

**Biofunktionalisierung oxidischer
Titanoberflächen über eine spezifische
Anbindung von biotinyliertem Fibronectin
für die medizinische Anwendung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Michael Lehnert,

Geb. am 06.07.1981 in Recklinghausen

Mainz, November 2011

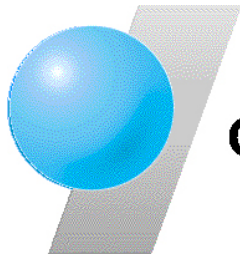
Dekan:

1. Berichterstatter:

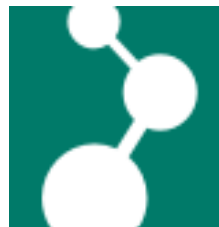
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.02.2012

Die vorliegende Arbeit wurde extern im Rahmen einer kooperativen Promotion durchgeführt. Die experimentellen Arbeiten fanden im Labor für Biophysik der Fachhochschule Gelsenkirchen (ab 01.03.2012 Westfälische Hochschule) am Standort Recklinghausen statt.



**Fachhochschule
Gelsenkirchen**



*„Die Kenntnis der Ursachen bewirkt die Erkenntnis der Ergebnisse.“
(Cicero, Topica)*

*„Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung.“
(Charles Darwin)*

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einführung	1
1.1 Titan als Implantatmaterial	1
1.1.1 Ablauf der Implantatintegration	2
1.1.2 Probleme bei Implantaten.....	4
1.1.3 Physikalische und chemische Oberflächenmodifizierungen.....	5
1.2 Bioaktivierung von Titanoberflächen	6
1.2.1 Problem Proteinmischschicht und bioinerte Oberflächen.....	7
1.2.2 Spezifische Oberflächenaktivierung bioinertter Schichten	10
1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung	12
Kapitel 2: Grundlagen	15
2.1 Oberflächenplasmonen-Spektroskopie	15
2.1.1 Anregung von Oberflächenplasmonen	15
2.1.2 SPR-Spektroskopie	18
2.2 Oberflächenplasmonen-Fluoreszenz-Spektroskopie	23
2.2.1 Fluoreszenzprozess	23
2.2.2 Quenchingprozesse an der Oberfläche.....	26
2.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)	28
2.4 Chemisorption von Silanen auf oxidische Oberflächen	33
2.5 Das Streptavidin-Biotin-System	35
2.6 Fibronectin	38
Kapitel 3: Experimentelle Methoden	45
3.1 SPR-Spektrometer	45
3.2 SPF-Spektrometer	49
3.3 AFM	50
3.4 Weitere Geräte	52
Kapitel 4: Überprüfung des Wirkungsprinzips	55
4.1 Bioaktivierung von Oberflächen über Streptavidin	55
4.2 Materialien und Methoden	59
4.3 Ergebnisse und Diskussion	65
4.3.1 Streptavidin-Adsorption an Biotin-modifizierte TiO _x -Oberflächen.....	65
4.3.2 Adsorption von Fibronectin	66
4.3.3 Zelltests	70
4.4 Konklusion	75
Kapitel 5: Analyse der Streptavidin-Monolage auf TiO_x	77
5.1 Aufbau der Streptavidin-Monolage über Sulfo-NHS-LC-Biotin	77

5.2 Materialien und Methoden	79
5.3 Ergebnisse und Diskussion	82
5.3.1 Silanisierung der Titanoxid-Oberfläche	82
5.3.2 Aufbau der Streptavidin-Monolage über Sulfo-NHS-LC-Biotin	84
5.3.3 Struktur der Streptavidin-Monolage.....	87
5.3.4 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten	90
5.4 Konklusion	92
Kapitel 6: Analyse der Fibronektinadsorption	95
6.1 Fibronektinkonformation und Biotinylierung	95
6.1.1 Unterschiedliche Konformationen von Fibronektin.....	95
6.1.2 Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Proteinen	98
6.2 Material und Methoden	99
6.3 Ergebnisse und Diskussion	103
6.3.1 SPR-spektroskopische Analyse der Adsorption von Fibronektin.....	103
6.3.2 AFM-Untersuchungen der Konformation von nativem Fibronektin auf Titanoberflächen.....	110
6.3.3 AFM-Untersuchungen der Konformation von bFn, angebunden an das Streptavidin-Schichtsystem auf TiO _x -Oberflächen.....	116
6.4 Konklusion	124
Kapitel 7: Multilayersystem	125
7.1 Layer-By-Layer-Multilayersysteme	125
7.2 Material und Methoden	128
7.3 Ergebnisse und Diskussion	130
7.3.1 Aufbau und SPFS- Analyse des Multilayersystems	130
7.3.2 Langzeitstabilität des Multilayersystems in Abhängigkeit des DOLs von bFn	136
7.4 Konklusion	138
Kapitel 8: Zusammenfassung und Ausblick	143
Zusammenfassung.....	143
Ausblick	144
Anhang	147
Literaturverzeichnis.....	147
Abkürzungsverzeichnis.....	159
Abbildungsverzeichnis	162
Tabellenverzeichnis.....	165
Danksagung	167
Ergänzende Messungen	168
Lebenslauf.....	174

Kapitel 1: Einführung

1.1 Titan als Implantatmaterial

In den letzten Jahrzehnten hat sich Titan als eines der meistgenutzten Implantatmaterialien bewährt. Kommerzielles Titan (engl.: commercially pure Ti/ cp Ti) ist das am häufigsten eingesetzte Material für Knochenimplantate und gilt in diesem Bereich weiterhin als orthopädischer Standard. Insbesondere im Bereich der Dentalimplantate ist es mit über einer Million Implantaten pro Jahr und einer Osseointegrationsquote von ca. 95 % der weltweit erfolgreichste Werkstoff. [Kas83, LeG07, DeJ08, Ros05, Kan09, Ray09]

Der Grund für diesen Erfolg findet sich in der hohen biologischen Kompatibilität des Materials. Dies liegt weniger an den metallischen Eigenschaften des Bulkmaterials selbst, sondern in erster Linie an einer sich spontan ausbildenden Oberflächenoxidschicht, welche einen eher keramischen Charakter aufweist. Titan ist hier als Kompositmaterial zu sehen. Sobald es Luft oder Wasser (z. B. in Körperflüssigkeiten) ausgesetzt wird, kommt es zur Einlagerung von Sauerstoffatomen in das Metall. Diese Schicht erreicht eine Tiefe von 3 bis 10 nm und besitzt einen Sauerstoffgradienten, der mit zunehmender Eindringtiefe abnimmt. Auch wenn es innerhalb der Oxidschicht zu unterschiedlichen Stöchiometrien kommt, wird verallgemeinernd zumeist von einer Titandioxid-Oberfläche (TiO_2 -Oberfläche) gesprochen, da dies die stabilste Form von Titanoxiden ist. Diese Oxidschicht schützt Titan vor Korrosion, was die Biokompatibilität gegenüber anderen Metallen enorm steigert. Zusätzlich bewirkt die metallische Härte ein verbessertes Einwachsen des Implantats. Der direkte Kontakt zum Knochen wird so gefördert und der Weichgewebekontakt, welcher zu einer Lockerung des Implantats führen kann, unterbunden. [Kas83, DeJ08, Ros05]

1.1.1 Ablauf der Implantatintegration

Der Prozess der Zelladsorption an dentalen Implantatoberflächen ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Die Eigenschaften der Titanoxidoberfläche wirken sich hier ebenfalls auf die Integration des Implantats in den Knochen aus, indem diese die Adsorption von H_2O , Ionen und Biomolekülen wie Proteinen an der Implantatoberfläche beeinflusst, was sich wiederum auf die Adhäsion von Zellen auswirkt: Nach Ausbildung der Oxidschicht und Implantation kommt es zunächst zur Anlagerung von H_2O -Molekülen an der TiO_2 -Oberfläche. Diese können sich als Mono- oder als Bilayer anlagern, je nach Zusammensetzung der Oxidschicht. Im zweiten Schritt lagern sich Ionen an der Implantatoberfläche an. Welche Ionen sich anlagern, hängt erneut von den Oberflächeneigenschaften und der ausgebildeten H_2O -Schicht ab. Anschließend adsorbieren körpereigene Proteine an die ausgebildete Hydrathülle. Dieser Adsorptionsprozess ist, im Vergleich zur Adsorption von Proteinen an körpereigenem Gewebe, weitestgehend ungerichtet und unspezifisch. Als Folge kommt es zur Ausbildung einer Proteinmischschicht, deren dynamische Zusammensetzung durch die Schicht aus Ionen und H_2O -Molekülen beeinflusst wird. Diese Proteinmischschicht dient nun als Substrat für die im nächsten Schritt erfolgende Adhäsion von Zellen. Neben der Adsorption von Knochenzellen (Osteoblasten) kommt es im Knochen vor allem zur Adsorption von mesenchymalen Stammzellen. Hierbei handelt es sich um multipotente Zellen, die u. a. zu Osteoblasten differenzieren können. Diese Differenzierung wird zum einen durch den Kontakt zu bereits adsorbierten Osteoblasten gefördert, zum anderen über die Proteinschicht auf dem Implantat beeinflusst. Zellen interagieren mit dieser Schicht mithilfe von membranständigen Rezeptorproteinen, die als Integrine bezeichnet werden. Diese Neuadsorption von Zellen ist somit der initiale Schritt zur Gewebeneubildung. [Kas99, Ran05, DeJ08, Shi04]

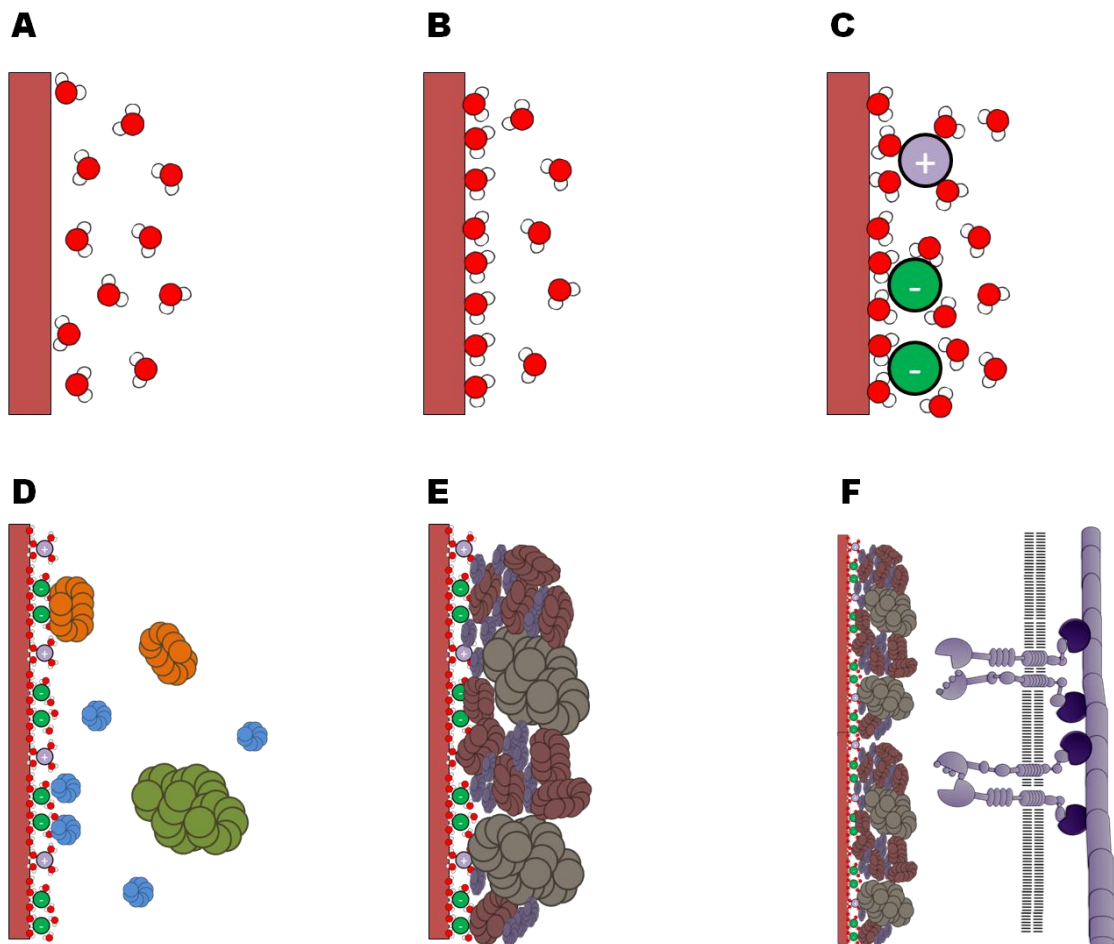


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Prozesse an der Gewebe-Implantat-Grenzfläche nach der Implantation eines Dentalimplantates in den Knochen. A: H₂O-Moleküle physisorbieren an die TiO₂-Oberfläche. B: Ausbildung eines Mono- oder Bilayers von H₂O-Molekülen an der TiO₂-Oberfläche. C: Ionen werden hydratisiert und lagern sich in die H₂O-Schicht ein. D: Einlagerung von Proteinen in die Hydrathülle. E: Die verstärkte Einlagerung von Proteinen führt zur Ausbildung einer Proteinmischschicht. F: Zellen erreichen Oberfläche und treten mit Proteinen der Proteinmischschicht in Wechselwirkung. Abbildung nach [Kas99].

Die Funktion der Osteoblasten besteht im Aufbau des Knochens. Hierzu synthetisieren sie die extrazelluläre Matrix (ECM) des Knochengewebes, die aus Proteinen und einer Mineralphase aus Hydroxylapatitnanokristallen besteht. 90 % der Proteine sind Collagenfasern, welche strukturgebende Eigenschaften besitzen. Weiterhin besitzen diese Fasern Bindestellen für Adhäsionsproteine, wie z. B. Fibronectin (Fn). Diese vermitteln u. a. die Adhäsion von Zellen und nehmen somit eine zentrale Rolle in der ECM ein (siehe Kapitel 2.6). In diese kalzifizierte Matrix sind Osteoblasten ebenfalls eingebettet und formen so eine durchgehende Schicht auf der Knochenoberfläche [DeJ08]. Durch den Kontakt von Osteoblasten zu neu adsorbierten mesenchymalen Stammzellen wird de-

ren Proliferation und Differenzierung zu weiteren Osteoblasten (Osteoinduktion) verbessert. Weiterhin bewirkt der Kontakt von Osteoblasten des angrenzenden Knochengewebes zu adhäranten Osteoblasten auf der Implantatoberfläche eine erhöhte Akzeptanz des Knochens für das Implantat. Zellen des Knochengewebes migrieren auf das Implantat und wachsen in dessen Oberflächenstrukturen hinein (Osteokonduktion). So bildet sich eine mechanisch solide Grenzschicht zwischen Knochen und Implantat ohne störende Weichgewebsschicht aus. Die Ausbildung einer fibrillären Zwischenschicht kann hingegen zum Verlust des Implantats führen. [DeJ08, Ran05, LeG07, Eng05]

1.1.2 Probleme bei Implantaten

Nach wie vor kommt es bei 5 % der gesetzten Implantate zu keiner erfolgreichen Integration und zu einem Implantatverlust [LeG07]. Ferner sind 95 % der Implantationen zwar erfolgreich, dennoch dauert es mehrere Wochen bis Monate, bis das Implantat eingewachsen ist, was gerade bei dentalen Implantaten für den Patienten sehr belastend sein kann. Insbesondere wenige Wochen nach der Implantation kommt es zu einer kritischen Phase im Einheilungsprozess. Nach Setzen des Implantats wird dieses zunächst über die mechanische Verankerung zum alten Knochen im Gewebe gehalten. Dessen Knochensubstanz nimmt nach einer Woche rapide ab. Gleichzeitig kommt es zur Knochenneubildung. Allerdings dauert es mehrere Wochen bis ausreichend Knochensubstanz gebildet wurde, um das Implantat zu stabilisieren. Als Folge tritt 2 bis 4 Wochen nach der Implantation eine Stabilitätslücke auf (Abb. 1.2) [Ran05]. Könnte die Osseointegration verbessert bzw. beschleunigt werden, würde sich die entstehende Lücke verkleinern. Aus diesem Grund ist für eine erfolgreiche Integration des Implantats die Aktivität adhäranter Osteoblasten wichtig. Das Titanimplantat selbst wird zum größten Teil über seine mechanische Verzahnung im Knochen stabilisiert. Eine starke und dichte Adhäsion des Knochengewebes an das Implantat bzw. eine chemische oder biochemische Bindung zum Knochen wurde aufgrund der biologischen Inertheit von Titan, bedingt durch die oxidische Oberfläche, bisher nicht erreicht. Eine spezifische Aktivierung auf molekularbiologi-

sche oder biophysikalische Weise ist bisher noch nicht gelungen. [Kan09, LeG07, Ran05]

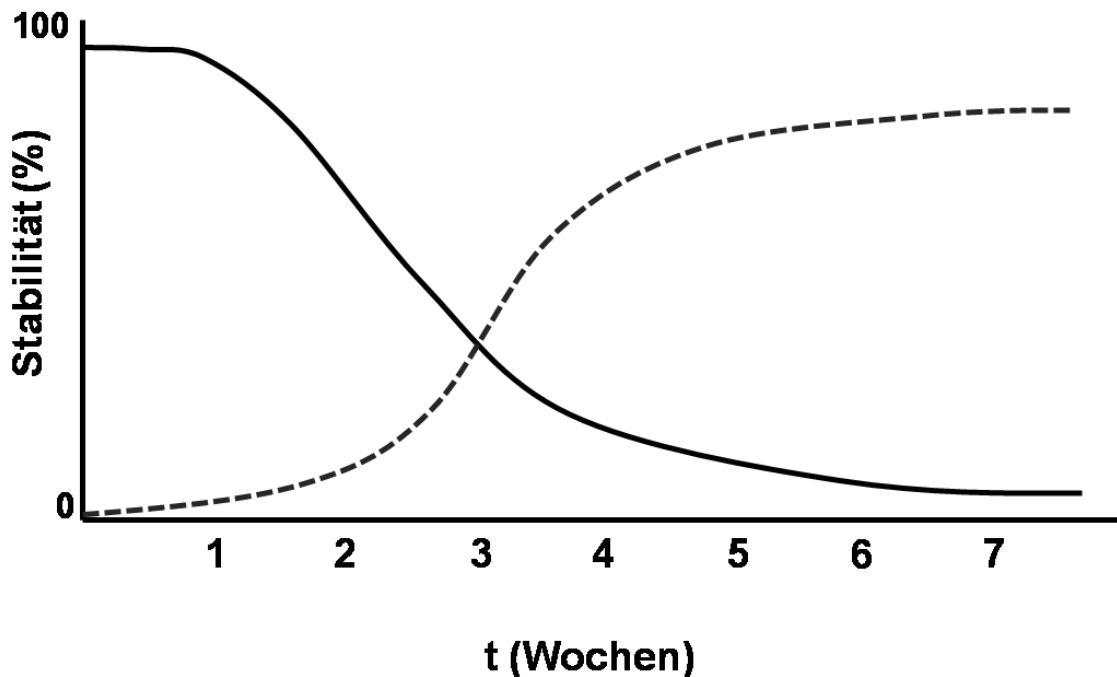


Abb. 1.2: Stabilitätsverlauf eines eingesetzten Implantats. Aufgetragen ist die Stabilität des Implantats, erzielt durch das alte (durchgezogene Linie) und neu aufgebaute (gestrichelte Linie) Knochengewebe, gegen die Zeit in Wochen. Zwischen der zweiten und vierten Woche entsteht eine Stabilitätslücke, wodurch es zu einer kritischen Phase im Einheilungsprozess kommt. Nach [Ran05].

1.1.3 Physikalische und chemische Oberflächenmodifizierungen

Ein physikalisches Verfahren zur Verbesserung der Osseointegration kommerzieller Dentalimplantate ist das Anrauen der Oberfläche im Mikrometerbereich. Durch dieses Verfahren wird die mechanische Stabilität des Implantats im Knochen erhöht. Dies bewirkt eine frühzeitige Fixierung und eine erhöhte Langzeitstabilität. Allerdings begünstigt eine raue Oberfläche zugleich das Anhaften von Mikroorganismen an der Oberfläche und steigert so die Gefahr einer Periimplantitis. Eine weitere physikalische Modifizierungsmethode ist das Erstellen von superhydrophilen Oberflächen, die das Einheilen ebenfalls positiv beeinflussen sollen. Studien zu diesem Thema zeigen allerdings bisher widersprüchliche Ergebnisse. Einige bestätigen eine Verbesserung des Einheilungsprozesses, andere können jedoch keinen Effekt nachweisen [LeG07]. Ein weiterer Lö-

sungsansatz ist die Applikation einer biomimetischen Schicht, beispielsweise durch das Aufbringen anorganischer Calciumphosphat (CaP)-Schichten auf Dentalimplantate, die der natürlichen Zusammensetzung des Zahns ähnelt. Trotz einer erhöhten Osseointegration ist die generelle Akzeptanz solcher Schichten gering, da sie sogar innerhalb derselben Charge große Qualitätsschwankungen aufweisen. Zusätzlich sind sie zumeist nicht geschlossen, sondern porös, und besitzen eine erhöhte Grenzflächenspannung, die zur Ablösung der anorganischen Schicht vom Implantat führt. Neben den rein anorganischen Schichten wird ebenfalls versucht Kompositschichten, bestehend aus CaP, Collagen und Proteinen, aufzubringen. Ein generelles Problem dieser Art von Beschichtung ist, dass anorganische Schichten meist bei hohen Temperaturen und unter unphysiologischen Bedingungen appliziert werden, sodass Collagen und Proteine nachträglich hinzugefügt werden müssen. Hierbei kommt es meist zu einer zu schnellen und unkontrollierten Abgabe dieser Komponenten an die Umgebung, dem sogenannten Burst. [LeG07, DeJ08]

1.2 Bioaktivierung von Titanoberflächen

Alternativ zu anorganischen Beschichtungen kann über eine gezielte Immobilisierung von Biomolekülen wie Proteinen, einzelnen Peptidsequenzen oder Wachstumsfaktoren, eine nanoskalige, biomimetische Schicht auf TiO₂-Oberflächen erzeugt werden, um so eine adhäsionsverstärkende Wirkung zu erzielen. *Böing* hatte zu diesem Zweck den Wachstumsfaktor „Bone Morphogenetic Protein 2“ (BMP-2), das Adhäsionsprotein „Fn“ und das Tripeptid „RGD“ auf aminoaktivierten Titanoberflächen kovalent immobilisiert [Böi03]. Das Tripeptid besteht aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparagin und wird im Allgemeinen als RGD oder RGD-Sequenz bezeichnet. Diese ist die primäre Bindestelle für Integrine innerhalb von Fn. *Auernheimer* nutzte ebenfalls über einen Phosphatanker auf TiO₂-Oberflächen immobilisierte RGD-Sequenzen, um deren Bioaktivität zu steigern [Aue05]. Der Wachstumsfaktor BMP-2 ist ein weiteres Protein, das häufig zur Steigerung der Osseointegration

eingesetzt wird. Insbesondere in Kombination mit Collagen oder Calciumphosphat zeigt auf Titan immobilisiertes BMP-2 eine erhöhte Knochenbildungsrate [DeJ08]. Hier tritt allerdings häufig das Problem der unkontrollierten Freigabe des Wirkstoffes an die Umgebung auf [LeG07]. Weiterhin besteht eine Verbindung zwischen dem Einsatz von BMP-2 in hohen Konzentrationen und der Bildung von Tumoren, was eine Verwendung problematisch macht [Rai05, Ste08]. Eine weitere Art der Bioaktivierung von Implantaten besteht im Aufbringen künstlicher Membranen. *Rossetti et al.* zeigten, dass über das Aufbringen von Siliziumdioxid-Nanopartikeln (SiO_2 -Nanodots) und dem Einsatz von unterschiedlichen künstlichen Membranen, die über Phosphatanker immobilisiert wurden (Supported-Phosphated-Bilayer), eine selektive Aktivierung von Titan mit unterschiedlichen Liganden möglich ist [Ros05]. Allerdings ist der Einsatz auf Implantatoberflächen aufgrund der geringen Stabilität von Lipidmembranen gegenüber Scherkräften äußerst unwahrscheinlich. Darüber hinaus gibt es Ansätze mit weiteren Proteinen wie „Bovines Serum Albumin“ (BSA) oder Enzyme wie der „Alkalischen Phosphatase“ (AP), um eine verbesserte Osseointegration zu erreichen. [DeJ08, Oka98]

1.2.1 Problem Proteinmischschicht und bioinerte Oberflächen

Die meisten der im vorherigen Abschnitt genannten Modifizierungen zeigen bei Zelladhäsionstests auf idealisierten Modelloberflächen eine Verbesserung der Osteoblastenadhäsion. Das Entstehen einer Proteinmischschicht bei Kontakt der Oberfläche mit Körperflüssigkeiten wie Blut, welche die biomimetische Schicht überdecken würde, wird hier allerdings nicht berücksichtigt. Diese Proteinmischschicht stellt in der Praxis ein großes Problem dar. Zellen reagieren bei der Adhäsion zumeist stark unspezifisch auf diese Schicht an der Implantatoberfläche. Wie bereits erwähnt, wird ihre Zusammensetzung auch über die Oberflächeneigenschaften des Implantats bestimmt. Da die Proteinadsorption hier nicht gezielt gesteuert wird, unterscheidet sich die Schichtzusammensetzung grundlegend von der der ECM. Um eine optimale Zelladhäsion und Gewebeintegration zu erreichen, dürften nur bestimmte Proteine, beispielsweise Zelladhäsionsproteine der ECM, in aktiver Konformation adsorbieren. Dies

ist bei der spontan ausgebildeten Proteinmischschicht jedoch nicht der Fall. Viele Proteine der Schicht besitzen keinerlei adhäsionsfördernde Wirkung. Des Weiteren können die Proteine falsch orientiert oder sogar denaturiert sein. Die Dynamik der Schichtzusammensetzung erschwert die Erkennung durch membranständige Integrine adhärierender Zellen zusätzlich. Die Mischschicht unterscheidet sich stark in ihrem Aufbau von dem der ECM. Hierdurch wird die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten bzw. pluripotenten mesenchymalen Stammzellen aus dem Blut negativ beeinflusst. Im Vergleich zur ECM (der natürlichen Umgebung von Osteoblasten) läuft die Zelladhäsion daher ungerichtet und unkontrolliert ab, was wiederum das Entstehen einer biochemischen Bindung zwischen Implantat und Knochengewebe erschwert. Darüber hinaus wird eine solche Schicht nicht vom Immunsystem erkannt oder sogar als fremd eingestuft, wodurch es zur fibrösen Einkapselung des Implantats kommen kann. Dies verschlechtert die Integration zusätzlich, sodass das Implantat nur über eine mechanische Verankerung im Knochen stabilisiert wird. [Bru01, Hua01, Mic02, Dal05, Ran05, DeJ08, Kan09, Ray09]

Zusätzlich kann die unkontrollierte Agglomeration von Proteinen zu Infektionen führen, die sich negativ auf das Einheilverhalten auswirken, da diese ebenfalls die bakterielle Adhäsion fördern [Gri88]. Eine reine Titanoberfläche würde dieses Problem nicht lösen, da Osteoblasten auf diesen Oberflächen langfristig nicht stabil adhären [Oka98].

Die oben aufgeführten Punkte führen zu einem weiteren Anspruch an biomimetische Implantatmodifizierungen, einer biologisch inerten Ausgangsoberfläche. Um sicherzustellen, dass das immobilisierte Protein bzw. Peptid einen spezifischen Effekt bei der Zelladhäsion hervorruft und dieser nicht durch die unspezifische Adsorption von weiteren Proteinen beeinflusst wird, muss die Oberfläche ohne Aktivierung ein biologisch inertes Verhalten zeigen. Sie muss die Adsorption von Proteinen unterbinden, um so die unspezifische Adhäsion von Zellen und von Gewebe zu verhindern. Oberflächen, die diese Eigenschaften erfüllen, werden als Blank-Oberflächen bezeichnet. Erst durch die spezifische Immobilisierung eines Biomoleküls darf sich dieses antiadhäsive Verhalten entsprechend der Eigenschaften des Biomoleküls ändern (Abb. 1.3). [Mic02, Hua01, Dal05, Ray09]

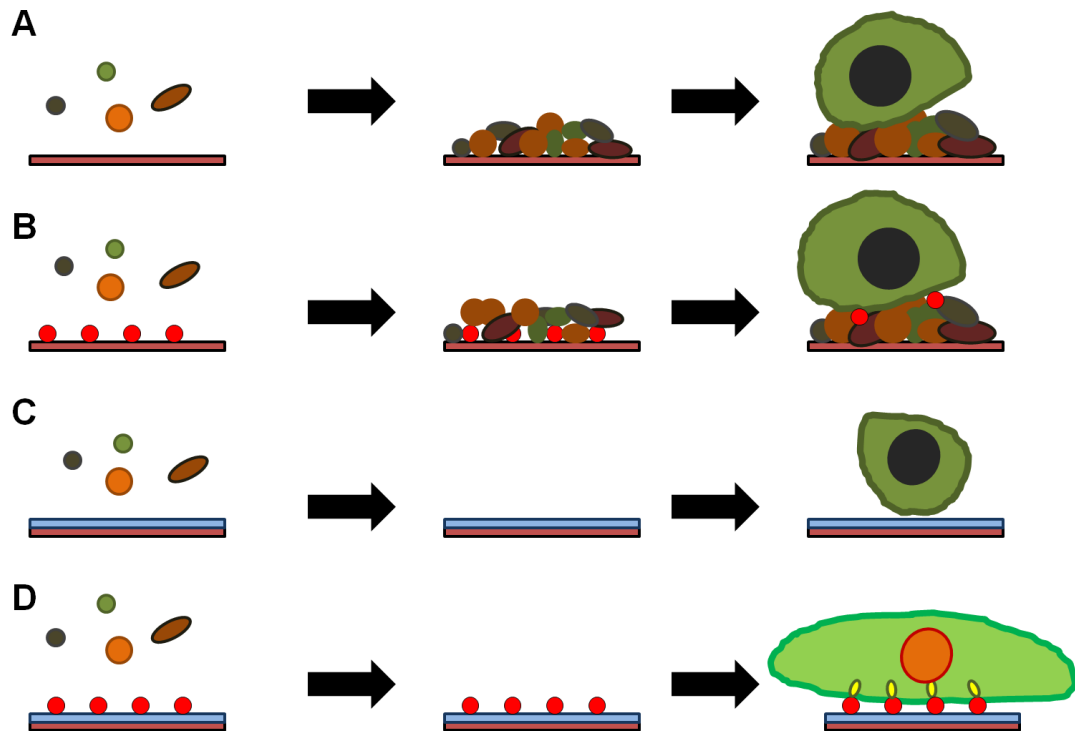


Abb. 1.3: Unterschiedliche postimplantäre Abläufe an Titanimplantatoberflächen, je nach Oberflächenfunktionalisierung. (A): Reine Titanoberflächen in Kontakt mit Körperflüssigkeiten werden schnell mit einer Proteinmischschicht bedeckt. Die Proteine innerhalb dieser Schicht sind oft denaturiert und unterschiedlich orientiert. Weiterhin adsorbieren hier nicht nur Adhäsionsproteine. Zelluläre Reaktionen auf solche Beschichtungen sind zumeist unspezifisch. (B): Ein identisches Bild zeichnet sich ebenfalls bei Beschichtungen mit Biomolekülen (Adhäsionsproteinen) ab. Die Schicht wird bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten ebenfalls instantan mit einer Proteinmischschicht bedeckt, welche den eigentlichen Effekt negativ beeinflusst. (C): Das Aufbringen einer antiadhäsiven Oberflächenbeschichtung verhindert die unspezifische Proteinadsorption und somit die Adhäsion von Zellen und Gewebe. (D): Optimal ist eine Kombination aus antiadhäsiver Beschichtung mit adhäsionsfördernden Proteinen. Durch die antiadhäsive Beschichtung wird gewährleistet, dass adhärierende Zellen ausschließlich auf die angebondenen Proteine reagieren und so eine spezifische Reaktion sichergestellt.

Um Oberflächen wie z. B. TiO_2 -Oberflächen antiadhäsive Eigenschaften zu verleihen, werden zumeist auf Ethylenglykol (EG) basierende Modifizierungen eingesetzt. Solche Beschichtungen lassen sich z. B. in Form einer Monolage applizieren. Sie verhindern Zelladhäsion, indem sie die Adsorption von Proteinen unterbinden. [Gna07, Ray09]

Dies gelingt zum einen durch die durch EG-Ketten verursachte sterische Repulsion [Jeo91, Bjö92]. Gleichzeitig verstärkt sich das proteinabweisende Verhalten mit der Anzahl an Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den EG-Gruppen der Beschichtung und den H_2O -Molekülen des umgebenden Mediums ausbilden [Per00]. Damit Proteine an eine Oberfläche physisorbieren können, müssen H_2O -Moleküle von der Oberfläche verdrängt werden. Je mehr Wasserstoffbrücken vorhanden sind, desto schwerer fällt diese Verdrängung. Oberflächenmodifizierungen mit Kohlenhydraten zeigen daher vergleichbare Eigenschaften. Neben Monolagen besitzen auch aus EG oder abgeleiteten Verbindungen aufgebaute Polymere diese antiadhäsiven Eigenschaften. Ein proteinabweisender Effekt konnte somit bereits bei unterschiedlichsten Polymeren wie etwa PLL-g-PEG, mPEG-DOPA, pPEGMA, Star-PEG oder Poly(OEGMA) nachgewiesen werden. [Hun01, Dal05, Kan09, Gna07, Eng05]

1.2.2 Spezifische Oberflächenaktivierung bioinertter Schichten

Um eine Adhäsionsverstärkung hervorzurufen, kann eine antiadhäsive Beschichtung durch zusätzliche Immobilisierung biologischer Liganden spezifisch aktiviert werden. Zellreaktionen treten nun ausschließlich aufgrund dieser Modifizierungen auf [Mic02, Gna07]. Hierbei können unterschiedliche Liganden zum Einsatz kommen. *Dalsin et al.* modifizierten beispielsweise eine TiO_2 -Oberfläche mit einer mPEG-DOPA-Polymerbeschichtung, um ihr einen proteinabweisenden Charakter zu verleihen [Dal05]. Anschließend immobilisierten sie 3,4-dihydroxyphenylalanin, das Kernpeptid von Muscheladhäsionsproteinen, um einen spezifischen Effekt hervorzurufen. *Engelhardt* nutzte ein Polymer aus sechsarmigen PEG-Ketten, um bei TiO_2 -Oberflächen ein antiadhäsives Verhalten zu erzeugen [Eng05]. Anschließend wurden zyklische und lineare RGD-

Sequenzen hinzugegeben. Hierbei zeigte sich, dass zyklische RGD-Sequenzen effektiver die Zelladhäsion fördern als lineare.

Eine wichtige Studie zu der Oberflächenaktivierung über Fn veröffentlichten u. a. *Raynor et al.* In dieser wurden unterschiedliche Oberflächen, darunter auch TiO_2 , mit verschiedenen proteinabweisenden Beschichtungen modifiziert, um eine biologisch inerte Oberfläche zu erhalten. Zu diesen Beschichtungen zählten u. a. ein OEG-SAM sowie ein Poly(OEGMA)-Polymer. Anschließend wurden die verschiedenen Beschichtungen mit unterschiedlichen, von Fn abgeleiteten Biomolekülen weitermodifiziert, um zu analysieren, wie diese sich auf die Zelladhäsion und Osseointegration auswirken. Bei diesen Biomolekülen handelte es sich um RGD, RGD in Kombination mit „PHSRN“ sowie einem Tetramer, bestehend aus den Fn Typ-3-Modulen 7-10. „PHSRN“ ist ein spezieller Sequenzabschnitt von Fn, der intramolekular in synergetische Wechselwirkung mit RGD tritt und so die Integrinbindung verbessert. Die Fn Typ-3-Module 7-10 simulieren die natürliche Umgebung von RGD innerhalb von Fn. So wird eine Modifizierung der Oberfläche mit Fn simuliert, bei der die zelladhäsionsfördernde Wirkung auf diese vier Module reduziert werden kann.¹ Als Ergebnis zeigte sich vor allem bei einer Oberflächenmodifizierung mit Fn im Vergleich zu einer Modifizierung mit RGD sowie RGD mit PHSRN eine Verstärkung der Zelladhäsion. Bei Fn-modifizierten Oberflächen wird die Zelladhäsion über $\alpha_5\beta_1$ -Integrine vermittelt, bei den anderen Modifikationen über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine. [Ray09]

Die Aktivierung von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen wirkt sich positiv auf die Zelladhäsion aus, da diese Integrine u. a. eine Apoptose bei Osteoblasten verhindern [Duf07]. Gleichzeitig zeigte sich bei mesenchymalen Stammzellen (MC3T3-E1-osteoblast like cells) auf Fn-modifizierten Oberflächen eine verstärkte Osteoinduktion. Dies konnte anhand einer gesteigerten Expression der beiden Markerproteine „Runx related transcription factor 2“ (Runx2) und AP nachgewiesen werden. In-vivo-Studien mit Titanimplantaten, modifiziert mit Poly(OEGMA) und Fn, zeigten zudem eine stärkere mechanische Verankerung durch erhöhte Bildung von Knochensubstanz. [Gar99a, Ste02, Ray09]

¹ Tatsächlich besitzt Fn entlang seiner Achse weitere Proteinbindungsstellen, siehe Kapitel 2.6.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen weiterer Studien [Cut03, Aue05, Oka98]. Aus diesem Grunde sollte Fn und nicht RGD allein genutzt werden, um eine optimale Adhäsion und osteoblastäre Aktivität von Zellen an der Oberfläche zu erzielen. Zusätzlich besitzt Fn, je nach Substrat auf dem es immobilisiert wird, unterschiedliche osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften [Gar99a, Ber03, Ste02]. Der Grund hierfür beruht auf den verschiedenen Konformationen, welche Fn je nach Oberflächenchemie annimmt [Mic03, Gar99b, Ber03].

Eine weitere Möglichkeit zur spezifischen Bioaktivierung antiadhäsiver Schichten ist das Biotin-Streptavidin-System. Streptavidin ist ein tetrameres Protein mit vier Bindestellen für Biotin. Hierdurch fungiert es als Kopplungsreagenz für die Immobilisierung von biotinylierten Biomolekülen an Biotin-modifizierte Oberflächen (siehe Kapitel 2.5). Bisher fand dieses System in erster Linie im Bereich der Biosensorik Anwendung. Es wird nun aber auch zunehmend für die spezifische Aktivierung von Biomaterialien genutzt. Meistens werden Polymere wie etwa PLL-g-PEG oder pPEGMA auf TiO₂ appliziert, um der Oberfläche einen proteinresistenten Charakter zu verleihen. In diese Polymere sind zusätzlich Biotinreste eingebaut, um eine Anbindung von Streptavidin zu ermöglichen. [Mic02, Hua02, Kan09]

1.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung einer biomimetischen Beschichtung für TiO₂-Implantat-Oberflächen auf Basis des Biotin-Streptavidin-Systems. Adhäsionsfördernde Proteine sollen über eine Streptavidin-Monolage spezifisch an die Oberfläche gebunden werden. Die Streptavidin-Schicht soll direkt, ohne den Einsatz einer antiadhäsiven Polymerbeschichtung, auf der TiO₂-Oberfläche entstehen. Die aufgebrachte Streptavidin-Monolage allein muss daher bereits ein antiadhäsives Verhalten gegenüber Proteinen und Zellen zeigen, um so eine biologisch inerte Ausgangsoberfläche für eine spezifische Aktivierung bereitzustellen. Bisher wurden solche Streptavidin-Monolagen auf TiO₂ noch nicht auf

eine antiadhäsive Wirkung, ähnlich der von EG-Beschichtungen, untersucht. Um die Adhäsion von Osteoblasten auf Basis dieser Beschichtung zu steigern, soll biotinyliertes Fn spezifisch auf der Streptavidin-Monolage immobilisiert werden. Es darf hier nicht zur Agglomeration von Fn auf der Oberfläche kommen, da dies ebenfalls die Adhäsion von Bakterien begünstigen könnte. Da bisher noch keine Erkenntnisse darüber vorliegen, inwieweit eine solche Beschichtung tatsächlich zu einer Steigerung der Zelladhäsion führt, soll dies weiterhin anhand der Adhäsion von Osteoblasten getestet werden. Zusätzlich sollte die fertige Beschichtung weitere Eigenschaften besitzen, damit sie auf Implantatoberflächen verwendet werden kann. Sie muss eine ausreichende Stabilität besitzen, leicht zu applizieren sein und sich über kommerziell gut zugängliche Chemikalien aufbauen lassen.

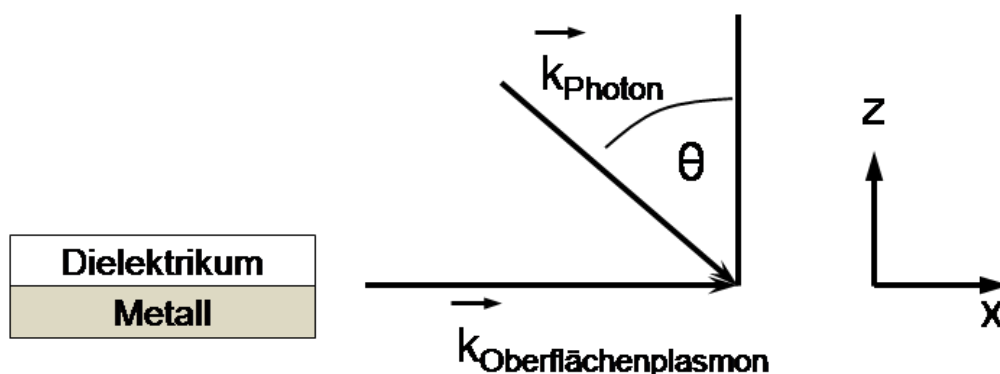
Kapitel 2: Grundlagen

2.1 Oberflächenplasmonen-Spektroskopie

2.1.1 Anregung von Oberflächenplasmonen

In Metallen existieren Elektronen in Form eines delokalisierten Elektronengases zwischen den einzelnen Atomkernen, in dem es zu Schwankungen der Elektronendichte kommen kann. An der Grenzfläche eines Edelmetalls zu einem Dielektrikum lassen sich diese Elektronendichteschwankungen über den Welleilchen-Dualismus als transversale Elektronenwellen beschreiben, welche Oberflächenplasmonen genannt werden. Diese Oberflächenplasmonen besitzen ein elektrisches Feld (E), das sowohl in Ausbreitungsrichtung (x) als auch orthogonal hierzu (z) exponentiell abfällt (Abb. 2.1). Es ist möglich, Oberflächenplasmonen über linear polarisierte (p-polarisierte) elektromagnetische Wellen anzuregen, wenn diese sowohl dieselbe Energie als auch denselben Impulswellenvektor besitzen. Dieser Prozess wird als Oberflächenplasmonenresonanz (engl.: Surface Plasmon Resonance, SPR) bezeichnet. Bei metallischen Schichten wie z. B. Gold (Au) oder Silber (Ag), wird eine solche Anregung in der Regel über Lichtwellen erreicht.

(A):



(B):

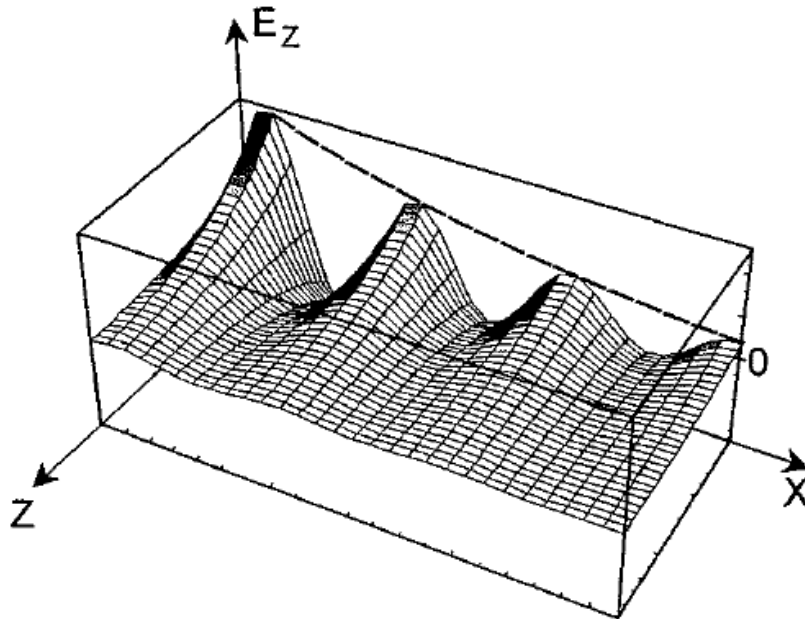


Abb. 2.1: A: Schematische Darstellung der Impulsvektoren (k) eines Oberflächenplasmons ($k_{\text{Oberflächenplasmon}}$) entlang einer Metall-Dielektrikum-Grenzfläche, das sich in x -Richtung ausbreitet und eines Photons (k_{Photon}), welches unter dem Einfallswinkel θ auf die Metall-Dielektrikum-Grenzfläche trifft. B: Schema des elektrischen Feldes eines Oberflächenplasmons, das sich in x -Richtung an einer Metall-Dielektrikum-Grenzfläche ausbreitet. Das elektrische Feld der Welle fällt in Ausbreitungsrichtung und in z -Richtung exponentiell ab. Entnommen aus [Kno98].

Um diesen Prozess zu verstehen, muss die Dispersionsrelation beider Wellen betrachtet werden. Diese ist ausschlaggebend dafür, ob sich ein Oberflächenplasmon durch Lichtwellen bzw. Lichtteilchen (Photonen) anregen lässt. Die Dispersionsrelation beschreibt das Verhältnis zwischen dem Impulsvektor der lateralen elektromagnetischen Welle in x -Richtung (k_x) und deren resultierender Energie (Abb. 2.2). Die Energie der Welle wird hier über die Kreisfrequenz ω beschrieben, wobei c die Lichtgeschwindigkeit ist und ν die Frequenz. Die optischen Eigenschaften der Grenzfläche fließen über die jeweiligen dielektrischen Konstanten (ϵ) mit ein.

$$\omega = 2\pi\nu = 2\pi \frac{c}{\lambda} \quad (2.1)$$

$$k_{\text{surfaceplasma}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (2.2)$$

$$k_{\text{photon}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \quad (2.3)$$

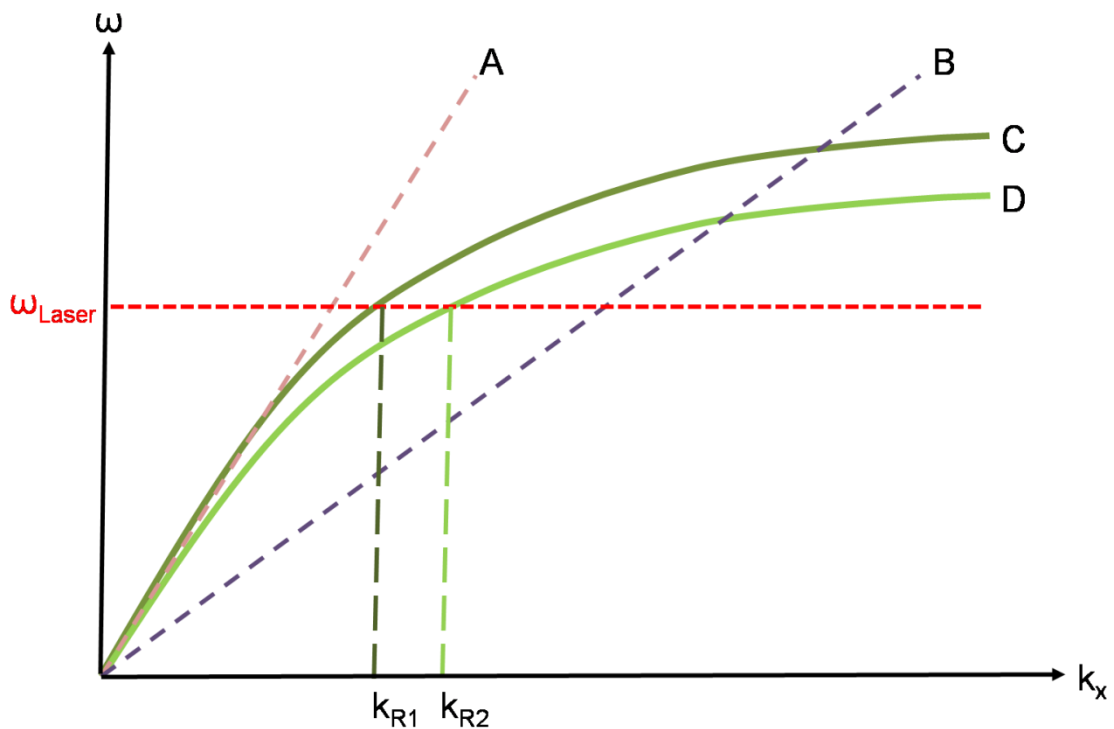


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Dispersionsrelationen unterschiedlicher elektromagnetischer Wellen an einer Goldoberfläche. A und B: Die Dispersionsrelation von Lichtwellen bei maximalem Einfallswinkel in Luft (A) und bei Durchlaufen eines Prismas (B). C und D: Die Dispersionsrelation eines Oberflächenplasmons vor (C) und nach (D) Adsorption einer Molekül-Monolage. ω_{laser} entspricht der Energie des eingesetzten Lasers. Wie sich zeigt, ist die Dispersionsrelation von Lichtwellen in Luft zu stark ansteigend, sodass sie die Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen nicht schneidet. Als Folge ist eine Anregung dieser erst nach dem Durchlaufen eines hochbrechenden dispersen Mediums möglich, da sich hierdurch ein Schnittpunkt beider Dispersionsrelationen ergibt. Da ω über den Laser festgelegt ist, erfolgt die Anregung der Oberflächenplasmonen bei einem bestimmten k_{R1} . Durch die Adsorption einer Molekül-Monolage auf der Goldoberfläche ergibt sich als Folge eine Verschiebung zu einem höheren k_{R2} . Nach [Kno98].

Wie sich zeigt, ist die Impulsvektorkomponente von einfallenden Photonen abhängig von den optischen Eigenschaften des Dielektrikums (ϵ_d), in dem sich die Lichtwellen ausbreiten (2.3). Das Oberflächenplasmon entlang einer metallisch-dielektrischen Grenzfläche (z. B. Gold-Glas) besitzt zusätzlich die dielektrische Konstante der Metallschicht (ϵ_m) als Parameter (2.2). Eine Anregung der Oberflächenplasmonen ist nur möglich, wenn deren Dispersionsrelation einen Schnittpunkt mit der Dispersionsrelation der Lichtwellen besitzt. Die Dispersionsrelation von Licht in Luft steigt jedoch zu stark an (Abb. 2.2, A), als dass sie die Dispersionsrelation eines Oberflächenplasmons (Abb. 2.2, C) schneiden könnte. Wie sich allerdings in Gleichung 2.3 zeigt, ist es möglich, die Dispersionsrelation von Lichtwellen herabzusetzen, indem das Licht ein disperses Medium, etwa ein Prisma aus hoch brechendem Glas, durchläuft (Abb. 2.2, B). Dieses Prinzip wird daher auch als Prismenkopplung bezeichnet. Schneiden sich die Kurven beider Dispersionsrelationen, ergibt sich als Folge eine Schnittfläche, die durch den maximalen Einfallswinkel des Lichts begrenzt wird. Innerhalb dieser Schnittfläche ist eine Anregung der Oberflächenplasmonen durch Lichtwellen nun prinzipiell möglich. Die benötigte Resonanzenergie beider Wellen ist über die Wellenlänge des eingesetzten Laserlichts (Abb. 2.2, ω_{Laser}) festgelegt. Da der Impulsvektor des Laserlichts abhängig von dessen Einfallswinkel (Θ) ist, kann über die Einstellung von Θ_{Resonanz} eine Kopplung der Lichtwellen an die Oberflächenplasmonen erreicht werden (2.4). Hier kommt es zur positiven Interferenz beider Wellen, wodurch die Lichtenergie auf die Oberflächenplasmonen übertragen und so deren elektrisches Feld verstärkt wird.

$$k_{\text{Prism}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \sin(\theta) \quad (2.4)$$

2.1.2 SPR-Spektroskopie

In der vorliegenden Arbeit werden Oberflächenplasmonen in *Kretschmann-Konfiguration* angeregt. P-polarisiertes Laserlicht einer festen Wellenlänge (z. B. 632.8 nm) wird auf ein Prisma aus hoch brechendem Glas (z. B. LaSFN9-Glas) gelenkt. Die Rückseite des Prismas ist in Kontakt mit einem dielektrischen

Medium, z. B. Wasser. An dieser Grenzschicht kommt es zur Reflexion des Laserstrahls. Der reflektierte Strahl wird auf einen Detektor gelenkt, wo dessen Intensität registriert wird. Ab dem kritischen Winkel kommt es zur Totalreflexion des Lichtes. Die Bedingungen hierfür ergeben sich über das *Snellius-Gesetz* unter Berücksichtigung der Brechungsindizes der jeweiligen Medien ($n_{\text{medium}} = \sqrt{\epsilon_{\text{medium}}}$):

$$n_1 \sin \Theta_1 = n_2 \sin \Theta_2 \quad (2.5)$$

Für den kritischen Winkel an einer Glas-Wasser-Grenzschicht gilt:

$$\sin \Theta_{\text{kritisch}} = n_{\text{Glas}} / n_{\text{Wasser}} \quad (2.6)$$

Da Lichtwellen stetig sind und somit in jedem Punkt differenzierbar sein müssen, kommt es als Folge der Totalreflexion zur Entstehung eines elektromagnetischen Photonenfeldes, das exponentiell im angrenzenden Medium abfällt und daher als evaneszentes Feld bezeichnet wird. Wird nun auf der Rückseite des Prismas eine ultradünne Metallschicht z. B. aus Gold oder Silber aufgebracht, können die Photonen des evaneszenten Feldes mit den Oberflächenplasmonen der Metallschicht in Wechselwirkung treten und diese anregen. An beiden Grenzflächen der metallischen Schicht entstehen Oberflächenplasmonen. Allerdings fällt das evaneszente Feld innerhalb des Glases zu stark ab, als dass hier die Lichtwellen effizient an die Oberflächenplasmonen koppeln könnten. Eine Anregung ist daher nur an der gegenüberliegenden Grenzschicht möglich. Aufgrund des quantenmechanischen Tunneleffekts ist es den Photonen, genauer genommen den Lichtwellen des evaneszenten Feldes, möglich, durch die ultradünne Metallschicht hindurch zu tunneln, sodass sich das Feld an der gegenüberliegenden Seite fortsetzt. Dies ist allerdings nur bei ultradünnen metallischen Schichten von ca. 50 nm Dicke möglich. Es kommt zur Überlagerung der elektromagnetischen Felder von Photonen des evaneszenten Feldes und Elek-

tronen der Metallschicht, wodurch die Kopplung einer Lichtwelle an ein Oberflächenplasmon ermöglicht wird. [Kno98]

In der Praxis wird meist nicht die Basis des Prismas direkt mit dem Metall bedampft, sondern ein Objektträger, der aus dem gleichen Glas gefertigt wurde wie das Prisma selbst. Dieser wird über Immersionsöl optisch auf die Basis des Prismas gesetzt. Das Prisma wird dann auf eine Durchflussmesszelle gesetzt, die mit unterschiedlichen Reaktionslösungen befüllt werden kann. Prisma und Messzelle sind zusammen mit dem Detektor an einer Motorsteuerung befestigt, über die der Einfallswinkel des Laserlichts gesteuert wird und so die Resonanzbedingungen erzeugt werden können (Abb. 2.3). Bei dem Winkel der Oberflächenplasmonenresonanz überträgt sich die Lichtenergie auf die Oberflächenplasmonen. Es kommt zu einer Abnahme der Intensität des reflektierten Lichtes. Beim Scannen der Reflektivität (R) eines Winkelbereichs entlang der Oberflächenplasmonenresonanz ergibt sich so ein charakteristisches Spektrum mit einem Minimum und einer Totalreflexionskante, über die sich die Schichtdicke der Metallschicht bestimmen lässt (Abb. 2.4, A). Die Kante der Totalreflexion ist bei einem Prisma mit metallischer Schicht kleiner als ohne, da diese als Spiegel wirkt und somit die Reflexion verstärkt.

