



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

**Modifikation von Proteinen mittels Photosensibilisatoren für die
strukturierte Proteinimmobilisierung und Quervernetzung von
Biomaterialien**

**Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

**genehmigte Dissertation
von Stefanie Eckes**

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Katja Schmitz

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Harald Kolmar

Darmstadt 2024

Tag der Einreichung: 14. Dezember 2023

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 2024

Eckes, Stefanie: Modifikation von Proteinen mittels Photosensibilisatoren für die strukturierte Proteinimmobilisierung und Quervernetzung von Biomaterialien
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2024
Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2024

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

Für David.



*„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas,
in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“*

Albert Einstein



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Zuerst möchte ich Frau Prof. Dr. Katja Schmitz für die Möglichkeit danken diese Arbeit durchzuführen und an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Besonders möchte ich mich für die andauernde Unterstützung und die Möglichkeit bedanken meine Ergebnisse an Konferenzen vorstellen zu können.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Kolmar für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Bastian Rapp und seiner Arbeitsgruppe für die Möglichkeit einen Teil der Immobilisierungsversuche am KIT durchzuführen sowie für die schöne Zeit am KIT. Tobias Nargang danke ich für die Bereitstellung der verwendeten Oberflächen sowie für die Belichtung am „Gutenberg“.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts „CoLOsAM“ (Projektnummer: 400569699). An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Ulrike Ritz und Prof. Dr. Daniela Nickel für die wissenschaftlichen Diskussionen, die fachliche Unterstützung und für das immer offene Ohr bedanken. Zudem danke ich Prof. Dr. Daniela Nickel für die Möglichkeit, die mechanischen Untersuchungen in Glauchau durchzuführen. Bei Joy Braun möchte ich mich ebenfalls für die gute Kooperation, die schöne Zeit und den Spaß während des Projekts bedanken. Frau Matthes danke ich für die Aufnahmen mittels Durchlichtmikroskopie. Herrn Sedner danke ich für die REM-Aufnahmen und das EDX-Mapping. Bei PD Dr. Tobias Meckel möchte ich mich für die Belichtungen am Konfokalmikroskop bedanken. Dem Arbeitskreis Hausch danke ich für die Möglichkeit, die Geldokumentationsstation benutzen zu dürfen.

Auch möchte ich mich bei all den Praktikanten, Bachelor- und Masterabsolventen bedanken, die durch ihre Arbeit meine unterstützt haben. An dieser Stelle möchte ich vor allem Gianluca Pohl danken.

Daniel Stubba und Dennis Bensingler danke ich für die schönen und lustigen Momente und ihr immer offenes Ohr.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Katja Schmitz für die tolle Zeit. Ein besonderer Dank geht dabei an Victoria Engemann, Michelle Kilb und Julia Wack. Ihr habt meine Zeit als Doktorandin unvergesslich gemacht. Ich danke euch für all die schönen Momente, eure Freundschaft und Unterstützung.

Mein spezieller Dank gilt meinen Eltern Gloria und Eberhard, meinem Bruder David, meinen Freunden und meinem Partner Adrian. Danke für eure liebevolle Unterstützung und unendliche Geduld. Ihr habt immer an mich geglaubt und mir in besonders schwierigen Zeiten Halt gegeben. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.



Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2016 bis Februar 2021 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Frau Prof. Dr. K. Schmitz durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder auf Tagungen vorgestellt:

Publikationen:

M. F. Kilb, Y. Moos, S. Eckes, J. Braun, U. Ritz, D. Nickel, K. Schmitz „An Additively Manufactured Sample Holder to Measure the Controlled Release of Vancomycin from Collagen Laminates“, *Biomedicines* **2021**, 9, 1668

J. Braun, S. Eckes, M. F. Kilb, D. Fischer, C. Eßbach, P. M. Rommens, P. Drees, K. Schmitz, D. Nickel, U. Ritz „Mechanical Characterization of Rose Bengal and Green Light Crosslinked Collagen Scaffolds for Regenerative Medicine“, *Regenerative Biomaterials* **2021**, 8(6), rbab059

Eckes, S., Braun, J., Wack, J. S., Ritz, U., Nickel, D., Schmitz, K. „Rose Bengal Crosslinking to Stabilize Collagen Sheets and Generate Modulated Collagen Laminates“, *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21(19), 7408

Braun, J., Eckes, S., Rommens, P. M., Schmitz, K., Nickel, D., & Ritz, U. (2020). „Toxic Effect of Vancomycin on Viability and Functionality of Different Cells Involved in Tissue Regeneration“, *Antibiotics* **2020**, 9(5), 238

K. Brahm, J. S. Wack, S. Eckes, V. Engemann, K. Schmitz, „Macrocyclization enhances affinity of chemokine-binding peptoids“, *Biopolymers* **2019**, 110.4, e23244

Posterbeiträge:

„Preparation, Characterization and Evaluation of Collagen Sheets for the Delivery of Vancomycin“, 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, Dresden, **2019**

„Light-induced Chemokine Patterning of Surfaces“, 3rd European Chemokine and Cell Migration Conference, Salamanca, Spanien, **2019**



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 Ortsaufgelöste Immobilisierung von Biomolekülen durch Licht	5
2.1.1 Photoreaktive Moleküle für die Immobilisierung von Biomolekülen.....	5
2.1.2 Techniken für die Erzeugung von Proteinmustern auf Oberflächen.....	10
2.2 Die photosensibilisatorvermittelte Proteinimmobilisierung und -modifikation	14
2.2.1 Fluoreszenz, <i>Intersystem Crossing</i> und Phosphoreszenz.....	14
2.2.2 Mechanismus der photosensibilisatorvermittelten Proteinmodifikation.....	16
2.3 Kollagen in der regenerativen Medizin.....	17
2.3.1 Struktur und Eigenschaften von Kollagen.....	17
2.3.2 Anwendungen von Kollagen.....	19
2.3.3 Modifikation von Kollagen für Anwendungen.....	19
3 Zielsetzung	21
4 Material und Methoden	23
4.1 Allgemeine Materialien und Chemikalien.....	23
4.1.1 Häufig verwendete Puffer.....	23
4.2 Geräte und Software.....	24
4.3 Proteinbiochemische Methoden	25
4.3.1 Proteinexpression und Zellyse	25
4.3.2 Proteinreinigung	26
4.4 Proteinanalytik	26
4.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	26
4.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
4.4.3 Western Blot	28
4.5 Proteinkonjugation - Selektive Markierung von IL-8-S72C über das C-terminale Cystein.....	30
4.6 Photoinduzierte Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen.....	30
4.6.1 Vorbereitung und Beschichtung der Oberflächen.....	30
4.6.2 Photoimmobilisierung von Biomolekülen	32
4.6.3 Fluoreszenzfärbung immobilisierter Biomoleküle	35
4.6.4 Detektion	36

4.6.5	Quantitative Analyse der Aufnahmen	37
4.7	Charakterisierung und Modifikation von Kollagen.....	38
4.7.1	Verwendete Kollagensheets	38
4.7.2	Ermittlung des Quellgrads.....	38
4.7.3	Beladung von Kollagen.....	38
4.7.4	Quervernetzung von Kollagen	39
4.7.5	Durchlichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie	39
4.7.6	Dickenmessung	39
4.7.7	Analyse der Vancomycin-Freisetzung aus Kollagen	40
5	Ergebnisse und Diskussion.....	41
5.1	Proteinadsorption durch Photobleichen zur Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen	41
5.1.1	Immobilisierung über Benzophenon	41
5.1.2	Immobilisierung über Fluorescein	43
5.1.3	Immobilisierung über Photosensibilisatoren mit höherer Triplett-Quantenausbeute	50
5.1.4	Immobilisierung mittels CLSM.....	56
5.2	Charakterisierung von quervernetztem Kollagen	61
5.2.1	Übersicht über die verwendeten Kollagensheets	61
5.2.2	Charakterisierung von Quellverhalten, Mikrostruktur, Dicke und Stabilität	62
5.2.2.1	Kollagensheets „wie erhalten“	62
5.2.2.2	Modifikation von Kollagensheets mittels RGX.....	65
5.2.2.3	Charakterisierung von Quellverhalten, Mikrostruktur, Dicke und Stabilität – Diskussion.....	75
5.2.3	Freisetzung von Vancomycin	78
5.2.4	Lamine	84
6	Fazit und Ausblick.....	89
6.1	Proteinadsorption durch Photobleichen zur Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen	89
6.2	Charakterisierung von quervernetztem Kollagen	91
	Literaturverzeichnis.....	I
7	Anhang.....	XV
	Erklärungen.....	XVII

Abkürzungsverzeichnis

μ CP	<i>microcontact printing</i>
μ FN	<i>microfluidic network</i> , mikrofluidisches Netzwerk
anti-IL-8-FITC	FITC-konjugierter anti-humaner Interleukin-8 Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
Äq.	Äquivalente
BSA	Rinderserumalbumin
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> , konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CM	(Cumarin-4-yl)methyl
CV	<i>column volume</i> , Säulenvolumen
CXL	<i>corneal crosslinking</i>
D	Donor
DCM	Dichlormethan
DHT	<i>dehydrothermal treatment</i> , dehydrothermale Behandlung
DMD	<i>digital mirror device</i> , Mikrospiegelarray
DMF	Dimethylformamid
DPN	<i>dip-pen nanolithography</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence reaction</i>
EDC	Ethyl-3(3-dimethylamino)propylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EO	Eosin Y
ER	Erythrosin B
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IC	<i>internal conversion</i> , innere Umwandlung
IL-8/CXCL8	Interleukin-8
IL-8-S72C/ CXCL8-S72C	Interleukin-8-Mutante, mit Cystein an Stelle 72
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ISC	<i>intersystem crossing</i>
LAPAP	<i>laser-assisted protein adsorption by photobleaching</i>
LB	<i>lysogeny broth</i> , Nährmedium für Bakterien
LCD	<i>liquid crystal display</i> , Flüssigkristallbildschirm

LED	<i>light-emitting diode</i> , Leuchtdiode
MACS	Methacrylsäure-3-(dimethylchlorsilyl)-propylester
NB	o-Nitrobenzyl
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	<i>protein adsorption by photobleaching</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDT	Photodynamische Therapie
PhS	Photosensibilisator
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPG	<i>photolabile protecting group</i> , photolabile Schutzgruppe
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB	Bengalrosa
RFU	<i>relative fluorescence unit</i> , relative Fluoreszenzeinheit
RGX	<i>rose bengal and green light crosslinking</i>
RT	Raumtemperatur
S	Singulett-Grundzustand
S*	angeregter Singulett-Zustand
S/HG	Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
T*	Triplett-Zustand
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
VR	vibronische Relaxation

Physikalische Größen

A	Absorption
c	Konzentration
d	Durchmesser
E	Energie
ε	Extinktionskoeffizient
I	Intensität
k	Geschwindigkeitskonstante
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Exzitationswellenlänge
m	Masse
Φ_{Fl}	Fluoreszenzquantenausbeute
Φ_{ISC}	Triplet-Quantenausbeute
ρ	Dichte
t	Zeit



1 Zusammenfassung

Photosensibilisatoren ermöglichen die Modifikation von Proteinen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht. So können Proteine quervernetzt oder gezielt in einem belichteten Bereich immobilisiert werden. Beides ist von Bedeutung für die biomedizinische Forschung, etwa im Bereich der Wirkstofffreisetzung aus quervernetzten Proteinmatrices, zur Herstellung diagnostischer Assays oder zur Untersuchung des Zellverhaltens auf strukturierten Oberflächen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteine mittels *proteinadsorption by photobleaching* (PAP) oder durch *rose bengal and green light crosslinking* (RGX) auf Oberflächen immobilisiert oder quervernetzt. In beiden Methoden kommen Photosensibilisatoren zum Einsatz, die durch sichtbares Licht angeregt werden und im Triplet-Zustand mit der Umgebung reagieren können. Während bei PAP der Photosensibilisator, meist Fluorescein, am Protein konjugiert vorliegt, wird bei RGX der Photosensibilisator Bengalrosa zum Protein hinzugegeben.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Photoimmobilisierung mittels PAP untersucht, bei der die Belichtung oftmals mit einem Laser oder Mikrospiegelarray (*digital mirror device*, DMD) realisiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einsatz einer Power-LED als lichtstarke kostengünstige Variante für die PAP-Methode untersucht werden und der Belichtung mittels Konfokalmikroskop und DMD gegenübergestellt werden. Hierbei wurde untersucht, ob der Photosensibilisator nicht nur am Protein konjugiert, sondern ebenfalls frei in Lösung oder an der Oberfläche adsorbiert eingesetzt werden kann. Zudem wurden Photosensibilisatoren unterschiedlicher Triplet-Quantenausbeute verwendet und die Effizienz der Proteinimmobilisierung verglichen. Für die Immobilisierungen wurden Biotin und das Modellchemokin IL-8 genutzt. Chemokine sind kleine Signalproteine, die die Migration von Zellen bei Entzündungsreaktionen und in der Homöostase des Immunsystems induzieren und lenken. Durch die Präsentation von Chemokinen auf Oberflächen in Form von gebundenen Gradienten, lässt sich die Migration von Zellen (Haptotaxis) untersuchen. Die Immobilisierung von IL-8 mit der PAP-Methode wurde außerdem mit der konventionellen Photoimmobilisierung über Benzophenon, das mit UV-Licht angeregt wird, verglichen.

Bei den Immobilisierungsversuchen von IL-8 mittels Benzophenon auf Polystyrol- bzw. auf mit PMMA beschichteten Polystyrol-Oberflächen konnten keine ausreichend hohen Verhältnisse in der Fluoreszenzintensität zwischen dem belichteten und unbelichteten Bereich (Signal-zu-Hintergrund (S/HG)-Verhältnis) erzeugt werden. Im Gegensatz dazu verlief die Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein auf mit BSA beschichteten Glasobjektträgern mittels Power-LED erfolgreich. Anhand dieses Modellsystems wurden sowohl Konzentration als auch Belichtungszeit optimiert und anschließend auf die Immobilisierung von mit Fluorescein konjugiertem IL-8, IL-8-S72C-Fluorescein, übertragen. Hierbei waren allerdings belichtete Bereiche kaum von nicht belichteten Bereichen zu unterscheiden. Es wurde vermutet, dass IL-8 eine unspezifische Wechselwirkung mit der BSA-beschichteten Oberfläche einging.

Die Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein bzw. IL-8 mit freiem Fluorescein mittels DMD war auf NH₂- und Methacrylsäure-3-(dimethyl-chlorsilyl)-propylester (MACS)-funktionalisierten Glasobjektträgern erfolgreich. Das größte in dieser Arbeit erhaltene S/HG-Verhältnis wurde dabei auf MACS-funktionalisierten Oberflächen erhalten, mit denen IL-8-S72C-

Fluorescein nachweislich nicht unspezifisch wechselwirkte. Mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) konnte eine Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf BSA-Glasobjektträgern im roten Kanal nicht nachgewiesen werden. Im grünen Kanal wurden invertierte Muster erhalten. Vermutlich wurde das Protein durch zu lange bzw. zu intensive Belichtung oxidativ geschädigt. Im Gegensatz dazu, konnte IL-8 wt mit freiem Fluorescein nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass der oxidative Schaden geringer war, da Fluorescein nicht direkt an IL-8 gebunden vorlag.

Da Fluorescein eine geringe Triplet-Quantenausbeute besitzt, wurde die Immobilisierung von Biotin und IL-8 mit den Photosensibilisatoren Eosin Y, Erythrosin B und Bengalrosa untersucht, die eine höhere Triplet-Quantenausbeute besitzen, und damit effektiver mit der Umgebung reagieren sollten. Die besten Ergebnisse wurden dabei unter Nutzung von mit Bengalrosa und Rattenschwanzkollagen bzw. Gelatine beschichteten Glasobjektträgern erzielt. Unter Verwendung eines Konfokalmikroskops konnten die Ergebnisse der Immobilisierung von IL-8 wt auf mit Rattenschwanzkollagen und Bengalrosa beschichteten Glasobjektträgern weiter verbessert werden. In nachfolgenden Arbeiten wurde die Immobilisierung von IL-8 mittels Bengalrosa auf Kollagen in Mikrofluidikkanälen untersucht.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die Art bzw. Intensität der Strahlungsquelle bei der Immobilisierung von Biomolekülen eine entscheidende Rolle spielt. Die Belichtungen mittels DMD und CLSM führten zu größeren S/HG-Verhältnissen als die Belichtungen über Power-LED mit Lochmasken.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Quervernetzung von Proteinen mittels RGX, was für unterschiedliche klinische Anwendungen beispielweise in der Augenheilkunde oder Orthopädie genutzt wird. RGX kann die mechanische Stabilität von Kollagenhydrogelen erhöhen, die dann beispielsweise zur kontrollierten lokalen Wirkstofffreisetzung genutzt werden können. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden daher zunächst drei verschiedene Kollagensheets (Collagen Solutions, Viscofan, Atelocollagen) unterschiedlicher Dicken und Dichten charakterisiert und die Wirkung von RGX auf Eigenschaften wie Mikrostruktur, Quellgrad, mechanische Stabilität und Freisetzung des Antibiotikums Vancomycin untersucht. Zur Beurteilung der mechanischen Stabilität wurde die Dicke unter Krafteinfluss mit Hilfe eines Höhenmessgeräts gemessen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob mittels RGX einzelne Schichten aus Kollagen stabil miteinander verbunden werden können. Damit sollte die Grundlage für Kollagenbiomaterialien mit maßgeschneiderten Eigenschaften, wie z.B. einer kontrollierten Freisetzung von Antibiotikum zur Vorbeugung von Entzündungen, geschaffen werden.

Während es sich bei Collagen Solutions um eine dünne, flexible Kollagenfolie handelt, deren Mikrostruktur keine erkennbare Faserstruktur zeigte, besteht Viscofan aus einer sehr kompakten Struktur mit langen Fasern, die mittels mikroskopischer Analyse sichtbar waren. Atelocollagen wiederum ist ein schwammartiges unvernetztes und nach Quellung labiles Material, dessen große Poren unter dem Durchlicht- und Rasterelektronenmikroskop erkennbar waren.

Die Behandlung mittels RGX hatte im Fall von Collagen Solutions lediglich einen Einfluss auf die Dicke, die bei 37 °C bei modifizierten Proben geringer war als bei unmodifizierten Proben. Im Fall von Viscofan wurden durch RGX mit 0,1 % RB und 10 min Belichtungszeit ein geringerer

Quellgrad und eine geringere Dicke erhalten. Die größte Veränderung der Eigenschaften durch RGX wurde für das offene, schwammartige Atelocollagen gemessen. Bei Konzentrationen von Bengalrosa von 0,01 % bzw. 0,1 % wurde der Quellgrad im Vergleich zu unmodifizierten Proben bei 37 °C um ca. 20 % bzw. ca. 40 % reduziert. Die unter Kraftereinwirkung gemessene Dicke war bei 37 °C für 0,01 % RB und 0,1 % RB im Durchschnitt 7-mal größer als die der unmodifizierten Proben. Bei Raumtemperatur betrug die Dicken des modifizierten Atelocollagens das 27-fache der unmodifizierten Variante. Diese Ergebnisse deuteten auf eine deutliche Steigerung der mechanischen Festigkeit hin. Die Mikrostrukturanalyse ergab, dass die schwammartige Struktur nach Behandlung mittels RGX durch eine faserige Struktur ersetzt wurde. Der anfängliche Burst-Effekt während der Vancomycin-Freisetzung wurde durch die Vernetzung jedoch nicht beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zudem unterschiedliche Kollagensheets mittels RGX zu Kollagenlaminaten zu verbinden. Die mechanische Charakterisierung zeigte, dass die Dicke der Lamine, bestehend aus Atelocollagen und Collagen Solutions, größer war als die Summe der Dicken der betreffenden unmodifizierten Proben. Die mechanische Stabilität von Atelocollagen konnte entsprechend durch den Verbund mit Collagen Solutions erhöht werden. Die in dieser Arbeit optimierten Parameter zur Laminatherstellung konnten bereits in Folgearbeiten angewendet und für die systematische Untersuchung der Vancomycin-Freisetzung aus Kollagenlaminaten genutzt werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass im Handel erhältliche Kollagensheets mittels RGX vernetzt werden können, um ihre Eigenschaften anzupassen. Die größte Wirkung zeigte sich beim unvernetzten, schwammartigen Atelocollagen, das durch RGX stabilisiert wurde, was in einem reduzierten Quellungsgrad und einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischem Druck resultierte. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass RGX zur Herstellung von Kollagenlaminaten verwendet werden kann, um Materialien mit kombinierten Eigenschaften zu schaffen. Dies macht die Modifikation und Kombination leicht verfügbarer Kollagensheets mittels RGX zu einem attraktiven Ansatz für die klinische Anwendung.



2 Einleitung

Mit Hilfe von Photosensibilisatoren können Proteine durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht gezielt im belichteten Bereich immobilisiert oder quervernetzt werden. Diese Prozesse sind in der biomedizinischen Forschung, wie beispielsweise im Bereich der Wirkstofffreisetzung aus Biomaterialien, zur Herstellung diagnostischer Assays und für die Analyse des Zellverhaltens auf strukturierten Oberflächen von Bedeutung.

In folgenden Kapiteln werden unterschiedliche photoreaktive Moleküle, Techniken für die Photoimmobilisierung sowie der Mechanismus der photosensibilisatorvermittelten Proteinmodifikation beschrieben. Letztere findet nicht nur bei der Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen, sondern auch bei der Quervernetzung von Proteinen untereinander Anwendung. Ein Beispiel hierfür stellt die Quervernetzung des am häufigsten in der regenerativen Medizin genutzten Biomaterials Kollagen dar. Die Modifikation von Kollagen hat Vorteile im Hinblick auf die mechanische Stabilität und Wirkstofffreisetzung und wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.1 Ortsaufgelöste Immobilisierung von Biomolekülen durch Licht

In den letzten Jahren wurden für die ortsaufgelöste Immobilisierung von Proteinen viele Techniken entwickelt, die eine oder mehrere der folgenden drei grundlegenden Strategien zur Immobilisierung beinhalten: adsorptiv, kovalent oder mittels Bioaffinität. Eine beliebte Technik stellt dabei die photoinduzierte Immobilisierung dar. Sie bietet neben der hohen örtlichen Auflösung zudem den Vorteil, dass sie auch unter milden Bedingungen durchgeführt werden kann. Zudem lässt sich die Menge an immobilisiertem Biomolekül durch die Belichtungsdauer oder Strahlungsintensität steuern. Für die photoinduzierte Immobilisierung werden vor allem auf Oberflächen verankerte photolabile Schutzgruppen, photoreaktive Moleküle oder Photosensibilisatoren verwendet. Während photolabile Schutzgruppen durch Licht abgespalten werden und somit eine reaktive Gruppe zur anschließenden Immobilisierung freigegeben wird, können Biomoleküle durch die Nutzung von photoreaktiven Crosslinkern oder Photosensibilisatoren direkt kovalent immobilisiert werden. Die bekanntesten photochemischen Reaktionen sowie Techniken für die strukturierte Photoimmobilisierung werden im Folgenden erläutert.

2.1.1 Photoreaktive Moleküle für die Immobilisierung von Biomolekülen

Photolabile Schutzgruppen

Photolabile Schutzgruppen (*photolabile protecting groups*, PPGs) stellen ein weit verbreitetes Werkzeug in der Biologie, organischen Synthese, Photolithographie und Biochemie dar.^[1-4] Biomoleküle und reaktive Moleküle können durch die kovalente Modifikation mit PPGs chemisch oder biofunktionell inert gemacht werden.^[5] Durch die Bestrahlung mit Licht können die PPGs anschließend abgespalten werden und geben dadurch biologisch aktive Moleküle oder reaktive funktionelle Gruppen wie Alkohole, Säuren oder Amine frei, die wiederum für weitere

Modifikationen genutzt werden können.^[6-7] Ein großer Vorteil der photochemischen Abspaltung besteht darin, dass sie ohne Zusatz von Reagenzien in physiologisch neutralem Milieu sowie unter räumlicher und zeitlicher Kontrolle erfolgen kann.^[6, 8] In biologischen Systemen eingesetzte PPGs werden als *caging*-Gruppe und die geschützten Biomoleküle als *caged*-Verbindungen bezeichnet.^[5, 9-10]

Idealerweise besitzen PPGs eine starke Absorption bei Wellenlängen über 300 nm, um eine Absorption durch die geschützten (Bio)Moleküle und deren Schädigung zu verhindern. Zudem sollte die Abspaltung mit einer hohen Effizienz erfolgen und die Spaltprodukte keine Reaktivität aufweisen.^[5, 7, 11] Die am häufigsten in der Literatur beschriebenen photolabilen Schutzgruppen sind die *o*-Nitrobenzyl-Gruppe (NB) und ihre Derivate gefolgt von Schutzgruppen auf Basis des (Cumarin-4-yl)methyl (CM).^[5, 12] In Abbildung 2.1 werden NB, CM und weitere häufig verwendete photolabile Schutzgruppen dargestellt.

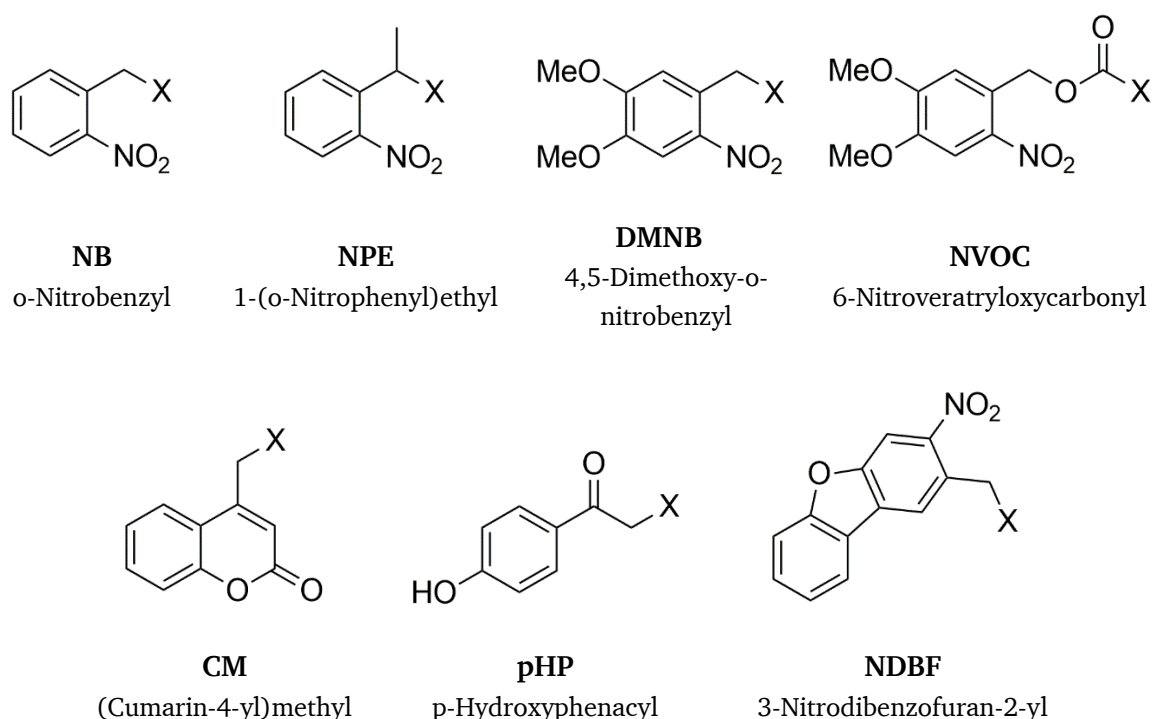
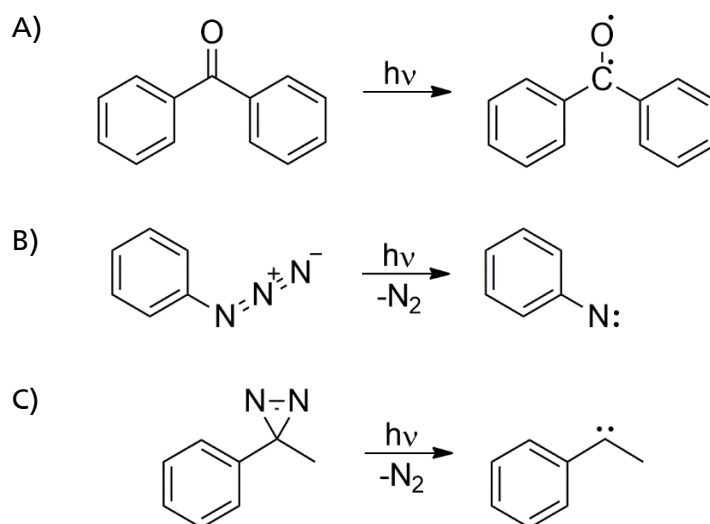


Abbildung 2.1: Häufig verwendete photolabile Schutzgruppen. Die geschützte Gruppe ist mit X gekennzeichnet.

Werden PPGs auf Oberflächen verankert, so können diese nach Abspaltung der PPGs mit anderen (Bio)Molekülen funktionalisiert werden.^[4, 7, 13] Im Jahre 1991 wurden *caged*-Verbindungen erstmals für die Oberflächenmodifikation mit Oligonukleotiden verwendet.^[14] Seitdem wurden (Bio)Moleküle in weiteren Anwendungen z.B. unter Verwendung von *caged* Biotin^[15], eines mit PPGs modifizierten His_n-Tags^[16] oder unter Kombination von PPGs und Click-Chemie^[17] auf Oberflächen immobilisiert. Um mehrere Funktionalitäten kontrollieren zu können, werden zudem orthogonale PPGs eingesetzt, die sich beispielsweise in ihren Absorptionsmaxima oder Quantenausbeuten unterscheiden.^[18]

Photoreaktive Crosslinker

Photoreaktive Crosslinker sind Moleküle mit einer oder mehreren funktionalen Gruppen, die durch Bestrahlung mit UV-Licht aktiviert werden können. Durch die Belichtung werden kurzlebige, hochreaktive Intermediate gebildet, die mit (Bio)Molekülen unter Bildung einer kovalenten Bindung reagieren können.^[19-20] Neben der zuvor genannten räumlichen und zeitlichen Kontrolle der photochemischen Reaktion, bieten photoreaktive Crosslinker im Vergleich zu PPGs den zusätzlichen Vorteil, dass sie direkt mit dem Zielmolekül reagieren.^[21] Häufig genutzte photoreaktive Crosslinker sind Arylazid^[22], Diazirin^[23-24] und Benzophenon^[25]. Arylazide bilden unter UV-Bestrahlung Nitrene, die in C-H, C-C, C=C, N-H, O-H oder S-H Bindungen insertieren können oder unter Ringerweiterung Dehydroazepine bilden, die mit Nucleophilen reagieren.^[19-20, 26] Die UV-Bestrahlung von Diazirinen führt zu hochreaktiven Carbenen, die in C-H, C-C, C=C, N-H, O-H oder S-H Bindungen insertieren können.^[19-20, 27] Benzophenone bilden durch Bestrahlung mit UV-Licht ein hochreaktives Diradikal an der Carbonylgruppe, das in C-H Bindungen insertieren kann. Ein Vorteil von Benzophenonen ist, dass sie nach Desaktivierung ohne Bildung einer Bindung erneut aktiviert werden können. Diese Eigenschaft führt zu einer höheren Crosslinking-Effizienz.^[19-20, 28] Bereits vor 30 Jahren wurden mit Hilfe von Diazirinen, Benzophenonen und Arylaziden unter anderem Peptide, Antikörper und Enzyme auf Glas-, Titanoxid- und Polymeroberflächen immobilisiert.^[29-34] Photoreaktive Crosslinker werden häufig für die Herstellung von Microarrays und Biosensoren genutzt. Um eine gerichtete Immobilisierung von Biomolekülen gewährleisten zu können, werden zusätzlich zu photoreaktiven Crosslinkern Interaktionen mit His-Tags^[35] oder Boronsäure^[36] ausgenutzt. Die photochemische Aktivierung von Arylazid, Diazirin und Benzophenon wird in Schema 2.1 dargestellt.



Schema 2.1: Photoaktivierbare Gruppen. A) Benzophenon. Bildung eines Diradikals durch UV-Bestrahlung. B) Arylazid. Bildung eines Nitrens durch UV-Bestrahlung. C) Diazirin. Bildung eines Carbens durch UV-Bestrahlung.

Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren sind Moleküle, die durch Absorption von sichtbarem oder UV-Licht aktiviert werden. Sie werden dabei zunächst in den angeregten Singulett-Zustand angehoben, gefolgt von einem Übergang in den langlebigeren angeregten Triplett-Zustand.^[37-38] In diesem Zustand können sie in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen Singulett Sauerstoff generieren oder durch Elektronentransfer ein Radikalanion ausbilden, welches wiederum in Anwesenheit von Sauerstoff ein Hyperoxid-Anion bilden kann.^[39] Eine genauere Beschreibung des Reaktionsmechanismus erfolgt in Kapitel 2.2.2.

Aufgrund der Eigenschaft reaktive Sauerstoffspezies bilden zu können, werden Photosensibilisatoren in der photodynamischen Therapie (PDT) zur Behandlung von bestimmten Krebserkrankungen, Makula-Degeneration, Psoriasis, Akne und anderen Erkrankungen eingesetzt.^[37, 39-40] Ein idealer Photosensibilisator sollte eine starke Absorption des Anregungslichts und eine hohe Triplett-Quantenausbeute aufweisen.^[41] Für die Anwendung in der PDT sollte er darüber hinaus nicht toxisch sein, sondern erst nach Aktivierung durch Bestrahlung toxisch wirken.^[42]

Häufig genutzte Photosensibilisatoren sind:

1. Tetrapyrrole: Porphyrine und Derivate, z.B. Chlorophyll, Phylloerythrin, Phthalocyanine.^[42]

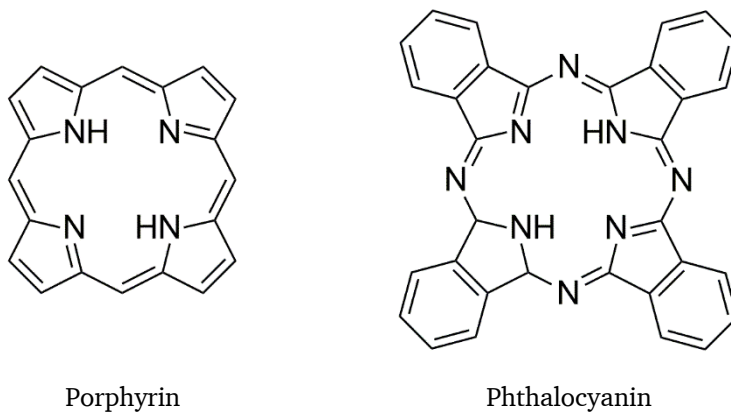


Abbildung 2.2: Darstellung von Porphyrin und Phthalocyanin als Beispiel für Tetrapyrrole.

2. Furocumarine: Psoralen und seine Methoxy-Derivate wie Xanthotoxin und Bergapten.^[42]

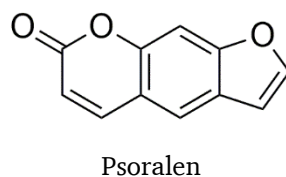
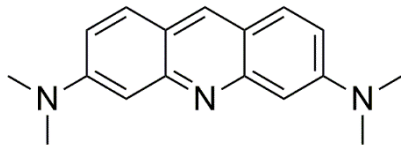
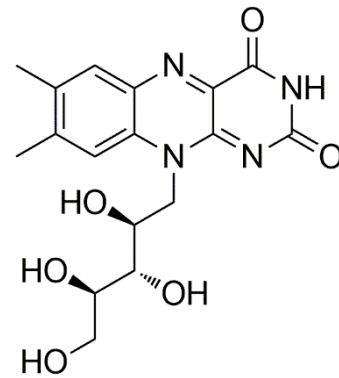


Abbildung 2.3: Struktur von Psoralen als Beispiel für ein Furocumarin.

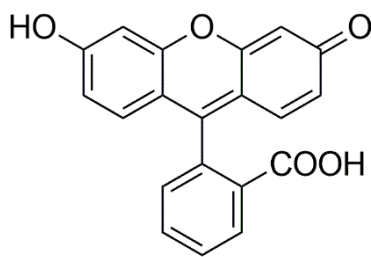
3. Tricyclische Farbstoffe: Acridine (Acridinorange, Proflavin) Riboflavin, Methylenblau, Xanthene (Fluorescein, Eosin, Erythrosin und Bengalrosa).^[42]



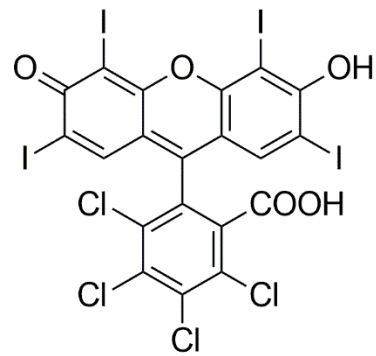
Acridinorange



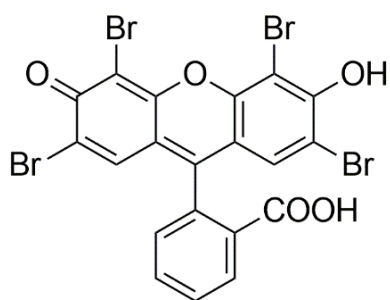
Riboflavin



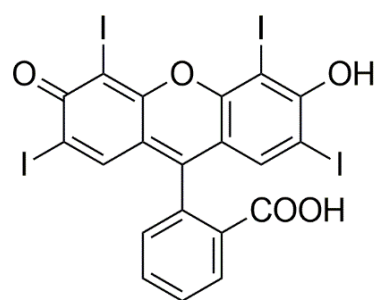
Fluorescein



Bengalrosa



Eosin Y



Erythrosin B

Abbildung 2.4: Struktur von Acridinorange, Riboflavin, Fluorescein, Bengalrosa, Eosin Y und Erythrosin B als Beispiele für tricyclische Farbstoffe.

Dadurch, dass Photosensibilisatoren bei der Anregung durch Licht in den langlebigen Triplett-Zustand übergehen und entsprechend lange mit ihrer Umgebung interagieren können, werden sie neben der PDT auch für die photochemische Immobilisierung und photochemische Quervernetzung von Biomolekülen verwendet. So können beispielsweise mit Hilfe der photochemischen Methode *protein adsorption by photobleaching* (PAP) Biomoleküle unter Nutzung von weniger schädlichem, langwelligerem Licht auf Oberflächen immobilisiert werden.^[43-44] Anstelle einer photolabilen Schutzgruppe oder eines photoreaktiven Crosslinkers, wird für die Immobilisierung ein Fluorophor, meist Fluorescein, als Photosensibilisator verwendet. Holden und Cremer bestrahlten fluoreszenzmarkiertes Biotin mit blauem Licht, sodass dieses durch Photobleichen kovalent an eine mit Rinderserumalbumin (BSA) beschichtete Oberfläche gebunden wurde.^[44] Mit Hilfe dieser Methode konnten ebenfalls Muster aus verschiedenen Proteinen hergestellt werden.^[44-45]

Für die photochemische Quervernetzung werden häufig Riboflavin und Bengalrosa (RB) verwendet.^[46-47] Die photochemische Quervernetzung kann in klinischen Anwendungen zur biomechanischen Versteifung, photochemischen Gewebepassivierung sowie zum Wundverschluss und *Tissue Engineering* genutzt werden.^[39] So konnten beispielsweise mittels sogenanntem *corneal crosslinking* (CXL) oder *rose bengal and green light crosslinking* (RGX) unter anderem Hornhautschäden repariert^[48], die Hornhaut versteift^[47, 49] und Kollagen modifiziert werden. Vorteile von Bengalrosa gegenüber Riboflavin zur photochemischen Quervernetzung liegen in der Verwendung von sichtbarem Licht gegenüber potenziell schädlichem UV-Licht^[50], sowie der nicht vorhandenen Phototoxizität von Bengalrosa innerhalb dieser Anwendungen^[49, 51].

2.1.2 Techniken für die Erzeugung von Proteinmustern auf Oberflächen

Für die Erzeugung von Proteinmustern stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Techniken zur Verfügung, die sich in Auflösung, Durchsatz, Kontrast, Bioaktivität und Haltbarkeit unterscheiden. Die Auswahl der Technik richtet sich dabei vor allem nach der Zielanwendung des immobilisierten Moleküls.^[52]

Eine genutzte Methode ist die sogenannte *dip-pen nanolithography* (DPN). DPN ist eine direkte Schreibmethode, bei der die Spitze eines Rasterkraftmikroskops verwendet wird, um chemische oder biologische Moleküle, die als „Tinten“ bezeichnet werden, über einen Lösungsmittelmiskus auf eine Oberfläche zu bringen.^[53-54] Die Auflösungsgrenze von DPN liegt in der Größenordnung von mehreren zehn Nanometern.^[52] Andere verwendete Techniken sind *microcontact printing* (μ CP), mikrofluidische Netzwerke (*microfluidic networks*, μ FN) und Hydrogele. Hierbei handelt es sich um Replikationstechniken, die Gebrauch von Stempeln machen. Bei μ CP werden aus Metall-Templaten Polymerstempel, meist aus Polydimethylsiloxan (PDMS), erstellt, die mit einer Proteinlösung bedeckt werden und dem Transfer von Proteinen auf eine Oberfläche dienen.^[55] Auf diese Weise können komplexe Muster mit einer Auflösung von mehreren hundert Nanometern erhalten werden.^[56] Eine Alternative zu μ CP bieten mikrofluidische Netzwerke. Sie erreichen eine Auflösung von etwa 1 μ m und werden besonders für die Erstellung von Konzentrationsgradienten verwendet.^[57]

In einer Methode nach Mayer *et al.*^[58] wird eine Protein-Lösung zu einem flachen Agarose-Stempel gegeben, sodass die Lösung von der Agarose absorbiert wird. Durch Zugabe von Wasser auf den Stempel wird durch Diffusion ein kontinuierlicher Gradient ausgebildet, der anschließend auf einen Aldehyd-funktionalisierten Objektträger gestempelt werden kann, auf dem das Biomolekül durch Reaktion mit dem Aldehyd kovalent immobilisiert wird.