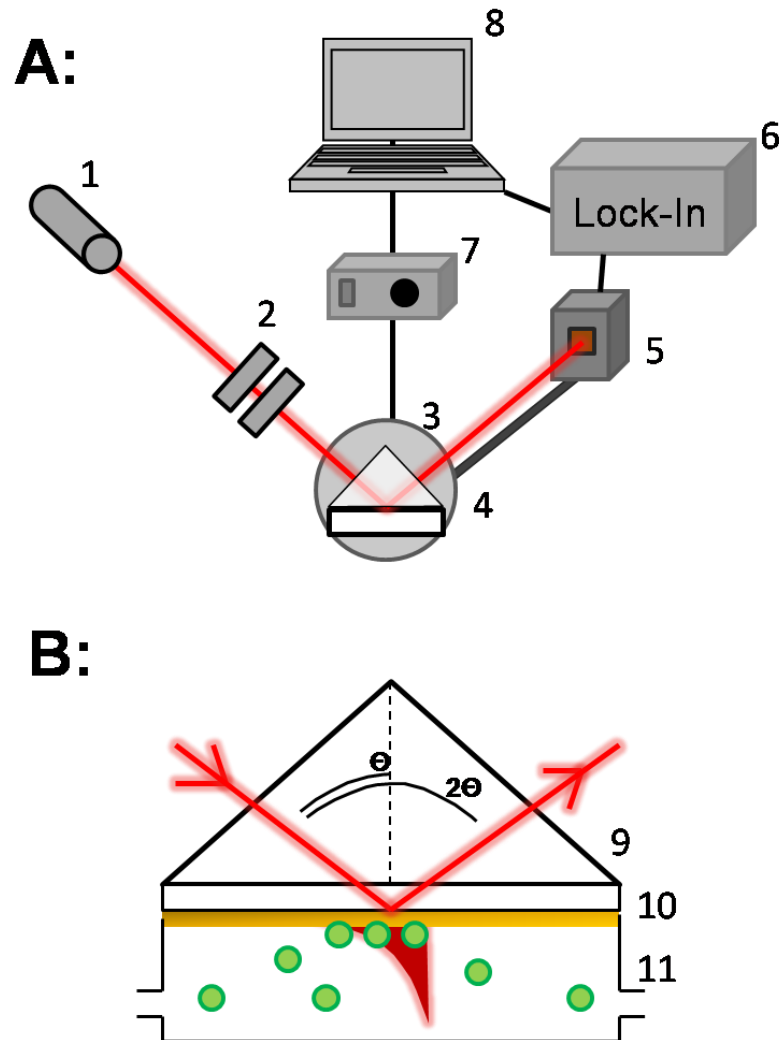


Abb. 2.3: A: Schematischer Aufbau eines SPR-Spektrometers. 1: Laser ($\lambda = 632.28 \text{ nm}$), 2: Polarisator, 3: Doppelgoniometer mit Detektorarm, 4: Prisma mit Messzelle, 5: Detektor, 6: Signalverstärker, 7: Motorsteuerung, 8: Computer. B: Prinzip der Prismenkopplung. 9: Prisma aus hochbrechendem Glas, 10: Glassubstrat mit aufgedampfter Metallschicht, das über Immersionsöl optisch auf das Prisma aufgesetzt wird. 11: Durchflusszelle aus Teflon für unterschiedliche Lösungsmittel und Adsorbate.

In Gleichung 2.3 wurde die Dispersionsrelation von Oberflächenplasmonen eines vereinfachten Systems betrachtet, das nur aus einem metallischen und dielektrischen Medium besteht. Tatsächlich ist diese Dispersionsrelation jedoch abhängig von sämtlichen an die Metallschicht angrenzenden Dielektrika und deren dispersen Eigenschaften. Mit zunehmenden Brechungsindizes dieser Dielektrika kommt es zu einer Änderung der Dispersionsrelation der Oberflächenplasmonen, was eine Verschiebung der Totalreflexionskante und der Oberflächenplasmonenresonanz zu höheren Impulsvektoren bzw. zu größeren Einfallswinkeln des polarisierten Laserlichtes bewirkt. Das Aufbringen einer

ultradünnen, dielektrischen Deckschicht auf die Metalloberfläche beeinflusst die Dispersionsrelation eines Oberflächenplasmons ebenfalls (Abb. 2.2, D) und bewirkt so eine Verschiebung des Resonanzwinkels (Abb. 2.4, A), allerdings ohne eine Verschiebung der Totalreflexionskante. Die Resonanzverschiebung nimmt für die Deckschichten linear zu ihrer optischen Schichtdicke zu, solange diese nicht größer als die Abfallslänge des Oberflächenplasmons im Dielektrikum ist (max. ca. 150 nm). Dieser Effekt ermöglicht es, bei Kenntnis des Brechungsindex bzw. der dielektrischen Konstante der Deckschicht, über die Verschiebung des Resonanzwinkels auf die Schichtdicke zu schließen und er bildet so die Grundlage der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Die Bestimmung der optischen Schichtdicke erfolgt durch einen Fit der gemessenen Reflektivität, in Abhängigkeit des Einfallswinkels an theoretische Daten. Diese sind für ein beliebiges Schichtsystem als Lösung der *Fresnel-Gleichungen* gegeben. Es muss berücksichtigt werden, dass bei einer SPR-Messung die ermittelte Schichtdicke nicht nur von Größe und Form des Adsorbats abhängig ist, sondern auch von dessen Oberflächenbedeckung. Gemessen wird stets ein Mittelwert, was bedeutet, dass niedrige Bedeckungsgrade eine geringere Winkelverschiebung verursachen als höhere.

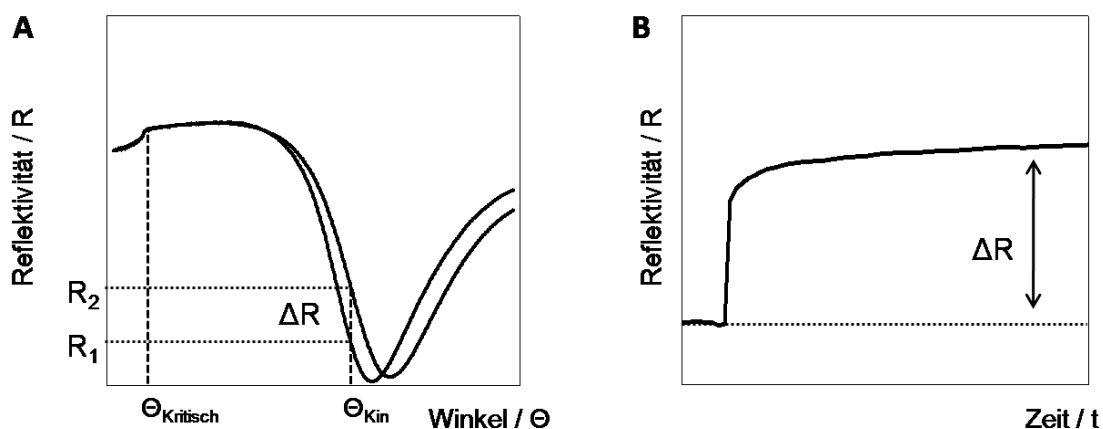


Abb. 2.4 A: Oberflächenplasmonenresonanzspektrum vor und nach Adsorption einer dielektrischen Deckschicht. Aufgetragen ist die Reflexion des Laserlichts (R) an der Grenzfläche gegen den Einfallswinkel (θ). Deutlich zu erkennen ist die Verschiebung des Minimums zu einem höheren Winkel. Ebenfalls eingezeichnet ist der Winkel der Totalreflexion (θ_{Kritisch}). B: SPR-Adsorptionskinetik, aufgenommen beim fixen Winkel θ_{Kin} . Der Wert ΔR beschreibt die Resonanzzunahme durch die Winkelverschiebung kurz vor der Oberflächenplasmonenresonanz, was die Aufnahme von Adsorptionskinetiken ermöglicht.

Da in einem Oberflächenplasmonenresonanzspektrum (SPR-Spektrum) die Intensität kurz vor dem Resonanzwinkel linear abfällt und das Spektrum durch die Schichtdickenzunahme zu höheren Winkeln hin verschoben wird, verläuft eine Intensitätszunahme in erster Näherung linear zur Schichtdickenzunahme. Auf diese Weise lassen sich in Echtzeit Kinetiken von Adsorptionsvorgängen an Metalloberflächen bzw. an Moleküle, welche auf diesen zuvor immobilisiert wurden, erfassen (Abb. 2.4, B). Die Zunahme der gemessenen Intensität ist hierbei in erster Näherung proportional zum Schichtdickenwachstum. [Kre68, Kre71, Gor77, Kno98, Sch08]

2.2 Oberflächenplasmonen-Fluoreszenz-Spektroskopie

2.2.1 Fluoreszenzprozess

Moleküle, die in der Lage sind Lichtenergie zu absorbieren und die Strahlung anschließend zu emittieren, werden Chromophore genannt. Das Molekül absorbiert zunächst die Lichtenergie, wodurch seine Elektronen in ein energetisch höheres Niveau gehoben werden. Beim Rückfall der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau wird diese Energie in Form von Strahlung wieder an die Umgebung abgegeben. Der gesamte Prozess unterteilt sich in drei Phasen (Abb. 2.5). Nachdem das Chromophor Lichtenergie absorbiert hat, geht es zunächst in den instabilen Zustand S_1^* über. Dieser Zustand ist gekennzeichnet durch eine extrem kurze Lebensdauer. Von diesem instabilen Zustand aus fallen die angeregten Elektronen zunächst zurück auf den energetisch geringeren Zustand S_1 . Bei diesem strahlungsfreien Übergang kommt es zu Konformationsänderungen des Chromophors, wodurch die Energie dieses Zustandes insgesamt etwas geringer ist als bei S_1^* . Relaxiert das Elektron nun zurück auf seinen Grundzustand S_0 , wird die Energie in Form von Photonen abgegeben, wodurch es zur Fluoreszenz kommt. Da die Energie des freigesetzten Photons geringer ist als die gesamte absorbierte Energie, kommt es zur Rotverschiebung des Lichtes. Diese Rotverschiebung wird als *Stokes Shift* bezeichnet. [Sch08]

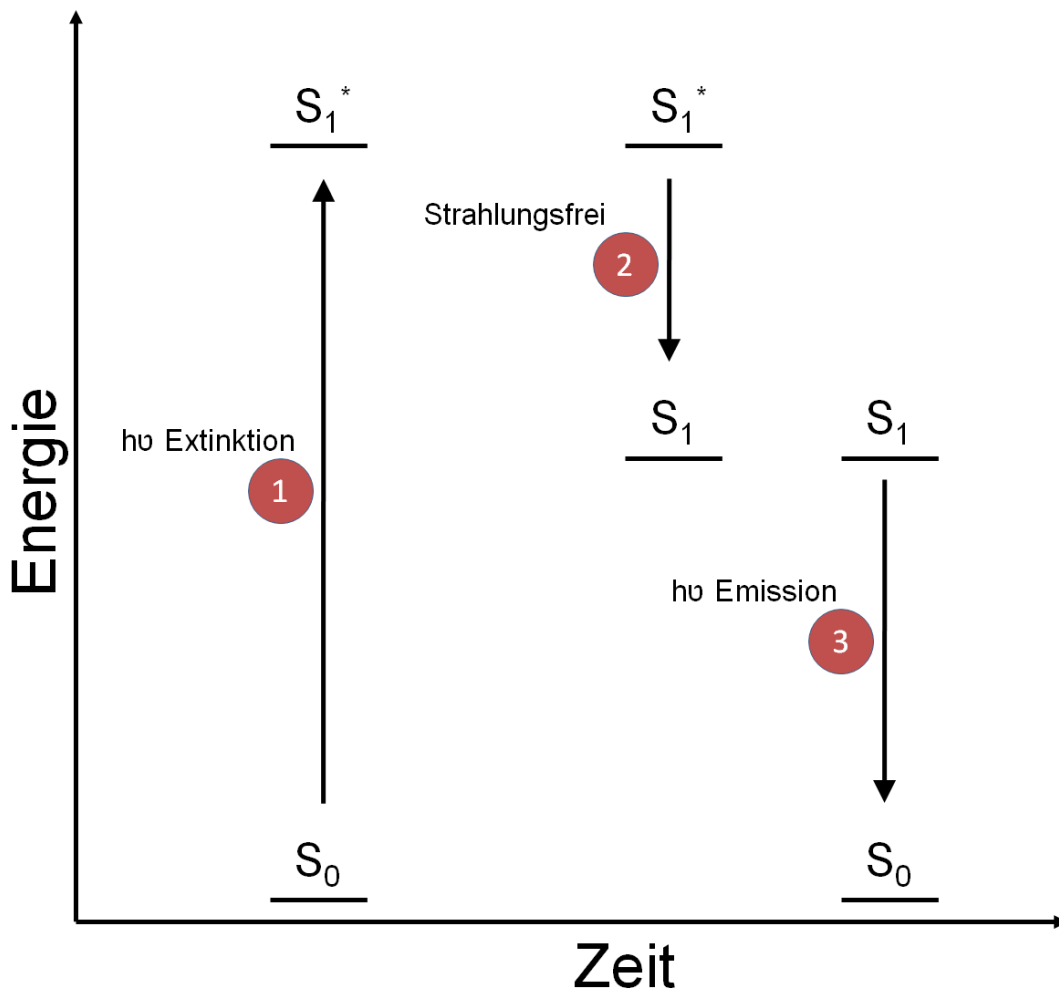


Abb. 2.5: Vereinfachtes *Jablonski-Diagramm*: Ein Fluoreszenzprozess unterteilt sich in drei unterschiedliche Phasen. In der ersten Phase (1) nimmt das Chromophor Lichtenergie auf. Auf diese Weise wird es vom Niveau S_0 in ein höheres, instabiles Energieniveau S_1^* gehoben. In der zweiten Phase (2) kommt es zum strahlungsfreien Abfall auf das Energieniveau S_1 . Von diesem fällt das Chromophor zurück auf sein ursprüngliches Energieniveau S_0 (3). Hierbei wird die aufgenommene Energie in Form von Photonen wieder abgegeben. Da das Niveau S_1 unter dem Niveau S_1^* liegt, ist das abgegebene Fluoreszenzlicht rotverschoben. Dieses Phänomen wird als *Stokes Shift* bezeichnet. [Sch08]

Mit der SPR-Spektroskopie wird bereits eine Auflösung erreicht, die hoch genug ist, die Adsorption einer monomolekularen Schicht zu detektieren. Die Auflösung liegt typischerweise bei 0.1 bis 0.2 nm [Spi93]. Dennoch stößt die SPR-Spektroskopie bei extrem kleinen Analyten oder geringen Bedeckungsgraden an ihre Auflösungsgrenze. Durch die Einbeziehung der Fluoreszenz in die SPR-Spektroskopie kann dieses Problem umgangen werden. Bei der Oberflächenplasmonen-Fluoreszenz-Spektroskopie (engl.: Surface Plasmon [Field Enhanced] Fluorescence Spectroscopy, SPFS) können kleinste Chromophore bis in den attomolaren Bereich hinein an Oberflächen detektiert werden

[YuF04]. Am Punkt der Oberflächenplasmonenresonanz stimmen Energie und Impulswellenvektor von Oberflächenplasmon und Lichtwelle überein, sodass es zur Resonanz zwischen beiden Wellen kommt. Hierbei wird nahezu die gesamte einfallende Strahlung auf die Oberflächenplasmonen übertragen und deren elektromagnetisches Feld drastisch verstärkt. Je kleiner der Imaginärteil der dielektrischen Konstante des eingesetzten Metalls, umso kleiner ist die Absorption und somit die Dissipation bzw. umso höher die Feldverstärkung (Abb. 2.6).

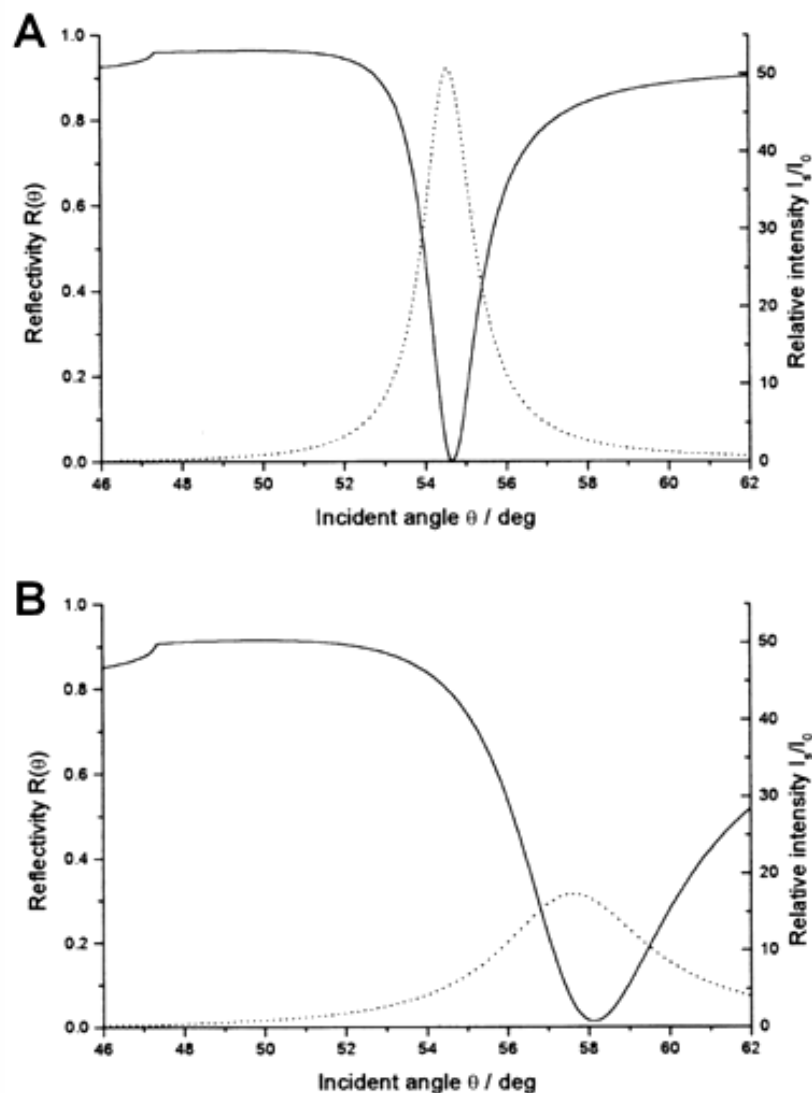


Abb. 2.6: Feldverstärkung (gestrichelte Linie) der evaneszenten Welle nahe der Oberflächenplasmonenresonanz auf Silber- (A) und Goldoberflächen (B). Aufgetragen sind die Reflektivität (durchgezogene Linie) und die Feldverstärkung (gestrichelte Linie) gegen den Einfallswinkel des Laserlichts im Bereich der Oberflächenplasmonenresonanz. Wie zu erkennen ist, ist die Feldverstärkung auf Silberoberflächen höher als auf Goldoberflächen. Entnommen aus [Lie00].

Durch die Oberflächenplasmonenresonanz kommt es so zu einer zusätzlichen Verstärkung des elektromagnetischen, evaneszenten Feldes an der Grenzfläche zwischen Metall und Dielektrikum. Diese Feldverstärkung kann nun genutzt werden, um Chromophore im Wellenlängenbereich des Lasers lokal begrenzt zur Fluoreszenz anzuregen. Da die maximale Feldverstärkung an der Grenzfläche auftritt und innerhalb des Dielektrikums exponentiell abfällt, ist eine Fluoreszenzanregung nur möglich, wenn die Chromophore sich nahe genug an der Oberfläche befinden. Dieser Umstand macht eine oberflächensensitive Fluoreszenzspektroskopie möglich. [Sch08, Lie00, Neu02]

2.2.2 Quenchingprozesse an der Oberfläche

Quenching ist eine distanzabhängige Interaktion zwischen einem angeregten Donator und einem Akzeptormolekül. Die Fluoreszenzenergie wird vom Donator auf das Akzeptormolekül übertragen. Die Energie kann als Licht oder Wärme bzw. Vibration weitergegeben werden oder ein zweites Molekül direkt in den angeregten Zustand versetzen. Letzteres wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. Die Fluoreszenz des Akzeptormoleküls ist rotverschoben. Der *Försterradius* beschreibt den Radius zwischen einem Donator und einem Akzeptor, bei dem die Effizienz des strahlungsfreien Übergangs bei über 50 % liegt. Dieser beträgt typischerweise 2 bis 6 nm.

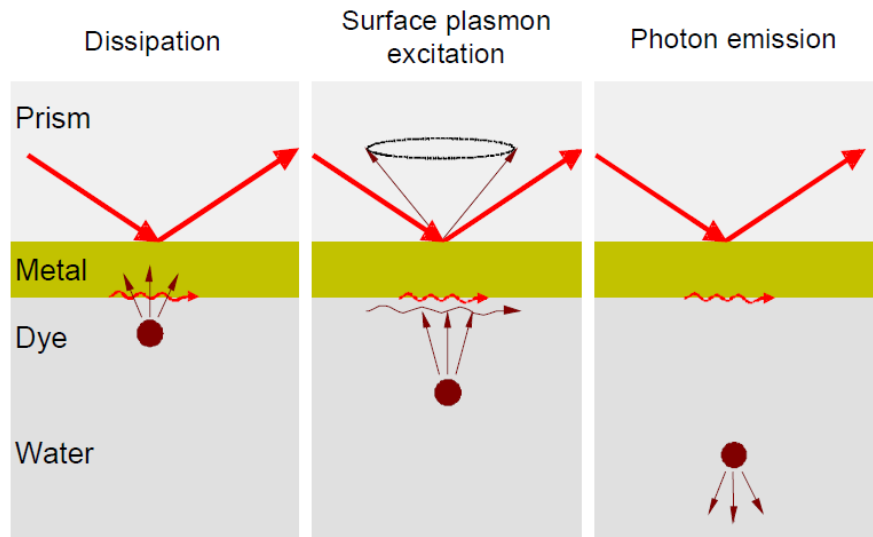


Abb. 2.7: Quenchingeffekte zwischen Chromophor und Oberfläche bei unterschiedlichen Abständen. Links: 0 bis 10 nm: Energie wird an Oberfläche als Wärme abgegeben. Mitte: Bis 20 nm: Elektronen aus dem Chromophororbital koppeln an die Oberflächenplasmonen zurück. Rechts: Über 20 nm: Das Chromophor kann frei fluoreszieren. Entnommen aus [Lie00].

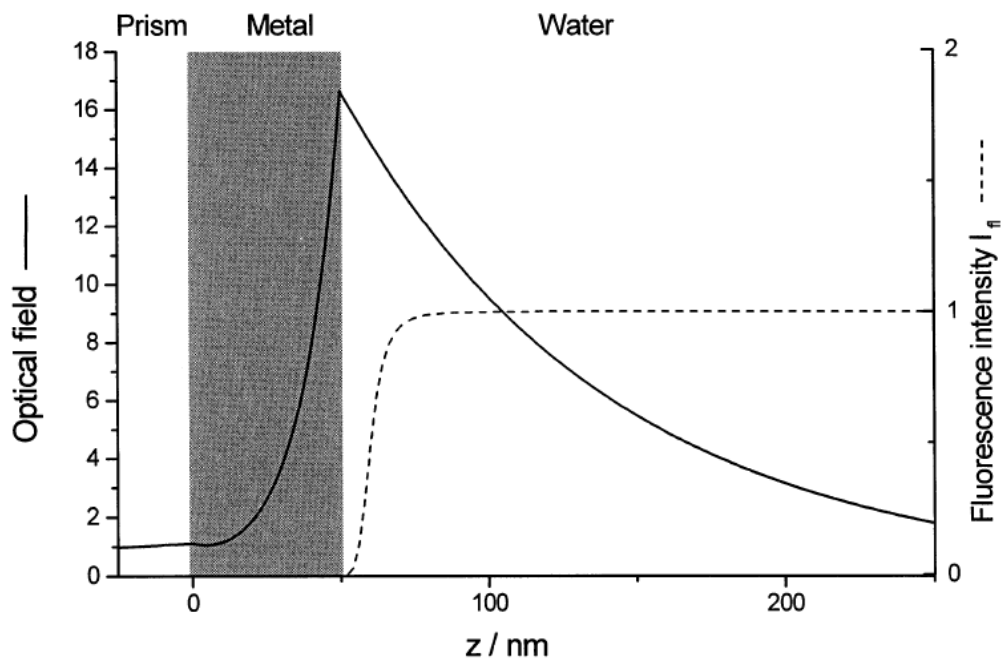


Abb. 2.8: Optische Intensität des evaneszenten Feldes (durchgezogene Linie) und Fluoreszenzintensität (gestrichelte Linie) aufgetragen gegen den Abstand des Fluoreszenzfarbstoffes zur Oberfläche. Wie zu erkennen ist, ist die optische Feldverstärkung direkt an der Grenzfläche am stärksten. Die maximale Fluoreszenz des Farbstoffes tritt allerdings erst ab einem Abstand von ca. 20 nm auf, da es zuvor zu Quenchingprozessen an der Oberfläche kommt. Entnommen aus [Lie00].

Das Phänomen des Quenchings muss bei SPFS-Messungen berücksichtigt werden. Die elektrische Kopplung der Elektronenorbitale des Chromophors an das Leiterband der Metalloberfläche ermöglicht neue Zerfallsarten der Fluoreszenzenergie. Hierdurch verändern sich Fluoreszenzintensität und Strahlungsdauer drastisch, je näher das Chromophor der Oberfläche kommt. Bei einem Abstand bis zu 10 nm kommt es so zu einer starken Reduzierung von Lebensdauer und Strahlungsintensität. Die Fluoreszenz ist „gequenched“, und die Energie geht als Wärme in die Metallschicht über. Bei einer mittleren Distanz von bis zu 20 nm kann die Anregungsenergie des Chromophors an die Oberflächenplasmonen zurückkoppeln. Da ein Teil der Anregungsenergie bereits vor der Fluoreszenz durch strahlungsfreie Übergänge wie etwa Vibration dissipiert, ist der resultierende Oberflächenplasmonenmode rotverschoben und strahlt kegelförmig ins Prisma zurück. Ab einer Distanz von 20 nm kommt es zur freien Fluoreszenz des Chromophors (Abb. 2.7 und 2.8). Die Stärke der Fluoreszenz hängt nur von der Intensität des evaneszenten Feldes ab. Wie zuvor erwähnt, ist dieses am stärksten direkt an der Grenzfläche zum Dielektrikum. Der Abstand des Chromophors darf daher nicht größer werden als die Ausbreitung des evaneszenten Feldes im Dielektrikum. Diese Punkte müssen beim Oberflächendesign berücksichtigt werden. [Sch08, Lie00, Neu02]

2.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Das Rasterkraftmikroskop (engl.: Atomic Force Microscope, AFM) wurde 1986 von IBM vorgestellt. Es stellt eine Weiterentwicklung bzw. eine Kombination aus Rastertunnelmikroskop (engl.: Surface Tunneling Microscope, STM) und Profilometer dar und wurde mit dem Ziel entwickelt, ein Mikroskop mit vergleichbarer Auflösung wie das STM zu schaffen, allerdings ohne die Einschränkung einer elektrisch leitfähigen Probe. Es wird nicht der gemessene Tunnelstrom zur Oberflächenvisualisierung genutzt, sondern die Kräfte, die zwischen Messspitze (befestigt an einer Blattfeder, engl.: cantilever) und Probe auftreten. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit dieser Methode können Kräfte bis 10^{-18} N

gemessen werden, was in einer vertikalen Auflösung geringer 1 \AA resultiert. [Bin86]

1986 wurde *Binnig* für die Entwicklung des AFM mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. In Kombination mit der ebenfalls sehr hohen lateralen Auflösung von ca. 2.5 \AA gelang 1987 erstmalig die Visualisierung einzelner Atome mittels AFM [Bin87]. Das AFM besitzt einen höheren Oberflächenkontrast als das Rasterelektronenmikroskop (REM) und eine höhere Auflösung als ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Durch die vereinfachte Probenvorbereitung und die zusätzliche Möglichkeit der Visualisierung in Flüssigkeiten ergeben sich insbesondere für die Biologie neue Möglichkeiten [Bra04]. Das AFM ermöglicht dabei nicht nur die Strukturaufklärung innerhalb einer Größenskala. Die Bandbreite der Anwendungen reicht von der Visualisierung einzelner Proteinstrukturen in künstlichen Membranen oder biomimetischer Grenzflächen bis hin zur Visualisierung mikrobieller Vorgänge wie der Phagozytose von *E. coli* [Mül02, Mül06, Sch99, Dub08].

Der Aufbau eines AFM ähnelt in seinen Grundzügen dem eines Schallplattenspielers, besitzt aber einige deutliche Verfeinerungen. Das Herz des AFM ist der Cantilever, an dessen Ende die Spitze sitzt. Diese Spitze ist extrem scharf, sodass im Idealfall nur die Wechselwirkung zwischen jeweils einem Atom an der Oberfläche und der Spitze registriert wird. Weiterhin ist der Cantilever extrem flexibel und die Position an der Oberfläche wird durch eine hochauflösende Spitzenpositionierungselektronik gesteuert. Die Cantilever sind aus Silizium oder Siliziumnitrid gefertigt und besitzen je nach Länge, Tiefe und Breite unterschiedliche Eigenschaften wie Federkonstanten und Resonanzfrequenzen. Die Auflösung des AFM hängt maßgeblich von der Schärfe der Spitze ab. Eine schmale Spitze kann kleinste Bereiche abtasten und besitzt somit eine höhere Auflösung als eine stumpfe Spitze. Als Nachteil zeigt sich häufig eine schnelle Abnutzung. Auch eine Beschädigung der Spitze wirkt sich auf die Visualisierung aus. So kann es bei einem Cantilever mit doppelter Spitze zu dem „Double-tip-Effekt“ kommen. Hier wird bei der Messung jeder Punkt zweimal gemessen und visualisiert, was zu einer falschen Darstellung der Oberflächenstruktur führt. [Jan01, Bra04]

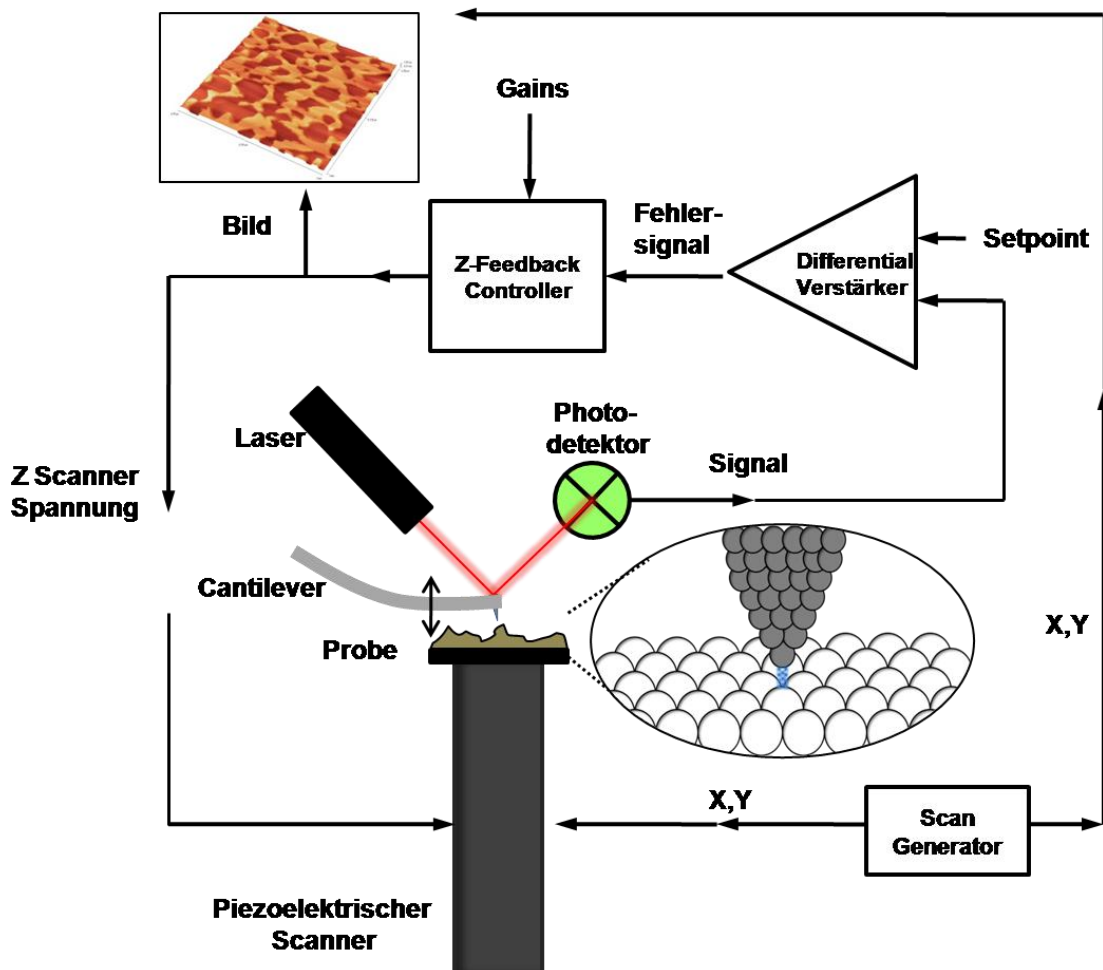


Abb. 2.9: Schematische Zeichnung des AFM-Messprinzips. Je nach Oberflächentopografie kommt es zu unterschiedlichen Auslenkungen des Cantilevers. Hierdurch wird der auf den Cantilever gerichtete Laserstrahl auf eine unterschiedliche Position im Detektorfeld gelenkt. Das so erfasste elektrische Signal wird mit dem Setpoint Signal verglichen und die Differenz verstärkt. Das entstehende Fehlersignal wird an den Z-Feedback-Controller weitergegeben, wo es mit den zuvor festgelegten Gain-Werten verrechnet wird. Hieraus resultiert zum einen das Höhenbild der Oberfläche. Gleichzeitig wird über die Gains die Spannung berechnet, die angelegt werden muss, um den Piezomotor wieder in seine Ausgangsstellung zu bringen. Abgeleitet aus [Vee08] und [Bra04].

Die Spitze wird während der Messung in unmittelbare Nähe zur Probenoberfläche gebracht, wodurch es über die *Van-der-Waals-Anziehung* und *Pauli-Repulsion* zur Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche kommt. Zur Detektion dieser Kräfte wird auf den Cantilever ein Laserstrahl gelenkt und über einen Spiegel in einen Vierfeld-Photodiodendetektor reflektiert, wo die Intensität als Spannung registriert wird. Der Cantilever selbst ist häufig zusätzlich mit Metall beschichtet, damit der Laser mit maximaler Intensität reflektiert werden kann. Während der Messung wird der Cantilever über die Oberfläche bewegt. Je nach Oberflächentopografie kommt es zu einer Veränderung der zwischen

Spitze und Probenoberfläche wirkenden Kräfte und zu einer Auslenkung des Cantilevers. Diese verändert das Signal im Detektor. Die ermittelte Spannungsdifferenz wird verstärkt und das Fehlersignal an den Feedbackcontroller übergeben. Der Feedbackcontroller berechnet mittels der vorgegebenen Gain-Parameter und des Fehlersignals die Höhengauslenkung des Cantilevers. Dies ist möglich, da das Fehlersignal in erster Näherung linear zur Höhendifferenz ist. Nichtlineares Verhalten wird über die Gain-Parameter und einen im Feedback-Loop implementierten PID-Regler ausgeglichen. Gleichzeitig wird die Spannung berechnet, die am Scanner angelegt werden muss, um den Cantilever wieder in seine Ausgangsposition zu bringen. Der Scanner selbst besteht aus piezoelektrischem Material mit der Eigenschaft, sich je nach angelegter Spannung zusammenzuziehen oder auszudehnen. Dies ermöglicht die präzise Kontrolle des Scanners. Auf diese Weise wird die Probenoberfläche linienweise abgerastert, wobei je Linie die Höhe in mehreren Messpunkten mit jeweils gleichem Abstand gemessen wird. So ergibt sich nach und nach ein dreidimensionales Bild der Oberfläche (Abb. 2.9). [Jan01, Vee08, Bra04]

Je nach AFM-Typ wird zwischen „Scanned Sample“ und „Scanned Tip“ unterschieden, wobei entweder die Probe direkt auf dem Scanner befestigt wird und unter der Spitze bewegt wird (Scanned Sample) oder die Spitze am Scanner befestigt wird und über die Probe bewegt wird (Scanned Tip). Beide Anordnungen besitzen Vor- und Nachteile. In dieser Arbeit wird ein Scanned-Sample-AFM genutzt. Dabei wird es in der Regel leichter, ein „Closed-Loop-Feedback“ zu implementieren. Hierbei handelt es sich um eine zusätzliche elektronische Korrektur der Position der Spitze auf der Oberfläche. Weiterhin verursacht diese Anordnung ein geringeres Rauschen, was gleichzeitig zu einer höheren Auflösung führt. Ein großer Nachteil ist die limitierte Probengröße. [Bra04, Vee08]

Im Allgemeinen kann zwischen zwei Messmodi unterschieden werden: Gleichstrom (engl.: direct current, DC) oder Wechselstrom (engl.: alternating current, AC). Beim Ersten wird die Durchbiegung des Cantilevers konstant gehalten, beim Zweiten der Cantilever zur Oszillation angeregt. Die Kräfte, welche zwischen Probe und Spitze wirken, lassen sich über das *Lennard-Jones-Potential* darstellen. Je nach AC- oder DC-Modus treten die Kräfte in unterschiedlichen Abständen zur Oberfläche auf (Abb. 2.10):

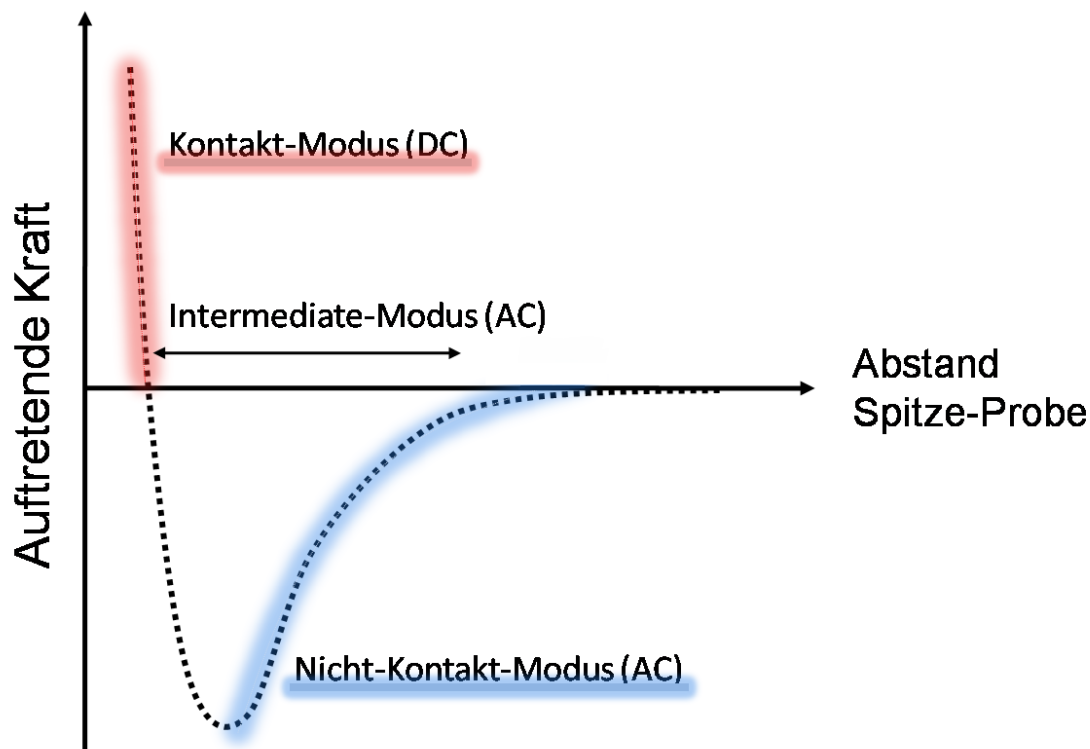


Abb. 2.10: Kraft-Abstands-Diagramm mit Zuordnung der einzelnen, mittels AFM gemessenen Kräfte. Nach [Bra04].

Im Kontakt-Modus (DC) wird der Cantilever in direkten Kontakt mit der Oberfläche gebracht. Die Regelung geschieht über die Konstanthaltung der Cantilever-Durchbiegung, indem der Laser im Detektorfeld kontinuierlich an derselben Stelle auftritt. Der Kontrast hängt von der aufgebrachten Kraft ab, mit der der Cantilever auf die Oberfläche einwirkt. Der Nachteil dieser Methode sind die auf die Probenoberfläche wirkenden starken Scherkräfte, welche die Oberfläche beschädigen können. Daher ist diese Methode ungeeignet für weiche Oberflächen wie z. B. biologische Proben. Beim Intermediate-Modus, auch Tapping-Mode genannt, handelt es sich um einen AC-Modus. Hierbei wird der Cantilever in Oszillation versetzt. Zu diesem Zweck wird ein zusätzliches Drive-Signal benötigt, das über einen zweiten Piezomotor am Cantilever erzeugt wird, um diesen so über dessen Resonanzfrequenz in Schwingung zu versetzen (Abb. 2.9). Während des Scans versucht der Feedback-Loop den Setpoint, der sich über den Effektivwert der Spannungsamplitude im Detektorfeld ergibt, konstant zu halten. Der oszillierende Cantilever bewegt sich so über die Oberfläche. Im Gegensatz zum Nicht-Kontakt-Modus, wo der Cantilever keinen direkten Kontakt

zur Oberfläche hat, berührt dieser die Oberfläche im Intermittent-Mode punktuell. Allerdings ist der Kontakt zur Oberfläche im Gegensatz zum Kontakt-Modus stark verringert, wodurch das Problem von wirkenden Scherkräften umgangen wird. Hierdurch ist es ebenfalls möglich, biologische Proben in einer hohen lateralen und vertikalen Auflösung und mit starkem Kontrast zu visualisieren. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Interaktion mit der Probe. Dies macht den Intermittent-Mode zusätzlich besonders geeignet für biologische Proben. Neben dem Höhsignal ist das Phasensignal des Intermediate-Mode ebenfalls gut zur Oberflächencharakterisierung geeignet. Es wird nicht die Höhe ermittelt, sondern die Materialeigenschaften der Oberfläche. Bewegt sich der Cantilever über eine Oberfläche mit unterschiedlichen Materialeigenschaften, z. B. Proteine auf Metall, so kommt es beim Übergang zwischen den Materialien zu einer Phasenverschiebung der Schwingung. Diese lässt sich über einen weiteren Kanal visualisieren und ermöglicht so hochauflösend die Darstellung unterschiedlicher Materialkomponenten einer Oberfläche, die sich in ihren Materialeigenschaften unterscheiden. [Bra04, Vee08]

2.4 Chemisorption von Silanen auf oxidische Oberflächen

Bei Kontakt mit Wasser oder Sauerstoff bildet Titan spontan eine native Oxidschicht aus, welche wichtig für die Biokompatibilität des Werkstoffes ist (siehe Kapitel 1.1). Um eine oxidische Oberfläche (wie z. B. eine TiO_2 - oder SiO_2 -Oberfläche) zu funktionalisieren, können Organosilane genutzt werden. Diese binden direkt an den Oberflächenoxiden und bilden so einen „Self-Assembled Monolayer“ (SAM) aus. Eine solche Monolage fungiert als Bindeglied zwischen organischem Adsorbat und anorganischer Oxidoberfläche. Organosilane, oder kurz Silane, bestehen aus einer Kopfgruppe, über die sie an die oxidische Oberfläche binden können, und einem organischen Rest, welcher für die jeweilige Funktion der Silanschicht wichtig ist. Die Kopfgruppe besteht aus einem Siliziumatom (Si-Atom) und einer bis drei hydrolysierbaren Gruppen, wie z. B.

Methoxy-, Ethoxy- oder Chlorgruppen. Chlorosilane reagieren hierbei am stärksten, allerdings sollte auf Chlor im Hinblick auf eine biologische Anwendung verzichtet werden. Trifunktionalisierte Silane bilden auf der Oberfläche ein dreidimensionales Netzwerk aus und sorgen so für eine hohe Stabilität. Hierbei reagieren Trimethoxysilane stärker und adsorbieren in höherer Anzahl als Triethoxysilane. [Bus00, Gam98]

Die Silanadsorption an oxidischen Oberflächen läuft nach folgendem Mechanismus ab (Abb. 2.11):

1. Die Silane werden durch im Lösungsmittel befindliches H_2O hydrolysiert.
2. Im nächsten Schritt physisorbiert das Silan zunächst an der Oberfläche des Substrats. Dies geschieht durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den am Si-Atom befindlichen Hydroxylgruppen und den Hydroxylgruppen der oxidischen Oberfläche, im Falle von TiO_2 Titanolgruppen.
3. Silan und Oberfläche reagieren unter H_2O -Abspaltung in einer Kondensationsreaktion und bilden eine kovalente Bindung aus.

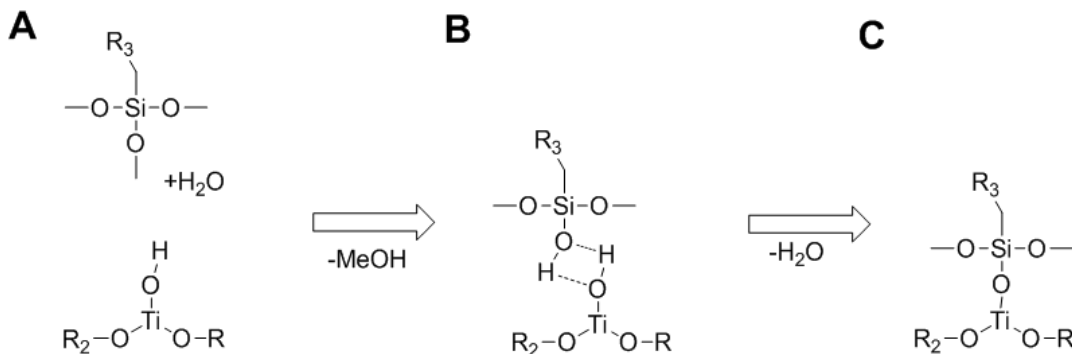


Abb. 2.11: Schema der Adsorption von Silanen an oxidischen Titanoberflächen. Die Adsorption lässt sich in drei Phasen unterteilen. In der ersten Phase (A) kommt es zur Hydrolyse der Abgangsgruppe durch im Lösungsmittel befindliches H_2O . Aufgrund der neu gebildeten Hydroxylgruppe kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Silan und Oberfläche (B). Die Silane physisorbieren so auf der Oberfläche. Im abschließenden dritten Schritt erfolgt eine Kondensationsreaktion zwischen dem Adsorbat und der Oberfläche (C). Das Silan wird auf diese Weise kovalent an die Oberfläche gebunden.

Bei der Adsorption von Silanen an TiO_2 -Oberflächen bilden sich, je nach eingesetztem Silan, unterschiedliche Topografien aus. Monosubstituierte Silane wie

beispielsweise $R\text{-Si}(\text{CH}_3)_2\text{-Cl}$ adsorbieren einzeln, ungeordnet und statistisch über die Oberfläche verteilt. Bei dreifach substituierten Silanen bildet sich hingegen eine andere Oberflächenstruktur aus. Bereits nach der Hydrolyse durch H_2O vernetzen sich diese Silane im Lösungsmittel über Wasserstoffbrücken untereinander. Durch diese Vernetzung adsorbieren Silane als Agglomerat und bilden bei einem Bedeckungsgrad $\Theta_{\text{Silan}} < 1$ eine inselartige Oberflächenstruktur aus. Innerhalb der Monolage besitzen dreifach substituierte Silane eine hohe Ordnung, adsorbieren aber nicht so dicht wie monosubstituierte Silane. [Hem02]

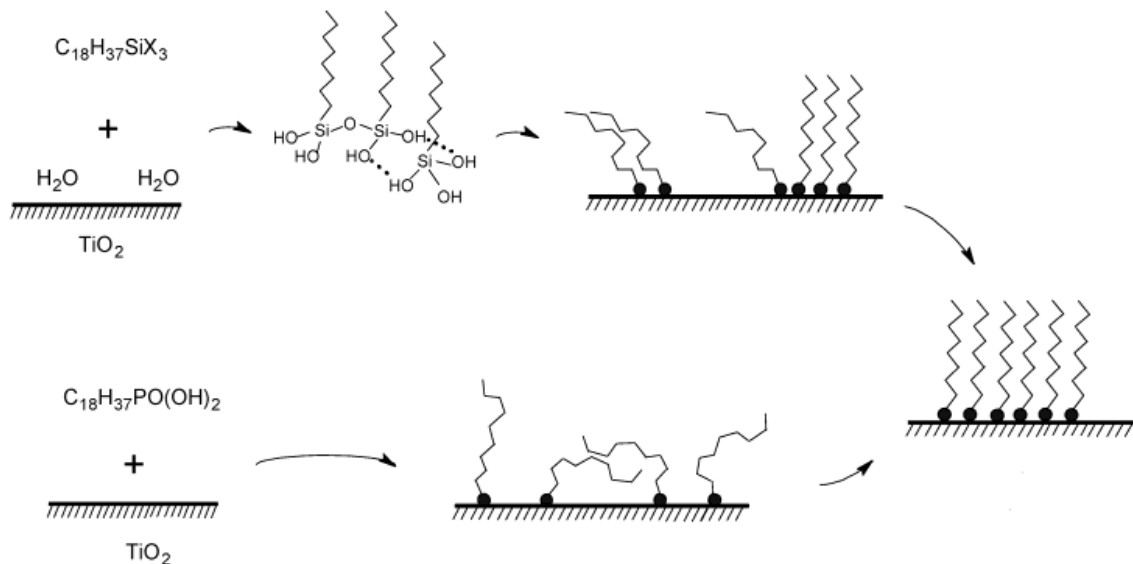


Abb. 2.12: Unterschiedliche Adsorptionsmechanismen auf Oberflächen. Bei dem oberen Mechanismus kommt es bereits im Lösungsmittel zur Hydrolyse und Vernetzung der Silane, so dass diese als Folge auf der Oberfläche unregelmäßig agglomerieren, bevor sie eine geschlossene Schicht ausbilden. Bei dem unteren Mechanismus tritt keine Wechselwirkung der Moleküle in Lösung auf, sodass sie zufällig und ungeordnet über die Oberfläche verteilt adsorbieren. [Hem02].

2.5 Das Streptavidin-Biotin-System

Streptavidin ist ein ca. 60 kDa großes Protein aus dem Bakterium *Streptomyces avidini*. Ähnlich wie Avidin wirkt es als natürliches Antibiotikum, das der Umgebung Biotin (Vitamin H) entzieht, wodurch das Bakterium einen Selektionsvorteil

gewinnt. Hierfür besitzt Streptavidin vier Biotin-Bindestellen. Die Bindung zwischen beiden Molekülen ist die stärkste, nicht kovalente, natürliche Bindung ($K_{ON} = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) [Cha64, Gre75]. Im Gegensatz zu Avidin ist es kein Glykoprotein, wodurch es nur zu wenigen unspezifischen Bindungen kommt. Streptavidin besitzt eine tetramere Struktur in D2-Symmetrie mit den Abmessungen $5.4 \times 5.8 \times 4.8 \text{ nm}^3$. Im Innern des Proteins befinden sich, ebenfalls in tetramerer Anordnung, die Biotin-Bindestellen (Abb. 2.13) [Hen89].

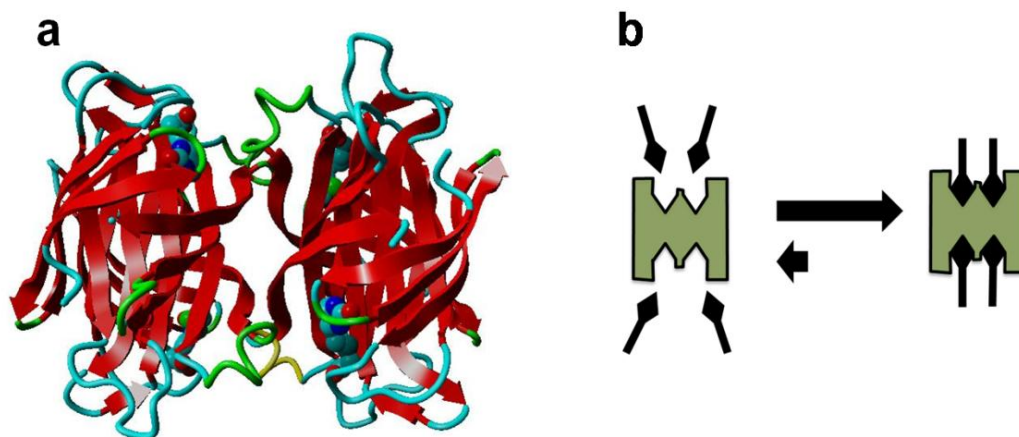


Abb. 2.13: a: 3-D-Struktur von Streptavidin, das vier Biotine gebunden hat. Entnommen aus der PDB-Datenbank (1SWE Apo Core Kristallstruktur bei pH 4.5, visualisiert durch Yasara 9.3.22) b: Schematische Darstellung der Biotin-Streptavidin-Bindung. Wie zu erkennen ist, befinden sich die Bindestellen auf der jeweils gegenüberliegenden Seite.

Jede Biotin bindende Untereinheit besitzt eine Trichterform, ähnlich der eines Basketballnetzes. Die gesamte Biotinstruktur wird, bis auf die Carboxylgruppe, in der Bindungstasche über eine Loop-Struktur begraben. Innerhalb der Bindungstasche kommt es zu einer Vielzahl an Wechselwirkungen zwischen den Resten der Streptavidin-Seitenkette und Biotin, die der Bindung ihre hohe Stärke verleihen. Es treten vier hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Tryptophanresten 79, 92, 108 und 120 und der Ringstruktur auf, welche eine Cyad-ähnliche Untereinheit bilden und Biotin so innerhalb der Tasche stabilisieren. Diese Wechselwirkungen sind essenziell wichtig für die Biotinbindung [Git88]. Der Großteil der stabilisierenden Wechselwirkung zwischen Protein und Molekül ergibt sich aber über ein komplexes Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen. Zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Stickstoffatomen

innerhalb der Ureastruktur und den Resten Serin 45 und Asparagin 128 verankern Biotin innerhalb der Bindungstasche. Drei weitere Wasserstoffbrückenbindungen entstehen zwischen dem Sauerstoff der Ureastruktur und Tyrosin 43, Asparagin 23 und Serin 27. Dies deutet auf ein tetrameres sp^3 -Orbital eines Oxoanion hin. Die entstehende Resonanzform wird über das Wasserstoffbrückennetzwerk zusätzlich stabilisiert. Weiterhin treten Wasserstoffbrücken zwischen dem Schwefelatom von Biotin und Threonin 90 und der endständigen Carbonylgruppe von Biotin und Serin 88 auf (Abb. 2.14). [Web89]

Neben Biotin gibt es weitere Moleküle wie z. B. 2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure (HABA), die ebenfalls über diese drei Wasserstoffbrücken innerhalb der Bindungstasche verankert werden und daher eine Affinität zu Streptavidin besitzen, wenngleich auch geringer als die von Biotin [Web94, Web95]. Eine Besonderheit der Biotinbindung liegt in der Modifizierbarkeit der Carboxylgruppe des Biotins. An diese lassen sich weitere Moleküle ankoppeln, ohne dass es zu einer Beeinflussung der Biotin-Streptavidin-Bindung kommt [Lan81]. Diese Eigenschaften machen Streptavidin für Bereiche wie Bioanalytik, Biosensorik oder Bionanotechnologie äußerst wertvoll [Fuj06, Ras03, Spi93, Xin06, Gre75, Hua02].

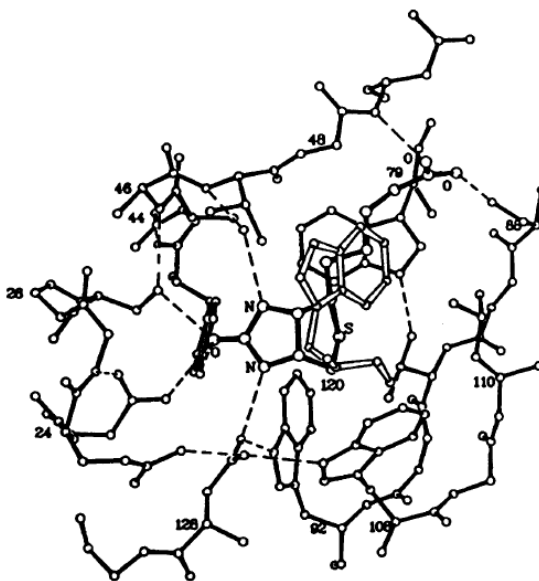


Abb. 2.14: Biotin gebunden innerhalb der Bindungstasche. Wasserstoffbrücken werden als gestrichelte Linien dargestellt. Entnommen aus [Web89].

2.6 Fibronektin

Damit Zellen an Oberflächen oder an der ECM anbinden können, bedarf es einer bestimmten Klasse von Proteinen, sogenannter Adhäsionsproteine. Fn ist ein bei allen Vertebraten vorkommendes Glykoprotein und besitzt eine große Anzahl unterschiedlicher Aufgaben innerhalb des Organismus. Zu diesen zählt neben der Zellmigration, Zelldifferenzierung, Wundheilung und Embryogenese vor allem die Zelladhäsion. Diese Eigenschaft macht Fn zu einer Kernkomponente der ECM [Alb04, Pan02, Pot96, Mao05]. Fn ist aus zwei identischen Strängen aufgebaut. Das Dimer wird nahe dem C-Terminus durch eine doppelte Disulfidbrücke verbunden [Eng81, Pan02, Pot94, Pot96]. Jedes Monomer besitzt ein Molekulargewicht von ca. 220 kDa, was zu einem Gesamtgewicht von ca. 440 kDa führt [Pot94, Eng81, Joh99, Mao05]. Weiterhin ist es sehr abbaustabil, da es nur von wenigen Proteasen gespalten werden kann [Pan02]. Fn kann in verschiedenen Isoformen exprimiert werden. Diese entstehen durch alternatives Splicing von drei unterschiedlichen Sequenzabschnitten. Das Protein wird durch ein einziges Gen codiert, das aus insgesamt 50 Exons besteht [Pan02, Pot94, Mao05, Alb04].

Grundsätzlich lassen sich zwei Isoformen unterscheiden. Plasma-Fn wird in der Leber gebildet und besitzt eine kompakte, globuläre Konformation. Innerhalb der ECM kommt Fn als unlösliches, faserförmiges Multimer vor [Pot94, Pot96, Pan02]. Diese Fasern bestehen aus entfaltetem Fn und bilden wiederum eine Matrix, die wichtig für eine normale Zelladhäsion und ein normales Zellwachstum ist [Mao05, Pan02, Pot94, Pot96, Joh99, Mao05, Alb04]. Da Fn gleichermaßen Bindestellen für Collagene der ECM und membranständige Integrine besitzt, wirkt es als Haftvermittler zwischen Zellen und ECM (Abb. 2.15) [Eng81, Pan02, Mao05, Alb01]. Interessanterweise bindet Fn stärker an denaturiertes Collagen als an natives. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich Collagen bei Körpertemperatur partiell entfaltet und so eine verbesserte Fn-Bindung ermöglicht [Pan02]. Da Integrine über Adaptorproteine zusätzlich mit dem Aktinskelett verbunden sind, können so Kräfte zwischen Zelle und ECM übertragen werden, was z. B. ein Herausreißen der Integrine unter Kraftaufwendung verhindert [Alb01, Alb04].

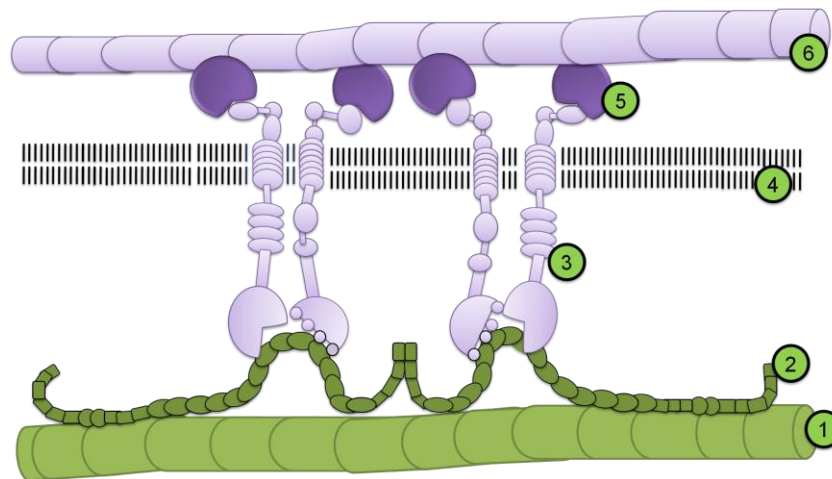


Abb. 2.15: Schematische Darstellung der Fn-vermittelten Bindung zwischen ECM und Zelle. Fn (2) ist an Collagen (1) gebunden, welches ein wichtiger Bestandteil der ECM ist. Über spezielle Bindestellen kommt es zur Bindung von Integrinen (3), die sich innerhalb der Membran (4) adhärierender Zellen befinden. Die Integrine wiederum sind über Adapterproteine (5) mit dem Aktinskelett (6) des Zytoskeletts verbunden. Diese Art der Anbindung von Zellen ermöglicht weiterhin die Kräfteübertragung zwischen Aktin und Collagen. Nach [Alb01].

Fn ist ein Mosaikprotein und wird aus drei sich wiederholenden Modultypen aufgebaut: Fn1(x), Fn2(x) und Fn3(x), wobei x die Wiederholung des Moduls innerhalb einer Fn-Untereinheit angibt (Abb. 2.16, A-C). Diese Module kommen ebenfalls bei anderen Proteinen vor, wurden aber zuerst bei Fn identifiziert [Pot94, Pot96]. Fn1 besteht aus 40 Aminosäuren, kommt 12-mal je Untereinheit vor und wird durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert. Fn2 wird ebenfalls durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert und besitzt 60 Aminosäuren. Es kommt allerdings nur zweimal je Untereinheit vor. Das für die Zelladhäsion jedoch wichtigste Modul ist Fn3. Jede Untereinheit besitzt 15 bis 17 Wiederholungen dieses aus 90 Aminosäuren bestehenden Moduls. Im Gegensatz zu Fn1 und Fn2 besitzt Fn3 keine Disulfidbrücken. Es besitzt eine wichtige Funktion in der Protein-Protein-Interaktion. Zusätzlich ist es wichtig für die richtige Orientierung funktioneller Domänen. Es besteht aus sieben antiparallelen β -Faltblättern, die ähnlich einem „Sandwich“ angeordnet sind. Zwischen zweien dieser β -Faltblätter innerhalb von Fn3(10) sitzt die bereits zuvor beschriebene RGD-Sequenz (siehe Kapitel 1.2), welche die primäre Bindestelle von Integrinen innerhalb von Fn ist und damit hauptverantwortlich für die zelladhäsiven Eigenschaften des Proteins. [Pan02, Pot94, Pot96, Pie83, Pie84]

Die allein über RGD vermittelte Zelladhäsion ist jedoch geringer als die Adhäsion, welche über ein komplettes Fn erzeugt wird [Pha03, Gar09, Ray09]. Fn besitzt viele weitere Sequenzen und Bindungsstellen, die die Zellanbindung sowohl durch intermolekulare als auch durch intramolekulare Wechselwirkungen unterstützen. Eine wichtige intramolekulare Wechselwirkung ist die bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnte Interaktion zwischen RGD und der im angrenzenden Modul Fn3(9) vorkommenden PHSRN-Synergiesequenz, welche aus den Aminosäuren Prolin, Histidin, Serin, Arginin und Asparagin besteht [Oba88]. Durch diese Interaktion wird insbesondere die Bindung von Fn zu $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen verstärkt [Aot94, Pot94, Sec97]. Eine Hauptfunktion innerhalb der Sequenz besitzt Arginin, da sich eine signifikante Verringerung der Aktivität erst beim Austausch dieser Aminosäure einstellt [Aot94]. Die Aktivierung von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen wirkt sich, wie ebenfalls bereits erwähnt, positiv auf die initiale Zelladhäsion aus [Oba88, Cut03, Zha95, Duf07, Ste02, Wie03, Mao05]. Allerdings sind ebenso strukturelle Eigenschaften von Fn für die natürliche Zelladhäsion wichtig [Pha03]. Hierzu zählt u. a. der Abstand zwischen der RGD- und PHSRN-Sequenz, welcher optimal bei 3.5 nm für eine Bindung von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen liegt [Kra02]. Darüber hinaus begünstigt die Wechselwirkung mit Fn3(8) und Fn3(7) die Zugänglichkeit von Fn3(9) und Fn3(10) für $\alpha_5\beta_1$ -Integrine. So befinden sich Fn3(9) und Fn3(10) im Fn-Rückgrat auf derselben Seite, wodurch sie eine räumliche Orientierung erhalten, die es ihnen ermöglicht, gemeinsam mit demselben Integrin in Wechselwirkung zu treten. Die PHSRN-Sequenz interagiert so direkt mit der α_5 -Untereinheit. Hierdurch wird die hohe Selektivität für diesen Integrintyp erreicht. Zusätzlich steht die RGD-Sequenz vom Fn-Gerüst ab und ist exponiert, was die Integrinzugänglichkeit weiter erhöht (Abb. 2.16 D) [Pot96, Pan02, Mic03].

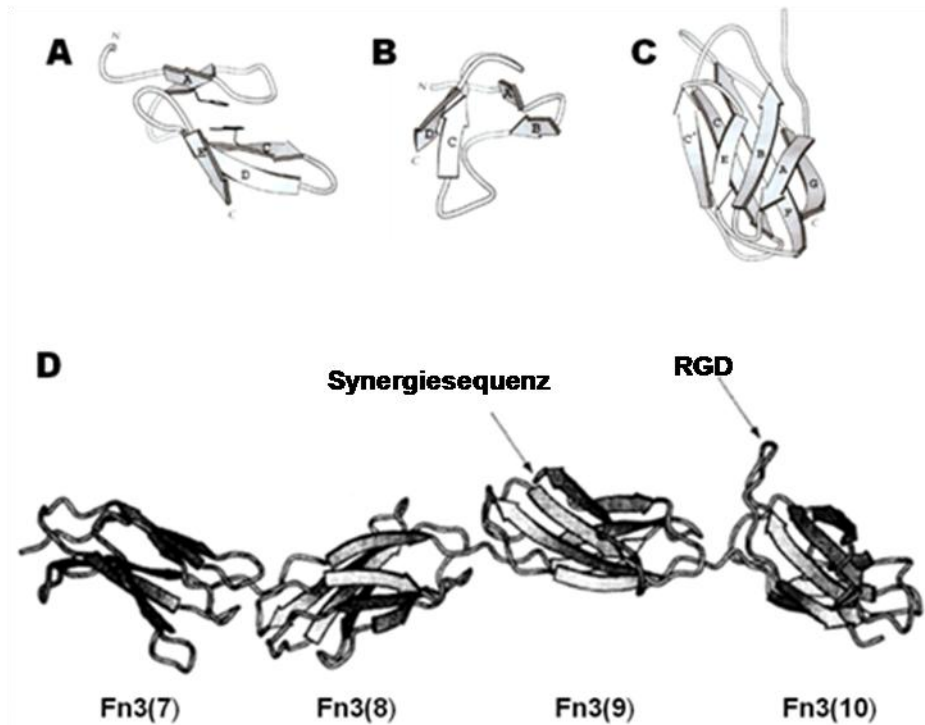


Abb. 2.16: A-C: Schematische Darstellung der Fn-Modultypen Fn1 (A), Fn2 (B) und Fn3 (C). D: Orientierung der Fn-Module Fn3(7) bis Fn3(10). Es ist zu erkennen, dass die Module Fn3(9) und Fn3(10) sich vom Fn-Rückgrat (dargestellt durch Fn3(7) und Fn3(8)) weg orientieren. So wird eine verbesserte Integrin zugänglichkeit dieser Module ermöglicht. Abbildungen entnommen aus [Pot94, Pot96].

Doch nicht nur die Integrinbindung bedarf dieser Art der intramolekularen Wechselwirkung. Die meisten Module von Fn benötigen die Interaktion mit anderen Modulen, um funktionelle Domänen auszubilden. Diese Interaktion ist nicht auf Module in sequenzieller Nähe beschränkt. Es kommt ebenfalls zur Ausbildung von modularen Motiven, die sequenziell weit auseinanderliegen. Ein Schema, das die Position der unterschiedlichen funktionellen Domänen innerhalb der Modulsequenz von Fn zeigt, ist in Abbildung 2.17 gegeben. Wie sich zeigt, besitzt Fn Bindestellen für weitere Proteine und Biomoleküle sowie zur intra- und intermolekularen Selbstassoziation.

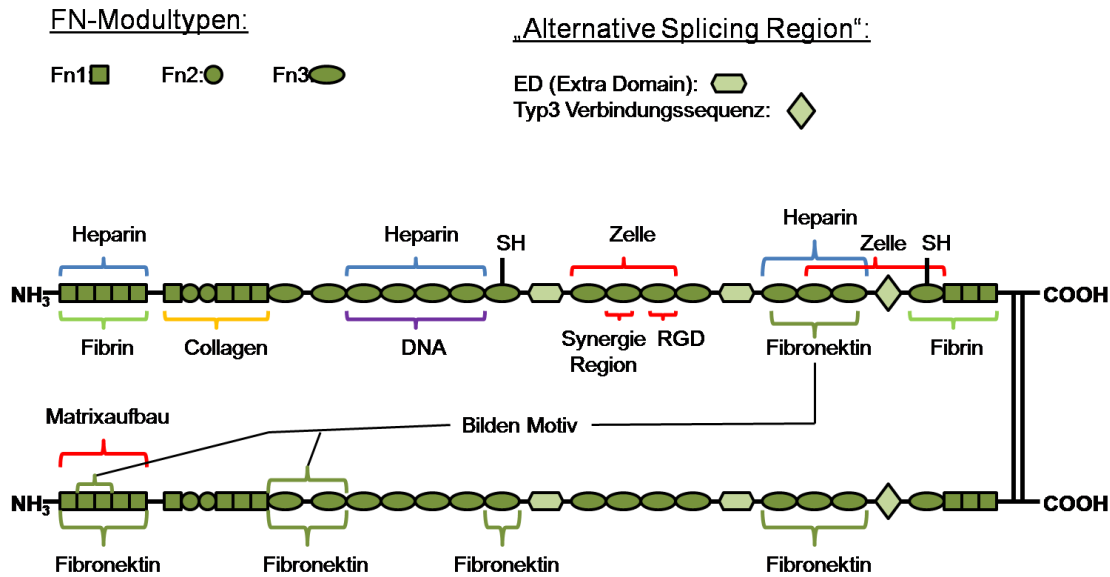


Abb. 2.17: Konsensussequenz der Fn-Modulsequenz und deren Domänen, erstellt aus den Quellen [Pot94, Pot96, Ber02, Pan02, Mao05, Pro87, Lin00, Joh99, Kra99, Wie03, Kra01, Gao06, Smi07, Che08]. Beide Dimere besitzen dieselben Domänen, wenngleich sie auf jeweils nur einer Untereinheit eingezeichnet sind.

Je nach Isoform und Umgebung nimmt Fn unterschiedliche Konformationen ein. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7.3 bis 7.4, PBS-Pufferlösung, Blutplasma) besitzt Fn eine kompakte Konformation, in der es auch auf TiO₂-Oberflächen adsorbiert [Joh99, Mac98, Sou07]. Da in dieser Arbeit ebenfalls humanes Plasma-Fn aus physiologischer PBS-Lösung heraus auf Streptavidin-modifizierten TiO₂-Oberflächen immobilisiert wurde, wurde zunächst davon ausgegangen, dass Fn in dieser Konformation adsorbieren würde. Aufgrund der diskusartigen Struktur der kompakten Konformation beträgt die Höhe eines einzelnen adsorbierten Proteins auf einer TiO₂-Oberfläche ca. 2.5 nm. Da Fn in dieser Konformation aber ebenfalls Agglomerate auf TiO₂-Oberflächen ausbildet, liegt die gemessene Partikelgröße meist über der tatsächlichen Höhe einzelner Moleküle und wird mit 4.6 ± 1.6 nm angegeben [Mac98, Sou07, Gri88].

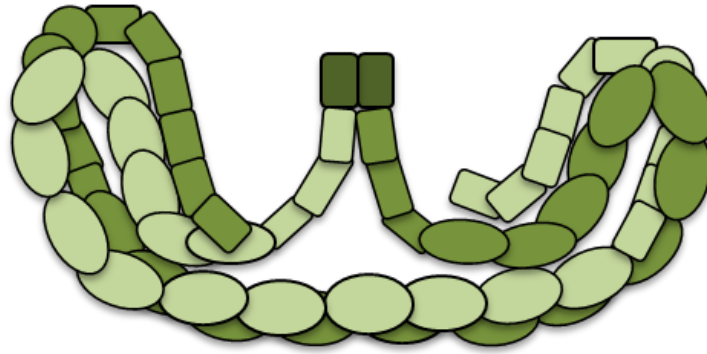


Abb. 2.18: Schematische Darstellung der kompakten, globulären Struktur von Fn. Diese ergibt sich u. a. aus der intramolekularen, ionischen Wechselwirkung der Module Fn3(2-3) mit den Modulen Fn3(12-14), der jeweils anderen Untereinheit [Joh99, Pot96]. Zur Verdeutlichung der Struktur sind beide Untereinheiten von Fn farblich unterschiedlich dargestellt.

Kapitel 3: Experimentelle Methoden

3.1 SPR-Spektrometer

Eingesetzt wird ein SPR-Spektrometer in *Kretschmann-Konfiguration* (Abb. 3.1). Der Laserstrahl von 632.8 nm wird über einen HeNe-Laser (JDS Uniphase 1125p) (Abb. 3.1, 1) erzeugt. Über einen Spiegel (Abb. 3.1, 2) wird der Laserstrahl durch eine Irisblende (Abb. 3.1, 3) auf einen Chopper (HMS Light Beam Chopper, Abb. 3.1, 4) gelenkt. Dieser ist an den Lock-In-Amplifier (Signal Recovery 7265 DSP Lock-In-Amplifier) (Abb. 3.1, 10) angeschlossen, wodurch das Tageslicht diskriminiert wird. Anschließend durchläuft der Strahl zwei Polarisatoren (Abb. 3.1, 5 und 6, Owis), wobei der erste so eingestellt ist, dass nur p-polarisiertes Laserlicht durchgelassen wird. Nur p-polarisiertes Licht schwingt in der Ebene der Oberflächenplasmonen und kann daher zur Anregung dieser genutzt werden. Der zweite Polarisator dient zur Einstellung der Intensität des Laserlichts. Der Laserstrahl durchläuft anschließend die Irisblende 2 (Abb. 3.1, 7) und trifft dann auf den optischen Messaufbau (Abb. 3.1, 11). Dieser besteht aus einem Prisma aus LaSFN9-Glas, an dessen Basis ein Objektträger, ebenfalls aus LaSFN9-Glas ($n = 1.85$), modifiziert mit einer 1.5 nm Chrom (Cr), 48 nm Au und 6 nm TiO_2 -Schicht über Immersionsöl (Cargille Series B, $n = 1.700$) optisch aufgesetzt wurde. Das LaSFN9-Substrat schließt die Teflonzelle des Liquid-Handling-Systems ab. Der optische Messaufbau ist über eine Halterung an dem Doppelgoniometer (Abb. 3.1, 8, Huber) angebracht. Über die Motorsteuerung (Abb. 3.1, 9) kann der Einfallswinkel des Laserstrahls auf die Oberfläche variiert werden. Von dem optischen Messaufbau wird der Strahl über die Irisblende 3 (Abb. 3.1, 12) und eine Sammellinse (Abb. 3.1, 13) auf den Detektor (Abb. 3.1, 14, Owis) gelenkt. Dieser überträgt die gemessene Intensität an den Lock-In-Amplifier. Das Liquid-Handling-System besteht aus zwei Teflonschläuchen, die an die Messzelle (Abb. 3.1, 17) angeschlossen sind.

Ein Schlauch dient als Zufluss (Abb. 3.1, 16). Hierüber wird die Lösung mittels einer Spritze (Abb. 3.1, 15) in die Messzelle injiziert. Der zweite Schlauch dient als Abfluss (Abb. 3.1, 18) und leitet das Lösungsmittel in ein Auffanggefäß. Die kreisrunden Öffnungen der Messzelle sind mit Gummiringen abgedichtet.

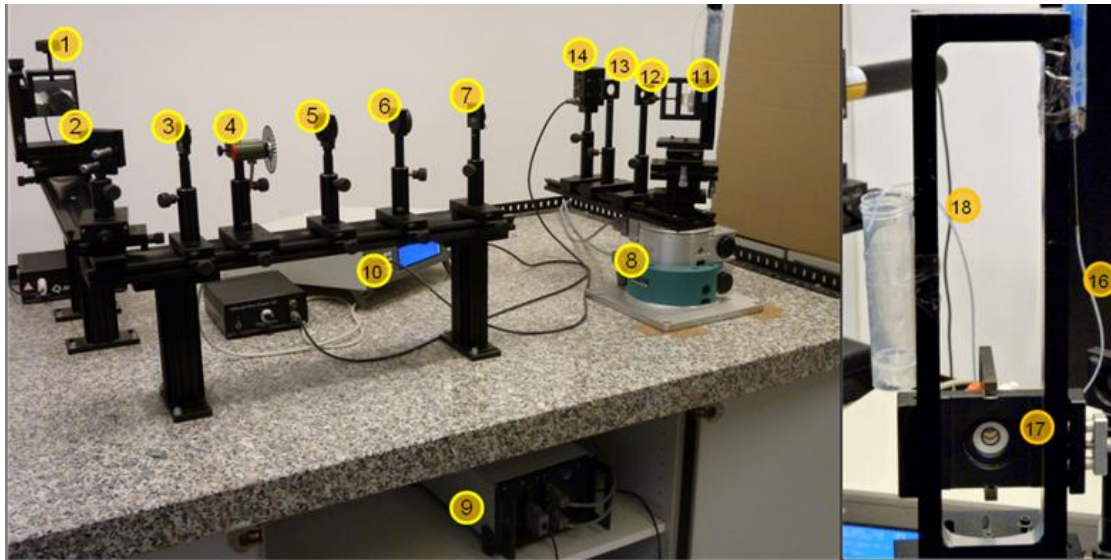


Abb. 3.1: SPR-Spektrometer in *Kretschmann-Konfiguration*, das in dieser Arbeit eingesetzt wurde: 1: HeNe-Laser ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$), 2: Spiegel, 3: Irisblende 1, 4: Chopper, 5: Polarisator 1, 6: Polarisator 2, 7: Irisblende 2, 8: Doppelgoniometer, 9: Motorsteuerung, 10: Lock-In-Verstärker, 11: Optischer Messaufbau, 12: Irisblende 3, 13: Sammellinse, 14: Detektor, 15: Injektionsspritze, 16: Teflonschlauch (Zufluss), 17: Teflonmesszelle, 18: Teflonschlauch (Abfluss)

Nach dem Einbau des LaSFN9-Substrats bzw. der Probe in das SPR-Spektrometer wurde zunächst eine Kalibrierung des Spektrometers vorgenommen. Hierfür wurde die Symmetrie des Strahlenganges durch die Probe eingestellt sowie der Probenmotor auf 45° und der Detektormotor auf 90° kalibriert. Zur Steuerung des Spektrometers und zur digitalen Datenerfassung wurde die Software „Wasplas“ vom Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPIP) in Mainz verwendet. Bevor die Glasobjektträger beschichtet wurden, wurde deren Oberfläche intensiv gereinigt. Alle Objektträger sind jeweils 15 Minuten im Ultraschallbad mit 2 % Helmanex-Lösung, destilliertem H_2O und absolut Ethanol gereinigt worden. Zwischen den Reinigungsschritten wurden die Färberküvetten 10-mal mit destilliertem H_2O durchspült. Nach der Reinigung mit Ethanol wurden die Oberflächen im N_2 -Strom getrocknet und in Ar-Atmosphäre gelagert. Cr und Au wurden thermal aufgedampft. Hierfür wurde ein Edwards FL 400 Auto

306 eingesetzt. Vor der Titanbeschichtung (Ti-Beschichtung) wurden 50 nm bei 300 W und 30 sccm Ar freigesputtert. Ti wurde unter O₂-Atmosphäre in einem Edwards Auto 500 DC aufgesputtert (300 W, 30 sccm O₂, 0.05 nm sec⁻¹). Sämtliche TiO_x- und Au-beschichteten Substrate wurden freundlicherweise vom MPIP zur Verfügung gestellt. Anschließend wurden die Proben bis zur Verwendung in Ar-Atmosphäre gelagert. Um die Schichtdicke mittels SPR zu bestimmen, wurde vor und nach der Oberflächenadsorption einer jeweiligen Komponente ein Scan der Reflektivität bei verschiedenen Winkeln entlang der Oberflächenplasmonenresonanz durchgeführt (SPR-Scan). Hier wurde ein Winkelintervall von 0.5° zwischen den einzelnen Messpunkten gewählt. Im Bereich der Totalreflexionskante und des Minimums des SPR-Spektrums wurde das Intervall auf 0.05° verringert. Nachdem das LaSFN9-Substrat in das Spektrometer eingebaut und kalibriert worden war, wurde die Zelle mit dem Lösungsmittel gefüllt und zunächst ein SPR-Scan der unmodifizierten TiO_x-Oberfläche durchgeführt. Anschließend wurde die Oberfläche mit dem jeweiligen Adsorbat inkubiert und nach Abschluss der Adsorption erneut intensiv mit dem Lösungsmittel gespült, um physisorbierte Moleküle zu entfernen. Alle Lösungen wurden bei 5 °C im Kühlschrank gelagert und vor der Injektion in die Messzelle durch leichtes Schwenken (10-mal auf und ab) durchmischt. Anschließend wurde erneut ein Winkelscan durchgeführt. Durch die Minimumverschiebung im SPR-Spektrum konnte so auf die Schichtdicke des Adsorbats geschlossen werden. Hierfür wurden die Scandaten an theoretische Daten, die sich aus den *Fresnel-Gleichungen* für das jeweilige Schichtsystem ergeben, über das Programm „WinSpall“ des MPIP manuell angefitet. Als Parameter für WinSpall dient die optische Schichtdicke jeder einzelnen Schicht des Schichtsystems. Dieser setzt sich zusammen aus der tatsächlichen Dicke der Schicht sowie dem jeweiligen komplexen Brechungsindex n , bzw. der jeweiligen komplexen, dielektrischen Konstante ϵ . Der Zusammenhang zwischen dielektrischer Konstante und Brechungsindex ist über die *Maxwell-Beziehung* gegeben:

$$\epsilon_{\text{real}} = n^2 - k^2 \quad (3.1)$$

$$\epsilon_{\text{imaginär}} = 2 n k \quad (3.2)$$

Zunächst wurde über die Totalreflexionskante ϵ_{real} des Lösungsmittels sowie die Dicke der Goldschicht bestimmt. Anschließend wurde das Minimum des SPR-Spektrums genutzt, um die Dicke der TiO_2 -Schicht zu ermitteln. Für jede weitere Schicht konnte so sukzessiv durch Anfitzen des Minimums die Dicke der nächsten Schicht ermittelt werden. Die dielektrische Konstante der jeweiligen Schicht wurde konstant gehalten und nur die Schichtdicke ist variiert worden. In dieser Arbeit sind folgende dielektrischen Konstanten zum Einsatz gekommen:

Tabelle 3.1: Dielektrische Konstanten

Schicht	ϵ_{real}	$\epsilon_{\text{imaginär}}$
LaSFN9	3.4225	0
Cr	-6.3	9.3
Au	-12.28	1.47
TiO_x	5.37	0
N-(6-aminohexyl) aminopropyl- trimethoxysilan	2.10279	0
Biotinderivate	2.25	0
Streptavidin	2.25	0
Fibronektin	1.96	0

Zusätzlich wurde die Kinetik des Adsorptionsprozesses in Echtzeit erfasst. Der benötigte konstante Winkel befand sich kurz vor dem Winkel der Oberflächenplasmonenresonanz. Vor der Injektion jedes neuen Adsorbats wurde für mindestens 5 Minuten eine Basislinie aufgenommen. Nach dem Spülvorgang lief die Kinetikmessung mindestens für weitere 5 Minuten, danach erfolgte ein SPR-Scan.

3.2 SPF-Spektrometer

Für die SPFS-Messungen wurde ebenfalls ein SPR-Spektrometer in *Kretschmann-Konfiguration* eingesetzt (RT2005, ResTec GmbH). Dieses wurde um einen Fluoreszenzdetektor erweitert. Der Grundaufbau entspricht dem des oben beschriebenen SPR-Spektrometers. Im Gegensatz zu diesem besitzt der Setup des SPF-Spektrometers (Abb. 3.2) keinen Chopper für den Nullabgleich des Signals, sodass der eingesetzte Detektor nicht an einen Lock-In-Amplifier gekoppelt ist. Das Signal wird hier über ein Multimeter (Abb. 3.2, 10, Kethley) erfasst. Der gesamte Aufbau befindet sich innerhalb einer Box, die lichtdicht verschlossen werden kann. Der Fluoreszenzdetektor (Abb. 3.2, 12) befindet sich hinter der Probenhalterung (Abb. 3.2, 9). Zwischen Messzelle und Fluoreszenzdetektor befindet sich ein zusätzlicher Filter, der die Anregungswellenlänge von 632.8 nm des HeNe-Lasers (JDS Uniphase 1125p, Abb. 3.2, 1) herausfiltert, sodass nur das rotverschobene Fluoreszenzsignal detektiert wird. Zusätzlich ist dieser Setup um einen zweiten Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm erweitert (Abb. 3.2, 15) (Laser Export Co Ltd.), der allerdings bei dieser Arbeit nicht eingesetzt wurde. Die Steuerung der Motoren und Erfassung der Messdaten erfolgte analog zur vorherigen Durchführung über die Software „Wasplas“ des MPIP. Als Substrate für die Messungen dienten ebenfalls die in Kapitel 3.1 beschriebenen mit Cr, Au und TiO₂ besputterten LaSFN9-Substrate. Als Abstand zwischen den einzelnen Messpunkten wurde ein Intervall von 0.05° gewählt.

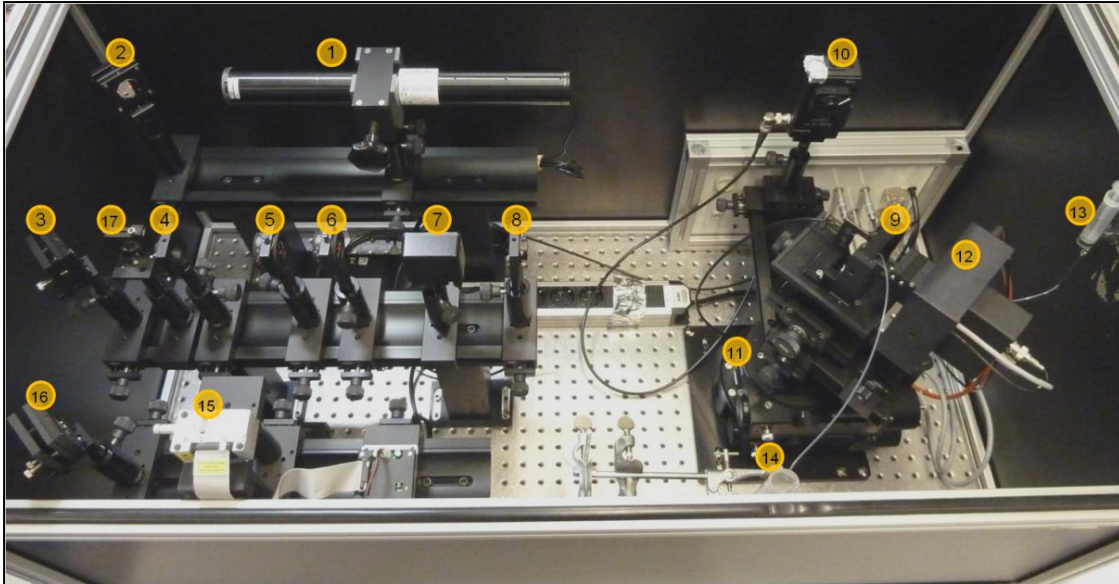


Abb. 3.2: SPR-Spektrometer in *Kretschmann-Konfiguration* und Fluoreszenzdetektionssystem, das in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Alle Komponenten befinden sich in einer lichtundurchlässigen Box. 1: HeNe-Laser ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$), 2: Spiegel, 3: Spiegel, 4: Irisblende 1, 5: Polarisator 1, 6: Polarisator 2, 7: Blende, 8: Irisblende 2, 9: Optische Probenhalterung, 10: Detektor, 11: Doppelgoniometer, 12: Fluoreszenzdetektor, 13: Spritze für Injektion in Messzelle, 14: Abfallgefäß, 15: Laser 2 ($\lambda = 532 \text{ nm}$), 16: Spiegel, 17: Kippspiegel

3.3 AFM

Für die Visualisierung der nanoskaligen Strukturen wurde ein Innova AFM von Bruker (ehemals Veeco-Instruments) eingesetzt (Abb. 3.3). Die Steuerung des AFM erfolgte über die Software „SPM-Lab“ (ebenfalls Bruker).



Abb. 3.3.: Innova Atomic Force Microscope der Firma Bruker (ehemals Veeco-Instruments), das in dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Als Substrate dienten Si-Wafer-Oberflächen (ABC GmbH), die mit 18 nm TiO_2 beschichtet wurden. Der Beschichtungsprozess verlief analog zu dem der LaSFN9-Substrate. Die Reinigung der Oberfläche wurde jedoch um einen Schritt erweitert. Als Erstes wurden die Si-Oberflächen für 15 Minuten mit Aceton im Ultraschallbad gereinigt und anschließend 10-mal mit destilliertem H_2O gespült, um Rückstände der Schutzfolie zu entfernen. Die beschichteten Oberflächen wurden unter Argon Schutzgas gelagert. Nach der Präparation der Oberfläche mit biologischen Komponenten wurde das Substrat mit destilliertem H_2O gereinigt, um Salzurückstände zu beseitigen, und dann im Vakuum getrocknet (Vakuumtrockenschrank VD-23 Binder). Die Messungen der Oberflächenstruktur erfolgten im Tapping-Mode an Luft bei Raumtemperatur. Die eingesetzten Spitzen stammen ebenfalls von Bruker (Modellnummer: RFESPA, Part: MPP-21120-10). Nachdem die Spitze in den Spitzenhalter eingesetzt wurde, lief der Scanner zunächst zwei Stunden warm. Die Spitze befand sich hierbei nicht auf der Oberfläche. Bevor die Spitze aufgesetzt wurde, wurde die Resonanzfrequenz des Cantilevers über die Software ermittelt. Standardmäßig wurde eine

Resonanzfrequenz genutzt, bei der die Spannungsamplitude (Setpoint) im Detektorfeld ca. 2 V betrug, da dies die besten Messergebnisse lieferte. Um die bestmögliche Visualisierung der Oberfläche zu erzielen, ist darüber hinaus eine optimale Wahl der Gain-Parameter des PID-Reglers der Feedback-Schleife entscheidend. Diese regeln die Reaktion der Spitze auf verschiedene Topografien. Gleichzeitig sind sie entscheidend für eine naturgetreue Wiedergabe der Oberflächenstrukturen und müssen daher für jede Oberfläche neu angepasst werden. Als Kriterium für die Güte der gewählten Parameter dient der Vergleich des Forward- zum Backward-Signal beim Scan der Oberfläche. Bei optimaler Parameterwahl ergibt sich so eine exakte Überlagerung beider Signalkurven [Vee08].

Bevor die eigentliche Probe vermessen wurde, ist der jeweilige Scanner mittels Standardprobe kalibriert worden. Je nach eingesetztem Scanner kamen hier unterschiedliche Standardproben zum Einsatz (Small-Area-Scanner PART: 00-107-0015, Large-Area-Scanner PART: 00-107-0016). Um eine geeignete Stelle für eine AFM-Messung zu finden, wurde zunächst ein größerer Bereich vermessen. Anschließend wurde aus diesem Bereich eine Stelle für eine repräsentative Messung mit kleinerem Scanbereich ausgewählt. Alle so ermittelten Daten wurden auf identische Weise über die Software „SPMLabAnalysis V7.00“ in True 2D Color (Shading: $\Phi = 180^\circ$ und $\Theta_{\text{Render}} = 70^\circ$) gerendert und im Tif-Format gespeichert.

3.4 Weitere Geräte

Neben dem SPR- bzw. SPF-Spektrometer und dem AFM kamen bei dieser Arbeit weitere Geräte zum Einsatz, die im Folgenden in Tabelle 3.2 aufgeführt sind:

Tabelle 3.2: Weitere Geräte, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden

Bezeichnung	Gerätetyp	Hersteller
VD 23	Vakuumtrockenschrank	Binder
VWR Ultrasonic Cleaner	Ultraschallbad	VWR
Lab Dancer	Vortexer	YellowLine
Thermomixer Comfort	Thermomixer	Eppendorf
Infinite M 200	Microreader	Tecan
Zeba Spin Desalting Columns, 0.5 ml	GPC-Säulen	Pierce
Centrifuge 5415 D	Zentrifuge	Eppendorf



Kapitel 4: Überprüfung des Wirkungsprinzips

4.1 Bioaktivierung von Oberflächen über Streptavidin

Wie eingangs erwähnt, ist es möglich, Streptavidin als Haftvermittler für eine spezifische Bioaktivierung von Oberflächen einzusetzen. Bisher wurde für biomedizinische Anwendungen nur eine Immobilisierung von Streptavidin über biotinylierte Polymere beschrieben [Hua02, Kan09]. Allerdings ist eine derartige Bioaktivierung aufgrund der eingesetzten Architektur aus Polymer und Biotin-Streptavidin-System nicht trivial. So zeigten *Huang et al.*, dass die Anzahl an gebundenem Streptavidin im PLL-g-PEG linear zum Biotinanteil des Polymers steigt, die Menge an gebundenen biotinylierten Liganden nach Erreichen eines Maximums jedoch mit zunehmendem Biotinanteil im Polymer wieder fällt [Hua02]. Ähnliches beobachteten auch *Xu et al.* Auch hier wurde Streptavidin als Haftvermittler für die Ankopplung biotinylierter Antikörper an biotinyliertem PLL-g-PEG eingesetzt. Nach Streptavidin-Anbindung konnten keine biotinylierten Liganden mehr immobilisiert werden. Er postulierte, dass aufgrund der hohen Affinität zwischen Streptavidin und Biotin das Protein bereits im Polymer durch freie Biotinreste des Polymers selbst abgesättigt wird [Xuf05, Xuf06]. Es ist ebenso möglich, direkt über Self-Assembly eine Streptavidin-Monolage auf einer Biotin-modifizierten Oberfläche zu generieren. Je nach Oberfläche bieten sich hierfür unterschiedliche Biotinderivate an. Im Allgemeinen besitzen diese neben einer endständigen Biotin-Gruppe zur Immobilisierung von Streptavidin eine oberflächenspezifische Ankergruppe. Auf Goldoberflächen werden häufig Disulfid- oder Thiolgruppen für eine Biotinylierung genutzt, auf oxidischen Oberflächen hingegen kommen meist Silane zum Einsatz. So lassen sich Oberflächen wie Ag, Au oder SiO₂ mit einer Streptavidin-Monolage beschichten. Im Gegensatz zur Streptavidin-Immobilisierung über Polymere, die beispielsweise über radikalische Polymerisation appliziert werden können, ist das Erzeugen einer Streptavidin-Monolage über Self-Assembly vergleichsweise

mit nur geringem Aufwand verbunden [Ray09]. Weiterhin steigt die Menge an spezifisch angekoppelten, biotinylierten Liganden direkt mit zunehmendem Streptavidin-Bedeckungsgrad [Spi93, Xin06, Bus00, Bus02]. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine spezifische Biotinarchitektur erforderlich ist, um einen maximalen Bedeckungsgrad an Streptavidin zu erreichen (Abb. 4.1). Da die Bindestelle innerhalb von Streptavidin liegt, muss ein Mindestabstand von 0.8 nm zwischen Ringstruktur und Oberfläche bestehen. In der Praxis wird dies über einen „Spacer“ erreicht, eine zusätzliche Kette, die zwischen Ring und Oberflächenankergruppe des Biotinderivates eingeführt wird. Ferner darf die Biotindichte auf der Oberfläche nicht zu hoch sein, damit die einzelnen Biotine der Streptavidin-Bindungstasche optimal zugänglich sind. Aus diesem Grund wird häufig ein zweites kürzeres Molekül immobilisiert, welches als Verdüner fungiert. Alternativ kann die notwendige Biotinarchitektur auch sequenziell aufgebaut werden. [Bal89, Häu91, Spi93, Spi00, Fuj06, Xin06]

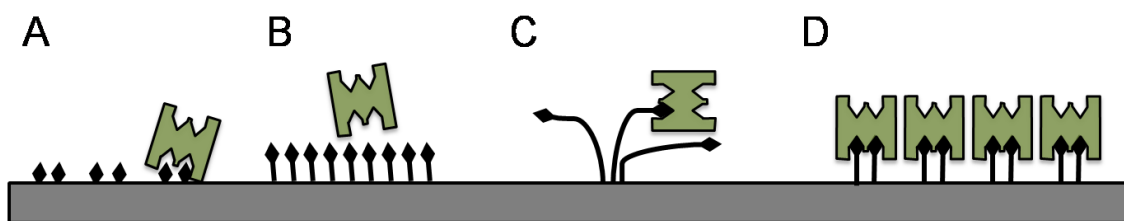


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des adsorbierten Streptavidins in Abhängigkeit der Biotinarchitektur auf der Oberfläche. A: Biotin wird ohne Spacer auf die Oberfläche immobilisiert und ist somit zu kurz, als dass es innerhalb des aktiven Zentrums von Streptavidin binden könnte. B: Die Biotinköpfe sind zu dicht auf der Oberfläche gepackt. Durch diese sterische Hinderung sind die einzelnen Biotine der Bindungstasche von Streptavidin nicht zugänglich. C: Biotin ist durch einen langen Spacer von der Oberfläche getrennt. Dieser ist aufgrund seiner Länge zu flexibel und baut so nur bedingt eine akkurate Monolage auf. D: Biotinköpfe besitzen einen ausreichenden Abstand zueinander und zur Oberfläche, um die Monolage optimal aufzubauen.

Je nachdem über welches Verfahren bzw. über welche Oberflächenarchitektur Streptavidin immobilisiert wurde, ist es innerhalb der Schicht unterschiedlich dicht gepackt. Diese unterschiedlichen „Bedeckungsdichten“ führen wiederum zu unterschiedlichen maximalen Bedeckungsgraden. Da sich die mittels SPR gemessene optische Schichtdicke aus gemessener Schichtdicke und Brechungsindex zusammensetzt, muss bei der Bestimmung des Streptavidin-

Bedeckungsgrades ein für die jeweilige Oberflächenarchitektur repräsentativer Brechungsindex gewählt werden [Dar91, Wei92, Sch99, Rei93, Häu91].

Aufgrund seiner symmetrischen Struktur kann Streptavidin maximal zwei Oberflächenbiotine binden. Somit bleiben zwei weitere Biotin-Bindungstaschen pro Streptavidin unbesetzt. Diese sind aufgrund der tetrameren Anordnung innerhalb des Proteins nicht zur Oberfläche orientiert und können so weitere biotinylierte (Bio-)Moleküle, Proteine und Nanopartikeln binden [Dar91, Spi93, Tov95, Bus02, Xin06, Fuj07]. Als Biotinylierung von Proteinen wird die Anbindung von Biotin an funktionelle Gruppen eines Proteins bezeichnet [Koh04]. Es ist möglich, Biotin mit unterschiedlichen reaktiven Endgruppen zu versehen, um eine Anbindung an bestimmte funktionelle Gruppen eines Proteins zu ermöglichen. Mittlerweile ist eine große Palette an Biotinylierungsreagenzien kommerziell erhältlich, die unterschiedlichste Gruppen wie Amine, Carboxyle, Kohlenhydrate oder Thiole funktionalisieren können. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass bestimmte Gruppen wichtige Funktionen innerhalb des Proteins besitzen und eine Modifizierung dieser zu einem Aktivitätsverlust führen kann. Schwefelverbindungen beispielsweise werden häufig genutzt, um über Disulfidbrücken Untereinheiten zu verbinden oder das Protein zu stabilisieren. In dieser Arbeit wird eine Biotinylierung der primären Amine von Fn, die ein häufiger Bestandteil von Proteinseitenketten sind (z. B. Lysin oder N-Terminus), vorgenommen (Abb. 4.2). Das eingesetzte Sulfo-NHS-LC-Biotin besitzt hierfür einen N-Hydroxysuccinimidrest.

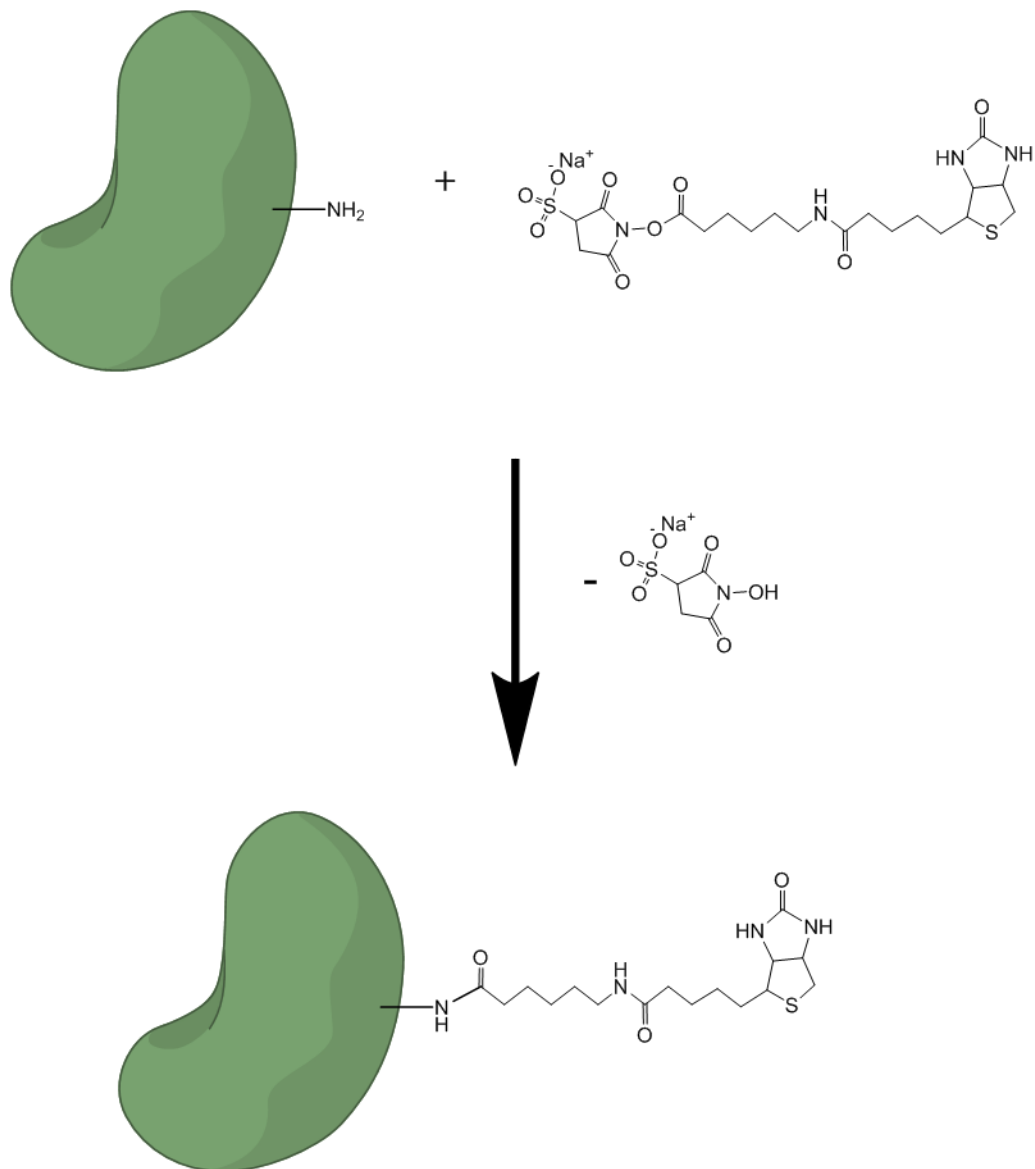


Abb. 4.2: Schema der Biotinylierung der primären Amine eines Proteins (grün) über Sulfo-NHS-LC-Biotin. Nach [TheCC].

Zusätzlich unterscheiden sich kommerziell verfügbare Biotinylierungsreagenzien in weiteren Punkten. So besitzen sie unterschiedliche Spacerlängen oder sind mit einer hydrophilen Sulfo-Gruppe modifiziert, um die Löslichkeit in H_2O zu erhöhen. Neben der Biotinylierung von Proteinen können diese Moleküle ebenso genutzt werden, um Oberflächen zu aktivieren [TheCC, TheBB].

4.2 Materialien und Methoden

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Substrate mit einer oxidischen Titanschicht modifiziert, die eine Implantatoberfläche simuliert und so als Modelloberfläche fungiert. Hierfür wurde Titan unter Sauerstoffpartialdruck auf das Substrat aufgesputtert. Da solche Schichten im Allgemeinen nicht vollständig homogen sind, werden sie als TiO_x -Oberfläche bezeichnet. Für Magnetronputtern ist bekannt, dass bei hohen Abscheideraten und einem kontrollierten Sauerstoffpartialdruck eine TiO_x -Schicht mit $x \approx 2$ entsteht [Bar05]. Auch wenn die hier genutzten Parameter sehr ähnlich sind, wird in dieser Arbeit die Oxidschicht der Korrektheit halber ebenfalls als TiO_x bezeichnet. Zum Aufbau des biomimetischen Schichtsystems auf einer TiO_x -Oberfläche und den Zelladhäsionstests wurden die in Tabelle 4.1 und 4.2 aufgeführten Chemikalien und Proteine eingesetzt:

Tabelle 4.1: Für den Aufbau des biomimetischen Schichtsystems eingesetzte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
PBS-Puffer	Sigma-Aldrich	P4417-50TAB
Methanol	Merck	1.06009.2511
Ethanol	Merck	8.18760.250
N-(6-Aminohexyl)-aminopropyl-trimethoxysilan	ABCR	AB110807
Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Pierce	21338

Tabelle 4.2: Für den Aufbau des biomimetischen Schichtsystems eingesetzte Proteine

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Streptavidin ultrapure	AppliChem	A1495.0001
Fibronektin	Millipore	FC010

Tabelle 4.3: Für die Zelladhäsionstests eingesetzte Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
HHOB-c	PromaCell	C12720647
Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM)	Gibco-Invitrogen	31885-023
Fetales Kalbsserum	Gibco-Invitrogen	10270106
Dexamethasone	Serva Bioproducts	8893
L-Glutamin	Invitrogen	25030-024
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich	A8960
Penicillin-Neomycin-Streptomycin-Antibiotikamix	Gibco-Invitrogen	15640055
Trypsin	Sedrom-Biochrom	L2153

Eine PBS-Puffertablette wurde gemäß der Herstellerangabe in 200 ml destilliertem H₂O gelöst. Anschließend wurde die Pufferlösung im Ultraschallbad für ca. 15 Minuten entgast. Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin wurde abgewogen und bis zur Verwendung bei -15 °C eingefroren. Vor der Verwendung wurde es zunächst eine Stunde lang aufgetaut und anschließend in Ethanol gelöst. Streptavidin wurde in PBS-Pufferlösung gelöst. Fn war vom Hersteller aus bereits in 150 mM NaCl und 10 mM Natriumphosphat gelöst. Für SPR-Messungen wurde es in PBS-Puffer resuspendiert. Für die Biotinylierung von Fn wurde ein Biotinylierungskit von Pierce genutzt (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit). Als Biotinylierungsreagenz wurde Sulfo-NHS-LC-Biotin eingesetzt. Die Biotinylierung geschah entsprechend der Herstellerangaben: Fibronectin in einer Konzentration von 0.5 µM wurde zusammen mit Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS-Puffer in einem molaren Mischungsverhältnis von 1:100 vermischt und der Reaktionsansatz für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mittels Desalt Spin Columns aufgereinigt. Alle Lösungen wurden bis zu ihrem Einsatz bei 5 °C im Kühlschrank gelagert.

Zum Aufbau des biomimetischen Schichtsystems auf TiO_x wurde ein sequenzielles Verfahren angewandt, das sich in mehrere Schritte unterteilt (Abb. 4.3 und 4.4). Als TiO_x -Modelloberflächen für die SPR-spektroskopische Analyse dienten die im Kapitel 3.1 beschriebenen LaSFN9-Objektträger, die nacheinander mit 1.5 nm Chrom, 50 nm Gold und 6 nm TiO_x beschichtet wurden. Die Präparation der einzelnen Molekül- und Proteinschichten wurde innerhalb einer Teflon-Messzelle durchgeführt und, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, SPR-spektroskopisch überwacht. Die TiO_x -Oberfläche wurde zunächst intensiv mit Ethanol und Methanol gereinigt, im N_2 -Luftstrom getrocknet und in die Messzelle eingebaut. Anschließend wurde die Messzelle mit Methanol befüllt. Im ersten Schritt wurde die TiO_x -Oberfläche für 60 Minuten mit 0.5 mM N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Messzelle mit Methanol gespült, um nicht-chemisorbierte Moleküle von der Oberfläche zu entfernen. Durch diesen Schritt wurde eine Aminomodifizierung der TiO_x -Oberfläche erreicht. Anschließend wurde das Lösungsmittel in der Messzelle gegen Ethanol ausgetauscht und die Oberfläche mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin in einer Konzentration von 0.2 mM bis 0.5 mM für mehrere Stunden inkubiert. Hierdurch wurden die im ersten Schritt auf der TiO_x -Oberfläche erzeugten Aminogruppen biotinyliert. Anschließend wurde die Biotin-modifizierte Oberfläche intensiv mit Ethanol gespült. Im dritten Schritt wurde das Lösungsmittel gegen PBS gewechselt und die biotinylierte Oberfläche mit Streptavidin in einer Konzentration von 0.5 μM inkubiert. Nachdem sich ein Plateau in der Adsorptionskinetik eingestellt hatte, wurde die Proteinanbindung durch intensives Spülen mit PBS-Puffer gestoppt. Im letzten Schritt wurde die Streptavidin-modifizierte TiO_x -Oberfläche mit biotinyliertem Fibronectin (bFn) in einer Konzentration 25 nM inkubiert und anschließend intensiv mit PBS-Puffer gespült, um physisorbierte Proteine zu entfernen.

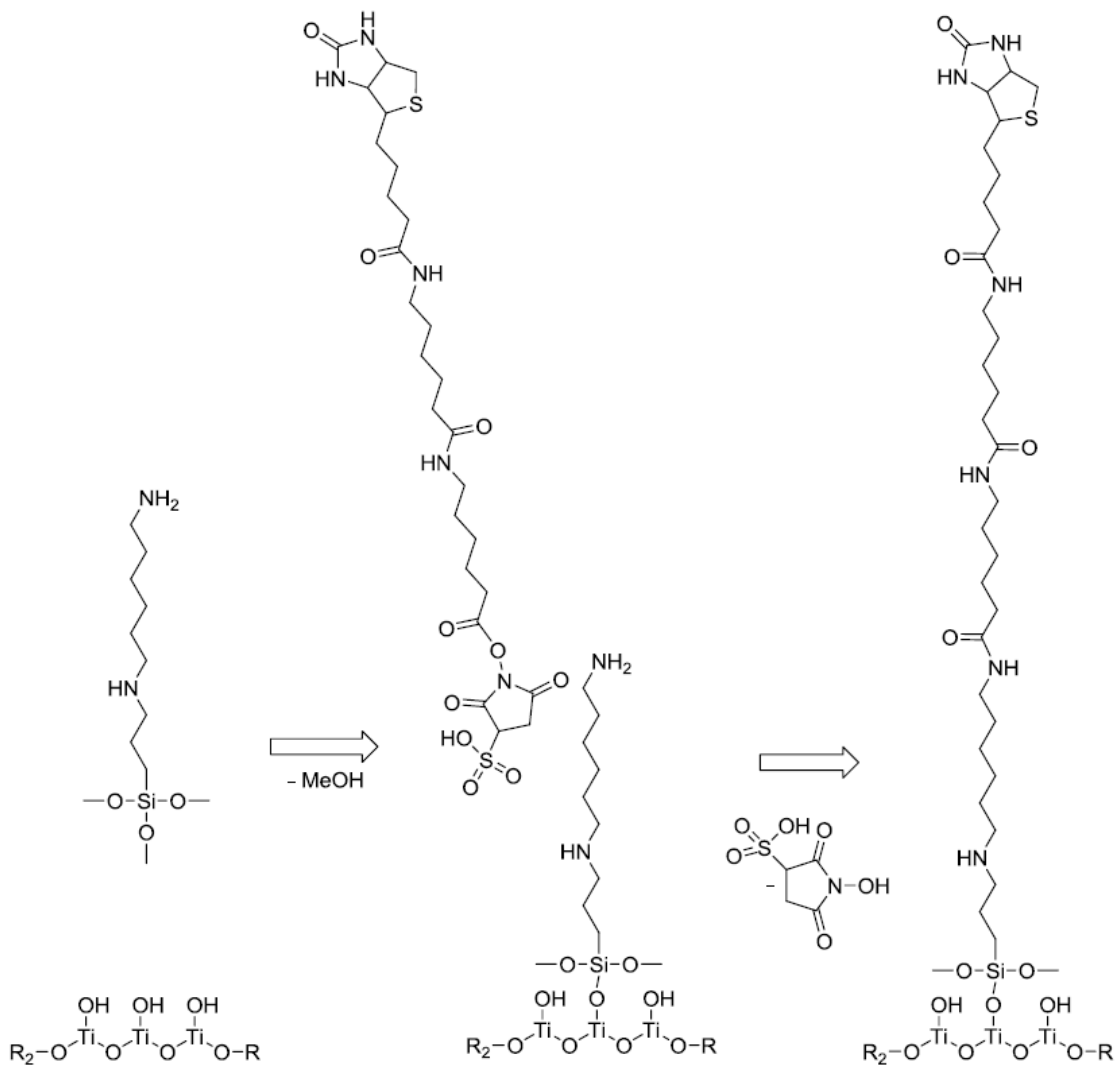


Abb. 4.3: Prinzip der Biotin-Oberflächenaktivierung der TiO_x -Oberfläche über N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan und Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, das in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Im ersten Schritt wird die TiO_x -Oberfläche durch Silanisierung aminoaktiviert. Über die so erzeugten Aminogruppen können NHS-Biotinderivate kovalent angebunden werden.

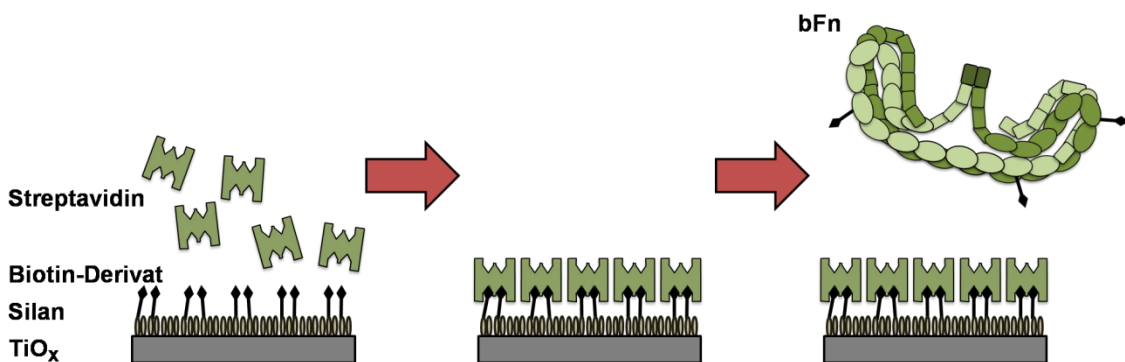


Abb. 4.4: Prinzip des sequenziellen Aufbaus einer Streptavidin- und bFn-Schicht über Self-Assembly auf einer Biotin-modifizierten TiO_x -Oberfläche.