Diese Methoden lassen sich in direkte Schreibtechniken (DPN) und Replikationstechniken (μ CP, μ FN, Hydrogele) einteilen.^[59] Während direktes Schreiben den Vorteil besitzt, sehr hohe Auflösungen der Muster generieren zu können, bestehen die Nachteile darin, dass es typischerweise langsam ist, einen geringen Durchsatz hat und aufgrund der Notwendigkeit das Muster seriell zu schreiben, nicht für eine großflächige Musterung geeignet ist.^[52] Die Replikationstechniken wiederum erlauben durch den Gebrauch von Stempeln eine großflächige Mustererzeugung, auch auf gekrümmten Oberflächen. Allerdings bietet die Nutzung von Stempeln typischerweise keine so hohe räumliche Auflösung wie direktes Schreiben.^[52] Zudem kann die Herstellung neuer Replikationsstrukturen für ein geändertes Design zeit- und kostenaufwändig sein.^[59]

Ein großer Nachteil der meisten dieser genannten Methoden ist jedoch, dass die Muster nur über wenige Stunden in Lösung stabil sind, da die Biomoleküle in der Regel nicht kovalent auf der Oberfläche gebunden sind.^[60] In diagnostischen Assays, für die Analyse des Zellverhaltens auf strukturierten Oberflächen ist es jedoch vorteilhaft, wenn die Biomoleküle räumlich definiert und zeitlich stabil immobilisiert werden. Dies ist mit Hilfe photolithographischer Methoden möglich.^[61] Als Photolithographie wird die Strukturierung mit Licht bezeichnet. Das Mustern kann dabei mit Hilfe von Masken oder mit einer maskenlosen Direktschreibweise durchgeführt werden.^[52] Im Folgenden werden unterschiedliche Techniken zur Photoimmobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen genauer erläutert.

Maskenbasierte Photolithographie

Das Strukturieren von Oberflächen mit Masken ist eine weitentwickelte Methode, deren Ursprung in der Mikroelektronik liegt.^[52] Hier wird starkes UV-Licht durch eine Metallmaske projiziert, um bestimmte Bereiche auf einer mit einem Photopolymer oder *Photoresist* beschichteten Oberfläche zu belichten und so den Grad der Vernetzung zu verändern (Abbildung 2.5).^[61] Auf Basis jahrzehntelanger Material- und Instrumentenforschung wurde die klassische Photolithographie für die Immobilisierung von Biomolekülen und Zellen angepasst.^[52] Hierzu wurden sogenannte *Bioresists* entwickelt, die unter milden, wässrigen Bedingungen entfernt werden können, sodass Biomoleküle keinen Bedingungen außerhalb des physiologischen Bereichs ausgesetzt werden.^[62] Als photoaktivierbare Moleküle wurden hierbei photolabile Schutzgruppen^[62-63] und photoreaktive Crosslinker^[22, 24-25] verwendet.

Die maskenbasierte Photolithographie hat den Vorteil, dass große Flächen schnell strukturiert werden können und somit ein hoher Durchsatz erreicht werden kann. Die Auflösung, die hierbei erreicht werden kann, liegt im Bereich von wenigen 100 nm. Zudem lassen sich mehrschichtige Muster durch wiederholte Strukturierungsschritte erzeugen.^[64-65] Bei der bereits beschriebenen PAP-Methode, wurde beispielsweise in den ersten Versuchen ein binäres Proteinmuster durch eine statische Maske erzeugt.^[44] Andere Arbeiten nutzten die Methode für die Immobilisierung

auf Methacrylat-Oberflächen.^[66] Darüber hinaus konnten Enzyme über Belichtung mit Masken kovalent an Papierfasern gebunden werden^[67], oder Oberflächen reversibel strukturiert werden.^[68]

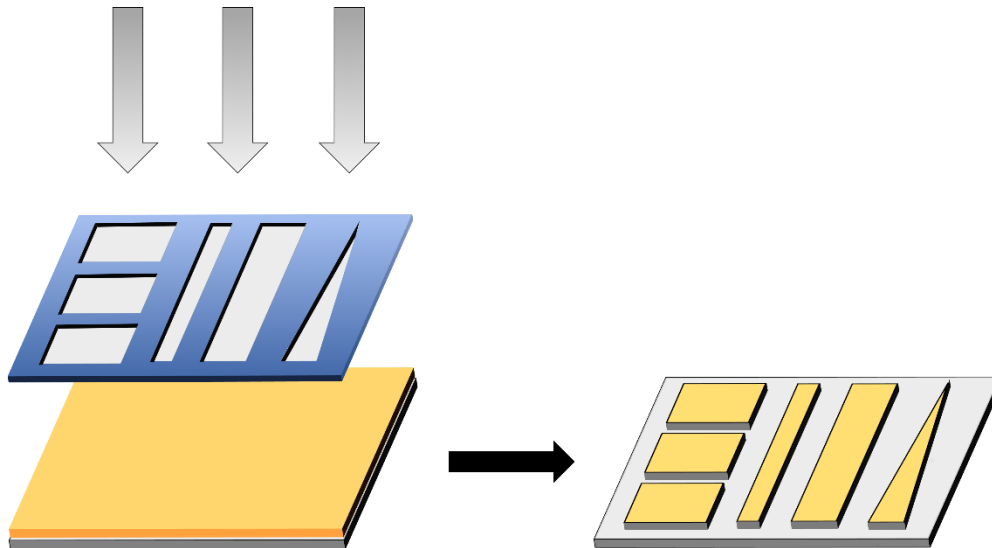


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Photolithographie mittels Masken. Eine mit Substrat (gelb) beschichtete Oberfläche (grau) wird über eine Maske (blau) bestrahlt. Dort wo das Licht (graue Pfeile) auftritt, wird das Substrat auf der Oberfläche immobilisiert.

Photolithographie durch direktes Schreiben

Bei der Photolithographie durch direktes Schreiben wird ein fokussierter Lichtstrahl verwendet, um eine Oberfläche direkt zu strukturieren. Hierbei wird Licht mit konventioneller Lichtoptik in kleine Bereiche fokussiert, um Oberflächen photochemisch zu modifizieren (Abbildung 2.6).^[52] Die räumliche Auflösung, die mit konventionell fokussiertem Licht erreicht werden kann, wird durch die optische Beugungsgrenze bestimmt und beträgt ungefähr die Hälfte der Wellenlänge des zur Anregung verwendeten Lichts.^[69]

Direktes Schreiben wird häufig für die Immobilisierung von Biomolekülen genutzt. So wurde beispielsweise UV-Licht genutzt, um *self-assembled monolayers* aus Thiolen mit PEG-Endgruppen auf Oberflächen selektiv durch Ablation zu entfernen und damit die Bindung von Proteinen durch Adsorption zu ermöglichen.^[70] Aufbauend auf den Arbeiten von Holden und Cremer entwickelten Bélisle *et al.* das direkte Schreibverfahren *laser-assisted protein adsorption by photobleaching* (LAPAP).^[43] Im Gegensatz zu Holden und Cremer nutzten sie für die Immobilisierung von fluoreszenzmarkiertem Biotin einen blauen Diodenlaser, um Muster und Konzentrationsgradienten über Graustufen zu erzeugen. Die Intensität des verwendeten Lasers, die Rastergeschwindigkeit und die Substratkonzentration regulieren dabei die Menge der auf der Oberfläche gebundenen Moleküle. Die Auflösung, die mit dieser Technik erreicht werden kann, wird neben der Beugungsgrenze ebenfalls durch die Präzision des Translationstisches bestimmt und liegt im Submikrometerbereich.^[43] Des Weiteren können durch mehrere Lichtexpositionen und Inkubationsschritte Multiproteinmuster hergestellt werden, bei denen es sich beispielsweise um gegenläufige Gradienten verschiedener Proteine handeln kann.^[45] Ein

Nachteil liegt jedoch in der Dauer, die für die Mustererzeugung benötigt wird, da es sich um ein serielles Schreibverfahren handelt. In späteren Arbeiten gelang es Scott *et al.* wiederum Proteinmuster mit einer Lasergeschwindigkeit von 10 mm/s auf PEG-Oberflächen zu erzeugen.^[71]

Angewendet wird LAPAP beispielsweise für die Immobilisierung von Proteinen in mikrofluidischen Systemen, um Zellmigrationen hinsichtlich gebundener und löslicher Chemokingradienten untersuchen zu können.^[72] Für die Herstellung einfacher Proteinmuster kann auch ein handelsübliches Konfokalmikroskop genutzt werden.^[73]

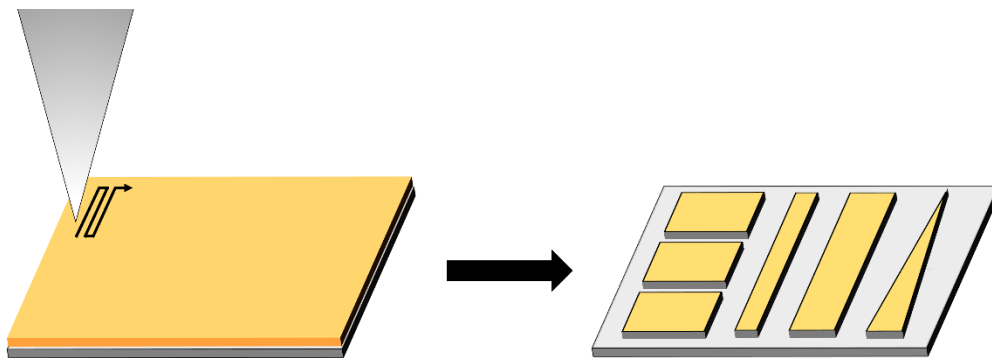


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Photolithographie durch direktes Schreiben. Ein fokussierter Lichtstrahl (grauer Pfeil) wird genutzt, um ein Substrat (gelb) direkt auf einer Oberfläche (grau) zu immobilisieren.

Photolithographie mittels *Digital Mirror Device*

Eine alternative Methode, bei der ein kontinuierlicher Gradient über unterschiedliche Graustufen erstellt werden kann, sind Mikrospiegelarrays (*digital mirror device*, DMD, Abbildung 2.7). Der DMD wurde 1987 von Larry Hornbeck von Texas Instruments entwickelt und ist ein mikromechanischer räumlicher Lichtmodulator.^[74] DMDs umfassen tausende einzeln adressierbare Mikrospiegel, die in einen Ein- oder Aus-Zustand geneigt werden können. Dabei wird von einem optischen System einfallendes Licht entweder in Richtung der Projektionsebene oder in ein sogenanntes „Licht-Depot“ reflektiert.^[75] Jeder Spiegel stellt ein einzelnes Pixel im projizierten Bild dar und weist im Ein-Zustand volle Helligkeit und im Aus-Zustand volle Dunkelheit auf.^[76] Schnelle Änderungen zwischen den Ein- und Aus-Zuständen führen zu Graustufen mittlerer Lichtintensität durch Pulsweitenmodulation.^[75]

Seit einiger Zeit werden maskenlose Projektionslithographiesysteme basierend auf DMDs für die Immobilisierung von Proteinen verwendet. Diese Technik hat den Vorteil, dass sie den hohen Durchsatz, der mit Breitfeld-Beleuchtung erreicht werden kann, mit der Vielseitigkeit des direkten Schreibens kombiniert. Um eine Auflösung im Mikrometerbereich erreichen zu können, wird eine kollimierte Lichtquelle benötigt.^[77]

So wurden DMDs beispielsweise unter Nutzung von UV-Strahlung für die Herstellung von DNA Microarrays^[78], mikrofluidischen Systemen^[79-80] und Proteinmustern^[77, 81-82] verwendet. Waldbaur *et al.* nutzten für die Erzeugung von Proteinmustern einen DMD in Kombination mit PAP.^[59] Der verwendete DMD ist dabei mit einer Hochdruck-Quecksilberlampe gekoppelt und mit einer verkleinernden Projektionsoptik ausgestattet. Dieser Aufbau ermöglicht eine schnelle

und reproduzierbare Erstellung von Graustufen-Proteinmustern mit Pixelauflösungen von $2,5 \mu\text{m}$. Angelehnt an DMDs nutzten B elisle *et al.* Breitfeld-Beleuchtung über eine Leuchtdiode durch einen lichtdurchlässigen *liquid crystal microdisplay* (LCD). Auf diese Weise konnte die Dauer für die Erzeugung der Muster von 80 min auf 5 min reduziert werden.^[45] Im Gegensatz zum DMD wird das Licht beim Einsatz des LCD nicht reflektiert sondern transmittiert.

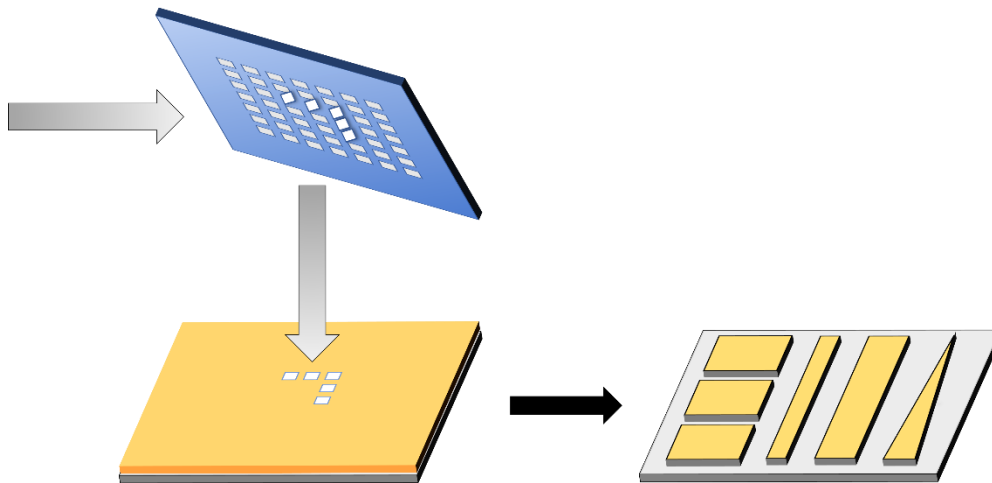


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Photolithographie unter Nutzung eines *digital mirror device* (blau). Einfallendes Licht wird über Mikrospiegel auf eine mit Substrat (orange) beschichtete Oberfläche (grau) projiziert, wodurch das Substrat immobilisiert wird.

2.2 Die photosensibilisatorvermittelte Proteinimmobilisierung und -modifikation

2.2.1 Fluoreszenz, *Intersystem Crossing* und Phosphoreszenz

Ein Photosensibilisator kann durch Absorption eines Photons bei Bestrahlung mit Licht im Wellenl ngensbereich seines Absorptionsmaximums energetisch angeregt werden. Dabei wird ein Elektron von seinem Singulett-Grundzustand (S_0) in einen elektronischen Zustand höherer Energie angehoben. Die aufgenommene Energie kann im Anschluss auf mehreren Wegen freigesetzt werden. Im Fall von Biomolekülen erfolgt dominierend zunächst eine vibronische Relaxation (*vibrational relaxation*, VR) in den S_1 -Schwingungsgrundzustand.^[83] Dieser Prozess erfolgt sehr schnell und geschieht innerhalb von Femto- bis Picosekunden (10^{-15} - 10^{-12} s).

Ausgehend von diesem Zustand kann die Energie durch Emission von Licht in Form von Fluoreszenz oder strahlungsfrei durch innere Umwandlung (*internal conversion*, IC) gefolgt von vibronischer Relaxation abgegeben werden. Alternativ kann durch sogenanntes *intersystem crossing* (ISC) ein Übergang in den Triplett-Zustand erfolgen. Im Vergleich zu Fluoreszenz oder IC ist der Prozess des ISC in der Regel viel unwahrscheinlicher, da er mit einer Spinumkehr verbunden und deshalb verboten ist. Ausgehend vom Triplett-Zustand kann die Energie unter anderem durch Phosphoreszenz oder erneutes ISC gefolgt von VR abgegeben werden. Da der Übergang jedoch erneut mit einer Spinumkehr verbunden ist, ist dieser Prozess zeitlich stark verzögert. Eine andere Möglichkeit stellt der Energie- oder Elektronen-Transfer von Photosensibilisatoren im Triplett-Zustand mit anderen Molekülen dar.

Diese soeben beschriebenen Vorgänge lassen sich in einem sogenannten Jablonski Diagramm zusammenfassen. Hierbei werden die Energieniveaus der elektronischen Zustände und Vibrationszustände als horizontale Linien dargestellt. Alle Strahlungsprozesse (Absorption oder Emission eines Photons) werden durch vertikale, gerade Pfeile, alle strahlungsfreien Prozesse durch geschwungene Pfeile gekennzeichnet.^[83] Abbildung 2.8 stellt ein um die Prozesse des Energie- und Elektronen-Transfers erweitertes Jablonski Diagramm dar.

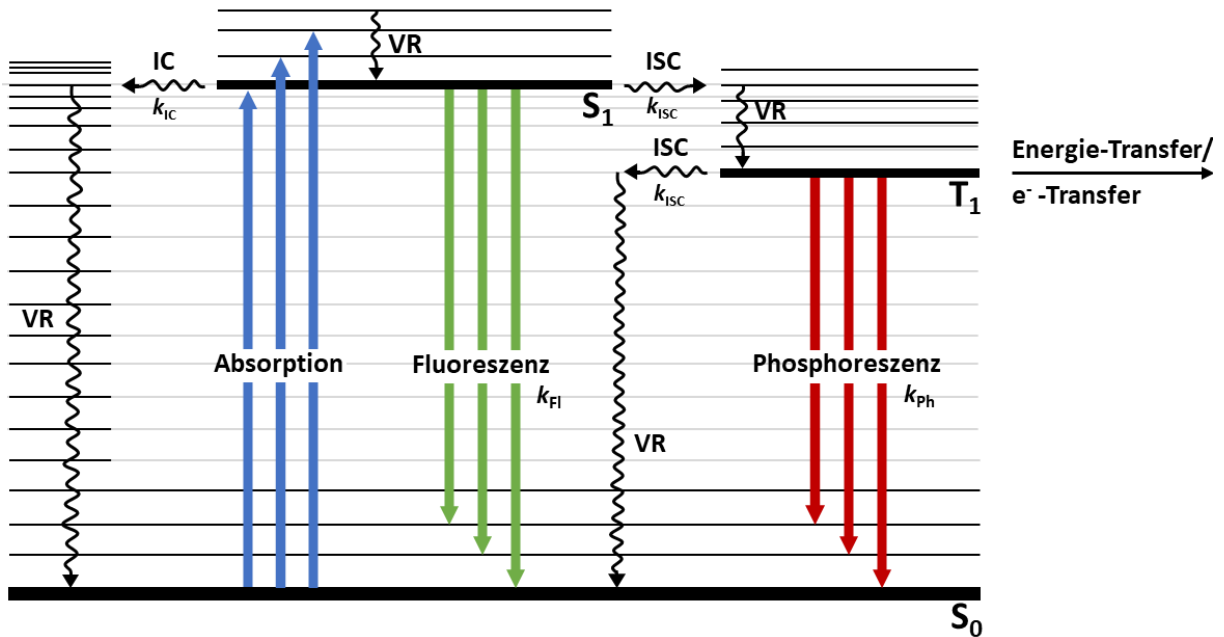


Abbildung 2.8: Darstellung eines Jablonski Diagramms. Modifiziert nach ^[83].

Für jeden Prozess kann eine Geschwindigkeitskonstante k angegeben werden, die proportional zur Wahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit ist, dass dieser Prozess eintritt. Die Quanteneffizienz eines Prozesses kann bestimmt werden, indem die Geschwindigkeitskonstante des Prozesses durch die Summe aller Prozesse dividiert wird, die in denselben Anfangszustand zurückführen. Für die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_{FI} gilt daher:

$$\Phi_{FI} = \frac{k_{FI}}{k_{FI} + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2.1)$$

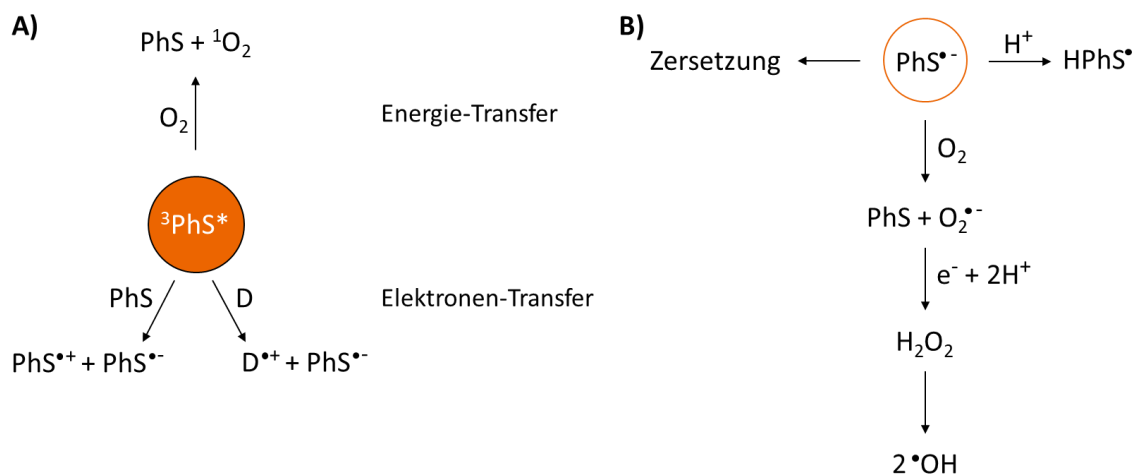
Auf die gleiche Weise lässt sich die Quantenausbeute für ISC bzw. die Triplett-Quantenausbeute Φ_{ISC} darstellen:

$$\Phi_{ISC} = \frac{k_{ISC}}{k_{FI} + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2.2)$$

2.2.2 Mechanismus der photosensibilisatorvermittelten Proteinmodifikation

Photosensibilisatoren, die bei Anregung mit Licht über ISC in den Triplett-Zustand übergehen ($^3\text{PhS}^*$), sind in der Lage ausgehend vom Triplett-Zustand Reaktionen einzugehen. Besitzt ein Photosensibilisator eine hohe Quantenausbeute für ISC, so können mehr Moleküle vom angeregten Singulett-Zustand in den Triplett-Zustand übergehen. Da dieser langlebiger ist, kann der Photosensibilisator effizienter mit der Umgebung interagieren. Die Triplett-Quantenausbeute kann durch Substitution mit schweren Atomen erhöht werden, da diese das *intersystem crossing* beschleunigen.^[41]

Ausgehend vom Triplett-Zustand wird zwischen den zwei konkurrierenden Reaktionswegen Energie-Transfer und Elektronen-Transfer unterschieden.^[39, 84-86] In beiden Reaktionswegen werden reaktive Spezies produziert, die die Quervernetzung von Proteinen initiieren können. Bei dem Energie-Transfer, oder auch Reaktion des Typ II, wird die Energie des $^3\text{PhS}^*$ auf Sauerstoff übertragen, wobei Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ gebildet wird. Im Fall eines Elektronen-Transfers, oder auch Reaktion des Typ I, wird ein Elektron von einem Donor (D) bzw. einem weiteren Photosensibilisatormolekül auf $^3\text{PhS}^*$ übertragen. Dabei entsteht das Radikalanion $\text{PhS}^{\bullet-}$ und das Radikalkation $\text{D}^{\bullet+}$ bzw. $\text{PhS}^{\bullet+}$ (Schema 2.2A).^[39, 84-86] Das Radikalanion $\text{PhS}^{\bullet-}$ kann wiederum unterschiedliche Reaktionen eingehen. So kann es bei Anwesenheit von Sauerstoff mit diesem reagieren und ein Superoxid-Radikalanion $\text{O}_2^{\bullet-}$ bilden, welches zu H_2O_2 reduziert und weiter zu einem Hydroxyradikal OH^\bullet reagieren kann.^[39, 84-86] In Abwesenheit von Sauerstoff hingegen kann sich $\text{PhS}^{\bullet-}$ zum einen zersetzen, um Spezies zu bilden, die eine Vernetzung initiieren, oder zum anderen ein Proton aufnehmen, sodass ein neutrales Radikal HPhS^\bullet gebildet wird. Dieses kann mit Proteinen reagieren und Radikale erzeugen, die unter Bildung von Vernetzungen miteinander reagieren (Schema 2.2B).^[39]



Schema 2.2: Mechanismus der photosensibilisatorvermittelten Proteinmodifikation. A) Darstellung der Reaktionswege „Energie-Transfer“ und „Elektronen-Transfer“ zur Bildung reaktiver Spezies (Singulett-Sauerstoff, Radikalkation $\text{D}^{\bullet+}$ bzw. $\text{PhS}^{\bullet+}$ und Radikalanion $\text{PhS}^{\bullet-}$) ausgehend vom Triplett-Zustand eines Photosensibilisators ($^3\text{PhS}^*$). B) Darstellung möglicher Folgereaktionen und Bildung von Superoxid-Radikalanion, Wasserstoffperoxid und Hydroxyradikal im Rahmen des Elektronen-Transfers ausgehend vom Radikalanion $\text{PhS}^{\bullet-}$. Modifiziert aus ^[39] und ^[86].

Im Fall von Fluorescein, wurden für die Desaktivierung des Triplett-Zustands zwei verschiedene Reaktionen beschrieben. Hierbei handelt es sich zum einen um Triplett-Triplett- und Triplett-Grundzustand-Reaktionen zweier Farbstoffmoleküle und zum anderen um die Reaktion zwischen einem Triplett-Farbstoffmolekül und einem Sauerstoffmolekül.^[87] Welche Reaktion dominiert abläuft, hängt von dem Konzentrationsverhältnis zwischen Fluorescein und Sauerstoff ab. Ist die Konzentration von Fluorescein wesentlich geringer als die von Sauerstoff, dominiert die Reaktion über Sauerstoff. Bei einer wesentlich höheren Fluorescein- als Sauerstoffkonzentration erfolgt die Reaktion primär mit einem weiteren Fluorescein-Molekül.^[87]

Bei der Immobilisierung von Biotin-4-Fluorescein mittels PAP, konnten Holden und Cremer feststellen, dass die Proteinimmobilisierung bei Belichtung einer sauerstoffgesättigten Lösung von Biotin-4-Fluorescein um den Faktor 7 stärker war als unter Verwendung einer sauerstofffreien Lösung.^[44]

Wertheimer *et al.* untersuchten die photosensibilisatorvermittelte Quervernetzung mittels Bengalrosa. Hierbei zeigten sie, dass bei Anwesenheit von Sauerstoff der Energie-Transfer bevorzugt wird.^[85, 88] In Abwesenheit von Sauerstoff führte der Elektronentransfer von einem Elektronendonator auf das angeregte Bengalrosa zu reaktiven Zwischenprodukten, die die Vernetzung initiieren.^[85, 88] In einem von Alarcon *et al.* vorgeschlagenen Prozess binden Aggregate von Bengalrosa an positiv geladene Aminosäuren von Kollagen.^[89] Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen akzeptiert angeregtes Bengalrosa im Triplett-Zustand ein Elektron von Arginin-Seitenketten. Bei höheren Sauerstoffkonzentrationen kann die Vernetzung durch Singulett-Sauerstoff initiiert werden.^[89]

2.3 Kollagen in der regenerativen Medizin

Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein in Säugetieren. Es ist das Hauptprotein des Bindegewebes, der Bänder, der Sehnen und der Hornhaut und bildet die Matrix von Knochen und Zähnen.^[90-91] Aufgrund seiner Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit, geringen Antigenität und Immunogenität, Hydrophilie und Stabilität gehört Kollagen zu den vielseitigsten und am häufigsten verwendeten natürlichen Biomaterialien für die regenerative Medizin und das *Tissue Engineering*.^[92-93] Um die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Kollagen für die Anwendung zu modifizieren und zu verbessern, stehen zudem unterschiedliche chemische, physikalische und biologische Methoden zur Verfügung.

2.3.1 Struktur und Eigenschaften von Kollagen

Das Vorkommen von Kollagen im gesamten Bindegewebe macht es zu einem der am meisten untersuchten Biomoleküle der extrazellulären Matrix. Bis heute wurden 29 unterschiedliche Typen identifiziert, wobei Kollagen Typ I das am häufigsten in Wirbeltieren vorkommende Kollagen darstellt.^[90, 92]

Aufgebaut ist Kollagen aus einer hierarchischen Struktur (Abbildung 2.9), bei der die unterste Ebene aus Dreifachhelices aus den drei α -Ketten $\alpha_1(I)$, $\alpha_1(II)$ und $\alpha_2(I)$ besteht. Jede dieser α -

Ketten setzt sich aus mehr als 1000 Aminosäuren mit der wiederkehrenden Sequenz -Gly-X-Y- zusammen, wobei die Positionen X und Y in der Regel von Prolin und Hydroxyprolin besetzt werden.^[94-96] Diese Dreifachhelix wird durch Wasserstoffbrückenbindungen durch 4-Hydroxyprolin stabilisiert. An jedem Ende der Dreifachhelix befinden sich die nicht helikalen Domänen, die aus Telozeptiden und N- bzw. C-Propeptid bestehen. Letztere werden bei der Biosynthese abgespalten, wobei Tropokollagen erhalten wird, was eine Länge von 300 nm und einen Durchmesser von 1-2 nm hat.^[94-97] Tropokollagene können sich durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zu Mikrofibrillen und anschließend zu Kollagenfibrillen zusammenlagern. Die molekulare Anordnung in Kollagenfibrillen wird durch die Bildung kovalenter Quervernetzungen stabilisiert. Die Vernetzung erfolgt dabei durch Oxidation von Lysin- und Hydroxylysin-Resten in den nicht-helikalen Telozeptid-Bereichen durch das Enzym Lysyl-Oxidase.^[95-98]

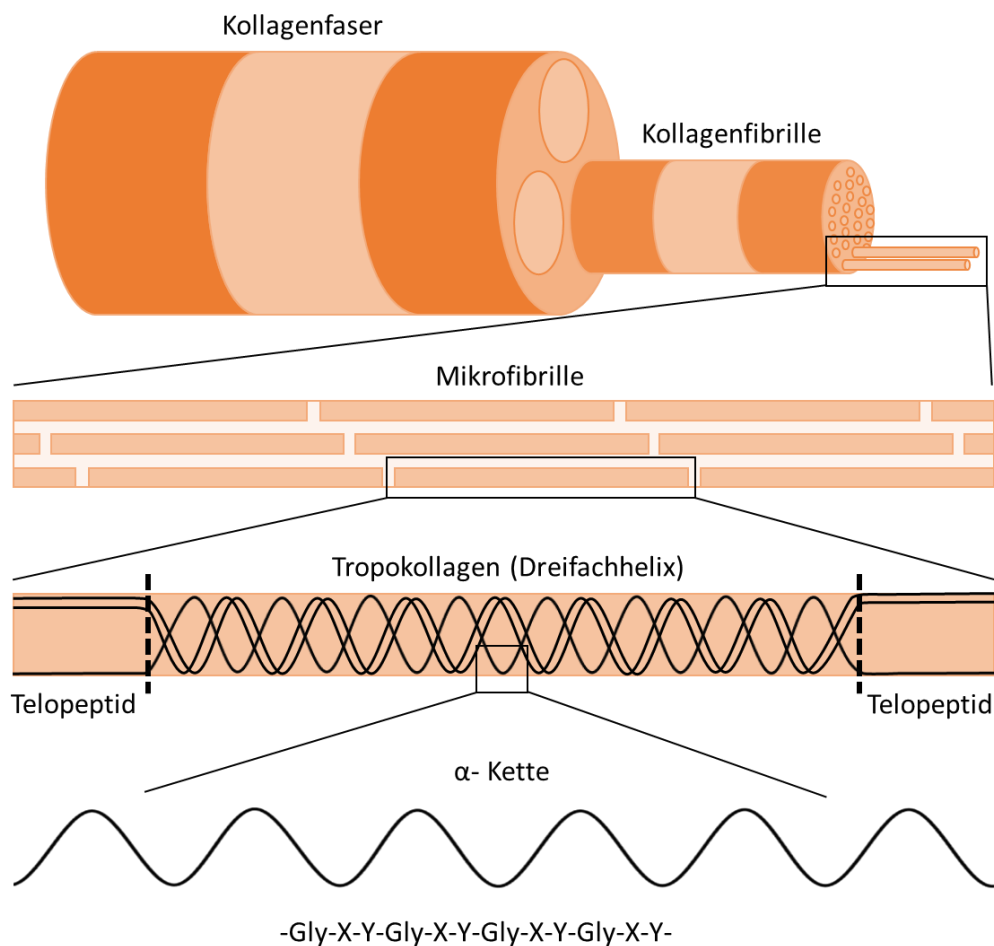


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Aufbaus von Kollagen. Die α -Kette setzt sich aus über 1000 Aminosäuren zusammen und besteht aus der wiederkehrenden Sequenz -Gly-X-Y-, wobei X und Y in der Regel für Prolin und Hydroxyprolin steht. Die α -Ketten lagern sich zu einer Dreifachhelix bzw. Tropokollagen zusammen, welches sich wiederum mit weiteren Tropokollagen-Einheiten zu Mikrofibrillen zusammenlagert, aus denen letztlich Kollagenfibrillen und Kollagenfasern entstehen.

Kollagen hat eine Reihe von physikalischen und biologischen Eigenschaften, die es zu einem wichtigen Biomaterial machen.^[90] So verfügt es unter anderem über eine hohe Zugfestigkeit, die von dem Anteil des unlöslichen Kollagens abhängt. Kollagen Typ I beispielsweise, bietet besonders innerhalb der Sehnen und Faszien die Zugsteifigkeit, um Deformationen und Rissen vorzubeugen.^[92] Darüber hinaus besitzt Kollagen eine geringe Immunogenität, sodass z.B. Kollagen Typ I ein geeignetes Material für Implantate ist.^[91] Die antigenen Bestandteile von Kollagen stellen hauptsächlich Telo peptide dar. Um die Antigenität von Kollagen zu reduzieren, können die Telo peptide enzymatisch entfernt werden, wobei sogenanntes Atelokollagen entsteht.^[99-102] Weitere vorteilhafte Eigenschaften von Kollagen sind die gute Bioabbaubarkeit und Biokompatibilität, weshalb es eine große Rolle in der Geweberegeneration spielt. Natives Kollagen ist resistent gegenüber Proteasen wie Pepsin, Trypsin und Papain, kann jedoch durch bakterielle und humane Kollagenasen abgebaut werden.^[92]

2.3.2 Anwendungen von Kollagen

Kollagen findet als Quelle für Leder, Hautpflegeprodukte, Gelatine und biomedizinische Produkte sowohl biomedizinische als auch industrielle Anwendung.^[103-104] Aufgrund seiner guten Zell- bzw. Gewebekompatibilität, mechanischen Festigkeit, Bioabbaubarkeit und geringen Immunogenität ist es ein in der regenerativen Medizin häufig verwendetes Biomaterial.^[105-106] Je nach Anforderung kann das Kollagen dabei in unterschiedlichsten Formen, wie beispielsweise als Hydrogel, Mikrosphären, Pellets, Film oder Schwamm zum Einsatz kommen.^[92, 103]

Schwämme oder Hydrogele einer dreidimensionalen, porösen Struktur werden häufig als Kollagengerüst für die Regeneration jeder Art von Gewebe verwendet.^[92, 107] So werden Kollagengerüste beispielsweise als Wundauflage oder dermalen Ersatz^[108], sowie für die Behandlung von osteochondralen Defekten^[109], Gefäßerkrankungen^[110-111], Hornhautdefekten^[112], oder zur Regeneration von Nervenzellen^[113] genutzt. Darüber hinaus können Kollagengerüste genutzt werden, um Zellen, Proteine und Wirkstoffe kalkulierbar und langfristig freizusetzen.^[114-115]

Für die Freisetzung von Zellen oder Wirkstoffen eignen sich zudem injizierbare Mikrosphären^[116-117] und Hydrogele^[92]. Mikrosphären besitzen eine ausgezeichnete Stabilisierung *in vivo* und fördern die dermale Penetration von Wirkstoffen.^[117] Hydrogele wiederum bieten den Vorteil, dass Zellen und Wirkstoffe während der Herstellung direkt integriert werden können.^[92]

2.3.3 Modifikation von Kollagen für Anwendungen

Kollagen kann aus tierischem Gewebe extrahiert^[105, 118-119] oder rekombinant hergestellt werden.^[105, 120] Um Kollagen zu extrahieren, kommen Verfahren wie chemische oder enzymatische Hydrolyse, Extraktion durch saure Lösungen, oder ultraschallunterstützte Methoden zum Einsatz.^[121] Hierbei werden allerdings die natürlich vorkommenden intramolekularen Vernetzungen zerstört, sodass die verarbeitete Form nach Extraktion die ursprünglichen Eigenschaften verliert.^[121] Um die Eigenschaften von extrahiertem Kollagen,

wie mechanische Festigkeit und die Resistenz gegenüber enzymatischem Abbau, zu verbessern, stehen chemische, physikalische oder biologische Verfahren zur Verfügung.^[99, 122]

Die chemische Vernetzung erfolgt meist durch Glutaraldehyd^[123-125], Ethyl-3(3-dimethylamino)propylcarbodiimid/N-hydroxysuccinimid (EDC/NHS)^[122, 126-127], Diisocyanate^[128-129] oder oxidierte Zucker^[130-131]. Die chemische Vernetzung ist jedoch aufgrund der erforderlichen Waschschriffe zur Entfernung der reaktiven Substanzen oft zeitaufwendig und hinterlässt potenziell toxische Rückstände.^[128, 132] Einige Crosslinker wie Glutaraldehyd sind zudem auch zytotoxisch.^[128, 133]

Zur physikalischen Vernetzung werden häufig dehydrothermale Behandlung (*dehydrothermal treatment*, DHT)^[50, 134-135] und UV-Bestrahlung^[46, 100, 136] verwendet. Bei DHT werden Quervernetzungen durch Kondensationsreaktionen erreicht. Die Reaktion wird dadurch begünstigt, dass Wärme und Vakuum genutzt werden, um das Nebenprodukt Wasser zu entfernen.^[135] Sowohl DHT als auch UV-Bestrahlung können jedoch zu einem teilweisen Abbau von Kollagen und zur Proteindenaturierung führen.^[134]

Die photodynamische Quervernetzung von Kollagen bietet gegenüber den bisher genannten Verfahren eine gute Alternative, da sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Kollagengerüsten verbessern lassen, ohne deren Biokompatibilität und Stabilität zu beeinträchtigen.^[137] Bei einer Methode namens *rose bengal and green light crosslinking* (RGX) wird unschädliches sichtbares Licht zur Aktivierung von Bengalrosa verwendet, um Kollagen zu modifizieren.^[47, 49, 85, 137-140] Hierbei konnten durch die Vernetzung von unfunktionalisiertem Kollagen mittels RGX die Thermostabilität und die mechanischen Eigenschaften verbessert, das Quellverhältnis von Kollagenmembranen modifiziert und die Wirkstofffreisetzung verändert werden.^[137, 139-141] Weitere Studien haben gezeigt, dass RGX zur Versteifung der Hornhaut^[49] und zur Reparatur von Hornhautschäden^[48, 142], zum Verkleben von Hauttransplantaten^[138] und zur Behandlung von Bandscheibendenerationen^[143] verwendet werden kann.

3 Zielsetzung

Durch Photosensibilisatoren können Proteine gezielt durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht modifiziert werden. Dies ermöglicht die Quervernetzung von Proteinen oder ihre gezielte Immobilisierung im belichteten Bereich. Diese Prozesse sind in der biomedizinischen Forschung von Bedeutung, wie beispielsweise im Bereich der Wirkstofffreisetzung aus quervernetzten Proteinmatrices, zur Herstellung diagnostischer Assays und für die Analyse des Zellverhaltens auf strukturierten Oberflächen.

Eine bekannte Methode zur photoinduzierten strukturierten Immobilisierung mit sichtbarem Licht ist das *protein adsorption by photobleaching* (PAP), bei der die verwendeten Photosensibilisatoren an das Protein konjugiert vorliegen und im angeregten Triplett-Zustand mit der Umgebung reagieren können. Die Belichtung kann mit Hilfe eines Lasers über Masken oder durch direktes Schreiben beispielsweise mittels eines Konfokalmikroskops bzw. Mikrospiegelarrays (*digital mirror device*, DMD) realisiert werden. Eine kostengünstige, lichtstarke Alternative zu diesen Methoden stellt die Belichtung über Power-LEDs dar.

Die Immobilisierung von biologisch aktiven Molekülen findet beispielsweise bei der Untersuchung der chemokin-induzierten Zellmigration Anwendung. Chemokine sind kleine Signalproteine, die durch Ausbildung von löslichen und gebundenen Gradienten die Migration von Immunzellen bei Entzündungsreaktionen und in der Homöostase des Immunsystems steuern. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Immobilisierung des kleinen Modellmoleküls Biotin und des Chemokins IL-8/CXCL8 als Modellprotein mit Hilfe einer Power-LED untersucht und der Immobilisierung durch Belichtung mittels Konfokalmikroskop und DMD gegenübergestellt werden. Hierbei werden Photosensibilisatoren unterschiedlicher Triplett-Quantenausbeute an das zu immobilisierende Biomolekül gebunden, frei in Lösung eingesetzt oder auf der Oberfläche immobilisiert und die Effizienz der Proteinimmobilisierung verglichen. Die Immobilisierung von IL-8 mit der PAP-Methode soll außerdem mit der konventionellen Photoimmobilisierung über Benzophenon, das mit UV-Licht angeregt wird, verglichen werden.

Photosensibilisatoren spielen auch bei der Modifikation von Biomaterialien für medizinische Anwendungen eine große Rolle. Eine dabei bewährte Methode ist *rose bengal and green light Crosslinking* (RGX), bei der grünes Licht zur Aktivierung von Bengalrosa genutzt wird, um insbesondere die Eigenschaften von Kollagen zu modifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wirkung von RGX auf drei verschiedene Kollagen-Typ-I-Materialien mit unterschiedlichen Dicken, Dichten und Vernetzungsgraden untersucht werden, die als Wundauflage zur Wirkstofffreisetzung verwendet werden können. Dazu sollen ihr Quellgrad, ihre Mikrostruktur, ihre mechanische Stabilität und die Freisetzung des Modellantibiotikums Vancomycin vor und nach Vernetzung mittels RGX verglichen werden. Die Verwendung einer kostengünstigen, leicht zu bedienenden starken Lichtquelle wie einer Power-LED macht diesen Ansatz für eine klinische Umgebung geeignet. Darüber hinaus soll getestet werden, inwiefern RGX dafür geeignet ist, einzelne Kollagenschichten zu Kollagenlaminaten zu verbinden. Diese Erkenntnisse sollen den Grundstein für die Entwicklung neuartiger mehrschichtiger Kollagen-Biomaterialien legen, die für eine verbesserte Wund- und Knochenheilung eingesetzt werden können.



4 Material und Methoden

4.1 Allgemeine Materialien und Chemikalien

Alle Materialien und Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: VWR International (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE), Biotium Inc. (Fremont, CA, USA), Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE), Alfa Aesar (Kandel, DE), Merck KGaA (Darmstadt, DE), Corning (Kaiserslautern, DE), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, AT), Sartorius AG (Göttingen, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, DE), Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG (Braunschweig, DE).

4.1.1 Häufig verwendete Puffer

In Tabelle 4.1 sind die in dieser Arbeit häufig verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden alle Puffer unter Verwendung von vollentsalztem Wasser (VE-H₂O) angesetzt. Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

Tabelle 4.1: Häufig verwendete Puffer.