Wie zuvor erwähnt, muss die Streptavidin-Koppelschicht proteinresistente Eigenschaften besitzen, damit die Spezifität des Effekts von immobilisiertem bFn gewährleistet wird [Mic02, Hua01, Dal05, Ray09]. Um dies zu testen, wurde als Modellversuch das antiadhäsive Verhalten der Streptavidin-Beschichtung gegenüber der Adsorption von nativem Fn analysiert. Die Menge an unspezifisch adsorbiertem, nativem Fn kann hier als repräsentatives Maß für die proteinresistenten Eigenschaften einer Oberflächenbeschichtung betrachtet werden [Ray09]. Als unspezifisch adsorbierte Proteine werden in diesem Fall nicht nur physisorbierte Proteine bezeichnet. Ebenfalls beinhaltet dies Proteine, welche nach dem Spülvorgang noch immer an der Oberfläche gebunden sind, ohne dass es für sie einen spezifischen Bindungspartner gibt. Zwar ist eine Oberflächenmodifikation mit Fn erwünscht, wie bereits erwähnt führt eine ungerichtete Proteinadsorption *in vivo* allerdings zur Ausbildung einer Proteinmischschicht an der Implantatoberfläche, die sich negativ auf das Einheilverhalten auswirken kann [Mic02, Hua01, Dal05, Ray09, Gri88]. Hierfür wurden alle drei Oberflächen für 200 Minuten mit Fn in einer Konzentration von 25 nM inkubiert.

Neben dieser Analyse wurden zusätzlich zellbiologische Tests an Osteoblasten vorgenommen.² Um die jeweilige Beschichtung hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Osteoblastenadhäsion zu bewerten, wurde zunächst die Fläche adhären-der Zellen gemessen. Erfolgreich auf der Oberfläche adhären-der Osteoblasten spreizen sich und flachen ab. Durch die Zellspreizung erhöht sich die zweidimensionale Zelloberfläche und somit die Kontaktfläche zum Implantat, was wiederum die Stärke der Zellanbindung steigert [Raj74, Sam05, Oka98]. Hierfür wurde eine aus dem Hüftknochen gewonnene, osteogene Zelllinie (HHOB-c) auf Gewebekultur-Polystyrol in Standard-Osteoblasten-Kultivierungs-medium (500 ml Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium, 50 ml fetales Kalbsserum, 1 ml Dexmethasone, 5 ml L-Glutamin, 150 mg Ascorbinsäure und 5 ml Penicillin-Neomycin-Streptomycin-Antibiotikamix, 20 µg Dexamethason) kultiviert. Die Zellen wurden in planmäßigen Intervallen unter Nutzung von 0.5 % Trypsin passagiert. Die Größe des Intervalls hing von den Zellwachstumscharakteristika ab. Die modifizierten Substrate wurden in 6-Well-Zellkulturplatten gegeben und

² Die Zellversuche wurden in Zusammenarbeit mit der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie (MKGC) der Uniklinik Mainz und dem MPIP Mainz im Rahmen einer kooperativen Master Thesis durchgeführt [Gor09a, Gor09b].

diese mit jeweils 9000 osteogenen Zellen aus der 5. Passage besiedelt. Die Proben wurden im Kultivierungsmedium bei 37 °C und einer konstanten Luftfeuchtigkeit bei 95 % Luft und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellmorphologie der angebundenen Zellen wurde über ein Transmissionsmikroskop (Leica DMIL 2000, Leica) visualisiert und deren Zellwachstum anschließend über die Software „CellAnalyzer“ bei jeweils 30 zufällig ausgewählten Zellen ausgewertet [Bru09]. Zusätzlich zu den Adhäsionsmessungen wurden die Ergebnisse der osteoblastären Proteinexpression auf unmodifizierten, mit nativem Fn modifizierten und mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem modifizierten TiO_x-Oberflächen diskutiert. Die Expression auf der TiO_x-Oberfläche diente hierbei der Normierung und wurde gleich 1 gesetzt. Die Proteinexpressionsstudien wurden über eine quantitative „Realtime PCR“ (RT-PCR) der zellulären mRNA, ausgewählter Markerproteine durchgeführt. Zur Extraktion der osteoblastären RNA wurde ein „RNeasy-Micro Kit“ (Quiagen) eingesetzt. Die RNA wurde anschließend via reverser Transkription in cDNA überschrieben. Eingesetzt wurden hierfür „Random Primer“ (Promega) sowie eine „M-MuLV Reverse Transcriptase“ (Bioron) in fünffachem Reaktionspuffer. Die Reaktion fand in einem Primus 96 Thermocycler (Peqlab) bei folgenden Parametern statt: Anealing: 70°C (10 Min.), Reverse Transkription: 42°C (60 Min.), Inaktivierung: 70°C (10 Min). 18s-RNA wurde als „house keeping gene“ eingesetzt. Die cDNA wurde im Folgenden mittels RT-PCR amplifiziert. Eingesetzt wurde hierfür ein „ABI Prism MasterMix“ mit „Taq-Polymerase“ (beides Peqlab). Die Reaktion geschah hierbei in einem „ABI Prism 7300 RT Detection System“ (Applied Biosystems) unter Verwendung eines „QuantiTect Primer Assay“ (Quiagen). Bei der Amplifikation wurde folgendes Programm eingesetzt: 50° C (2 Min.), 95° C (15 Min.). Anschließend 40 Zyklen: 94° C (15 Sec.), 55°C (30 Sec.), 72°C (35 Sec.). Die DNA wurde zu 18s RNA normalisiert. [Gor09a, Gor09b]

In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesen Daten gezielt die Ergebnisse für die Markerproteine β_1 -Integrin, Runx2 und AP ausgewählt, da diese eine gesteigerte Aktivität von Osteoblasten kennzeichnen [Ray09].

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Streptavidin-Adsorption an Biotin-modifizierte TiO_x -Oberflächen

Nach abgeschlossener Biotinmodifizierung der Oberfläche wurde diese mit Streptavidin inkubiert und die Güte der Beschichtung anhand der gemessenen Streptavidin-Schichtdicke analysiert. Wie sich zeigt, kann eine Streptavidin-Monolage auf aminoaktiviertem TiO_x durch Inkubation mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin aufgebaut werden (Abb. 4.5). Gleichzeitig ist Streptavidin nicht in der Lage, auf unbiotinylierten Oberflächen zu binden. Die Anbindung an die Oberfläche ist somit hochgradig spezifisch. Bei allen Messungen war der Aufbau einer solchen Monolage nach ca. 60 Minuten Streptavidin-Adsorption abgeschlossen. Auch bei längerer Streptavidin-Inkubation zeigte sich kein Einfluss auf die maximale Schichtdicke (siehe Anhang).

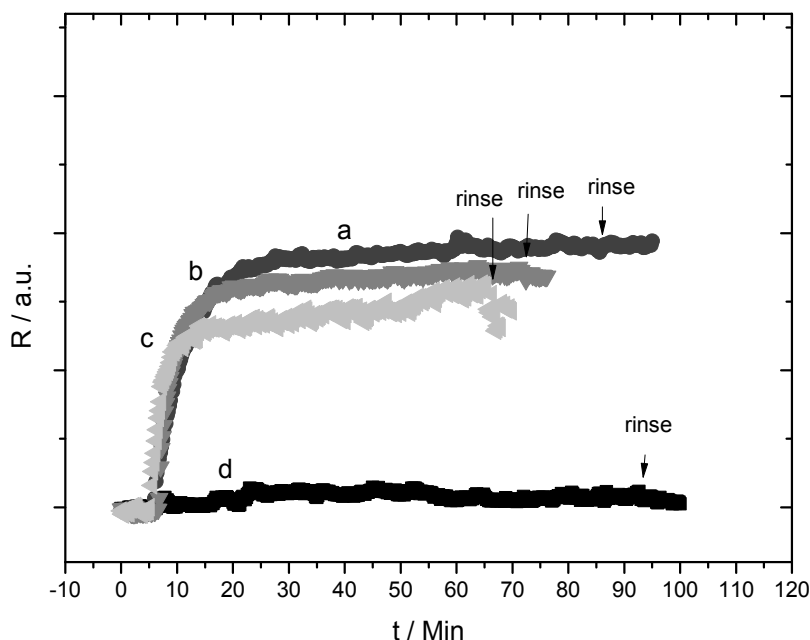


Abb. 4.5: SPR-Kinetikmessungen der Adsorption von Streptavidin auf unterschiedlich mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin modifizierten und zuvor aminoaktivierten TiO_x -Oberflächen. a: 147 Minuten Inkubation mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin. [Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin] = 0.5 mM. Schichtdicke nach Spülen = ca. 3.1 nm. b: 220 Minuten Inkubation mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin. [Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin] = 0.25 mM, Schichtdicke nach Spülen = ca. 2.7 nm. c: 220 Minuten Inkubation mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin. [Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin] = 0.2 mM, Schichtdicke nach Spülen = ca. 2.9 nm. d: Keine Aktivierung über Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Schichtdicke nach Spülen = ca. 0 nm.

4.3.2 Adsorption von Fibronectin

Die so erzeugten Streptavidin-Monolagen wurden mit bFn und nativem Fn inkubiert (Abb. 4.6 und 4.8). Zusätzlich wurden ebenfalls reine TiO_x -Oberflächen und N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan modifizierte TiO_x -Oberflächen mit Fn inkubiert und die Ergebnisse verglichen.

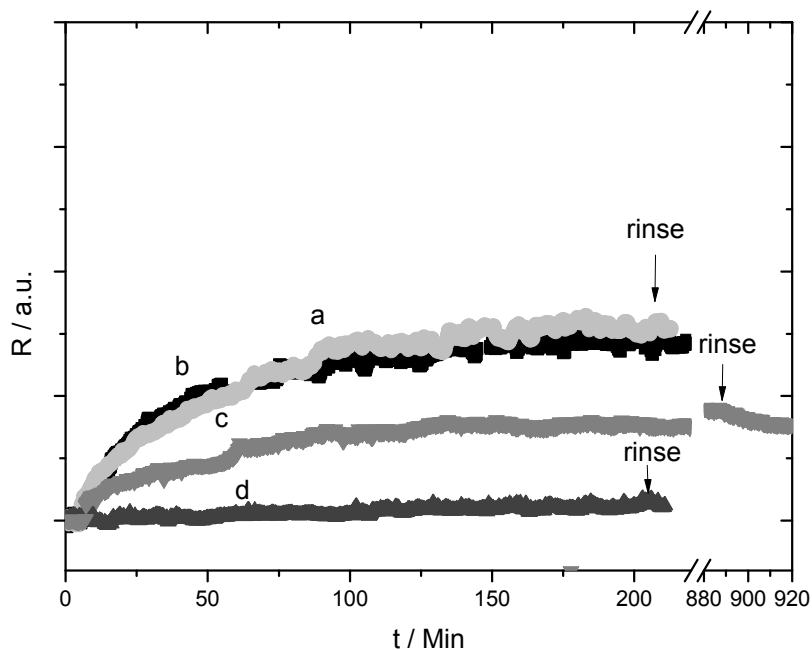
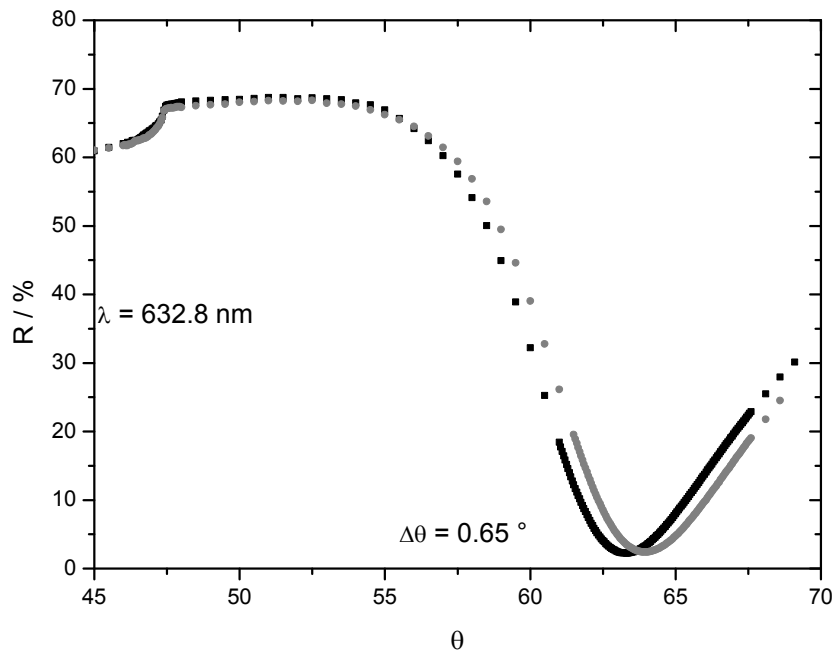
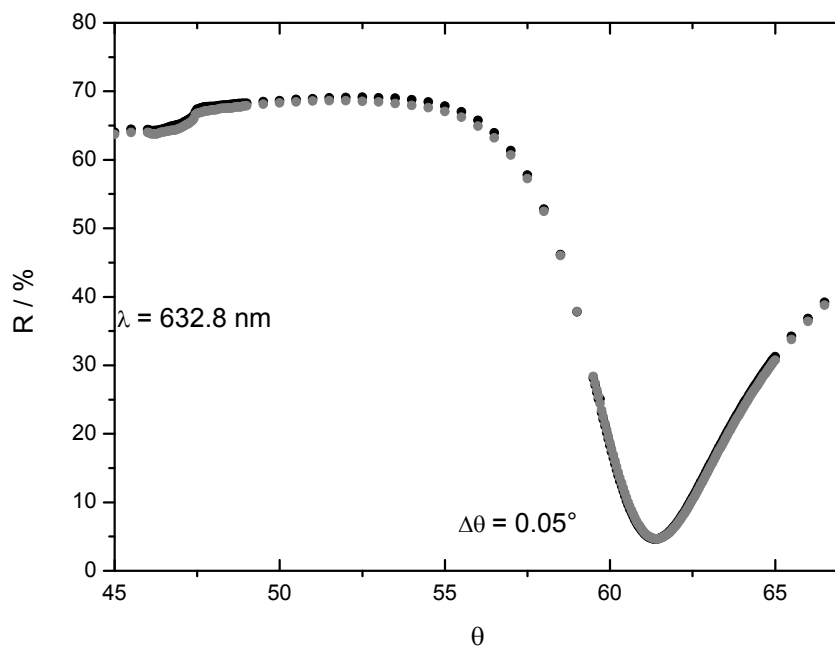


Abb. 4.6: SPR-Kinetikmessungen der Fn-Adsorption auf unterschiedlich modifizierten TiO_x -Oberflächen: a: Adsorption von nativem Fn auf TiO_x . Schichtdicke nach Spülen 5.9 nm. b: Adsorption von nativem Fn auf aminoaktiviertem TiO_x . Schichtdicke nach Spülen 4.6 nm. c: bFn-Adsorption auf Streptavidin (3.1 nm)-aktiviertem TiO_x . Schichtdicke nach Spülen 2.2 nm. d: Adsorption von nativem Fn auf Streptavidin (2.9 nm)-aktiviertem TiO_x . Schichtdicke nach Spülen 0.4 nm.

(a)



(b)



(c)

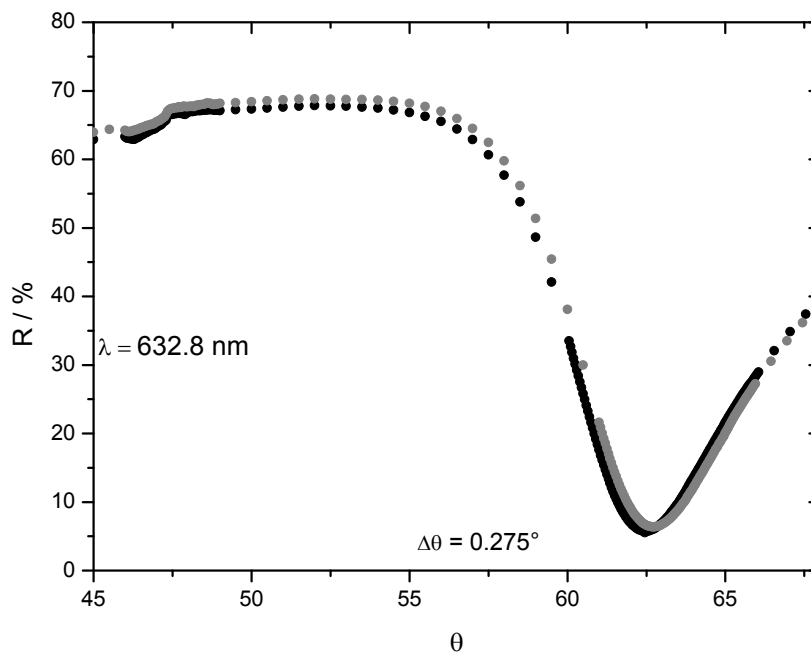


Abb. 4.7: Verschiebung der SPR-Spektren, aufgenommen vor (schwarz) und nach (grau) der Adsorption von Fn bzw. bFn auf verschiedenen Oberflächen. a: Natives Fn auf TiO_x , b: Natives Fn auf Streptavidin- modifiziertem TiO_x , c: bFn auf Streptavidin-modifiziertem TiO_x .

Da für Fn kein einheitlicher Brechungsindex bekannt ist, wurde zunächst ein Brechungsindex von $n = 1.4$ angenommen, wie er für die Fn-Adsorption auf Gold bereits beschrieben wurde [Pax02]. Wie bereits aus der Literatur bekannt, zeigte sich in den SPR-Messungen für die Adsorption von nativem Fn, dass das Protein spontan sowohl auf TiO_x als auch auf aminoaktivierten TiO_x -Oberflächen in großer Menge adsorbiert (Abb. 4.6 a und 4.6 b) [Mac98, Sou07, Böi03]. Die bei den Messungen in dieser Arbeit erzielten Schichtdicken von 5.9 nm auf TiO_x und 4.6 nm auf aminoaktiviertem TiO_x lassen vermuten, dass Fn untereinander agglomeriert und Multilagen ausbildet. Beide Oberflächen besitzen somit keine proteinresistenten Eigenschaften. Das Gegenteil ist hier der Fall. Dieses Adsorptionsverhalten von Fn ändert sich drastisch nach dem Aufbringen einer Streptavidin-Monolage auf TiO_x (Abb. 4.6 d und 4.7 b). Im Gegensatz zu reinem TiO_x oder aminoaktiviertem TiO_x unterbindet eine solche Streptavidin-Monolage die Proteinadsorption und stellt so eine gute Ausgangsbeschichtung für eine spezifische Bioaktivierung dar. So wird sichergestellt,

dass adhärierende Osteoblasten auf den Streptavidin-modifizierten TiO_x -Oberflächen ausschließlich auf das im Anschluss immobilisierte bFn reagieren und es keinen negativen Einfluss durch die Adsorption weiterer Proteine (z. B. aus Körperflüssigkeiten heraus) gibt [Mic02, Hua01, Dal05, Ray09]. Die hier erzielte Streptavidin-Schichtdicke lag allerdings noch deutlich unter der maximalen Schichtdicke von ca. 4.6 bis 4.8 nm, welche für eine annähernd geschlossene Monolage angenommen werden kann [Sch99, Hen89]. Dies zeigt allerdings auch, dass eine komplett geschlossene Streptavidin-Schicht nicht erforderlich ist, um einen starken, proteinabweisenden Effekt auf der Oberfläche zu erzeugen.

Gleichzeitig ermöglicht Streptavidin eine spezifische Anbindung von bFn an die TiO_x -Oberfläche (Abb. 4.6 c und 4.7 c). Die adsorbierte Schicht von bFn an Streptavidin ist mit ca. 2.2 nm deutlich dünner als die der unspezifischen Adsorption auf TiO_x bzw. silanisiertem TiO_x . Bei einer Wiederholung der Messung zeigte sich erneut eine vergleichbare bFn-Schichtdicke von 2.8 nm. Da bei dieser Messung ein gewisses Maß an physisorbiertem bFn durch den Spülvorgang beobachtet werden konnte, ist Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin möglicherweise nicht optimal geeignet, um eine Streptavidin-Monolage aufzubauen. Aufgrund der Länge des eingebauten Spacers kann der Biotinkopf auf der Oberfläche wegnicken, sodass nicht alle Streptavidine akkurat ausgerichtet sind. Dies würde eine zusätzliche Physisorption von bFn begünstigen und lässt vermuten, dass die bFn-Schichtdicke von ca. 2.5 nm nahe dem Maximum des spezifisch gebundenen bFn auf Streptavidin ist. Da bei der Adsorption von bFn nach 200 Minuten kein Anstieg mehr gegenüber der endgültigen bFn-Schichtdicke zu erkennen war, wurde die Adsorptionszeit auf 200 Minuten gesenkt. Für die anschließenden Zelladhäsionstests wurden folgende Parameter übergeben:

Tabelle 4.4: Parameter, die für den Aufbau des biomimetischen Schichtsystems bei den folgenden Zelltests genutzt wurden.

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Lösungsmittel
Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	0.2 mM	220 Min.	Ethanol
Streptavidin	0,5 µM	60 Min.	PBS
bFn	0,025 µM	200 Min.	PBS

4.3.3 Zelltests

Anschließend wurden die oben angegebenen Parameter genutzt, um das bFn-Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x -Oberflächen aufzubauen und im Zellversuch an Osteoblasten zu testen. Neben der fertigen bFn-Streptavidin-Beschichtung wurde ebenfalls jede einzelne Komponente des Schichtsystems aufgebaut und auf seine zelladhäsiven Eigenschaften hin getestet. Zusätzlich wurden Osteoblasten auf unmodifizierten und mit nativem Fn modifizierten Oberflächen inkubiert, um die Ergebnisse später mit denen des bFn-Streptavidin-Schichtsystems zu vergleichen. Erwartungsgemäß zeigte sich auf den verschiedenen Oberflächen ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten der Zellen (Abb. 4.8 und 4.9) [Gor09a, Gor09b].

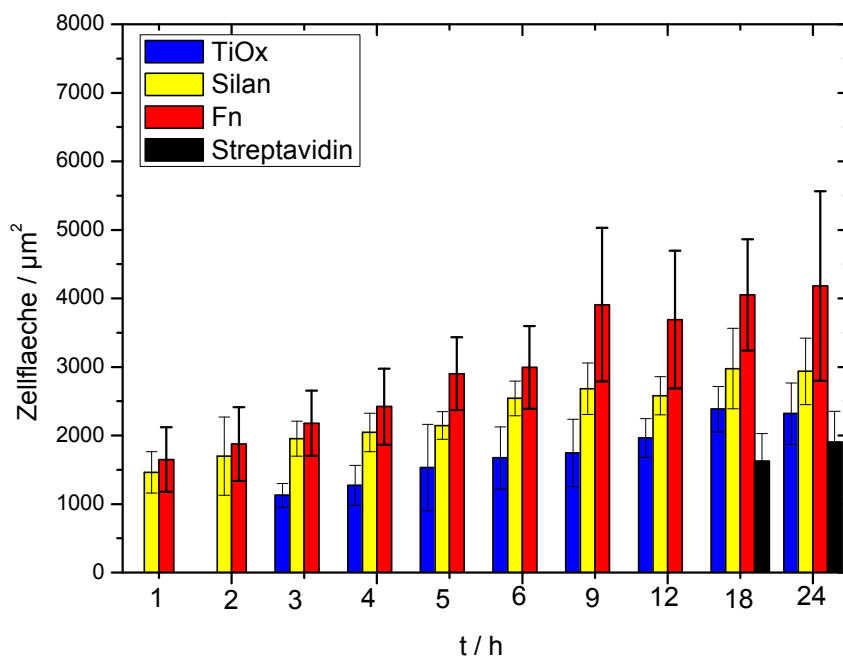


Abb. 4.8: Durchschnittliche Zellfläche von Osteoblasten auf unterschiedlich modifizierten Oberflächen: TiO_x (blau), N-(6-aminoethyl)aminopropyl-trimethoxysilan (gelb), Streptavidin (schwarz) und Fn (rot).

Auf silanisierten TiO_x-Oberflächen begannen die Zellen bereits nach einer Stunde mit der Spreizung, auf unmodifizierten TiO_x-Oberflächen nach drei Stunden (Abb. 4.8). Die Zellflächen nahmen anschließend konstant zu und erreichten auf beiden Oberflächen nach ca. 18 h einen maximalen Wert von durchschnittlich 3000 μm² bzw. 2300 μm². Auf Oberflächen, die mit nativem Fn inkubiert wurden, konnte dieses Ergebnis noch einmal gesteigert werden, sodass bereits nach ca. 9 h ein Maximalwert von ca. 4000 μm² erreicht wurde. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis der SPR-Messung, die ein hohes Maß an unspezifisch angebundenem nativem Fn auf TiO_x zeigte (Abb. 4.7 a). Auch unspezifisch gebundenes Fn ist dafür bekannt, die Adhäsion von Osteoblasten gegenüber unbehandelten TiO_x-Oberflächen zu steigern [Pha03, Aan07]. Wie allerdings zuvor erwähnt, ist eine solche Beschichtung aus unspezifisch adsorbiertem nativem Fn ohne eine zuvor applizierte antiadhäsive Blank-Schicht nicht als Beschichtung für Implantatoberflächen geeignet. Ebenfalls im Einklang mit den SPR-Messungen sind die Ergebnisse für die Adsorption von Osteoblasten auf Streptavidin-modifizierten TiO_x-Oberflächen (siehe Abb. 4.8).

In den ersten 12 h war auf diesen Oberflächen, im Gegensatz zu allen anderen Modifikationen, keine Adhäsion erkennbar. Erst nach 18 h war eine Zellspreizung zu beobachten. Nach 24 h betrug die Zellfläche ca. $1900 \mu\text{m}^2$, was zu diesem Zeitpunkt die geringste Zellspreizung insgesamt darstellte. Hierdurch ist es möglich, über einen Zeitraum von ca. 12 h eine spezifische zelluläre Reaktion ausschließlich auf das adsorbierte, biotinylierte Biomolekül zurückzuführen. Die zuvor bereits auf Proteinebene gezeigten antiadhäsiven Eigenschaften der Streptavidin-Monolage wirken sich erwartungsgemäß direkt auf die Zelladhäsion aus. Wird die Adsorption von Adhäsionsproteinen wie z. B. Fn unterbunden, ist auch die Adhäsion von Zellen unterdrückt. Streptavidin-Monolagen auf TiO_x besitzen somit vergleichbare Eigenschaften wie antiadhäsive Polymerbeschichtungen (z. B. poly(OEGMA)) und sind daher als Blank-Beschichtung für eine gezielte Bioaktivierung von Oberflächen geeignet [RAY09]. Weiterhin zeigte sich, dass auf Oberflächen immobilisiertes Streptavidin keine zelladhäsionsfördernden Eigenschaften besitzt, wie aufgrund einer Aminosäuresequenz aus den Aminosäuren RYD, die der RGD-Sequenz von Fn ähnelt, lange vermutet wurde. In dieser Sequenz ist das Glycin von RGD durch ein Tyrosin (Y) ersetzt [Alo90]. Aufgrund dieser RYD-Sequenz ist es Streptavidin in Lösung möglich, unspezifisch an Integrine zu binden, worüber es sich innerhalb der Nieren anreichern kann. Da Streptavidin bei dieser Beschichtung fest auf der TiO_x -Oberfläche immobilisiert ist und darüber hinaus in sehr geringen Dosen eingesetzt wird, kann ein ähnlicher Effekt wie bei *Murray et al.* ausgeschlossen werden [Mur02]. Darüber hinaus ist es möglich, dass Streptavidin auch immobilisiert seine antibakterielle Wirkung beibehält, was das Risiko von bakteriellen Infektionen nach der Implantation herabsetzen könnte.

Nach der Anbindung von bFn an die mit Streptavidin modifizierte TiO_x -Oberfläche kam es zu einer starken und schnellen Adhäsion und somit zu einer Spreizung der Osteoblasten (Abb. 4.9). Insgesamt war die Zellflächenzunahme bei dieser Art der Oberflächenmodifizierung am stärksten. Die mittlere Zellfläche lag hier stets über der mittleren Schichtdicke aller anderen Oberflächenmodifikationen. Bereits nach 6 h stellte sich ein Maximum von ca. $5000 \mu\text{m}^2$ ein. Bisher wurde der Einfluss einer Biotinylierung von Fn auf die Adhäsion von Zellen nur an Endothelzellen und ohne die Verwendung einer Blank-Oberfläche

getestet, wobei kein Einfluss festgestellt werden konnte [Ana07]. Bei den hier aufgeführten Resultaten fiel dieses Ergebnis eindeutig zugunsten der Oberflächen aus, die über eine Modifizierung mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem verfügten. Um dies zu verdeutlichen wurde die spezifische Zunahme der osteoblastären Zelloberfläche durch die Immobilisierung von bFn auf der Streptavidin-Monolage mit der Zunahme durch die Immobilisierung von nativem Fn auf TiO_x verglichen (Abb. 4.9). Hier wurde die Differenz der mittleren Zelloberfläche auf Substraten mit immobilisiertem nativem Fn bzw. bFn zu der mittleren Zelloberfläche auf Substraten ohne immobilisiertes natives Fn bzw. bFn (also TiO_x - oder Streptavidin-modifiziertes TiO_x) betrachtet. Es wird deutlich, dass durch die Zugabe von bFn die Zelladhäsion signifikant gegenüber der Zugabe von nativem Fn verstärkt wurde.

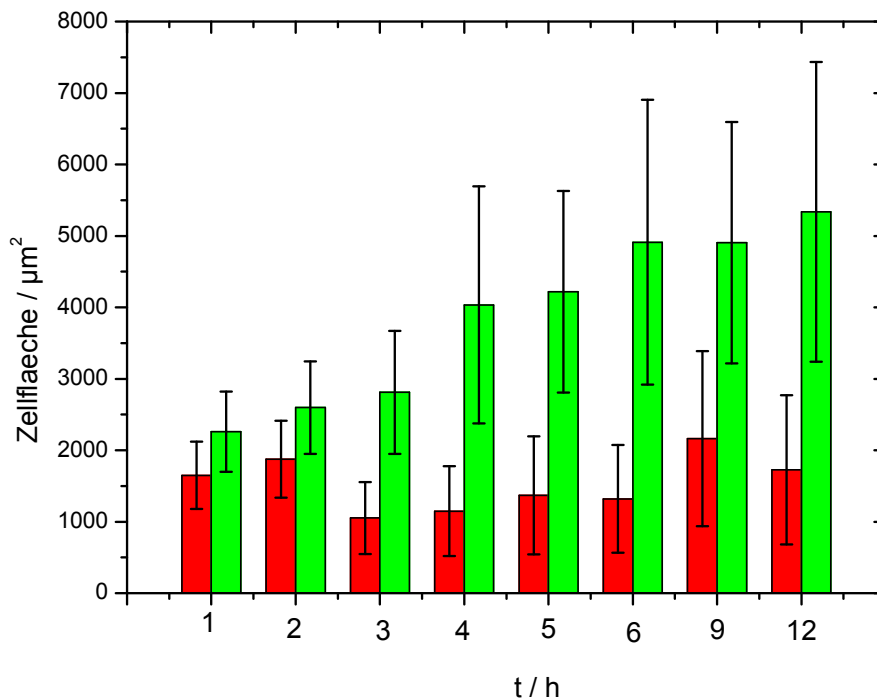


Abb. 4.9: Zunahme der osteoblastären Zellfläche nach Adsorption von nativem Fn auf TiO_x (rot) und nach der Adsorption von bFn auf Streptavidin-modifiziertem TiO_x (grün). Betrachtet wird hierbei die Differenz der Zelloberfläche auf Substraten mit und ohne adsorbiertes Fn. Deutlich zu erkennen ist eine Verstärkung der Zelladhäsion durch Immobilisierung von bFn gegenüber einer Immobilisierung von nativem Fn. Da Streptavidin die osteoblastäre Zelladhäsion für ca. 12 h unterdrückt, kann für diesen Zeitraum eine Steigerung der Zelladhäsion auf die spezifische Immobilisierung von bFn zurückgeführt werden.

Erstaunlich war, dass die gemessene Fn-Bedeckung von bFn auf Streptavidin mit ca. 2.2 nm deutlich unter der von nativem Fn auf TiO_x mit ca. 6 nm lag. Es wäre daher zu erwarten gewesen, dass auf der Oberfläche mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem eine geringere Zelladhäsion stattgefunden hätte. Das Gegenteil war jedoch der Fall.

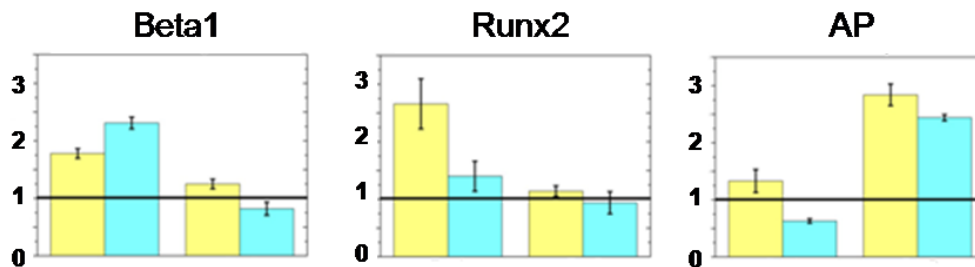


Abb. 4.10: Relative Expression von β_1 -Integrin (links), Runx2 (Mitte) und alkalische Phosphatase (AP, rechts) auf Fn- (grün) und bFn- (gelb) beschichteten Oberflächen nach drei (links) und sieben (rechts) Tagen. Alle drei Proteine markieren eine gesteigerte Aktivität der Osteoblasten auf der Oberfläche. Als Vergleich dient TiO_x (horizontaler Balken).

Zusätzlich zu den Zelladhäsionsstudien konnte darüber hinaus bei der Expression aller drei Markerproteine auf Oberflächen mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem eine Steigerung gegenüber TiO_x-Oberflächen erzielt werden [Gor09b]. Auch hier zeigte sich im Falle der AP und Runx2, dass die Expression sogar gegenüber mit nativem Fn beschichteten TiO_x-Oberflächen gesteigert werden konnte (Abb. 4.10). Dieses Ergebnis ist erneut mit dem Ergebnis von *Raynor et al.* vergleichbar, bei dem bei einer gewebeintegrationssteigernden Beschichtung aus poly(OEGMA) kombiniert mit Fn-Liganden ebenfalls eine erhöhte Expression von Runx2 und AP bei adhätierenden Zellen auftrat, was auf eine gesteigerte Osteoinduktion hindeutet [Ray09]. Die Expression von β_1 -Integrinen ist ebenfalls nach drei Tagen gegenüber TiO_x-Oberflächen hochreguliert und nach sieben Tagen auf bFn-Oberflächen gegenüber Fn noch immer erhöht. Die geringere Hochregulation von β_1 -Integrinen bei TiO_x-Oberflächen mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem lässt sich durch die geringere bFn-Bedeckung erklären. Die Anzahl an $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen steigt linear zur Anzahl an Fn auf einer Oberfläche [Gar99a]. Gleichzeitig muss jedoch berück-

sichtigt werden, dass nicht nur die Menge des gebundenen Fn an einer Oberfläche wichtig für die Adhäsion und Aktivität von Zellen ist, sondern ebenfalls die Fn-Konformation auf einer Oberfläche, da diese ein wichtiges Signal für adhärierende Zellen ist [Gar99b, Mic03]. Wird Fn innerhalb einer ECM auf TiO₂-Oberflächen immobilisiert, besitzt es eine andere Konformation als im Plasma. Daher zeigt sich auf diesen Oberflächen u. a. auch eine erhöhte Osteoblastenadhäsion (Osteoblast-like SAOS-2 cells) gegenüber TiO₂-Oberflächen, die ausschließlich mit nativem Fn modifiziert wurden [Pha03]. Bereits auf Collagen-beschichteten Oberflächen bindet verglichen mit anderen Oberflächen relativ wenig Fn. Dennoch zeigen Zellen auf diesen Oberflächen durch eine Steigerung der Matrixmineralisierung und eine Erhöhung der AP-Expression die höchste osteoblastäre Aktivität bzw. stärkste Differenzierung zu Osteoblasten [Ste02]. Dies ähnelt dem Muster, das in der vorliegenden Arbeit auf TiO_x-Oberflächen, modifiziert mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem, beobachtet wurde. Es wäre daher denkbar, dass sich durch die Biotinylierung und Anbindung an die Streptavidin-Monolage die Fn-Konformation ebenfalls geändert hat. In diesem Fall besäße bFn hier nicht mehr seine kompakte Plasmakonformation, sondern eine Konformation, welche die Adhäsion und Aktivität von Osteoblasten positiv beeinflussen würde. Für diese These würde darüber hinaus die niedrigere Expression von β_1 -Integrin sprechen, die bei Osteoblasten auf Oberflächen mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem gemessen wurde. Adhärierende Zellen rekrutieren $\alpha_5\beta_1$ -Integrin u. a. um Fn anzubinden und um es dann durch Kontraktion ihres Cytoskeletts in eine andere Konformation zu überführen, welche für ihre Adhäsion geeigneter ist [Mao05]. Liegt Fn bereits in dieser Konformation vor, ist eine Hochregulierung der $\alpha_5\beta_1$ -Expression nicht notwendig.

4.4 Konklusion

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass bFn über eine Streptavidin-Monolage auf TiO_x immobilisiert werden kann. Die Adsorption von bFn an Streptavidin ist

hochgradig spezifisch, sodass unbiotinyliertes Fn von der Monolage abgewiesen wird. Die biomimetische Oberflächenbeschichtung genügt somit den geforderten Kriterien für eine spezifische Oberflächenaktivierung. Die so erzeugte Schicht aus bFn ist dünner als eine Schicht aus nativem Fn, welche durch unspezifische Adsorption entsteht. Dennoch kommt es auf Oberflächen mit bFn zur stärksten Adhäsion von Osteoblasten. Auch die osteoblastäre Proteinexpression weist auf diesen Oberflächen durch die erhöhte Expression von AP und Runx2 auf eine gesteigerte Aktivität der Osteoblasten hin [Ray09].

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass das bFn-Streptavidin-Schichtsystem als Beschichtung für Titanimplantate geeignet ist, um ein erhöhtes Einwachsen in den Knochen zu erreichen. Darüber hinaus lässt sich die Schicht in wenigen Schritten via Self-Assembly aufbauen und ist so leichter anzuwenden als vergleichbare Polymerbeschichtungen für TiO_x-Oberflächen. Der Grund für die gesteigerten osteoaktiven Eigenschaften der Oberfläche ist noch unklar, könnte möglicherweise aber an einem Konformationswandel von bFn auf der Streptavidin-Monolage liegen. Deshalb wird das hier erzeugte bFn-Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x-Oberflächen in den folgenden zwei Kapiteln genauer analysiert. Weiterhin beträgt die maximale Streptavidin-Bedeckung hier, bei einer angenommenen maximalen Schichtdicke von 4.8 nm, wie sie sich aus der Struktur von Streptavidin ableitet, gerade einmal ca. 65 %. Daher wird im Folgenden versucht, die Bedeckung mit Streptavidin zu erhöhen, um die Effektivität der Beschichtung weiter zu steigern.

Kapitel 5: Analyse der Streptavidin-Monolage auf TiO_x

5.1 Aufbau der Streptavidin-Monolage über Sulfo-NHS-LC-Biotin

Durch die Zelltests im letzten Kapitel wurde erstmals ein *Proof of Principle* für das hier eingesetzte bFn-Streptavidin-Schichtsystem erbracht. Es wurde gezeigt, dass über Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin eine Streptavidin-Monolage auf aminoaktiviertem TiO_x aufgebracht werden kann, die antiadhäsiv auf Proteine und Zellen wirkt. Nach Anbinden von bFn schlägt dieser Effekt um, sodass die Oberfläche nun stark adhäsionsfördernd ist. Weiterhin ist diese Beschichtung effektiver als eine Beschichtung mit nativem Fn. Allerdings besitzt diese Methode zur Modifizierung von TiO_x -Oberflächen noch einige Nachteile:

Bei einer angenommenen Höhe von Streptavidin von 4.8 nm als Schichtdicke für eine maximale Bedeckung liegt der Bedeckungsgrad bei ca. 65 % [Hen89]. Könnte der Bedeckungsgrad an Streptavidin weiter gesteigert werden, würde dies den Effekt zusätzlich verstärken. Weiterhin ist Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin in Ethanol nur sehr schlecht löslich und es besteht die Möglichkeit, dass aufgrund der höheren Spacerlänge die Biotinderivate wegnicken (Abb. 4.1). Hierdurch wäre das Biotin-Streptavidin-Schichtsystem nicht akkurat aufgebaut. Busse zeigte zudem, dass ein kürzerer Spacer besser zur Immobilisierung von Streptavidin auf Oberflächen geeignet ist als ein längerer [Bus00, Bus02]. Zusätzlich wäre es wesentlich eleganter und kostengünstiger, wenn der Aufbau der Streptavidin-Monolage und die Biotinylierung von Fn über dasselbe Molekül durchgeführt werden könnten. Da sich Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin nur sehr schlecht in H_2O löst, fällt dies für den Einsatz als Biotinylierungsreagenz weg. Daher wurde hier Sulfo-NHS-LC-Biotin (Abb. 5.1) zum Aufbau einer Streptavidin-Monolage auf aminoaktivierten TiO_x -Oberflächen eingesetzt und die Charakteristika dieser so erzeugten Proteinschicht anschließend analysiert.

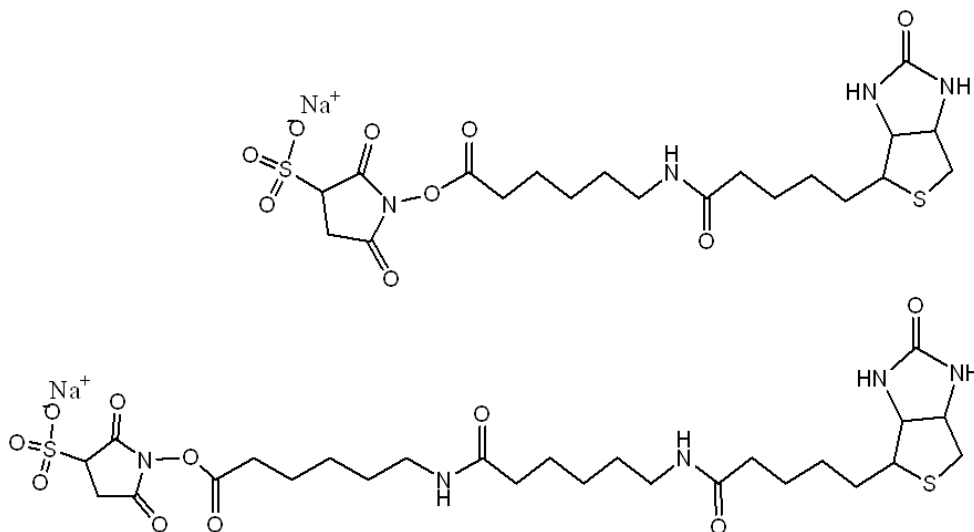


Abb. 5.1: Lewis-Struktur von Sulfo-NHS-LC-Biotin (oben) und Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (unten). Beide Biotinderivate unterscheiden sich in der Kettenlänge des Spacers, der sich zwischen Biotinkopf und Ankergruppe befindet.

Eine Aufgabenstellung ist die Beschreibung der Adsorptionsisotherme für die Adsorption von Streptavidin auf Biotin-modifiziertem TiO_x. Adsorptionsisotherme beschreiben das Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption eines Stoffes an einer Oberfläche aus einer Gasphase bzw. einer Lösung heraus bei konstanter Temperatur. Im Falle von Lösungen stellen sie die gebundene Stoffmenge in Abhängigkeit der Konzentration des gelösten Stoffes dar. Die *Langmuir-Adsorptionsisotherme* ist das einfachste Adsorptionsmodell, das physikalische Grundlagen besitzt. Hier werden folgende Annahmen getroffen:

1. Es findet die Adsorption einer einzelnen Molekülschicht, einer Monolage, an der Oberfläche statt.
2. Alle Adsorptionsplätze sind gleichwertig und gleichmäßig über die Oberfläche verteilt.
3. Die Adsorption eines Moleküls beeinflusst nicht die benachbarten Adsorptionsplätze.

Die Bedeckung einer Oberfläche wird im Allgemeinen mit dem Bedeckungsgrad (Θ_c) angegeben. Er beschreibt das Verhältnis der adsorbierten Stoffmenge zur maximalen Anzahl an Adsorptionsplätzen, sodass bei maximaler Bedeckung

$\Theta_c = 1$ ist. Durch die *Langmuir-Adsorptionsisotherme* wird die Oberflächenbedeckung folgendermaßen beschrieben:

$$\theta_c = \frac{K_{ON} C}{1 + K_{ON} C} \quad (5.1)$$

C ist die jeweilige Konzentration des Adsorbats in der Lösung und K_{ON} der *Langmuir-Adsorptionskoeffizient* [Atk98]. Immobilisiertes Streptavidin verteilt sich nicht gleichmäßig über die Oberfläche, sondern organisiert sich zu Clustern [Azz07]. Diese Cluster bilden keine Multilagen aus und besitzen somit eine Schichtdicke von 4.6 bis 4.8 nm [Hen89, Sch99]. Diese Schichtdicke entspricht einer maximalen Oberflächenbedeckung und kann zur Berechnung des Bedeckungsgrades von Streptavidin genutzt werden.

5.2 Materialien und Methoden

Chemikalien und Proteine, die zum Aufbau einer Streptavidin-Monolage auf TiO_x eingesetzt wurden, sind in den Tabellen 5.1 und 5.2 aufgeführt.

Tabelle 5.1: Chemikalien, die zum Aufbau einer Streptavidin-Monolage auf TiO_x eingesetzt wurden

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
PBS-Puffer	Sigma-Aldrich	P4417-50TAB
Methanol	Merck	1.06009.2511
Ethanol	Merck	8.18760.250
N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan	ABCR	AB110807
Sulfo-NHS-LC-Biotin, „No-Weigh™“-Format	Pierce	21327
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce	21335

Tabelle 5.2: Zum Aufbau einer Monolage auf TiO_x eingesetztes Streptavidin

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Streptavidin ultrapure	AppliChem	A1495.0001

N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan und Streptavidin wurden, wie im vorherigen Kapitel unter Punkt 4.2 beschrieben, gelöst und gelagert. Sulfo-NHS-LC-Biotin wurde abgewogen und bei -19 °C eingefroren. Vor der Benutzung wurde es entsprechend der Herstellerangaben ca. eine Stunde lang bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in Ethanol oder destilliertem Wasser in einer Konzentration von 0.5 mM gelöst. Für die spätere Inkubation im Self-Assembly-Gefäß wurde vorabgewogenes „No-Weigh™“-Sulfo-NHS-LC-Biotin eingesetzt. Bis zur Benutzung wurden alle Lösungen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Der Aufbau der Biotinarchitektur und die Adsorption von Streptavidin wurde zunächst analog zur Beschreibung in Kapitel 4.2 komplett innerhalb einer Teflonmesszelle durchgeführt und mittels SPR überwacht. Bei der Adsorption von Streptavidin wurde aufgrund der Vergleichbarkeit eine konstante Inkubationszeit von 60 Minuten gewählt. Nachdem die optimalen Parameter zur Adsorption von Streptavidin bestimmt wurden, wurde der Aufbau der

Biotinarchitektur aufgrund der erleichterten Handhabung in zwei getrennten Self-Assembly-Gefäßen durchgeführt (Abb. 5.2). Zur Bestimmung der mittleren Streptavidin-Schichtdicke sowie deren Standardabweichung wurden insgesamt 19 Streptavidin-Schichten nach den oben beschriebenen Parametern aufgebaut. Für die Biotinmodifizierung der aminoaktivierten TiO_x -Oberfläche mittels Sulfo-NHS-LC-Biotin wurde Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt und eine Inkubationszeit von 120 Minuten gewählt.



Abb. 5.2: Self-Assembly-Gefäß, das für die Inkubation des LaSFN9-Substrats genutzt wurde.

Um eine hochauflösende Visualisierung der Streptavidin-Schicht zu erhalten, wurde die Monolage mittels AFM vermessen. Die Visualisierung geschah mittels Small-Area-Scanner. Dieser besitzt eine verbesserte vertikale Auflösung in Scanbereichen $< 5 \mu\text{m}$, allerdings ohne Closed-Loop-Funktion. Die Biotinaktivierung der Waferoberfläche wurde analog zur Biotinaktivierung der LaSFN9-Substrate durchgeführt. Für die Inkubation der silanisierten TiO_x -Oberfläche mit 0.5 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung (Lösungsmittel = absolut Ethanol) wurde eine Inkubationszeit von 120 Minuten gewählt. Die Adsorption von Streptavidin erfolgte in destilliertem H_2O , damit bei der anschließenden Trocknung keine Salzurückstände an der Oberfläche zurückbleiben.

Zur Bestimmung der Bindungskonstante K_{ON} wurde eine *Langmuir-Adsorptionsisotherme* erstellt. Hierfür wurden Biotin-modifizierte TiO_x -Oberflächen zusätzlich mit Streptavidin in den Konzentrationen 1000 nM , 750

nM, 250 nM, 100 nM und 25 nM inkubiert und die resultierenden Schichtdicken und Adsorptionskinetiken mittels SPR erfasst. Für eine Streptavidin-Konzentration von 500 nM wurde der Mittelwert aus 19 einzelnen Messungen genommen. Die über SPR ermittelten Schichtdicken wurden in Θ_c umgerechnet. Es wurde eine Schichtdicke von 4.8 nm für eine geschlossene Streptavidin-Schichtdicke angenommen. Der Fit selbst erfolgte über die Software „Origin 8 Pro“.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Silanisierung der Titanoxid-Oberfläche

Zunächst wurden die Schichtdicken der N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan-Schicht bei insgesamt 32 unterschiedlichen Titanschichtdicken analysiert. Die mittlere Schichtdicke der TiO_x-Schicht lag bei 6.5 ± 2.2 nm, die der Silanschicht bei 1.1 ± 0.3 nm. Die Abweichung letzterer befand sich nahe der Auflösung des SPR-Spektrometers. Aus der Struktur von N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan lässt sich eine Schichtdicke von maximal 1.4 nm ableiten, was bedeutet, dass der mittlere Bedeckungsgrad bei ca. 78 % liegt. Eine gemittelte Adsorptionskinetik ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Des Weiteren wurde die Schichtdicke der Silanschicht gegen die Schichtdicke der TiO_x-Schicht der jeweiligen Probe aufgetragen (Abb. 5.4). Wie zu sehen ist, besteht keine Korrelation zwischen beiden Größen. Es ist daher davon auszugehen, dass bereits ab 3 nm die TiO_x-Schicht komplett geschlossen ist.

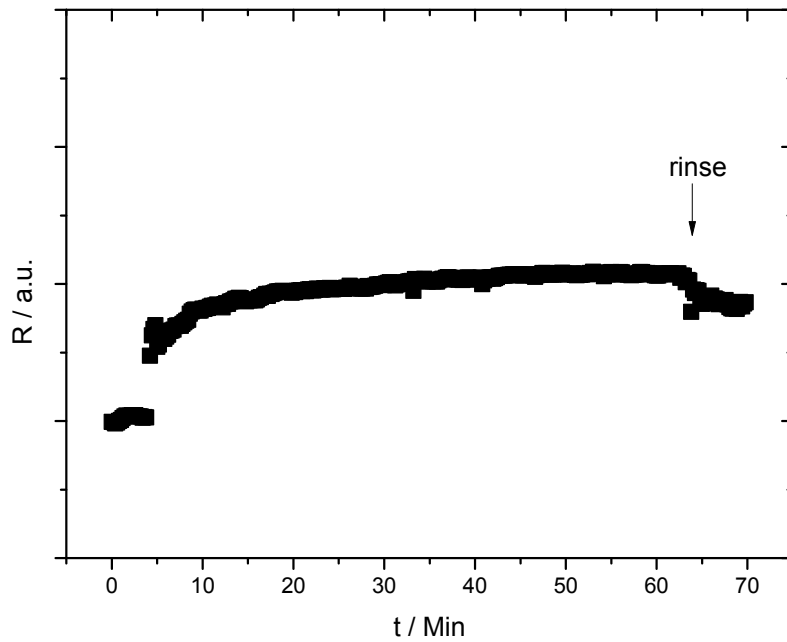


Abb. 5.3: Aus 22 Einzelmessungen gemittelte Adsorptionskinetik von N-(6-aminohexyl)-aminopropyl-trimethoxysilan an einer TiO_x -Oberfläche.

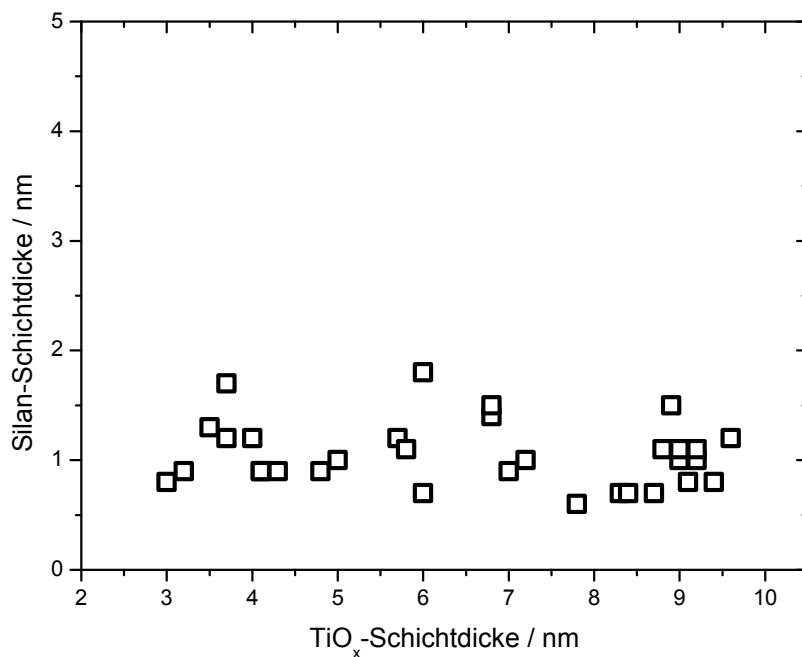


Abb. 5.4: N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan-Schichtdicke aufgetragen gegen die entsprechende TiO_x -Schichtdicke. Wie sich zeigt, gibt es keine sichtbare Korrelation zwischen beiden Größen, sodass bereits ab einer Dicke von 3 nm TiO_x von einer geschlossenen Schicht ausgegangen werden kann.

Um auszuschließen, dass sich die gemessene Schichtdicke durch die Einlagerungen von H₂O-Molekülen ändert und auf diese Weise das Ergebnis verfälscht würde, wurde eine TiO_x-Oberfläche für 16 h in PBS-Pufferlösung gelagert und anschließend erneut vermessen. Es zeigte sich keine messbare Schichtdickenänderung. Die maximale Sulfo-NHS-LC-Biotin-Schichtdicke lag bei 0.2 nm, was zugleich der Messunsicherheit bei SPR-Messungen entspricht. Daher wurde bei der folgenden Analyse der Streptavidin-Monolage die Streptavidin-Schichtdicke gegen die Sulfo-NHS-LC-Biotin-Inkubationszeit aufgetragen.

5.3.2 Aufbau der Streptavidin-Monolage über Sulfo-NHS-LC-Biotin

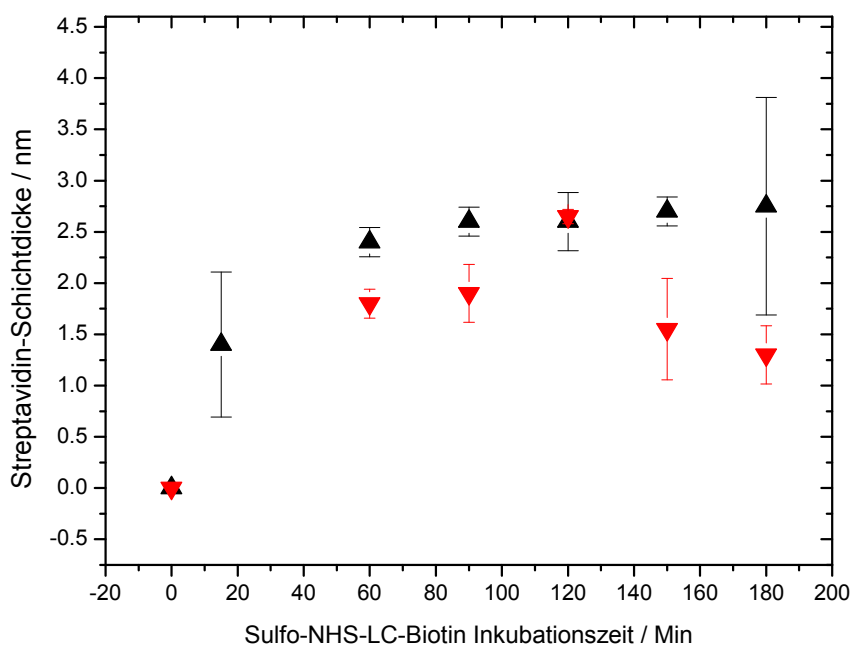


Abb. 5.5: Aufgetragen sind die gemittelten Streptavidin-Schichtdicken gegen die Inkubationszeit mit Sulfo-NHS-LC-Biotin auf den silanisierten TiO_x-Oberflächen in Ethanol (schwarz) oder destilliertem H₂O (rot).