Bezeichnung	Substanz	Zusammensetzung
Puffer A; pH 7,4	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	40 mM
	Natriumchlorid (NaCl)	90 mM
Puffer B; pH 7,4	Na ₂ HPO ₄	40 mM
	NaCl	1,5 M
Puffer C; pH 7,4	Na ₂ HPO ₄	40 mM
	NaCl	35 mM
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS); pH 7,4	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
	NaCl	137 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,5 mM
	Kaliumchlorid (KCl)	2,7 mM

4.2 Geräte und Software

In Tabelle 4.2 sind die wichtigsten, in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 4.2: Verwendete Geräte.

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
Power-LED 265 nm	M265L3	Thorlabs, Bergkirchen, DE
Power-LED 490 nm	M490L4	Thorlabs, Bergkirchen, DE
Power-LED 565 nm	M565L3	Thorlabs, Bergkirchen, DE
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer, HXP 120 C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop ¹	Leica TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Durchlichtmikroskop ²	Leica DM4 M	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Lithographiesystem ³	-	A. Waldbauer, Prof. Dr. Rapp ²
Rasterelektronenmikroskop ⁴	EVO [®] MA 15	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
HPLC	ÄKTApurifier 10	GE Healthcare, München, DE
HPLC mit Autosampler	LC20-AD, SIL-20AC	Shimadzu, Duisburg, DE
LC-Massenspektrometer	LCMS 2020	Shimadzu, Duisburg, DE
Höhenmessgerät	DIGIMAR CX1-DX1	Mahr, Göttingen, DE
Microarray Scanner ³	GenePix 4000B	Molecular Devices, USA
Mikrotiterplattenlesegerät mit Injektionsvorrichtung	Infinite [®] M1000	Tecan, Maennedorf, CH
Semi-dry Blotting System	Owl [™] -HEP-1	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Geldokumentationsstation	Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm, Minato, Präfektur Tokio, JPN
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin Electronics, Berlin, DE

¹ Macromolecular and Paper Chemistry, Ernst-Berl Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, TU Darmstadt

² Abteilung Kunststoffe und Verbunde, MPA-IfW Darmstadt

³ AK Prof. Dr. Rapp, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), Universität Freiburg

⁴ AK Prof. Dr. Mücklich, Institut für Produktionstechnik, WH Zwickau

Tabelle 4.3 fasst die in dieser Arbeit verwendete Software zusammen.

Tabelle 4.3: Verwendete Software.

Software	Anwendungsbereich	Hersteller
Axio Vision	Mikroskopiedaten	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
GenePix	Spektroskopie	Molecular Devices, USA
i-control	Spektroskopie	Tecan, Männedorf, CH
ImageJ	Bildverarbeitung	Wayne Rasband
Image Reader LAS-3000	Western Blot	Fujifilm, Tokyo, JP
LOCI Tools	PlugIn für ImageJ	Bio-Formats
LabSolutions	Chromatographie	Shimadzu, Duisburg, DE
Unicorn Control	Chromatographie	GE Healthcare, München, DE

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinexpression und Zellyse

Die Expression von IL-8 wt/CXCL8 und IL-8-S72C/CXCL8-S72C erfolgt anhand des Protokolls von Rink *et al.*^[60]. Der verwendete Stamm *E. coli* BL21 (DE3) RIL enthielt das Plasmid pET-22b mit der Sequenz für IL-8 bzw. IL-8-S72C. Der Expressionsvektor pET22b codiert eine zur Proteinsequenz N-terminal liegende pelB-Signalsequenz. Sie sorgt nach der Expression für den Transport der Proteine in das Periplasma, wo sie abgespalten wird und das Protein seine native Faltung einnehmen kann.

Viermal 20 mL LB-Medium mit 60 µg/mL Ampicillin werden mit den transformierten *E. coli* angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Zum Überimpfen werden jeweils 400 mL steril autoklaviertes LB-Medium mit 60 µg/mL Ampicillin bzw. 30 µg/mL Kanamycin versetzt, mit den frischen Übernachtskulturen inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu der gewünschten optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 bis 1,0 inkubiert. Anschließend wird die Proteinexpression durch die Zugabe von 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid induziert. Es wird für 3 h bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Nach abgeschlossener Expression wird die Zellsuspension für 45 min bei 4 °C und 4739 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wird bei -20 °C gelagert oder direkt aufgeschlossen. Zur Überprüfung der Proteinexpression werden vor und nach der Expression 400 µL der Zellsuspension entnommen und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend werden 350 µL des Überstandes verworfen und das erhaltene Pellet nach Kapitel 4.4.2 mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die Zellyse werden die Zellpellets mit 10 mL Lysis-Puffer (1 mM EDTA, 0,2 mg/mL Lysozym, 0,1 mg/mL DNase, ¼ Proteaseinhibitor-Tablette (cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) in Puffer A, pH 7,5) resuspendiert und für 1,5 h auf Eis inkubiert. Während dieses Vorgangs wird die Suspension mehrmals invertiert. Im Anschluss wird als Detergenz

50 μL Triton X-100 hinzugegeben und die Zellsuspension mittels Vortexer vermischt. Es folgt eine dreimalige Ultraschallbehandlung für je 30 s bei einer Amplitude von 30 %. Nach Zugabe von 100 μL DNase I wird die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss erfolgt ein Hitzeschritt, bei dem die Suspension für 10 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert wird. Zuletzt wird die Suspension für 45 min bei 4 °C und 4739 x g zentrifugiert. Nach der Zellyse werden 50 μL des Lysatüberstands und eine Probe des Pellets, resuspendiert in 50 μL Puffer A, nach Kapitel 4.4.2 mittels SDS-PAGE analysiert.

4.3.2 Proteinreinigung

Der Lysatüberstand aus 4.3.1 wird über einen 0,2 μm Filter filtriert und mittels Kationenaustauschchromatographie an der HPLC ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare, München, DE) gereinigt. Dafür wird eine 5 mL HiTrap SP FF Säule (GE Healthcare, München, DE) mit zwei Säulenvolumen (CV) Puffer A äquilibriert. Anschließend wird die Säule mit dem filtrierten Lysatüberstand mit einer Flussrate von 1 mL/min beladen. Es folgt ein Waschschriff mit 6 CV Puffer A, bei dem nicht gebundenes Protein eluiert wird. Nun werden die positiv geladenen Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 0 - 30 % Puffer B über 40 CV eluiert und in Fraktionen von 3 mL gesammelt. Die Detektion des Proteins erfolgt mittels UV-Messung bei 280 nm. Die Fraktionen, die IL-8 wt bzw. IL-8-S72C enthalten, werden vereinigt, in einem Centricon (Vivaspin 20, Sartorius AG, Ausschlussgrenze 3000 Da) eingengt und in Puffer C umgepuffert. Hiervon werden Proben für die SDS-PAGE und Konzentrationsbestimmung entnommen. Zuletzt wird das gereinigte Protein aliquotiert, gefriergetrocknet und bei -20 °C gelagert.

4.4 Proteinanalytik

4.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von IL-8 wt und IL-8-S72C wird eine Absorptionsmessung bei 280 nm durchgeführt. Hierzu werden dreimal 18 μL der IL-8 wt bzw. IL-8-S72C Lösung in Puffer C in eine UV-transparente 384er Mikrotiterplatte (Corning) gegeben und diese anschließend für 10 s bei 3000 x g zentrifugiert. Es folgt die photometrische Bestimmung bei 280 nm am Tecan M1000. Die Konzentration von IL-8 wt und IL-8-S72C lässt sich im Anschluss mit Hilfe einer bereits früher im Arbeitskreis erstellten Kalibriergeraden (Formel 4.1) berechnen.^[144]

$$c(\text{IL-8}) = \frac{A_{280\text{nm}} - 0,079}{0,0122} \quad (4.1)$$

4.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur qualitativen Analyse der rekombinant exprimierten Proteine wird eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) durchgeführt. Die Proben werden mit 2x oder 5x Lämmli-Puffer versetzt (Tabelle 4.4) und für 10 min bei 95 °C erhitzt, wodurch die Proteine denaturiert und linearisiert werden. Die Proben können bis zur Auftrennung mittels SDS-PAGE bei 4 °C gelagert werden. Zur Herstellung des Trenngels werden die einzelnen Bestandteile (Tabelle 4.4) zusammengegeben und gut vermischt. Der Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS) und der Radikalstabilisator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) werden dabei erst unmittelbar vor dem Befüllen der Gelkammern zugegeben. Die Kammer für das Trenngel wird bis 1,5 - 2 cm zum oberen Rand befüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach 20 - 30 min ist das Gel auspolymerisiert und das Isopropanol wird vorsichtig abgegossen. Im Anschluss daran werden die einzelnen Bestandteile des Sammelgels zusammengegeben, gut vermischt (Tabelle 4.4) und bis zum oberen Rand der Gelkammer auf das Trenngel gegeben. Unmittelbar danach wird der Kamm für die Proben Taschen in das Sammelgel gesteckt. Nachdem das Gel in die Laufapparatur eingebaut und diese mit SDS-Laufpuffer (Tabelle 4.4) befüllt wurde, werden je 20 µL der Proben auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard dienen 3 µL des Proteinmarkers *BLUEplus prestained Protein Ladder* (Biomol GmbH, Hamburg, DE). Gestartet wird die Gelelektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 100 V. Die Spannung wird auf 120 V erhöht, sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hat. Die SDS-PAGE findet bei RT statt. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden mit dem Farbstoff Coomassie G250 angefärbt, der mit Proteinen einen unspezifischen Komplex ausbildet. Für die Färbung der Gele werden diese nach beendeter SDS-PAGE in der kolloidalen Coomassie-Lösung (Tabelle 4.4) über Nacht auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Zur Entfärbung der Gele verbleiben diese so lange in VE-Wasser, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Das VE-Wasser wird während dieses Vorgangs mehrmals gewechselt. Zur Dokumentation der Gele werden diese anschließend mit Hilfe eines Scanners aufgenommen.

Tabelle 4.4: Lösungen und Zusammensetzung der Gele für SDS-PAGE.

Bezeichnung	Substanz	Zusammensetzung
Tris Puffer; pH 6,8	TRIS	0,5 M
Tris Puffer; pH 8,8	TRIS	1,5 M
SDS-Lösung	Natriumdodecylsulfat	20 % (w/v)
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat	10 % (w/v)
2x Lämmli-Puffer	SDS	4 % (w/v)
	Glycerol	20 % (v/v)
	2-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	Tris-Puffer, pH 6,8	0,16 M

Bezeichnung	Substanz	Zusammensetzung
5x Lämmli-Puffer	SDS	10 % (w/v)
	Glycerol	50 % (v/v)
	2-Mercaptoethanol	25 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	Tris-Puffer, pH 6,8	0,31 M
18 %-iges Trenngel	VE-H ₂ O	1,3 mL
	1,5 M Tris Puffer; pH 8,8	2,5 mL
	30 %-ige Acrylamidlösung ⁵	6 mL
	10 %-ige SDS-Lösung	100 µL
	10 %-ige APS-Lösung	100 µL
	TEMED	4 µL
5 %-iges Sammelgel	VE-H ₂ O	2,3 mL
	0,5 M Tris Puffer; pH 6,8	1 mL
	30 %-ige Acrylamidlösung ⁵	670 µL
	10 %-ige SDS-Lösung	40 µL
	10 %-ige APS-Lösung	40 µL
	TEMED	2,5 µL
SDS-Laufpuffer; pH 7,5	TRIS	25 mM
	Glycin	193 mM
	SDS	3,5 mM
Kolloidale Coomassie-Lösung	Phosphorsäure	10 % (v/v)
	Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
	Coomassie G250	0,12 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)

4.4.3 Western Blot

Der Western Blot dient zur spezifischen Identifizierung von Proteinen mit Antikörpern. Dazu werden die mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine für weitere Analysen auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert und dort immunochemisch nachgewiesen. Der Proteintransfer erfolgt im Rahmen dieser Arbeit mit dem *Semi-Dry*-Verfahren. Die PVDF-Membran wird zunächst durch Eintauchen in Methanol aktiviert. Zwei Whatmanpapiere werden in Western Blot Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 10 % Methanol) getränkt. Anschließend wird ein Sandwich aus Whatmanpapier, Gel, PVDF-Membran und einem zweiten Whatmanpapier zwischen Kathode (unten) und Anode (oben) angeordnet. Um einen optimalen Proteintransfer zu gewährleisten, ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen Gel und der Membran liegen. Das Blotting eines Gels wird für 45 min bei 80 mA bei RT durchgeführt.

⁵ Acrylamid:Bisacrylamid 29:1

Nach Beendigung des Proteintransfers wird die Bloteffizienz durch Anfärbung des Gels mit Coomassie überprüft. Um unspezifische, freie Proteinbindestellen der Membran zu sättigen, wird diese für 2 h bei RT mit 5 % (w/v) Milchpulverlösung in PBS-T (PBS mit 0,1 % Tween-20) geblockt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper in PBS (Tabelle 4.5) auf dem Schüttler für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Zur Entfernung überschüssigen Primärantikörpers wird die Membran dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Bei der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primärantikörpern, lassen sich die Proteine auf der Membran direkt durch die Detektion von Fluoreszenz mit dem Image-Analyzer LAS-3000 nachweisen (Messmodus: SYBRGreen, Increment; Intervall: 10 s). Wurden unmarkierte Primärantikörper genutzt, so erfolgt die Inkubation mit dem entsprechenden HRP-markierten sekundären Antikörper in PBS (Tabelle 4.5) für 1 h bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS-T werden die Proteine mit dem *Amersham ECL start Western Blotting Detection Reagent* (ECL Start, GE Healthcare, München, DE) nach Herstellerangaben detektiert. Hierzu wird die Membran mit der Lösung benetzt und die Chemilumineszenz mit dem Image-Analyzer LAS-3000 aufgenommen, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar sind (Messmodus: Chemiluminescence, Increment; Intervall: 10 s). Des Weiteren wird der Marker aufgenommen (Messmodus: Digitize, Precision; Belichtungszeit: 1/60 s).

Tabelle 4.5 fasst die für den Western Blot verwendeten Antikörper zusammen.

Tabelle 4.5: Verwendete Antikörper für den Western Blot.

Name	Art	Verdünnung	Hersteller
Anti-humanes IL-8 IgG, Maus, polyklonal	Primärantikörper	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
FITC ⁶ -konjugiertes anti-humanes IL-8 IgG, Maus, polyklonal	Primärantikörper	1:1000	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
HRP-konjugiertes anti-Maus IgG, Ziege, polyklonal	Sekundärantikörper	10 µg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, DE

⁶ Fluoresceinisothiocyanat

4.5 Proteinkonjugation - Selektive Markierung von IL-8-S72C über das C-terminale Cystein

Für eine selektive Markierung über das C-terminale Cystein werden zunächst Dimere, die durch intermolekulare Disulfidbrücken über die C-terminalen Cysteine des IL-8-S72C entstehen können, mit *Immobilized TCEP Disulfide Reducing Resin* (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE) reduziert. Dazu wird das Harz dreimal mit Markierungspuffer (20 mM EDTA in PBS) gewaschen. 1 mL einer IL-8-S72C-Lösung in Markierungspuffer wird auf 3 - 4 Äquivalente Harz gegeben und für 60 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Harzpartikel für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL-Gefäß überführt. Das Harz wird mit 200 μ L Waschpuffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand zu der Proteinlösung gegeben. Anschließend wird in vierfachem molarem Überschuss Fluorescein-5-maleimid (AAT Bioquest, Inc, Sunnyvale, Californien, USA) bzw. Benzophenon-4-Maleimid (Merck KGaA, Darmstadt) in DMF zugegeben und für mindestens 2 h schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die erhaltene Reaktionslösung wird mittels Gelfiltration an der HPLC ÄKTApurifier 10 gereinigt. Der Reaktionsansatz wird dafür auf eine mit 2 CV Puffer C äquilibrierte 53 mL HiPrep 26/10 Desalt Säule (GE Healthcare) aufgetragen und das markierte Protein von überschüssigem Markierungsreagenz getrennt. Die Elution erfolgt isokratisch mit 2 CV des Puffers C bei einer Flussrate von 3 mL/min. Das Protein wird anhand der UV-Messung bei 280 nm detektiert und in Fraktionen à 1,3 mL gesammelt. Die Fraktionen, die Protein enthalten, werden anschließend vereinigt und mittels eines Centricons (Vivaspin 20, Sartorius AG, Ausschlussgrenze 3000 Da) eingengt. Die Markierung wird massenspektrometrisch überprüft.

4.6 Photoinduzierte Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen

Für die photochemische Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen werden photoreaktive Moleküle bzw. Fluoreszenzfarbstoffe als Photosensibilisatoren benötigt. Diese kommen im Rahmen dieser Arbeit entweder bereits bei der Beschichtung der Oberfläche, konjugiert an das zu immobilisierende Biomolekül oder frei in Lösung zum Einsatz.

4.6.1 Vorbereitung und Beschichtung der Oberflächen

Im Rahmen dieser Arbeit findet die Immobilisierung von Biomolekülen sowohl auf Kunststoffpetrischalen als auch auf Glasobjektträgern statt.

Polystyrol-Petrischalen

Die Polystyrol (PS)-Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, DE) werden entweder direkt für die Immobilisierung verwendet oder zuvor mit dem Polymer Polymethylmethacrylat (PMMA, BASF, Ludwigshafen am Rhein) beschichtet. Hierzu wird 1 mL einer PMMA-Lösung (3 % (w/v) in Aceton) mittig auf die PS-Petrischale aufgetragen und mittels Spin Coating (Delta 6 RC, Süß MicroTec SE, Garching) bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 300 rpm gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Anschließend wird überschüssige Lösung aus der Petrischale entfernt und gewartet bis das Lösemittel komplett verdampft ist.

Glasobjektträger

Es kommen sowohl herkömmliche Glasobjektträger (Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific Braunschweig, DE), als auch NH₂- und MACS-funktionalisierte Glasobjektträger (Nexterion Glass B, Schott, Mainz) zum Einsatz. NH₂- bzw. MACS-funktionalisierte Glasobjektträger werden durch Funktionalisierung von Nexterion Glass B Objektträgern mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) bzw. Methacrylsäure-3-(dimethylchlorsilyl)-propylester (MACS) hergestellt⁷ und können direkt verwendet werden. Menzel-Gläser werden vor dem Einsatz beschichtet. Dazu werden sie zunächst mit n-Propanol und VE-Wasser gereinigt und mittels Druckluft getrocknet. Die Beschichtung erfolgt anschließend mit unterschiedlichen Proteinen oder Protein-Photosensibilisator-Mischungen.

Beschichtung mit Rinderserumalbumin:

Die gereinigten Glasobjektträger werden in einer Petrischale für 30 min bei RT in einer 3 %-igen (w/v) BSA-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, DE) in PBS inkubiert. Im Anschluss werden die Glasobjektträger in einem *System Wash-N-Dry™ Slide Rack* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) platziert und in einem Becherglas für je 10 min in PBS und weitere 10 min in VE-H₂O unter Rühren gewaschen. Zuletzt werden die Glasobjektträger mit Druckluft getrocknet.

Beschichtung mit Rattenschwanzkollagen:

Die gereinigten Glasobjektträger werden in einer Petrischale über Nacht bei 4 °C mit einer 0,01 bzw. 0,3 %-igen (w/v) Rattenschwanzkollagen-Lösung (Corning) in PBS inkubiert. Der anschließende Wasch- und Trocknungsvorgang erfolgt analog zu dem der Beschichtung mit BSA.

Beschichtung mit Gelatine:

Die gereinigten Glasobjektträger werden in einer Petrischale über Nacht bei 4 °C mit einer 0,3 bzw. 3 %-igen (w/v) Gelatine-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, DE) in PBS inkubiert. Hierzu wird die Gelatine zuvor für 15 min bei 37 °C in PBS gelöst. Im anschließenden Waschvorgang wird anstelle von kaltem PBS warmes PBS verwendet.

Beschichtung mit einer Protein-Photosensibilisator-Mischung:

Zur Beschichtung der Glasobjektträger mit einer Protein-Photosensibilisator-Lösung wird der entsprechenden Proteinlösung Bengalrosa (RB; Alfa Aesar, Kandel, DE), Eosin Y (EO; Alfa Aesar, Kandel, DE) oder Erythrosin B (ER; Alfa Aesar, Kandel, DE) zugegeben. Die verwendeten Proteine und Parameter zur Beschichtung sowie die Konzentrationen der Photosensibilisatoren können Tabelle 4.6 und Tabelle 4.7 entnommen werden. Der anschließende Wasch- und Trocknungsvorgang erfolgt analog zu dem der Beschichtung mit der jeweiligen Proteinlösung ohne Zusatz des Photosensibilisators.

⁷ durchgeführt von Tobias Nargang, AK Prof. Dr. Rapp, Universität Freiburg

Tabelle 4.6: Proteine und Parameter für die Beschichtung der Glasobjektträger.

Protein	Konzentration	Dauer
BSA	3 % (w/v) in PBS	30 min, RT
Rattenschwanzkollagen	0,01 % (w/v); 0,3 % (w/v) in PBS	über Nacht, 4 °C
Gelatine	0,3 % (w/v); 3 % (w/v) in PBS	über Nacht, 4 °C

Tabelle 4.7: Eingesetzte Photosensibilisatoren und deren Konzentrationen zur Beschichtung der Glasobjektträger.

Photosensibilisator	Konzentration
Bengalrosa	57 μ M; 98 μ M
Eosin Y	46,5 μ M
Erythrosin B	39,5 μ M

4.6.2 Photoimmobilisierung von Biomolekülen

Auf die beschichteten Oberflächen wird eine *SecureSealTM hybridization chamber* (Artikel-Nr. 621501, Grace Bio-Labs, Bend, USA) aufgeklebt und mit 250 μ L einer 80 μ M Lösung des zu immobilisierenden Biomoleküls befüllt. Die Öffnungen werden anschließend mit *Adhesive Seal Tabs* (Grace Bio-Labs, Bend, USA) verschlossen.

Da im Fall der PS/PMMA-Oberflächen bzw. der mit Protein beschichteten Glasobjektträger kein Photosensibilisator auf der Oberfläche vorliegt, wird der für die Immobilisierung benötigte Photosensibilisator zuvor an das Biomolekül konjugiert, oder frei in Lösung zugegeben. Wurden die Glasobjektträger mit einer Protein-Photosensibilisator-Mischung beschichtet, so wird die *SecureSealTM hybridization chamber* mit unkonjugiertem Biomolekül befüllt. Die Zugabe der Lösungen erfolgt stets in gedimmtem Licht, um unspezifische Photoimmobilisierungen zu vermeiden. Im Anschluss werden die Biomoleküle durch Belichtung auf den Oberflächen immobilisiert. Hierbei kann zwischen maskenbasierten Verfahren mittels Power-LEDs oder Belichtungen mittels DMD oder konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) unterschieden werden.

In Tabelle 4.8 sind die in dieser Arbeit verwendeten Biomoleküle, Oberflächen und Belichtungsapparaturen angegeben.

Tabelle 4.8: Zusammenfassung aller verwendeten Biomoleküle, Oberflächen und Belichtungsapparaturen.

Biomolekül	Hersteller	Oberfläche	Belichtungsapparatur
IL-8-S72C- Benzophenon	AK Schmitz	PS-Petrischale	Power-LED M265L3
		PS-Petrischale + PMMA	Power-LED M265L3
Biotin-5- Fluorescein	Biotium	BSA-Glasobjektträger	Power-LED M490L4/ CLSM
		BSA + RB-Glasobjektträger	Power-LED M565L3
		BSA + EO-Glasobjektträger	Power-LED M565L3
		BSA + ER-Glasobjektträger	Power-LED M565L3
IL-8-S72C- Fluorescein	AK Schmitz	BSA-Glasobjektträger	Power-LED M490L4/ CLSM
		NH ₂ -Glasobjektträger	DMD
		MACS-Glasobjektträger	DMD
Biotin- Cadaverin	Iris Biotech	BSA + RB-Glasobjektträger	Power-LED M565L3
		Rattenschwanzkollagen + RB-Glasobjektträger	Power-LED M565L3
		Gelatine + RB- Glasobjektträger	Power-LED M565L3
IL-8 wt	AK Schmitz	BSA + RB-Glasobjektträger	Power-LED M565L3
		BSA + EO-Glasobjektträger	Power-LED M565L3
		BSA + ER-Glasobjektträger	Power-LED M565L3
		Rattenschwanzkollagen + RB-Glasobjektträger	Power-LED M565L3/ CLSM
		Gelatine + RB- Glasobjektträger	Power-LED M565L3
IL-8 wt + Fluorescein	AK Schmitz	BSA-Glasobjektträger	Power-LED M490L4/ CLSM
		NH ₂ -Glasobjektträger	DMD
		MACS-Glasobjektträger	DMD

Maskenbasierte Belichtung mittels Power-LED

Auf die befüllte *SecureSeal™ hybridization chamber* wird eine Metallochmaske (Abbildung 4.1) platziert. Im Anschluss erfolgt die Belichtung über eine Power-LED (M265L3, M490L4, M565L3) im Abstand von 2 cm. Dabei werden Bestrahlungsstärken von 17,75 mW/cm² für M490L4 bzw. 45,8 mW/cm² für M565L3 erreicht. Die Wahl der Power-LED ist dabei abhängig von dem für die Immobilisierung verwendeten photoreaktiven Molekül bzw. Photosensibilisator (Tabelle 4.9). Nach der Belichtung wird die *SecureSeal™ hybridization chamber* entfernt und die Oberflächen werden gewaschen und getrocknet.

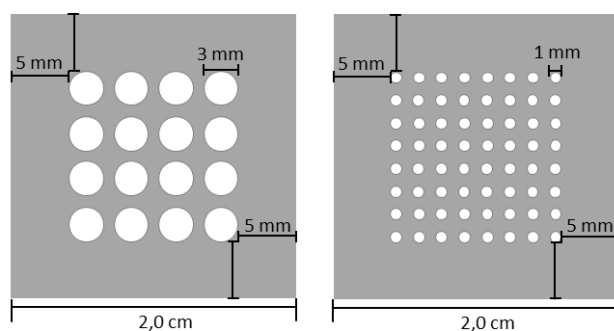


Abbildung 4.1: Verwendete Metallochmasken (Mechanikwerkstatt, Fachbereich Chemie, TU-Darmstadt) für die maskenbasierte Belichtung mittels Power-LED.

Tabelle 4.9: Photoreaktive Moleküle bzw. Photosensibilisatoren unter Angabe der Absorptionsmaxima sowie der verwendeten Power-LEDs und Belichtungszeit. Die angegebenen Belichtungszeiten wurden zum Teil durch Gianluca Pohl im Rahmen seiner Masterthesis^[145] bestimmt (siehe Kapitel 5.1.3).

Photoreaktives Molekül/ Photosensibilisator	Absorptions- maximum/ nm	verwendete Power-LED	Belichtungszeit / min
Benzophenon	254	M265L3	30:00
Bengalrosa	548	M565L3	23:28
Eosin Y	520	M565L3	35:50
Erythrosin B	527	M565L3	32:33
Fluorescein	491	M490L4	30:00

Maskenlose Belichtung mittels DMD

Für die Belichtung mittels DMD wurde das maßgeschneiderte Lithographiesystem nach Waldbauer *et al.* verwendet.^[59] Es basiert auf einem kommerziell erhältlichen DMD (DLP Discovery 4100, Vialux, Chemnitz, DE) mit 1024 x 768 adressierbaren Pixeln. Die Spiegel können über Pulsweitenmodulation auf 256 verschiedene Grauwerte eingestellt werden. Als Lichtquelle dient eine Superdruck-Quecksilberlampe (Superlite 400, Lumatec, Deisenhofen, DE), die auf 490 nm ± 20 nm gefiltert wurde. In der Projektionsebene beträgt die Lichtintensität 10 mW/cm². Eine Software ermöglicht die Projektion von 8-Bit-Graustufen-Bitmap-Bildern auf eine Fläche von 2 x 3 mm² über eine Verkleinerungsoptik. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels DMD IL-8-S72C-Fluorescein und IL-8 wt mit freiem Fluorescein auf NH₂- bzw. MACS-funktionalisierten Glasobjektträgern immobilisiert. Dazu wird die Oberfläche mit der mit IL-8-S72C-Fluorescein bzw. IL-8 wt und freiem Fluorescein befüllten *SecureSealTM hybridization chamber* in dem Lithographiesystem platziert und für 3 min belichtet⁸. Nach der Belichtung wird die *SecureSealTM hybridization chamber* entfernt und die Oberflächen gewaschen und getrocknet.

Maskenlose Belichtung mittels CLSM

Die Oberfläche mit der befüllten *SecureSealTM hybridization chamber* wird auf dem Objektisch des CLSM positioniert. Anschließend wird über das Objektiv (HC PL Fluotar 10x/0.3, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) eine Fläche von 200,09 x 200,09 μm² für 100 Frames bei einer Laserintensität von 100 % belichtet. Der gewählte Laser hängt von dem für die Immobilisierung verwendeten Photosensibilisator ab (488 nm für Fluorescein/FITC, 552 nm für Bengalrosa). Nach der Belichtung wird die *SecureSealTM hybridization chamber* entfernt und die Oberflächen gewaschen und getrocknet.

4.6.3 Fluoreszenzfärbung immobilisierter Biomoleküle

Für die Fluoreszenzfärbung der immobilisierten Biomoleküle werden alle Arbeitsschritte in einem fensterlosen Raum mit schwachem indirektem Licht durchgeführt. Zusätzlich werden die Oberflächen zwischen jedem Arbeitsschritt in mit Alufolie umwickelten Petrischalen gelagert.

Biotin-5-Fluorescein

Es wird eine *SecureSealTM hybridization chamber* auf den belichteten Bereich aufgeklebt und mit 250 μL einer Streptavidin-Cy3-Lösung (0,01 mg/mL in PBS) befüllt. Nach einer Inkubation von 1 h wird die *SecureSealTM hybridization chamber* entfernt, die Lösung abgespült und die Oberfläche gewaschen und getrocknet.

Biotin-Cadaverin

Der Nachweis von Biotin-Cadaverin erfolgt analog zu dem von Biotin-5-Fluorescein. Anstelle von Streptavidin-Cy3 wird jedoch Streptavidin-FITC verwendet.

⁸ durchgeführt von Tobias Nargang, AK Prof. Dr. Rapp, Universität Freiburg

IL-8-S72C-Benzophenon

Auf den belichteten Bereich wird eine *SecureSeal™ hybridization chamber* aufgeklebt und mit 250 μL einer Lösung des FITC-markierten anti-IL-8 Antikörpers (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS) befüllt. Nach einer Inkubation von 1 h wird die *SecureSeal™ hybridization chamber* entfernt, die Lösung abgespült und die Oberfläche gewaschen und getrocknet.

IL-8-S72C-Fluorescein

Es wird eine *SecureSeal™ hybridization chamber* auf den belichteten Bereich aufgeklebt und mit 250 μL des anti-humanen IL-8 Antikörpers (1:1000 in PBS) befüllt. Nach Inkubation für 1 h wird die *SecureSeal™ hybridization chamber* entfernt, die Lösung abgespült und die Oberfläche gewaschen und getrocknet. Auf den gleichen Bereich wird eine neue *SecureSeal™ hybridization chamber* aufgeklebt und mit 250 μL des Cy3-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörpers (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Ely, UK; 1:200 - 1:2000 in PBS) befüllt. Nach erneuter einstündiger Inkubation wird die *SecureSeal™ hybridization chamber* entfernt und die Oberfläche gewaschen und getrocknet.

IL-8 wt

Der Nachweis von IL-8 wt erfolgt analog zu dem von IL-8-S72C-Benzophenon.

4.6.4 Detektion

Je nach gewählter Belichtungsapparatur (Power-LED, DMD, CLSM) findet die Detektion mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops, eines Microarray Scanners oder des CLSM statt.

Detektion mittels Fluoreszenzmikroskop

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops werden die mittels Power-LED immobilisierten Biomoleküle nach Fluoreszenzfärbung aufgenommen. Die Detektion von Cy3 erfolgt im DsRed-Kanal ($\lambda_{Ex} = 538 - 562 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 570 - 640 \text{ nm}$). Für den Nachweis von FITC wird der GFP-Kanal verwendet ($\lambda_{Ex} = 450 - 490 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 500 - 550 \text{ nm}$).

Detektion mittels Microarray Scanner

Nach Fluoreszenzfärbung der mittels DMD immobilisierten Biomoleküle, erfolgt deren Aufnahme wie durch Waldbaur *et al.*^[59] beschrieben mit Hilfe des GenePix 4000B Microarray Scanners. Folgende Einstellungen werden verwendet: Photomultiplier 600, Pixelauflösung 5 μm , Laserleistung 100 %, Anregung 532 nm, Emissionsfilter optimiert für Cy3.

Detektion mittels CLSM

Die mittels CLSM immobilisierten Biomoleküle werden nach Fluoreszenzfärbung mittels CLSM aufgenommen. FITC wird bei 488 nm angeregt und die Emission zwischen 500 - 550 nm detektiert (grüner Kanal). Cy3 wird bei 552 nm angeregt und die Emission zwischen 560 - 630 nm detektiert (roter Kanal). Die Detektion erfolgt mittels PMT und HyD-Detektoren unter Verwendung des Objektivs HC PL Fluotar 10x/0.3 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar).

4.6.5 Quantitative Analyse der Aufnahmen

Für die Quantifizierung der Ergebnisse werden die Aufnahmen mittels ImageJ (Fiji) ausgewertet. Dazu wird zunächst eine Gerade definiert, die bei allen Aufnahmen sowohl durch den belichteten Bereich (Spot) als auch unbelichteten Bereich (Hintergrund) verläuft. Mit Hilfe der Software wird für jede Pixelreihe innerhalb dieser Fläche der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten in Form von Grauwerten dargestellt. Die so erhaltenen Daten können anschließend mittels Excel graphisch aufgetragen werden. Hierbei werden drei Abschnitte definiert, die sowohl Spot als auch Hintergrund beschreiben. Im Anschluss werden die Fluoreszenzintensitäten über die definierten Abschnitte gemittelt, sodass jeweils ein Mittelwert (MW) für Spot und Hintergrund erhalten wird. Werden mehrere Bereiche belichtet, so werden die erhaltenen Werte gemittelt. Zudem wird die Standardabweichung gebildet, sodass eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse getroffen werden kann. Um die Qualität der Ergebnisse zu bewerten, wird zudem das Verhältnis zwischen Spot- und Hintergrundintensität (Signal-zu-Hintergrund (S/HG)-Verhältnis) ermittelt. Das Vorgehen wird schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt, wobei die Datenpunkte, die die Abschnitte beschreiben in Grün (Spot) und Rot (Hintergrund) markiert sind. Bei Belichtung mittels DMD werden, aufgrund des belichteten Musters, die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten des belichteten und unbelichteten Bereichs jeweils über eine Fläche von $820 \times 1180 \mu\text{m}$ gebildet.

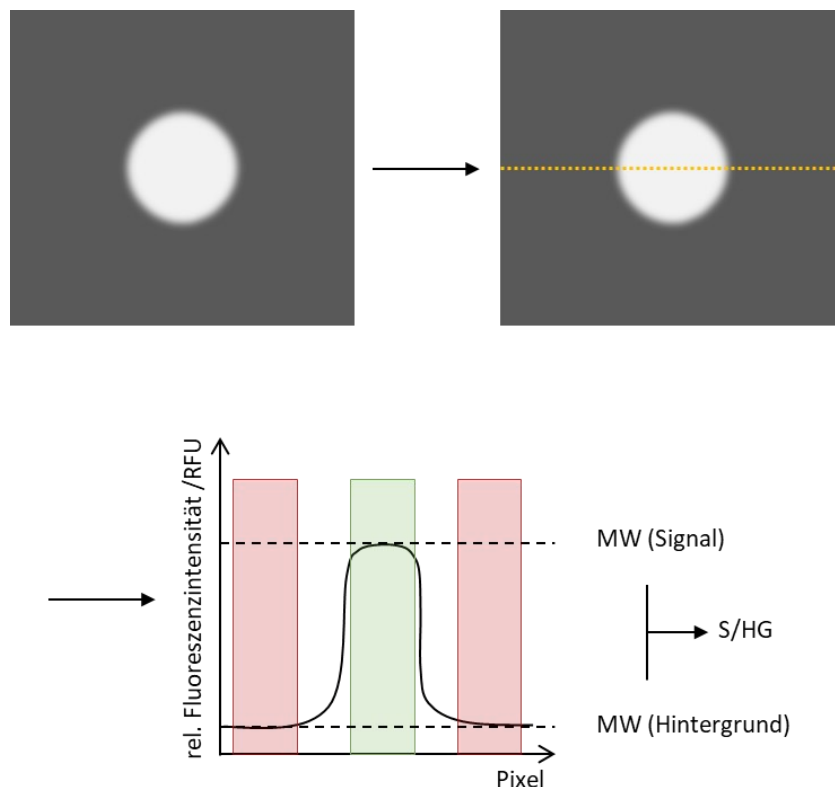


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der quantitativen Analyse von Aufnahmen. Mittels ImageJ (Fiji) wird eine Gerade (gelb) definiert die durch belichtete Bereiche (Spot, heller Kreis) und unbelichtete Bereiche (Hintergrund, grau) verläuft. Innerhalb dieser Gerade werden die Fluoreszenzintensitäten pro Pixelreihe bestimmt, die graphisch aufgetragen werden. Dabei ergeben sich drei Abschnitte, aus welchen sich der Mittelwert (MW) der Fluoreszenzintensitäten von Spot (grün) und Hintergrund (rot) berechnen lässt. Über die Mittelwerte kann zusätzlich das Signal-zu-Hintergrund (S/HG)-Verhältnis bestimmt werden.

4.7 Charakterisierung und Modifikation von Kollagen

4.7.1 Verwendete Kollagensheets

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kollagensheets sind in Tabelle 4.10 aufgelistet.

Tabelle 4.10: Verwendete Kollagensheets.

Kollagen	Hersteller	Bezeichnung
Non-perforated Collagen Film	Collagen Solutions, London, UK	Collagen Solutions
Kollagen Membran	Viscofan, Weinheim, DE	Viscofan
Atelocollagen sponge CLS-01	Koken Co. Ltd., Tokio, JP	Atelocollagen

4.7.2 Ermittlung des Quellgrads

Kollagensheets der Größe 1x1 cm² werden gewogen, um das Trockengewicht (m_t) zu erhalten. Anschließend werden die Proben in 2 mL PBS bei RT und 37 °C für 24 h inkubiert und nach 2 h, 4 h und 24 h gewogen. Vor Messung des Gewichts der feuchten Kollagensheets (m_f) wird nicht absorbierte Flüssigkeit vorsichtig abgetupft. Der Quellgrad (Formel 4.2) und die Kapazität (Formel 4.3) der Kollagensheets werden wie folgt berechnet:

$$\text{Quellgrad} = \frac{m_f}{m_t} \cdot 100 \% \quad (4.2)$$

$$\text{Kapazität (pro cm}^2\text{)} = \frac{m_f - m_t}{\rho (M)} \quad (4.3)$$

$\rho (M)$ = Dichte Medium (PBS)

m_f = Masse im feuchten Zustand

m_t = Masse im trockenen Zustand

Mit Hilfe des *two-sample t-test* wurde bestimmt, ob sich die Quellgrade der Proben bei 37 °C und RT bzw. vor und nach Modifizierung mittels RGX (siehe Kapitel 4.7.4) signifikant voneinander unterscheiden. Dabei gilt: $0,05 \geq p \geq 0,01 \triangleq *$; $0,01 > p \geq 0,005 \triangleq **$; $0,005 > p \triangleq ***$.

4.7.3 Beladung von Kollagen

Zur Beladung werden Kollagensheets der Größe 1x1 cm² in einer Petrischale oder 24-well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, DE) für 2 h bei RT in einem Volumen entsprechend ihrer Kapazität (Formel 4.3) gequollen. Je nach Untersuchung, werden die Kollagensheets entweder mit PBS, Vancomycin (Carl Roth, Karlsruhe, DE) in PBS, Bengalrosa (BR, Alfa Aesar, Kandel, DE) in PBS oder einer Kombination aus Vancomycin und Bengalrosa in PBS beladen. Kollagensheets, die lediglich mit PBS beladen wurden, werden im Folgenden als „unmodifiziert“ bezeichnet.

4.7.4 Quervernetzung von Kollagen

Kollagensheets

Die Quervernetzung von Kollagen wird durch *rose bengal and green light crosslinking* (RGX) realisiert. Hierzu werden die Kollagensheets mit 0,01 % (w/v) RB in PBS beladen und für 10 min einseitig mit grünem Licht ($\lambda = 565 \text{ nm}$) unter Verwendung einer Power-LED (M565L3, Thorlabs, Bergkirchen, DE) belichtet. Die Proben werden 2 cm von der Lichtquelle entfernt platziert, wobei eine Bestrahlungsstärke von $45,8 \text{ mW/cm}^2$ erreicht wird. Die Bestrahlungsstärke wird mit einem Fotoleistungssensor gemessen, der an eine Strom- und Energiezählerkonsole (S120VC, PM100D, Thorlabs, Bergkirchen, DE) angeschlossen ist. Mittels RGX modifizierte Kollagensheets werden im Folgenden als „modifiziert“ bezeichnet.

Kollagenlamine

Zur Herstellung von Kollagenlaminaten werden zunächst zwei Kollagensheets mit PBS beladen. Im Anschluss werden $20 \mu\text{L}$ 0,1 % (w/v) RB in PBS auf ein Kollagensheet pipettiert und vorsichtig auf der Oberfläche verteilt. Nach Auflegen des zweiten Kollagensheets auf das erste wird der Stapel für 10 min analog zu den Einzel-Kollagensheets belichtet.

4.7.5 Durchlichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie

Unmodifizierte und modifizierte Kollagensheets werden mittels Durchlichtmikroskopie⁹ unter Verwendung von polarisiertem Licht und Schrägbeleuchtung sowie Rasterelektronenmikroskopie REM¹⁰ untersucht. Die Proben für die Lichtmikroskopie werden vor der Untersuchung für 24 h in PBS konditioniert. Für die REM-Analyse werden trockene Kollagenproben verwendet.

4.7.6 Dickenmessung

Die Dicke der Kollagensheets wird bei RT und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für unmodifizierte und modifizierte Kollagensheets sowie für Kollagenlamine gemessen. Alle Proben wurden zunächst für 24 h bei der entsprechenden Temperatur in PBS konditioniert und dann mittels Höhenmessgerät (DIGIMAR CX1-DX1, Mahr, Göttingen, Deutschland) analysiert. Hierbei werden die Proben einer Kraft von $1 \text{ N} \pm 0,2 \text{ N}$ ausgesetzt, die auf eine kreisförmige Fläche mit einem Durchmesser von 1 cm ausgeübt wurde. Die Antastgeschwindigkeit bzw. Entprellzeit wurden auf 3 mm/s bzw. 3 s eingestellt.