Durch Inkubation der Oberfläche mit Sulfo-NHS-LC-Biotin lässt sich ebenfalls eine Streptavidin-Monolage auf TiO_x aufbauen. Hierbei zeigten sich Unterschiede bei der Wahl des Lösungsmittels (Abb. 5.5). Bei destilliertem H₂O stellte sich nach 120 Minuten Sulfo-NHS-LC-Biotin-Inkubationszeit ein Maximum in der Schichtdicke ein. Anschließend sank die Streptavidin-Schichtdicke mit wei-

ter ansteigender Inkubationszeit ab. Dieses Absinken ist wahrscheinlich auf die geringe Stabilität von Sulfo-NHS-LC-Biotin in wässriger Lösung zurückzuführen, da hier verstärkt die Gefahr einer Hydrolyse von Sulfo-NHS-LC-Biotin besteht. Zusätzlich bestünde auch hier die Möglichkeit, dass die Biotindichte an der Oberfläche zu hoch ist, als dass einzelne Biotinköpfe dem Streptavidin frei zugänglich sind [Spi93, Tov00]. Bei einer Inkubation in Ethanol stellte sich nach 120 Minuten eine vergleichbare Streptavidin-Schichtdicke ein. Allerdings besaßen die Streptavidin-Schichten über einen längeren Sulfo-NHS-LC-Biotin-Inkubationszeitraum eine vergleichbare Schichtdicke. Erst nach 180 Minuten zeigten sich größere Schwankungen. Im Intervall von 90 bis 150 Minuten lag die Schichtdicke im Mittel bei 2.6 bis 2.7 nm. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem von *Fujimaki et al.* [Fuj06]. Die hier über ein ähnliches System aufgebaute Streptavidin-Schichtdicke auf TiO_2 betrug 4.2 nm, allerdings bei einem angenommenen $n_{\text{Streptavidin}} = 1.45$. Dieser Brechungsindex ist repräsentativ, um die Adsorption von Streptavidin über Biotinthiole oder Biotindisulfide auf Gold zu beschreiben. Er ist so gewählt, dass die maximale Streptavidin-Bedeckung, die über eine Biotinthiolarchitektur auf Goldoberflächen aufgebaut werden kann, eine optische Schichtdicke von ca. 4 nm erreicht. Dies würde unter Berücksichtigung der Zwischenräume, welche über eine Biotinthiol- bzw. Biotindisulfidarchitektur innerhalb einer Streptavidin-Schicht entstehen, der Dichte einer geschlossenen Monolage entsprechen. Da in dieser Arbeit Streptavidin auf TiO_x über eine andere Art von molekularer Biotinarchitektur aufgebaut wurde und so dichtere Streptavidin-Bedeckungen als über Thiole auf Gold erzielt werden können, wurde ein $n_{\text{Streptavidin}} = 1.5$ angenommen [Rei93, Ras03, Xin06, Häu91]. Bei eben diesem Brechungsindex ergäbe sich bei *Fujimaki et al.* eine vergleichbare Streptavidin-Schichtdicke auf TiO_2 von ca. 3.1 nm. Allerdings zeigte sich, dass auch diese Schichtdicke unter der einer Streptavidin-Monolage von ca. 4.6 bis 4.8 nm lag. Der Grund lag im eingesetzten Sulfo-NHS-LC-Biotin. Da Sulfo-NHS-LC-Biotin stark hygroskopisch ist, kam es bereits beim Abwiegen der Substanz an der Laborluft zur Hydrolyse. Um das Problem zu umgehen, wurde im Folgenden Sulfo-NHS-LC-Biotin verwendet, das bereits vom Hersteller auf 1 mg vorabgewogen wurde. In dieser Menge ist es sowohl für die Biotinylierung von Fn als auch für die Oberflächenmodifizierung geeignet. Aufgrund der erhöhten Kosten und der erleichterten Handhabung wurde die Biotinmodifizierung der

TiO_x-Oberflächen in Self-Assembly-Gefäßen (SA-Gefäß) durchgeführt. Für den Aufbau der Biotinschicht im SA-Gefäß wurde absolut Ethanol als Lösungsmittel, eine Konzentration von 0.5 mM und eine Inkubationszeit von 120 Minuten festgelegt. Nachdem die Biotinarchitektur so auf der TiO_x-Oberfläche aufgebaut wurde, wurde das Substrat in eine SPR-Messzelle eingebaut und die Streptavidin-Adsorption für 60 Minuten in PBS analysiert. Mit diesen Parametern wurden 19 Adsorptionsversuche unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Streptavidin-Schichtdicken sind als Boxplot-Diagramm in Abbildung 5.6 dargestellt.

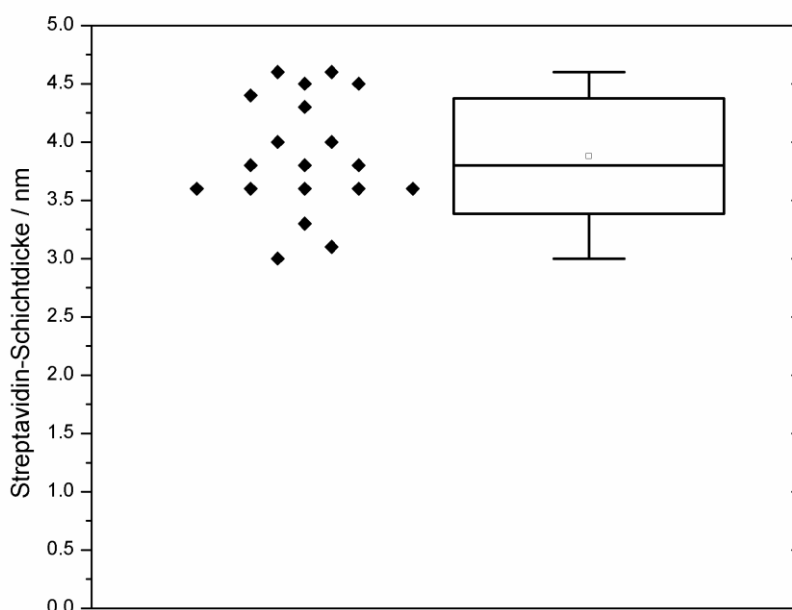


Abb. 5.6: Verteilung der Streptavidin-Schichtdicken, die via SPR auf Sulfo-NHS-LC-Biotin aktiviertem, silanisiertem TiO_x gemessen wurden. Die Inkubation geschah im Self-Assembly-Gefäß. Links sind die Messdaten visualisiert, rechts der dazugehörige Boxplot. Die Mittellinie zeigt den Median, der Punkt den Mittelwert. Die Box visualisiert die Standardabweichung, die Whiskers zeigen den Minimum- und Maximumwert der Messreihe an.

Die mittlere Streptavidin-Schichtdicke lag hier bei 3.9 nm mit einer Standardabweichung von 0.5 nm. Diese mittlere Schichtdicke entspricht einem Bedeckungsgrad von 85 %. Dies stellt eine Steigerung von ca. 20 % gegenüber den Schichtdicken dar, welche über Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin erzeugt wurden. Auch bei einer längeren Streptavidin-Inkubation erhöhte sich die gemessene Schichtdicke nicht mehr. Zusätzlich zeigte sich, dass vorabgefülltes Sulfo-NHS-LC-

Biotin dem Problem der Hydrolyse an der Laborluft entgegenwirkt. Da die Streptavidin-Adsorptionskinetiken stets nach dem gleichen zeitlichen Muster durchgeführt wurden, konnte so eine mittlere Adsorptionskinetik erstellt werden (Abb. 5.7). Wie sich auch hier zeigte, blieb bei keiner vorhergegangenen Sulfo-NHS-LC-Biotin-Inkubation der TiO_x -Oberfläche die Adsorption von Streptavidin aus.

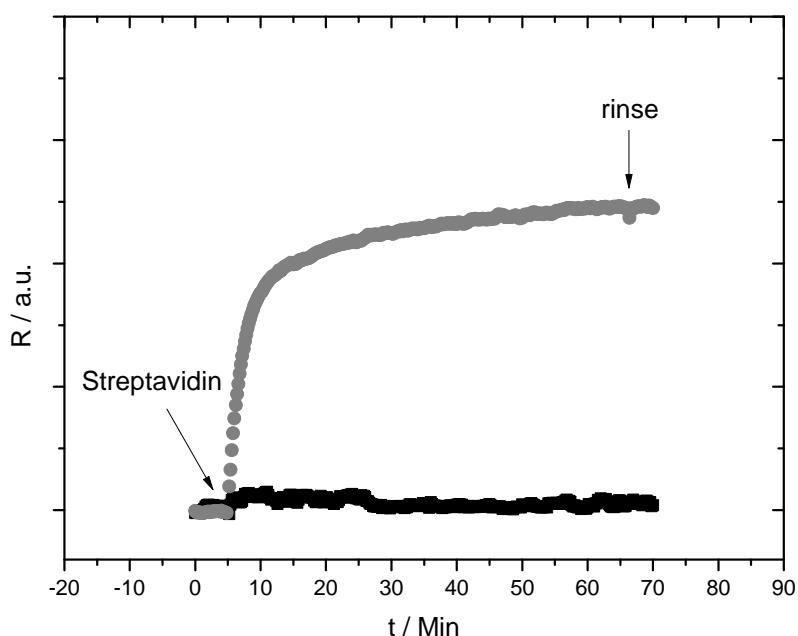


Abb. 5.7: Dargestellt ist die gemittelte Streptavidin-Adsorptionskinetik aus 17 einzelnen Adsorptionskinetiken (graue Kurve). Wie sich zeigt, gibt es keinen Schichtdickeneinbruch nach dem Spülen bei ca. 65 Min. sowie ebenfalls keine Adsorption von Streptavidin auf einer unbiotinylierten TiO_x -Oberfläche (schwarze Kurve).

5.3.3 Struktur der Streptavidin-Monolage

Um die Struktur der Streptavidin-Monolage auf TiO_x genauer zu analysieren, wurde die Oberfläche mittels AFM hochauflösend visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 und 5.9 dargestellt. Die Streptavidin-Monolage zeichnet sich hier deutlich vom Untergrund ab. Aufgrund der fehlenden Closed-Loop-Funktion wirken einige Strukturen entlang der Scanrichtung allerdings leicht verzerrt und unscharf. Insgesamt jedoch ließ sich mittels Small-Area-Scanner sehr gut die Oberflächenstruktur der Streptavidin-Monolage wiedergeben. Es

zeigt sich, dass Streptavidin auch auf TiO_x-Oberflächen zu Clustern mit hoher Proteindichte organisiert ist. Besonders deutlich wird dies im Phasenbild, das eine enorme Amplitude von ca. 1.5 V besitzt und eine aus zwei verschiedenen Komponenten bestehende Oberfläche zeigt (Abb. 5.9). Diese Streptavidin-Cluster sind gleichmäßig über die Oberfläche verteilt. Eine solche Streptavidin-Organisation wurde bereits von *Azzaroni et al.* auf Gold und von *Scheuring und Müller* auf Lipidmembranen beschrieben [Azz07, Sch99]. Eine Kontrollmessung via SPR ergab hier eine Streptavidin-Schichtdicke von 2.6 nm bzw. $\Theta_c = 0.56$. Dies entspricht in etwa dem auf der Oberfläche visualisierten Bedeckungsgrad. Die über die AFM-Analyse-Software berechnete durchschnittliche Höhe der Oberfläche betrug 4.4 nm und entspricht nahezu exakt der Höhe von Streptavidin [Sch99, Hen89]. Darüber hinaus lassen sich in Abbildung 5.8 ebenfalls einzelne Streptavidin-Moleküle erkennen (weiße Pfeile). Zusätzlich zeigen sich Fehlstellen innerhalb der Monolage (schwarze Pfeile). Vergleichbare Strukturen wurden u. a. von *Scheuring und Müller* beschrieben [Sch99]. Bedauerlicherweise reichte die laterale Auflösung des Scanners nicht aus, um die Organisation und Orientierung der einzelnen Streptavidin-Moleküle innerhalb der Monolage zu visualisieren. Insgesamt untermauern diese Ergebnisse dennoch den Wert von 4.8 nm für die Dicke einer geschlossenen Streptavidin-Monolage. Es war nun möglich, die Streptavidin-Bedeckung der Oberfläche zu berechnen und so eine *Langmuir-Adsorptionsisotherme* zu erstellen.

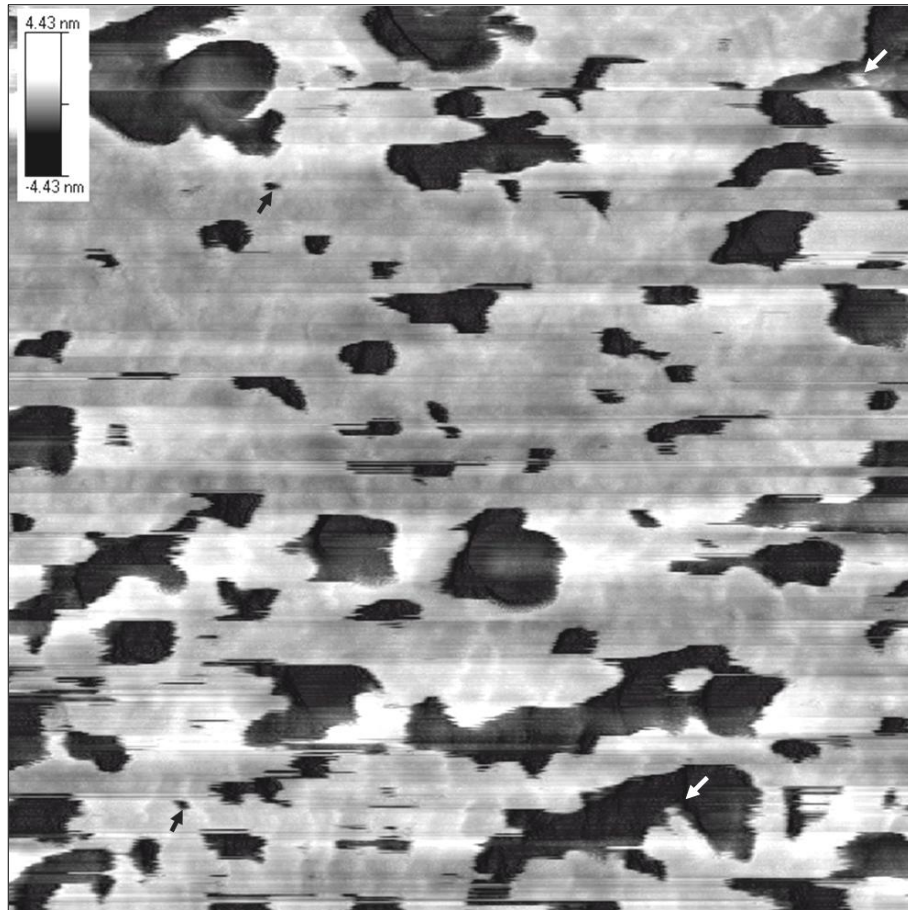


Abb. 5.8: Höhenbild der Streptavidin-Monolage auf der Sulfo-NHS-LC-Biotin-aktivierten, silanisierten TiO_x-Oberfläche. Die Visualisierung geschah mittels Small-Area-Scanner. Scanbereich: 500 nm x 500 nm. Die weißen Pfeile zeigen einzelne Streptavidin-Moleküle, die schwarzen Pfeile Fehlstellungen innerhalb der Monolage.

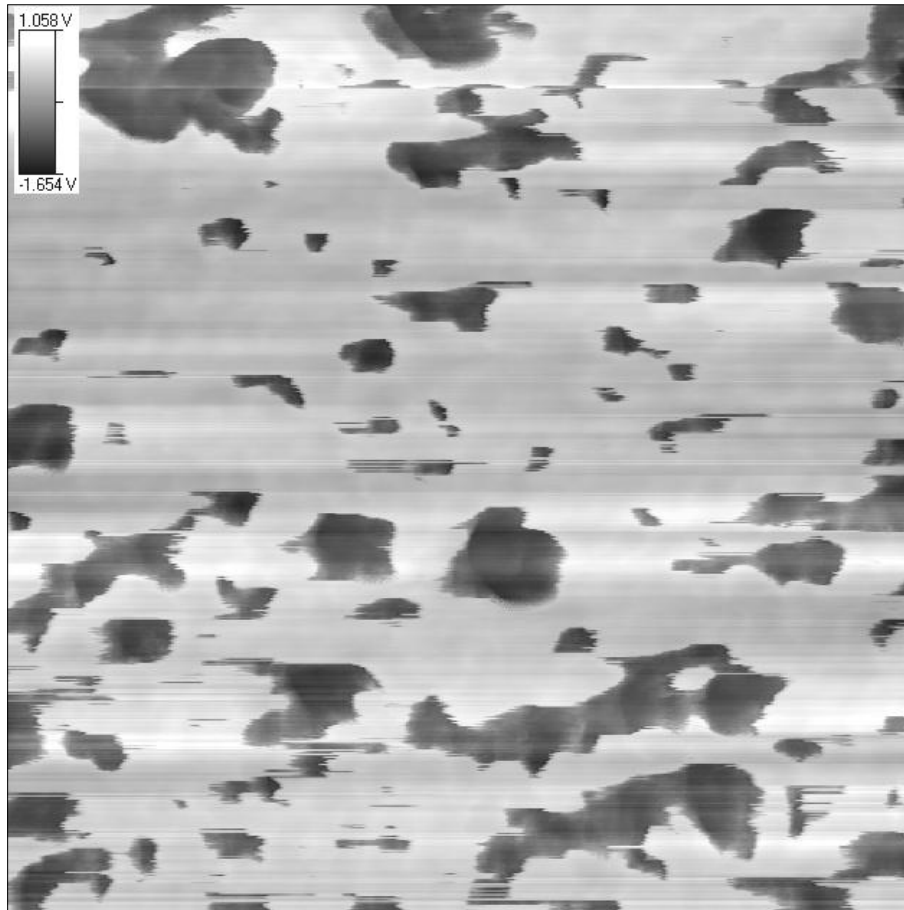


Abb. 5.9: Phasenbild der Streptavidin-Monolage auf der Sulfo-NHS-LC-Biotin-aktivierten, silanisierten TiO_x-Oberfläche. Die Visualisierung geschah mittels Small-Area-Scanner. Scanbereich: 500 nm × 500 nm. Deutlich zu erkennen ist, dass die Streptavidin-Monolage eine andere Phase besitzt als der Untergrund.

5.3.4 Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten

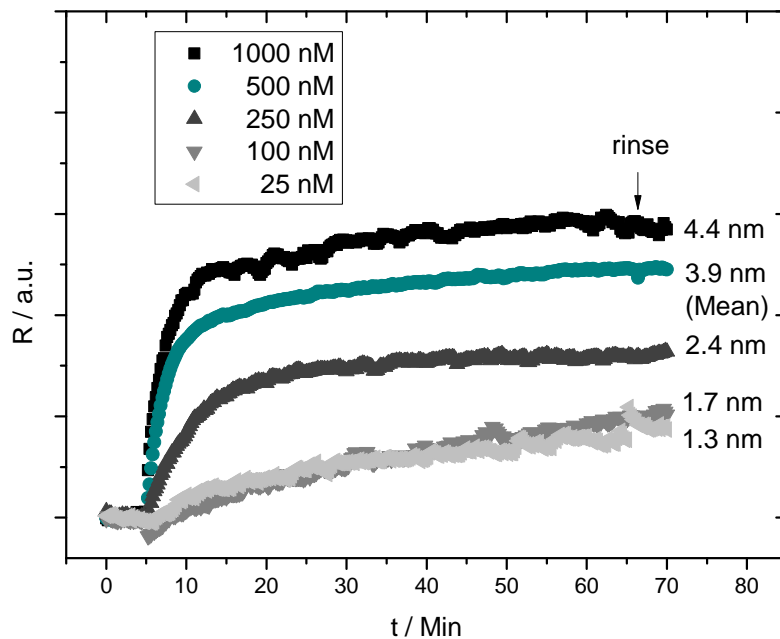
In Abbildung 5.10 a sind die SPR-Adsorptionskinetiken bei verschiedenen Streptavidin-Konzentrationen dargestellt. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen ergaben sich unterschiedliche Adsorptionsgeschwindigkeiten und maximale Schichtdicken nach 60 Minuten. Die so erzeugten Maximalschichtdicken bzw. Bedeckungsgrade nahmen entsprechend der eingesetzten Konzentration zu. Die höchste Schichtdicke wurde somit bei einer Konzentration von 1000 nM erreicht. Allerdings lag diese mit ca. 4.4 nm nur leicht über der Standardabweichung der mittleren Schichtdicke bei einer Konzentration von 500 nM. Aus diesen unterschiedlichen Schichtdicken konnte in der Folge eine *Langmuir-Adsorptionsisotherme* erstellt werden (Abb. 5.10 b). In dieser zeigte sich ab 500 nM eine Sättigungscharakteristik. Über die Korrelation zwischen Bedeckungs-

grad und der jeweiligen Konzentration konnte nun die Gleichgewichtskonstante K_{ON} über einen Fit der *Langmuir-Adsorptionsisotherme* bestimmt werden. Da in diesem Modell davon ausgegangen wurde, dass es keine Rückreaktion gab, wurde der *Adsorptionskoeffizient* als K_{ON}^* bezeichnet:

$$K_{ON}^* = 7 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)} \quad (5.2)$$

Verglichen mit der Komplexbildungskonstante $K_{ON,Liquid} = 10^{15}$, die die Affinität zwischen Streptavidin und Biotin in Lösung beschreibt, beträgt K_{ON} für die Adsorption an Oberflächen deutlich weniger [Cha64, Gre75]. Dies war zu erwarten, da die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenstoßes zwischen beiden Molekülen bei an der Oberfläche gebundenem Biotin wesentlich geringer als in Lösung ist.

(a)



(b)

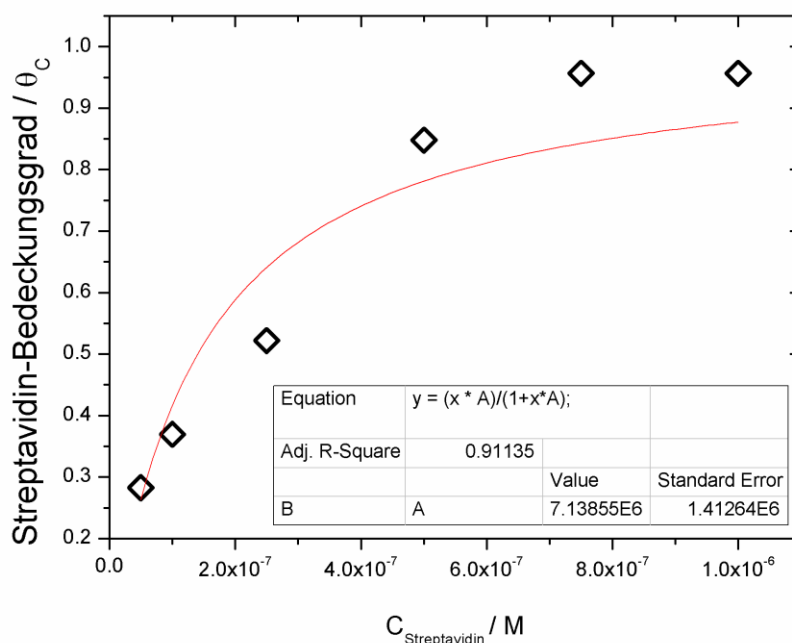


Abb. 5.10: Streptavidin-Schichtdicke auf der Biotin-modifizierten TiO_x-Oberfläche bei unterschiedlichen Konzentrationen: 1000 nM, 750 nM, 500 nM (gemittelt), 250 nM, 100 nM und 25 nM. a: Streptavidin-Adsorptionskinetiken. b: Die resultierenden Schichtdicken dargestellt als *Langmuir-Adsorptionsisotherme*. Bei einer Konzentration von 500 nM wurde der Mittelwert aus 19 Einzelmessungen angegeben. Die Kurve des Fits ist grau dargestellt. Aus dem Fit ergibt sich ein K_{ON}^* von $7 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$.

5.4 Konklusion

In diesem Kapitel wurde der Aufbau einer Streptavidin-Monolage auf TiO_x im Detail untersucht. Die aminoaktivierte Oberfläche wurde mit Sulfo-NHS-LC-Biotin inkubiert, da sich dieses Derivat insgesamt als am besten geeignet herausgestellt hat. Es besitzt eine optimale Spacerlänge und ist sowohl in EtOH als auch in H₂O gut löslich. Hierdurch kann es zur Oberflächenaktivierung und auch zur Biotinylierung von Fn eingesetzt werden. Da aufgrund der stark hygroskopischen Eigenschaften dieses Biotinderivates an der Raumluft eine erhöhte Hydrolysegefahr besteht, wurde vom Hersteller bereits vorabgewogenes Sulfo-NHS-LC-Biotin („No-WeighTM“-Format) eingesetzt und der Aufbau der Biotinarchitektur innerhalb eines Self-Assembly-Gefäßes durchgeführt. Zur

Biotinmodifizierung stellten sich eine Konzentration von 0.5 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin (gelöst in Ethanol) und eine Inkubationszeit von 120 Minuten als optimal heraus. Die resultierende mittlere Streptavidin-Schichtdicke nach 60 Minuten betrug 3.9 ± 0.6 nm. Die Oberflächenvisualisierung mittels AFM zeigte, dass Streptavidin sich an der TiO_x -Oberfläche zu Clustern organisiert. Insgesamt entspricht die beobachtete Streptavidin-Bedeckung der Oberfläche den Ergebnissen der SPR-Messung. So konnte eine Schichtdicke von 4.8 nm für eine 100 % Streptavidin-Bedeckung festgelegt werden. Dies ermöglichte die Berechnung einer Gleichgewichtskonstanten von $K_{\text{ON}}^* = 7 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ für die Adsorption von Streptavidin an Biotin-modifizierte TiO_x -Oberflächen. Dieser Wert liegt deutlich unter dem für Streptavidin und Biotin in Lösung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die Oberflächenimmobilisierung die Wahrscheinlichkeit einer Kollision zwischen Streptavidin und Biotin wesentlich geringer ist als in Lösung. Zum Aufbau einer dichten Streptavidin-Monolage auf einer TiO_x -Oberfläche wurden folgende Parameter als optimal ermittelt:

Tabelle 5.3: Parameter für den Aufbau einer dichten Streptavidin-Monolage auf TiO_x

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Lösungsmittel
N-(6-Aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan	0.5 mM	60 Min.	Methanol
Sulfo-NHS-LC-Biotin	0.5 mM	120 Min.	Ethanol
Streptavidin	0,5 μM	60 Min.	PBS



Kapitel 6: Analyse der Fibronektinadsorption

6.1 Fibronektinkonformation und Biotinylierung

6.1.1 Unterschiedliche Konformationen von Fibronektin

Nachdem der Aufbau einer Streptavidin-Monolage über Sulfo-NHS-LC-Biotin auf TiO_x im vorherigen Kapitel analysiert wurde, kann nun die Adsorption von bFn im Detail untersucht werden. In Kapitel 4 zeigte sich eine deutliche Steigerung in der Adhäsion und Aktivität von Osteoblasten auf TiO_x -Oberflächen, die mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem modifiziert wurden, gegenüber mit nativem Fn modifizierten TiO_x -Oberflächen. Dies ist insbesondere interessant, da im ersten Fall die bFn-Schichtdicke deutlich geringer ausfiel als die Schichtdicke von nativem Fn auf TiO_x -Oberflächen. Eine Erklärung wäre hier ein Konformationswandel von bFn gegenüber nativem Fn auf der Substratoberfläche. Wie bereits erwähnt, besitzt Fn auf TiO_2 -Oberflächen eine kompakte, globuläre Konformation. Je nach Umgebung kann Fn jedoch unterschiedliche Konformationen einnehmen, was ein wichtiges Signal für adhärierende Zellen ist [Gar99b, Mic03, Ber03, Joh99]. Im Allgemeinen lassen sich zwei Konformationen unterscheiden. Je nach Milieu zeigt sich entweder die kompakte, globuläre Konformation oder eine entfaltete, lineare Konformation [Too83, Che08, Zen93, Lin00, Mac98, Sou07, Pri82].

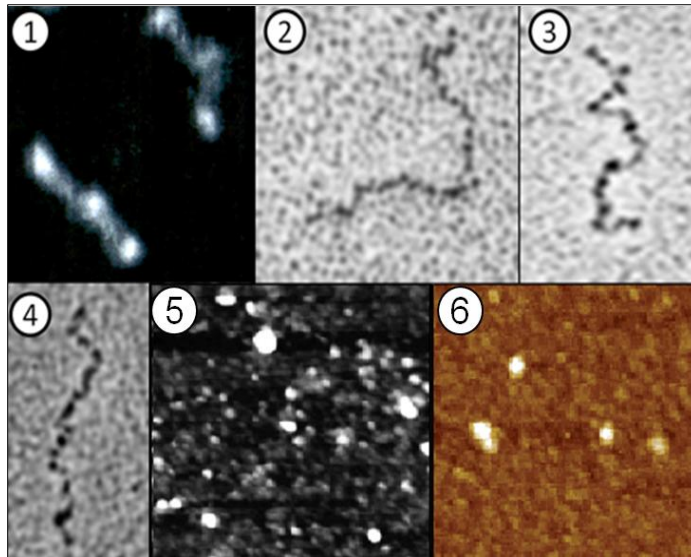


Abb. 6.1: Unterschiedliche Konformationen von Fn. 1: In linearer Konformation auf Mica adsorbiertes Fn [Lin00], 2: Fn gelöst in 0.5 M NaCl in linearer Konformation [Eng81], 3: Fn gelöst in 1 M NaCl in linearer Konformation [Eri81], 4: Fn gelöst in 0.2 M NaCl in globulärer Konformation [Eri81], 5: Fn in globulärer Konformation aus PBS-Puffer auf UPLGA adsorbiert [Che08], 6: Fn in globulärer Konformation aus PBS-Puffer auf TiO_2 adsorbiert [Sou07].

Durch die Modulängen $\text{Fn}_1 = 2.5 \text{ nm}$, $\text{Fn}_2 = 0.7 \text{ nm}$ und $\text{Fn}_3 = 3.2 \text{ nm}$ ergibt sich für entfaltetes Fn eine theoretische Länge von ca. 180 nm [Smi07]. Diese Dimensionen stimmen gut mit der tatsächlich gemessenen Länge von Fn überein. Bei hohen Ionenstärken (0.5 M und 1 M NaCl) erscheint das Protein in einer linearen, V-förmigen Konformation mit enormer Flexibilität. Die gemessene Länge variiert zwischen 120 bis 180 nm und die Dicke beträgt ca. 1 bis 3 nm [Eng81, Eri81]. Eine Verringerung der Ionenstärke auf 0 bis 0.02 M NaCl bewirkt den Übergang zur kompakten, globulären Konformation [Kot81, Eri83]. Dies spiegelt sich auch im gemessenen Gyrationradius wider, der bei geringen Ionenstärken von 0 bis 0.2 M NaCl auf maximal 8.8 nm bis 10.7 nm und bei hohen Ionenstärken von 1.1 M NaCl auf maximal 16.2 nm bis 17.5 nm bestimmt wurde [Roc87, Sjö89]. Diese kompakte Konformation von Fn wird durch die intramolekulare ionische Wechselwirkung der positiv geladenen Module $\text{Fn}_3(2-3)$ mit den negativ geladenen Modulen $\text{Fn}_3(12-14)$ der jeweils anderen Fn-Untereinheit stabilisiert, was die Empfindlichkeit der Konformation gegenüber ionischen Lösungsmitteln erklärt [Joh99, Pot96]. Ebenfalls unterscheidet sich die Konformation der Plasma-Isoform von der ECM-Isoform von Fn. Innerhalb des Knochengewebes stellt die ECM zugleich die natürliche Umgebung von Osteoblasten dar [DeJ08]. Sie ist ein dynamisches Gerüst, welches

eine Umgebung für Zelladhäsion, Differenzierung und Proliferation darstellt. In der ECM-Isoform ist Fn zu einem Netzwerk aus Fibrillen organisiert [Oha99]. Diese Fn-Matrix ist insbesondere wichtig für die Förderung der Zelladhäsion und des Zellwachstums [Mao05]. Der Übergang von kompakter Plasmaform zur fibrillären Form wird *in vivo* durch Zellen vermittelt, wobei die Aktivierung von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen erneut eine entscheidende Rolle einnimmt [Mao05, Wie03, Sec97]. Während der Fibrillogenese kommt es weiterhin zum Konformationswandel, wobei die lösliche, kompakte Plasmaform gestreckt und in die entfaltete, lineare Konformation überführt wird. Ausgehend von dieser Konformation wird Fn dann zu Fibrillen gebündelt [Mao05, Pan02]. Hierbei ist die Fähigkeit der Selbstassoziation von Fn wichtig, da über diese Fn-Fn-Bindung die Fibrillen zusammengehalten werden [Pan02, Pes90]. In der ECM besitzt Fn daher überwiegend seine entfaltete Konformation, ähnlich der, die u. a. auf hydrophilen Oberflächen beobachtet wurde [Smi07, Mao05, Roc87, Pro87, Ber03]. Das von Zellen der ECM exprimierte Fn unterscheidet sich sequenziell leicht von Plasma-Fn. Für den Einbau in die Fibrillen der ECM spielt dies jedoch keine Rolle. Beide Fn-Typen werden gleichermaßen verbaut [Pes90].

6.1.2 Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Proteinen

Die Methode zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Proteinen, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, basiert auf dem FRET-Prinzip und auf der Eigenschaft von Streptavidin, neben Biotin weitere Moleküle mit geringerer Affinität binden zu können [Ana07]. Eingesetzt wird für die Detektion des Biotinylierungsgrades Streptavidin, an das der Fluoreszenzfarbstoff DyLight488 kovalent angebunden ist. Der Fluoreszenzfarbstoff emittiert Fluoreszenzlicht bei 488 nm. Zunächst werden die vier Bindestellen von Streptavidin durch HABA abgesättigt. Das Absorptionsmaximum von HABA überlappt gleichzeitig mit dem Emissionsmaximum von DyLight488. Hierdurch wirkt es als Akzeptor und DyLight488 als Donator, wodurch es zum FRET kommt. Neben der Überlagerung des Emissionsspektrums des Donatormoleküls mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptormoleküls müssen beide Moleküle parallele elektrische Schwingungsebenen besitzen und dürfen nur wenige Nanometer voneinander entfernt sein. Wird dieser HABA-Streptavidin-DyLight488-Komplex mit einem biotinylierten Protein inkubiert, kommt es zur Verdrängung des Quenchers aus der Biotin-Bindungstasche von Streptavidin-DyLight488 durch die am Protein gebundenen Biotinreste. Durch diesen Vorgang wird die Entfernung zwischen Donator- und Akzeptormolekül zu groß, als dass es weiterhin zum FRET kommen kann, was in einer messbaren Zunahme der Fluoreszenzintensität resultiert. Da diese Zunahme proportional zur Anzahl der gebundenen Biotinderivate eines Proteins ist, lässt sich so der Biotinylierungsgrad (engl. Degree of Labeling, DOL) bestimmen (siehe Abb. 6.2).

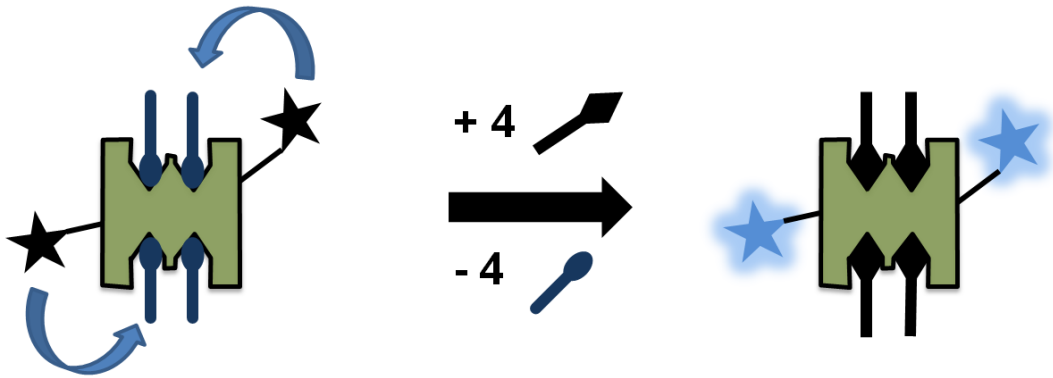


Abb. 6.2.: Schematische Darstellung des Prinzips zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Proteinen. Streptavidin ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifiziert, der im Bereich von 488 nm Licht emittiert. Zunächst jedoch wird diese Fluoreszenz durch den Quencher HABA unterdrückt, der sein Absorptionsmaximum ebenfalls bei ca. 488 nm besitzt. Durch die Zugabe eines biotinyliertem Proteins kommt es zur Bindung zwischen den Biotinresten des Proteins und Streptavidin, wobei HABA aus der Biotin-Bindungstasche verdrängt und das Quenching der Fluoreszenz aufgehoben wird.

6.2 Material und Methoden

Die Chemikalien und Proteine, die zum Aufbau einer Streptavidin-Monolage auf TiO_x und zum Anbinden von bFn eingesetzt wurden, sind in den Tabellen 6.1 und 6.2 aufgeführt.

Tabelle 6.1: Chemikalien, die zum Aufbau der Streptavidin-Monolage auf TiO_x und der Anbindung von bFn eingesetzt wurden

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
PBS-Puffer	Sigma-Aldrich	P4417-50TAB
Methanol	Merck	1.06009.2511
Ethanol	Merck	8.18760.250
N-(6-Aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan	ABCR	AB110807
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce	21327
Biocitin	Sigma-Aldrich	B4261-25MG
HABA	Fluka	54793

Tabelle 6.2: Proteine, die zum Aufbau der Streptavidin-Monolage auf TiO_x und der Anbindung von bFn eingesetzt wurden

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Streptavidin ultrapure	AppliChem	A1495.0001
Streptavidin-Dylight488	Pierce	21832
Fibronectin	Millipore	FC010

Sämtliche Chemikalien und Proteine wurden wie in Kapitel 4.2 und 5.2 beschrieben angesetzt und gelagert. Für die Biotinylierung von Fn und die Biotinaktivierung der silanisierten TiO_x-Oberfläche wurde „No-Weigh™“-Sulfo-NHS-LC-Biotin eingesetzt. Die in Kapitel 4 beschriebene Biotinylierung von Fn wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Um den Einfluss des Biotinylierungsgrades (DOL) auf das Adsorptionsverhalten von bFn exakt zu analysieren, wurde das Biotinylierungsprotokoll so abgewandelt, dass verschiedene DOL gezielt über das Biotin-zu-Fn-Verhältnis erzeugt werden können.³ Sulfo-NHS-LC-Biotin gelöst in Ethanol und Fn gelöst in PBS-Puffer wurden in den Mischungsverhältnissen von 50:1 bis 600:1 (Biotin:Fn) vermischt und für 60

³ Die gezielte Biotinylierung von Fn wurde im Rahmen eines Bachelor-Projekts etabliert, welche im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde.

Minuten inkubiert. Die Fn-Konzentration betrug standardmäßig 0.5 μM . Die Inkubation geschah in einem Thermomixer bei 25 °C und 500 rpm, um definierte Bedingungen für alle Ansätze zu erhalten. Anschließend wurden unragierte Sulfo-NHS-LC-Biotin-Moleküle aus der Lösung mittels „Size-Exclusion-Chromatography“ aufgereinigt. Die Lösung wurde pro Aufreinigungsschritt zwei Minuten bei 1500 \times g über eine Säule zentrifugiert (Desalt-Spin-Columns, Pierce). Das bFn befand sich daraufhin im Eluat. Vor Benutzung der Säulen wurde zunächst der Lagerungspuffer bei 1500 \times g eine Minute lang herauszentrifugiert. Anschließend wurde jede Säule dreimal mit PBS-Puffer aufgefüllt und erneut je eine Minute bei 1500 \times g zentrifugiert. Im Anschluss an die Aufreinigung der im Lösungsmittel befindlichen Sulfo-NHS-LC-Biotine wurde die Konzentration an bFn erneut bestimmt, um eine Abnahme durch den Aufreinigungsprozess zu berücksichtigen. Um den DOL von bFn zu bestimmen, wurde ein „Fluorogenic Biotin Assay“ eingesetzt, der auf der Verdrängung von HABA aus der Biotin-Bindetasche von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Streptavidin (Streptavidin-DyLight488) beruht. Hier wurde zunächst eine Biocitin-Kalibrierreihe aufgestellt. Es wurden jeweils 50 μl eines Lösungsgemisches aus Streptavidin-DyLight488 (400 nM) und HABA (500 μM) mit 50 μl Biocitin mit einer Stoffmenge von 0 bis 80 pMol vermischt und die Fluoreszenz der Kalibrierreihe über den Microreader gemessen. Als Lösungsmittel diente PBS-Pufferlösung. Streptavidin-DyLight488 fluoresziert bei 488 nm, wird aber durch das zugegebene HABA gequenched. Das zugegebene Biocitin wirkt dem Quenchingeffekt entgegen, indem es HABA aus der Biotin-Bindetasche von Streptavidin verdrängt. In dem resultierenden Diagramm wurde die Stoffmenge an Biocitin gegen die gemessene Fluoreszenz aufgetragen und die Messreihe über ein quadratisches Polynom angefitet. Anschließend wurde die Probe des bFn im Microreader vermessen. Diese entsprach in ihrer Zusammensetzung der der Kalibrierreihe, mit der Ausnahme, dass anstelle von Biocitin der Probe bFn beigefügt wurde. Über das erhaltene Fluoreszenzsignal wurde über die zuvor aufgenommene Kalibrierreihe die Stoffmenge an Biotin in der Probe bestimmt. Der Quotient aus Biotinstoffmenge und Fn-Stoffmenge in der Probe ergibt so den DOL des bFn.

Um die Adsorption von Fn und bFn genauer zu analysieren, wurden weitere Adsorptionsversuche auf TiO_x -Oberflächen, modifiziert mit dem Streptavidin-Schichtsystem, durchgeführt. Der Aufbau der Biotinarchitektur auf der TiO_x -Oberfläche und die Adsorption von Streptavidin wurden, soweit nicht weiter angegeben, analog zur Beschreibung in Kapitel 5.2 durchgeführt und SPR-spektroskopisch überwacht. Um die Schichtdicken von nativem Fn und bFn auf den jeweiligen Oberflächen genauer SPR-spektroskopisch bestimmen zu können, wurde eine höhere Anzahl an Adsorptionsversuchen durchgeführt. Um den Einfluss des DOL zu testen, wurde bFn mit drei unterschiedlichen DOLs, 15, 29 und 45, erzeugt. Das bFn des jeweiligen DOL wurde in einer Konzentration von 25 nM für 200 Minuten auf einer Streptavidin-Monolage inkubiert. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass alle Streptavidin-Monolagen eine identische Schichtdicke besaßen, um vergleichbare Ausgangsbedingungen für die bFn-Adsorption zu erreichen. Nach 200 Minuten wurde die Oberfläche intensiv mit der Pufferlösung gespült. Darüber hinaus wurde die Adsorption von Fn und bFn an Streptavidin-Monolagen unterschiedlicher Dichte analysiert. Um unterschiedlich Streptavidin-Bedeckungsgrade für diese Analyse zu erhalten, wurden verschiedene Verfahren eingesetzt. Zum einen wurde das Streptavidin-Schichtsystem wie oben beschrieben auf TiO_x aufgebaut. Aufgrund einer Standardabweichung von durchschnittlich 0.5 nm ergab sich so ein kleines Spektrum an unterschiedlichen Streptavidin-Bedeckungen. Zusätzlich wurden die im Kapitel 5.3 beschriebenen unterschiedlich dichten Streptavidin-Schichten, die durch Variation der Inkubationszeiten von Sulfo-NHS-LC-Biotin in Ethanol und unterschiedliche Konzentrationen an Streptavidin erzeugt wurden, im Anschluss ebenfalls mit nativem Fn bzw. bFn inkubiert. Um die Konformation von Fn auf TiO_x und bFn auf der Streptavidin-Monolage zu bestimmen, wurden AFM-Messungen dieser Schichten durchgeführt. Hierfür wurde das biomimetische Schichtsystem Schicht für Schicht auf TiO_x -besputterten Si-Wafern (siehe Kapitel 3.3) aufgebaut und anschließend im Vakuum getrocknet. Der Aufbau des Schichtsystems wurde zusätzlich durch SPR-Messungen kontrolliert. Um keine Salzurückstände auf der Oberfläche zu erhalten, welche eine AFM-Messung stören würden, wurde anstelle von PBS-Pufferlösung destilliertes H_2O eingesetzt. Für die AFM-Messungen wurde ein Large-Area-Scanner mit Closed-Loop eingesetzt.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 SPR-spektroskopische Analyse der Adsorption von Fibronectin

Die Schichtdicke von nativem Fn auf silanisierten TiO_x -Oberflächen betrug im Mittel 5 ± 0.3 nm, was mit den zuvor auf TiO_x erzielten Ergebnissen vergleichbar ist (Abb. 6.3). Nach Aufbau der Streptavidin-Monolage änderte sich auch hier das Adsorptionsverhalten von Fn deutlich. Zur Analyse wurden vier Streptavidin-Monolagen mit Fn inkubiert (Abb. 6.3). Wie sich zeigt, unterdrücken auch diese Streptavidin-Schichten die Adsorption von nativem Fn nahezu komplett, sodass die Schichtdicke im Mittel bei 0.2 ± 0.2 nm lag.

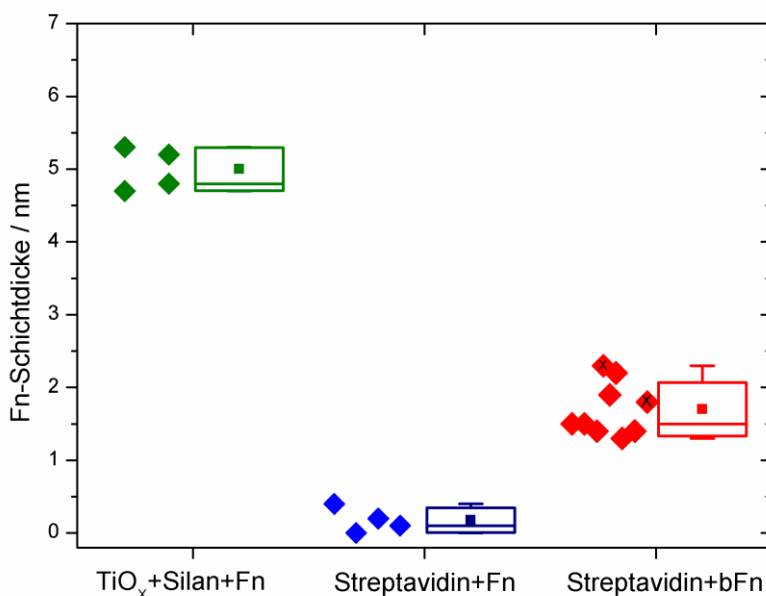


Abb. 6.3: Boxplot (rechts) und Messwerte (links) der Schichtdickenverteilung von biotinyliertem und nichtbiotinyliertem Fn auf unterschiedlich modifizierten TiO_x -Oberflächen. Die mittlere Linie der Boxplots stellt den Median dar, das Quadrat den Mittelwert. Die Größe der Box entspricht der Standardabweichung, die Whiskers zeigen den Minimal- und Maximalwert an. Links neben dem Boxplot befinden sich die jeweiligen Messwerte. Grün dargestellt ist natives Fn auf silanisiertem TiO_x , blau natives Fn auf dem Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x und rot bFn auf dem Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x . Die beiden mit X markierten Punkte besaßen eine Inkubationszeit von 100 Minuten.

Um Fn spezifisch an einer Streptavidin-Oberfläche anzubinden, muss dieses zuvor biotinyliert werden (Abb. 6.3). Um ein besseres Verständnis von diesem Prozess zu erhalten, wurde zunächst der Einfluss des DOL auf die Schichtdicke von bFn untersucht. Die Ergebnisse für den Einfluss des Biotinüberschusses auf den DOL sind in Abbildung 6.4 dargestellt [Ros09]. Wie sich zeigte, steigt der DOL mit zunehmendem Biotinüberschuss sigmoidal an. Die leichte Abflachung ist auf das Erreichen der maximalen Anzahl an angebondenen Biotinen zurückzuführen.⁴ Die Ergebnisse des Einflusses von drei unterschiedlichen DOLs auf die resultierende bFn-Schichtdicke sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst.

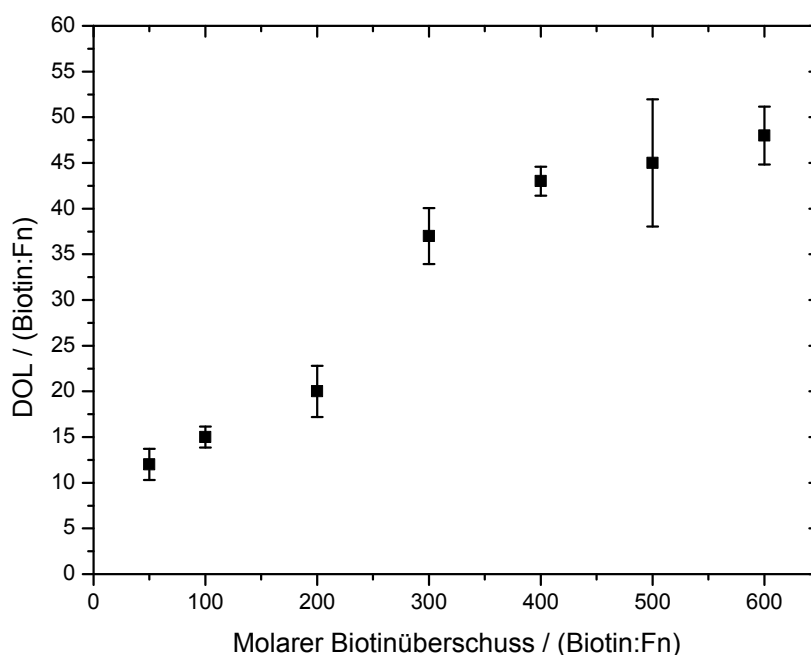


Abb. 6.4: Einfluss des Biotinüberschusses auf den DOL von bFn.

⁴ In den dargestellten Daten wurde im Biotinylierungsverfahren eine dreifache Säulenreinigung gewählt. Wurde hingegen nur eine einfache Aufreinigung über die Säule gewählt, resultierte dies in höheren DOLs bei gleichem Biotin zu Fibronektin Verhältnis. Diese höheren DOLs sind auf nichtaufgereinigten Sulfo-NHS-LC-Biotin-Resten im Lösungsmittel zurückzuführen. Die Säulenkapazität reicht demnach nicht aus, um sämtliche Biotine bei nur einem Aufreinigungsschritt zu entfernen. Die überschüssigen Biotinreste haben hierbei allerdings keinen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten oder auf die resultierende Schichtdicke von bFn (Abb. 6.3). [Ros09]

Tabelle 6.3: Einfluss der DOLs auf die bFn-Schichtdicke

Schichtdicke bFn (nm)	DOL	Schichtdicke Streptavidin (nm)
1.5	15	3.6
1.4	29	3.6
1.5	45	3.8
0.4	0	3.5

Wie sich zeigt, hat auch hier der DOL keinen Einfluss auf die resultierende bFn-Schichtdicke bzw. das Adsorptionsverhalten an der Streptavidin-Monolage. Die mittlere bFn-Schichtdicke der drei eingesetzten DOLs betrug 1.5 nm mit einer Schwankung von gerade einmal ± 0.1 nm, die somit unter der Auflösungsgrenze des SPR-Spektrometers liegt. Insgesamt zeigen sich in Abbildung 6.3 signifikante Unterschiede in den Schichtdicken von nativem Fn auf aminoaktiviertem TiO_x , nativem Fn auf dem Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x und bFn auf dem Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x . Um die Adsorptionskinetik von bFn an Streptavidin besser erfassen zu können, wurde aus sieben einzelnen Adsorptionskinetiken eine gemittelte Kinetik der Adsorption über 200 Minuten erstellt (Abb. 6.5). Der Verlauf der gemittelten Kinetik ähnelt im Allgemeinen dem der Adsorptionskinetik von bFn an Streptavidin, welches über Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin an der Oberfläche gebunden ist. Es kam zu keinem Rückgang der bFn-Schichtdicke nach dem Spülen. Das bedeutet, dass es nahezu keine Physisorption von bFn gab. Des Weiteren zeigt sich auch hier die schnelle Ausbildung eines Plateaus. Dieses ist bereits nach 70 Minuten erreicht. Aus diesem Grunde konnte die Inkubationszeit für die bFn-Adsorption auf 100 Minuten gesenkt werden.

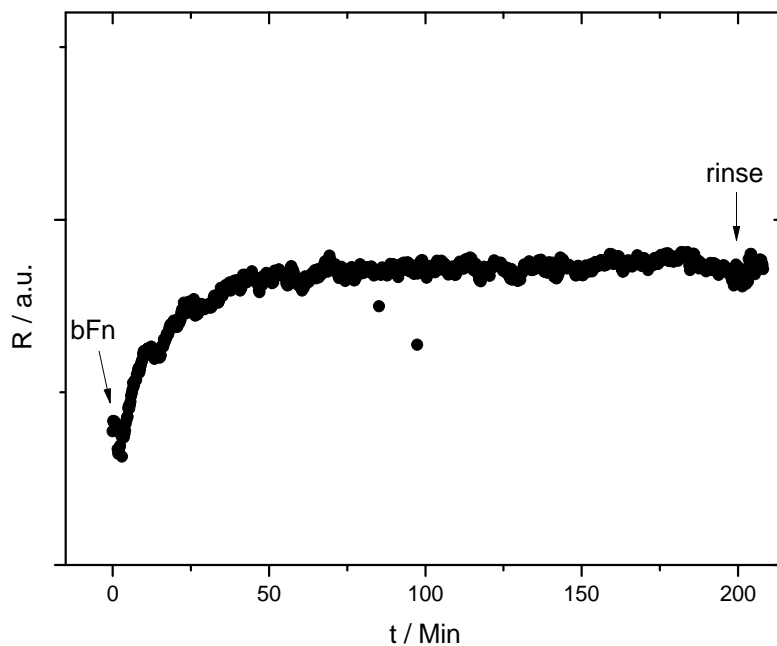


Abb. 6.5: Aus sieben Einzelmessungen gemittelte Adsorptionskinetik von bFn auf einer Streptavidin-Monolage. Wie sich zeigt, ist die Bildung einer Monolage bereits nach ca. 100 Minuten abgeschlossen.

Insgesamt wurden sieben Messungen der spezifischen Adsorptionen von bFn an Streptavidin über 200 Minuten und zwei über 100 Minuten durchgeführt. Wie zu erwarten war, konnte kein systematisches Abweichen aufgrund der verringerten Inkubationszeit festgestellt werden. Die Ergebnisse für die bFn-Schichtdicken sind als Boxplot ebenfalls in Abbildung 6.3 dargestellt. Die mittlere Schichtdicke der bFn-Schicht beträgt hier 1.7 nm mit einer Standardabweichung von 0.3 nm, die erneut nahe der Auflösung des SPRs ist. Insgesamt ist die Gesamtschichtdicke von bFn mit gemittelt 1.7 nm etwas niedriger als an der über Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin erzeugten Streptavidin-Monolage. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Streptavidin-Schichten erzeugt über Sulfo-NHS-LC-Biotin, von denen, die über Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin erzeugt wurden, in ihren Dicken unterscheiden. Um den Zusammenhang zwischen bFn- und Streptavidin-Schichtdicke zu verdeutlichen, wurden die bFn-Schichtdicken gegen den Bedeckungsgrad an Streptavidin aufgetragen, wobei eine Streptavidin-Schichtdicke von 4.8 nm als geschlossene Monolage betrachtet wurde (siehe Kapitel 5.3). Die resultierenden bFn-Schichtdicken sind zusammen mit denen des unbiotinylierten Fn in Abbildung 6.6 dargestellt. Zusätzlich

werden in diesem Diagramm die nativen Fn- und bFn-Schichtdicken an Streptavidin-Monolagen, aufgebaut über Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, aufgeführt.

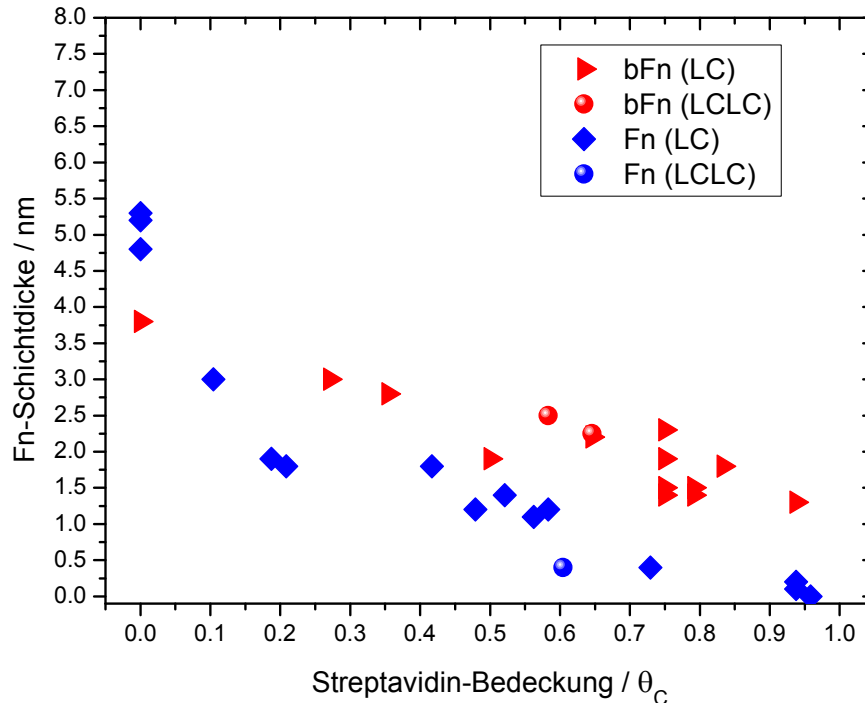


Abb. 6.6: Schichtdicken von Fn (blau) und bFn (rot) nach Adsorption auf TiO_x -Oberflächen, die mit dem Streptavidin-Schichtsystem modifiziert wurden. Aufgetragen sind die Fn-Schichtdicken gegen die jeweiligen Streptavidin-Bedeckungsgrade (θ_c) der Oberfläche. Die Kürzel LC und LCLC geben die Kettenlänge des Biotinderivates an, über welches die Streptavidinschicht aufgebaut wurde. Wie sich zeigt, nimmt die Dicke der nativen Fn-Schicht kontinuierlich ab, bis bei einem $\theta \approx 1$ keine Fn-Adsorption mehr nachweisbar ist. bFn adsorbiert erwartungsgemäß auch bei $\theta \approx 1$ an der Streptavidin-Oberfläche.