Mit Hilfe des *two-sample t-test* wurde bestimmt, ob sich die Dicken der Proben bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und RT bzw. vor und nach Modifizierung mittels RGX (siehe Kapitel 4.7.4) signifikant voneinander unterscheiden. Dabei gilt: $0,05 \geq p \geq 0,01 \triangleq *$; $0,01 > p \geq 0,005 \triangleq **$; $0,005 > p \triangleq ***$.

⁹ durchgeführt von Fr. Matthes, Abteilung Kunststoffe und Verbunde, MPA-IfW Darmstadt

¹⁰ durchgeführt von Hr. Sedner, AK Prof. Dr. Mücklich, Institut für Produktionstechnik, WH Zwickau

4.7.7 Analyse der Vancomycin-Freisetzung aus Kollagen

Die Kollagensheets werden mit einer Lösung aus 1 mg Vancomycin in PBS, die 0,01 % (w/v) RB enthält, in einer 24-well-Platte beladen und mittels RGX modifiziert. Als Kontrolle werden unmodifizierte Kollagensheets verwendet, die mit 1 mg Vancomycin in PBS beladen sind. Um die Freisetzung von Vancomycin zu untersuchen, werden die Kollagensheets direkt nach dem Beladen und der Belichtung in der 24-well-Platte in 1 mL PBS bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h werden Proben entnommen. Hierzu wird der gesamte Überstand mit der Pipette durchmischt, entnommen und dem Kollagensheet 1 mL frisches PBS hinzugegeben. Die freigesetzte Menge an Vancomycin wird durch Absorptionsmessung entweder mittels Mikrotiterplattenlesegerät oder *reversed-phase*-HPLC bestimmt.

Bestimmung mittels Mikrotiterplattenlesegerät

Es werden 40 μ L der Proben in Triplikaten in eine UV-transparente 384-well-Platte transferiert und die Absorption bei 280 nm bestimmt. Als Blank werden die Proben unbeladener Kollagensheets verwendet. Um die Vancomycin-Konzentration der Proben bestimmen zu können, wird eine Kalibriergerade in dem Konzentrationsbereich von 0 mg/mL - 1 mg/mL erstellt. Die Menge an freigesetztem Vancomycin lässt sich im Anschluss über das eingesetzte Volumen bestimmen.

Bestimmung mittels *reversed-phase* HPLC

Es werden 100 μ L der Proben in Triplikaten via Autosampler auf eine C18 250 x 4.6 mm Synergi™ 4 μ m Fusion-RP 80 Å Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) injiziert. Nach 20-minütigem Waschen mit Eluent A (95 % Milli-Q H₂O, 5 % Acetonitril mit 0,1 % TFA) wird die Konzentration von Eluent B (5 % Wasser, 95% Acetonitril mit 0,1% TFA) über 50 min bei einer Flussrate von 0,5 mL/min stetig von 0 % auf 90 % erhöht. Die Absorption wird bei 280 nm für Vancomycin und bei 220 nm für Kollagen detektiert (SPD-M20A-Photodiodenarray-Detektor, Shimadzu, Duisburg, DE). Vancomycin eluiert bei einer Retentionszeit von ca. 41 min. Für die Bestimmung der Vancomycin-Konzentration aus der Peakfläche wird eine Kalibrierreihe von Vancomycin im Bereich von 0 bis 1 mg/mL aufgenommen. Die Menge an freigesetztem Vancomycin lässt sich im Anschluss über das eingesetzte Volumen bestimmen.

Mit Hilfe des *two-sample t-test* wurde bestimmt, ob sich die Freisetzung von Vancomycin aus unmodifizierten und modifizierten Kollagensheets signifikant voneinander unterscheidet. Dabei gilt: $0,05 \geq p \geq 0,01 \triangleq *$; $0,01 > p \geq 0,005 \triangleq **$; $0,005 > p \triangleq ***$.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Proteinadsorption durch Photobleichen zur Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen

In diesem Teil der Arbeit wurde die Immobilisierung von Biotin und IL-8 durch *protein adsorption by photobleaching* (PAP) mittels Power-LED, Konfokalmikroskop und DMD untersucht. Die Immobilisierung von IL-8 mit der PAP-Methode wurde außerdem mit der konventionellen Photoimmobilisierung über Benzophenon verglichen. Darüber hinaus wurden Photosensibilisatoren unterschiedlicher Triplet-Quantenausbeute verwendet und die Effizienz der Proteinimmobilisierung verglichen. Zur Beurteilung der Effizienz wurde jeweils das Signal-zu-Hintergrund (S/HG)-Verhältnis ermittelt, das dem Verhältnis der Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten des belichteten und unbelichteten Bereichs entspricht.

In der Literatur werden oftmals S/HG-Verhältnisse ab einem Wert von 2 beschrieben.^[45, 59, 146] Für die spätere Erzeugung eines Gradienten zur Untersuchung der Zellmigration ist es aber vor allem notwendig, dass der Verlauf des Gradienten von Zellen als solcher erkannt wird. In früheren Arbeiten des AK Schmitz konnte die Zellmigration auf einem mittels Stempelverfahren hergestellten Chemokingradienten beobachtet werden, bei dem sich der lineare Bereich des Gradienten über die Länge von 500 μm erstreckte.^[60]

5.1.1 Immobilisierung über Benzophenon

Eine Möglichkeit, Proteine auf Oberflächen zu immobilisieren, stellt eine Reaktion mit photoreaktiven Crosslinkern wie Benzophenon dar. Benzophenon kann durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm angeregt werden, wobei ein hochreaktives Diradikal entsteht, das in C-H Bindungen insertieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte IL-8-S72C mittels Benzophenon an einer Polymer-Oberfläche immobilisiert werden. Hierzu dienten eine Polystyrol-Petrischale oder eine mit PMMA beschichtete Polystyrol-Petrischale. Zur Immobilisierung wurde Benzophenon-4-Maleimid zunächst an das C-terminale Cystein von IL-8-S72C konjugiert und anschließend durch Belichtung durch eine Metalllochmaske bei 265 nm mittels Power-LED an der Oberfläche immobilisiert. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen an IL-8-S72C-Benzophenon sowie verschiedene Belichtungszeiten untersucht. Die anschließende Detektion erfolgte mit Hilfe des FITC-markierten anti-IL-8 Antikörpers.

In allen Versuchen konnten die belichteten Stellen lokalisiert werden, wobei die daraus ermittelten S/HG-Verhältnisse nicht größer als 1,14 waren (Tabelle 5.1). Bei einer IL-8-S72C-Konzentration von 80 μM führten längere Belichtungszeiten zu leicht steigenden S/HG-Verhältnissen. Die größten Werte nach 60-minütiger Belichtung betragen 1,14 im Fall der PS-Petrischale bzw. 1,13 bei der mit PMMA beschichteten PS-Petrischale.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der S/HG-Verhältnisse der Immobilisierung von IL-8-S72C-Benzophenon auf Polystyrol-Petrischalen und mit PMMA beschichteten Polystyrol-Petrischalen.

Oberfläche	Konzentration IL-8-S72C-Benzophenon	Belichtungszeit	S/HG- Verhältnis
PS-Petrischale	20 μ M	10 min	1,10
		30 min	1,06
		60 min	1,13
	80 μ M	10 min	1,07
		30 min	1,10
		60 min	1,14
PS-Petrischale + PMMA	20 μ M	10 min	1,12
		30 min	1,10
		60 min	1,09
	80 μ M	10 min	1,07
		30 min	1,10
		60 min	1,13

In Kontrollversuchen wurde IL-8-S72C-Benzophenon ohne Belichtung für 10 min, 30 min und 60 min auf den Oberflächen inkubiert und anschließend mittels anti-IL-8-FITC nachgewiesen. Die Fluoreszenzaufnahmen und daraus ermittelten relativen Fluoreszenzintensitäten deuteten darauf hin, dass eine unspezifische Wechselwirkung zwischen IL-8-S72C-Benzophenon und der PS-Petrischale bzw. der mit PMMA beschichteten PS-Petrischale vorliegen könnte. Mit Ausnahme der 10-minütigen Inkubation auf der mit PMMA beschichteten Oberfläche, lagen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der mit Protein und Antikörper inkubierten Oberfläche über denen der jeweiligen unbehandelten Oberflächen (Abbildung 5.1).

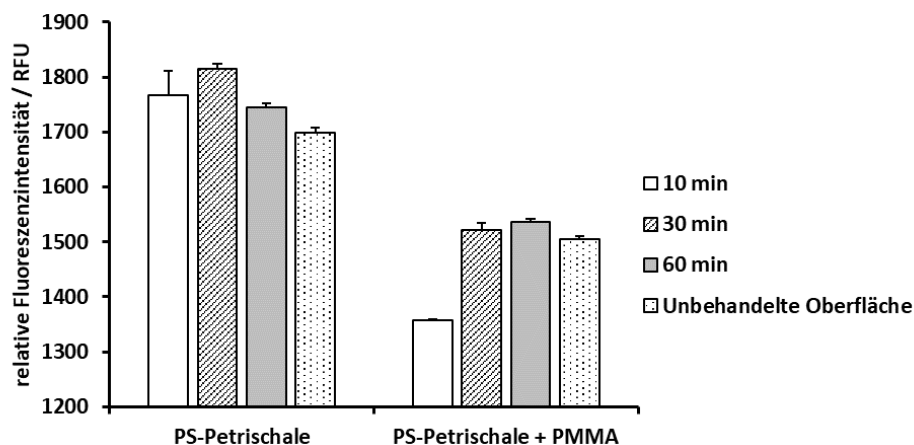


Abbildung 5.1: Darstellung der Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensitäten der Kontrollversuche zur Immobilisierung von IL-8-S72C-Benzophenon. 80 μ M IL-8-S72C-Benzophenon wurden für 10 min, 30 min oder 60 min auf einer PS-Petrischale bzw. mit PMMA beschichteten PS-Petrischale inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit anti-IL-8-FITC für 1 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4). Belichtungszeit am Mikroskop im GFP-Kanal: 2,05 s.

Die beobachtete unspezifische Wechselwirkung von IL-8-272C-Benzophenon mit den Oberflächen ist ein möglicher Grund für die niedrigen S/HG-Verhältnisse. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass IL-8-S72C-Benzophenon bei der Belichtung mit UV-Strahlung beschädigt wurde und die Bindung an anti-IL-8-FITC infolgedessen eingeschränkt worden war. Um dies zu untersuchen, wurde in einem weiteren Versuch zunächst Benzophenon-4-Maleimid mittels 30-minütiger UV-Belichtung auf den Oberflächen (PS-Petrischale, PS-Petrischale + PMMA) immobilisiert und im Anschluss an IL-8-S72C konjugiert. Unabhängig von der verwendeten Oberfläche wurden S/HG-Verhältnisse von 1,08 erhalten und somit keine Verbesserung des S/HG-Verhältnisses erzielt.

5.1.2 Immobilisierung über Fluorescein

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Immobilisierung von Biomolekülen mittels Fluorescein zu höheren S/HG-Verhältnissen führen kann. Die Immobilisierung erfolgte dabei mit PAP, bei der Photosensibilisatoren im angeregten Triplet-Zustand mit der Umgebung reagieren.^[39, 84-86] Die Methode wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben.^[44-45] Der Vorteil bei der Nutzung von Fluorescein ist zudem, dass es bei 490 nm angeregt werden kann, sodass die Proteine nicht geschädigt und keine Schutzmaßnahmen gegen UV-Strahlung erforderlich sind. In Anlehnung an Bélisle *et al.*^[43] wurde zunächst die Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein auf mit BSA beschichteten Glasobjektträgern untersucht und sowohl Konzentration als auch Belichtungszeit variiert. Hierbei wurden zunächst Belichtungszeiten von 1 min, 10 min und 60 min mit Biotin-5-Fluorescein-Konzentrationen von 10 μM , 80 μM und 320 μM kombiniert. Die ermittelten S/HG-Verhältnisse sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Im Fall der 1-minütigen Belichtung wurden konzentrationsunabhängig jeweils gleiche relative Fluoreszenzintensitäten für Spot und Hintergrund ermittelt. Erst mit zunehmender Belichtungszeit nahmen die S/HG-Verhältnisse zu. Bei den Belichtungszeiten von 10 min und 60 min nahmen die S/HG-Verhältnisse bei Konzentrationen von 10 μM auf 80 μM zu, aber bei einer Konzentration von 320 μM wieder ab. Mögliche Gründe für die Abnahme bei 320 μM können sterische Hinderung oder Quenching-Prozesse aufgrund der höheren Konzentration sein. Die mit 1,51 bzw. 1,46 bisher höchsten S/HG-Verhältnisse wurden bei einer Konzentration von 80 μM und Belichtungszeiten von 10 min bzw. 60 min erreicht.

Im Folgenden wurde der Versuch daher mit einer Belichtungszeit von 30 min wiederholt, um zu untersuchen, ob das S/HG-Verhältnis noch weiter verbessert werden kann (Abbildung 5.2). Das Verhältnis der relativen Fluoreszenzintensität von belichteten und unbelichteten Bereichen erreichte bei einer 30-minütigen Belichtung einen Wert von 1,54 und konnte damit verglichen mit der 10- bzw. 60-minütigen Belichtung zusätzlich gesteigert werden (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der S/HG-Verhältnisse der Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein auf BSA-beschichteten Glasobjektträgern. 10 μM , 80 μM und 320 μM Biotin-5-Fluorescein wurden für 1 min, 10 min bzw. 60 min bei 490 nm (Power-LED) auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger bestrahlt. 80 μM Biotin-5-Fluorescein wurden zudem für 30 min bestrahlt. Der Nachweis erfolgte mit 0,01 mg/mL Streptavidin-Cy3 und einer Inkubationszeit von 1 h.

Konzentration Biotin-5-Fluorescein	Belichtungszeit	S/HG-Verhältnis
10 μM	1 min	1,00
	10 min	1,07
	60 min	1,14
80 μM	1 min	1,04
	10 min	1,51
	30 min	1,54
	60 min	1,46
320 μM	1 min	1,01
	10 min	1,29
	60 min	1,34

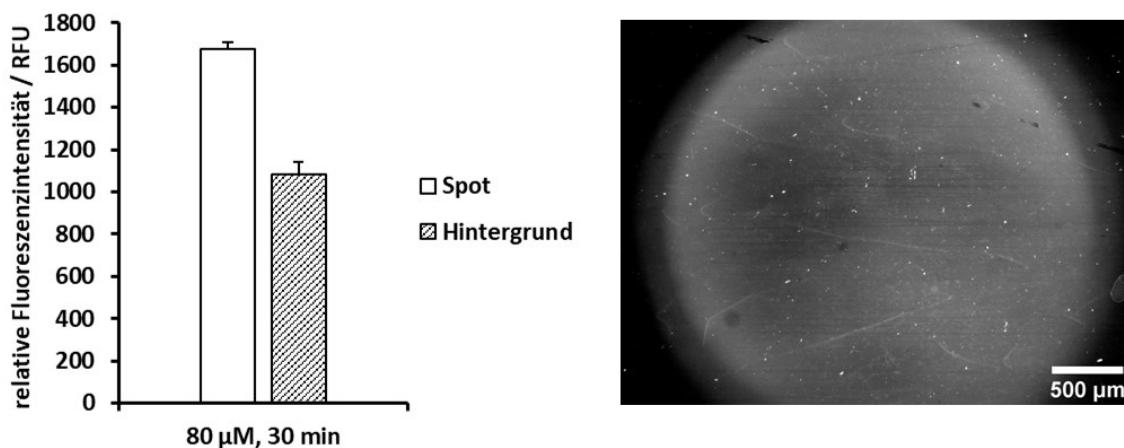


Abbildung 5.2: Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger. Rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von immobilisiertem Biotin-5-Fluorescein. 80 μM Biotin-5-Fluorescein wurden 30 min bei 490 nm (Power-LED) auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger bestrahlt. Der Nachweis erfolgte mit 0,01 mg/mL Streptavidin-Cy3 und einer Inkubationszeit von 1 h. Belichtungszeit am Mikroskop im DsRed-Kanal: 800 ms. Links: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) der relativen Fluoreszenzintensitäten von Spot und Hintergrund von immobilisiertem Biotin-5-Fluorescein.

Für die Weiterarbeit wurden deshalb die Parameter von 80 μM Biotin-5-Fluorescein und 30 min Belichtungszeit verwendet. Diese Ergebnisse stimmen mit den Parametern von Bélisle *et al.* überein, die für die Immobilisierung von Biotin-4-Fluorescein eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. 78 μM und ebenfalls eine Belichtungszeit von 30 min nutzen.^[45]

Anschließend wurde die Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf BSA-Oberflächen mit den zuvor als optimal bestimmten Parametern ($80 \mu\text{M}$, 30 min) untersucht. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 und Cy3-konjugiertem anti-Maus. Im Gegensatz zu den Immobilisierungsversuchen von Biotin-5-Fluorescein wurde bei dem Versuch, IL-8-S72C-Fluorescein zu immobilisieren, lediglich ein S/HG-Verhältnis von 1,04 erreicht. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (Abbildung 5.3) wird ersichtlich, wie stark die Fluoreszenzintensität außerhalb der durch einen gelben Kreis gekennzeichneten belichteten Fläche war. Womöglich fand eine unspezifische Wechselwirkung zwischen IL-8-S72C-Fluorescein und der BSA-Oberfläche statt. Anhand Abbildung 5.3 fällt ebenso die starke Inhomogenität der Oberfläche in Form von Schlieren und sichtbar schwankenden Fluoreszenzintensitäten bzw. hellen Flecken auf, die Einfluss auf die Mittelwerte und somit auf das S/HG-Verhältnis haben. Ebenso kann die Größe des belichteten Bereichs einen Einfluss auf das S/HG-Verhältnis haben. Bélisle *et al.*^[45] nutzen für die Belichtung eine kollimierte blaue Power-LED, die einen LCD beleuchtet, der in der Bildebene des Kameraanschlusses eines Mikroskops positioniert ist. Durch die Beleuchtung LCD entsteht sein Bild auf der Brennebene des Objektivs. Auf diese Art und Weise können Proteinpuster auf kleinen Flächen erzeugt werden. Durch die Immobilisierung auf einer kleineren Fläche fallen Störfaktoren wie Schlieren und Kratzer bei der quantitativen Auswertung weniger stark ins Gewicht, sodass größere S/HG-Verhältnisse erhalten werden können.

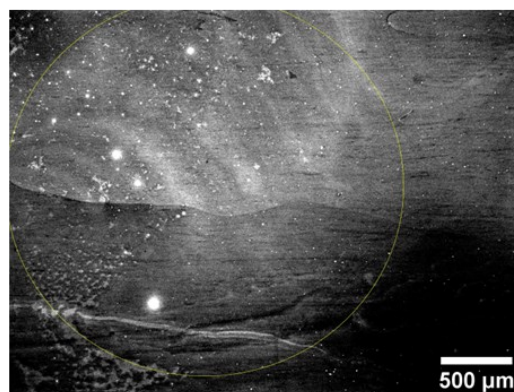


Abbildung 5.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von immobilisiertem IL-8-S72C-Fluorescein auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger. $80 \mu\text{M}$ IL-8-S72C-Fluorescein wurden 30 min bei 490 nm (Power-LED) auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger bestrahlt. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:1000) und Inkubationszeiten von je 1 h. Belichtungszeit am Mikroskop im DsRed-Kanal: 800 ms.

Eine andere Möglichkeit für das geringe S/HG-Verhältnis besteht darin, dass die Konzentration an Cy3-konjugiertem anti-Maus Antikörper nicht optimal gewählt wurde, um den belichteten Bereich klar vom unbelichteten Bereich abgrenzen zu können. Im Folgenden wurde daher die Konzentration des Sekundärantikörpers zwischen 1:200 und 1:1000 variiert. Hierbei konnte keine Korrelation zwischen den erhaltenen S/HG-Verhältnissen und den verschiedenen Antikörperkonzentrationen ermittelt werden. Das beste Ergebnis mit einem Verhältnis von 1,12 wurde bei einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:400 erzielt und konnte somit im Vergleich zu einer Konzentration von 1:1000 leicht gesteigert werden.

Eine andere Methode, mit der sich Proteinmuster und -gradienten auf Oberflächen erzeugen lassen, ist durch Verwendung eines DMD. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bastian Rapp am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), inzwischen an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, wurde eine Apparatur basierend auf einem Mikrospiegelarray (DMD) entwickelt, welche Lichtmuster mit Pixelauflösungen von $2,5 \mu\text{m}$ für eine schnelle und reproduzierbare Erstellung von Proteinmustern ermöglicht.^[59]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immobilisierung von IL-8 über Fluorescein mit Hilfe dieser Apparatur in den Laboren des AK Rapp am KIT untersucht. Aufgrund der vermuteten Wechselwirkung zwischen IL-8 und BSA wurde in einem ersten Versuch die Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein sowie IL-8 wt und freiem Fluorescein als Photosensibilisator zunächst auf NH_2 -funktionalisierten Glasobjektträgern betrachtet. Zum Nachweis wurden der Primärantikörper anti-IL-8 und der Cy3-konjugierte anti-Maus Sekundärantikörper verwendet. Aus Abbildung 5.4 wird allerdings deutlich, dass das Proteinmuster wider Erwarten invertiert erscheint. Der belichtete Bereich wies eine niedrigere relative Fluoreszenzintensität auf als der unbelichtete (Hintergrund), was in S/HG-Verhältnissen von 0,84 für IL-8-S72C-Fluorescein und 0,66 für IL-8 wt und Fluorescein resultierte. Als Kontrolle wurde der Cy3-konjugierte anti-Maus Sekundärantikörper für 1 h auf dem NH_2 -funktionalisierten Glasobjektträger inkubiert und nach Waschen analysiert. Im direkten Vergleich fällt auf, dass dieser mit ca. 10800 RFU eine höhere relative Fluoreszenzintensität aufwies als die Proben im belichteten und unbelichteten Bereich, was für eine unspezifische Wechselwirkung des Sekundärantikörpers mit der Oberfläche spricht.

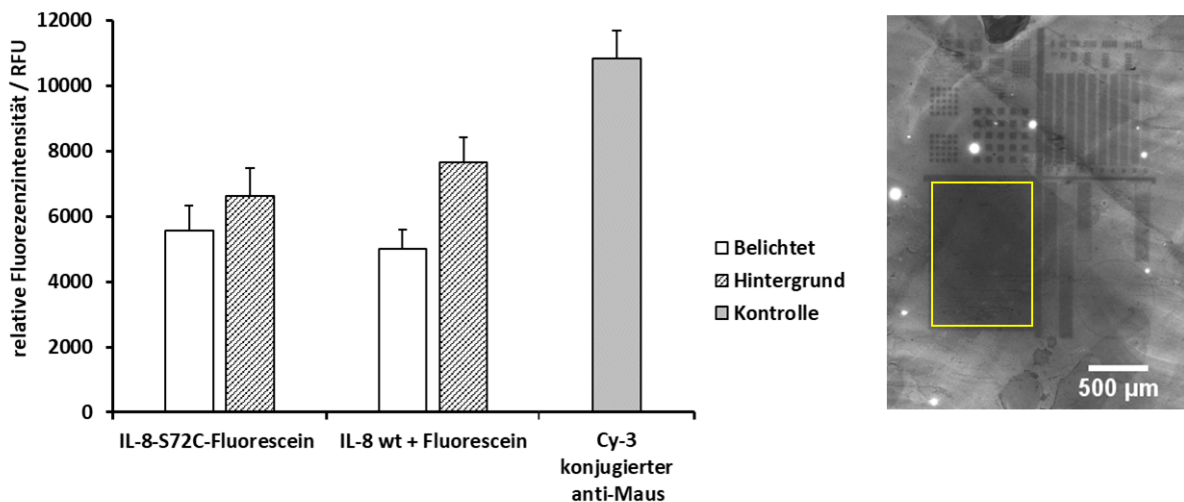


Abbildung 5.4: Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein bzw. IL-8 wt und Fluorescein auf NH_2 -funktionalisierten Glasobjektträgern. $80 \mu\text{M}$ IL-8-S72C-Fluorescein bzw. eine Lösung aus $80 \mu\text{M}$ IL-8 wt und $80 \mu\text{M}$ Fluorescein wurden für 3 min mittels DMD auf NH_2 -funktionalisierten Glasobjektträgern bestrahlt. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:400) und Inkubationszeiten von je 1 h. Die Glasobjektträger wurden anschließend mittels Microarray Scanner (Pixelauflösung $5 \mu\text{m}$, Laserleistung 100 %, Anregung 532 nm, Emissionsfilter optimiert für Cy3) aufgenommen. Rechts: Aufnahme des Glasobjektträgers von immobilisiertem IL-8 wt und Fluorescein Links: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=2$) der relativen Fluoreszenzintensitäten des belichteten Bereichs (gelb umrandet) und Hintergrunds von immobilisiertem IL-8.

Unspezifische Wechselwirkungen von Sekundärantikörpern können aufgrund zu hoher Konzentrationen und unzureichendem Blocken entstehen. Im Folgenden wurde anhand der Immobilisierung von IL-8 wt in Anwesenheit von freiem Fluorescein untersucht, welchen Einfluss das Blocken der Oberfläche mit 3 % BSA in PBS-T nach Belichtung und vor Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper hat. Die eingesetzte Konzentration von Cy3-konjugiertem anti-Maus betrug 1:500 bzw. 1:1000. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zugabe von 0,3 % BSA zur Sekundärantikörperlösung das S/HG-Verhältnis beeinflusst (Abbildung 5.5). Hierbei wird deutlich, dass Blocken mit 3 % BSA in PBS-T die S/HG-Verhältnisse negativ beeinflusste. Unabhängig von der gewählten Konzentration wurden bei den Versuchen mit Blocken invertierte Proteinmuster detektiert, sodass S/HG-Verhältnisse < 1 erhalten wurden. In allen Versuchen wurde allerdings mit höherer Verdünnung ein größeres S/HG-Verhältnis erhalten. Bei einer Konzentration von 1:1000, ohne Zugabe von 0,3 % BSA zum Sekundärantikörper, sowie ohne Blocken nach Belichtung wurde der Höchstwert von 1,75 erreicht. Diese Parameter wurden daher für Folgeversuche verwendet.

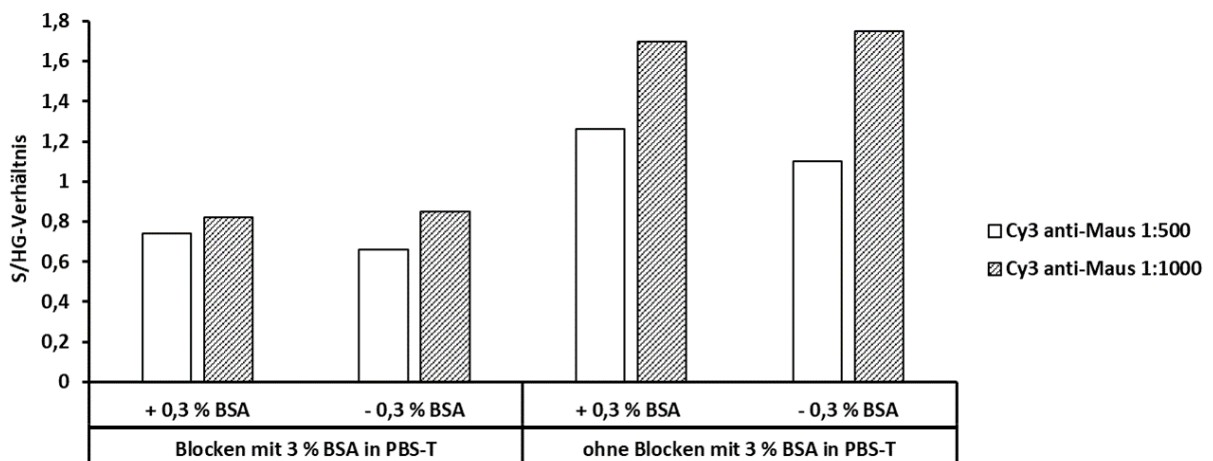


Abbildung 5.5: Untersuchung des Einflusses von Blocken, der Sekundärantikörperkonzentration sowie Zugabe von BSA zur Sekundärantikörperlösung. Darstellung der erhaltenen S/HG-Verhältnisse der Immobilisierungsversuche von IL-8 wt mit Fluorescein. Eine Lösung aus 80 μM IL-8 wt und 80 μM Fluorescein wurde für 3 min mittels DMD auf einem NH_2 -funktionalisierten Glasobjektträger bestrahlt. Die Versuche wurden mit und ohne Blocken (3 % BSA in PBS-T) nach Belichtung, sowie mit und ohne Zugabe von 0,3 % BSA zur Sekundärantikörperlösung untersucht. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:500, 1:1000) und Inkubationszeiten von je 1 h. Die Glasobjektträger wurden anschließend mittels Microarray Scanner (Pixelauflösung 5 μm , Laserleistung 100 %, Anregung 532 nm, Emissionsfilter optimiert für Cy3) aufgenommen.

Abbildung 5.6 zeigt die relativen Fluoreszenzintensitäten der belichteten und unbelichteten Bereiche der Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein nach Optimierung der Parameter. Durch die Verdünnung des Sekundärantikörpers konnte das S/HG-Verhältnis von 0,84 (siehe Abbildung 5.4) auf 1,45 verbessert werden. Die relative Fluoreszenzintensität des Hintergrunds war allerdings weiterhin sehr hoch und erreichte zum Teil Werte, die im belichteten Bereich gemessen wurden. Es wurde angenommen, dass IL-8-S72C-Fluorescein unspezifisch am NH_2 -Glasobjektträger gebunden hatte, und somit zur hohen Fluoreszenzintensität des Hintergrunds beitrug. Gestützt wurde diese Annahme durch Fluoreszenzintensitätsmessungen des

unbelichteten Bereichs des NH₂-funktionalisierten Glasobjektträgers vor Inkubation mit den Antikörpern. Die relative Fluoreszenzintensität des Hintergrunds betrug im Mittel 770 RFU und war damit ca. 12-Mal höher als die des unbehandelten NH₂-funktionalisierten Glasobjektträgers (siehe Anhang Abbildung 7.1). Auffällig sind zudem die hellen Flecken, im belichteten und unbelichteten Bereich, die die Mittelwerte verfälschen bzw. annähern und somit zu kleineren S/HG-Verhältnissen führen. In einem zellbasierten Experiment würden diese partiell erhöhten Fluoreszenzintensitäten ein verfälschtes Ergebnis zur Folge haben. In Arbeiten des AK Rapp, in der mit derselben DMD-Apparatur belichtet wurde, wurden derartige Inhomogenitäten nicht beschrieben.^[59, 147]

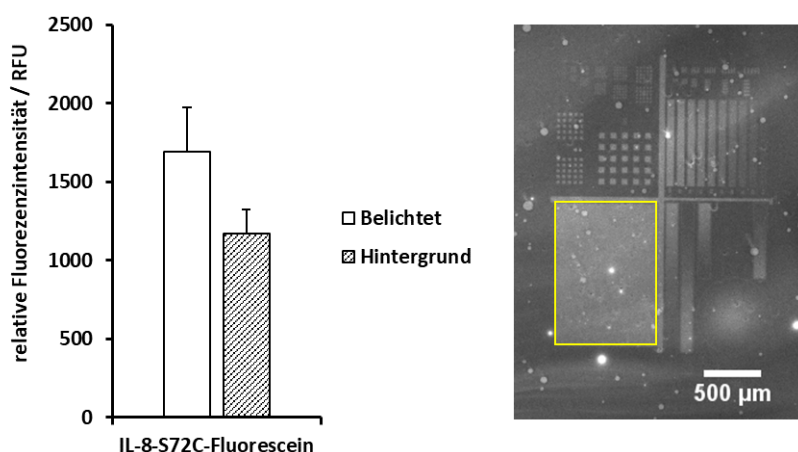


Abbildung 5.6: Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf einem NH₂-funktionalisierten Glasobjektträger. 80 µM IL-8-S72C-Fluorescein wurden für 3 min mittels DMD auf einem NH₂-funktionalisierten Glasobjektträger bestrahlt. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:1000) und Inkubationszeiten von je 1 h. Der Glasobjektträger wurde anschließend mittels Microarray Scanner (Pixelauflösung 5 µm, Laserleistung 100 %, Anregung 532 nm, Emissionsfilter optimiert für Cy3) aufgenommen. Rechts: Aufnahme des Glasobjektträgers von immobilisiertem IL-8-S72C-Fluorescein Links: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2) der relativen Fluoreszenzintensitäten des belichteten Bereichs (gelb umrandet) und Hintergrunds von immobilisiertem IL-8-S72C-Fluorescein.

In einem anderen Versuch wurde die Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf einer Oberfläche untersucht, die mit Methacrylsäure-3-(dimethylchlorsilyl)-propylester (MACS) funktionalisiert war. Auf diesem MACS-funktionalisierten Glasobjektträger betrug die relative Fluoreszenzintensität des Hintergrunds nach der Belichtung ca. 50 RFU für IL-8-S72C-Fluorescein. Da der unbelichtete MACS-funktionalisierte Glasobjektträger bereits eine relative Fluoreszenzintensität von ca. 40 aufwies, konnte eine unspezifische Wechselwirkung von IL-8-S72C-Fluorescein mit der Oberfläche ausgeschlossen werden (siehe Anhang, Abbildung 7.2). Das erhaltene S/HG-Verhältnis nach Photoimmobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein betrug 1,83 und konnte damit gegenüber der NH₂-funktionalisierten Oberfläche um 0,38 verbessert werden (Abbildung 5.7). Verglichen mit der Immobilisierung von IL-8-S72C auf BSA-beschichteten Glasobjektträgern mittels Power-LED wurde ein um 0,7 größeres S/HG-Verhältnis erhalten. Da die Bestrahlungsstärke der verwendeten DMD-Apparatur mit 10 mW/cm² geringer ist als die der Power-LED mit 17,75 mW/cm², wurde angenommen, dass vor allem die alternative Oberflächenbeschichtung zu dem verbesserten Ergebnis geführt hatte.

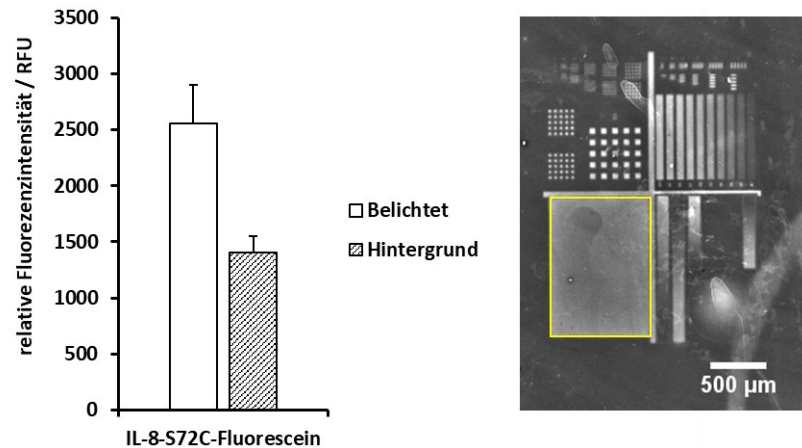


Abbildung 5.7: Photoimmobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf einem MACS-funktionalisierten Glasobjektträger. 80 μM IL-8-S72C-Fluorescein wurden für 3 min mittels DMD auf einem MACS-funktionalisierten Glasobjektträger bestrahlt. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:1000) und Inkubationszeiten von je 1 h. Der Glasobjektträger wurde anschließend mittels Microarray Scanner (Pixelauflösung 5 μm , Laserleistung 100 %, Anregung 532 nm, Emissionsfilter optimiert für Cy3) aufgenommen. Rechts: Aufnahme des Glasobjektträgers von immobilisiertem IL-8-S72C-Fluorescein Links: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=2$) der relativen Fluoreszenzintensitäten des belichteten Bereichs (gelb umrandet) und Hintergrunds von immobilisiertem IL-8-S72C-Fluorescein.

Mit Hilfe der Immobilisierung mittels DMD sind beliebig viele Proteinmuster denkbar. Abbildung 5.8 zeigt beispielweise ein Proteinmuster in Form der Mona Lisa, welches durch Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein mit den optimierten Parametern auf einem MACS-Glasobjektträger erzeugt wurde.



Abbildung 5.8: Darstellung der Mona Lisa durch ein immobilisiertes Proteinmuster. 80 μM IL-8-S72C-Fluorescein wurden für 3 min mittels DMD auf einem MACS-funktionalisierten Glasobjektträger bestrahlt. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:1000) und Inkubationszeiten von je 1 h. Der Glasobjektträger wurde anschließend mittels Microarray Scanner (Pixelauflösung 5 μm , Laserleistung 100 %, Anregung 532 nm, Emissionsfilter optimiert für Cy3) aufgenommen.

5.1.3 Immobilisierung über Photosensibilisatoren mit höherer Triplett-Quantenausbeute

Fluorescein, das in der Literatur häufig für PAP verwendet wird^[44-45, 59, 71-72], besitzt mit $\Phi_{ISC} = 0,05$ ^[148] eine geringe Triplett-Quantenausbeute. Nur wenige Moleküle gelangen also nach der Anregung in den Triplett-Zustand, sodass für eine Reaktion lange Belichtungszeiten oder hohe Lichtintensitäten notwendig sind.^[45, 59] Photosensibilisatoren mit einer höheren Triplett-Quantenausbeute verweilen nach Anregung zu größeren Teilen im langlebigen Triplett-Zustand und können daher effizienter mit der Umgebung in Form von Energie- oder Elektronentransferreaktionen interagieren.^[41] Hierbei entstehen Singulett-Sauerstoff oder Radikalanionen, die mit Proteinen interagieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Photosensibilisatoren mit höherer Triplett-Quantenausbeute als Fluorescein für die Photoimmobilisierung bewertet. Hierbei wurde der Photosensibilisator bei der Beschichtung der Oberfläche eingesetzt. Dies bietet den Vorteil, dass dieser nicht zuvor in einem zusätzlichen Schritt an das Biomolekül konjugiert werden muss. Teile der experimentellen Arbeiten wurden im Rahmen der von mir betreuten Masterthesis von Gianluca Pohl durchgeführt.

Auswahl der Photosensibilisatoren

Bei der Auswahl der Photosensibilisatoren wurde darauf geachtet, Farbstoffe mit schweren Atomen als Substituenten zu verwenden, da diese das *intersystem crossing* begünstigen.^[41] Ausgewählt wurden daher Bengalrosa, Eosin Y (EO) und Erythrosin B (ER) (siehe Abbildung 2.4). Tabelle 5.3 gibt die Triplett-Quantenausbeuten der untersuchten Photosensibilisatoren und Fluorescein als Referenz an.

Tabelle 5.3: Literaturwerte zu experimentell bestimmten Triplett-Quantenausbeuten der Photosensibilisatoren Bengalrosa, Eosin Y, Erythrosin B und Fluorescein in wässriger Lösung.^[148-149]

Photosensibilisator	Triplett- Quantenausbeute Φ_{ISC}
Fluorescein	$0,05 \pm 0,02$
Bengalrosa	$1,05 \pm 0,06$
Eosin Y	$0,71 \pm 0,10$
Erythrosin B	$1,07 \pm 0,13$

Anpassung der Photosensibilisator-Konzentration und Belichtungszeit

Für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse musste zunächst gewährleistet werden, dass die Photosensibilisatoren während der Versuche die gleiche Energie aufnehmen. Hierzu wurden zu Beginn sowohl die Konzentration der Photosensibilisatoren als auch die Belichtungszeiten angepasst. Die Arbeiten hierzu wurden im Rahmen der Masterthesis von Gianluca Pohl durchgeführt.

Zur Bestimmung der zu einsetzenden Konzentrationen wurden zunächst die Extinktionskoeffizienten am gemessenen Absorptionsmaximum der jeweiligen Photosensibilisatoren bei 10 μM mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Formel 5.1) bestimmt. Die Extinktion wurde mittels Spektralphotometer GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE) gemessen. Die Dicke der verwendeten Küvette betrug 1 cm.

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (5.1)$$

Die Konzentrationen von Bengalrosa, Eosin Y und Erythrosin B wurden anschließend mittels Formel 5.2 an die eingesetzte Konzentration von Fluorescein angepasst. In Tabelle 5.4 sind die gemessenen Absorptionsmaxima, die berechneten Extinktionskoeffizienten und die Faktoren zur Konzentrationsanpassung der Photosensibilisatoren zusammengefasst.

$$c_{\text{Photosensibilisator}} = c_{\text{Fluorescein}} \cdot \frac{\varepsilon_{\text{Fluorescein}}}{\varepsilon_{\text{Photosensibilisator}}} \quad (5.2)$$

Tabelle 5.4: Am jeweiligen Absorptionsmaximum berechnete Extinktionskoeffizienten von Bengalrosa, Eosin Y, Erythrosin B und Fluorescein sowie deren angepasste Konzentrationen.^[145]

Photosensibilisator	Absorptionsmaximum/ nm	Extinktionskoeffizient $\varepsilon/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$	Faktor Anpassung Konzentration
Fluorescein	491	71700	1
Bengalrosa (RB)	548	62900	1,14
Eosin Y (EO)	520	77200	0,93
Erythrosin B (ER)	527	91300	0,79

Zur Belichtung der Photosensibilisatoren wurden aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima verschiedene Power-LEDs genutzt, die sich in Wellenlänge und Leistung unterscheiden. Damit die Photosensibilisatoren während der Versuche mit der gleichen Energie bestrahlt werden, mussten nach Anpassung der Konzentration auch die Belichtungszeiten angepasst werden.

Hierzu wurden zunächst die Leistungen der Lampen mit Hilfe eines Fotoleistungssensors im Abstand von 2 cm gemessen (S120VC, PM100D, Thorlabs, Bergkirchen, Deutschland). Zusätzlich wurden die aufgenommenen Spektren der Photosensibilisatoren normiert ($f(\lambda)$) und mit den normierten Spektren der Lampen ($g(\lambda)$; Thorlabs) multipliziert. Die dadurch erhaltenen Spektren $h(\lambda)$ beschreiben, wie viel Energie der Lampe bei einer bestimmten Wellenlänge durch den Photosensibilisator absorbiert wird. Abbildung 5.9 stellt dies beispielhaft für Fluorescein und die Power-LED M490L4 dar. Aus dem Verhältnis der Flächen der Spektren konnte im Anschluss mit der gemessenen Leistung der Lampen die Energie bestimmt werden, die von den Photosensibilisatoren absorbiert wurde (Formel 5.4).

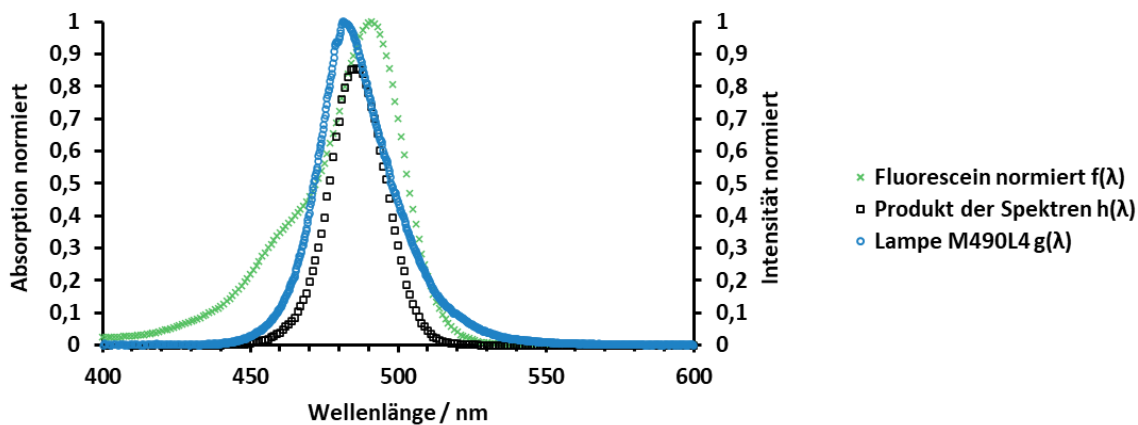


Abbildung 5.9: Normiertes Spektrum der Lampe M490L4 (blauer Kreis), normiertes Absorptionsspektrum von Fluorescein (grünes Kreuz), sowie das Produkt der beiden Spektren (schwarzes Quadrat). Modifiziert nach^[145].

$$E_{Lampe} = P_{Lampe} \cdot t \quad (5.3)$$

$$E_{Photosensibilisator} = P_{Lampe} \cdot t \cdot \frac{\sum_{i=400}^{800} h(\lambda_i)}{\sum_{i=400}^{800} g(\lambda_i)} \quad (5.4)$$

Zuletzt wurden die Belichtungszeiten der Photosensibilisatoren Bengalrosa, Eosin Y und Erythrosin B gemäß Formel 5.5 an die Belichtungszeiten von Fluorescein angepasst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

$$t_{Photosensibilisator} = \frac{E_{Fluorescein}}{E_{Photosensibilisator}} \cdot t_{Fluorescein} \quad (5.5)$$

Tabelle 5.5: Angepasste Belichtungszeiten der verwendeten Photosensibilisatoren.^[145]

Photosensibilisator	Belichtungszeit/ min			
Fluorescein	05:00	10:00	30:00	60:00
Bengalrosa	03:55	07:49	23:28	46:56
Eosin Y	05:58	11:57	35:50	71:40
Erythrosin B	05:26	10:51	32:33	65:06

Im Rahmen der Masterthesis von Gianluca Pohl wurden zur Immobilisierung von Biomolekülen auf beschichteten Glasobjektträgern verschiedene Methoden untersucht. Die Photosensibilisatoren waren dabei entweder frei in Lösung, gebunden an zu immobilisierenden Biomolekül oder Teil der Oberflächenbeschichtung. Die Belichtung erfolgte über eine Metalllochmaske gemäß Kapitel 4.6. Die größten S/HG-Verhältnisse wurden hierbei vor allem mit der Variante mit oberflächengebundenem Photosensibilisator erzielt. Untersucht wurden unter anderem die Immobilisierung von IL-8 wt und Biotin-5-Fluorescein auf Oberflächen, die mit BSA und Bengalrosa, Eosin Y bzw. Erythrosin B beschichtet wurden. Die Ergebnisse der Versuche sind unter Angabe des S/HG-Verhältnisses in Tabelle 5.6 dargestellt.

Tabelle 5.6: Zusammenfassung der S/HG-Verhältnisse der Immobilisierungsversuche von IL-8 wt und Biotin-5-Fluorescein auf Oberflächen, die mit BSA und Bengalrosa (RB), Eosin Y (EO) bzw. Erythrosin B (ER) beschichtet wurden.

Biomolekül	Beschichtung	S/HG-Verhältnis
IL-8 wt	BSA + RB	1,1
	BSA + EO	-
	BSA + ER	-
Biotin-5-Fluorescein	BSA + RB	1,56
	BSA + EO	1,56
	BSA + ER	-

Die Immobilisierung von IL-8 wt konnte lediglich bei Oberflächen mit BSA und Bengalrosa erfolgreich nachgewiesen werden. Biotin-5-Fluorescein hingegen konnte sowohl auf BSA/RB- als auch auf BSA/EO-Oberflächen nachgewiesen werden. Absorptionsspektren der Photosensibilisatoren in Gegenwart von BSA zeigten, dass Bengalrosa wesentlich langsamer ausbleicht als Eosin Y, und Erythrosin B am schnellsten ausbleicht (Daten nicht gezeigt). Bei der Belichtung von Bengalrosa kann dadurch über einen längeren Zeitraum Singulett-Sauerstoff generiert und IL-8 wt bzw. Biotin-5-Fluorescein immobilisiert werden. In einem weiteren Versuch im Rahmen der Masterthesis von Gianluca Pohl, in dem freies Biotin an BSA/RB, BSA/EO und BSA/ER gebunden werden sollte, konnte kein immobilisiertes Biotin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es wurde vermutet, dass Biotin aufgrund der geringen Größe dicht auf der Oberfläche immobilisiert vorlag und eine anschließende Bindung

an das Nachweisreagenz Streptavidin-Cy3 sterisch gehindert war. Im Fall von Biotin-5-Fluorescein könnte Fluorescein als Spacer dienen, sodass die Zugänglichkeit zur Bindungsstelle von Streptavidin für das konjugierte Biotin erhalten blieb.

Um zu überprüfen, ob Biotin möglicherweise aufgrund einer sterischen Hinderung von Streptavidin-Cy3 nicht nachgewiesen werden konnte und ob Fluorescein als Spacer fungieren könnte, wurde der Versuch im Rahmen meiner eigenen Arbeit mit Biotin-Cadaverin, welches einen nicht-fluoreszenten Linker besitzt, auf BSA/RB-beschichteten Glasobjektträgern wiederholt. Im Gegensatz zu dem Versuch mit freiem Biotin konnten bei Verwendung von Biotin-Cadaverin Spots identifiziert werden (Abbildung 5.10), was die Hypothese einer sterischen Hinderung des Nachweisreagenzes bei Verwendung von Biotin unterstützt. Das ermittelte S/HG-Verhältnis betrug 1,07 und war damit wesentlich geringer als das S/HG-Verhältnis, welches bei der Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein erhalten wurde. Da die verwendete Power-LED (M565L3) Licht zwischen ca. 500 - 750 nm emittiert und Fluorescein bis zu Wellenlängen von ca. 545 nm schwach anregbar ist, wurde vermutet, dass das Fluorescein von Biotin-5-Fluorescein nicht nur als Spacer diente, sondern ebenfalls bei der Belichtung angeregt wurde und so zusätzlich die Immobilisierung von Biotin auf der Oberfläche begünstigte.

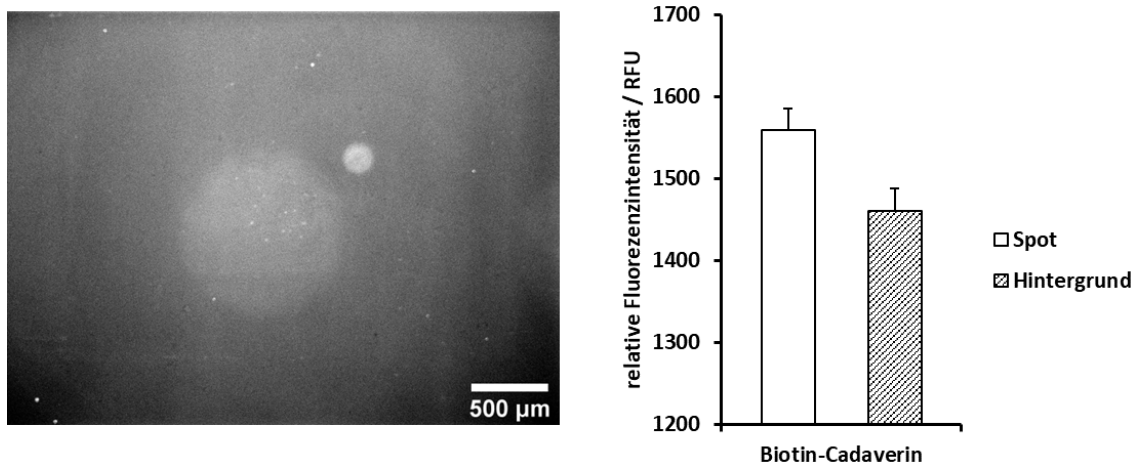


Abbildung 5.10: Immobilisierung von Biotin-Cadaverin auf einem BSA/RB-beschichteten Glasobjektträger mittels Power-LED. Links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von immobilisiertem Biotin-Cadaverin. 80 µM Biotin-Cadaverin wurden für 23:28 min bei 565 nm (Power-LED) auf einem BSA/RB-beschichteten Glasobjektträger bestrahlt. Der Nachweis erfolgte mit 0,01 mg/mL Streptavidin-FITC und Inkubationszeiten von je 1 h. Belichtungszeit am Mikroskop im GFP-Kanal: 2,05 s. Rechts: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4) der relativen Fluoreszenzintensitäten von belichteten (Spot) und unbelichteten (Hintergrund) Bereichen.

Im Rahmen meiner Dissertation wurde Bengalrosa ebenfalls in einer Methode namens *rose bengal and green light crosslinking* verwendet, mit welcher Kollagen modifiziert und quervernetzt werden kann. Die dabei verwendete Konzentration von Bengalrosa beträgt 0,01 % (w/v) bzw. 98 µM in PBS. Um zu überprüfen, ob durch Erhöhung der Bengalrosakonzentration mehr Biotin-Cadaverin immobilisiert werden kann, wurde der Versuch mit dieser Konzentration auf BSA-beschichteten Glasobjektträgern wiederholt. Darüber hinaus wurde

untersucht, ob eine Beschichtung mit Rattenschwanzkollagen (0,01 % (w/v) in PBS) anstelle von BSA die Immobilisierung mittels Bengalrosa verbessern kann. Allerdings konnte Biotin-Cadaverin in keinem dieser Versuche nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Versuche wurden im Anschluss mit IL-8 wt wiederholt. Im Gegensatz zu Biotin-Cadaverin konnte bei IL-8 wt in allen Fällen immobilisiertes Protein nachgewiesen werden (Tabelle 5.7).

Eine Erhöhung der Bengalrosa-Konzentration von 57 μM auf 98 μM in PBS hatte bei der Immobilisierung von IL-8 wt auf BSA-Oberflächen keinen Einfluss auf das S/HG-Verhältnis. Bei Oberflächen, die mit Rattenschwanzkollagen beschichtet wurden, führte die erhöhte RB-Konzentration zu einem geringfügig erhöhten S/HG-Verhältnis. Allerdings waren die erhaltenen S/HG-Verhältnisse in beiden Fällen kleiner als bei der Nutzung von BSA-Oberflächen (Tabelle 5.7).

Im Anschluss wurde untersucht, ob eine höhere Rattenschwanzkollagen-Konzentration von 0,3 % (w/v) in PBS einen Effekt auf das S/HG-Verhältnis hat. Im Fall von Biotin-Cadaverin konnten weiterhin keine Spots auf den Oberflächen identifiziert werden. Bei der Immobilisierung von IL-8 wt wurde ein S/HG-Verhältnis von 1,27 erreicht, was um 0,22 höher war als bei einer Rattenschwanzkollagen-Konzentration von 0,01 % (w/v) (Tabelle 5.7).

In weiteren Versuchen wurde anstelle von Rattenschwanzkollagen Gelatine verwendet, welche aus denaturiertem Kollagen besteht. Hierbei wurden Oberflächenbeschichtungen mit den Gelatine-Konzentrationen von 0,3 % (w/v) und 3 % (w/v) in PBS untersucht. In beiden Fällen konnte Biotin-Cadaverin nicht immobilisiert werden. Bei IL-8 wt hingegen wurden S/HG-Verhältnisse von 1,19 bei 0,3 % (w/v) bzw. 1,29 bei 3 % (w/v) erhalten (Tabelle 5.7). Das S/HG-Verhältnis von 1,29 auf Gelatine/RB-beschichteten Glasobjektträgern war das höchste Verhältnis, das mittels Power-LED für die Immobilisierung von IL-8 im Rahmen dieser Arbeit erreicht wurde.

Tabelle 5.7: Zusammenfassung der S/HG-Verhältnisse der Immobilisierung von Biotin-Cadaverin und IL-8 wt auf BSA/RB- bzw. Rattenschwanzkollagen/RB-beschichteten Glasobjektträgern mit unterschiedlichen RB-Konzentrationen.

Biomolekül	Beschichtung Oberfläche	Protein-konzentration	Konzentration Bengalrosa	S/HG-Verhältnis
IL-8 wt	BSA + RB	3 % (w/v)	57 μM	1,07
			98 μM	1,07
	Rattenschwanz-kollagen + RB	0,01 % (w/v)	57 μM	1,02
			98 μM	1,05
	Rattenschwanz-kollagen + RB	0,3 % (w/v)	98 μM	1,27
	Gelatine + RB	0,3 % (w/v)	98 μM	1,19
		3 % (w/v)	98 μM	1,29

5.1.4 Immobilisierung mittels CLSM

Eine maskenlose Immobilisierung von Biomolekülen mittels PAP kann ebenfalls mit Hilfe eines Konfokalmikroskops erreicht werden.^[73] Vorteile hierbei sind die hohe Auflösung des Mikroskops sowie die hohe Lichtintensität des Lasers. Um zu untersuchen, ob die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse weiter gesteigert werden können, wurden einige Versuche mittels Belichtung durch CLSM wiederholt.

Zunächst wurde hierzu die geeignete Lichtintensität und Belichtungszeit (gemessen als Anzahl der Frames) anhand des Modellmoleküls Biotin-5-Fluorescein auf BSA-beschichteten Glasobjektträgern untersucht. Lichtintensitäten von 100 % und 75 % wurden mit 200, 100 und 50 Frames kombiniert.

Bei Lichtintensitäten von 75 % waren die belichteten quadratischen Flächen unzureichend erkennbar (Daten nicht gezeigt). Abbildung 5.11 zeigt die Aufnahmen der mit 100 % Lichtintensität belichteten Flächen nach Fluoreszenzfärbung mittels Streptavidin-Cy3 sowie die daraus erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten. Hierbei fällt auf, dass die Anzahl der Frames nicht mit der Fluoreszenzintensität korreliert. Die deutlichste Abgrenzung zwischen belichtetem und unbelichtetem Bereich sowie die höchsten Fluoreszenzintensitäten wurden bei 100 Frames und einer Laserintensität von 100 % erhalten. Dies resultierte in einem S/HG-Verhältnis von 1,91 (Tabelle 5.8). Verglichen mit dem S/HG-Verhältnis, welches bei der Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein mittels Power-LED erhalten wurde (siehe Tabelle 5.2), konnte das S/HG-Verhältnis durch die Immobilisierung mittels CLSM um ca. 0,4 erhöht werden. Wie bereits zuvor in anderen Versuchen sind auch auf den Aufnahmen der mittels CLSM immobilisierten Biomoleküle Bereiche hoher Fluoreszenzintensität erkennbar. Die Auswirkung dieser Inhomogenitäten sind in Abbildung 5.11 deutlich erkennbar, da die Fluoreszenzintensitäten teilweise um ca. 500 - 1000 RFU abweichen. Dies führt, wie bereits zuvor beschrieben, zu verfälschten S/HG-Verhältnissen. Da die Belichtung mittels Konfokalmikroskop auf einer kleineren Fläche stattfindet als mittels Power-LED, haben diese Inhomogenitäten womöglich jedoch einen geringeren Einfluss auf das S/HG-Verhältnis.

Tabelle 5.8: Zusammenfassung der S/HG-Verhältnisse der Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM bei unterschiedlicher Lichtintensität und Anzahl der Frames.

Lichtintensität/ %	Frames	S/HG-Verhältnis
100	100	1,91
	200	1,70
	50	1,55
75	100	1,56
	200	-

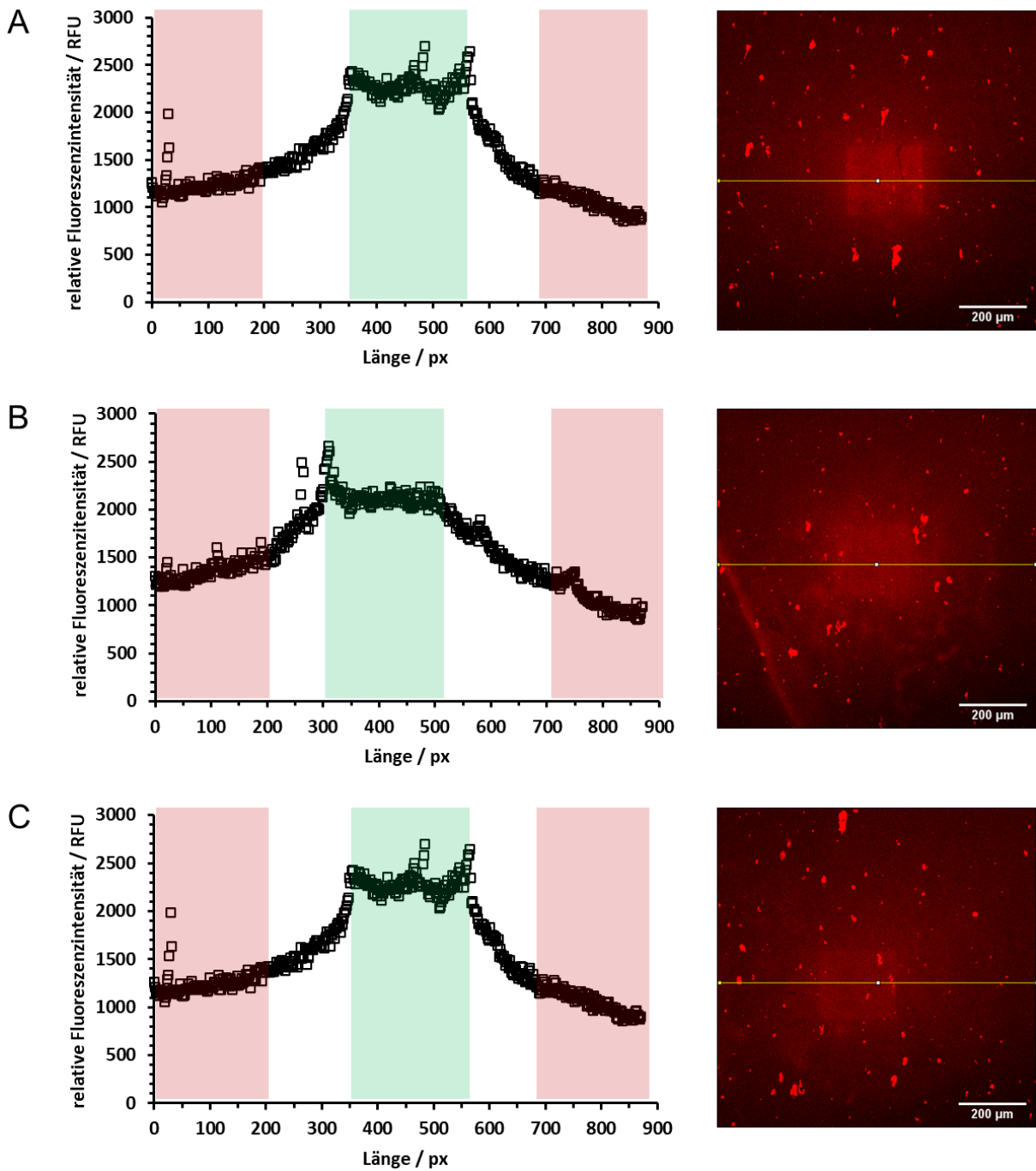


Abbildung 5.11: Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM. Rechts: CLSM-Aufnahme im roten Kanal von immobilisiertem Biotin-5-Fluorescein angefärbt mit Streptavidin-Cy3. 80 μM Biotin-5-Fluorescein wurden auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM unter verschiedenen Bedingungen bestrahlt. (A) 100 % Lichtintensität, 100 Frames. (B) 100 % Lichtintensität, 200 Frames. (C) 100 % Lichtintensität, 50 Frames. Der Nachweis erfolgte mit 0,01 mg/mL Streptavidin-Cy3 und einer Inkubationszeit von 1 h. Links: Darstellung der relativen Fluoreszenzintensitäten entlang der gelben Linie der CLSM-Aufnahme. Rot: Unbelichteter Bereich. Grün: Belichteter Bereich.

Im Folgenden wurde die Immobilisierung von IL-8 mittels CLSM wiederholt, um zu untersuchen, inwiefern die Belichtungsquelle das S/HG-Verhältnis beeinflusst. Hierzu sollte IL-8 mittels konjugiertem oder freiem Fluorescein auf BSA-Oberflächen immobilisiert werden. Zur Fluoreszenzfärbung wurden nach Belichtung anti-humaner IL-8 Antikörper und Cy3-konjugierter anti-Maus Antikörper verwendet.

Eine Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf BSA war nicht nachweisbar. Im roten Kanal konnte nach Inkubation mit anti-IL-8 und Cy3-konjugiertem anti-Maus kein IL-8 auf der Oberfläche detektiert werden. Im grünen Kanal hingegen war der belichtete Bereich sichtbar ausgebleicht (Abbildung 5.12). Das spricht für einen starken Photobleichprozess, bei dem vermutlich auch das Protein geschädigt wurde. Dies würde wiederum dazu führen, dass die Antikörper nicht an IL-8 binden und es nicht mehr im roten Kanal detektiert werden kann. Hipper *et al.*^[150] berichten darüber, dass es durch die Belichtung von Photosensibilisatoren zu oxidativen Schäden des Proteins kommen kann. Da Fluorescein direkt an IL-8 konjugiert vorlag und mit der passenden Wellenlänge belichtet wurde, besteht die Möglichkeit, dass IL-8 bei der Belichtung oxidiert wurde und somit entweder nicht mehr an die Oberfläche oder an den Antikörper binden konnte.

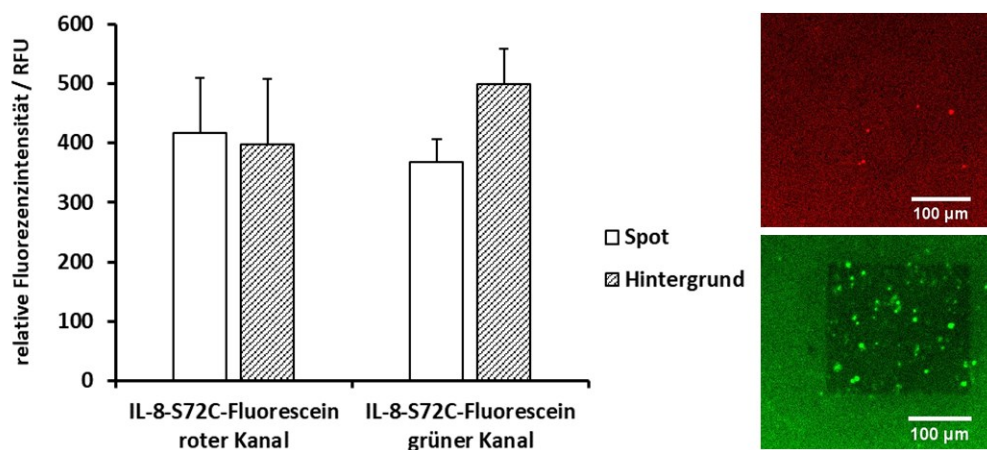


Abbildung 5.12: Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM. 80 µM IL-8-S72C-Fluorescein wurden auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM bei 100 % und 100 Frames belichtet. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:1000) und Inkubationszeiten von je 1 h. Links: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung (n=4) der relativen Fluoreszenzintensitäten von belichteten (Spot) und unbelichteten (Hintergrund) Bereichen im roten und grünen Kanal. Rechts: CLSM-Aufnahmen des belichteten und unbelichteten Bereichs im roten (oben) und grünen Kanal (unten).

Anders als bei IL-8-S72C-Fluorescein konnte IL-8 wt bei Anwesenheit von freiem Fluorescein im roten Kanal detektiert werden (Abbildung 5.13). Allerdings war der belichtete Bereich nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper ebenfalls im grünen Kanal deutlich sichtbar. Das Verhältnis von Signal-zu-Hintergrund im grünen Kanal lag mit ca. 2,1 um 0,5 höher als im roten Kanal, wo ein S/HG-Verhältnis von 1,6 gemessen wurde. Dies war nicht zu erwarten, da eine Belichtung mit der Anregungswellenlänge zu einer Photobleichung von Fluorescein führen sollte und eine Inkubation mit Cy3-markiertem Sekundärantikörper gleichzeitig zu einer stärkeren Fluoreszenz im roten Kanal führen sollte. Möglicherweise war die Photooxidation geringer, weil der Photosensibilisator nicht an IL-8 konjugiert vorlag und der Energietransfer somit weniger effizient wäre. Dass der belichtete Bereich im grünen Kanal sichtbar war, spricht dafür, dass während der Belichtung ein Prozess abläuft, der ebenfalls den Photosensibilisator an die Oberfläche bindet und dieser dabei seine Fluoreszenz beibehält. Gestützt wird diese Hypothese durch einen Versuch, bei dem IL-8 wt und freies Fluorescein mittels Power-LED belichtet wurden und der belichtete Bereich im GFP-Kanal bereits nach dem Belichten vor der Inkubation mit den Antikörpern sichtbar war (siehe Anhang Abbildung 7.3).

Die Anregung im grünen Kanal des CLSM erfolgte bei 488 nm. Bei dieser Wellenlänge kann neben dem immobilisierten Fluorescein auch der für die Fluoreszenzmarkierung verwendete Cy3-konjugierte anti-Maus Antikörper angeregt werden. Bei 488 nm erreicht die Absorption durch Cy3 15 % ihres Maximums. Neben dieser direkten Anregung kann auch das durch Fluorescein emittierte Licht den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 anregen. Am Emissionsmaximum von Fluorescein erreicht die Absorption durch Cy3 ca. 45 % ihres Maximums. Da Cy3 Licht im Bereich von ca. 530 - 700 nm emittiert, war es ebenfalls im grünen Kanal ($\lambda_{Em} = 500 - 550 \text{ nm}$) detektierbar. Im grünen Kanal wurde daher sowohl immobilisiertes Fluorescein sowie fluoreszenzmarkiertes IL-8 wt aufgenommen. Dies wiederum kann die Mittelwerte verfälschen und zu einem gegenüber dem roten Kanal erhöhten S/HG-Verhältnis führen. Da im roten Kanal mit einer Wellenlänge von 552 nm angeregt wurde und Fluorescein nur bis zu Wellenlängen von ca. 545 nm schwach anregbar ist, wurde hier lediglich immobilisiertes IL-8 detektiert.

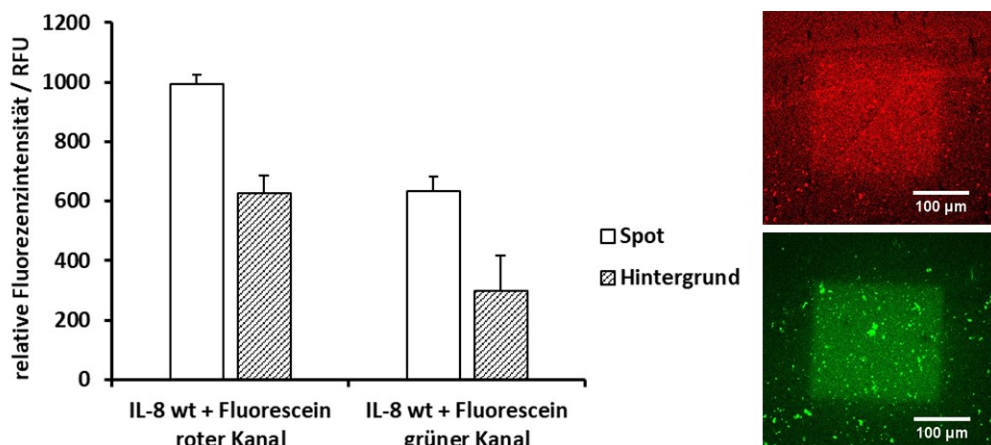


Abbildung 5.13: Immobilisierung von IL-8 wt mit Fluorescein auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM. 80 μM IL-8 wt und 80 μM Fluorescein wurden gemeinsam auf einem BSA-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM bei 100 % und 100 Frames belichtet. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:1000) und Inkubationszeiten von je 1 h. Links: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) der relativen Fluoreszenzintensitäten von belichteten (Spot) und unbelichteten (Hintergrund) Bereichen im roten und grünen Kanal. Rechts: CLSM-Aufnahmen des belichteten und unbelichteten Bereichs im roten (oben) und grünen Kanal (unten).

Die Immobilisierung von IL-8 wt mittels CLSM wurde ebenfalls auf Kollagen/Bengalrosa-Oberflächen untersucht. Zur Detektion wurde FITC-markierter anti-IL-8 Antikörper verwendet. In Abbildung 5.14 sind die Ergebnisse der Immobilisierung von IL-8 wt auf einem mit 0,3 % Rattenschwanzkollagen und 98 μ M RB beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM dargestellt. Wie erwartet konnte IL-8 wt nach Fluoreszenzfärbung mittels anti-IL-8-FITC im grünen Kanal nachgewiesen werden, sodass der belichtete Bereich heller erschien. Im Mittel betrug die relative Fluoreszenzintensität des belichteten Bereichs ca. 420 RFU und die des Hintergrunds ca. 320 RFU, sodass ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 1,32 erreicht wurde. Im roten Kanal war der belichtete Bereich wie erwartet nicht abgegrenzt erkennbar. Dieses Ergebnis ist um einen Wert von 0,05 höher, aber dennoch vergleichbar mit dem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 1,27 (siehe Tabelle 5.8), welches unter Verwendung der Power-LED erhalten wurde.

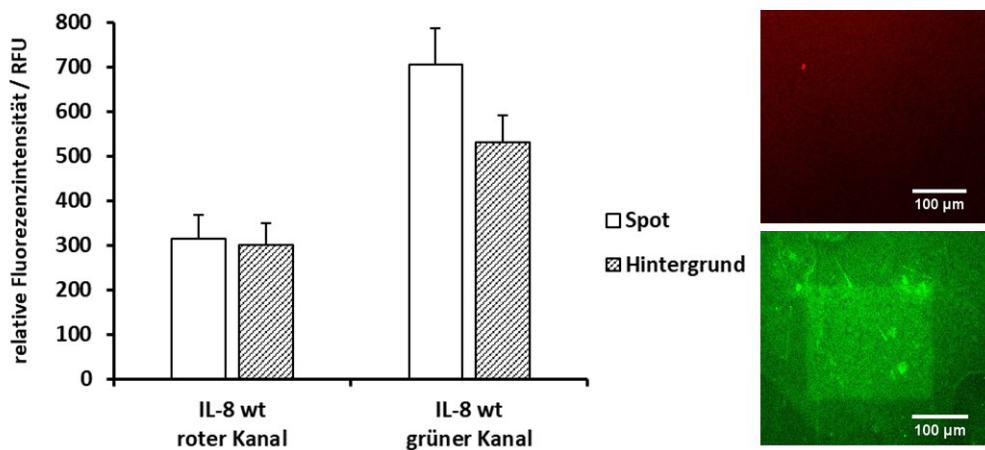


Abbildung 5.14: Immobilisierung von IL-8 wt mit Fluorescein auf einem Rattenschwanzkollagen/RB-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM. 80 μ M IL-8 wt wurden auf einem Rattenschwanzkollagen/RB-beschichteten Glasobjektträger mittels CLSM bei 100 % und 100 Frames belichtet. Der Nachweis erfolgte mit 10 μ g/mL anti-IL-8-FITC und einer Inkubationszeit von 1 h. Links: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=4$) relativen Fluoreszenzintensitäten von belichteten (Spot) und unbelichteten (Hintergrund) Bereichen im roten und grünen Kanal. Rechts: CLSM-Aufnahmen des belichteten und unbelichteten Bereichs im roten (oben) und grünen Kanal (unten).

5.2 Charakterisierung von quervernetztem Kollagen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden unterschiedliche Kollagensheets untersucht und mittels RGX modifiziert. Bei den Untersuchungen der Wirkung von RGX auf die Kollagene wurde besonderes Augenmerk auf das Quellverhalten und die Mikrostruktur sowie auf die mechanischen Eigenschaften und die Freisetzung von Wirkstoffen gelegt. Darüber hinaus wurde die Herstellung von Kollagenlaminaten aus einzelnen Kollagensheets getestet und diese bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften und Mikrostruktur analysiert.

5.2.1 Übersicht über die verwendeten Kollagensheets

Um eine möglichst große Variabilität in späteren Laminaten erzielen zu können, wurden Kollagensheets mit unterschiedlichen Eigenschaften ausgewählt. Abbildung 5.15 zeigt makroskopische Aufnahmen der in dieser Arbeit verwendeten Kollagensheets. Collagen Solutions (C) ist eine dünne, flexible Kollagenfolie mit erkennbaren, sich wiederholenden Prägungen. Es handelt sich hierbei um Rinderkollagen Typ I medizinischer Qualität. Viscofan (V) zeigt ebenfalls eine kompakte Struktur und wurde aus Rinderkollagen Typ I hergestellt. Bei Atelocollagen (A) handelt es sich um hochreines, poröses, schwammartiges, unvernetztes Atellocollagen Typ I aus Rinderdermis, das für dreidimensionale Zellkulturen entwickelt wurde.

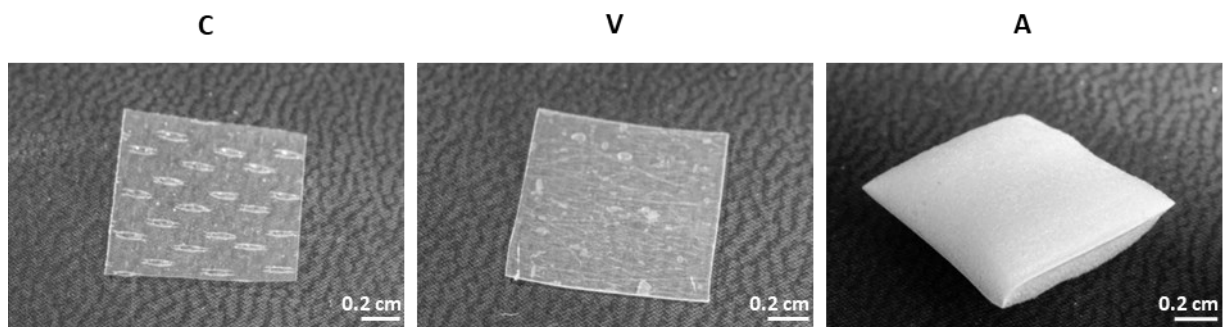


Abbildung 5.15: Fotografien der verwendeten Kollagensheets. Probengröße: 1x1 cm². C: Collagen Solutions, V: Viscofan und A: Atelocollagen.^[141]

In Tabelle 5.9 sind die Dicken der verwendeten Kollagenmaterialien gemäß Hersteller und nach Dickenmessung im trockenen Zustand mittels Höhenmessgerät angegeben.

Tabelle 5.9: Dicke der verschiedenen Kollagensheets gemäß Hersteller und nach Analyse mittels Höhenmessgerät.

Kollagen	Dicke gemäß Hersteller	Dicke (1 N ± 0,2 N)
C	n/a	25 μm ± 2 μm
V	ca. 140 μm	124 μm ± 1 μm
A	5 mm	1569 μm ± 62 μm

5.2.2 Charakterisierung von Quellverhalten, Mikrostruktur, Dicke und Stabilität

5.2.2.1 Kollagensheets „wie erhalten“

Quellverhalten

Der Quellgrad der Kollagenproben „wie erhalten“ wurde nach 2 h, 4 h und 24 h Quellung in 2 mL PBS bei 37 °C und RT gemessen (Abbildung 5.16). Nach 2 h war keine weitere Quellung in PBS erkennbar, weshalb für folgende Quellversuche stets 2 h verwendet wurde.

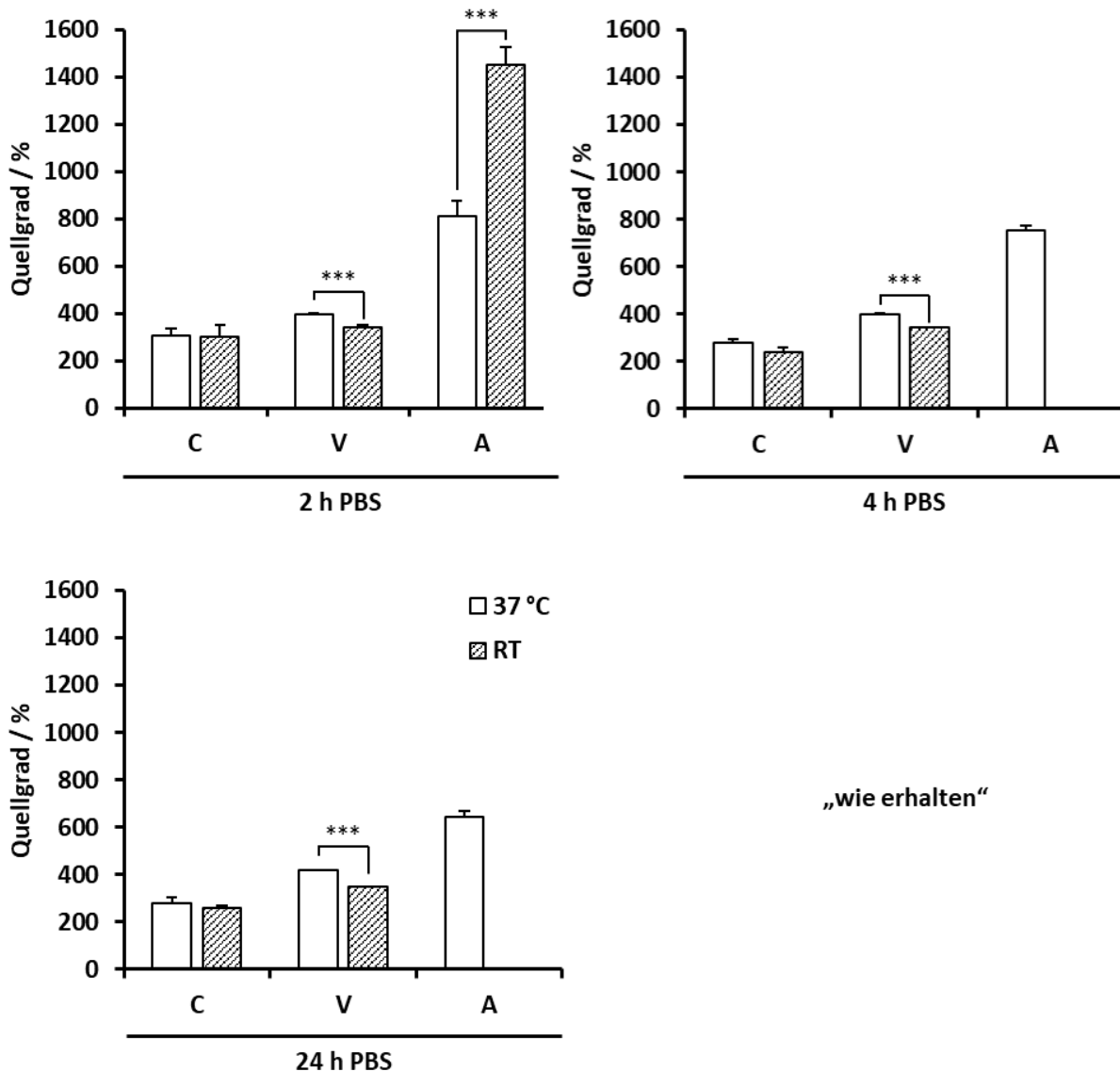


Abbildung 5.16: Quellgrad von Kollagen Sheets „wie erhalten“ bei 37 °C und RT nach 2 h, 4 h und 24 h bezogen auf ihr Trockengewicht (100 %).^[141] Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3). Die Sterne geben die Signifikanz an.

Für Collagen Solutions wurde keine Temperaturabhängigkeit beobachtet, da die Kollagen Sheets den gleichen Quellgrad von 300 % (w/w) zeigten. Bei Viscofan wurde bei 37 °C bzw. RT ein Quellgrad von 400 % (w/w) bzw. 340 % (w/w) beobachtet, was auf eine signifikante Temperaturabhängigkeit der Quellung hindeutet. Für Atelocollagen-Proben wurde ebenfalls eine signifikante Temperaturabhängigkeit beobachtet. Bei 37 °C erreichten die Proben 810 % (w/w) ihrer Trockenmasse. Das mit Abstand größte Quellvermögen wurde mit bis zu 1440 % (w/w) bei RT erhalten. Der Quellgrad nach 4 h und 24 h konnte bei Atelocollagen nur bei 37 °C gemessen werden, da Proben bei RT während der Messung von 2 h durch Instabilität des Kollagenschwamms zerstört wurden.

Dicke und Stabilität

Die Dicke der Kollagene „wie erhalten“ wurde nach Konditionierung der Sheets für 24 h in PBS bei 37 °C bzw. RT mit Hilfe eines Höhenmessgeräts unter Anwendung von 1 N ermittelt (Abbildung 5.17). Die größte Dicke mit 0,55 mm wurde für Viscofan bei 37 °C gemessen. Für RT wurde eine um 25 % kleinere Dicke ermittelt. Abhängig von der Temperatur zeigten sich ebenso die Proben von Collagen Solutions, die bei 37 °C um 33 % dicker waren als bei RT. Im Fall von Atelocollagen wurden die Proben nach der ersten oder zweiten Messung irreversibel komprimiert bzw. beschädigt (Abbildung 5.18), was zu geringen Dicken führte. Ob die Dicke von Atelocollagen eine Temperaturabhängigkeit vorweist, konnte daher nicht ermittelt werden.

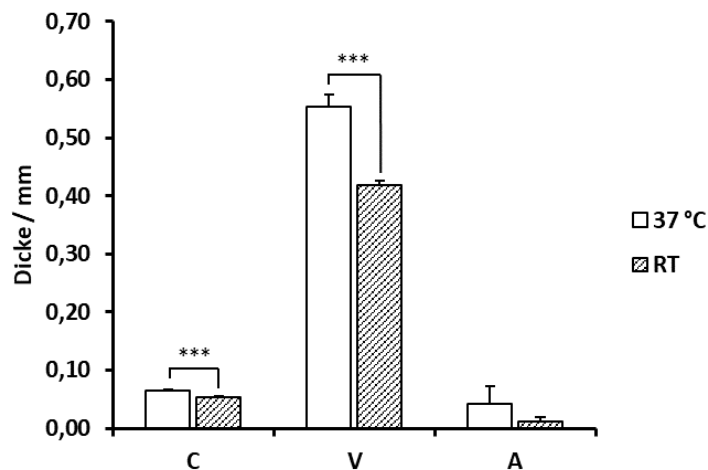


Abbildung 5.17: Dicke unterschiedlicher Kollagensheets „wie erhalten“ bei 37 °C und RT. Die Proben wurden zuvor für 2 h in PBS konditioniert.^[144] Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3). Die Sterne geben die Signifikanz an.