Wie sich zeigt, nimmt die Fn-Bedeckung scheinbar exponentiell zur Streptavidin-Bedeckung ab, bis bei einer Streptavidin-Schichtdicke von 4.6 nm bzw. ca. 96 % Streptavidin-Bedeckung keine Fn-Adsorption mehr messbar ist. Es wird deutlich, dass Streptavidin die Fn-Adsorption an der Oberfläche unterdrückt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit denen, die für antiadhäsive Oberflächenbeschichtungen wie PEG oder pPEGMA bekannt sind [Dal05, Kan09, Gna07, Eng05]. *Huang et al.* zeigten beispielsweise, dass PLL-g-PEG-beschichtete TiO_2 -Oberflächen die Fibrinogenadsorption um 96 bis 98 % vermindern [Hua01]. Dies verdeutlicht, dass es nicht notwendig ist, bei einer TiO_x -Aktivierung über das Streptavidin-Schichtsystem eine antiadhäsive Basisbe-

schichtung aufzubringen, wie bei anderen Arbeiten zumeist geschehen, da Streptavidin selbst bereits antiadhäsiv wirkt [Kan09, Hua02]. Fn ist ein glykosyliertes Protein und besitzt einen isoelektrischen Punkt (pI) im leicht sauren Bereich, wodurch es bei einem physiologischen pH von 7.3 negativ geladen ist [Bou84, Zho86, Bou07]. Im Gegensatz zu Fn und seinem Analogon Avidin besitzt Streptavidin keine Glykosylierung und hat einen pI-Wert um pH 7, wodurch es bei physiologischem pH neutral geladen ist [Mor04, Git88, Ska04, Muz91, Dit89]. Aus diesem Grund können beide Proteine nur schwer in Wechselwirkung treten, wodurch sich der antiadhäsive Effekt von Streptavidin auf Fn erklärt. Um diese These zu untermauern, wurde ebenfalls die Adsorption von Lysozym auf unmodifizierten und Streptavidin-beschichteten Oberflächen mittels SPR-Spektroskopie analysiert. In Gegensatz zu Fn hat Lysozym keine Funktion in der Zelladhäsion. Es wurde ausgewählt, da sein pI im basischen Bereich liegt, wohingegen sich der von Fn im sauren Bereich befindet [Bou84, Zho86, Bou07, Dev04]. Aus diesem Grund ist Lysozym in physiologischer PBS-Pufferlösung positiv geladen. Die Lysozymkonzentration betrug hier 500 nM. Auf unmodifizierten TiO_x-Oberflächen konnte unmittelbar nach Injektion in die SPR-Messzelle ein schneller Anstieg der Lysozym-Schichtdicke gemessen werden (siehe Abb. 6.7). Dieser Anstieg ging nach ca. 25 Min. in ein Plateau über. Nach dem Spülvorgang blieb die gemessene Schichtdicke stabil bei 1.5 nm ($n_{\text{Lysozym}} = 1.4$). Im nächsten Schritt wurde eine Streptavidin-Monolage auf der TiO_x-Oberfläche aufgebaut. Wie zu erwarten war, zeigt sich in Abbildung 6.7, dass diese Beschichtung ebenfalls die Adsorption von Lysozym auf der TiO_x-Oberfläche unterbindet, sodass keine Schichtdickenzunahme nach 200 Min. Inkubation nachgewiesen werden konnte.

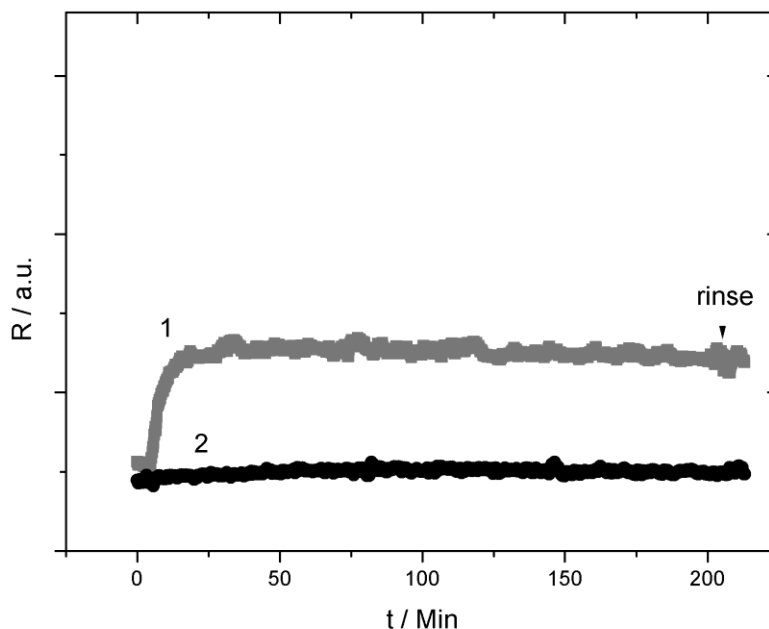


Abb. 6.7: Adsorption von Lysozym auf unterschiedlichen Oberflächen. 1: Adsorption von Lysozym auf unmodifizierten TiO_x -Oberflächen. 2: Adsorption von Lysozym auf Streptavidin-beschichteten TiO_x -Oberflächen.

Darüber hinaus bestätigt sich in Abbildung 6.6 erneut der gewählte Wert von $n_{\text{Streptavidin}} = 1.5$ für eine Streptavidin-Monolage auf TiO_x -Schichten, gegenüber einem Wert von $n_{\text{Streptavidin}} = 1.45$, wie er für die Analyse der Streptavidin-Adsorption auf Goldschichten genutzt wird (siehe Kapitel 4).

Wie zu erwarten war, unterscheiden sich die Schichtdickenverläufe von nativem Fn und bFn bei zunehmender Streptavidin-Bedeckung. Bei beiden Kurven lässt sich eine Abnahme der Fn-Schichtdicke mit zunehmender Streptavidin-Schichtdicke erkennen. Im Gegensatz zu nativem Fn stoppt bei bFn die Abnahme bei einer Streptavidin-Bedeckung von ca. 74 % und liegt im Mittel bei 1.4 bis 1.6 nm. Es scheinen sich keine bFn-Multilagen bzw. -Agglomerate auf dem Streptavidin-Schichtsystem auszubilden. Hierdurch wird in erster Linie eine zelluläre Adhäsion gefördert bzw. beschleunigt. Durch die schnelle Bedeckung der Oberfläche mit körpereigenen Zellen würde einer bakteriellen Besiedelung entgegengewirkt werden [Gri88]. Zusätzlich liegt die bFn-Schichtdicke stets über der von unbiotinyliertem Fn. Dies erklärt zugleich die etwas höheren Schichtdicken bei der Adsorption an Streptavidin-Monolagen, die über Sulfo-

NHS-LC-LC-Biotin aufgebaut wurden. Die hier erzeugten Streptavidin-Schichten zur Adsorption von bFn waren insgesamt etwas dünner, sodass die unspezifische Adsorption von bFn an der silanisierten Oberfläche nicht komplett unterbunden wurde. Im Gegensatz zu unbiotinyliertem Fn ist bFn aufgrund der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung nun zusätzlich in der Lage, spezifisch auf der Streptavidin-Monolage zu adsorbieren. Einzig bei einem Streptavidin-Bedeckungsgrad von null lag die bFn-Schichtdicke unter der von nativem Fn. Im Gegensatz zu unbiotinyliertem Fn nahm die Bedeckung von bFn nicht exponentiell, sondern eher linear ab. Darüber hinaus zeigen sich weitere Indizien, die für eine Adsorption von bFn in entfalteter Konformation sprechen. Die spezifisch adsorbierte bFn-Schicht auf einer geschlossenen Streptavidin-Monolage besaß eine Dicke von ca. 1.6 nm. Diese liegt nahe dem Durchmesser eines entfalteten Fn-Stranges, der, je nach Messmethode, mit 1 bis 3 nm angegeben wird [Eng81, Eri81, Zen93, Lin00]. Zusätzlich zeigte bFn ein Adsorptionsverhalten, das sich stark von dem von unbiotinyliertem Fn unterscheidet. Diese These wird weiterhin dadurch unterstützt, dass bereits bei 0 nm Streptavidin die bFn-Schicht ca. 1 nm dünner ist als die von Fn. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Konformation von nativem Fn und bFn auf den unterschiedlichen Oberflächen eingehend mittels AMF analysiert.

6.3.2 AFM-Untersuchungen der Konformation von nativem Fibronektin auf Titanoberflächen

Als Erstes wurde die Adsorption von Fn auf TiO_x untersucht. Hierzu wurden die Abmessungen und die Oberflächenstruktur von Fn bestimmt, um später mit den Dimensionen von bFn auf Streptavidin verglichen werden zu können. Zunächst wurde die blanke TiO_x -Oberfläche als Negativ vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.8 dargestellt. Das Höhenbild der TiO_x -Oberfläche zeigt aus kleineren Partikeln aufgebaute, raue und unebene Oberflächenstrukturen. Das Höhendelta betrug bei dieser Messung ca. 1.5 nm. Allerdings zeigt das Phasenbild, dass kein Zusammenhang zwischen dieser Topografie und der Materialeigenschaft der Oberfläche besteht, sodass eine geschlossene TiO_x -Schicht angenommen werden kann. Weiterhin betrug die Phasenverschiebung eines einzelnen Partikels gerade einmal 16 mV. Nachdem die blanke TiO_x -Oberfläche

charakterisiert wurde, wurde nun die Struktur von adsorbiertem Fn auf diesen Oberflächen betrachtet. Da sich in der SPR-Messung nach 90 Minuten bereits ein Plateau zeigte, wurde diese Zeitspanne zusätzlich bei der Fn-Inkubation eingesetzt. Die Ergebnisse für die Fn-Adsorption über 90 und 200 Minuten sind in den Abbildungen 6.9 bis 6.13 und in Tabelle 6.4 dargestellt.

Tabelle 6.4: Maße der markierten bFn-Strukturen auf Abbildung 6.9

Fn	Durchmesser (nm)	Höhe (nm)
1	26	0.7
2	28	0.435
3	32	0.81
4	28	0.87
5	34	0.995
6	28	0.505
Mittelwert	29.33	0.72
STD	3.01	0.22

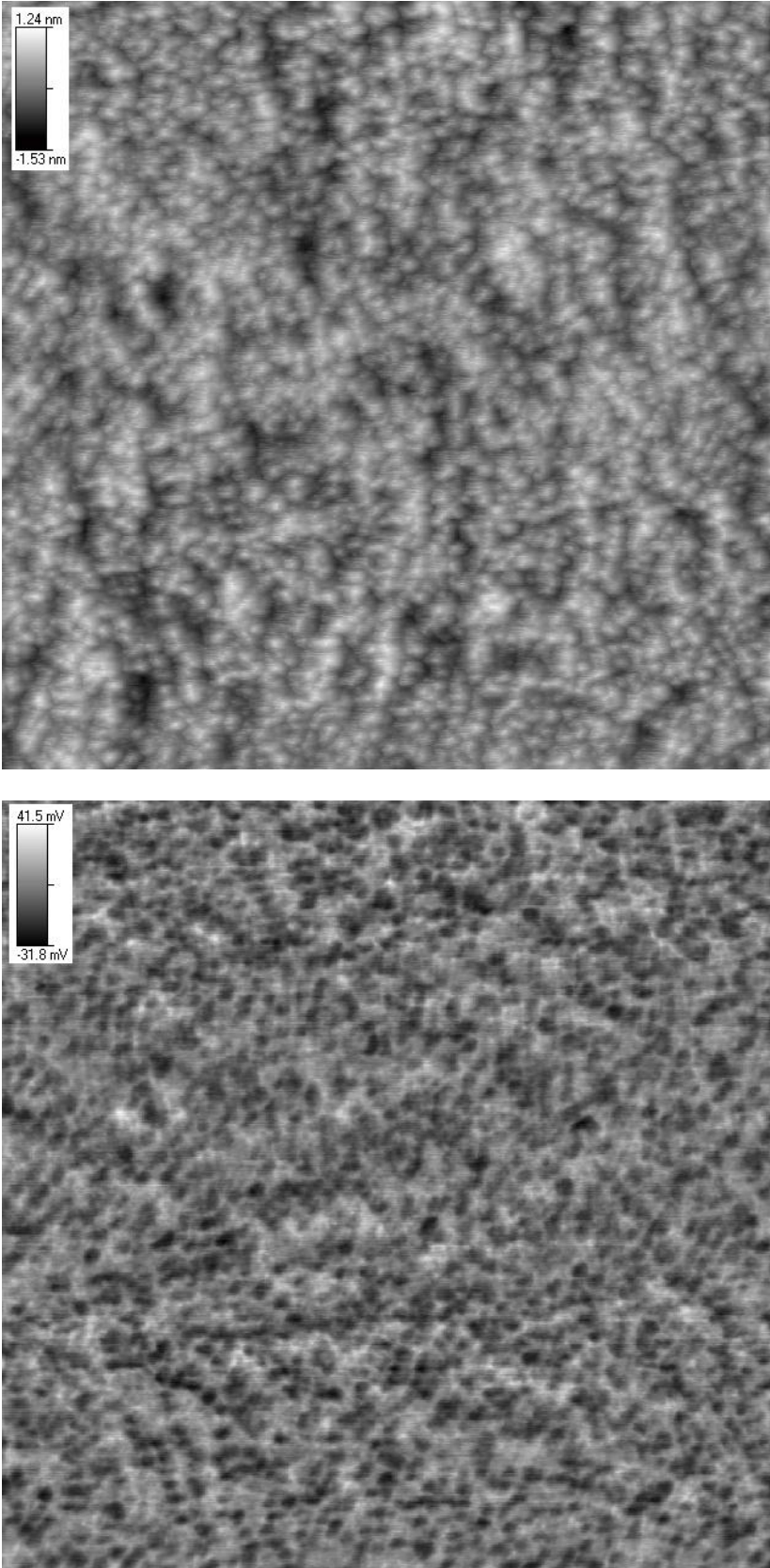


Abb. 6.8: Höhenbild (oben) und Phasenbild (unten) der aufgesputterten TiO_x-Schicht auf der Si-Wafer-Oberfläche (TiO_x-Oberfläche). Abmessung 1 μm × 1 μm.

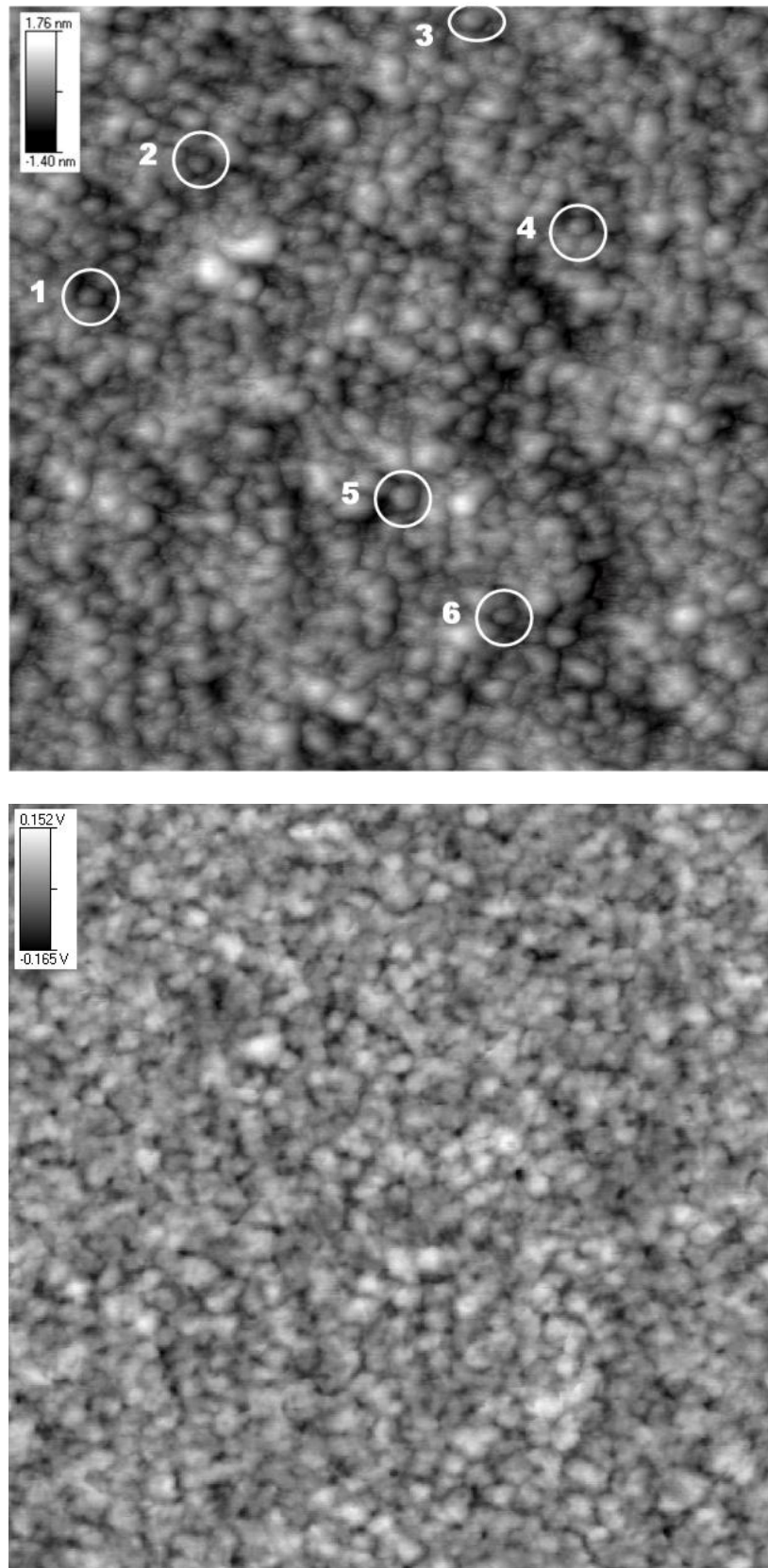


Abb. 6.9. Höhenbild (oben) und Phasenbild (unten) einer TiO_x -Oberfläche, die 90 Minuten mit nativem Fn inkubiert wurde. Deutlich zu erkennen ist die globuläre Fn-Struktur. Abmessungen: $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. Eingezeichnet sind Partikel, die zur Größenbestimmung genutzt wurden.

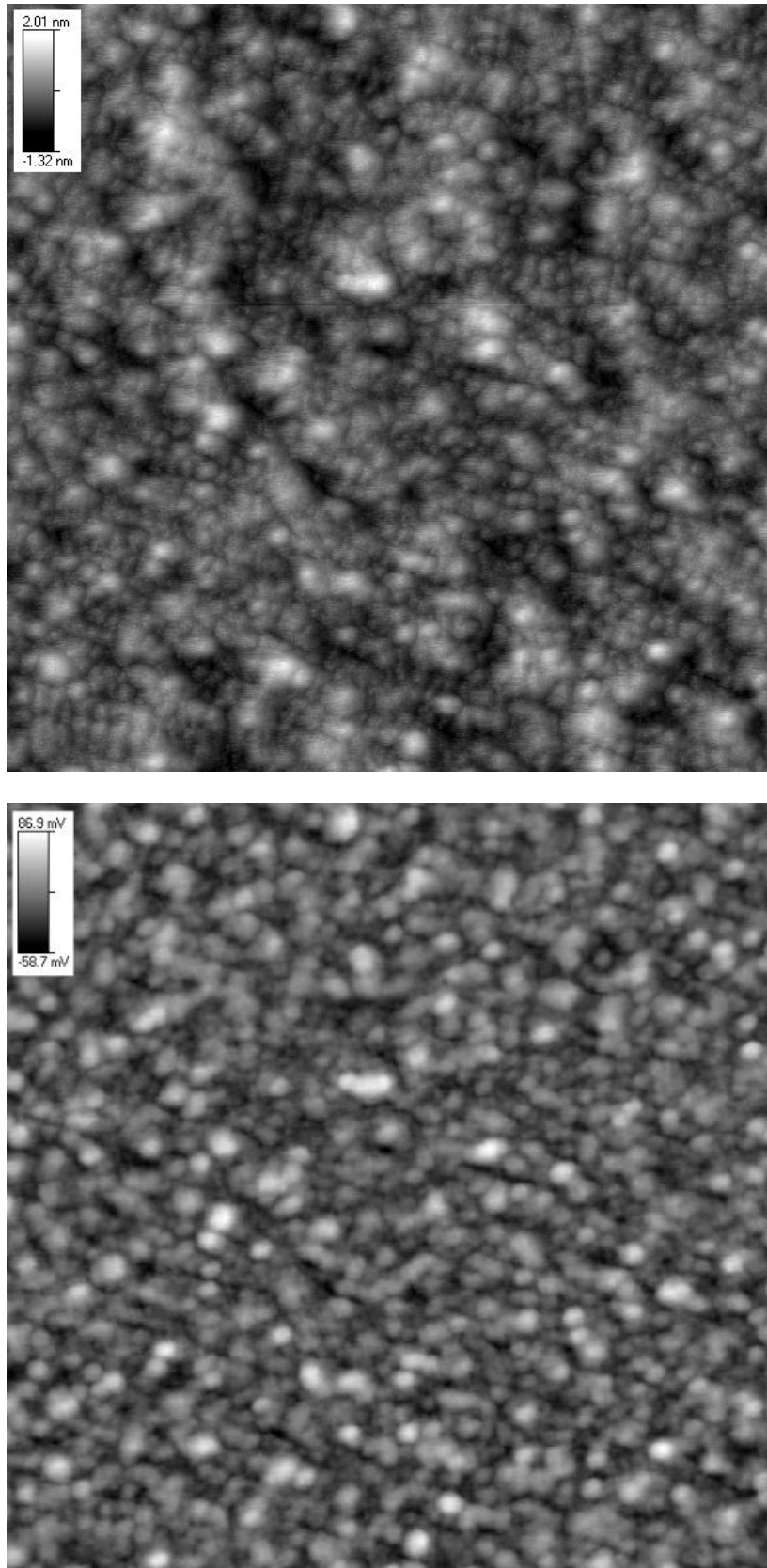


Abb. 6.10: Höhenbild (oben) und Phasenbild (unten) einer TiO_x -Oberfläche, die 200 Minuten mit nativem Fn inkubiert wurde. Deutlich zu erkennen ist die globuläre Fn-Struktur. Abmessungen: $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$.

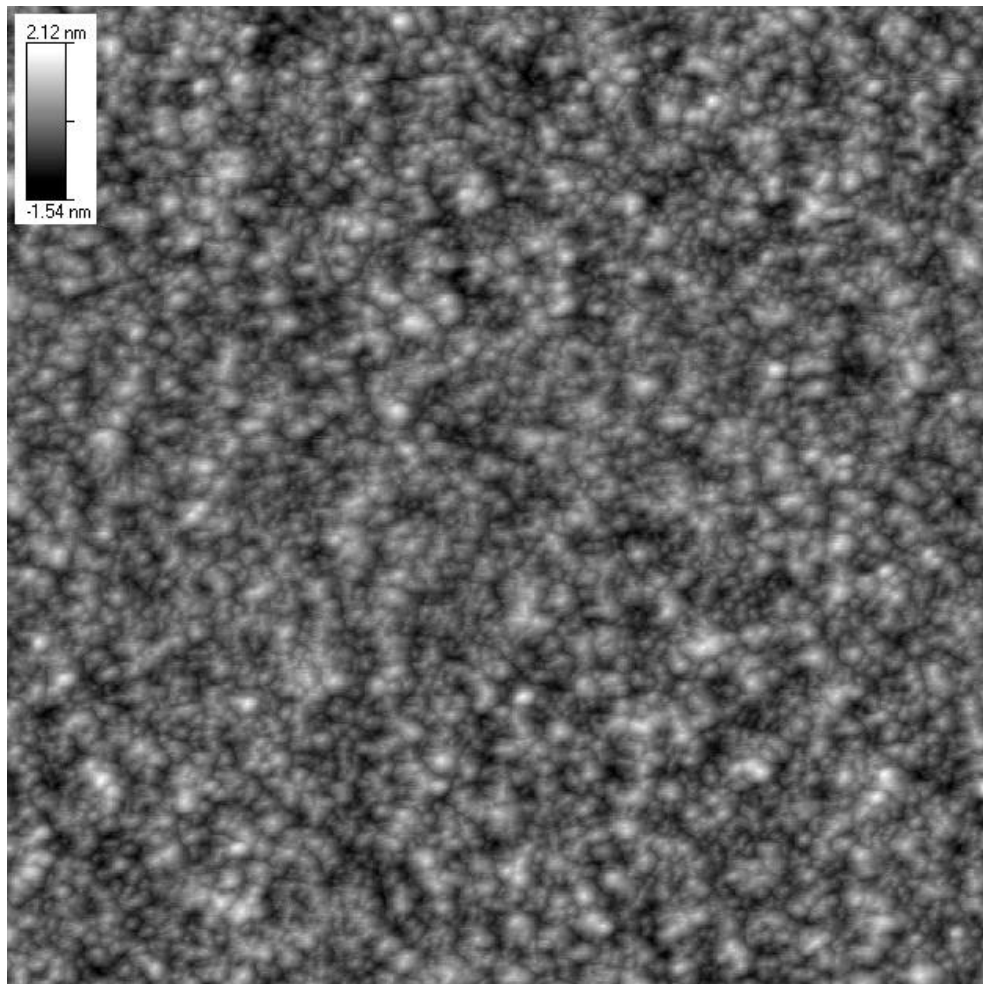


Abb. 6.11: Höhenbild einer TiO_x -Oberfläche, die 200 Minuten mit nativem Fn inkubiert wurde. Abmessung $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$.

Wie sich zeigt, war die Oberfläche bereits nach 90 Minuten mit einer geschlossenen Fn-Schicht bedeckt. Die Zusammensetzung dieser Schicht war sehr homogen und zeigte auch bei größeren Scanbereichen dasselbe Verteilungsmuster von Fn-Molekülen an der Oberfläche (siehe Anhang). Einzelne Moleküle besaßen einen Durchmesser von $29\ \text{nm} \pm 3\ \text{nm}$ und eine Höhe von $0.7\ \text{nm} \pm 0.2\ \text{nm}$. Diese Maße stimmen unter Berücksichtigung des bei der Messung aufgetretenen Fehlers mit den bisher bekannten Ergebnissen teilweise unterschiedlicher Analysemethoden überein [Eri83, Roc87, Pri82, Too83, Sou07, Che08]. Neben diesen einzelnen Strukturen verschmolzen Fn-Partikel zu größeren Agglomeraten von ca. $60\ \text{nm}$ Durchmesser. Dieses Verhalten von Fn auf TiO_2 -Oberflächen ist bereits aus der Literatur bekannt [Sou07, Gri88]. Aufgrund dieser Agglomeration war es schwierig, isolierte Fn-Partikel für eine optimale Abmessung einzelner Partikel zu finden. Weiterhin ist es möglich, dass es zum

Zusammenfallen der globulären Fn-Strukturen bei der Vakuumtrocknung kam. Im Phasenbild ist eine starke Verschiebung der Fn-Moleküle zur TiO_x -Oberfläche von ca. 114 ± 35 mV zu erkennen. Da die Oberfläche dicht mit Fn-Molekülen bedeckt war, war diese Verschiebung wahrscheinlich nicht maximal, da hierfür eine teilweise bedeckte Oberfläche besser geeignet gewesen wäre. Die Fn-Verteilung auf der Oberfläche zeigte sich darüber hinaus sehr homogen und gleichmäßig. Auch nach einer 200-minütigen Inkubation mit Fn zeigten sich vergleichbare Strukturen auf der Oberfläche, allerdings kam es zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl an Fn-Agglomeraten. In Abbildung 6.10 lassen sich darüber hinaus einzelne Fn-Partikel erkennen, die direkt oberhalb der ersten Fn-Schicht adsorbierten. Insgesamt spiegeln diese Ergebnisse sehr gut die erwarteten Ergebnisse zur Adsorption von nativem Fn auf TiO_x in physiologischer Lösung bzw. destilliertem H_2O wider. Wie sich hier zeigte, adsorbiert das Protein in einer globulären Konformation. So wird es ihm ermöglicht, Multilagenn und Agglomerate auszubilden. Da diese Agglomerate zu unspezifischen Zellreaktionen führen, die die Ansiedlung von Bakterien fördern und unerwünschte Immunantworten hervorrufen können, sind sie als Implantatbeschichtung ungeeignet (siehe Kapitel 1.2.1).

6.3.3 AFM-Untersuchungen der Konformation von bFn, angebunden an das Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x -Oberflächen

Um die bFn-Struktur auf Streptavidin zu analysieren, wurde nach und nach das gesamte Schichtsystem visualisiert. Zunächst wurde auch hier mit dem TiO_x -Substrat begonnen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.12 (links) dargestellt. Bei der visualisierten TiO_x -Oberfläche zeigte sich erneut eine raue Topografie mit regelmäßigen Erhebungen, die eine leicht erhöhte Höhenamplitude gegenüber der vorherigen Messung besaßen. Nach der Silanisierung änderte sich die Oberflächenstruktur deutlich (Abb. 6.12 [rechts]), die nun aus gleichmäßig verteilten Silan-Agglomeraten bestand. Einzelne Agglomerate besaßen einen Durchmesser von ca. 100 nm und eine Höhe von ca. 2 nm. Die Entstehung solcher Strukturen durch Inselwachstum wurde bereits von *Hemly und Fadeev* beschrieben [Hem02]. Ähnliche Agglomerationen wurden darüber hinaus durch Trichlorosilan auf SiO_2 -Oberflächen beobachtet [Hua97]. Die Struktur der

Streptavidin-Schicht wurde bereits in Kapitel 5.4 detailliert beschrieben. Da die Messungen in diesem Kapitel allerdings mittels Large-Area-Scanner durchgeführt wurden, wurde auch diese Struktur erneut visualisiert (Abb. 6.13). Im Vergleich zu den Ergebnissen des Small-Area-Scanners zeigt sich in Abbildung 6.13 deutlich die geringere Auflösung des Large-Area-Scanners. Hierdurch war es diesmal nicht möglich, einzelne Proteine zu visualisieren. Insgesamt zeigte sich eine homogene Struktur, welche die Analyse der Adsorption von bFn ermöglichte.

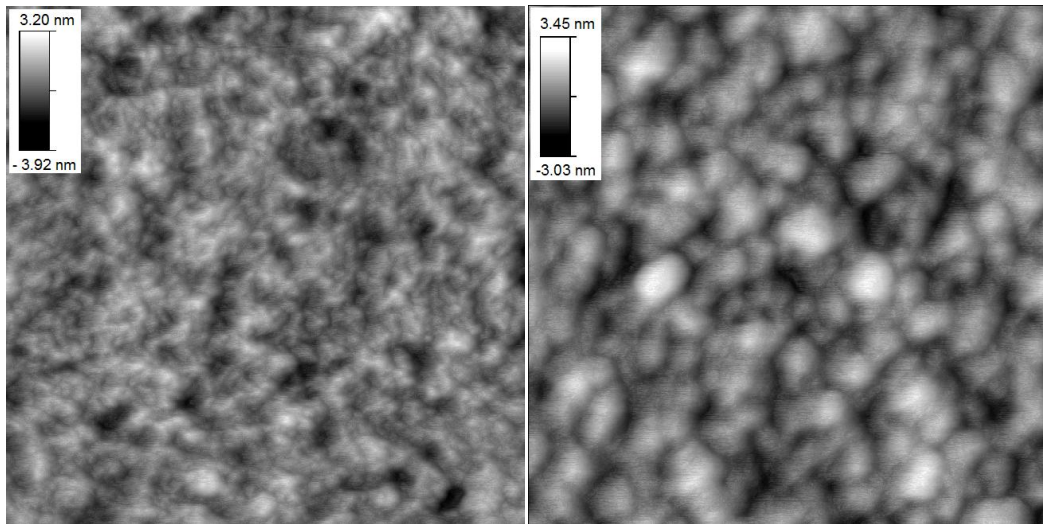


Abb. 6.12. Links: Höhenbild einer TiO_x -Oberfläche. Rechts: Höhenbild einer silanisierten TiO_x -Oberfläche. Abmessung der Abbildungen: $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$.

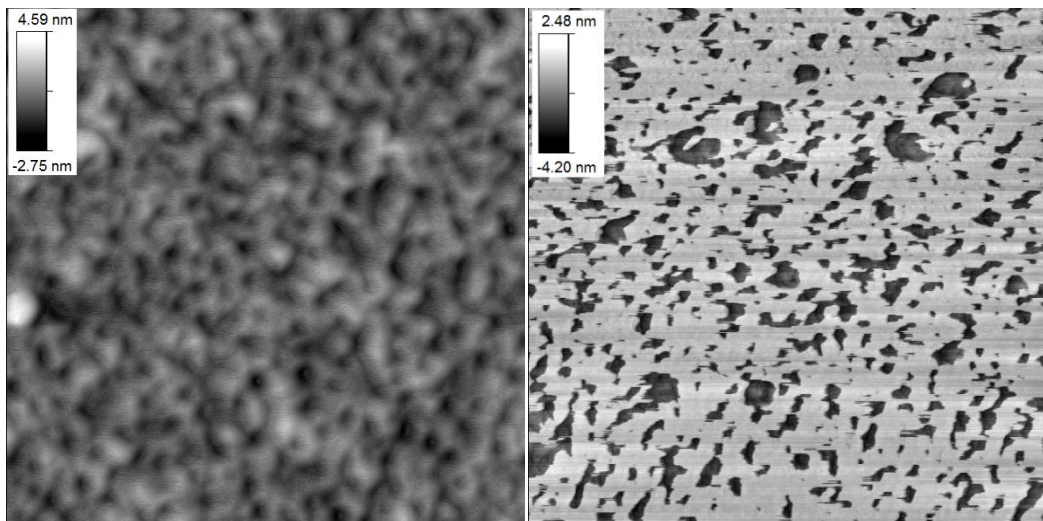


Abb. 6.13. Höhenbild einer Streptavidin-Monolage, aufgebaut auf einer Biotin-aktivierten und silanisierten TiO_x -Oberfläche. Links wurde die Oberfläche mittels Large-Area-Scanner, rechts mittels Small-Area-Scanner visualisiert. Abmessung der Abbildungen: $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$.

Nachdem das Schichtsystem bis zur Streptavidin-Monolage charakterisiert wurde, wurde nun das komplette bFn-Streptavidin-Schichtsystem aufgebaut, um die Struktur von bFn auf der Streptavidin-Monolage zu analysieren. Die Visualisierung des bFn-Streptavidin-Schichtsystems auf der TiO_x -Oberfläche ist in Abbildung 6.14 und 6.15 dargestellt. Hier zeigte sich eine ähnliche Grundstruktur wie bei der zuvor visualisierten Streptavidin-Oberfläche. Dies war auch zu erwarten, da die Streptavidin-Schicht ebenso die Grundstruktur der bFn-Schicht darstellt. In den Oberflächenbildern ließen sich keine globuläre Fn-Strukturen erkennen. Stattdessen zeigte sich ein filigranes Netzwerk aus linearen Fn-Strukturen, wodurch die Oberfläche deutlich ungleichmäßiger und unstrukturierter wirkte als das unmodifizierte Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x -Oberflächen (Abb. 6.14). Diese filigranen Netzwerkstrukturen ähneln den Oberflächenstrukturen von linearem Fn, die von *Toony et al.* und *Zenhäuser et al.* unabhängig voneinander visualisiert wurden [Too83, Zen93]. Vor allem die Arbeit von *Toony et al.* ist aufschlussreich. Die Entfaltung von Fn wurde hier durch eine Succinylierung des Proteins erreicht, welche dem hier eingesetzten Biotinylierungsprozess ähnelt. Da sich keine Unterschiede in den Schichtdicken von bFn bei unterschiedlichen DOLs zeigten (Tabelle 6.3) ist anzunehmen, dass der Biotinylierungsprozess allein wahrscheinlich die Entfaltung von bFn bewirkt.

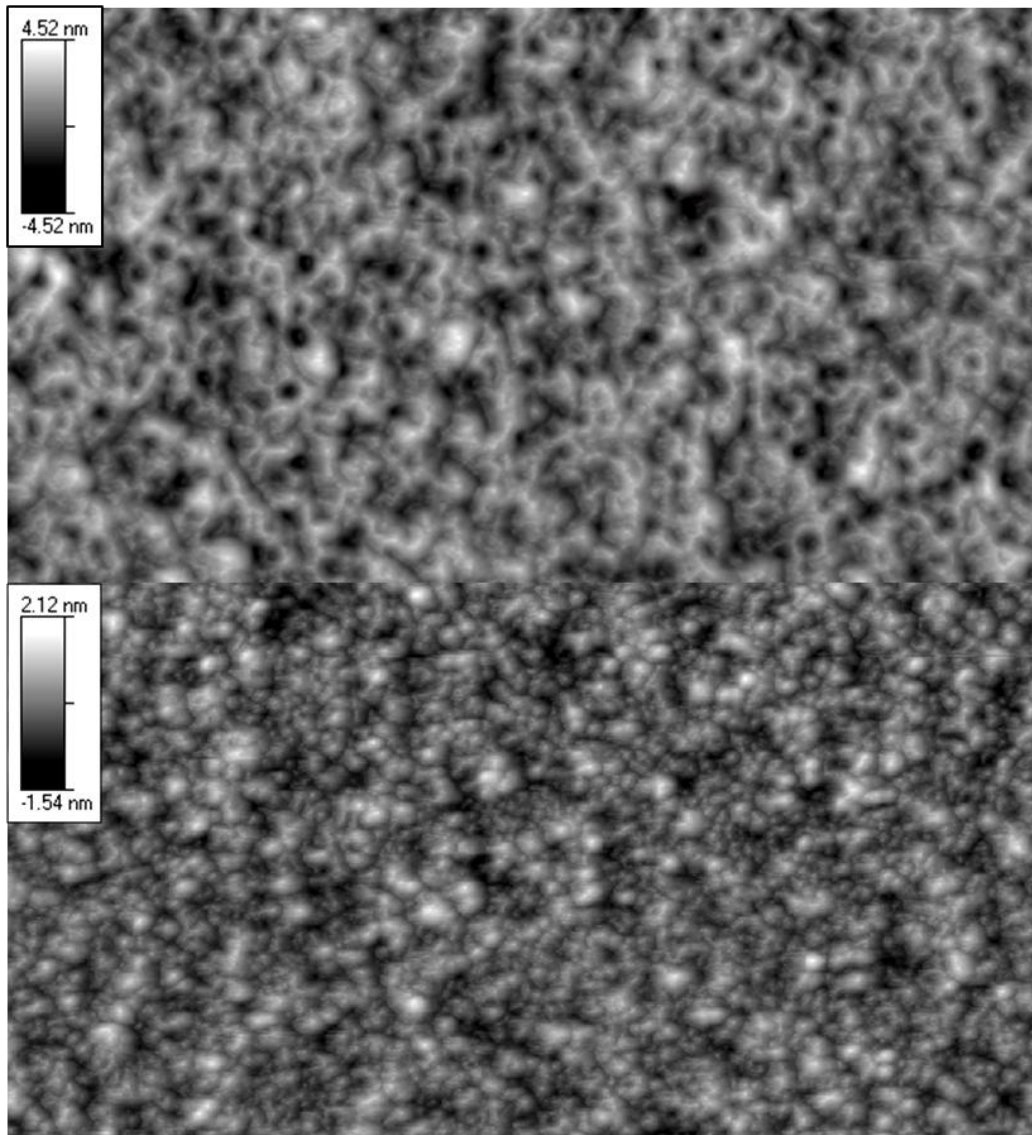


Abb. 6.14: Direkter Vergleich des Höhenbilds von bFn, adsorbiert über eine Streptavidin-Monolage auf einer TiO_x -Oberfläche (oben) und von nativem Fn, das direkt auf der TiO_x -Oberfläche adsorbiert wurde. Deutlich zu erkennen ist eine unterschiedliche Konformation von Fn in beiden Abbildungen. Oben besitzt Fn eine entfaltete, lineare Konformation, unten eine kompakte, globuläre Konformation. Abmessung der Abbildung: Je $2 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$.

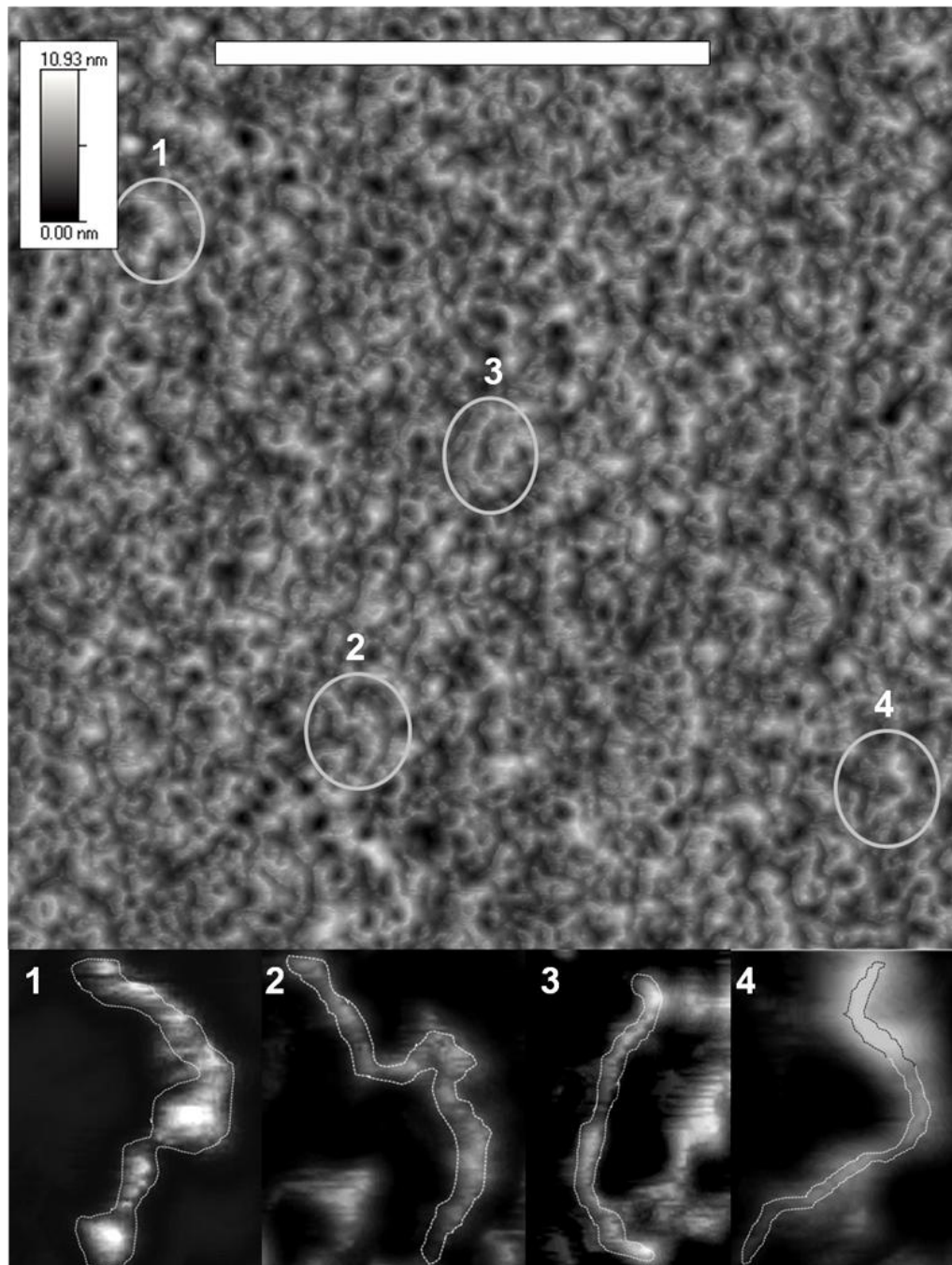


Abb. 6.15: Höhenbild des bFn-Streptavidin-Schichtsystems auf einer TiO_x -Oberfläche. Deutlich erkennbar besitzt bFn eine lineare Konformation. Zusätzlich lassen sich einzelne, lineare Fn-Moleküle erkennen (1 - 4). Skalierungsbalken: 1 μm .

Darüber hinaus ließen sich auch einzelne bFn-Moleküle innerhalb dieses Netzwerkes erkennen (Abb. 6.15). Diese Moleküle zeigten deutlich die für entfaltetes Fn typische lineare, leicht V-förmige Konformation, die unter anderen Bedingungen bereits häufig in der Literatur beschrieben wurde [Lin00, Eri81, Eri83, Eng81].

Die Visualisierung dieser bFn-Strukturen ermöglichte es darüber hinaus die Maße eines einzelnen bFn-Moleküls, adsorbiert auf einer Streptavidin-Monolage, im Detail zu bestimmen. Durchschnittlich ergab sich eine bFn-Länge von $189 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$. Die Standardabweichung repräsentiert hier die hohe Flexibilität der Fn-Stränge. Diese Daten decken sich erneut mit jenen, welche aus anderen Arbeiten bereits für entfaltetes Fn bekannt sind [Eng81, Eri81, Roc87, Zen93, Lin00, Che08]. Die mittlere Höhe eines bFn-Stranges, also dessen Durchmesser, wurde mit $1.8 \pm 0.5 \text{ nm}$ bestimmt. Auch dieses Ergebnis deckt sich zum einen erneut mit den aus der Literatur bekannten Werten von ca. 1 bis 3 nm Strangdurchmesser [Eng81, Eri81, Zen93, Lin00]. Zum anderen passt dieser Wert zum Ergebnis der SPR-Kontrollmessung der gemessenen bFn-Schichtdicke, die hier bei 1.9 nm lag (Abb. 6.16).

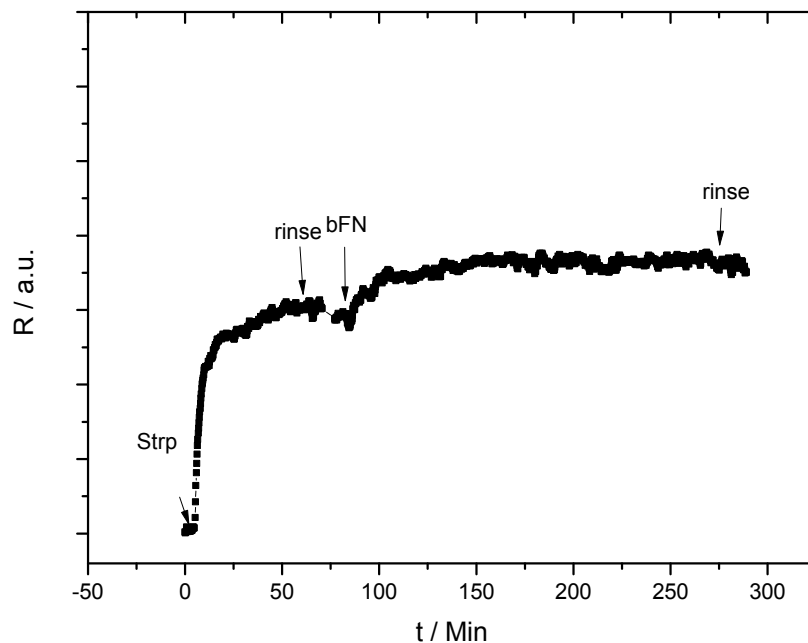


Abb. 6.16: SPR-Kontrollmessung: Sequenzielle Adsorption von Streptavidin (Strp) und bFn auf einer Biotin-modifizierten, silanisierten TiO_x -Oberfläche.

Die AFM-Messungen zeigten weiterhin, dass keine geschlossene bFn-Schicht ausgebildet wurde (Abb. 6.14 und 6.15). Bei einer angenommenen Schichtdicke von 2.5 nm als maximaler bFn-Bedeckungsgrad läge dieser mit 1.9 nm bei ca. 76 %. Bei Betrachtung der bFn-Oberflächenbedeckung in den Abbildungen 6.14

und 6.15 ist dieser Bedeckungsgrad durchaus realistisch. Der gewählte Brechungsindex von $n = 1.4$ ist daher repräsentativ, um die Adsorption von bFn an der Streptavidin-Schicht zu beschreiben. Es ist fraglich, ob eine höhere bFn-Konzentration zu einer höheren bFn-Schichtdicke führen würde. Bei einem Streptavidin-Bedeckungsgrad von $\Theta_c = 0$ lag die bFn-Schichtdicke bei 3.6 nm (Abb. 6.6). Dies zeigt, dass bei der gleichen Konzentration ebenfalls eine nahezu doppelt so dicke Schicht an bFn erzeugt werden kann. Tatsächlich stellte sich die Schichtdicke für spezifisch angebundenes bFn bei höheren Streptavidin-Bedeckungsgraden bei ca. 1.6 nm ein (Abb. 6.6).

Als Ergebnis zeigt sich, dass bFn auf der Streptavidin-Monolage tatsächlich in seiner entfalteten, linearen Konformation adsorbiert und nicht in seiner kompakten, globulären Konformation, wie es bei nativem Fn auf TiO_x -Oberflächen der Fall ist (Abb. 6.17). Entfaltetes Fn besitzt eine höhere Affinität zu Zellen und kommt u. a. auch daher in dieser Konformation in der ECM vor [Mao05, Smi07, Pan02, Pha03]. Diese Konformation unterscheidet sich funktionell dahingehend, dass alle Bindestellen entlang der Fn-Achse frei zugänglich sind und nicht, wie bei der kompakten Plasma-Konformation, kryptisch im Innern des Proteins liegen [Ber03, Joh99]. Durch die kompakte Konformation wird diese Affinität gezielt herabgesetzt, sodass es zu keinen unerwünschten Bindungen innerhalb des Plasmas, z. B. zwischen Blutzellen, kommen kann [Joh99]. Hierdurch erklärt sich letztendlich die verstärkte Zelladhäsion an TiO_x -Oberflächen, die mit dem bFn-Streptavidin-Schichtsystem modifiziert wurden, gegenüber TiO_x -Oberflächen, die mit nativem Fn modifiziert wurden (siehe Kapitel 4.3.3). Letztere besitzen zwar eine ca. dreimal höhere Gesamtschichtdicke an Fn, gleichzeitig nimmt das Protein hier allerdings seine kompakte Konformation mit geringerer Zellaffinität ein.

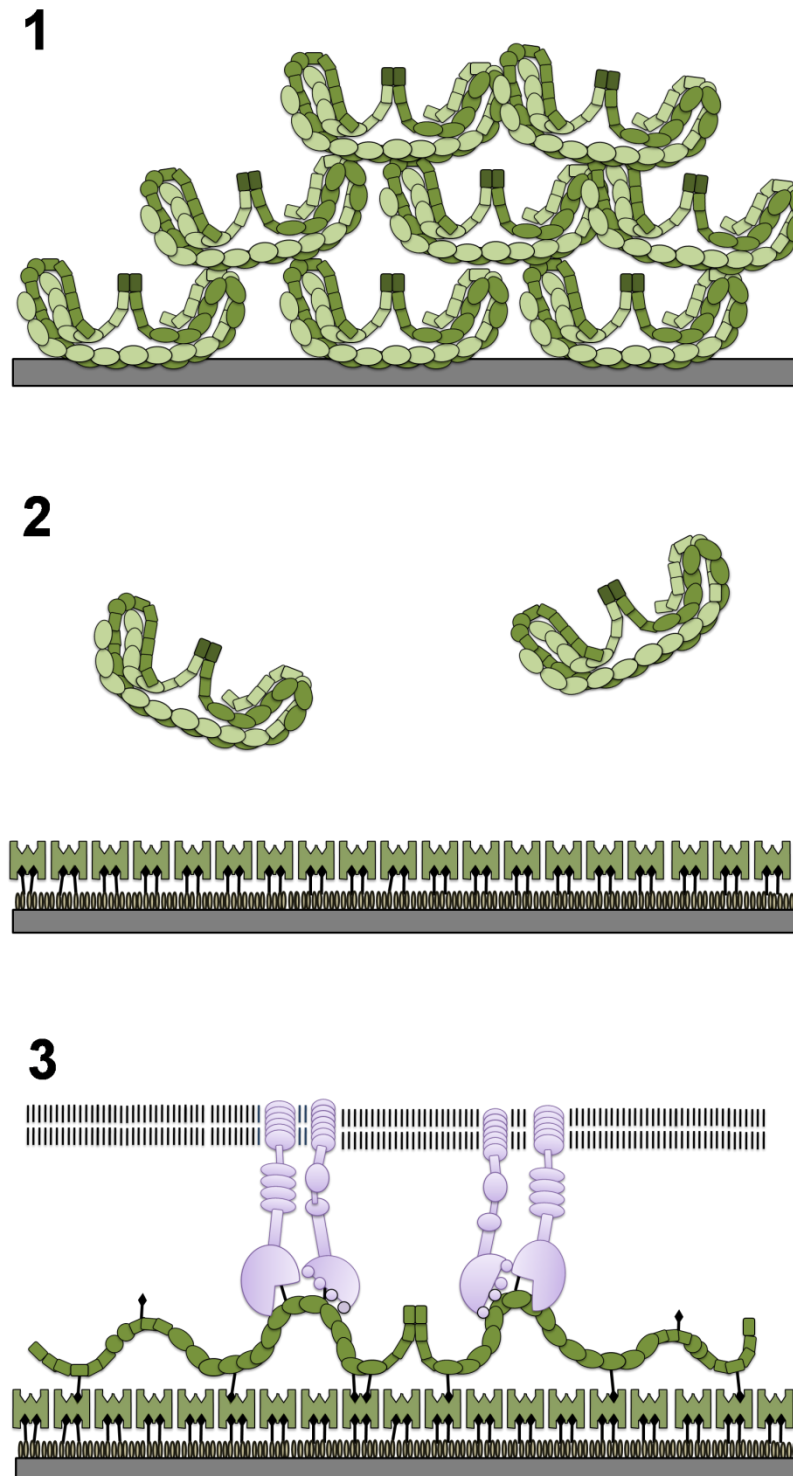


Abb. 6.17: Unterschiedliche Konformationen von nativem Fn und bFn, je nach Oberflächenmodifizierung. 1: Fn-Agglomerate auf TiO_x. 2: TiO_x-Oberfläche, die mit einer Streptavidin-Monolage modifiziert wurde. Es kommt zu keiner Adsorption von Fn auf dieser Oberfläche. 3: bFn, immobilisiert über eine Streptavidin-Koppelschicht, auf einer TiO_x-Oberfläche. Im Unterschied zur direkten Adsorption auf TiO_x-Oberflächen besitzt Fn hier eine lineare Konformation, die eine höhere Affinität zu Zellen besitzt und so die Adhäsion und Aktivität von Osteoblasten positiv beeinflusst.

6.4 Konklusion

In diesem Kapitel wurde die Adsorption von Fn an einer Streptavidin-Monolage analysiert. Es zeigten sich große Unterschiede, je nachdem, ob Fn zuvor biotinyliert wurde oder unbiotinyliert inkubiert wurde. Kommt es auf einer aminoaktivierten TiO_x -Oberfläche noch zu einer dicken Schicht an unspezifisch gebundenem, nativem Fn, so nimmt diese Schicht scheinbar exponentiell zur Streptavidin-Bedeckung ab, bis sie ab ca. 4.6 nm Streptavidin-Schichtdicke nicht mehr nachgewiesen werden kann. Erst durch die Biotinylierung wird eine hochspezifische Anbindung von Fn ermöglicht. Wie sich zeigte, hat der Biotinylierungsgrad keinen Einfluss auf die Schichtdicke und Konformation und es kommt zu keiner Ausbildung von bFn-Multilagern. Weiterhin ändert bFn an der Streptavidin-Schicht seine Konformation von kompakt-globulär zu entfaltet-linear. Diese Konformation weist im Gegensatz zu der kompakten Konformation, in der natives Fn auf TiO_x bindet, weitere Bindestellen entlang der Fn-Achse auf, was in einer erhöhten Zellaffinität resultiert. Dies erklärt die gesteigerte Adhäsion und Aktivität bei Osteoblasten auf diesen Oberflächen, die in Kapitel 4.7 beschrieben wurde. Das gesamte Schichtsystem weist eine hohe Reproduzierbarkeit auf und ist leicht über Self-Assembly zu applizieren. Es ist damit gut als Beschichtung für Implantate geeignet. Zur Beschichtung einer TiO_x -Oberfläche mit bFn über eine Streptavidin-Schicht sollten folgende Parameter eingesetzt werden:

Tabelle 6.5: Parameter für die Anbindung von bFn an eine Streptavidin-Monolage auf TiO_x

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Lösungsmittel
bFn	0.025 μM	100 Min.	PBS

Kapitel 7: Multilayersystem

7.1 Layer-By-Layer-Multilayersysteme

Die Tatsache, dass bFn linear an einem Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x adsorbiert, eröffnet nun weitere Möglichkeiten im Aufbau dieser molekularen Architektur. Wenn von einer gleichmäßigen Verteilung von angebondenen Biotinresten entlang des bFn-Stranges ausgegangen wird, dürfte maximal die Hälfte zur Anbindung an die Streptavidin-Oberfläche genutzt werden, sodass die übrigen freien Biotinköpfe zur Verfügung stünden, um eine zweite Streptavidin-Schicht aufzubauen. So könnten alternierende Schichten aus bFn und Streptavidin aufgebaut werden, analog zum „Layer-By-Layer“-Verfahren. Als „Layer-By-Layer“-Verfahren wird das schichtweise Aufbringen von molekularen Polyelektrolyt-Schichten via Self-Assembly bezeichnet. Diese Schichten bestehen aus abwechselnden kationischen und anionischen Polyelektrolyten, die über die starken Colomb-Wechselwirkungen zusammengehalten werden [Dec97]. Anstelle der Colomb-Wechselwirkungen werden hier die Schichten über die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung zusammengehalten. Solche Schichten könnten eine sehr praktische Anwendung haben. So könnte sich die Stabilität des Schichtsystems gegenüber nur einer Monolage deutlich erhöhen (Abb. 7.1). Die bisherige bFn-Schicht besitzt eine sehr geringe Stabilität, was eine Anwendung in der Praxis erschwert (Tabelle 7.1).