Abbildung 5.18: Fotografie einer während der Dickenmessung beschädigten Atelocollagen-Probe „wie erhalten“.

Mikrostruktur

Für eine genauere Untersuchung der Kollagenproben wurden diese mittels Durchlichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie (REM) charakterisiert (Abbildung 5.19). Die Proben der Collagen Solutions Sheets erschienen dicht und ohne erkennbare Faserstruktur. Viscofan-Proben zeigten jedoch eine stark vernetzte Struktur mit langen Fasern, die sowohl unter dem Lichtmikroskop als auch durch REM erkennbar waren. Proben von Atelocollagen zeigten eine offene, schwammartige Struktur mit breiten Poren, die unter dem Lichtmikroskop im feuchten Zustand sichtbar waren und die im trockenen Zustand durch REM-Bildgebung dichter erschienen.

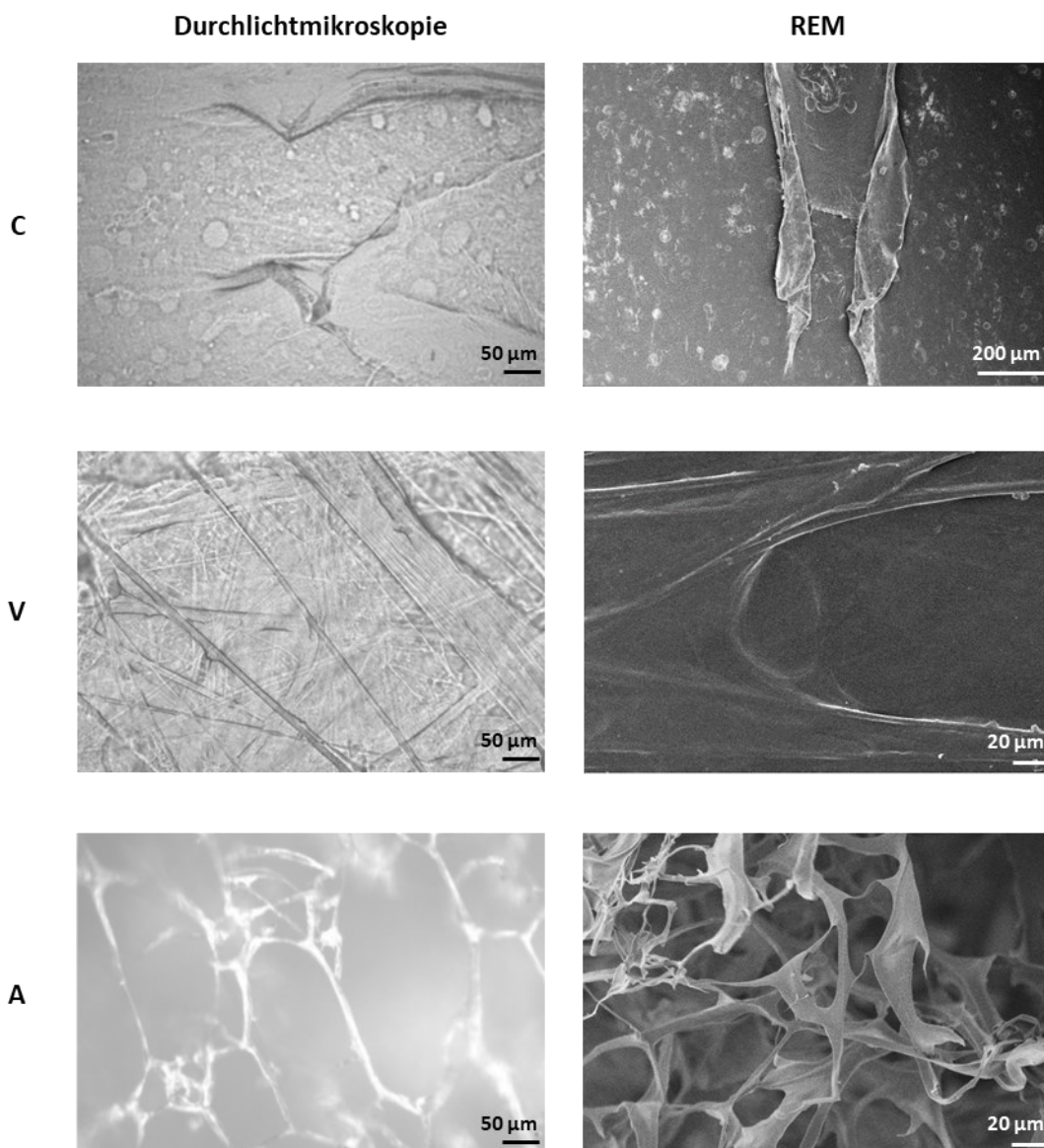


Abbildung 5.19: Durchlichtmikroskop- und REM-Aufnahmen von Kollagensheets.^[141] Mittels Durchlichtmikroskopie analysierte Proben wurden in PBS konditioniert. Vergrößerung Durchlichtmikroskop: 200x. REM-Vergrößerung: V und A: 1000x, C: 200x. C: Collagen Solutions, V: Viscofan und A: Atelocollagen.

5.2.2.2 Modifikation von Kollagensheets mittels RGX

Um stabilisierte Kollagensheets für eine verbesserte Handhabung zu erhalten, wurden Kollagensheets von Collagen Solutions, Viscofan und Atelocollagen unter verschiedenen Bedingungen mittels RGX behandelt. Zur Untersuchung des Einflusses von RGX wurden Konzentrationen von 0,1 % RB und 0,01 % RB mit Belichtungszeiten von 10 min bzw. 60 min kombiniert. Abbildung 5.20 zeigt Aufnahmen der Kollagensheets, nachdem diese mittels RGX modifiziert wurden. Die Kapazität bzw. das nutzbare Volumen für die Beladung der Kollagensheets wurde gemäß Formel 4.3 für jede Charge neu bestimmt.

Im Fall von Collagen Solutions wird für die Sheets, die mit 0,1 % RB beladen wurden, eine deutliche Entfärbung mit längerer Belichtungszeit deutlich. Die Sheets, die mit 0,01 % RB beladen wurden, wurden unabhängig von der Belichtungszeit gleichermaßen entfärbt. Grund hierfür ist das geringe Quellvolumen (ca. 10 μL) der Sheets und die damit verbundene geringe Menge an Bengalrosa. Im Gegensatz zu den Proben von Collagen Solutions waren für Sheets von Viscofan mit 0,1 % RB keine Entfärbung mit zunehmender Belichtungszeit zu erkennen. Vermutlich liegt dies an dem größeren Volumen (ca. 50 μL) und der größeren Menge an Bengalrosa, die aufgenommen wurde. Für 0,01 % RB ist eine Entfärbung mit zunehmender Belichtungszeit erkennbar. Im Fall von Atelocollagen ist unabhängig von der Belichtungszeit eine gleich starke Färbung der Proben von 0,1 % RB und 0,01 % RB sichtbar. Die Belichtungszeit hat aufgrund des vergleichbar großen Quellvolumens (ca. 100 μL) und somit hohen Mengen an RB in der Probe keinen sichtbaren Entfärbungseffekt.

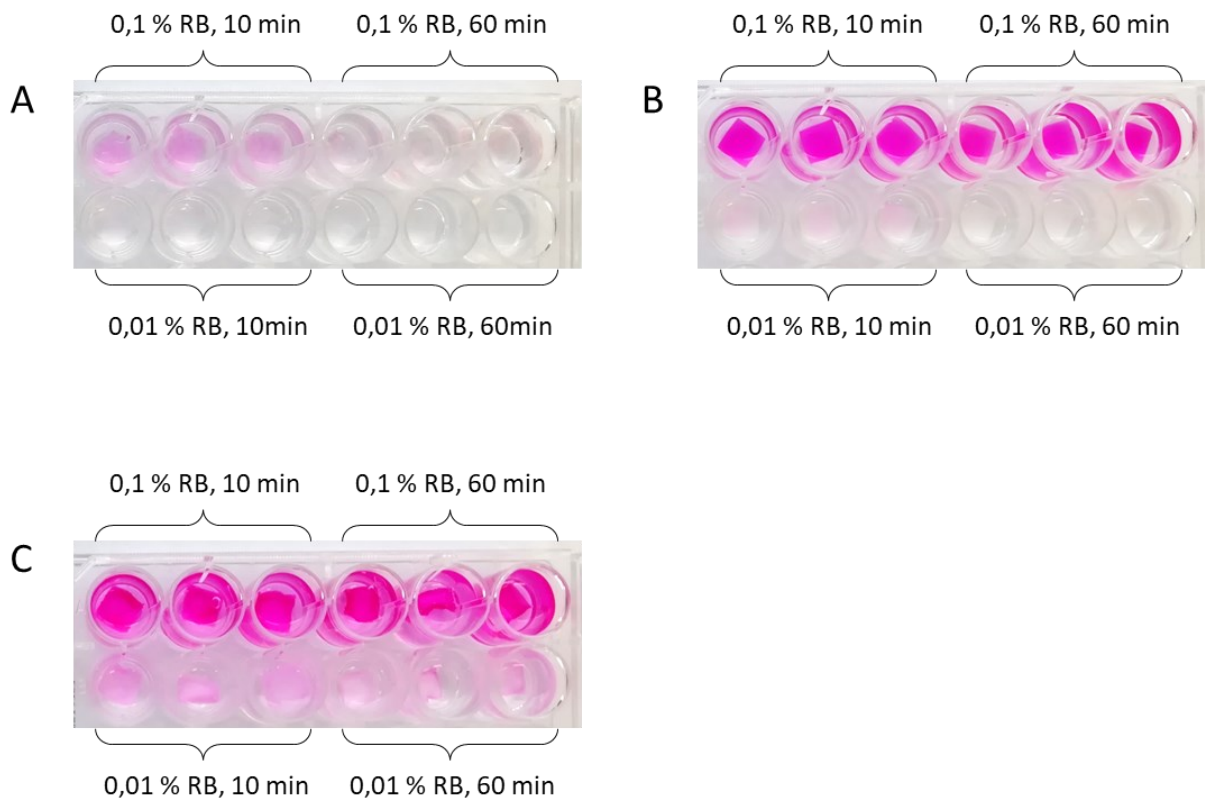


Abbildung 5.20: Aufnahme der Kollagensheets von (A) Collagen Solutions, (B) Viscofan und (C) Atelocollagen nach Modifikation mittels RGX. Die RB-Konzentration betrug 0,1 % bzw. 0,01 %. Die Belichtung erfolgte für 10 min bzw. 60 min.

Auswirkung von RGX auf das Quellverhalten

Zur Vernetzung mittels RGX wurden Proben mit RB in PBS beladen, vernetzt und vor weiteren Experimenten lyophilisiert. Um die Auswirkung der Beladung und Trocknung beurteilen zu können, wurden als Kontrolle Kollagensheets mit PBS beladen, lyophilisiert und im Anschluss daran analysiert. Die mit PBS beladenen Proben werden im Folgenden als „unmodifiziert“ bezeichnet, um sie von Proben „wie erhalten“ (siehe Abbildung 5.16) zu unterscheiden. In Abbildung 5.21 wird der Quellgrad von Collagen Solutions, Viscofan und Atelocollagen nach Beladung mit PBS bei 37 °C und RT dargestellt. Collagen Solutions und Viscofan zeigten unabhängig von der Temperatur und Dauer die gleichen Quellgrade und Temperaturabhängigkeit wie bei den Proben „wie erhalten“. Im Fall von Atelocollagen führte die Beladung mit PBS und anschließendes Gefriertrocknen zu einem geringeren Quellgrad und einem Verlust der Temperaturabhängigkeit. Wie bei den Proben „wie erhalten“ konnte der Quellgrad der unmodifizierten Proben nach 4 h und 24 h nur teilweise oder nicht gemessen werden, da die Proben aufgrund ihrer Instabilität während der 2 h Messung zerstört wurden.

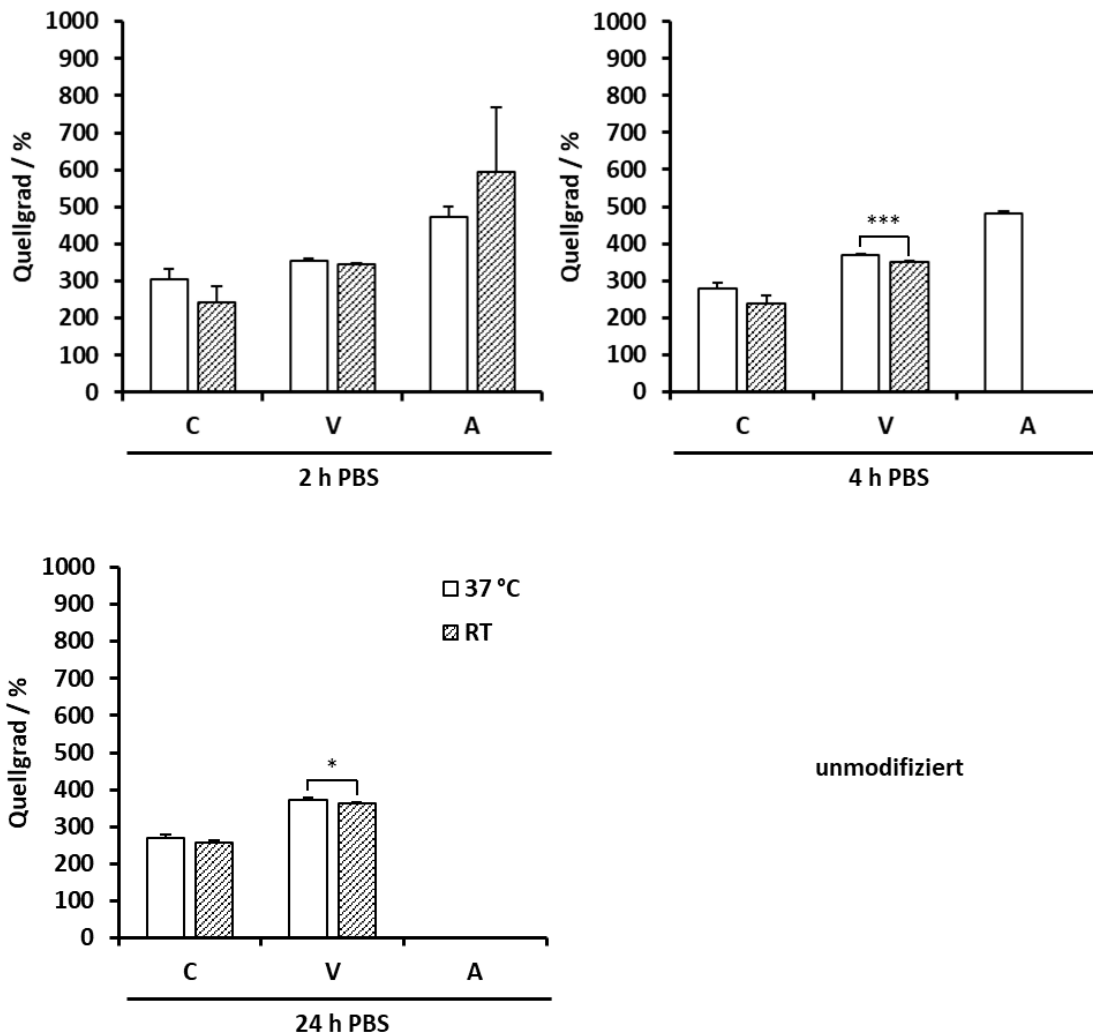


Abbildung 5.21: Quellgrad von unmodifizierten Kollagensheets bei 37 °C und RT nach 2 h, 4 h und 24 h bezogen auf ihr Trockengewicht (100 %).^[141] Unmodifizierte Atelocollagen-Proben wurden während der 2 h- und 4 h-Messungen zerstört, sodass für 4 h bei RT und 24 h keine Ergebnisse erhalten wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3). Die Sterne geben die Signifikanz an. C: Collagen Solutions, V: Viscofan und A: Atelocollagen.

Für die Quellversuche modifizierter Proben wurden Konzentrationen von 0,1 % RB und 0,01 % RB mit Belichtungszeiten von 10 min bzw. 60 min kombiniert (Abbildung 5.22). Die Analyse des Quellgrads wurde nach 2 h bei 37 °C durchgeführt. Wegen der höheren Quellung der beladenen Sheets von Collagen Solutions und Viscofan bei 37 °C ist zu erwarten, dass ein Einfluss von RGX bei 37 °C leichter zu ermitteln wäre.

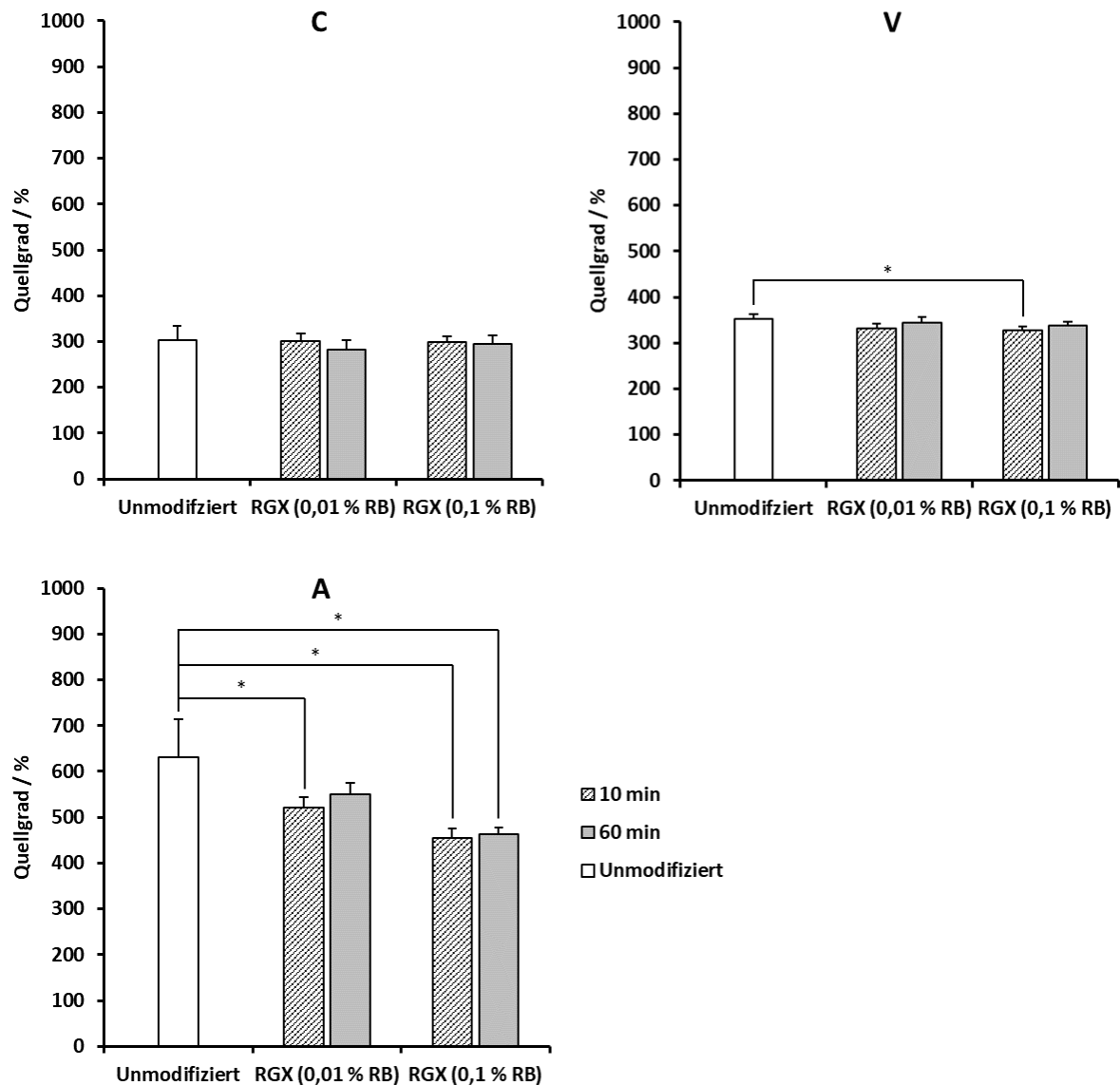


Abbildung 5.22: Quellgrad von unmodifizierten und mittels RGX modifizierten Kollagensheets bei 37 °C. Für die Modifikation mit RGX wurden Belichtungszeiten von 10 min und 60 min mit RB-Konzentrationen von 0,1 % und 0,01 % kombiniert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3). Die Sterne geben die Signifikanz an. C: Collagen Solutions, V: Viscofan, A: Atelocollagen.

Sowohl für Proben von Collagen Solutions als auch für Proben von Viscofan hatte die Dauer der Belichtung und die Konzentration von Bengalrosa keinen Einfluss auf den Quellgrad der Kollagensheets. Im Fall von Collagen Solutions erreichten unmodifizierte und modifizierte Proben im gequollenen Zustand gleichermaßen 300 % (w/w) ihrer Trockenmasse. Viscofan zeigte einen Quellgrad von 330 % (w/w) für unmodifizierte Proben und 350 % (w/w) für modifizierte Proben (0,1 % RB, 10 min). Im Fall von Atelocollagen nahm der Quellgrad nach der Modifikation mit 0,01 % RB für die Belichtungszeiten von 10 min bzw. 60 min von 630 % (w/w) auf 520 % (w/w) bzw. 550 % (w/w) ab. Eine sechsmal längere Belichtungszeit hatte demnach keinen weiteren Einfluss auf den Quellgrad. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für eine RB-Konzentration von 0,1 %, bei der eine Belichtungszeit von 10 min bzw. von 60 min in Quellgraden von 455 % (w/w) bzw. 462 % (w/w) resultierten. Wie Versuche von Kooperationspartnerinnen zeigten, hatte eine Konzentration von 0,1 % RB eine toxische Wirkung auf Osteoblasten und wurde daher als nicht geeignet angesehen.^{11[141]} Insgesamt zeigten Atelocollagen-Sheets nach Modifikation mit RGX eine kompaktere Struktur und waren während der gesamten Messungen stabil, was ihre Handhabung im Vergleich zu Proben „wie erhalten“ und unmodifizierten Proben erleichterte.

Abbildung 5.23 stellt die Ergebnisse unterschiedlicher Kontrollversuche mit einer Belichtungszeit von 10 min und einer Bengalrosa-Konzentration von 0,01 % dar. Hierbei wurden die Kollagenproben mit 0,01 % Bengalrosa beladen und mit Umgebungslicht behandelt (0 min, 0,01 % RB) oder lediglich mit PBS beladen und für 10 min mit grünem Licht belichtet (10 min, 0 % RB).

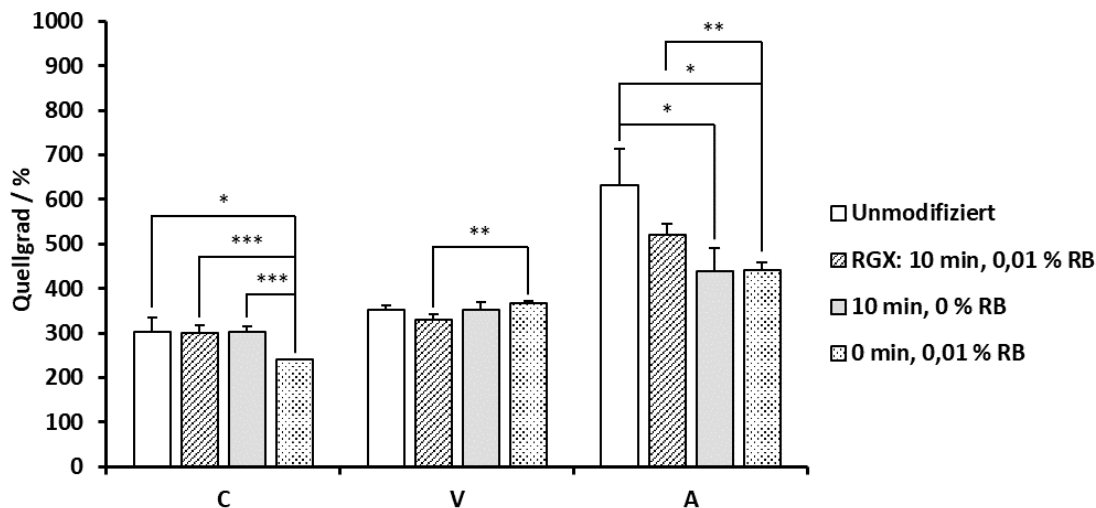


Abbildung 5.23: Kontrollversuche der Untersuchung des Quellgrads von unmodifizierten und mit RGX modifizierten Proben von Collagen Solutions, Viscofan und Atelocollagen. Als Kontrolle dienten mit 0,01 % RB beladene Kollagensheets, die einer Standardlaborbeleuchtung (0 min, 0,01 % RB) ausgesetzt wurden, und mit PBS beladene Kollagensheets, die grünem Licht (10 min, 0 % RB) ausgesetzt wurden. Die Quellung erfolgte für 2 h bei 37 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3). Die Sterne geben die Signifikanz an. C: Collagen Solutions, V: Viscofan und A: Atelocollagen.

¹¹ durchgeführt von Joy Braun, AK PD Dr. Ulrike Ritz, Zentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsmedizin JGU Mainz

Die Belichtung lediglich mit grünem Licht hatte bei Collagen Solutions und Viscofan keinen Einfluss auf das Quellvermögen. Bei Atelocollagen wurde, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, ein ähnlicher Quellgrad wie bei mit RGX-modifizierten Proben erhalten. Eine Beladung mit Bengalrosa und anschließender Belichtung im Umgebungslicht ergab im Fall von Collagen Solutions bzw. Atelocollagen im Vergleich zu den mit RGX behandelten Proben einen um 20 % bzw. 15 % geringeren Quellgrad. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine Belichtung mit Umgebungslicht bereits zu einer Modifikation des Kollagensheets führte.

Auswirkung von RGX auf Dicke und Stabilität

Zur Bewertung der Wirkung von RGX auf die Stabilität der Kollagene (insbesondere für Atelocollagen) wurde die Dicke von unmodifizierten und RGX-modifizierten Kollagensheets bei 37 °C und RT über ein Höhenmessgerät unter Krafteinwirkung gemessen, was ein Maß für die mechanische Stabilität darstellt. Stabilere Kollagensheets lassen sich weniger stark komprimieren und besitzen dadurch größere Dicken.

Um zunächst die Auswirkungen der Beladung der Kollagensheets mit PBS und die anschließende Lyophilisierung auf deren Dicke beurteilen zu können, wurden entsprechend vorbereitete Sheets mittels Höhenmessgerät analysiert. Abbildung 5.24 zeigt die Dickenmessungen bei 37 °C und RT von unmodifizierten Proben verglichen mit Proben „wie erhalten“ nach Konditionierung der Sheets für 24 h in PBS.

Unter Berücksichtigung der Abweichungen wird hierbei ersichtlich, dass die Proben innerhalb der betrachteten Temperatur die gleichen Dicken aufweisen, sodass eine Beladung der Kollagensheets mit PBS keinen Einfluss auf die Dicke hatte.

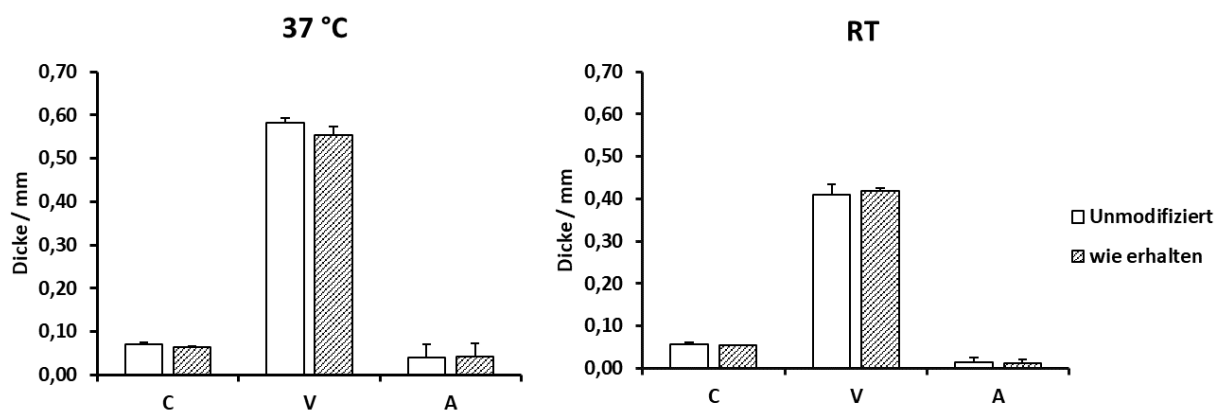


Abbildung 5.24: Dicke unmodifizierter Kollagensheets verglichen mit Proben "wie erhalten" bei 37 °C und RT nach zweistündiger Konditionierung in PBS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3). C: Collagen Solutions, V: Viscofan und A: Atelocollagen.

Abbildung 5.25 zeigt die Dickenmessungen der Kollagensheets von Collagen Solutions, Viscofan und Atelocollagen bei 37 °C bzw. RT nach Behandlung mittels RGX. Im Fall von Collagen Solutions besaßen bei 37 °C alle mittels RGX modifizierte Proben eine geringere Dicke als die unmodifizierten Proben. RGX verursachte eine durchschnittliche Dickenabnahme von 18 % und zeigte somit einen Effekt, der bei Quellgradmessungen nicht beobachtet wurde. Der größte Effekt wurde bei 0,01 % RB und einer Belichtungszeit von 10 min erzielt. Hier betrug die Dicke 21 % weniger als bei den unmodifizierten Proben. Bei Betrachtung der RGX-modifizierten Proben untereinander fiel die Dicke der Kollagensheets bei 37 °C gleich groß aus. Bei RT hingegen wurden die Proben mit 0,1 % RB und 60 min sowie mit 0,01 % RB und 10 min stärker komprimiert, als die mit 0,1 % RB und 10 min behandelten Proben. Verglichen mit den unmodifizierten Proben bei RT hatte RGX allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Dicke. Mit Ausnahme der Proben von 0,1 % RB und 60 min waren alle mit RGX behandelten Proben unabhängig von der Temperatur gleich dick. Die Modifikation von Collagen Solutions mittels RGX führte dementsprechend zu einem Verlust der ursprünglichen Temperaturabhängigkeit, bei der die Proben bei 37 °C eine 25 % größere Dicke als bei RT aufwiesen.

Bei Viscofan-Proben führte eine Modifikation mit RGX nur bei einer Probe zur Änderung der Dicke. Bei 37 °C zeigten mit 0,1 % RB und 10 min belichtete Proben eine signifikant geringere Dicke als die unmodifizierten Proben. Bei RT hingegen zeigten die Sheets unabhängig von der Behandlung die gleiche Dicke wie die unmodifizierten Proben. Wie zuvor bei Collagen Solutions konnten allerdings innerhalb der mit RGX behandelten Proben Dickenunterschiede gemessen werden. Die Temperaturabhängigkeit blieb bei allen Proben unabhängig von der RGX-Behandlung erhalten.

Die Modifikationen von Atelocollagen-Sheets mittels RGX führte zu einer signifikanten Zunahme ihrer Dicke. Da die unmodifizierten Sheets teilweise bei der Messung irreversibel komprimiert wurden, weist das auf eine höhere mechanische Stabilität hin. Im Durchschnitt wurden für 37 °C bzw. RT ca. 26-mal (2630 %) bzw. ca. 6-mal (580 %) größere Dicken erreicht. Die größte Dickenzunahme wurde sowohl für 37 °C (640 %) als auch für RT (3170 %) bei Proben mit 0,01 % RB und 10-minütiger Belichtung erreicht.

Auf Basis der oben beschriebenen Ergebnisse und der bereits erwähnten toxischen Wirkung von 0,1 % RB auf Osteoblasten^[141] wurde eine 10-minütige Belichtung mit grünem Licht bei einer RB-Konzentration von 0,01 % für eine Modifikation mittels RGX als optimal bestimmt.

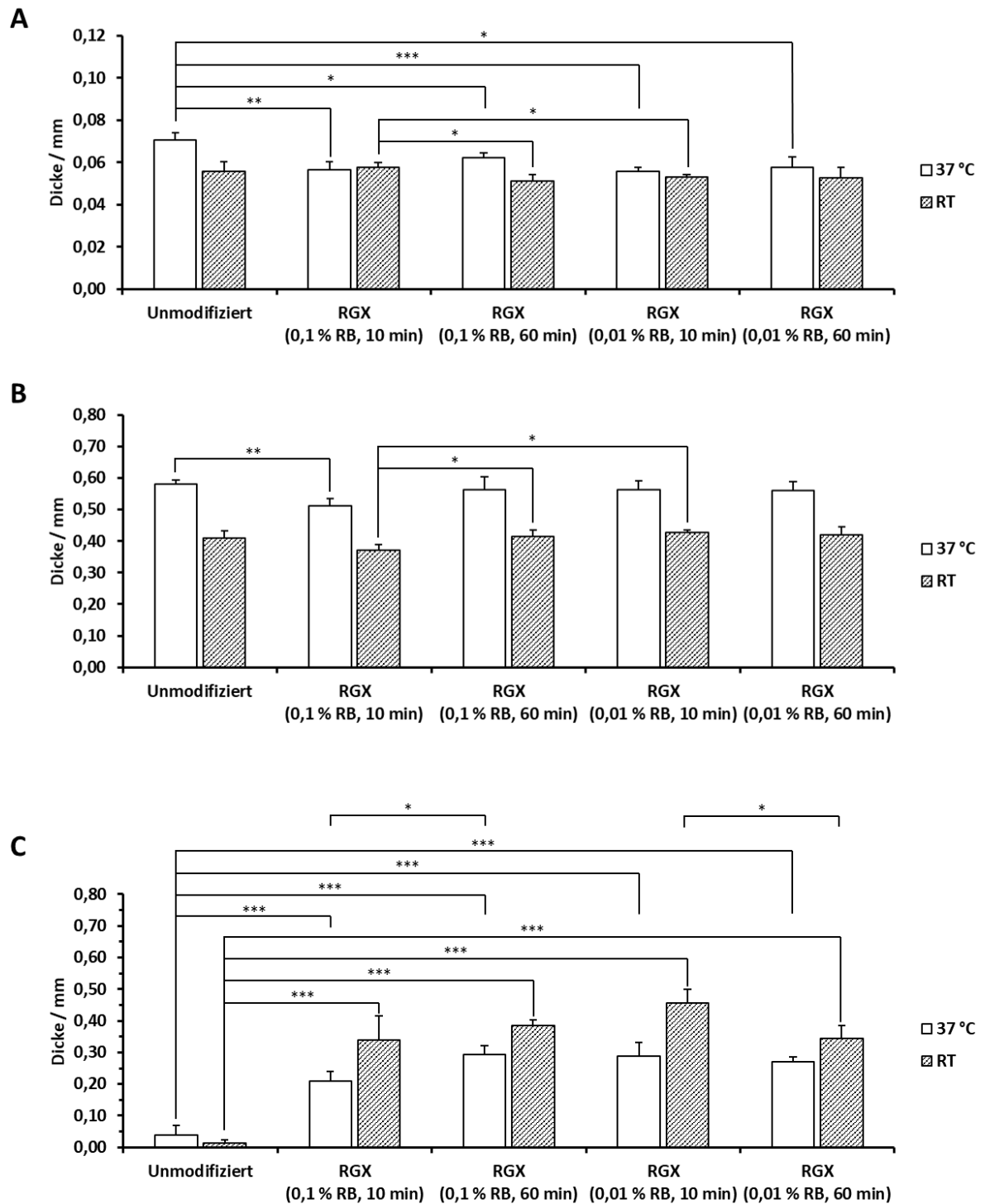
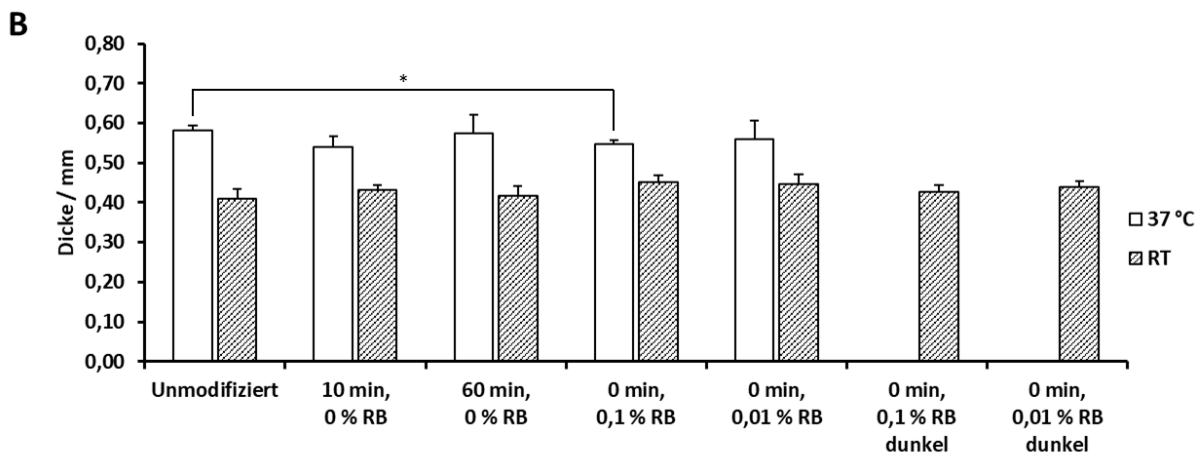
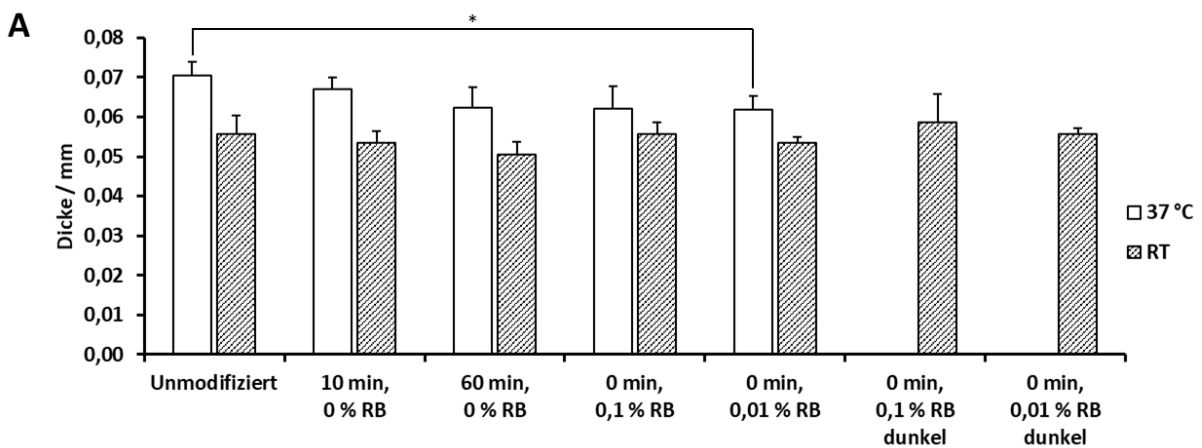


Abbildung 5.25: Dicke von unmodifizierten und mit RGX modifizierten Kollagensheets von Collagen Solutions, Viscofan und Atelocollagen. Zur Behandlung mit RGX wurden die Sheets mit 0,1 % bzw. 0,01 % RB beladen und für 10 min bzw. 60 min mit grünem Licht bestrahlt. Die Messung der Dicke erfolgte nach einer Konditionierung der Sheets für 24 h in PBS bei 37 °C bzw. RT. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3). Die Sterne geben die Signifikanz an. (A) Collagen Solutions. (B) Viscofan. (C) Atelocollagen.

Als Kontrollen wurden Proben verwendet, die lediglich 10 min bzw. 60 min mit grünem Licht oder mit einer Bengalrosa-Konzentration von 0,1 % bzw. 0,01 % und Laborbeleuchtung behandelt wurden (Abbildung 5.26). Für RT wurden zusätzlich Kontrollversuche gemessen, bei denen die Sheets mit RB behandelt und im Dunkeln gelagert wurden. Die Proben der Kontrollversuche von Collagen Solutions und Viscofan wiesen unter Berücksichtigung der Abweichungen innerhalb der betrachteten Temperatur größtenteils gleiche Dicken auf. Eine Behandlung nur mit Licht hatte keinen Einfluss auf die Dicke der Sheets. Eine Behandlung der Proben nur mit Bengalrosa hingegen führte zu einer geringeren Dicke. Die Behandlung nur mit Bengalrosa und Laborbeleuchtung hatte ebenfalls bei Atelocollagen-Proben einen Effekt. Es wurde eine signifikante Zunahme der Dicke erreicht, wobei die Dicken für 37 °C bzw. RT im Durchschnitt 740 % bzw. 2810 % mehr betragen als die Dicke der jeweils unmodifizierten Proben. Eine Behandlung mit Bengalrosa und Lagerung im Dunkeln führte nicht zu einer derartigen Dickenzunahme. Die Behandlung nur mit grünem Licht für 10 min bzw. 60 min zeigte wie zuvor bei Collagen Solutions und Viscofan keine Auswirkung auf die Dicke der Proben.



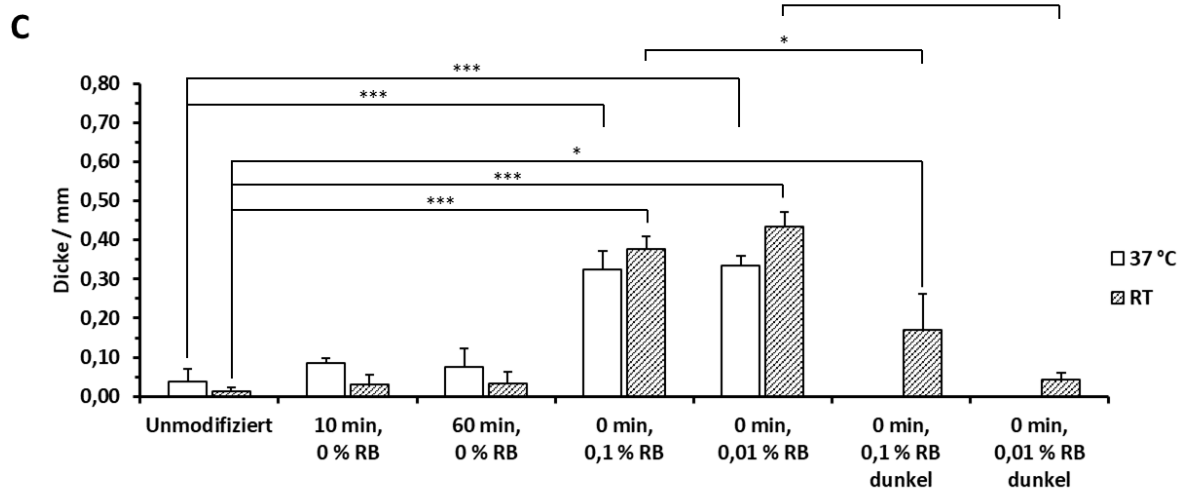


Abbildung 5.26 Kontrollversuche der Dickenmessung von unmodifizierten und mit RGX modifizierten Proben von Collagen Solutions, Viscofan und Atelocollagen. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % bzw. 0,01 % RB beladene Kollagensheets, die einer Standardlaborbeleuchtung (0 min, 0,1 % RB; 0 min, 0,01 % RB) ausgesetzt wurden oder im Dunkeln gelagert wurden (0 min, 0,1 % RB dunkel; 0 min, 0,01 % RB dunkel), und mit PBS beladene Kollagensheets, die 10 min bzw. 60 min grünem Licht (10 min, 0 % RB; 60 min, 0 % RB) ausgesetzt wurden. Die Messung der Dicke erfolgte nach einer Konditionierung der Sheets für 24 h in PBS bei 37 °C bzw. RT. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3). Die Sterne geben die Signifikanz an. (A) Collagen Solutions. (B) Viscofan. (C) Atelocollagen.

Mikrostruktur

Abbildung 5.27 zeigt die Aufnahmen mittels Durchlichtmikroskopie und REM der unterschiedlichen Kollagensheets für die optimierten Bedingungen von 10 min und einer Bengalrosa-Konzentration von 0,01 %.

Im Fall von Collagen Solutions waren sowohl durch Lichtmikroskopie als auch mittels REM keine Veränderungen in der Mikrostruktur zwischen unmodifizierten und modifizierten Proben nachweisbar (Abbildung 5.27A).

Viscofan-Proben zeigten keine strukturellen Veränderungen bei der Durchlichtmikroskopie, jedoch schienen Fasern in Kollagenproben in der REM-Analyse nach RGX ausgeprägter zu sein (Abbildung 5.27B).

Lichtmikroskopische- und REM-Aufnahmen von unmodifizierten Atelocollagen-Proben zeigten einen Zusammenbruch der offenen, schwammartigen Struktur, die in Proben „wie erhalten“ zu sehen gewesen war (Abbildung 5.19). Weiterhin erschienen unmodifizierte Proben unter dem Lichtmikroskop diffus, während nach RGX einzelne Fasern erkennbar waren. REM-Bilder von unmodifizierten Atelocollagen-Proben zeigten eine Aggregation von Fasern, während modifizierte Proben eine voluminösere Anordnung zeigten (Abbildung 5.27C).

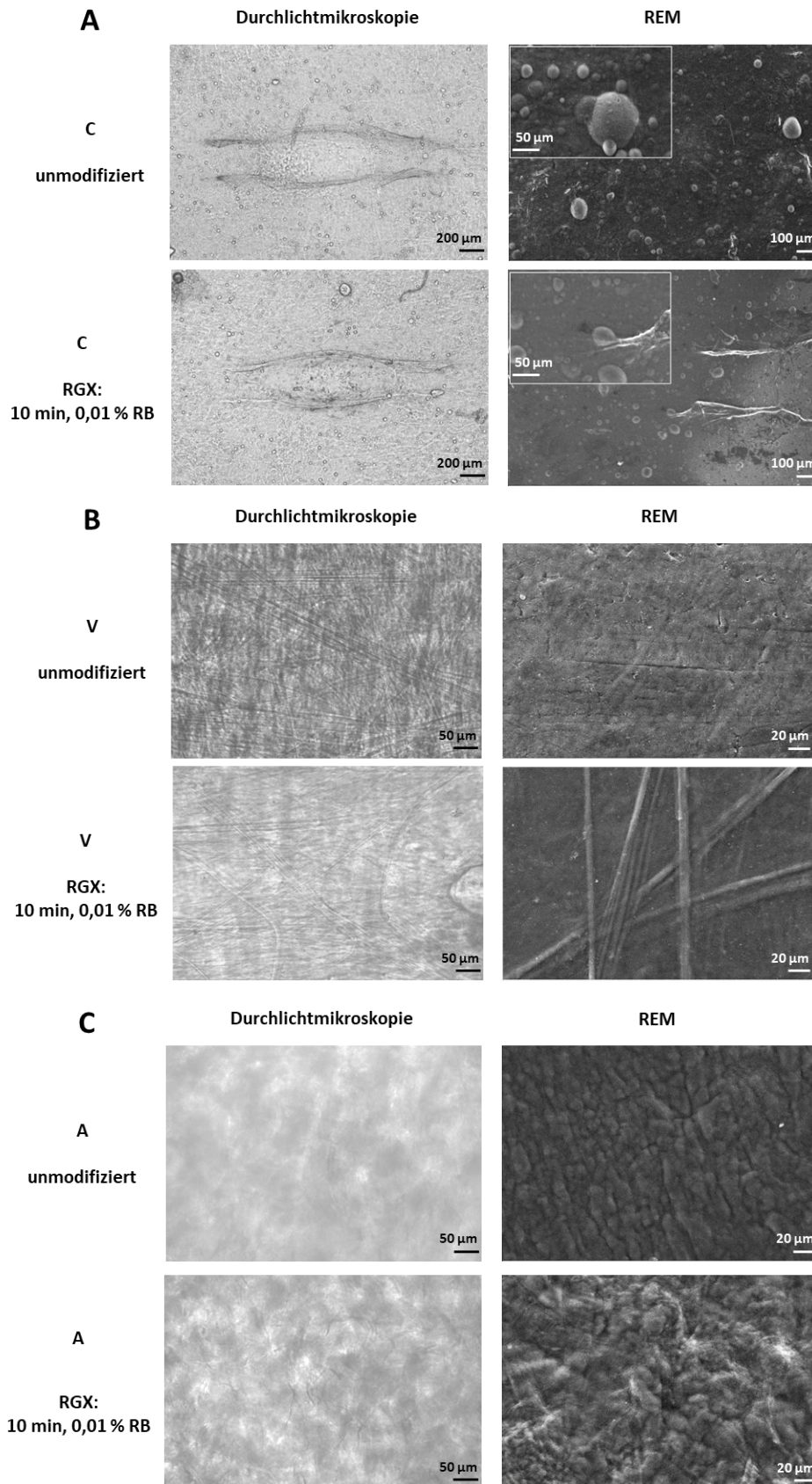


Abbildung 5.27: Durchlichtmikroskop- und REM-Aufnahmen von Kollagensheets vor (unmodifiziert) und nach RGX (10 min, 0,01 % RB). Mittels Durchlichtmikroskopie analysierte Proben wurden in PBS konditioniert. (A) Collagen Solutions, C. Vergrößerung Durchlichtmikroskop: 50x. REM-Vergrößerung: 200x und 1000x. (B) Viscofan, V. Vergrößerung Durchlichtmikroskop: 200x. REM-Vergrößerung: 1000x. (C) Atelocollagen, A. Vergrößerung Durchlichtmikroskop: 200x. REM-Vergrößerung: 1000x.

5.2.2.3 Charakterisierung von Quellverhalten, Mikrostruktur, Dicke und Stabilität – Diskussion

Dickenmessungen der verschiedenen Kollagene im trockenen Zustand mittels Höhenmessgerät unter Kraftanwendung ergaben, dass Collagen Solutions mit einer Dicke von 25 μm das dünnste Kollagen Sheet war, verglichen mit Viscofan und Atelocollagen, die 5-mal bzw. 62-mal dicker waren. Die höchste Komprimierung, auf etwa ein Drittel der ursprünglichen Dicke, konnte aufgrund der offenen schwammartigen Struktur für Atelocollagen gemessen werden (Abbildung 5.15, Abbildung 5.19). Dickenmessungen von unmodifizierten Proben und Proben „wie erhalten“ zeigten, dass die Beladung der Kollagensheets mit PBS keinen Einfluss auf die Dicke hatte (Abbildung 5.24).

Es wurde die Dickenanalyse unter Krafteinwirkung verwendet, um Änderungen der mechanischen Stabilität der Kollagene bei verschiedenen Temperaturen vor und nach der Quervernetzung zu untersuchen. Sie spiegelt die Verformung des Materials bei schonender Handhabung wider, bei der Flüssigkeit aus dem Hydrogel ausgetrieben werden kann oder bei ungenügender Stabilität sogar zu einer irreversiblen Kompression führen kann. Sie ist daher gut geeignet, um den Einfluss der Quervernetzung auf die mechanische Stabilität zu beurteilen. Zudem wurden alle Materialien durch Messung des Quellgrads und mittels Mikroskopie charakterisiert, um die Wirkung von RGX auf die Kollagensheets zu untersuchen.

Bei der Analyse des Quellgrads bei RT und 37 °C zeigten alle Proben „wie erhalten“ eine signifikante Massenzunahme. Proben von Collagen Solutions quollen auf 300 % (w/w) des Trockengewichts. Die Massenzunahme war während der gesamten Messdauer von 24 h temperaturunabhängig. Dieses Ergebnis war zunächst unerwartet, da für den Quellgrad von Kollagenmaterialien Temperaturabhängigkeiten beschrieben wurden. Zhao *et al.*^[151] berichteten im Fall von dem menschlichen Kollagen ähnlichen Kollagen-Hydrogelen, die mit Transglutaminase vernetzt wurden, über ein höheres Quellverhältnis bei 37 °C als bei 4 °C. Nagorski *et al.*^[152] berichteten jedoch über eine Abnahme der Quellung mit steigender Temperatur für Kollagen Typ I. Da die Proben von Collagen Solutions sehr dünn und bereits stark vernetzt waren (Abbildung 5.19), wurde angenommen, dass die Unterschiede in den absorbierten Volumina zu gering waren, um mittels Analysenwaage ermittelt werden zu können. Die Dickenmessung zeigte jedoch eine um 25 % höhere Dicke der unmodifizierten Proben von Collagen Solutions bei 37 °C im Vergleich zu RT. Nach Behandlung mit RGX ging diese Temperaturabhängigkeit verloren (Abbildung 5.25).

Die Viscofan-Proben besaßen eine sehr kompakte Struktur und sichtbar lange Fasern (Abbildung 5.19). Proben „wie erhalten“ zeigten eine Temperaturabhängigkeit, die in einer 15 %-igen Zunahme des Quellgrads (Abbildung 5.16) und einer 33 % größeren Dicke (Abbildung 5.17) bei 37 °C im Vergleich zu RT resultierte. Verglichen mit Proben von Collagen Solutions besaß Viscofan bereits im Trockenzustand eine größere Dicke (Tabelle 5.9), sodass der Einfluss der Temperatur vermutlich leichter messbar war. Diese Beobachtung unterstützen die Ergebnisse von Zhao *et al.*^[151], die eine Zunahme des Quellverhältnisses mit der Temperatur von menschlichen Kollagen ähnlichen Kollagen-Hydrogelen, die mit Transglutaminase vernetzt wurden, beschreiben. Sie erklären diesen Effekt durch eine Verstärkung hydrophiler Wechselwirkungen bei erhöhten Temperaturen, sodass Wasser

leichter mit hydrophilen Gruppen in der Kollagenmatrix interagiert, was wiederum zu einer Expansion des Hydrogels führt. Vermutlich können Wasserstoffbrückenbindungen bei erhöhten Temperaturen leichter brechen und sich neu bilden. Dies führt dazu, dass sich Hohlräume in dem dichten Kollagenmaterial vergrößern und mehr PBS einschließen können, was wiederum zu höheren Quellgraden und Dicken führt. Die Behandlung von Viscofan-Sheets mittels RGX hatte geringen bis keinen Einfluss auf den Quellgrad und die Dicke, was zu erwarten war, da die Mikrostruktur dieses Materials bereits im unmodifizierten Zustand sehr dicht erschien (Abbildung 5.19).

Atelocollagen „wie erhalten“ zeigte den höchsten Quellgrad und die höchste Temperaturabhängigkeit aller Kollagenproben mit einem fast doppelt so hohen Quellgrad bei RT wie bei 37 °C. Große Quellverhältnisse von Atelocollagen wurden bereits in anderen Arbeiten beobachtet.^[153-154] Wie die Aufnahmen mittels Lichtmikroskopie und REM zeigten, besitzt Atelocollagen viel größere Hohlräume als die Proben von Collagen Solutions oder Viscofan (Abbildung 5.19). Wie bei Viscofan könnte der schnellere Austausch von Wasserstoffbrückenbindungen bei höheren Temperaturen die Hohlräume von Atelocollagen vergrößern, sodass in den ohnehin schon großen Hohlräumen die Kapillarwirkung verringert wird. Folglich ließe sich das PBS weniger gut zurückhalten. Darüber hinaus würde die Entfernung von nicht absorbierter Flüssigkeit vor der Messung zusätzlich Puffer aus der Probe entfernen, was zusammen genommen in dem beobachteten niedrigeren Quellgrad bei 37 °C im Vergleich zu RT resultiert. Bei Atelocollagen-Proben hatte das Beladen mit PBS und anschließende Trocknen, um „unmodifizierte“ Proben zu erhalten, einen signifikanten Einfluss. Die Proben verloren ihre Temperaturabhängigkeit und der Quellgrad nahm um einen Faktor von 1,74 bzw. 2,4 im Vergleich zu Proben „wie erhalten“ bei 37 °C bzw. RT ab (Abbildung 5.16, Abbildung 5.21).

Dies liegt wahrscheinlich an der kollabierten offenen schwammartigen Struktur (Abbildung 5.27C), die nach der Beladung mit PBS beobachtet wurde, und an der höheren Ionenstärke innerhalb der Probe.^[155-156] Atelocollagen-Proben „wie erhalten“ und unmodifizierte Atelocollagen-Proben waren während der generellen Handhabung und den Messungen des Quellgrads sehr instabil, was durch die offene schwammartige Struktur zu erklären ist. Diese Beobachtung wurde durch die Dickenmessung gestützt, bei der unmodifizierte Proben nach der ersten oder zweiten Messung irreversibel komprimiert wurden, was zu Dickenwerten führte, die sogar zwei- bis viermal kleiner waren als Proben des dünnen Films von Collagen Solutions.

RGX hatte die stärkste Auswirkung auf Atelocollagen-Proben, was in signifikanten Änderungen sowohl des Quellgrads als auch der Dicke resultierte. Während der Quellgrad bei 37 °C durch RGX-Modifikation mit 0,01 % RB im Durchschnitt um ca. 20 % und für 0,1 % RB im Durchschnitt um ca. 40 % reduziert wurde (Abbildung 5.22), konnten für modifizierte Proben bei 37 °C für 0,01 % RB und 0,1 % RB im Durchschnitt ca. 6-mal größere Dicken gemessen werden. Bei RT waren die Dicken für 0,01 % RB und 0,1 % RB im Durchschnitt ca. 26-mal größer als die der unmodifizierter Proben (Abbildung 5.25).

Dies zeigt eine bemerkenswerte Stabilitätssteigerung nach dem Quervernetzen, die sich auch während der Handhabung bemerkbar machte. Dies stimmt darüber hinaus mit früheren Berichten über Vernetzungsexperimente unter Verwendung anderer gebräuchlicher Verfahren

zur Bewertung von Stabilitätsänderungen überein. Vizárová *et al.* ^[157] modifizierten Atelokollagen durch UV-Bestrahlung und chemische Quervernetzung, was im Vergleich zur unmodifizierten Kontrolle zu niedrigeren Quellverhältnissen führte. Messungen der Zugfestigkeit zeigten eine höhere mechanische Festigkeit von Atelokollagen. Diese Ergebnisse werden durch eine Untersuchung von Rousseau und Gagnieu ^[131] gestützt, bei der die Quervernetzung von Atelokollagen durch oxidierten Zucker zu einer Abnahme des Quellverhältnisses und einer Stabilitätserhöhung führte. Shrestha *et al.* ^[158] berichteten über eine signifikante Erhöhung der Zähigkeit für mit RGX vernetztes Dentin-Kollagen. Chan und So ^[137] konnten mittels DSC und Zugversuchen höhere Stabilitäten von Kollagenhydrogelen nach Modifikation mit RGX erhalten. Sie ermittelten zusätzlich eine Abnahme des Quellgrads im Zusammenhang mit reduzierten Porenvolumina. Bei Atelocollagen, das mit RGX behandelt wurde, zeigten lichtmikroskopische und REM-Aufnahmen die Entwicklung einer faserigen Struktur, wohingegen große Poren nicht mehr erkennbar waren. Dies steht im Einklang mit einem verringerten Porenvolumen und dem verringerten Quellgrad (Abbildung 5.22). Interessanterweise konnten diese beiden Effekte sowie eine signifikant höhere Dicke für Atelocollagen-Proben in einer Kontrollgruppe beobachtet werden, die lediglich mit RB behandelt wurde (Abbildung 5.23, Abbildung 5.26). Eine Verringerung des Quellgrades wurde auch für Collagen Solutions in dieser Kontrolle beobachtet, was darauf hindeutet, dass Umgebungslichteinwirkung für die Vernetzung ausreicht (Abbildung 5.23). Dieser Effekt wurde auch von Chan und So beschrieben ^[137]. Eine Wiederholung dieses Kontrollexperiments mit RB unter Ausschluss von Umgebungslicht führte zu vergleichbaren Dicken wie bei unmodifizierten Kollagenproben. Die Belichtung von Atelocollagen-Proben mit grünem Licht ohne RB hatte keinen Einfluss auf die Dicke.

Kollagenhydrogele wurden durch eine Vielzahl von Verfahren quervernetzt, um die mechanische Stabilität zu verbessern. Neben RGX ^[137, 158] und Quervernetzung durch oxidierten Zucker ^[131] wurde Kollagen durch andere Reagenzien wie EDC, Glutaraldehyd oder mikrobielle Transglutaminase vernetzt ^[159-160]. Die Verwendung bireaktiver kleiner Moleküle erfordert umfangreiches Waschen, um toxische Wirkungen bei der späteren Anwendung zu vermeiden. Enzyme wiederum können während der Lagerung an Aktivität verlieren. RGX hingegen ist eine robuste Methode, die ausgehend von trockenen Kollagensheets „wie erhalten“ nur wenige Handhabungsschritte benötigt und zu einer signifikanten Erhöhung der mechanischen Stabilität in weichen Materialien wie Atelocollagen führt. Für Anwendungen in der regenerativen Medizin spielt zudem die RB-Konzentration, die für die Modifikation mit RGX zum Einsatz kommt, eine Rolle. Wie Arbeiten von Kooperationspartnerinnen zeigten, hatte eine Konzentration von 0,1 % RB eine toxische Wirkung auf Osteoblasten. Möglicherweise hing dies damit zusammen, dass Bengalrosa in der 0,1%-igen Lösung nicht vollständig gebleicht wurde.

5.2.3 Freisetzung von Vancomycin

Zur Untersuchung der Freisetzung von Vancomycin aus den Kollagensheets wurden diese entsprechend dem Quellvermögen mit 1 mg Vancomycin beladen. Die beladenen Sheets wurden anschließend in PBS inkubiert und die Vancomycin-Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten über 24 h gemessen. Da die Kollagensheets von Viscofan für die Proliferation humaner Osteoblasten und humaner Muskelzellen ungeeignet waren, wurde die Freisetzung von Vancomycin lediglich für Proben von Collagen Solutions und Atelocollagen bestimmt. Um die Wirkung von RGX untersuchen zu können, wurde die Freisetzung von Vancomycin ebenfalls aus mit RGX (10 min, 0,01 % RB) behandelten Proben untersucht.

Um die Freisetzung von Vancomycin aus Kollagen bestimmen zu können, musste zunächst eine geeignete Methode entwickelt werden. Zu Beginn wurde hierzu die Absorption des Überstands aus dem Freisetzungsversuch in einer UV-transparenten 384-well-Platte bei 280 nm gemessen. Um die Vancomycin-Konzentration aus der Absorption der Proben bestimmen zu können, wurde zunächst eine Kalibriergerade mit reinem Vancomycin (Abbildung 5.28) erstellt. Die Kalibriergerade (Formel 5.6) hatte im Konzentrationsbereich von 0 mg/mL - 1 mg/mL einen Korrelationskoeffizienten von 0,9984 und somit einen sehr genauen Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Absorption bei 280 nm.

$$A_{280} [AU] = 1,345 \cdot c [mg \cdot mL^{-1}] \quad (5.6)$$

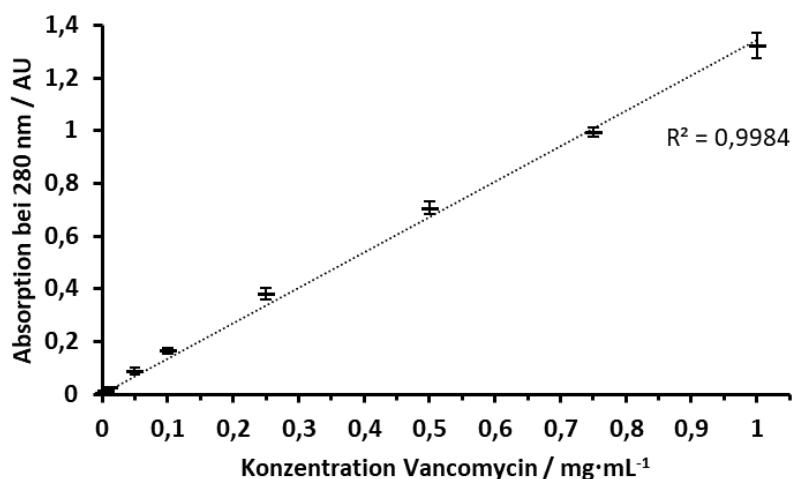


Abbildung 5.28: Kalibriergerade zur Bestimmung der Vancomycin-Konzentration im Bereich von 0 mg/mL - 1 mg/mL durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Die Messung erfolgte in einem Volumen von jeweils 40 µL in einer UV-transparenten 384-well-Platte (Corning). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3).

In Abbildung 5.29 wird die Freisetzung von Vancomycin aus Collagen Solutions und Atelocollagen dargestellt. Im Fall von Collagen Solutions wurde die halbmaximale Freisetzung nach weniger als 0,5 h erreicht. Bereits nach 4 h wurde die maximale Menge von $91\% \pm 10\%$ des beladenen Vancomycins freigesetzt. Bei den darauffolgenden Messungen befanden sich die Vancomycin-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze.

Bei Atelocollagen verlief die Freisetzung leicht verzögert, sodass eine halbmaximale Freisetzung bei 0,5 h erreicht wurde. Insgesamt wurden maximal $70\% \pm 1\%$ der beladenen Vancomycinmenge freigesetzt.

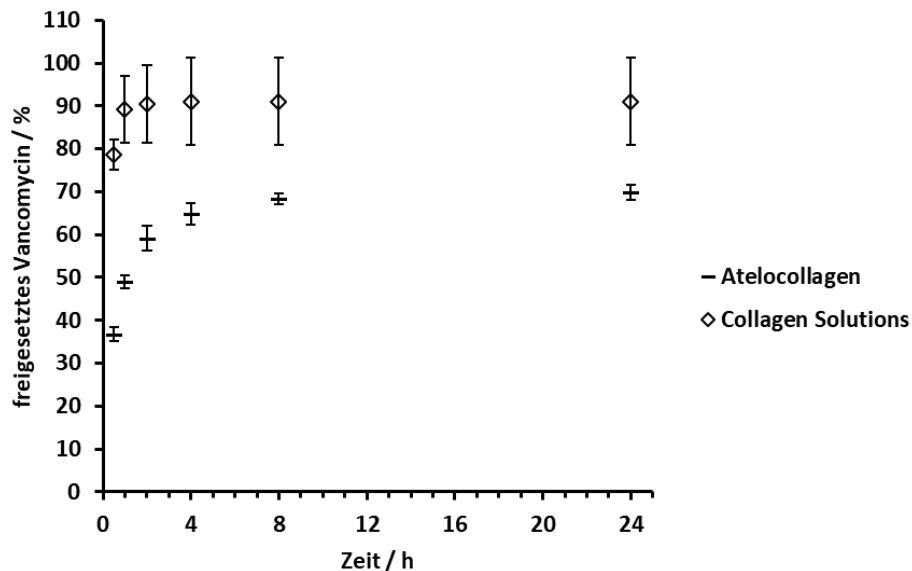


Abbildung 5.29: Vancomycin-Freisetzung über 24 h aus Kollagensheets von Atelocollagen bzw. Collagen Solutions. Die Sheets wurden zuvor mit 1 mg Vancomycin beladen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die unvollständige Freisetzung von Vancomycin durch eine Wechselwirkung von Vancomycin mit den im Versuch verwendeten Kunststoffmaterialien verursacht wurde. Hierzu wurden jeweils 1 mL einer 1 mg/mL-Lösung Vancomycin in PBS bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer 24-well-Platte inkubiert und nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h komplett abgenommen. Ein Teil der Proben wurde bis zur Absorptionsmessung in den für die Lagerung der Proben verwendeten Mikrozentrifugenröhrchen aufbewahrt, um deren mögliche Wechselwirkung mit Vancomycin zu untersuchen. Zur Untersuchung der Wechselwirkung mit der für die Inkubation verwendete 24-well-Platte wurde der zweite Teil der Proben bis zur Messung anstelle von Mikrozentrifugenröhrchen in Glas-Vials gelagert. Die Messung der Vancomycin-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Mikrotiterplattenlesegeräts bei 280 nm ($n=3$). Als Kontrolle wurde eine Lösung aus 1 mg/mL Vancomycin in PBS direkt in die UV-transparente 384-well-Platte transferiert.

Wie Abbildung 5.30 zeigt, hatte die Nutzung der 24-well-Platte (Lagerung in Glas-Vials) und der Mikrozentrifugenröhrchen (Lagerung in Mikrozentrifugenröhrchen) keinen Einfluss auf die Vancomycin-Konzentration. Die experimentell ermittelte Konzentration der 1 mg/mL Kontrolllösung lag bei 0,98 mg/mL. Mit Ausnahme der Messungen bei 2 h und 24 h entsprachen unter Berücksichtigung der Standardabweichung alle Messungen der Konzentration der Kontrolle. Über die Dauer der Inkubation war keine Abnahme der Konzentration erkennbar. Die erhöhte Vancomycin-Konzentration der 24 h-Messung von 1,09 mg/mL (24-well-Platte) bzw. 1,08 mg/mL (Mikrozentrifugenröhrchen) könnte auf ein Verdunsten der Probenlösung während des Versuchs zurückgeführt werden. Eine Interaktion von Vancomycin mit den während des Versuchs verwendeten Kunststoffmaterialien konnte somit ausgeschlossen werden.

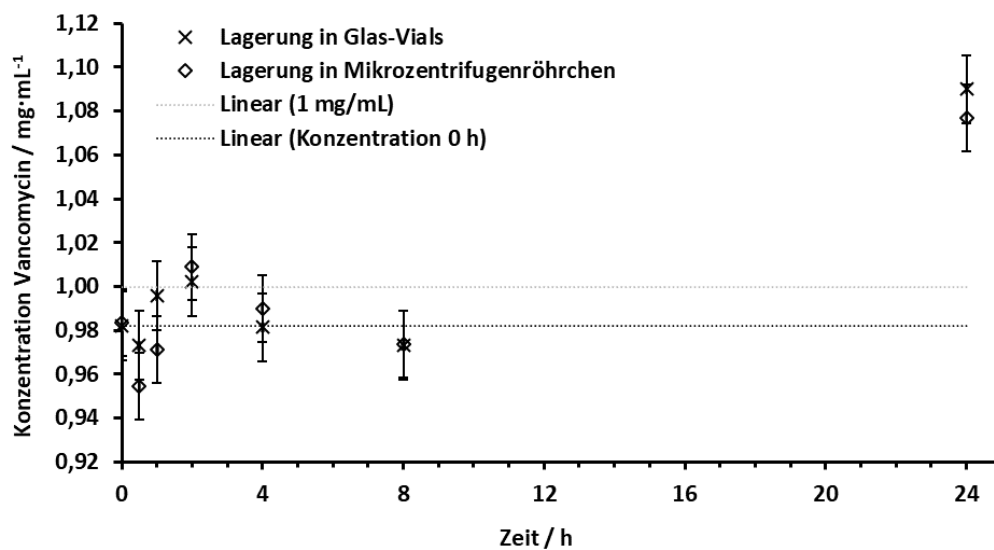


Abbildung 5.30: Untersuchung der Wechselwirkung von Vancomycin mit der 24-well-Platte und Mikrozentrifugenröhrchen. 1 mL Vancomycin in PBS (1 mg/mL) wurde über 24 h in einer 24-well-Platte bei 37 °C inkubiert. Nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h wurde die Lösung entnommen und in Glas-Vials bzw. Mikrozentrifugenröhrchen gelagert. Die Bestimmung der Vancomycin-Konzentration erfolgte über Absorptionsmessung bei 280 nm mittels Mikrotiterplattenlesegerät. Als Kontrolle dienten 1 mg/mL Vancomycin in PBS (Linear Konzentration 0 h). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$).

Um zu untersuchen, ob eine Behandlung der Kollagensheets mittels RGX einen Einfluss auf die Freisetzung von Vancomycin hat, wurden die Versuche ebenfalls mit modifizierten Proben durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Dabei zeigte sich als Nachteil der Absorptionsmessung mittels Mikrotiterplattenlesegerät, dass nicht gebleichtes Bengalrosa ebenfalls bei 280 nm absorbiert und somit die Bestimmung der Vancomycin-Konzentration bei 280 nm stört. Um dies zu umgehen, wurden die Proben im Folgenden mittels *reversed-phase* HPLC analysiert. Der Vorteil hierbei besteht darin, dass Bengalrosa bei der verwendeten Methode eine längere Retentionszeit als Vancomycin besitzt und somit die Konzentrationsbestimmung nicht stört (Abbildung 5.31).

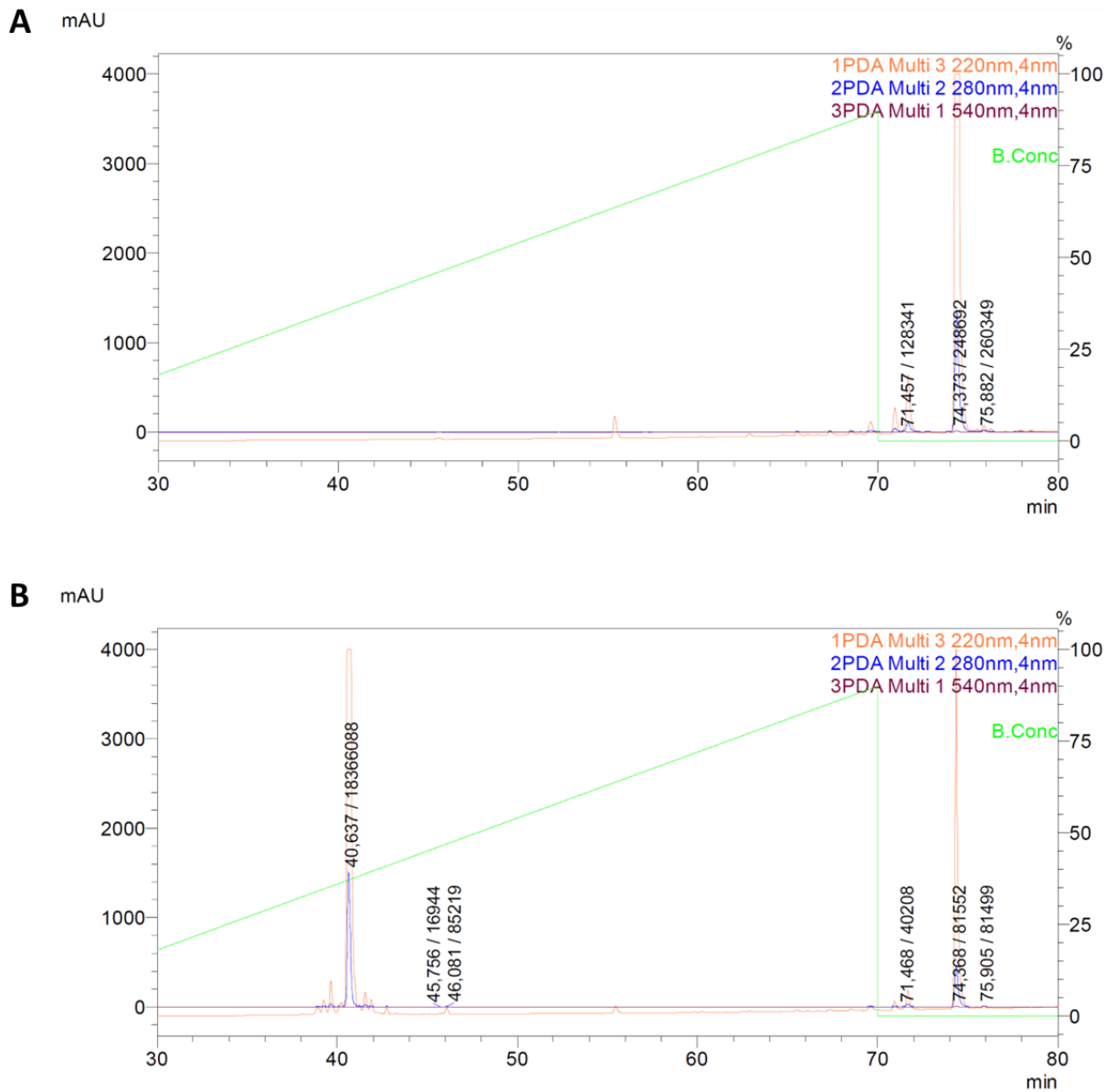


Abbildung 5.31: Chromatogramm von Bengalrosa (A) sowie einer Lösung aus Vancomycin und Bengalrosa (B). Dargestellt sind die Absorptionen bei 220 nm (orange), 280 nm (blau) und 540 nm (rot), sowie der Gradient von Eluent B (grün).

Um die Freisetzung von Vancomycin mittels *reversed-phase* HPLC quantifizieren zu können, wurde zunächst eine Kalibriergerade (Formel 5.7) im Bereich von 0 mg/mL - 1 mg/mL erstellt (Abbildung 5.32). Diese besitzt einen Korrelationskoeffizienten von 0,99 und somit einen genauen Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Peakfläche des Chromatogramms.

$$\text{Peakfläche [mAU} \cdot \text{min]} = 3,47 \cdot 10^7 \cdot c [\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}] + 1,78 \cdot 10^5 \quad (5.7)$$

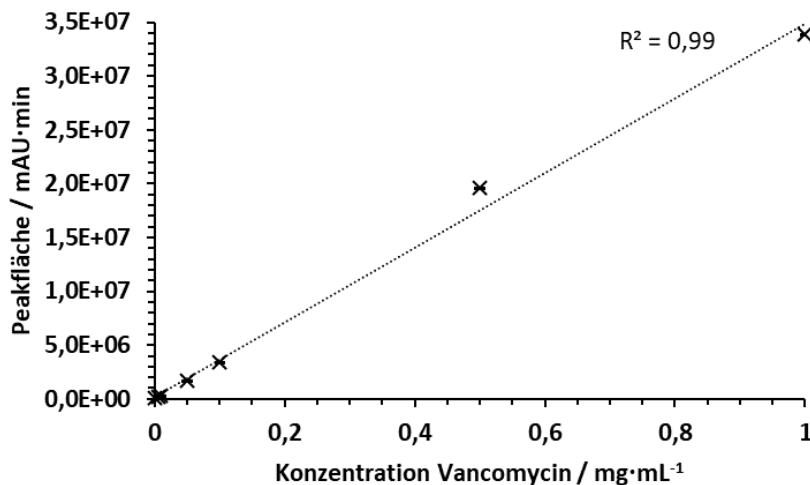


Abbildung 5.32: Kalibriergerade zur Bestimmung der Vancomycin-Konzentration im Bereich von 0 mg/L - 1 mg/mL gemessen mittels *reversed-phase*-HPLC. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3).

Eine Modifikation mittels RGX von mit Vancomycin beladenen Proben zeigte weder bei Collagen Solutions noch bei Atelocollagen einen Einfluss auf das Freisetzungverhalten. Im Fall von Collagen Solutions wurde Vancomycin innerhalb der ersten 2 h freigesetzt. Innerhalb von 30 min wurden bereits 71 % \pm 5 % der beladenen Menge an Vancomycin aus unmodifizierten Proben bzw. 78 % \pm 1 % aus modifizierten Proben freigesetzt (Abbildung 5.33A). Dies war zu erwarten, da diese Sheets sehr dünn und daher die Diffusionswege kurz sind. Die Freisetzung aus Atelocollagen war etwas langsamer, wobei die Hälfte der Vancomycin-Menge nach 30 min freigesetzt wurde (Abbildung 5.33B). Da die Atelocollagen-Sheets 62-mal dicker und poröser sind als Sheets von Collagen Solutions, sind die Diffusionswege länger, weshalb eine verlängerte Freisetzung zu erwarten war. Allerdings wurden weder bei Collagen Solutions noch bei Atelocollagen die gesamte Menge an beladenem Vancomycin freigesetzt. Laut Rosenblatt *et al.*^[161] muss das Molekulargewicht von Wirkstoffen sehr groß sein (200 - 300 kDa), um eine gehinderte Diffusion zu erreichen. Da Vancomycin ein Molekulargewicht von nur 1,5 kDa besitzt, war keine gehinderte Diffusion zu erwarten. Singh *et al.*^[162] zeigten, dass Wirkstoffe aus unterbeladenen Matrizen viel langsamer freigesetzt wurden als aus vollbeladenen oder überladenen Matrizen. Da keine Bindung von Vancomycin an Kollagen beobachtet wurde^[163], wurden die Beladungskapazitäten für Vancomycin mit den in dieser Arbeit verwendeten Mengen deutlich überschritten, sodass keine verzögerte Freisetzung zu erwarten war. In allen Experimenten konnte nach 24 h nur 80 - 90 % des Vancomycins zurückgewonnen werden. Da

dies nicht auf eine Interaktion von Vancomycin mit den verwendeten Mikrotiterplatten zurückgeführt werden konnte (siehe Abbildung 5.30), ist es möglich, dass ein Teil des Vancomycins mit der Kollagenmatrix interagiert und langsam in Mengen unterhalb der Nachweisgrenze freigesetzt wird.

B. Chan *et al.*^[139] beschrieben, dass RGX die anfängliche rasche Freisetzung von BSA aus Kollagenhydrogelen reduziert. BSA ist jedoch ein 66,5 kDa schweres, negativ geladenes Protein und bindet daher wahrscheinlich an positiv geladenes Kollagen bei pH 7,4.^[164] Zudem interagiert es bekanntermaßen mit kleinen Molekülen wie RB.^[165] Es ist daher wahrscheinlich, dass BSA während RGX kovalent an die Kollagenmatrix gebunden ist, was zu einer Kinetik führt, die nicht nur durch Diffusion gesteuert wird. In dieser Arbeit wurden die Kinetik und die maximale Menge des freigesetzten Vancomycins in keinem der Materialien durch RGX beeinflusst, was darauf hindeutet, dass es keine kovalente Vernetzung von Vancomycin mit der Kollagenmatrix gab.

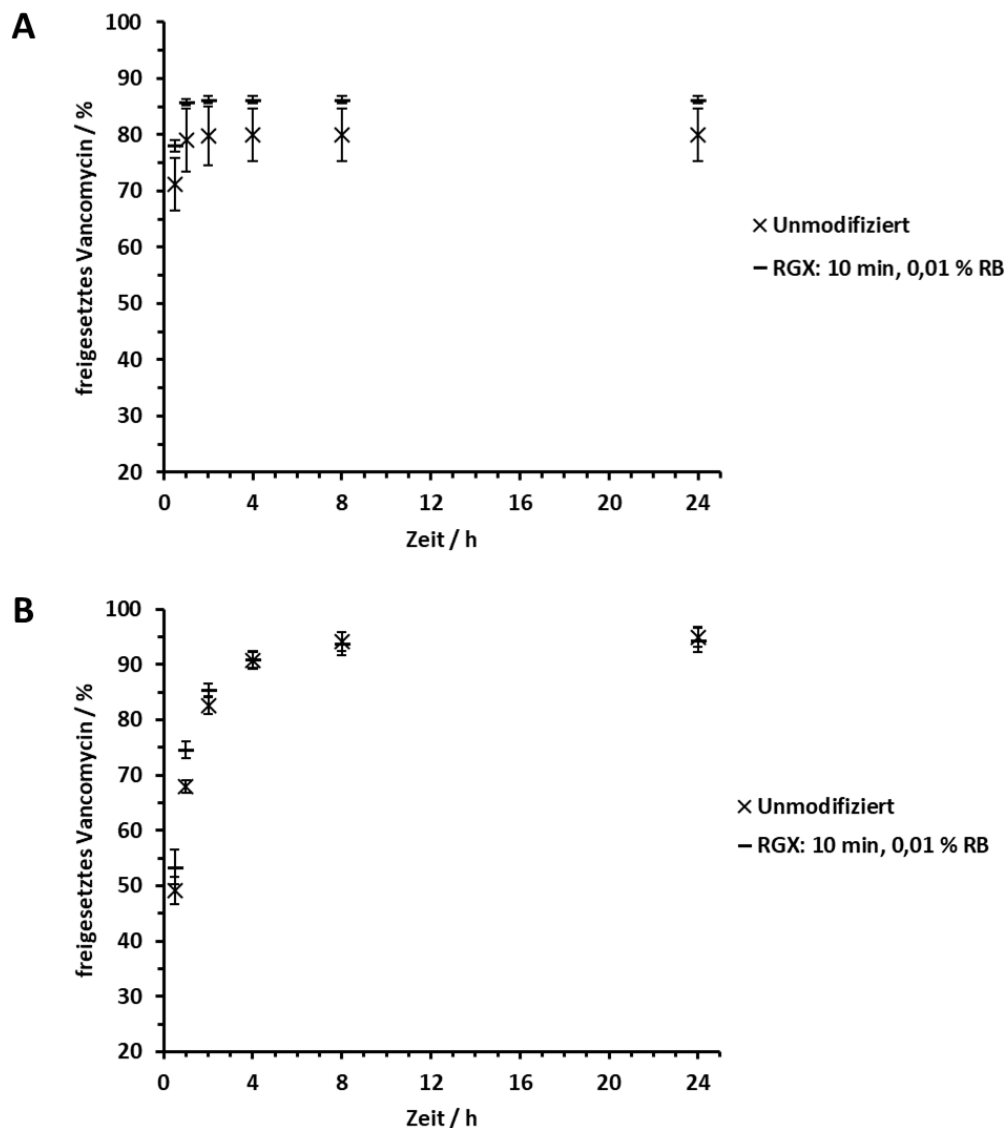


Abbildung 5.33: Freisetzung von Vancomycin über 24 h aus unmodifiziertem und modifiziertem (RGX: 10 min, 0,01 % RB) Collagen Solutions (A) und Atelocollagen (B). Die Kollagensheets wurden zuvor mit 1 mg Vancomycin beladen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=3).