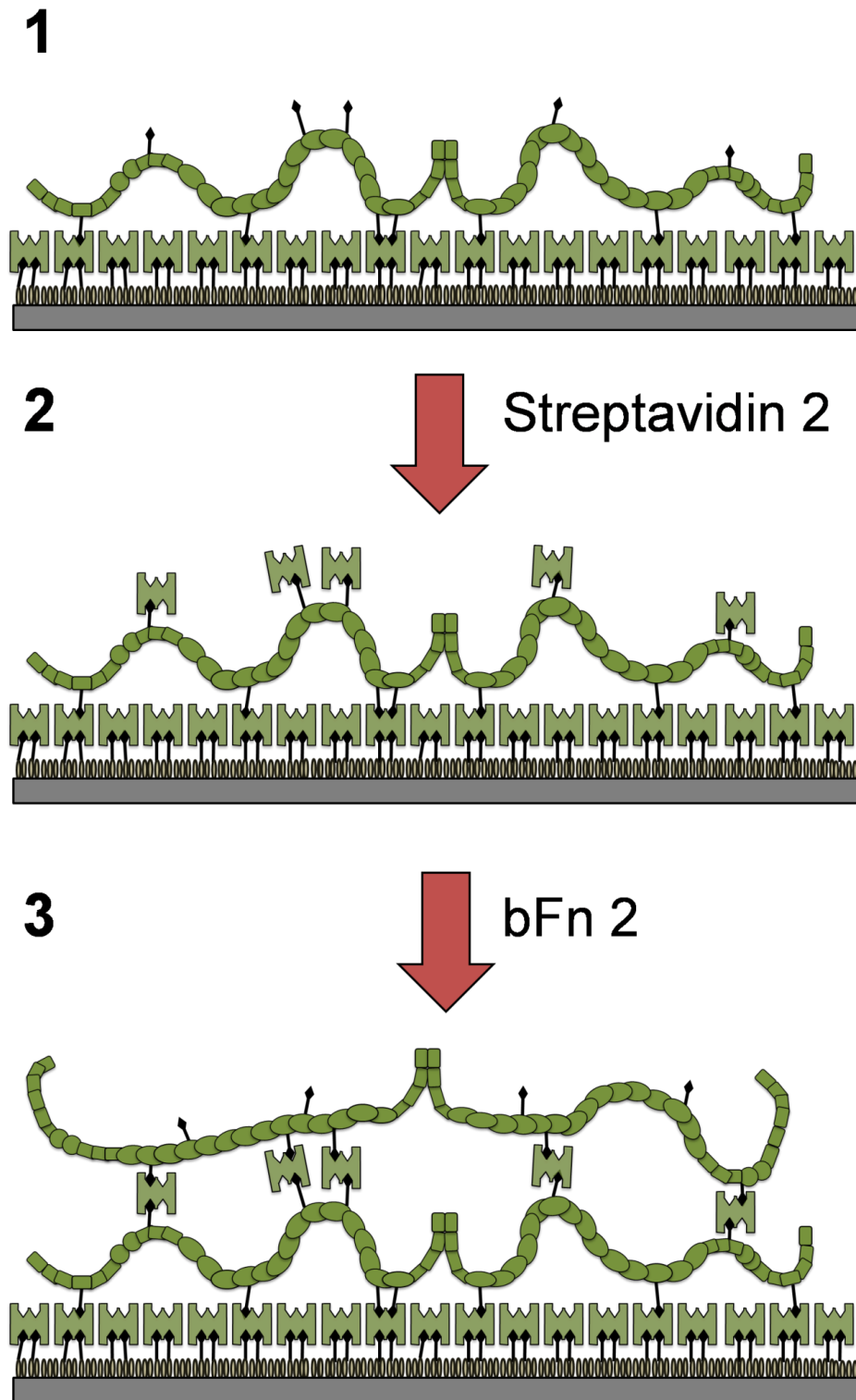


Abb. 7.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Streptavidin-bFn-Multilayersystems: Der Aufbau geschieht via Self-Assembly nach dem Layer-By-Layer-Prinzip. Zunächst wird das bFn-Streptavidin-Schichtsystem auf TiO_x -Oberflächen aufgebaut (1). Im nächsten Schritt bindet eine zweite Streptavidin-Schicht über freie Biotinreste an die erste bFn-Schicht an (2). Im dritten Schritt kann diese zweite Streptavidin-Schicht genutzt werden, um erneut eine bFn-Schicht anzubinden.

Tabelle 7.1: Stabilität von bFn-Schicht auf der Streptavidin-Monolage

Streptavidin (nm)	bFn (nm)	Streptavidin am nächsten Tag (nm)	bFn am nächsten Tag (nm)
3.6	1.9	3.5	0
3.8	1.3	3	0
4.5	1.3	4.5	0.3
3.6	1.5	3.5	0
4.3	0	4.3	0

Wie im letzten Kapitel beschrieben, hat der DOL keinen Einfluss auf die Schichtdicke von bFn, eventuell aber auf die Adsorption einer zweiten Streptavidin-Schicht. *Anamelechi et al.* adsorbierten bFn unspezifisch auf Substraten und analysierten die Anbindung u. a. über SPR durch die Zugabe von Streptavidin. Hier konnte allerdings kein Einfluss des DOLs auf die Anbindung der zweiten Streptavidin-Schicht nachgewiesen werden [Ana07].

7.2 Material und Methoden

Für den Aufbau des bFn-Streptavidin-Multilayersystems wurden die in Tabelle 7.2 und 7.3 aufgeführten Chemikalien und Proteine eingesetzt.

Tabelle 7.2: Chemikalien, die zum Aufbau des bFn-Streptavidin-Multilayersystems auf TiO_x eingesetzt wurden

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
PBS-Puffer	Sigma-Aldrich	P4417-50TAB
Methanol	Merck	1.06009.2511
Ethanol	Merck	8.18760.250
N-(6-Aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan	ABCR	AB110807
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce	21327
Biocitin	Sigma-Aldrich	B4261-25MG

Tabelle 7.3: Proteine, die zum Aufbau des bFn-Streptavidin-Multilayersystems auf TiO_x eingesetzt wurden

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Streptavidin-Dylight	Pierce	21832
Atto-633-Streptavidin	Atto-Tec	AD633-61
Fibronektin	Millipore	FC010

Alle Chemikalien und Proteine wurden, wie in Kapitel 6.2 beschrieben, eingesetzt und gelagert. Da bei dem Aufbau des Schichtsystems via SPR kein Einfluss des DOLs von bFn auf die Dicke der zweiten Streptavidin-Schicht nachgewiesen werden konnte, wurde bei diesem Versuch fluoreszenzmarkiertes Streptavidin eingesetzt [Ana07]. Neben der Analytik via SPR-Spektroskopie konnte so der Aufbau der zweiten Streptavidin-Schicht ergänzend über SPFS analysiert werden. Eingesetzt wurde Atto-633-Streptavidin, das ein Absorpti-

onsmaximum bei $\lambda = 629$ nm und ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 657$ nm besitzt. Da ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin mehrere Chromophore trägt, unterscheidet es sich in seiner optischen Schichtdicke von normalem Streptavidin. Weil in der Literatur keine Angaben dazu existieren, musste diese zunächst mittels SPR bestimmt werden. Hierfür wird eine geschlossene Atto-633-Streptavidin-Monolage erzeugt, deren Schichtdicke im Fresnel-Fit mit 4.8 nm festgelegt wurde. Um eine geschlossene Monolage zu erzeugen, wurde die Sulfo-LC-Biotin-modifizierte, silanierte TiO_x -Oberfläche mehrfach mit Atto-633-Streptavidin inkubiert, bis kein Schichtdickenzuwachs mehr in der Adsorptionskinetik verzeichnet werden konnte. Anschließend wurde die dielektrische Konstante von Atto-633-Streptavidin an eine Schichtdicke von 4.8 nm angepasst. Auf diese Weise bleiben die Ergebnisse für die Adsorption von bFn mit den Ergebnissen für die Adsorption an Streptavidin vergleichbar. Es sollte sich so ein Muster ergeben, das mit dem Muster in Abbildung 6.6 identisch ist. Um den Einfluss des DOLs auf die Adsorption der zweiten Streptavidin-Schicht zu analysieren, wurden zwei unterschiedliche DOLs erzeugt: DOL1 = 9.4 und DOL2 = 43.6. Die Biotinylierung und Bestimmung des DOLs erfolgte analog zum vorherigen Kapitel. Eingesetzt wurde ein Biotinüberschuss von 100:1 (DOL = 9.4) und 300:1 (DOL = 43.6). Der Aufbau einer Atto-633-Streptavidin-Schicht auf einer TiO_x -Oberfläche erfolgte analog zum Aufbau der Streptavidin-Schicht, wie in Kapitel 6.2 beschrieben. Die Adsorption von Atto-633-Streptavidin geschah innerhalb der Messzelle und wurde mittels SPFS, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, in Echtzeit überwacht. Anschließend wurde die Atto-633-Streptavidin-Monolage mit bFn in einer Konzentration von 25 nM inkubiert und nach 100 Minuten mit PBS-Puffer gespült. Daraufhin wurde die Oberfläche für 60 Minuten erneut mit einer 0.5 μM Atto-633-Streptavidin-Lösung inkubiert und anschließend intensiv mit Puffer gespült. Im letzten Schritt wurde die Oberfläche ein zweites Mal für 100 Minuten mit einer 25 nM bFn-Lösung mit identischem DOL inkubiert und abschließend noch einmal gründlich mit PBS gespült. Zur Normalisierung der Fluoreszenzzunahme wurde das Fluoreszenzsignal der zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht zu dem Signal der ersten Schicht ins Verhältnis gesetzt.

7.3 Ergebnisse und Diskussion

7.3.1 Aufbau und SPFS- Analyse des Multilayersystems

Die Ergebnisse zum Aufbau einer Atto-633-Streptavidin-Monolage sind in Abbildung 7.2 dargestellt. Wie sich zeigte, stellt sich eine Monolage bereits nach zweifacher Inkubation der Oberfläche mit Atto-633-Streptavidin ein. Bereits nach 60 Minuten war die Adsorption zu 88 % abgeschlossen. Nach erneuter Zugabe von Atto-633-Streptavidin setzte sich die Adsorption mit identischem Verlauf fort und ging bald in ein Plateau über. Dieses Ergebnis zeigt, dass Atto-633-Streptavidin nur eine Monolage auf Sulfo-LC-Biotin ausbildet und es nicht zum Aufbau von Multilagen kommt. Die Winkelverschiebung vor und nach der Adsorption betrug hierbei ca. 1.9° .

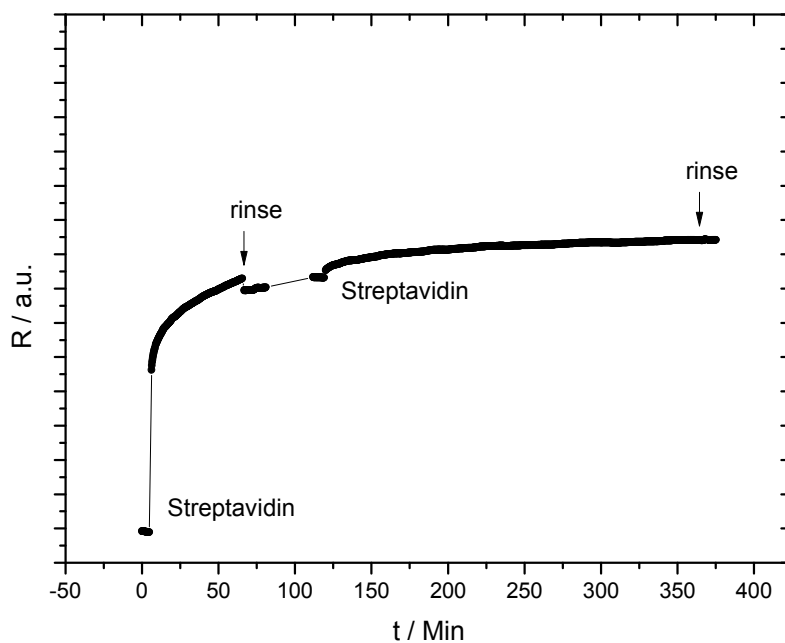


Abb. 7.2: Adsorptionskinetik von Atto-633-Streptavidin an eine Biotin-modifizierte TiO_x -Oberfläche. Nach 65 Minuten wurde die Adsorption durch Spülen gestoppt. Anschließend wurde nach 120 Minuten erneut Atto-633-Streptavidin hinzugegeben und die Adsorption fortgesetzt, bis kein Schichtdickenzuwachs zu verzeichnen war. Wie sich zeigt, tritt diese kurz darauf auf und es kommt nicht zur Ausbildung von Multilagen an Atto-633-Streptavidin.

Bei einer festgelegten Schichtdicke von 4.8 nm ergab sich so eine dielektrische Konstante von $\epsilon_{\text{real}} = 2.54$ bzw. ein Brechungsindex von $n_{\text{Atto-633-Streptavidin}} = 1.59$ für Atto-633-Streptavidin. Die angenommene Schichtdicke entspricht der Höhe von Streptavidin ohne angebundene Chromophore [Hen89]. Die an das Protein gekoppelten Chromophore werden so nicht berücksichtigt und wirken sich direkt auf den Brechungsindex aus. Alternativ würde bei Annahme einer entsprechend dickeren Streptavidin-Schicht der Brechungsindex für Atto-633-Streptavidin etwas geringer ausfallen. Nachdem die optischen Parameter analysiert wurden, wurde nun das gesamte Multilayersystem via Self-Assembly aufgebaut. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7.3 bis 7.5 und in Tabelle 7.4 dargestellt. Die Adsorptionskinetik des Aufbaus eines solchen Multilayersystems ist in Abbildung 7.3 dargestellt. Wie anhand der Zunahme des Resonanzsignales zu sehen ist, lässt sich durch abwechselnde Atto-633-Streptavidin- und bFn-Inkubation ein alternierendes Multilayersystem aufbauen. Die einzelnen Schichten sind spezifisch und stabil angebunden, sodass keine Schichtdickenabnahme nach dem Spülen erkennbar ist. Die gestrichelten Linien markieren den Zeitpunkt der Aufnahme eines SPFS-Scans.

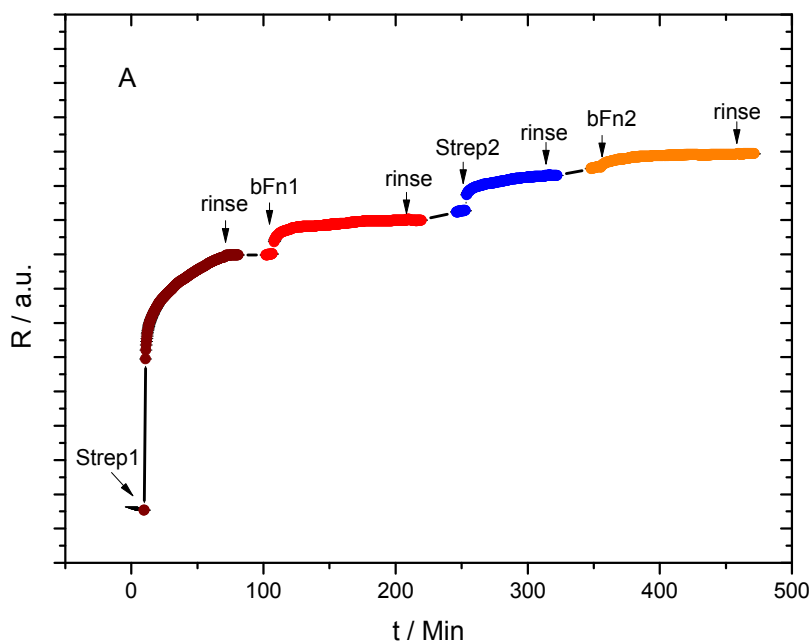


Abb. 7.3: Adsorptionskinetik des Aufbaus eines Multilayersystems, bestehend aus alternierenden Atto-633-Streptavidin und bFn-Schichten.

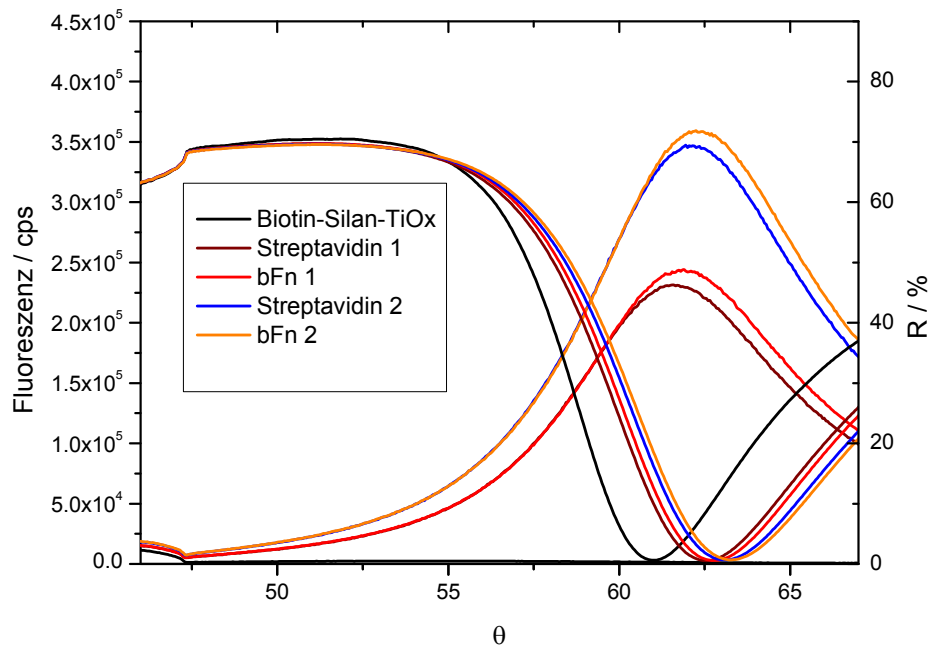
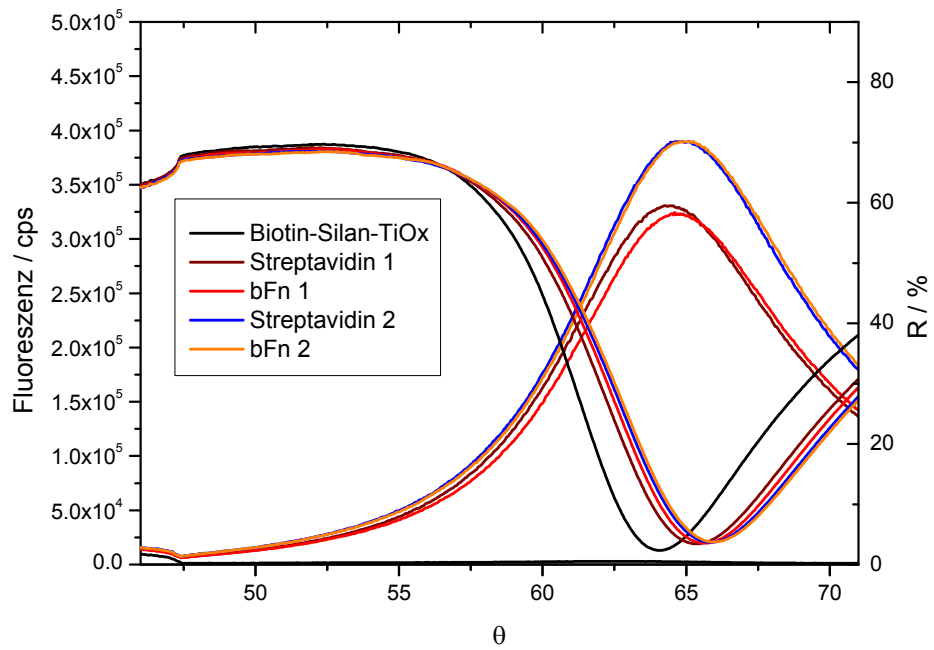
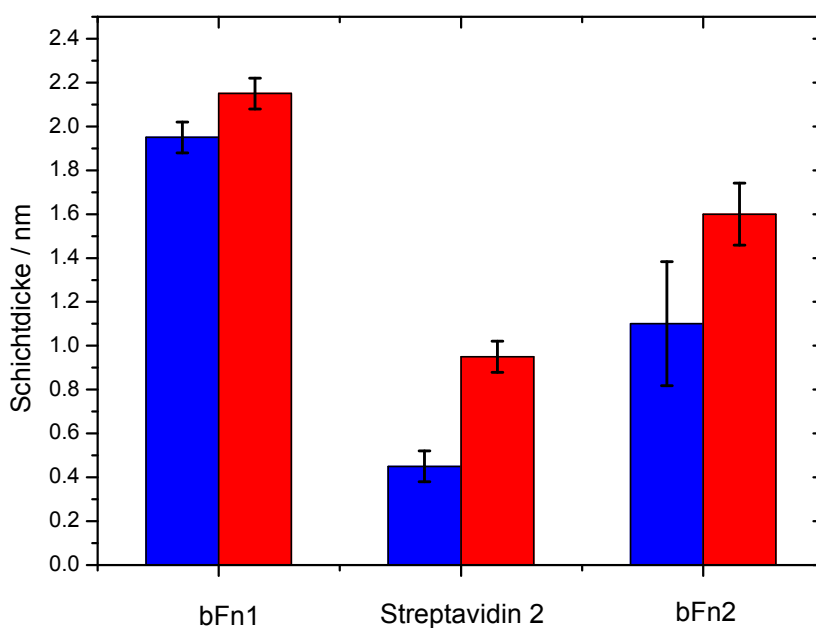


Abb. 7.4: SPFS-Scan der einzelnen Schichten eines alternierenden Atto-633-Streptavidin- und bFn-Multilayersystems bei zwei unterschiedlichen DOLs (9.4 [oben] und 43.6 [unten]). Bereits in der Verschiebung des Minimums im SPR-Spektrum lässt sich bei einem DOL von 43.6 deutlich eine größere Verschiebung zwischen der Bande für bFn (rot) und Streptavidin2 (blau) erkennen, als bei einem DOL von 9.4.

Tabelle 7.4: Schichtdicke der einzelnen Komponenten des Multilayersystems, geordnet nach dem jeweiligen DOL von bFn

DOL	Streptavidin1 (nm)	bFn1 (nm)	Streptavidin2 (nm)	bFn2 (nm)
9.4	3	2	0.5	0.9
9.4	2.9	1.9	0.4	1.3
43.6	4.2	2.1	0.9	1.7
43.6	3.5	2.2	1	1.5

**Abb. 7.5:** Mittlere Schichtdicke der einzelnen Schichten des alternierenden Atto-633-Streptavidin-bFn-Multilayersystems bei zwei verschiedenen DOLs (blau = 9.4, rot = 43.6).

Die sich ergebenden Schichtdicken sind für beide DOLs in Tabelle 7.2 und Abbildung 7.5 dargestellt. Alle Messungen zeigten eine ähnliche Schichtdicke der ersten Schicht an adsorbiertem bFn und besaßen somit vergleichbare Ausgangsbedingungen für die Adsorption einer zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht. Werden diese bFn-Schichtdicken in Abbildung 6.6 ergänzt, so wird deutlich, dass diese dasselbe Verteilungsmuster besitzen wie die übrigen bFn-Schichtdicken (Abb. 7.6).

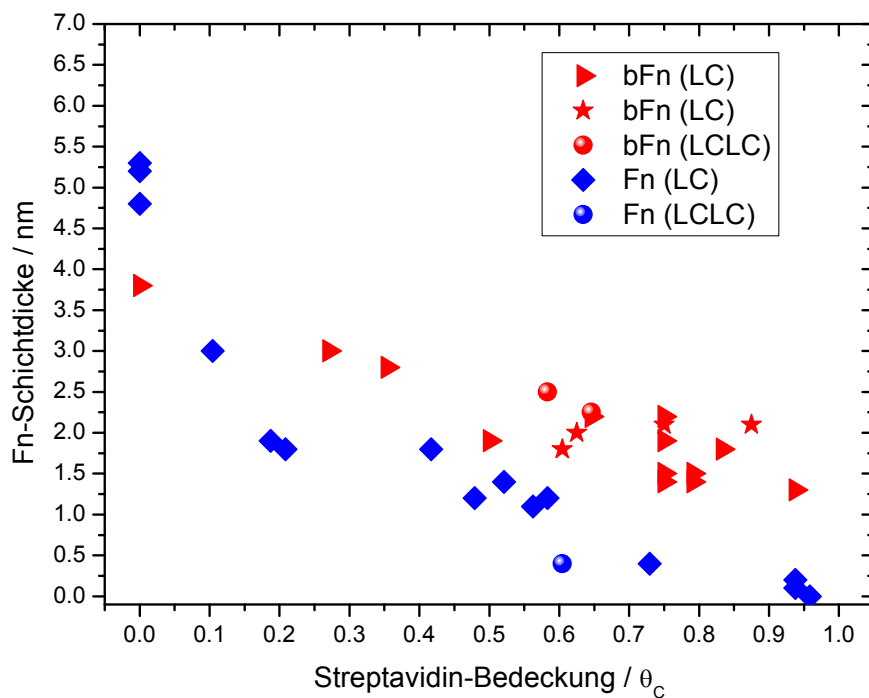


Abb. 7.6: bFn und Fn aufgetragen gegen den Bedeckungsgrad an Streptavidin analog zu Abbildung 6.6. Bei den sternförmigen Messpunkten wurde Atto-633-Streptavidin zum Aufbau der Monolage eingesetzt.

Es zeigte sich erneut, dass der DOL keinen wirklichen Einfluss auf die bFn-Schichtdicke hat. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von *Anamelechi et al.* wird allerdings ein signifikanter Einfluss des DOLs von immobilisiertem bFn auf die Schichtdicke der zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht deutlich (Abb. 7.4 und 7.5, Tabelle 7.4) [Ana07]. Die zweite Atto-633-Streptavidin-Schicht fiel bei einem DOL von 43.6 ca. doppelt so dick aus, wie bei einem DOL von 9.4. Dies lässt sich mit der erhöhten Anzahl an Biotinen begründen, die pro bFn zur Verfügung standen, um Atto-633-Streptavidin zu binden. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch die Ergebnisse der Fluoreszenzzunahme in Tabelle 7.5 und 7.6 untermauert:

Tabelle 7.5: Fluoreszenz der ersten und zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht bei DOL = 9.4.

DOL (bFn) = 9.4		
Schicht	Signal (cps)	Fluoreszenzzunahmen (%)
Biotin	1836	
Streptavidin1	428335	
Streptavidin2	505293	17.97
Biotin	3036	
Streptavidin1	330748	
Streptavidin2	389992	17.91

Tabelle 7.6: Fluoreszenz der ersten und zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht bei DOL = 43.6.

DOL (bFn) = 43.6		
Schicht	Signal (cps)	Fluoreszenzzunahme (%)
Biotin	1398	
Streptavidin1	242200	
Streptavidin2	401760	65.88
Biotin	2445	
Streptavidin1	231473	
Streptavidin2	347293	50.04

Nach Adsorption der ersten wie auch der zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht konnte eine deutliche Zunahme der gemessenen Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Bei Betrachtung der prozentualen Fluoreszenzzunahme nach Adsorption der zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht an bFn relativ zur ersten, zeigt sich außerdem, dass die Stärke der Fluoreszenzzunahme ebenfalls vom DOL des eingesetzten bFn abhängig ist. So stieg die Gesamtfluoreszenz nach Adsorption von Atto-633-Streptavidin an bFn eines DOLs von 43.6 um $55 \% \pm 5 \%$. Bei einem DOL von 9,4 betrug die Fluoreszenzzunahme durch At-

to-633-Streptavidin hingegen nur $17.9 \% \pm 0.1 \%$. Die leichte Abweichung von 5 % bei einem DOL von 43.6 lässt sich durch die unterschiedlichen Schichtdicken der ersten Atto-633-Streptavidin-Schicht erklären. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Anamelechi et al.* konnte hier eindeutig gezeigt werden, dass der DOL sehr wohl die Schichtdicke der zweiten Streptavidin-Schicht beeinflusst, was durch die hier gesteigerte Fluoreszenzzunahme noch einmal untermauert wurde. Diese zweite Atto-633-Streptavidin-Schicht ermöglichte zugleich die Adsorption einer zweiten Lage an bFn. Zusätzlich wirkte sich die erhöhte Atto-633-Streptavidin-Schichtdicke bei einem DOL von 43.6 ebenfalls positiv auf die Dicke der zweiten bFn-Schicht aus. Diese erreichte im Mittel eine Schichtdicke von 1.6 nm und lag somit 0.5 nm über der Dicke der Schicht bei einem DOL von 9.4.

7.3.2 Langzeitstabilität des Multilayersystems in Abhängigkeit des DOLs von bFn

Um festzustellen, ob sich die neue nanoskalige Architektur aus alternierenden Streptavidin-bFn-Schichten positiv auf die Schichtstabilität auswirkt, wurde für jeden DOL des Multilayersystems über mindestens 12 Tage mittels SPR analysiert. Es wurde davon ausgegangen, dass sich das Multilayersystem nach dem LIFO-Prinzip (Last In First Out) abbaut. Hier handelt es sich um die ungünstigste Annahme, da sich die Schichten umgekehrt zur Reihenfolge, in der sie aufgebracht wurden, wieder ablösen. Es würde sich zunächst eine Schicht aus bFn ablösen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.7 und Abbildung 7.8 dargestellt:

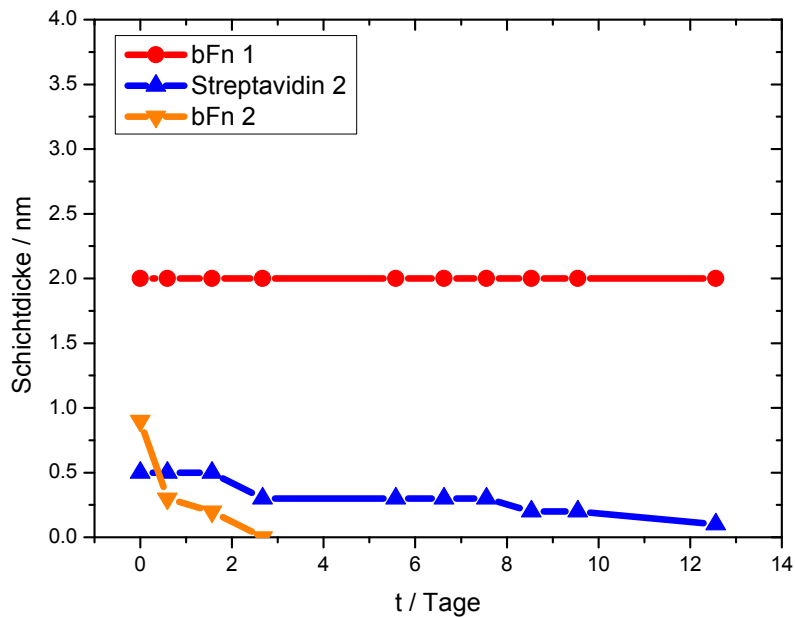


Abb. 7.7: Langzeitstabilität der einzelnen Schichten des Multilayersystems bei einem bFn DOL von 9.4. Aufgetragen ist die Schichtdicke der einzelnen Schichten in nm gegen die Zeit in Tagen. Wie zu sehen ist, nimmt die zweite bFn-Schicht bereits nach einem Tag um mehr als die Hälfte ab. Die Stabilität der ersten bFn-Schicht ist dennoch über 12 Tage gegeben.

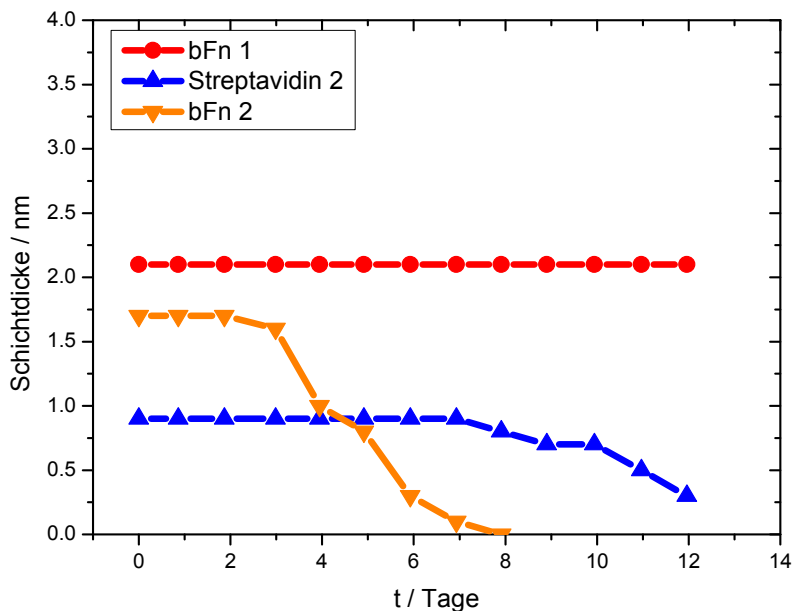


Abb. 7.8: Langzeitstabilität der einzelnen Schichten des Multilayersystems bei einem bFn DOL von 43.6. Aufgetragen ist die Schichtdicke der einzelnen Schichten in nm gegen die Zeit in Tagen. Wie zu sehen, zeigen sich deutliche Unterschiede zur Stabilität des Schichtsystems bei einem bFn DOL von 9.4 (Abb. 7.7). Bei einem DOL von 43.6 ist das gesamte Schichtsystem über 3 Tage lang stabil, was sich durch die erhöhte Anzahl an Biotin-Streptavidin-Bindungen erklärt. Die Stabilität der ersten bFn-Schicht ist auch hier über ganze 12 Tage gegeben.

Durch den Aufbau des Multilayersystems wird die Dauer der Anbindung von bFn an der TiO_x -Oberfläche von wenigen Stunden auf mehrere Tage deutlich erhöht. Nach dem angenommenen Modell blieb die erste bFn-Schicht über den gesamten Zeitraum bei beiden DOLs vollständig gebunden. Darüber hinaus sind Stabilitätsunterschiede der einzelnen Schichten in Abhängigkeit des eingesetzten DOLs zu erkennen. Bei einem DOL von 9.4 zeigte sich bereits nach 15 h eine deutliche Abnahme der Dicke der zweiten bFn-Schicht (Abb. 7.7). Nach zwei Tagen hatte sich diese Schicht dann komplett gelöst, sodass es nun auch zur Abnahme der zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht kam. Die Abnahme dieser Schicht lief allerdings wesentlich langsamer ab, sodass selbst nach 5 Tagen die Schicht noch zu ca. 60 % vorhanden war. Bei einem DOL von 43.6 hingegen begann sich die zweite bFn-Schicht erst nach über 3 Tagen abzulösen. Die Schichtdickenabnahme der zweiten Streptavidin-Schicht verlief ähnlich schnell wie bei einem DOL von 9.4. Aufgrund der höheren Dicke war nach 5 Tagen noch immer 25 % des bFn der zweiten Schicht vorhanden. Die höhere Stabilität erklärt sich durch die größere Anzahl an Biotin-Streptavidin-Bindungen, welche bFn bei einem DOL von 43.6 eingehen kann. Der DOL von 43.6 ist somit wesentlich besser zum Aufbau eines Multilayersystems und für eine Anwendung in der Praxis geeignet als ein DOL von 9.4.

7.4 Konklusion

In diesem Kapitel wurde ein Multilayersystem, bestehend aus alternierenden Streptavidin- und bFn-Schichten, mittels Layer-By-Layer-Technologie aufgebaut. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass der DOL des eingesetzten bFn einen Einfluss auf die Schichtdicke der folgenden Streptavidin-Schicht hat. Die Dicke der zweiten Streptavidin-Schicht nimmt hier mit steigendem DOL zu. Zusätzlich werden diese Ergebnisse durch parallel durchgeführte SPFS-Messungen gestützt. Auch hier zeigte sich analog zu der Zunahme der Schichtdicke des fluoreszenzmarkierten Streptavidins eine Zunahme der gemessenen Fluoreszenz. Diese Ergebnisse erklären sich logisch durch die er-

höhte Anzahl an Biotingruppen je bFn, die eine erhöhte Adsorption von Streptavidin ermöglichen. Gleichzeitig stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den Ergebnissen von *Anamelechi et al.* Weiterhin ergibt sich durch dieses Multilayersystem eine erhöhte Stabilität der biomimetischen Beschichtung. Erwartungsgemäß traten auch hier Unterschiede in Abhängigkeit des eingesetzten DOLs auf, wobei bei einem eingesetzten DOL von 43.6 eine über mehrere Tage stabile Beschichtung entstand. Die unterschiedlichen Stabilitäten erklären sich erneut durch die gesteigerte Anzahl an Biotin-Streptavidin-Bindungen. Darüber hinaus blieb bei beiden untersuchten DOLs die erste bFn-Schicht über 12 Tage stabil. Das Multilayersystem besitzt somit eine Stabilität, die hoch genug ist, um einen Einsatz in der Praxis zu ermöglichen. So könnte ein Implantat mehrere Tage vor der Implantation und nicht unmittelbar vor dem Eingriff beschichtet werden. Zum Aufbau eines Multilayersystems, bestehend aus zwei Schichten bFn an einer bestehenden Streptavidin-Monolage auf TiO_x , sollten folgende Parameter eingesetzt werden:

Tabelle 7.7: Parameter für einen erfolgreichen Aufbau eines alternierenden Multilayersystems

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Lösungsmittel
bFn (DOL ca. 40)	0.025 μM	100 Min.	PBS
Streptavidin	0,5 μM	60 Min.	PBS
bFn (DOL ca. 40)	0.025 μM	100 Min.	PBS

Das Multilayersystem kann darüber hinaus zur Erzielung von zusätzlichen Effekten um zusätzliche Komponenten erweitert werden. Interessant wäre z. B. der Einsatz von BMP-2. BMP-2 ist ein Signalprotein, das zu einer erhöhten Knochenneubildung führt. Durch die spezifische Immobilisierung dieses Proteins als Teil des Multilayersystems könnte der bereits durch das bFn auftretende osteoinduktive Effekt verstärkt werden. Weiterhin wäre es möglich, Komponenten mit antibakteriellen Eigenschaften mit aufzubringen. Dies könnte durch biotinylierte Silbernanopartikel oder Peptide mit antibakterieller Wirkung geschehen. Da die zweite bFn-Schichtdicke mit ca. 1.6 nm genau so dick ist wie

die erste, ist es ebenso möglich, dieses Layer-By-Layer-System weiter fortzusetzen. Hierdurch könnte die Menge an spezifisch immobilisiertem Protein weiter erhöht werden. Es ist nicht auszuschließen, dass auf diese Weise multifunktionale Schichtsysteme, bestehend aus mehreren Komponenten, aufgebaut werden könnten. Nach der zweiten Streptavidin-Schicht könnte beispielsweise eine Schicht bestehend aus Silbernanopartikeln folgen, welche wiederum von einer weiteren bFn-Schicht eingeschlossen wird (Abb. 7.8). Auf diese Weise können die einzelnen Komponenten des Systems der Reihe nach ihre Wirkung entfalten. All dies ist zurzeit noch Spekulation, aber allein an diesen Beispielen kann gesehen werden, wie sich über einfache Self-Assembly-Strategien mittels des Biotin-Streptavidin-Systems komplexe Strukturen auf Implantatoberflächen aufbauen ließen. Es bleibt abzuwarten, ob diese Technologie, die im Bereich der Biosensorik sehr gut etabliert ist, in Zukunft auch zu einer vergleichbaren Größe im Bereich der Bionanotechnologie werden wird.

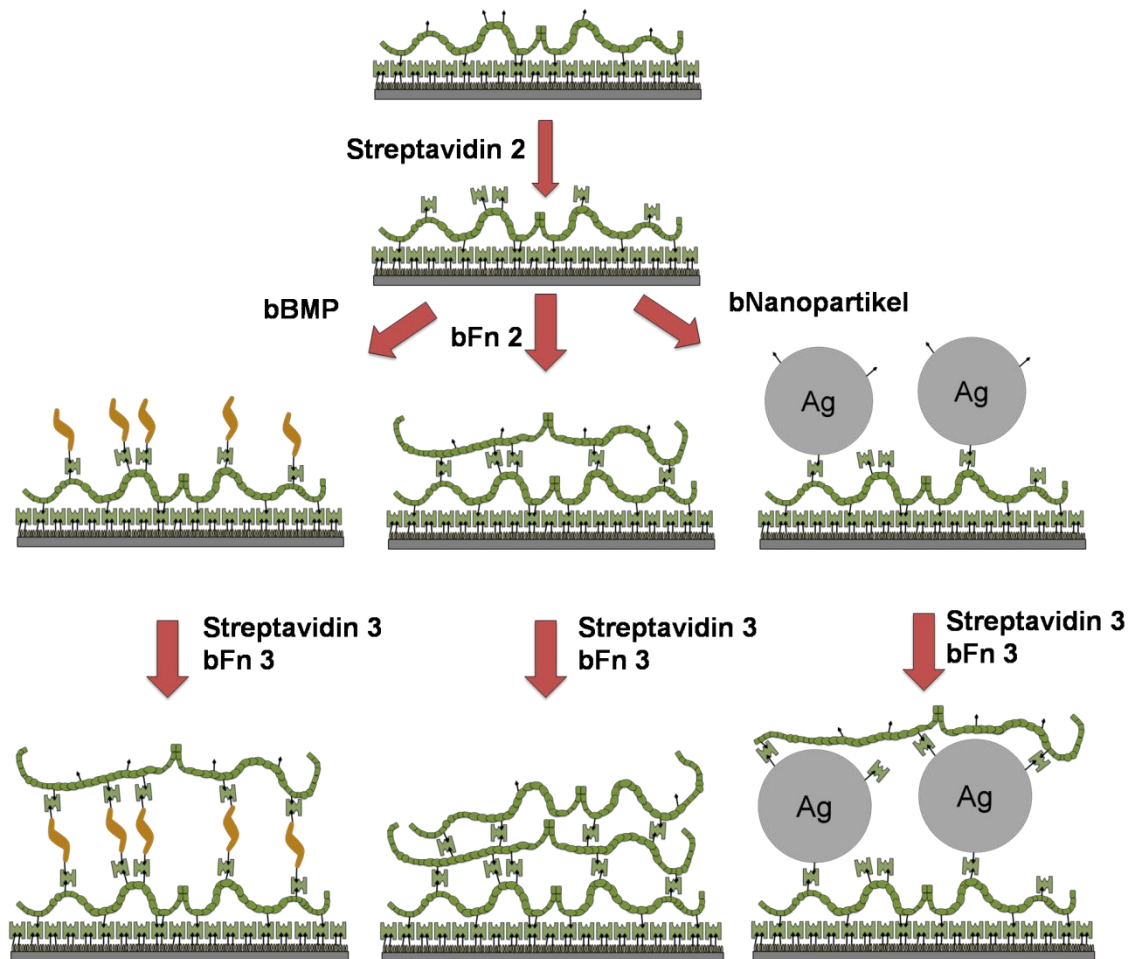


Abb. 7.9: Theoretische Vielseitigkeit des Multilayersystems: Nachdem die zweite Streptavidin-Schicht aufgebracht ist, ließen sich gezielt weitere Moleküle über Self-Assembly an die Oberfläche binden und so der Oberfläche zusätzliche biologische Eigenschaften verleihen. Durch das Anbinden von BMP-2 (links) könnte so die Osteokonduktivität der Beschichtung gesteigert werden. Das Anbinden von Ag-Nanopartikeln (rechts) würde der Oberfläche eine antibakterielle Komponente verleihen. Theoretisch ließe sich an diese Schicht erneut eine Schicht aus bFn anbinden, die diese Schicht einkapselt und gleichzeitig das Anbinden einer weiteren Streptavidin-Schicht ermöglicht.

Kapitel 8: Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Dissertation wird die Entwicklung und Charakterisierung einer biomimetischen Beschichtung für Titanimplantatoberflächen, insbesondere Dentalimplantate, beschrieben. Ziel war es, die Adhäsion und Aktivität von Osteoblasten auf Titanoberflächen zu steigern und so eine Beschleunigung der Implantatintegration in das Knochengewebe zu erreichen. Hierfür wurde eine spezielle Art der biomimetischen Beschichtung entwickelt, bei der biotinyliertes Fibronectin (bFn) über Streptavidin auf eine biotinylierte TiO_x -Modelloberfläche immobilisiert wurde. Die Biotinmodifizierung der TiO_x -Oberfläche erfolgte hierbei über einen „Self-Assembly-Prozess“ durch sequenzielle Chemiesorption von N-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan sowie verschiedenen Sulfo-NHS-Biotin-Derivaten, welche den Aufbau einer Streptavidin-Monolage ermöglichten. Als ein wichtiges Resultat zeigte sich, dass die Streptavidin-Monolage effektiv die unspezifische Adsorption von Proteinen an die TiO_x -Oberfläche unterbindet und hierdurch die Adhäsion von Osteoblasten auf dieser unterdrückt. Dies hat den Vorteil, dass auf eine antiadhäsive Basisbeschichtung, welche für eine spezifische Zellreaktion wichtig ist, verzichtet werden kann. Dieses osteoblastere Adhäsionsverhalten änderte sich signifikant nach Anbindung von bFn an die Streptavidin-Monolage, mit dem Ergebnis, einer drastischen Steigerung der Osteoblastenadhäsion. Weiterhin besaßen Osteoblasten auf diesen Oberflächen ein Proteinexpressionsmuster, das auf eine erhöhte Osteoinduktion schließen lässt. Es zeigte sich darüber hinaus eine verstärkte Zelladhäsion sowie eine Steigerung des osteoinduktiven Effekts auf Substraten, bei denen bFn über eine Streptavidin-Monolage immobilisiert wurde, gegenüber mit nativem Fibronectin (Fn) modifizierten TiO_x -Oberflächen. Ein wesentlicher Schwerpunkt bestand daher in der Analyse der Zusammensetzung und Struktur der biomimetischen Beschichtung über „Surface Plasmon

Spectroscopy“ und „Atomic Force Microscopy“. Diese ergab, dass bFn und natives Fn auf den jeweiligen Oberflächen eine unterschiedliche Konformation einnimmt. Im Gegensatz zu nativem Fn, das bei der Adsorption unter physiologischen Bedingungen auf TiO_x-Oberflächen eine kompakte Konformation besitzt, nimmt bFn auf einer Streptavidin-Monolage eine entfaltete Konformation ein. Bei letzterer handelt es sich um dieselbe, welche Fn *in vivo* innerhalb der extrazellulären Matrix besitzt. Sie unterscheidet sich von der kompakten Fn-Konformation dahingehend, dass entlang der Fn-Achse weitere Proteinbindstellen zugänglich werden und hierdurch die Zellaffinität von Fn gesteigert wird. Die nachgewiesene Konformationsänderung kann somit als Grund für die gesteigerte Osteoblasten-Adhäsion und Aktivität auf Oberflächen mit bFn angenommen werden. Diese Kenntnisse konnten weiterhin für die Optimierung des biomimetischen Schichtsystems genutzt werden. So war es möglich, durch alternierendes Inkubieren der Biotin-aktivierten Oberfläche mit Streptavidin und bFn, ein Multilayersystem gezielt aufzubauen. Der Vorteil dieses Multilayersystems gegenüber einer einfachen Monolage aus bFn besteht in einer erhöhten Stabilität der biomimetischen Beschichtung, wodurch eine Anwendung in der Praxis erleichtert würde.

Ausblick

In dieser Arbeit konnte sowohl auf molekularer Ebene als auch im Zellmodell die Eignung des bFn-Streptavidin-Schichtsystems als Beschichtung für Implantatoberflächen nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt sollte daher mit vorklinischen Tests im Tiermodell fortgefahren werden. Da jeder Vertebrat ein spezielles Fn besitzt, das sich insbesondere in seinem Glykosylierungsmuster unterscheidet, würde ein artübergreifender Einsatz von bFn zu immunologischen Reaktionen führen. Nach dem gleichen Prinzip werden ebenfalls kommerzielle Antikörper gegen humanes Fn in Hasen, Schweinen oder Ziegen hergestellt. Gleichzeitig ist nicht für jeden Modellorganismus Fn kommerziell verfügbar und müsste daher zunächst aufwendig gewonnen

werden. Eine Ausnahme ist Kaninchen-Fn, das kommerziell leicht zugänglich ist, womit dieses Tiermodell am sinnvollsten wäre.

Weiterhin wäre es ebenfalls möglich, bei einer späteren Anwendung als Implantatbeschichtung patienteneigenes Fn zu verwenden. Dieses könnte beispielsweise aus dem Blutplasma des Patienten vor dem Eingriff gewonnen und biotinyliert werden. Zurzeit gibt es Bemühungen, Biomaterialien wie z. B. Knochenersatzmaterial mit körpereigenen (Stamm)Zellen zu modifizieren, um das Einheilverhalten des Materials zu verbessern [Mei04, Shi04, Boo02]. Der Einsatz von lebenden Zellen, insbesondere von Stammzellen, ist sehr umstritten und daher als schwierig zu bewerten. Das spezifische Aufbringen von körpereigenen Proteinen (bspw. Fn) könnte deshalb eine interessante Alternative darstellen. Da eine solche Variante extrem kostenintensiv wäre, sollte es zunächst bei Patienten zum Einsatz kommen, bei denen herkömmliche Implantate einen geringen Einheileffekt zeigen, beispielsweise Patienten im höheren Alter.

Weiterhin wäre ein Einsatz ebenfalls bei besonders kritischen Implantaten, wie etwa Unterkieferimplantaten, denkbar. Hier wird zurzeit verstärkt an BMP (vor allem BMP-2 und BMP-7) als mögliche Alternative zu Beschichtungen mit Fn geforscht. Diese Wachstumsfaktoren sollen die Knochenneubildung um das Implantat verbessern. Gleichzeitig besteht hier bei zu hoher Dosierung ein gesteigertes Risiko zur Tumorbildung [Ste08, Rai05]. Der Einsatz von körpereigenem bFn wäre auch hier eine vielversprechende Alternative.

Anhang

Literaturverzeichnis

- [Alb01] Albers, B., Börsch-Supan, M., Eds. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. [der "kleine" Albers]*, 2., korrigierte Aufl.; Wiley-VCH: Weinheim, 2001.
- [Alb04] Albers, B., Jaenicke, L., Albers-Johnson-Lewis-Raff-Roberts-Walter, Eds. *Molekularbiologie der Zelle. [mit Cell biology interactive]*, 4. Aufl.; Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
- [Alo90] Alon, R.; Bayer, E. A.; Wilchek, M. Streptavidin Contains An RYD Sequence Which Mimics THE RGD Receptor Domain of Fibronectin. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1990, 170 (3), 1236–1241.
- [Ana07] Anamelechi, C. C.; Clermont, E. E.; Brown, M. A.; Truskey, G. A.; Reichert, W. M. Streptavidin Binding and Endothelial Cell Adhesion to Biotinylated Fibronectin. *Langmuir* 2007, 23, 12583–12588
- [Aot94] Aota S, Nomizu M & Kenneth YM (1994) The Short Amino Acid Sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in Human Fibronectin Enhances Cell-adhesive Function. *Journal of Biological Chemistry* 269: 24756–24761
- [Atk98] Atkins, P. W., Ed.: *Physical Chemistry*; Oxford University Press: 1998.
- [Aue05] Auernheimer, J. Funktionalisierung künstlicher Oberflächen mit Integrinliganden zur Stimulierung integrinvermittelter Zelladhäsion. Dissertation, Technische Universität München, München, 2005.
- [Azz07] Azzaroni, O.; Mir, M.; Knoll, W. Supramolecular Architectures of Streptavidin on Biotinylated Self-Assembled Monolayers. Tracking Biomolecular Reorganization after Bioconjugation. *Journal of Physikal Chemistry* 2007, 111, 13499–13503.
- [Bal89] Balkenburg, R.; Meller, P.; Ringsdorf, H.; Salesse, C. Interaction between Biotin Lipids and Streptavidin in Monolayers: Formation of Oriented Two-Dimensional Protein Domains Induced by Surface recognition. *Biochemistry* 1989, 28, 8214–8221.

- [Bar05] Baroch, P.; Musil, J.; Vlcek, K. H.; Han, J. G. Reactive magnetron sputtering of TiOX films. *Surface & Coatings Technology* 2005, 193, 107–111.
- [Ber03] Bergkvist, M.; Carlsson, J.; Oscarsson, S. Surface-dependent conformation of human plasma fibronectin adsorbed to silica, mica, and hydrophobic surfaces, studied with use of Atomic Force Microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research* 2003, 64A, 349–356.
- [Bin86] Binning, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* 1986, 56 (9), 930–933.
- [Bin87] Binning, G.; Gerber, C.; Stoll, E.; Albrecht, T. R.; Quate, C. F. Atomic Resolution with Atomic Force Microscope. *Surface Science* 1987, 189/190, 1–6.
- [Bjo92] Björling, M. Interaction between Surfaces with attached Poly(ethylene oxide) Chains. *Macromolecules* 1992, 25, 3956–3970.
- [Boo02] Boo, J. S.; Yamada, Y.; Okazaki, Y.; Hibino, Y.; Okada, K.; Hata, K.-I.; Yoshikawa, T.; Sugiura, Y.; Ueda, M. Tissue-Engineered Bone Using Mesenchymal Stem Cells and a Biodegradable Scaffold. *Journal of Craniofacial Surgery* 2002, 13, 231–239.
- [Boi03] Böing, J. Modifizierung von Glas- und Titanoberflächen zur Verbesserung der Biokompatibilität. Dissertation, Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Aachen, 2003.
- [Bou07] Bouafsoun, A.; Helali, S.; Mebarek, S.; Zeiller, C.; Prigent, A.-F.; Othmane, A.; Kerkeni, A.; Jaffrézic-Renault, N.; Ponsonnet, L. Electrical probing of endothelial cell behavior on a fibronectin/polystyrene/thiol/gold electrode by Faradaic electrochemical impedance spectroscopy (EIS). *Bioelectrochemistry* 2007, 70 (2), 401–407.
- [Bou84] Boughton, B. J.; Simpson, A. W. The Biochemical and Functional Heterogeneity of Circulating Human Plasma Fibronectin. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1984, 119 (3), 1174–1180.
- [Bra03] Brakebusch, C.; Fässler, R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *The EMBO Journal* 2003, 22 (10), 2324–2333.
- [Bra04] Braga, P. C., Ed. *Atomic Force Microscopy /// Biomedical Methods and Applications*; Methods in molecular biology 242; Humana Press: Totowa, NJ, 2004.
- [Bru09] Brüllmann, D.; Klein, M.; Al-Nawas, B.; Horn, S.; Büsser, V.; Jung, B.; Wagner, W.; d'Hoedt, B. Implementation of new software for

- fast screening of cell compatibility on surface modifications using low-contrast time-lapsed microscopy. *Clinical Oral Investigations* 2009.
- [Bru01] Brunette, D. M., Ed. *Titanium in medicine. Material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications*; Engineering materials; Springer: Berlin, 2001.
- [Bus00] Busse, S. Untersuchungen Molekularer Erkennungsreaktionen mit Einem Integriert-Optischen Mach-Zehnder-Interferometer. Dissertation, Johannes Gutenberg - Universität, Mainz, 2000.
- [Bus02] Busse, S.; Scheumann, V.; Menges, B.; Mittler, S. Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods. *Biosensors and Bioelectronics* 2002, 17, 704–710.
- [Cha64] Chalet, L.; Wolf, F. J. The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomyces. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1964, 106, 1–5.
- [Che08] Cheung, J. W.; Walker, G. C. Immuno-Atomic Force Microscopy Characterization of Adsorbed Fibronectin. *Langmuir* 2008, 24, 13842–13849.
- [Cut03] Cutler, S. M.; Garcia, A. J. Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin alpha5beta1 binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials* 2003, 24 (10), 1759–1770.
- [Dal05] Dalsin, J. L.; Lin, L.; Tosatti, S.; Voros, J.; Textor, M.; Messersmith, P. B. Protein Resistance of Titanium Oxide Surfaces Modified by Biologically Inspired mPEG-DOPA. *Langmuir* 2005, 21, 640–646.
- [Dar91] Darst, S. A.; Ahlers, M.; Meller, P. H.; Kubalek, W.; Balkenburg, R. Two-Dimensional crystals of streptavidin on biotinylated lipid layers and their interactions with biotinylated macromolecules. *Biophysical Journal* 1991, 59, 387–396.
- [DeJ08] De Jonge, L. T.; Leeuwburgh, S. C.; Wolke, J. G.; Jansen, J. A. Organic-Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces. *Pharmaceutical Research* 2008, 25 (10), 2357–2369.
- [Dec97] Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: toward Layered Polymeric MultiComposites. *Science* 1997, 277, 1232–1237.
- [Dev04] Deval, J.; Umali, T. A.; Lan, E. H.; Dunn, B.; Ho, C.-M. Reconfigurable hydrophobic/hydrophilic surfaces in microelectromechanical systems (MEMS). *Journal of Micromechanics and Microengineering* 2004, 14 (1), 91–95.

- [Dit89] Dittmer, J.; Dittmer, A.; Della Bruna, R.; Kasche, V. A native, affinity-based protein blot for the analysis of streptavidin heterogeneity: Consequences for the specificity of streptavidin mediated binding assays. *Electrophoresis* 1989, *10*, 762–765.
- [Dub08] Dubrovin, E. V.; Voloshin, A. G.; Kraevsky, S. V.; Ignatyuk, T. E.; Abramchuk, S. S.; Yaminsky, I. V.; Ignatov, S. G. Atomic Force Microscopy Investigation of Phage Infection of Bacteria. *Langmuir* 2008, *24*, 13068–13074.
- [Duf07] Dufoura, C.; Holyb, X.; Mariea, P. J. Skeletal unloading induces osteoblast apoptosis and targets alpha5beta1-pi3k-bcl-signaling in rat bone. *Experimental Cell Research* 2007, *313*, 394–403.
- [Eng81] Engel, J.; Obermatt, E.; Engel, A. Shapes, Domain Organization and Flexibility of Laminin and Fibronectin, Two Multifunctional Proteins of the Extracellular Matrix. *Journal of Molecular Biology* 1981, *150*, 97–120.
- [Eng05] Engelhard, E. Adhäsion und Differenzierung humaner mesenchymaler Progenitorzellen auf Poly-Ethylen-Glykol-beschichteten und durch lineare und zyklische RGD-Peptide funktionalisierten Oberflächen. Dissertation, Universität Ulm, Ulm, 2005.
- [Eri81] Erickson, H. P.; Carrell, N.; McDonagh, J. Fibronectin Molecule Visualized in Electron Microscopy: A Long, Thin, Flexible Strand. *Journal of Cell Biology* 1981, *91*, 673–678.
- [Eri83] Erickson, H. P.; Carrell, N. Fibronektin in Extended and Compact Conformation: Electron Microscopy and Sedimentational Analysis. *Journal of Biological Chemistry* 1983, *258* (23), 14539–14544.
- [Fuj06] Fujimaki, M.; Rockstuhl, C.; Wang, X.; Awazu, K.; Tominaga, J.; Ikeda, T.; Koganezawa, Y.; Ohki, Y. Biomolecular sensors utilizing waveguide modes excited by evanescent fields. *Journal of Electron Microscopy* 2006, *229*, 320–326.
- [Fur83] Furcht, L. T. Structure and Function of the Adhesive Glycoprotein Fibronectin. *Modern Cell Biology* 1983, *1*, 53–117.
- [Gam98] Gamble, L.; Henderson, M. A.; Campbell, C. T. Organofunctionalization of TiO₂(110): (3,3,3-Trifluoropropyl)trimethoxysilane Adsorption. *Journal of Physikal Chemistry B* 1998, *102*, 4536–4543.
- [Gar99a] Garcia, A. J.; Boettiger, D. Integrin-fibronectin interactions at the cell-material interface: initial integrin binding and signaling. *Bio-materials* 1999, *20*, 2427–2433.

- [Gar99b] Garcia, A. J.; Vega, M. D.; Boettiger, D. Modulation of Cell Proliferation and Differentiation through Substrate-dependent Changes in Fibronectin Conformation. *Molecular Biology of the Cell* 1999, *10*, 785–798.
- [Gar09] Garcia, A. J., George, W., Eds. *Integrin-specific nanoclustered fibronectin-mimetic ligands to engineer cell responses*, 2009.
- [Git88] Gitlin, G.; Bayer, E. A.; Wilchek, M. Studies on the biotin-binding site of streptavidin. *Biochemistry* 1988, *256*, 279–282.
- [Gna07] Gnauck, M.; Jaehne, E.; Blaettler, T.; Tosatti, S.; Textor, M.; Adler, H.-J. P. Carboxy-Terminated Oligo(ethylene glycol)-Alkane Phosphate: Synthesis and Self-Assembly on Titanium Oxide Surfaces. *Langmuir* 2007, *23*, 377–381.
- [Gor09a] Gorbahn, M.; Lehnert, M.; Klein, M.; Brüllmann, D.; Köper, I.; Al-Nawas, B.; Veith, M. Implant coating with Fibronectin over a Biotin-Streptavidin System. *BIOMaterialien* 2009, *10* (S1), 95.
- [Gor09b] Gorbahn, M. Zellbiologische Charakterisierung biomimetischer Implantatbeschichtungen mit Fibronectin über ein Biotin-Streptavidin-System. Master-Thesis, Fachhochschule Gelsenkirchen, Recklinghausen, 2009.
- [Gor77] Gordon, J. G.; Swalen, J. D. The Effect of Thin Organic Films on the Surface Plasma Resonance on Gold. *Optics Communications* 1977, *22* (3), 374–376.
- [Gre75] Green, M. Avidin. *Advances in Protein Chemistry* 1975, *29*, 85–133.
- [Gri88] Gristina, A. G.; Naylor, P.; Myrvik, Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Medical Progress through Technology* 1988, *14*, 205–224.
- [Hau91] Häussling, L.; Ringsdorf, H.; Schmitt, F. J.; Knoll, W. Biotin-Functionalized Self-Assembled Monolayers on Gold: Surface Plasmon Optical Studies of Specific Recognition Reactions. *Langmuir* 1991, *7* (7), 1837–1840.
- [Hem02] Hemly, R.; Fadeev, A. Y. Self-Assembled Monolayers Supported on TiO₂: Comparison of C₁₈H₃₇SiX₃ (X= H, Cl, OCH₃), C₁₈H₃₇Si(CH₃)₂Cl, and C₁₈H₃₇PO(OH)₂. *Langmuir* 2002, *18*, 8924–8928.
- [Hen89] Hendrickson, W. A.; Pähler, A.; Smith, J. L.; Satow, Y.; Merritt, E. A.; Phizackerley, P. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron. *Biophysics* 1989, *86*, 2190–2194.

- [Hua97] Huang, J. Y.; Song, K. J.; Langoutchev, A.; Yang, P. K.; Chuang, T. J. Molecular Conformation and Nanomechanics of Self-Assembled Alkylsilxane Monolayers. *Langmuir* 1997, *13*, 58–64.
- [Hua01] Huang, N.-P.; Michel, R.; Voros, J.; Textor, M.; Hofer, R.; Rossi, A.; Elbert, D. L.; Hubbell, J. A.; Spencer, N. D. Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption. *Langmuir* 2001, *17*, 489–498.
- [Hua02] Huang, N.-P.; Voros, J.; De Paul, S. M.; Textor, M.; Spencer, N. D. Biotin-Derivatized Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol): A Novel Polymeric Interface for Bioaffinity Sensing. *Langmuir* 2002, *18*, 220–230.
- [Jan01] Jandt, K. D. Atomic Force Microscopy of Biomaterials, surfaces and interfaces. *Surface Science* 2001, *491*, 303–332.
- [Jeo91] Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G. Protein-surface interaction in the presence of polyethylene oxide: 1. Simplified theory. *Journal of Colloid and Interface Science* 1991, *142*, 149–158.
- [Joh99] Johnson, K. J.; Sage, H.; Briscoe, G.; Erickson, H. P. The Compact Conformation of Fibronectin is Determined by Intramolecular Ionic Interactions. *Journal of Biological Chemistry* 1999, *274* (22), 15479-15479.
- [Kan09] Kang, M. S.; Bong, S. L.; Kim, W.-J.; Choi, I. S. Specific Binding of Streptavidin onto the Nonbiofouling Titanium/Titanium Oxide Surface through Surface-Initiated, Atom Transfer Radical Polymerization and Bioconjugation of Biotin. *Macromolecular Research* 2009, *17* (3), 174–180.
- [Kas83] Kasemo, B. Biocompatibility of titanium implants: Surface science aspects. *Journal of Prosthet Dent* 1983, *49*, 832–837.
- [Kas99] Kasemo, B.; Gold, J. Implant surface and Interface processes. *Adv Dent Res* 1999, *13*, 8–20.
- [Kim91] Kimizuka, F.; Yoichi, O.; Yasutoshi, K.; Shimojo, T.; Taguchi, Y.; Hashino, K.; Goto, S.; Hashi, H.; Kato, I.; Sekiguchi, K.; Titani, K. Role of Type 3 Homology Repeats in Cell Adhesive Function within the Cell-binding Domain of Fibronectin. *Journal of Biological Chemistry* 1991, *266* (5), 3045–3051.
- [Kno98] Knoll, W. Interfaces and Thin Films as Seen by Bound Electromagnetic Waves. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1998, *49*, 569–638.
- [Koh04] Kohanski, R. A., Ed. *Encyclopedia of Biological Chemistry 1. Biotinylation of Proteins*, 2004.

- [Kot81] Koteliansky, V. E.; Glukhova, M. A.; Benjanian, M. V.; Smirnov, V. N.; Filimonov, V. V.; Zalite, O. M.; Venyaminov, S. Y. A study of the structure of Fibronectin. *European Journal of Biochemistry* 1981, *119*, 619–624.
- [Kra02] Krammer, A.; Craig, D.; Thomas, W.; Schulten, K.; Vogel, V. A structural model for force regulated integrin binding to fibronectins RGD-synergy site. *Matrix Biology* 2002, *21*, 139–147.
- [Kre68] Kretschmann, E.; Reather, H. Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmon Excited by Light. *Zeitschrift für Naturforschung* 1968, *23* (12), 2135–2136.
- [Kre71] Kretschmann, E. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metall durch Anregung von Oberflächenplasmonen. *Zeitschrift für Physik* 1971, *241*, 313–324.
- [Lan81] Langer, P. R.; Waldrop, A. A.; Ward, D. C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Biochemistry* 1981, *76* (11), 6633–6637.
- [LeG07] Le Guehannec, L.; Soueidan, A.; Layrolle, P.; Amouriq, Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials* 2007, *23*, 844–854.
- [Lie00] Liebermann, T.; Knoll, W. Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A* 2000, *171*, 115–130.
- [Lin00] Lin, H.; Ratnesh, L.; Clegg, D. O. Imaging and Mapping Heparin-Binding Site on Single Fibronectin Molecules with Atomic Force Microscopy. *Biochemistry* 2000, *39*, 3192–3196.
- [Mac98] MacDonald, D. E.; Markovic, B.; Allen, M.; Sosasundaran, P.; Boskey, A. L. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998, *41*, 120–130.
- [Mao05] Mao, Y.; Schwarzbauer, J. E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology* 2005, *24*, 389–399.
- [Mic03] Michael, K. E.; Vernekar, V. N.; Keselowsky, B. G.; Meredith, J. C.; Latour, R. A.; Garcia, A. J. Adsorption-Induced Conformational Changes in Fibronectin Due to Interactions with well-Defined Surfaces. *Langmuir* 2003, *19*, 8033–8040.
- [Mic02] Michel, R.; Reviakine, I.; Sutherland, D.; Fokas, C.; Csucs, G.; Danuser, G.; NicholasSpencer, N. D.; Textor, M. A novel Approach to Produce Biologically Relevant Chemical Patterns at the

- Nanometer Scale: Selective Molecular Assembly Patterning Combined with Colloidal Lithography. *Langmuir* 2002, 18, 8580–8586.
- [Mor04] Morpurgo, M.; Radu, A.; Bayer, E. A.; Wilchek, M. DNA condensation by high-affinity interaction with avidin. *Journal of Molecular Recognition* 2004, 17, 558–566.
- [Mur02] Murray, S.; Anthony, M.; Dougan, T.; Chu, A. C. Reduction of streptavidin-RYD-mediated renal adhesion by site-directed mutagenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002, 1570, 81–88.
- [Mül02] Müller, D. J.; Hand, G. M.; Engel, A.; Sosinsky, G. E. Conformational changes in surface structures of insolated connexin 26 gap junctions. *The EMBO Journal* 2002, 21 (14), 3598–3607.
- [Mül06] Müller, D. J. Hochauflösende Rasterkraft-mikroskopie mikrobieller membranen. *BIOspektrum* 2006, 12, 483–485.
- [Muz91] Muzykantov, V. R.; Smirnov, M. D.; Samokhin, G. P. Streptavidin-induced lysis of homologous biotinylated erythrocytes Evidence against the key role of the avidin charge in complement activation via the alternative pathway. *FEBS Letters* 1991, 280, 112–114.
- [Neu02] Neumann, T.; Johansson, M.-L.; Kambhampati, D.; Knoll, W. Surface-Plasmon Fluoreszenz Spectroscopy. *Advanced Functional Materials* 2002, 12 (9), 575–586.
- [Oba88] Obara, M.; Kang, M. S.; Yamada, K. M. Site-directed mutagenesis of the cell binding domain of human fibronectin: separable, synergistic sites mediate adhesive function. *Cell* 1988, 53 (4), 649–657.
- [Oha99] Ohashi, T.; Kiehart, D. P.; Erickson, H. P. Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein. *Cell Biology* 1999, 96, 2153–2158.
- [Oka98] Okamoto, K.; Matsuura, T.; Hosokawa, R.; Akagawa, Y. RGD Peptides Regulate the specific Adhesion Scheme of Osteoblasts to Hydroxyapatite but not Titanium. *Journal of Dental Research* 1998, 77 (3), 481–487.
- [Pan02] Pankov, R.; Yamada, K. M. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 2002, 115, 3861–3863.
- [Pax02] Pax, M. Die Quarzmikrowaage als extrazellulärer Biosensor. Diplomarbeit, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz, 2002.
- [Per00] Pertsin, A. J.; Grunze, M. Computer Simulation of Water near the Surface of Oligo (ethylene glycole)-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* 2000, 16, 8829–8841.
- [Pes90] Pesciotta Peters, D. M.; Portz, L. M.; Fullenwider, J.; Mosher, D. F. Co-assembly of Plasma and cellular Fibronectin into Fibrils in Hu-

- man Fibroblast Cultures. *Journal of Cell Biology* 1990, 111, 249–256.
- [Pha03] Pham, M. T.; Reuther, H.; Maitz, M. F. Native extracellular matrix coating on Ti surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 2003, 66A, 310–316.
- [Pie83] Pirschbacher, M.; Hayman, E. G.; Ruoslahti, E. Synthetic peptide with cell attachment activity of fibronectin. *Biochemistry* 1983, 80, 1224–1227.
- [Pie84] Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments. *Nature* 1984, 309, 30–33.
- [Pot94] Potts, J.; Campbell, I. Fibronectin structure and assembly. *Current opinion in Cell Biology* 1994, 6, 648–655.
- [Pot96] Potts, J.; Campbell, I. Structure and Function of Fibronectin Modules. *Matrix Biology* 1996, 15, 313–320.
- [Pri82] Price, T. M.; Rudee, M. L.; Pierschbacher, M.; Ruoslahti, E. Structure of Fibronectin and its fragments in electron Microscopy. *European Journal of Biochemistry* 1982, 129, 359–363.
- [Pro87] Proctor, R. A. Fibronectin: A brief overview on its structure, function, and physiology. *Reviews of Infectious diseases* 1987, 9, 317–321.
- [Rai05] Raida, M.; Clement, J. H.; Leek, R. D.; Ameri, K.; Bicknell, R.; Niederwieser, D.; Harris, A. L. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005, 131, 741–750.
- [Raj74] Rajaraman, R.; Rounds, D. E.; Yen, S. P. S.; Rembaum, A. A Scanning Electron Microscope Study of Cell Adhesion and Spreading in Vitro. *Experimental Cell Research* 1974, 88, 327–339.
- [Ran05] Ranghavendra, S.; Wood, M. C.; Taylor, T. D. Early Wound Healing Around Endosseous Implants: A Review of the Literature. *Int. Journal of Oral Maxillofac Implants* 2005, 20 (425 - 431).
- [Ras03] Raschke, G.; Kowarik, S.; Franzl, T.; Sönnichsen, C.; Klar, T. A.; Feldmann, J. Biomolekulare Recognition Based on Single Gold Nanoparticle Light Scattering. *Nano Letters* 2003, 3 (7), 935–938.
- [Ray09] Raynor, J. E.; Capadona, J. R.; Collard, D. M.; Petrie, T. A.; Garcia, A. J. Polymer brushes and self-assembled monolayers: Versatile platforms to control cell adhesion to biomaterials (Review). *Biointerphases* 2009, 4, FA3 - FA16.

- [Rei93] Reiter, R.; Motschmann, H.; Knoll, W. Ellipsometric Characterization of Streptavidin Binding to Biotin-Functionalized Lipid Monolayers at the Water / Air Interface. *Langmuir* 1993, 9, 2430–2435.
- [Roc87] Rocco, M.; Infusini, E.; Giovanna Daga, M.; Gogioso, L.; Cuniberti, C. Models of Fibronectin. *The EMBO Journal* 1987, 6 (8), 2343–2349.
- [Ros05] Rossetti, F. F.; Bally, M.; Michel, R.; Textor, M.; Reviakine, I. Interactions between Titanium Dioxide and Phosphatidyl Serine-Containing Liposomes: Formation and Patterning of Supported Phospholipid Bilayers on the Surface of a Medically Relevant Material. *Langmuir* 2005, 21 (6443-6450).
- [Ros09] Rosin, C. Auswirkung des Biotinylierungsgrades von Fibronektin auf dessen Adsorptionsverhalten bei der Biofunktionalisierung von Titanimplantatoberflächen. Bachelor-Thesis, Fachhochschule Gelenkirchen, Recklinghausen, 2009.
- [Sam05] Sammons, R. L.; Lumbikanonda, N.; Gross, M.; Cantzler, P. Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration. *Clinical Oral Implant Research* 2005, 1–10.
- [Sch08] Schasfoort, R. B. M., Tudos, A. J., Eds. *Handbook of surface plasmon resonance*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2008.
- [Sch99] Scheuering, S.; Müller, D. J.; Ringler, P.; Heymann, J. B.; Engel, A. Imaging streptavidin 2D crystals on biotinylated lipid monolayers at high resolution with the atomic force microscope. *Journal of Microscopy* 1999, 199, 28–35.
- [Shi04] Shine, M.; Yoshimoto, H.; Vacanti, J. In Vivo Bone Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells on a Novel Electrospun Nanofibrous Scaffold. *Tissue Engineering* 2004, 10, 33–41.
- [Sec97] Sechler, J. L.; Corbett, S. A.; Schwarzbauer, J. E. Modulatory Roles of Integrin Activation and the Synergy Site of Fibronectin during Matrix Assembly. *Molecular Biology of the Cell* 1997, 8, 2563–2573.
- [Sjo89] Sjöberg, B.; Ericksson, M.; Österland, E.; Österland, K. Solution structure of human plasma Fibronectin as a function on NaCl concentration determined by small-angle X-ray scattering. *European Biophysical Journal* 1989, 17, 5–11.
- [Ska04] Skander, M.; Humbert, N.; Collot, J.; Gradinaru, J.; Klein, G.; Loosli, A.; Sauser, J.; Zocchi, A.; Gilardoni, F.; Ward, T. R. Artificial Metalloenzymes: (Strept)avidin as Host for Enantioselective

- Hydrogenation by Achiral Biotinylated Rhodium-Diphosphine Complexes. *JACS* 2004, 126, 14411–14418.
- [Smi07] Smith, M. L.; Gourdon, D.; Little, W. C.; Kubow, K. E.; Eguiluz, A.; Luna-Morris, S.; Vogel, V. Force-Induced Unfolding of Fibronectin in the Extracellular Matrix of living Cells. *PLoS Biology* 2007, 5, 2243–2254.
- [Sou07] Sousa, S. R.; Bras, M. M.; Moradas-Ferreira, P.; Barbosa, M. A. Dynamics of Fibronectin Adsorption on TiO₂ surfaces. *Langmuir* 2007, 23, 7046–7054.
- [Spi93] Spinke, J.; Liley, M.; Guder, H. J.; Angermaier, L.; Knoll, W. Molecular Recognition at Self-Assembled Monolayers: The Construction of Multicomponent Multilayers. *Langmuir* 1993, 9, 1821–1825.
- [Spi00] Spinke, J.; Schmitt, F. J.; Pisevic, D.; Liley, M.; Badia, A.; Arnold, S.; Liebermann, T.; Zizlsperger, M.; Knoll, W. Streptavidin Arrays as supramolecular architectures in surface-plasmon optical sensor formats. *Colloids and Surfaces A* 2000, 161, 151-137.
- [Ste08] Steinert, S. Untersuchungen zur tumorbiologischen Relevanz von BMP-2 im Mammakarzinom. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, 2008.
- [Ste02] Stephansson, S. N.; Byers, B. A.; Garcia, A. J. Enhanced expression of osteoblastic phenotype on substrates that modulate fibronectin conformation and integrin receptor binding. *Biomaterials* 2002, 23, 2527–2534.
- [TheCC] Thermo Scientific, Pierce Protein Research Products. Chemistry of Crosslinking. (www.piercenet.com)
- [TheBB] Thermo Scientific, Pierce Protein Research Products. EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin and Biotinylation Kits. (www.piercenet.com)
- [Too83] Tooney, N. M.; Mosesson, M. W.; Amrani, D. L.; Heinfeld, J. F.; Wall, J. S. Solution and Surface Effects on Plasma Fibronectin Structure. *Journal of Cell Biology* 1983, 97, 1686–1692.
- [Vee08] Veeco Instruments Inc. *User Manual For SPM and Software. 004-1005-000 (Standard) 004-1005-100 (Cleanroom)*. Copyright © [2008] Veeco Instruments Inc. All rights reserved.: Santa Barbara, California 93117.
- [Web89] Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R. Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science* 1989, 243, 85–88.

- [Web94] Weber, P. C.; Pantoliano, M. W.; Salemme, F. R. Structure-Based Design of Synthetic Azobenzene Ligands for Streptavidin. *Journal of the American Chemical Society* 1994, *116*, 2717–2724.
- [Web95] Weber, P. C.; Pantoliano, M. W.; Salemme, F. R. Crystallographic and Thermodynamic Comparison of Structurally Diverse Molecules Binding to Streptavidin. *Acta Crystallographica* 1995, D51, 590–596.
- [Wei92] Weisenhorn, A. L.; Schmitt, F. J.; Knoll, W.; Hansma, P. K. Streptavidin binding observed with atomic force microscope. *Ultramicroscopy* 1992, *42-44*, 1125–1132.
- [Wie03] Wierzbicka-Partynowski, I.; Schwarzbauer, J. E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of Cell Science* 2003, *116*, 3269–3276.
- [Wil82] Williams, E. C.; Janmey, P. A.; Ferry, J. D.; Mosher, D. F. Conformational States of Fibronectin. *Journal of Biological Chemistry* 1982, *257*, 14973–14978.
- [Xin06] Xinheng, L.; Tamada, K.; Baba, A.; Knoll, W.; Hara, M. Estimation on Dielectric Function of Biotin-Capped Gold Nanoparticles via Signal Enhancement on Surface Plasmon Resonance. *Journal of Physikal Chemistry B* 2006, *110*, 15755–15762.
- [XuF05] Xu, F. Assembly and Characterization of Supramolecular Architectures for Biosensor Applications. Dissertation, Johannes Gutenberg - Universität, Mainz, 2005.
- [XuF06] Xu, F.; Zhen, G.; Textor, M.; Knoll, W. Surface plasmon optical detection of Beta-lactamase binding to different initial matrices combined with fiber optic absorbance spectroscopy for enzymatic activity. *Biointerphases* 2006, *1*, 73–81.
- [YuF04] Yu, F.; Persson, B.; Löfas, S.; Knoll, W. Attomolar Sensitivity in Bioassays Based on Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy. *JACS* 2004, *126*, 8902–8903.
- [Zen93] Zenhausern, F.; Adrian, M.; Descouts, P. Solution Structure and Direct Imaging of Fibronectin Adsorption to Solid Surfaces by Scanning Force Microscopy and Cryo-electron Microscopy. *Journal of Electron Microscopy* 1993, *42*, 378–388.
- [Zha95] Zhang, Z.; Vuori, K.; Reed, J. C.; Erkki, R. The alpha5beta1 integrin support survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Cell Biology* 1995, *92*, 6161–6165.
- [Zho86] Zhou, N. F.; Pethica, B. A. Monolayers of Human Plasma Fibronectin at the Air/Water Interface. *Langmuir* 1986, *2*, 47–50.

Abkürzungsverzeichnis

μM	10^{-6} M
μm	10^{-6} m
Å	Angström (10^{-10} m)
AC	Wechselstrom
AFM	Rasterkraftmikroskopie
Ag	Silber
AP	Alkalische Phosphatase
Ar	Argon
Atto-633-Streptavidin	Streptavidin, modifiziert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto 633
Au	Gold
bFn	biotinyliertes Fibronectin
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Konzentration
c	Lichtgeschwindigkeit
CaP	Kalziumphosphat
cDNA	Copy DNA
DC	Gleichstrom
DOL	Biotinylierungsgrad
DOPA	3,4-dihydroxyphenylalanin
E	elektrisches Feld
ECM	extrazelluläre Matrix
EG	Ethylen Glykol
et al.	und andere
Fn	Fibronectin
Fn1(x)	Fibronectin-Modultyp 1
Fn2(x)	Fibronectin-Modultyp 2
Fn3(x)	Fibronectin-Modultyp 3

FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Erdbeschleunigung (9.80665 m / s^2)
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure
kDa	Kilodalton
K_{ON}	Gleichgewichtskonstante
K_{ON}^*	K_{ON} unter Vernachlässigung der Rückreaktion
k_x	Impulsvektorkomponente in x-Richtung
LC	"Long Chain"
LIFO	"Last In First Out"
m	Meter
M	Molar (Mol / Liter)
Min.	Minuten
Mio.	Million
mM	10^{-3} M
n	Brechungsindex
N	Newton ($\text{kg} \times \text{m / s}^2$)
N_2	Stickstoff
NH_2	Aminogruppe
nM	10^{-9} M
nm	10^{-9} m
O_2	Sauerstoff
OEG	Oligo Ethylen Glykol
p	Polarisierungsebene p
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Poly Etyhlen Glykol
PHSRN	Aminosäuresequenz innerhalb von Fn3(9)
PID	Proportional Integral Differential
pM	10^{-12} M
R	Reflektivität

REM	Raster Elektronen Mikroskop
RGD	Aminosäuresequenz innerhalb von Fn3(10), welche mit Integrinen Wechselwirkt
rpm	Umdrehungen pro Minute
Runx2	Runt related transcription factor 2
RYD	Aminosäuresequenz innerhalb von Streptavidin welche RGD-Sequenz ähnelt
S.A.	Self-Assembly
S ₀	Elektron im Grundzustand
S ₁	Elektron im Angeregten Zustand 1
S ₂	Elektron im Angeregten Zustand 2
SAM	Self Assembled Monolayer
Si	Silizium
sp ³	Hybridmolekülorbital
SPFS	Oberflächenplasmonen verstärkte Fluoreszenz Spektroskopie
SPR	Oberflächenplasmonen Resonanz
STD	Standardabweichung
STM	Rastertunnelmikroskop
Streptavidin-DyLight488	Streptavidin modifiziert mit dem Fluoreszenzfarbstoff DyLight488
TEM	Transmissions Elektronen Mikroskop
TiO _x	Titanoxid mit Sauerstoffanteil 1 – 2.
V	Volt
ε _{imaginär}	Imaginärteil der Dielektrizitätskonstante
ε _{real}	Realteil der Dielektrizitätskonstante
Θ _c	Bedeckungsgrad
Θ	Einfallswinkel
λ	Wellenlänge
v	Frequenz
ω	Kreisfrequenz

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Prozesse an der Gewebe-Implantat-Schnittstelle nach der Implantation. Seite: 3

Abb. 1.2: Stabilitätsverlauf eines eingesetzten Implantats. Seite: 5

Abb. 1.3: Unterschiedliche postimplantäre Abläufe an Titanimplantatoberflächen, je nach Oberflächenfunktionalisierung. Seite: 9

Abb. 2.1: Schema des elektrischen Feldes eines Oberflächenplasmons, welches sich in x -Richtung an einer Metall-Dielektrikum-Grenzfläche ausbreitet. Seite: 16

Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Dispersionsrelationen unterschiedlicher elektromagnetischer Wellen an einer Goldoberfläche. Seite: 17

Abb. 2.3: Schematischer Aufbau eines SPR-Spektrometers. Seite: 21

Abb. 2.4: Oberflächenplasmonenspektrum vor und nach Adsorption einer dielektrischen Deckschicht. Seite: 22

Abb. 2.5: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm. Seite: 23

Abb. 2.6: Feldverstärkung der evaneszenten Welle nahe der Plasmonenresonanz auf Silber (A) und Goldoberflächen (B). Seite: 25

Abb. 2.7: Quenchingeffekte zwischen Chromophor und Oberfläche bei unterschiedlichen Abständen. Seite: 27

Abb. 2.8: Optische Intensität des evaneszenten Feldes (durchgezogene Linie) und Fluoreszenzintensität (gestrichelte Linie) aufgetragen gegen den Abstand des Fluoreszenzfarbstoffes zur Oberfläche. Seite: 27

Abb. 2.9: Schematische Zeichnung des AFM-Messprinzips. Seite: 31

Abb. 2.10: Kraft-Abstands-Diagramm mit Zuordnung der einzelnen, mittels AFM gemessenen Kräfte. Seite: 32

Abb. 2.11: Schema der Adsorption von Silanen an oxidischen Oberflächen, hier beispielhaft an TiO_2 dargestellt. Seite: 34

Abb. 2.12: Unterschiedliche Adsorptionsmechanismen von Silanen auf Oberflächen. Seite: 35

Abb. 2.13: Struktur von Streptavidin mit gebundenem Biotin. Seite: 36

Abb. 2.14: Biotin-Bindungstasche von Streptavidin. Seite: 38

Abb. 2.15: Schematische Darstellung der Fn-vermittelten Bindung zwischen ECM und Zelle. Seite: 39

Abb. 2.16: Schematische Darstellung der Fn-Modultypen. Seite: 41

Abb. 2.17: Konsensussequenz der Fn-Modulsequenz. Seite: 42

Abb. 2.18: Schematische Darstellung der kompakten Struktur von Fn. Seite: 43

Abb. 3.1: SPR-Spektrometer in Kretschmann-Konfiguration, welches in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Seite: 46

- Abb. 3.2:** SPR-Spektrometer in Kretschmann-Konfiguration mit Fluoreszenz-Detektor, welches in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Seite: 50
- Abb. 3.3:** Innova Atomic Force Microscope der Firma Bruker (ehemals Veeco-Instruments), das in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Seite: 51
- Abb. 4.1:** Schematische Darstellung des adsorbierten Streptavidins in Abhängigkeit der Biotinarchitektur auf der Oberfläche. Seite: 56
- Abb. 4.2:** Schema der Biotinylierung der primären Amine eines Proteins (grün) über Sulfo-NHS-LC-Biotin. Seite: 58
- Abb. 4.3:** Prinzip der Biotin-Oberflächenaktivierung der TiO_x -Oberfläche über N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan und Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, welches u. a. in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Seite: 62
- Abb. 4.4:** Prinzip des sequenziellen Aufbaus einer Streptavidin- und bFn-Schicht über Self-Assembly auf einer Biotin-modifizierten TiO_x -Oberfläche. Seite: 62
- Abb. 4.5:** SPR-Kinetikmessungen der Adsorption von Streptavidin auf unterschiedlich mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin modifizierten und zuvor aminoaktivierten TiO_x -Oberflächen. Seite: 65
- Abb. 4.6:** SPR-Kinetikmessungen der Fn-Adsorption auf unterschiedlich modifizierten TiO_x -Oberflächen. Seite: 66
- Abb. 4.7:** SPR-Spektren aufgenommen vor (schwarz) und nach (grau) der Adsorption von Fn bzw. bFn auf verschiedenen Oberflächen. Seite: 67-68
- Abb. 4.8:** Durchschnittliche Zellfläche von Osteoblasten auf unterschiedlich modifizierten Oberflächen. Seite: 71
- Abb. 4.9:** Zunahme der osteoblastären Zellfläche nach Adsorption von nativem Fn auf TiO_x und nach der Adsorption von bFn auf Streptavidin-modifiziertem TiO_x . Deutlich zu erkennen ist eine Verstärkung der Zelladhäsion durch Immobilisierung von bFn gegenüber einer Immobilisierung von nativem Fn. Seite: 73
- Abb. 4.10:** Relative Expression von β_1 -Integrin, Runx2 und alkalische Phosphatase auf Fn- und bFn-beschichteten Oberflächen nach drei und sieben Tagen. Seite: 74
- Abb. 5.1:** Lewis-Struktur von Sulfo-NHS-LC-Biotin und Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin. Beide Biotinderivate unterscheiden sich in der Kettenlänge des Spacers, welcher sich zwischen Biotinkopf und Ankergruppe befindet. Seite: 78
- Abb. 5.2:** Self-Assembly-Gefäß, das für die Inkubation des LaSFN9-Substrats genutzt wurde. Seite: 81
- Abb. 5.3:** Aus 22 Einzelmessungen gemittelte Adsorptionskinetik von N-(6-aminohexyl)-aminopropyl-trimethoxysilan an einer TiO_x -Oberfläche. Seite: 83
- Abb. 5.4:** N-(6-aminohexyl)aminopropyl-trimethoxysilan Schichtdicke aufgetragen gegen die entsprechende TiO_x -Schichtdicke. Seite: 83
- Abb. 5.5:** Gemittelte Streptavidin-Schichtdicke aufgetragen gegen die Inkubationszeit mit Sulfo-NHS-LC-Biotin auf den silanisierten TiO_x -Oberflächen in Ethanol oder destilliertem H_2O . Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Seite: 84

Abb. 5.6: Verteilung der Streptavidin-Schichtdicken, welche via SPR auf Sulfo-NHS-LC-Biotin aktiviertem, silanisiertem TiO_x gemessen wurden. Seite: 86

Abb. 5.7: Gemittelte Streptavidin-Adsorptionskinetik aus 17 einzelnen Adsorptionskinetiken. Seite: 87

Abb. 5.8: Höhenbild der Streptavidin-Monolage auf der Sulfo-NHS-LC-Biotin-aktivierten, silanisierten TiO_x -Oberfläche. Seite: 89

Abb. 5.9: Phasenbild der Streptavidin-Monolage auf der Sulfo-NHS-LC-Biotin-aktivierten, silanisierten TiO_x -Oberfläche. Seite: 90

Abb. 5.10: Streptavidin-Schichtdicke auf der Biotin-modifizierten TiO_x -Oberfläche bei unterschiedlichen Konzentrationen. Seite: 91-92

Abb. 6.1: Unterschiedliche Konformationen von Fn. Seite: 96

Abb. 6.2: Schematische Darstellung des Prinzips zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Proteinen. Seite: 99

Abb. 6.3: Boxplot und Messwerte der Schichtdickenverteilung von biotinyliertem und nichtbiotinyliertem Fn auf unterschiedlich modifizierten TiO_x -Oberflächen. Seite: 103

Abb. 6.4: Einfluss des Biotinüberschusses auf den DOL von bFn. Seite: 104

Abb. 6.5: Aus sieben Einzelmessungen gemittelte Adsorptionskinetik von bFn auf einer Streptavidin-Monolage. Wie sich zeigt, ist die Bildung einer Monolage bereits nach ca. 100 Minuten abgeschlossen. Seite: 106

Abb. 6.6: Schichtdicke von Fn und bFn nach Adsorption auf einer TiO_x -Oberfläche, welche mit dem Streptavidin-Schichtsystem modifiziert wurde. Seite: 107

Abb. 6.7: Adsorption von Lysozym auf unterschiedlichen Oberflächen. Seite: 109

Abb. 6.8: Höhenbild und Phasenbild der aufgesputterten TiO_x -Schicht auf der Si-Wafer-Oberfläche (TiO_x -Oberfläche). Abmessung $1 \mu m \times 1 \mu m$. Seite: 112

Abb. 6.9: Höhenbild und Phasenbild einer TiO_x -Oberfläche, welche 90 Minuten mit nativem Fn inkubiert wurde. Seite: 113

Abb. 6.10: Höhenbild und Phasenbild einer TiO_x -Oberfläche, welche 200 Minuten mit nativem Fn inkubiert wurde. Seite: 114

Abb. 6.11: Höhenbild einer TiO_x -Oberfläche, welche 200 Minuten mit nativem Fn inkubiert wurde. Abmessung $2 \mu m \times 2 \mu m$. Seite: 115

Abb. 6.12: Links: Höhenbild einer TiO_x -Oberfläche. Rechts: Höhenbild einer silanisierten TiO_x -Oberfläche. Abmessung der Abbildungen: $1 \mu m \times 1 \mu m$. Seite: 117

Abb. 6.13: Höhenbild einer Streptavidin-Monolage, aufgebaut auf einer Biotin-aktivierten und silanisierten TiO_x -Oberfläche. Seite: 117

Abb. 6.14: Direkter Vergleich des Höhenbilds von bFn, adsorbiert auf dem Streptavidin-Schichtsystem auf einer TiO_x -Oberfläche und von nativem Fn, welches direkt auf der TiO_x -Oberfläche adsorbiert wurde. Seite: 119

-
- Abb. 6.15:** Höhenbild des bFn-Streptavidin-Schichtsystems auf einer TiO_x -Oberfläche. Seite: 120
- Abb. 6.16:** Kontrollmessung: Sequenzielle Adsorption von Streptavidin und bFn auf einer Biotin-modifizierten, silanisierten TiO_x -Oberfläche. Seite: 121
- Abb. 6.17:** Unterschiedliche Konformationen von Fn und bFn, je nach Oberflächenmodifizierung. Seite: 123
- Abb. 7.1:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines Streptavidin-bFn-Multilayerschichtsystems. Seite: 126
- Abb. 7.2:** Adsorptionskinetik von Atto-633-Streptavidin an eine Biotin-modifizierte TiO_x -Oberfläche. Seite: 130
- Abb. 7.3:** Adsorptionskinetik des Aufbaus eines Multilayersystems, bestehend aus alternierenden Atto-633-Streptavidin und bFn-Schichten. Seite: 131
- Abb. 7.4:** SPFS-Scan der einzelnen Schichten eines alternierenden Atto-633-Streptavidin- und bFn-Multilayerschichtsystems bei zwei unterschiedlichen DOLs. Seite: 132
- Abb. 7.5:** Mittlere Schichtdicke der einzelnen Schichten des alternierenden Atto-633-Streptavidin-bFn-Multilayerschichtsystems bei zwei verschiedenen DOLs. Seite: 133
- Abb. 7.6:** bFn und Fn aufgetragen gegen den Bedeckungsgrad an Streptavidin. Seite: 134
- Abb. 7.7:** Langzeitstabilität der einzelnen Schichten des Multilayersystems bei einem bFn DOL von 9.4. Seite: 137
- Abb. 7.8:** Langzeitstabilität der einzelnen Schichten des Multilayersystems bei einem bFn DOL von 43.6. Seite: 137
- Abb. 7.9:** Vielseitigkeit des Multischichtsystems. Seite: 141

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 3.1:** Dielektrische Konstanten. Seite: 48
- Tabelle 3.2:** Weitere Geräte, welche in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Seite: 53
- Tabelle 4.1:** Für den Aufbau des biomimetischen Schichtsystems eingesetzte Chemikalien. Seite: 59
- Tabelle 4.2:** Für den Aufbau des biomimetischen Schichtsystems eingesetzte Proteine. Seite: 59
- Tabelle 4.3:** Für die Zelladhäsionstests eingesetzte Materialien. Seite: 60

Tabelle 4.4: Parameter, welche für den Aufbau des biomimetischen Schichtsystems bei den folgenden Zelltests genutzt wurden. Seite: 70

Tabelle 5.1: Chemikalien, welche zum Aufbau einer Streptavidin-Monolage auf TiO_x eingesetzt wurden. Seite: 80

Tabelle 5.2: Zum Aufbau einer Monolage auf TiO_x eingesetztes Streptavidin. Seite: 80

Tabelle 5.3: Parameter für den Aufbau einer dichten Streptavidin-Monolage auf TiO_x . Seite: 93

Tabelle 6.1: Chemikalien, welche zum Aufbau der Streptavidin-Monolage auf TiO_x und der Anbindung von bFn eingesetzt wurden. Seite: 100

Tabelle 6.2: Proteine, welche zum Aufbau der Streptavidin-Monolage auf TiO_x und der Anbindung von bFn eingesetzt wurden. Seite: 100

Tabelle 6.3: Einfluss der DOLs auf die bFn-Schichtdicke. Seite: 105

Tabelle 6.4: Maße der markierten bFn-Strukturen aus Abbildung 6.9. Seite: 111

Tabelle 6.5: Parameter für die Anbindung von bFn an eine Streptavidin-Monolage auf TiO_x . Seite: 124

Tabelle 7.1: Stabilität von bFn-Schichten auf der Streptavidin-Monolage. Seite: 127

Tabelle 7.2: Chemikalien, welche zum Aufbau des bFn-Streptavidin-Multilayersystems auf TiO_x eingesetzt wurden. Seite: 128

Tabelle 7.3: Proteine, welche zum Aufbau des bFn-Streptavidin-Multilayersystems auf TiO_x eingesetzt wurden. Seite: 128

Tabelle 7.4: Schichtdicke der einzelnen Komponenten des Multilayersystems, geordnet nach dem jeweiligen DOL von bFn. Seite: 133

Tabelle 7.5: Fluoreszenz der ersten und zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht bei $\text{DOL} = 9.4$. Seite: 135

Tabelle 7.6: Fluoreszenz der ersten und zweiten Atto-633-Streptavidin-Schicht bei $\text{DOL} = 43.6$. Seite: 135

Tabelle 7.7: Parameter für einen erfolgreichen Aufbau eines alternierenden Multilayersystems. Seite: 140

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater danke ich recht herzlich für die Betreuung, den wissenschaftlichen Input (der mich an einigen Stellen entscheidend weitergebracht hat) sowie dafür, dass er es mir ermöglicht hat, in einem so spannenden Bereich zu arbeiten.

Meiner Zweitprüferin danke ich dafür, dass Sie meine Arbeit als zweite Gutachterin beurteilt und für ihre weitere Unterstützung.

Meinem Projektleiter danke ich insbesondere für die sehr gute, langjährige Betreuung vor Ort sowie für sein Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Weiterhin danke ich recht herzlich meiner Freundin und meiner Familie für die Unterstützung während der letzten Jahre.

Für das Korrekturlesen der früheren Versionen meiner Arbeit danke ich insbesondere meinen Arbeitskollegen und Freunden, meiner Freundin und meiner Mutter.

Ebenfalls möchte ich mich recht herzlich bei all den weiteren Projektpartnern, Mitarbeitern und Kollegen für die Unterstützung dieses Projektes durch Material und Knowhow bedanken. Dies gilt insbesondere für die Unterstützung im Bereich der Zellversuche, bei Beschichtungstechniken, bei biochemischen Fragestellungen, für die Einführung in die AFM-Messtechnik sowie für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Zu guter Letzt danke ich dem BMBF für die zur Verfügung gestellten Mittel, welche diese Arbeit letztendlich erst ermöglicht haben.

Ergänzende Messungen

Vergleich der TiO_x -Modelloberfläche mit kommerziellen Titanimplantatmaterial

Zusätzlich zu der Charakterisierung mittels SPR und AFM wurden die TiO_x -Modelloberfläche mittels Kontaktwinkelmessungen analysiert (OCA15, Dataphysics). Hierfür wurden die erzeugten Modelloberflächen auf Si-Wafern und LaSFN9-Gläsern mit kommerziellen TiO_2 -Implantatmaterial verglichen, die freundlicherweise von einem weiteren Projektpartner zur Verfügung gestellt wurde. Die Messung des statischen Kontaktwinkels gibt Auskunft über den hydrophilen Charakter einer Oberfläche und damit über deren Beschaffenheit. Hierzu wird ein Tropfen Wasser an fünf verschiedenen Positionen auf die Oberfläche gegeben. Je hydrophiler diese war, desto höher war deren Benetzung durch den Tropfen und desto kleiner der Kontaktwinkel. Im Allgemeinen spricht man bei Kontaktwinkeln die größer 90° sind, von hydrophoben und bei Kontaktwinkeln, die kleiner als 90° sind, von hydrophilen Oberflächen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.1 dargestellt. Wie sich zeigte, besitzen beide TiO_x -Modelloberflächen nahezu denselben Kontaktwinkel wie kommerzielles TiO_2 -Material, wodurch eine vergleichbare, chemische Zusammensetzung angenommen werden kann. Weiterhin weist die 6 nm Dicke TiO_x -Schicht auf den goldbeschichteten LaSFN9-Substraten praktisch denselben Kontaktwinkel auf, wie die 18 nm Dicke TiO_x -Schicht des Si-Wafers. Hierdurch ist anzunehmen, dass es sich bereits bei der 6 nm dicken TiO_x -Schicht um eine homogene und geschlossene Schicht handelt.

Tabelle A.1: Kontaktwinkel von unmodifizierten und mit TiO_x-Modelloberflächen modifizierten Substraten im Vergleich zu kommerziellen TiO₂-Implantatmaterial.

Substrat	Kontaktwinkel (°)
Si-Wafer	48.7 ± 0.4
LaSFN9-Substrat mit 50 nm Au-Beschichtung	102.3 ± 0.7
TiO _x -Modelloberfläche auf Si-Wafer	85.2 ± 2.6
TiO _x -Modelloberfläche auf goldbeschichtetem LaSFN9-Substrat	85.9 ± 0.8
Kommerzielles TiO ₂ -Material	87.6 ± 1.7

Langzeitinkubation einer Biotin-modifizierten TiO_x-Oberfläche mit Streptavidin

Zur Analyse des Einflusses der Streptavidin-Inkubationszeit auf die Streptavidin-Bedeckung wurde eine Biotin-modifizierte Oberfläche (Analog zur Durchführung in Kapitel 4) 1000 Min. mit Streptavidin inkubiert. Es zeigte sich hierbei keine Steigerung der Schichtdicke gegenüber einer Inkubationszeit von 60 Min. Zwar stieg die Schichtdicke zunächst weiter linear an, allerdings fällt diese nach dem Spülvorgang wieder auf den Wert vor dem linearen Anstieg ab.

Ein ähnliches Verhalten zeigte sich auch bei einer längeren Adsorption von Streptavidin an TiO_x-Oberflächen, die silanisiert und über Sulfo-NHS-LC-Biotin modifiziert wurden. Die Schichtdicke lag nach 120 Min. im Mittel bei 4.1 ± 0.6 nm, was nahe des tatsächlich, für Streptavidin bestimmten Mittelwertes von 3.9 ± 0.6 nm liegt.

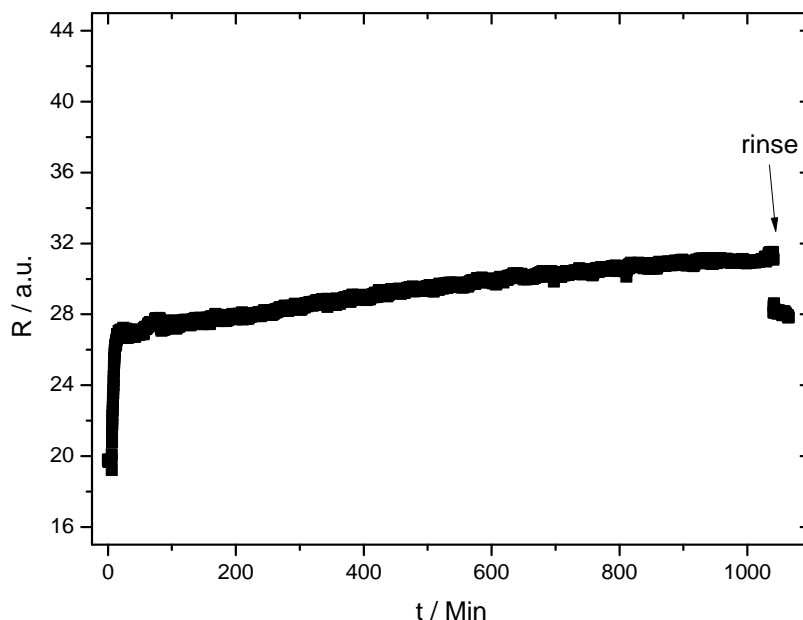


Abb. A.1: SPR-Kinetik der Streptavidinadsorption auf Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin aktiviertem TiO_x . Wie sich zeigt, wirkt sich eine längere Inkubationszeit nicht auf die spezifisch gebundene Menge an Streptavidin aus, da die Schichtdicke nach dem Spülen wieder auf den Wert der Plateauphase zurückfällt. Schichtdicke nach Spülen ca. 2.9 nm.

Verteilung von nativem Fn auf einer TiO_x -Oberfläche

Die drei nachfolgenden AFM-Messungen zeigen die Verteilung von nativem Fn nach einer 90 Min. Inkubation auf einer TiO_x -Oberfläche. Die Durchführung verlief hierbei analog zu Kapitel 6.2. Bei allen drei Abbildungen handelt es sich um denselben Oberflächenbereich, allerdings in drei unterschiedlichen Zoomstufen ($1 \mu\text{m}^2$, $4 \mu\text{m}^2$ und $25 \mu\text{m}^2$). Wie sich hierbei zeigt, verteilt sich natives Fn gleichmäßig über die Oberfläche. Auch bei größeren Bildausschnitten zeigt sich dasselbe Muster von einzelnen Proteinen und Agglomeraten an der Oberfläche, die alle eine vergleichbare Maximalamplitude des Höhenbildes besitzen. (Abb. A.2 – A.4)

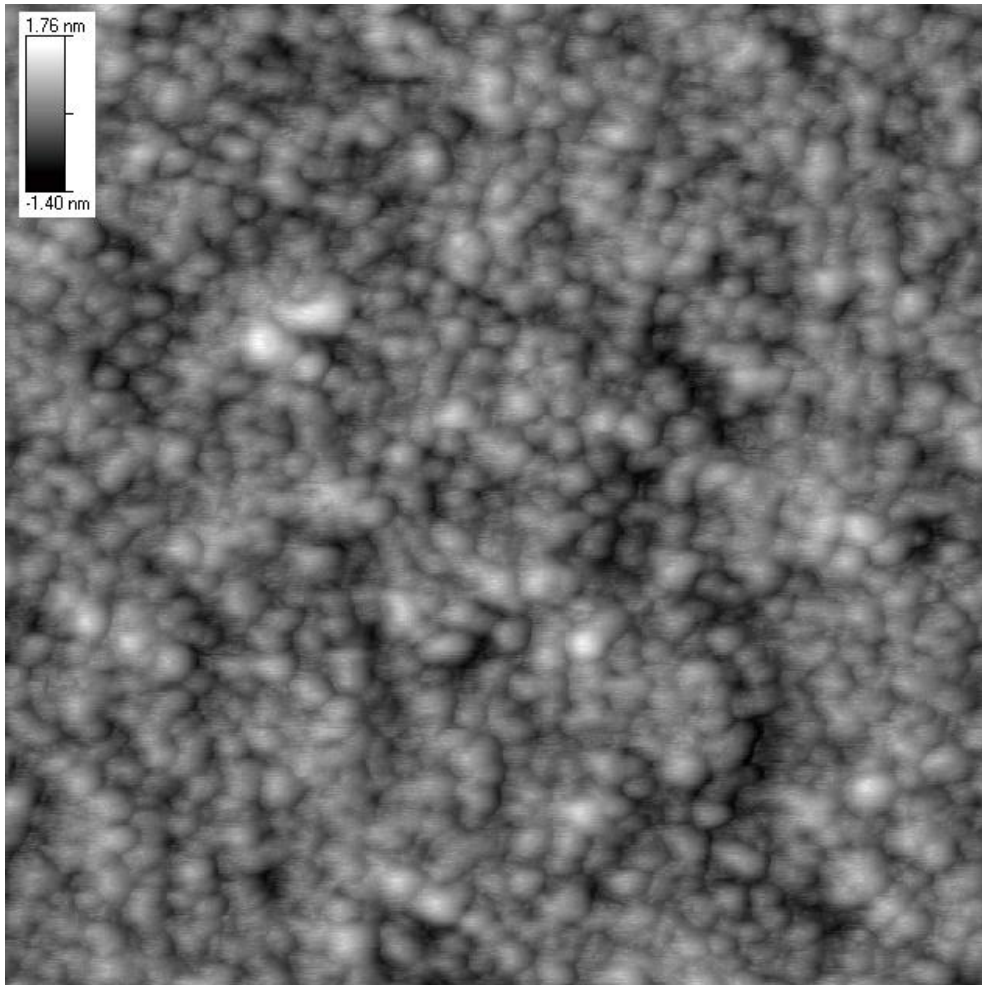


Abb. A.2: Höhenbild einer TiO_x -Oberfläche, die 90 Min. mit Fc inkubiert wurde. Deutlich zu erkennen ist die globuläre Fc-Struktur. Abmessungen: $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$.

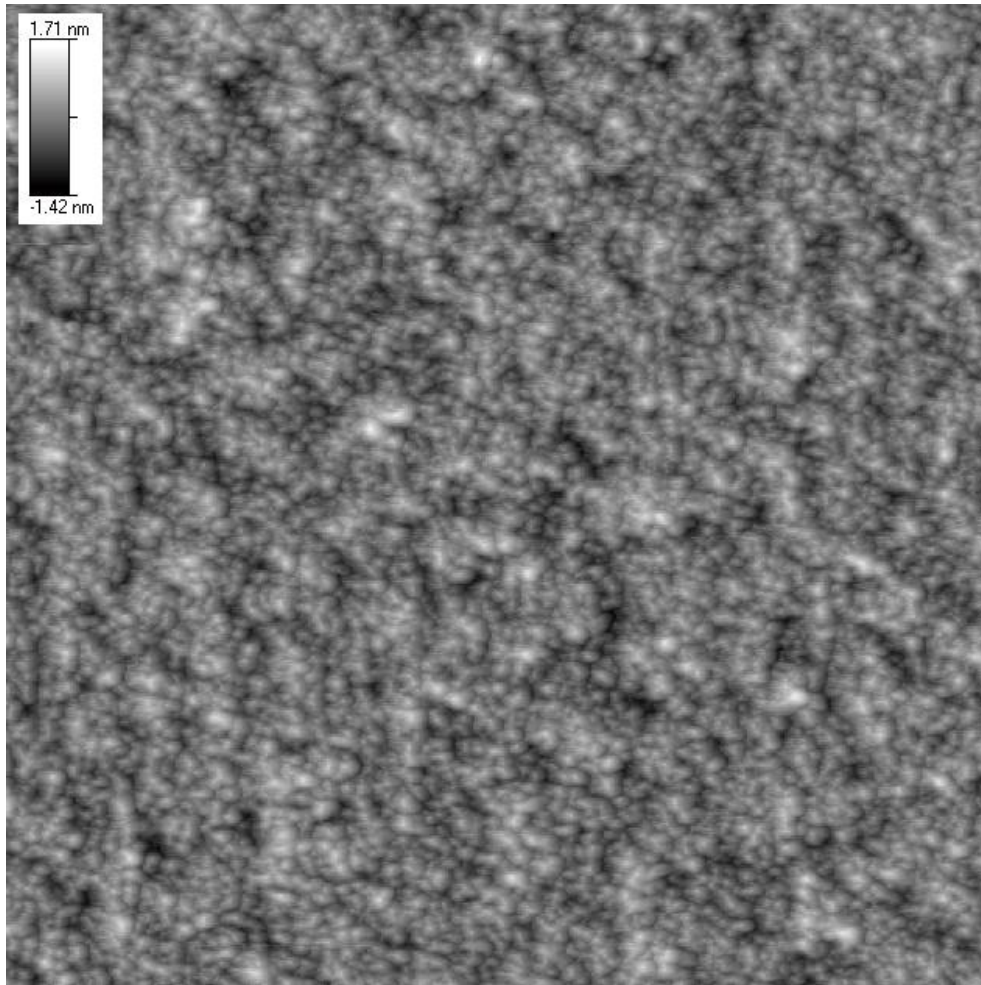


Abb. A.3: Höhenbild einer TiO_x -Oberfläche, die 90 Min. mit Fn inkubiert wurde. Abmessungen: $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$.

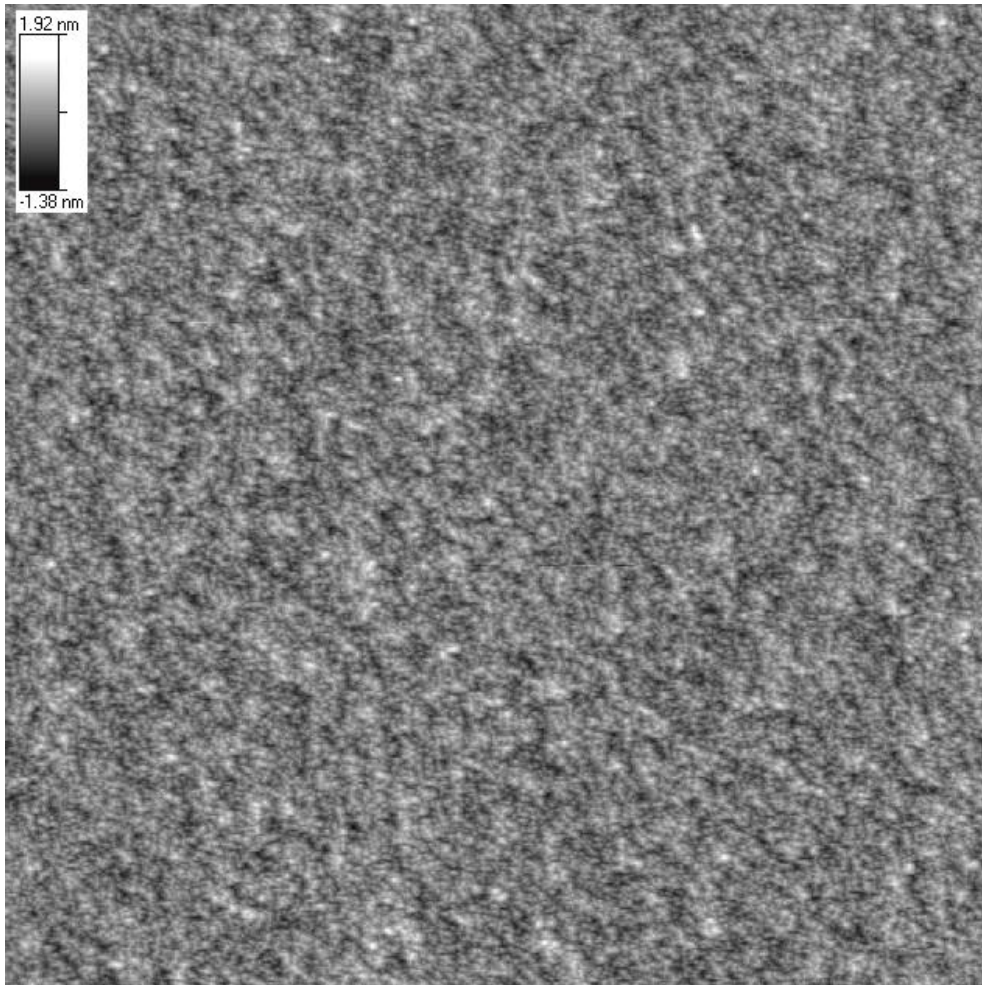


Abb. A.4: Höhenbild einer Titanoberfläche die 90 Min. mit Fc inkubiert wurde. Deutlich zu erkennen ist die gleichmäßige Fc-Verteilung. Abmessungen: $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$.

Lebenslauf