5.2.4 Lamine

Mechanische Charakterisierung

Im Folgenden wurde getestet, ob RGX dafür geeignet ist, einzelne Kollagensheets zu Laminaten zu verbinden. Hierzu wurden Einzelsheets „wie erhalten“ mit PBS beladen und gestapelt. Zwischen die Sheets wurden 20 μL 0,1 % RB in PBS gegeben und der Stapel für 10 min mit grünem Licht bestrahlt. In bisherigen Untersuchungen zeigten alle Kollagensheets unterschiedliche Eigenschaften. Es wurde daher untersucht, inwiefern sich die Eigenschaften der Lamine von denen der Einzelsheets unterscheiden. Eine Eigenschaft, die untersucht wurde, war die Dicke und damit auch die mechanische Stabilität der Lamine, die mittels Höhenmessgerät unter Krafteinwirkung analysiert wurde. Die Dicke der Kollagenlamine, bestehend aus Sheets von Collagen Solutions und Atelocollagen, wurde mit der theoretischen Dicke verglichen, die aus Messungen der Einzelsheets unmodifizierter und modifizierter Proben bei 37 °C bzw. RT berechnet wurde (Abbildung 5.34). Im Vergleich zur theoretischen Dicke unmodifizierter Proben führte die Vernetzung von Collagen Solutions mit Atelocollagen zu einer deutlich größeren Dicke von 130 % (37 °C) und 340 % (RT). Da im Fall von unmodifiziertem Atelocollagen eine irreversible Kompression zu geringen Dickenwerten geführt hatte, deutet dies darauf hin, dass Atelocollagen durch die Laminatbildung mit Collagen Solutions stärker stabilisiert wurde als durch RGX allein. Verglichen mit der theoretischen Dicke, die aus der Dicke modifizierter Einzelsheets berechnet wurde, weist das Laminat jedoch eine um 24,8 % (37 °C) und 38,8 % (RT) geringere Dicke auf. Dies kann durch die Probenvorbereitung erklärt werden. Für die RGX-Behandlung von Einzelsheets wurden trockene Proben 2 h lang mit RB beladen, was zu einer gleichmäßigen Verteilung von RB führte. Im Fall der Lamine wurde RB direkt vor der Belichtung auf die Oberfläche eines mit PBS beladenen Kollagensheets pipettiert und das zweite daraufgelegt, sodass nur der Kontaktbereich vernetzt werden konnte. Dies hatte zur Folge, dass Teile des Atelocollagens unverändert blieben und während der Messung zu einer stärkeren Kompression neigten. Wie bei der theoretischen Dicke, die aus modifizierten Kollagensheets berechnet wurde, wies das Laminat bei RT eine höhere Dicke auf als bei 37 °C, wohingegen die Summe der Dicken der Einzelsheets unmodifizierter Proben aufgrund zerstörter Atelocollagen-Proben das Gegenteil vorhergesagt hatte.

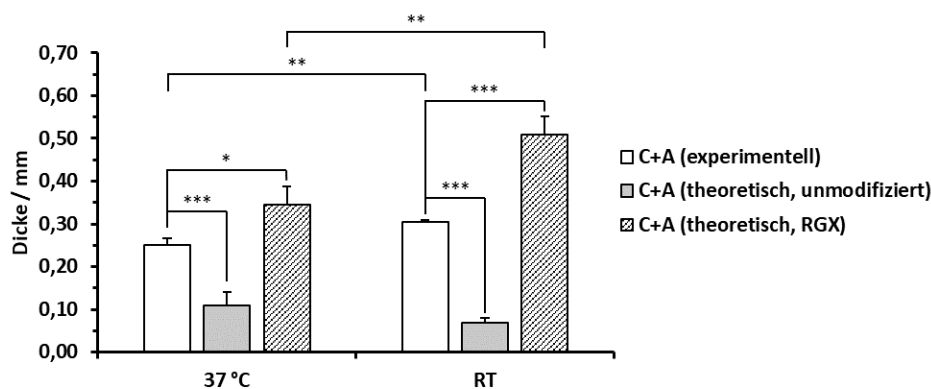


Abbildung 5.34: Dicke von Kollagenlaminaten bestehend aus Collagen Solutions und Atelocollagen. Vergleich der Dicke der durch RGX (10 min, 0,1 % RB) hergestellten Lamine mit ihrer theoretischen Dicke (Summe der Dicke der Einzelsheets) von unmodifizierten und RGX-modifizierten Proben bei 37 °C und RT. Die Proben wurden vor der Messung 24 h lang in PBS konditioniert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$). Die Sterne geben die Signifikanz an. C: Collagen Solutions, V: Viscofan und A: Atelocollagen.

Mikrostruktur

Neben der Dicke und mechanischen Stabilität der Lamine wurde ebenfalls die Mikrostruktur mittels Durchlichtmikroskopie und REM untersucht (Abbildung 5.35). Hierbei wurden jeweils beide Seiten eines Laminats bestehend aus Collagen Solutions und Atelocollagen aufgenommen. Die Durchlichtmikroskop-Aufnahmen unterscheiden sich bei direktem Vergleich nicht von den Aufnahmen der Einzelsheets nach Behandlung mit RGX (siehe Abbildung 5.27). Im Fall von Collagen Solutions waren allerdings deutliche farbige Schlieren von Bengalrosa sichtbar, die womöglich durch Kapillareffekte vermehrt im Bereich der Prägungen auftraten. Auf den REM-Aufnahmen fällt zudem auf, dass sich bei den Laminaten Aggregate formten. Um zu untersuchen, um welche Substanz es sich hierbei handelte, wurde eine energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)-Analyse¹² durchgeführt (Abbildung 5.36). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aggregate vor allem aus Natrium und Chlor bestanden. Vermutlich handelte es sich hierbei um NaCl, welches in großen Teilen in PBS enthalten ist, mit dem die Sheets vorbehandelt wurden. Diese Aggregate waren bei der Untersuchung der Einzelsheets mittels REM nicht zu erkennen. Möglichweise bildeten sich während der Gefriertrocknung der Lamine bevorzugt dort Aggregate, wo die PBS-Lösung zwischen den Einzelsheets eingeschlossen werden konnte.

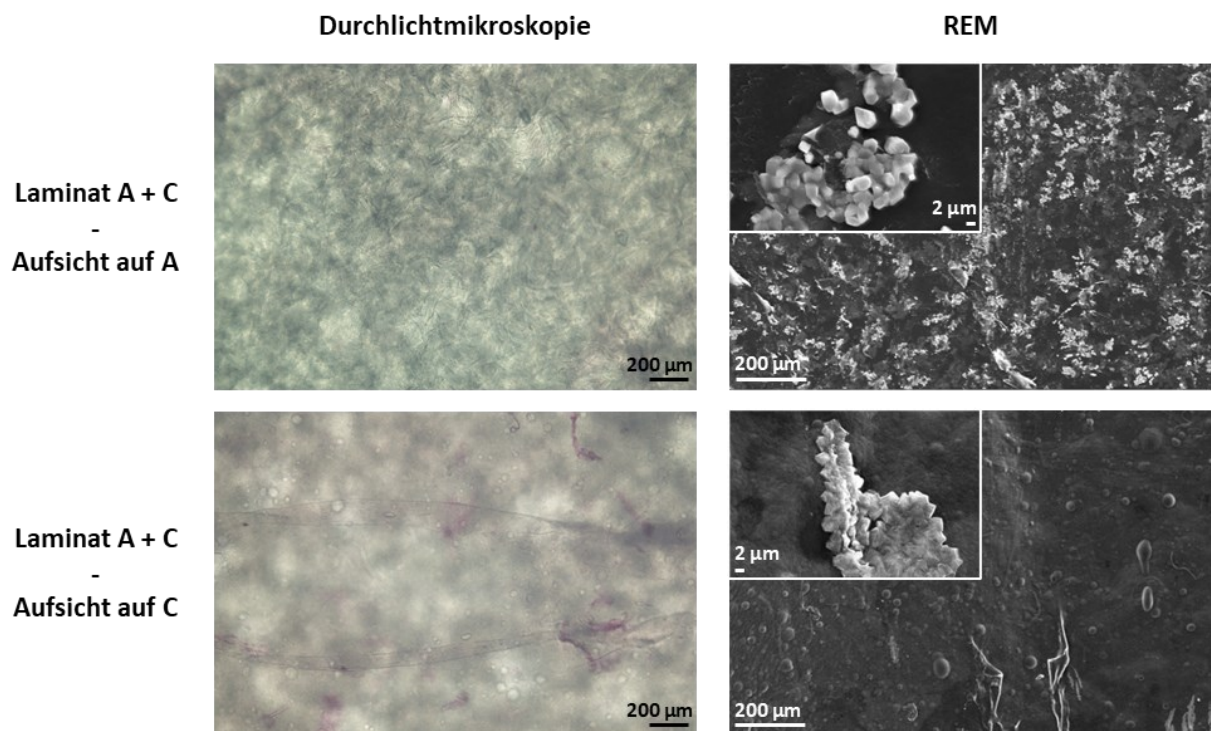


Abbildung 5.35: Durchlichtmikroskop- und REM-Aufnahmen von Laminaten bestehen aus Collagen Solutions und Atelocollagen. Mittels Durchlichtmikroskopie analysierte Proben wurden zuvor in PBS konditioniert. Vergrößerung Durchlichtmikroskop: 50x. REM-Vergrößerung: 200x und 5000x. C: Collagen Solutions, A: Atelocollagen.

¹² durchgeführt von Hr. Sedner, AK Prof. Dr. Mücklich, Institut für Produktionstechnik, WH Zwickau

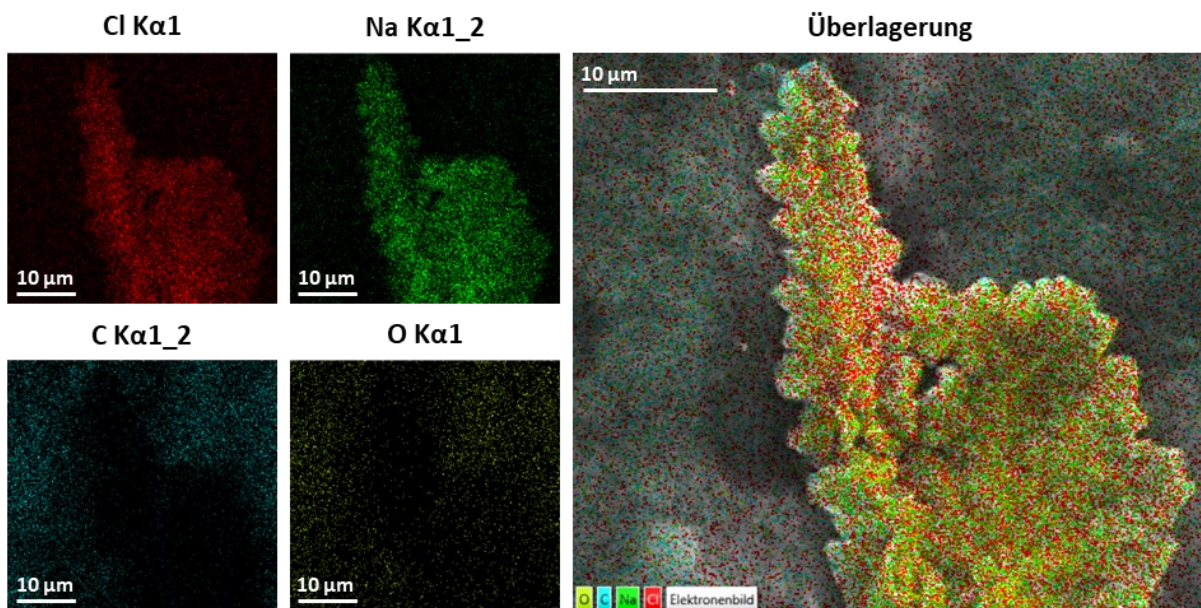


Abbildung 5.36: Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX-Mapping von Laminaten bestehend aus Collagen Solutions und Atelocollagen).

Optimierung der Laminatherstellung

Zur weiteren Verbesserung der Stabilität der Lamine wurden unterschiedliche Herstellungsarten miteinander verglichen. Hierzu wurden 0,5 cm² große Zweischicht-Lamine aller möglichen Kombinationen der Kollagensheets Collagen Solutions und Atelocollagen hergestellt. Die Herstellungsarten unterschieden sich dabei in der Vorbehandlung der Einzelsheets. So wurden diese entweder in RB oder PBS gequollen, oder zuvor mit RGX behandelt. Zudem wurde untersucht, ob die Zugabe von 5 μL 0,01 % RB zwischen zwei Einzelsheets (RB-Layer) einen Einfluss auf die Stabilität der Lamine hatte.

Nach Herstellung der Lamine (Duplikate) durch 10-minütige Belichtung mit grünem Licht (Kapitel 4.7.4), wurden diese in 1 mL PBS bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die Lamine wurden anschließend danach bewertet, ob sich die Sheets bei Kontakt mit PBS direkt voneinander ablösen (rot), innerhalb von 24 h voneinander ablösen (orange), nach 24 h unter Aufwendung leichter Scherkräfte ähnlich der normalen Handhabung voneinander ablösen (gelb), oder nach 24 h weiterhin stabil waren (grün). Abbildung 5.37 stellt die Bewertung aller Laminatkombinationen mit und ohne RB-Layer in Form zweier Matrices dar. Verglichen mit Laminaten, die ohne RB-Zwischenschicht hergestellt worden waren, führte die Verwendung einer Lösung von 0,01 % RB in PBS zwischen den Einzelsheets dazu, dass sich der Anteil der Lamine, die nach 24 h weiterhin stabil waren, von einem Drittel auf die Hälfte erhöhte. Lediglich bei Laminaten, bei denen Einzelsheets zuvor in 0,01 % RB in PBS gequollen wurden und zwischen den Sheets über einen RB-Layer verfügten, waren alle Kombinationen von Collagen Solutions- und Atelocollagen-Sheets auch nach 24 h noch stabil. Aus diesem Grund wurden diese Parameter als optimal für die Herstellung von Laminaten angesehen.

Diese Bedingungen wurden in Folgearbeiten für eine ausführliche Charakterisierung der Lamine übernommen.^[166-168] Mit der entwickelten Methode können auf einfache Art und

Weise Einzelsheets vor Ort kombiniert und zu Laminaten vernetzt werden. Bei anderen in der Literatur beschriebenen Mehrschichtfolien liegt das Trägermaterial häufig bereits im Verbund vor [169-172]. Zudem wurden mehrschichtige Filme z.B. durch UV-Bestrahlung in Gegenwart eines Photoinitiators [173] erzeugt oder durch elektrostatische Wechselwirkung durch Polyelektrolyte zusammengehalten [172, 174].

A

Ohne RB-Layer		in RB gequollen		RGX (10 min, 0,01 % RB)		In PBS gequollen	
		A	C	A	C	A	C
in RB gequollen	A	Green	Yellow	/	/	/	/
	C	Yellow	Orange	/	/	/	/
RGX (10 min, 0,01 % RB)	A	Green	Orange	Green	Green	/	/
	C	Red	Orange	Green	Yellow	/	/
in PBS gequollen	A	Green	Green	Green	Red	Red	Red
	C	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red

B

Mit RB-Layer (0,01 %, 5 µL)		in RB gequollen		RGX (10 min, 0,01 % RB)		In PBS gequollen	
		A	C	A	C	A	C
in RB gequollen	A	Green	Green	/	/	/	/
	C	Green	Green	/	/	/	/
RGX (10 min, 0,01 % RB)	A	Green	Yellow	Red	Orange	/	/
	C	Red	Red	Orange	Red	/	/
in PBS gequollen	A	Green	Red	Green	Red	Green	Green
	C	Red	Red	Green	Green	Green	Orange

Abbildung 5.37: Übersicht der Stabilität verschiedener Lamine bestehend aus Collagen Solutions und Atelocollagen. Die Einzelsheets wurden auf unterschiedliche Weise vorbehandelt (gequollen in RB oder PBS, behandelt mit RGX). Optional ohne (A) oder mit (B) einer Schicht aus 0,01 % RB in PBS zwischen den Einzelsheets. Die Lamine wurden nach Herstellung in 1 mL PBS bei 37 °C für 24 h in einer 24-well-Platte inkubiert. Rot: Sheets lösen sich direkt voneinander ab. Orange: Sheets lösen sich nach 24 h voneinander ab. Gelb: Sheets lösen sich nach 24 h unter Aufwendung von Druck voneinander ab. Grün: Lamine nach 24 h weiterhin stabil. C: Collagen Solutions, A: Atelocollagen.



6 Fazit und Ausblick

6.1 Proteinadsorption durch Photobleichen zur Immobilisierung von Biomolekülen auf Oberflächen

Ziel dieses Teils der Arbeit war die strukturierte Photoimmobilisierung von Biomolekülen mit Hilfe einer Power-LED und der Vergleich mit der Belichtung mittels DMD und Konfokalmikroskop. Hierbei wurde die bekannte Methode *protein adsorption by photobleaching* genutzt, bei der die verwendeten Photosensibilisatoren im angeregten Triplet-Zustand mit der Umgebung reagieren können. Darüber hinaus sollte die Effizienz verschiedener Photosensibilisatoren für die Immobilisierung untersucht werden. Die Photosensibilisatoren kamen dabei am Protein gebunden, an der Oberfläche adsorbiert oder frei in Lösung zum Einsatz. Durch die photoinduzierte Immobilisierung kann beispielsweise die Herstellung von definierten Proteinmustern ermöglicht werden, die zur Untersuchung der Zellmigration entlang von Proteingradienten genutzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immobilisierung von Biotin und des Modellchemokins IL-8 untersucht. Da Biotin bereits in verschiedenen Arbeiten erfolgreich photochemisch immobilisiert werden konnte [44, 59, 175], diente es dem direkten Methodenvergleich.

Die Immobilisierung von Biotin-5-Fluorescein aus BSA-beschichteten Glasobjektträgern mithilfe von blauem Licht verlief erfolgreich und führte unter Verwendung des CLSM zu höheren S/HG-Verhältnissen als bei Nutzung der Power-LED. Möglicherweise war die Intensität der Power-LED nicht ausreichend hoch, um vergleichbare Ergebnisse mit der bereits beschriebenen Belichtung mittels CLSM^[73] zu erzielen. Eine andere Möglichkeit für die unterschiedlich starken S/HG-Verhältnisse ist, dass die Strukturen, die mittels Power-LED über die Metalllochmaske erzeugt werden, zu groß gegenüber Inhomogenitäten auf der Oberfläche sind. Bestärkt wurden diese Annahmen zunächst dadurch, dass der belichtete Bereich beim Immobilisierungsversuch von IL-8-S72C-Fluorescein auf BSA-beschichteten Glasobjektträgern mittels Power-LED nicht klar erkennbar war. Allerdings wurde auch deutlich, dass IL-8 eine unspezifische Wechselwirkung mit BSA auf dem Glasobjektträger einging, was niedrige S/HG-Verhältnisse zur Folge hatte.

IL-8-S72C-Fluorescein bzw. IL-8 mit freiem Fluorescein als Photosensibilisator konnten durch Belichtung mittels DMD erfolgreich auf NH₂- bzw. MACS-funktionalisierten Glasobjektträgern immobilisiert werden. Besonders bei der Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf MACS-funktionalisierten Glasobjektträgern, mit der IL-8 nicht unspezifisch wechselwirkte, konnten durch Belichtung über DMD die, im Rahmen dieser Arbeit, höchsten S/HG-Verhältnisse generiert werden. Da sich die Bestrahlungsintensitäten von DMD und Power-LED ähneln, wurde angenommen, dass die alternative Oberflächenbeschichtung zu den hohen S/HG-Verhältnissen mittels Power-LED führte. Um allerdings eine Aussage darüber treffen zu können, müsste in weiteren Versuchen die Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf MACS-funktionalisierten Oberflächen mittels Power-LED untersucht werden.

Bei der Photoimmobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein bzw. IL-8 wt mit freiem Fluorescein auf BSA-beschichteten Glasobjektträgern mittels CLSM wurden unerwartete Ergebnisse erhalten. Im Fall von IL-8-S72C-Fluorescein konnte im roten Kanal kein Unterschied zwischen belichteten Bereichen und Hintergrund detektiert werden. Im grünen Kanal erschien der belichtete Bereich jedoch ausgebleicht. Dies spricht für einen starken Photobleichprozess, bei dem das Protein vermutlich oxidativ geschädigt wurde und somit nicht mehr detektiert werden

konnte. Es wurde daher angenommen, dass die Belichtung zu lange bzw. zu intensiv war und somit für weiterfolgende Versuche optimiert werden muss. Im Fall von IL-8 wt und freiem Fluorescein war der belichtete Bereich sowohl im roten als auch im grünen Kanal deutlich heller als der Hintergrund und die Immobilisierung von IL-8 wt somit erfolgreich. Möglicherweise war die Photooxidation geringer als bei IL-8-S72C, weil der Photosensibilisator nicht an IL-8 konjugiert vorlag und der Energietransfer somit weniger effizient wäre. Während der Belichtung bindet Fluorescein offenbar an die Oberfläche, behält dabei seine Fluoreszenz bei und ist somit im grünen Kanal detektierbar.

Bei der Immobilisierung von IL-8 wt mittels Photosensibilisatoren einer höheren Triplet-Quantenausbeute als Fluorescein, konnten bei Belichtung über Power-LED die besten S/HG-Verhältnisse bei Oberflächenbeschichtungen mit Bengalrosa und Rattenschwanzkollagen bzw. Gelatine erreicht werden. Versuche mittels CLSM zeigten auf mit Bengalrosa und Rattenschwanzkollagen beschichteten Glasobjektträgern vergleichbare Ergebnisse. Diese Strategie stellte sich daher als am erfolgsversprechendsten heraus und bietet zudem den Vorteil, dass IL-8 nicht im Vorfeld an einen Photosensibilisator konjugiert werden muss. Da der für die Reaktion benötigte Photosensibilisator bereits auf der Oberfläche vorliegt, kann IL-8 wt nach Belichtung in einem einstufigen Prozess direkt mittels des FITC-konjugierten anti IL-8 Antikörpers nachgewiesen werden. Mit dieser Methode ist die Immobilisierung verschiedener nicht-modifizierter Proteine denkbar. In zukünftigen Versuchen sollte IL-8 wt auf mit Bengalrosa und Rattenschwanzkollagen bzw. Gelatine beschichteten Oberfläche mittels DMD immobilisiert werden, um zu untersuchen, ob die Ergebnisse zusätzlich verbessert werden können.

Mit Hilfe dieser Erkenntnisse könnten Chemokingradienten auf einfache Weise für die Untersuchung der Haptotaxis erstellt werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, lösliche Gradienten, die beispielsweise innerhalb von Mikrofluidikkanälen erzeugt werden können, *in situ* zu immobilisieren und somit den Einfluss von löslichen und gebundenen Gradienten auf Zellen zu untersuchen. In nachfolgenden Arbeiten wurde die Erzeugung von IL-8 Gradienten in Mikrofluidikkanälen mittels Bengalrosa auf Kollagen untersucht.^[176] Diese Arbeiten waren jedoch nicht erfolgreich, da die Photoimmobilisierung in den physiologisch sinnvollen Konzentrationsbereichen nicht effizient genug ablief. Dies könnte durch die Nutzung des DMD umgangen werden, da hierbei verschiedene Lichtintensitäten eingestellt werden können, mit denen das Protein aus einer homogenen Lösung in Form eines Gradienten immobilisiert werden kann.

6.2 Charakterisierung von quervernetztem Kollagen

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung, inwieweit die Eigenschaften von drei unterschiedlichen Kollagen-Typ-I-Materialien durch RGX beeinflusst werden können. Darüber hinaus sollte getestet werden, ob die Herstellung von stabilen Kollagenlaminaten aus verschiedenen Kollagensheets mittels RGX möglich ist.

Für die Untersuchung der Wirkung von RGX auf die Kollagensheets wurden Quellverhalten, Mikrostruktur, mechanische Stabilität sowie die Freisetzung des Modellantibiotikums Vancomycin untersucht. Bei dichten Kollagenmaterialien wie Collagen Solutions und Viscofan war der Einfluss von RGX geringer als bei dem schwammartigen Atelocollagen. Der größte Einfluss wurde bei Atelocollagen deutlich, das durch RGX mechanisch stabilisiert werden konnte. Dies äußerte sich in einem geringeren Quellgrad und in einer stark erhöhten Dicke und somit Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischem Druck. Ein Einfluss auf die Freisetzung von Vancomycin konnte bei keinem der untersuchten Kollagensheets gezeigt werden, sodass der anfängliche Burst-Effekt bei der Freisetzung aus den unbehandelten Proben auch nach der Stabilisierung durch RGX erhalten blieb.

Für die Herstellung der Lamine wurden unterschiedliche Herstellungsarten bewertet. Bei der erfolgversprechendsten Variante wurden die Kollagensheets in 0,01 % Bengalrosa in PBS gequollen und zwischen den Sheets zusätzlich eine Lösung aus 0,01 % Bengalrosa zugegeben. Auf Basis der in dieser Arbeit entwickelten Herstellungsart von Kollagenlaminaten konnten in Folgearbeiten beispielsweise das Quellverhalten und die Freisetzung von Vancomycin aus Kollagenlaminaten^[166, 168] sowie die mechanische Stabilität in Zugversuchen^[167] untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass der anfängliche Burst-Effekt bei der Vancomycin-Freisetzung aus Einzelsheets durch Verwendung von zwei oder drei Schichten in den Kollagenlaminaten beeinflusst werden konnte, was in einer verlängerten halbmaximalen Freisetzung resultierte.^[166] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Freisetzung bei höheren und niedrigeren pH-Werten verzögert wird.^[168]

Mit Hilfe der beschriebenen Methode können im klinischen Umfeld handelserhältliche Kollagensheets vor Ort kombiniert und durch RGX stabil verbunden werden, um ihre Eigenschaften an verschiedene Anwendungen anzupassen. Beispielsweise kann Atelocollagen, das das Zellwachstum unterstützt^[141] und größere Mengen von Wirkstoffen aufnehmen und schnell freisetzen kann, mit Collagen Solutions kombiniert werden, um eine Stabilitätssteigerung zu erzielen. Damit die modulare Herstellung von Kollagenlaminaten durch RGX in klinischen Anwendungen für die Wundheilung zum Einsatz kommen kann, sollten zukünftige Arbeiten neben der Antibiotikafreisetzung auch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Kollagenlaminaten berücksichtigen.



Literaturverzeichnis

- [1] C. G. Bochet, Photolabile protecting groups and linkers, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, 125-142.
- [2] V. R. Pillai, Photoremovable protecting groups in organic synthesis, *Synthesis* **1980**, *1*, 1-26.
- [3] M. Goeldner, R. Givens, *Dynamic studies in biology: phototriggers, photoswitches and caged biomolecules*, John Wiley & Sons, **2006**.
- [4] A. del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, Surface Modification with Orthogonal Photosensitive Silanes for Sequential Chemical Lithography and Site-Selective Particle Deposition, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 4707-4712.
- [5] J. Cui, V. S. Miguel, A. del Campo, Light-triggered multifunctionality at surfaces mediated by photolabile protecting groups, *Macromolecular Rapid Communications* **2013**, *34*, 310-329.
- [6] R. M. Hensarling, E. A. Hoff, A. P. LeBlanc, W. Guo, S. B. Rahane, D. L. Patton, Photocaged pendent thiol polymer brush surfaces for postpolymerization modifications via thiol-click chemistry, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2013**, *51*, 1079-1090.
- [7] P. Klán, T. s. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: reaction mechanisms and efficacy, *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 119-191.
- [8] P. Wang, Photolabile protecting groups: structure and reactivity, *Asian Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2*, 452-464.
- [9] G. C. Ellis-Davies, Caged compounds: photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology, *Nature methods* **2007**, *4*, 619-628.
- [10] S. R. Adams, R. Y. Tsien, Controlling cell chemistry with caged compounds, *Annual review of physiology* **1993**, *55*, 755-784.
- [11] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications, *Photochemical & photobiological sciences* **2002**, *1*, 441-458.
- [12] N. Kotzur, B. t. Briand, M. Beyermann, V. Hagen, Wavelength-selective photoactivatable protecting groups for thiols, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 16927-16931.
- [13] D. Ryan, B. A. Parviz, V. Linder, V. Semetey, S. K. Sia, J. Su, M. Mrksich, G. M. Whitesides, Patterning multiple aligned self-assembled monolayers using light, *Langmuir* **2004**, *20*, 9080-9088.
- [14] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *science* **1991**, *251*, 767-773.

-
- [15] M. C. Pirrung, C.-Y. Huang, A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using “caged” biotin, *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7*, 317-321.
- [16] M. Gropeanu, M. Bhagawati, R. A. Gropeanu, G. M. Rodríguez Muñiz, S. Sundaram, J. Piehler, A. del Campo, A versatile toolbox for multiplexed protein micropatterning by laser lithography, *small* **2013**, *9*, 838-845.
- [17] T. Pauloehrl, G. Delaittre, M. Bruns, M. Meißler, H. G. Börner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, (Bio) molecular surface patterning by phototriggered oxime ligation, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 9181-9184.
- [18] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, Wavelength-selective cleavage of photoprotecting groups: strategies and applications in dynamic systems, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 3358-3377.
- [19] A. Blawas, W. Reichert, Protein patterning, *Biomaterials* **1998**, *19*, 595-609.
- [20] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic press, **2013**.
- [21] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, Protein immobilization strategies for protein biochips, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775-1789.
- [22] T. Matsuda, T. Sugawara, Development of surface photochemical modification method for micropatterning of cultured cells, *Journal of biomedical materials research* **1995**, *29*, 749-756.
- [23] H. Bayley, J. R. Knowles, Photogenerated reagents for membrane labeling. 2. Phenylcarbene and adamantylidene formed within the lipid bilayer, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2420-2423.
- [24] Y. Chevlot, O. Bucher, D. Léonard, H. J. Mathieu, H. Sigrist, Synthesis and characterization of a photoactivatable glycoaryldiazirine for surface glycoengineering, *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 169-175.
- [25] J.-F. Clemence, J. P. Ranieri, P. Aebischer, H. Sigrist, Photoimmobilization of a bioactive laminin fragment and pattern-guided selective neuronal cell attachment, *Bioconjugate Chemistry* **1995**, *6*, 411-417.
- [26] J. F. Keana, S. X. Cai, New reagents for photoaffinity labeling: synthesis and photolysis of functionalized perfluorophenyl azides, *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 3640-3647.
- [27] R. A. Smith, J. R. Knowles, The preparation and photolysis of 3-aryl-3 H-diazirines, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1975**, 686-694.
- [28] G. Dorman, G. D. Prestwich, Benzophenone photophores in biochemistry, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661-5673.
- [29] L. F. Rozsnyai, D. R. Benson, S. P. Fodor, P. G. Schultz, Photolithographic immobilization of biopolymers on solid supports, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1992**, *31*, 759-761.

-
- [30] A. Collioud, J. F. Clemence, M. Saenger, H. Sigrist, Oriented and covalent immobilization of target molecules to solid supports: Synthesis and application of a light-activatable and thiol-reactive cross-linking reagent, *Bioconjugate Chemistry* **1993**, *4*, 528-536.
- [31] H. Sigrist, H. Gao, B. Wegmüller, Light-dependent, covalent immobilization of biomolecules on 'inert' surfaces, *Bio/technology* **1992**, *10*, 1026-1028.
- [32] G. Sundarababu, H. Gao, H. Sigrist, Photochemical linkage of antibodies to silicon chips, *Photochemistry and Photobiology* **1995**, *61*, 540-544.
- [33] H. Gao, M. Sängler, R. Luginbühl, H. Sigrist, Immunosensing with photo-immobilized immunoreagents on planar optical wave guides, *Biosensors and Bioelectronics* **1995**, *10*, 317-328.
- [34] T. Sugawara, T. Matsuda, Photochemical surface derivatization of a peptide containing Arg-Gly-Asp (RGD), *Journal of biomedical materials research* **1995**, *29*, 1047-1052.
- [35] E. M. Ericsson, K. Enander, L. Bui, I. Lundström, P. Konradsson, B. Liedberg, Site-specific and covalent attachment of his-tagged proteins by chelation assisted photoimmobilization: a strategy for microarraying of protein ligands, *Langmuir* **2013**, *29*, 11687-11694.
- [36] A. K. Adak, B.-Y. Li, L.-D. Huang, T.-W. Lin, T.-C. Chang, K. C. Hwang, C.-C. Lin, Fabrication of antibody microarrays by light-induced covalent and oriented immobilization, *ACS applied materials & interfaces* **2014**, *6*, 10452-10460.
- [37] H. Abrahamse, M. R. Hamblin, New photosensitizers for photodynamic therapy, *Biochemical Journal* **2016**, *473*, 347-364.
- [38] M. Rajendran, Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods, *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **2016**, *13*, 175-187.
- [39] R. W. Redmond, I. E. Kochevar, Medical applications of rose bengal-and riboflavin-photosensitized protein crosslinking, *Photochemistry and Photobiology* **2019**, *95*, 1097-1115.
- [40] K. Konopka, T. Goslinski, Photodynamic therapy in dentistry, *Journal of dental research* **2007**, *86*, 694-707.
- [41] J. Zhao, W. Wu, J. Sun, S. Guo, Triplet photosensitizers: from molecular design to applications, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 5323-5351.
- [42] P. Meisel, T. Kocher, Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art, *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology* **2005**, *79*, 159-170.
- [43] J. M. Bélisle, J. P. Correia, P. W. Wiseman, T. E. Kennedy, S. Costantino, Patterning protein concentration using laser-assisted adsorption by photobleaching, LAPAP, *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 2164-2167.
- [44] M. A. Holden, P. S. Cremer, Light activated patterning of dye-labeled molecules on surfaces, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8074-8075.

-
- [45] J. M. Bélisle, D. Kunik, S. Costantino, Rapid multicomponent optical protein patterning, *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 3580-3585.
- [46] X. Zhao, K. Long, Y. Liu, W. Li, S. Liu, L. Wang, L. Ren, To prepare the collagen-based artificial cornea with improved mechanical and biological property by ultraviolet-A/riboflavin crosslinking, *Journal of Applied Polymer Science* **2017**, *134*, 1-10.
- [47] N. Bekesi, P. Gallego-Munoz, L. Ibares-Frias, P. Perez-Merino, M. C. Martinez-Garcia, I. E. Kochevar, S. Marcos, Biomechanical changes after in vivo collagen cross-linking with rose bengal–green light and riboflavin-UVA, *Investigative ophthalmology & visual science* **2017**, *58*, 1612-1620.
- [48] E. E. Verter, T. E. Gisel, P. Yang, A. J. Johnson, R. W. Redmond, I. E. Kochevar, Light-initiated bonding of amniotic membrane to cornea, *Investigative ophthalmology & visual science* **2011**, *52*, 9470-9477.
- [49] D. Cherfan, E. E. Verter, S. Melki, T. E. Gisel, F. J. Doyle, G. Scarcelli, S. H. Yun, R. W. Redmond, I. E. Kochevar, Collagen cross-linking using rose bengal and green light to increase corneal stiffness, *Investigative ophthalmology & visual science* **2013**, *54*, 3426-3433.
- [50] A. Nakada, K. Shigeno, T. Sato, T. Hatayama, M. Wakatsuki, T. Nakamura, Optimal dehydrothermal processing conditions to improve biocompatibility and durability of a weakly denatured collagen scaffold, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2017**, *105*, 2301-2307.
- [51] M. Yao, A. Yaroslavsky, F. P. Henry, R. W. Redmond, I. E. Kochevar, Phototoxicity is not associated with photochemical tissue bonding of skin, *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery* **2010**, *42*, 123-131.
- [52] J. S. Lee, R. T. Hill, A. Chilkoti, W. L. Murphy, in *Biomaterials Science*, Elsevier, **2020**, pp. 553-573.
- [53] X. Chen, L. Chi, in *Frontiers of Nanoscience, Vol. 1*, Elsevier, **2009**, pp. 326-365.
- [54] L. G. Gómez-Mascaraque, R. Palao-Suay, B. Vázquez, in *Smart Polymers and their Applications*, Elsevier, **2019**, pp. 481-531.
- [55] A. C. von Philipsborn, S. Lang, A. Bernard, J. Loeschinger, C. David, D. Lehnert, M. Bastmeyer, F. Bonhoeffer, Microcontact printing of axon guidance molecules for generation of graded patterns, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 1322-1328.
- [56] S. R. Coyer, A. J. García, E. Delamarche, Facile preparation of complex protein architectures with sub-100-nm resolution on surfaces, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 6837-6840.
- [57] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, Patterned delivery of immunoglobulins to surfaces using microfluidic networks, *Science* **1997**, *276*, 779-781.

-
- [58] M. Mayer, J. Yang, I. Gitlin, D. H. Gracias, G. M. Whitesides, Micropatterned agarose gels for stamping arrays of proteins and gradients of proteins, *Proteomics* **2004**, *4*, 2366-2376.
- [59] A. Waldbaur, B. Waterkotte, K. Schmitz, B. E. Rapp, Maskless projection lithography for the fast and flexible generation of grayscale protein patterns, *Small* **2012**, *8*, 1570-1578.
- [60] I. Rink, J. Rink, D. Helmer, D. Sachs, K. Schmitz, A Haptotaxis Assay for Leukocytes Based on Surface-Bound Chemokine Gradients, *The Journal of Immunology* **2015**, *194*, 5549-5558.
- [61] S. G. Ricoult, T. E. Kennedy, D. Juncker, Substrate-bound protein gradients to study haptotaxis, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **2015**, *3*, 1-12.
- [62] J. Doh, D. J. Irvine, Photogenerated polyelectrolyte bilayers from an aqueous-processible photoresist for multicomponent protein patterning, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9170-9171.
- [63] M. Alvarez, A. Best, S. Pradhan-Kadam, K. Koynov, U. Jonas, M. Kreiter, Single-Photon and Two-Photon Induced Photocleavage for Monolayers of an Alkyltriethoxysilane with a Photoprotected Carboxylic Ester, *Advanced Materials* **2008**, *20*, 4563-4567.
- [64] J. G. Goodberlet, Patterning 100 nm features using deep-ultraviolet contact photolithography, *Applied Physics Letters* **2000**, *76*, 667-669.
- [65] M. Totzeck, W. Ulrich, A. Göhnermeier, W. Kaiser, Pushing deep ultraviolet lithography to its limits, *nature photonics* **2007**, *1*, 629-631.
- [66] J. Scrimgeour, V. K. Kodali, D. T. Kovari, J. E. Curtis, Photobleaching-activated micropatterning on self-assembled monolayers, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2010**, *22*, 1-6.
- [67] A. Böhm, S. Trosien, O. Avrutina, H. Kolmar, M. Biesalski, Covalent attachment of enzymes to paper fibers for paper-based analytical devices, *Frontiers in chemistry* **2018**, *6*, 1-10.
- [68] T. K. Claus, S. Telitel, A. Welle, M. Bastmeyer, A. P. Vogt, G. Delaittre, C. Barner-Kowollik, Light-driven reversible surface functionalization with anthracenes: visible light writing and mild UV erasing, *Chemical Communications* **2017**, *53*, 1599-1602.
- [69] R. C. Dunn, Near-field scanning optical microscopy, *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2891-2928.
- [70] M. J. Hynes, J. A. Maurer, Photoinduced monolayer patterning for the creation of complex protein patterns, *Langmuir* **2012**, *28*, 16237-16242.
- [71] M. A. Scott, Z. D. Wissner-Gross, M. F. Yanik, Ultra-rapid laser protein micropatterning: screening for directed polarization of single neurons, *Lab on a Chip* **2012**, *12*, 2265-2276.
- [72] J. Schwarz, V. Bierbaum, J. Merrin, T. Frank, R. Hauschild, T. Bollenbach, S. Tay, M. Sixt, M. Mehling, A microfluidic device for measuring cell migration towards substrate-bound and soluble chemokine gradients, *Scientific reports* **2016**, *6*, 1-12.

-
- [73] J. M. Belisle, J. Mazzaferri, S. Costantino, Laser-assisted adsorption by photobleaching, *Methods in cell biology* **2013**, *119*, 125-140.
- [74] P. F. Van Kessel, L. J. Hornbeck, R. E. Meier, M. R. Douglass, A MEMS-based projection display, *Proceedings of the IEEE* **1998**, *86*, 1687-1704.
- [75] K. Hane, M. Sasaki, in *Comprehensive microsystems*, Elsevier, **2007**, pp. 1-63.
- [76] J. B. Sampsell, Digital micromirror device and its application to projection displays, *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena* **1994**, *12*, 3242-3246.
- [77] P. O. Strale, A. Azioune, G. Bugnicourt, Y. Lecomte, M. Chahid, V. Studer, Multiprotein Printing by Light-Induced Molecular Adsorption, *Advanced Materials* **2016**, *28*, 2024-2029.
- [78] S. Singh-Gasson, R. D. Green, Y. Yue, C. Nelson, F. Blattner, M. R. Sussman, F. Cerrina, Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array, *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 974-978.
- [79] N. Xiang, H. Yi, K. Chen, S. Wang, Z. Ni, Investigation of the maskless lithography technique for the rapid and cost-effective prototyping of microfluidic devices in laboratories, *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2013**, *23*, 1-11.
- [80] T. Naiser, T. Mai, W. Michel, A. Ott, Versatile maskless microscope projection photolithography system and its application in light-directed fabrication of DNA microarrays, *Review of Scientific Instruments* **2006**, *77*, 1-11.
- [81] S. Chen, L. M. Smith, Photopatterned thiol surfaces for biomolecule immobilization, *Langmuir* **2009**, *25*, 12275-12282.
- [82] D.-S. Shin, K.-N. Lee, K.-H. Jang, J.-K. Kim, W.-J. Chung, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, Protein patterning by maskless photolithography on hydrophilic polymer-grafted surface, *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *19*, 485-494.
- [83] P. J. Walla, *Modern biophysical chemistry: detection and analysis of biomolecules*, John Wiley & Sons, **2014**.
- [84] M. S. Baptista, J. Cadet, P. Di Mascio, A. A. Ghogare, A. Greer, M. R. Hamblin, C. Lorente, S. C. Nunez, M. S. Ribeiro, A. H. Thomas, Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways, *Photochemistry and Photobiology* **2017**, *93*, 912-919.
- [85] C. M. Wertheimer, C. Elhardt, S. M. Kaminsky, L. Pham, Q. Pei, B. Mendes, S. Afshar, I. E. Kochevar, Enhancing rose bengal-photosensitized protein crosslinking in the Cornea, *Investigative ophthalmology & visual science* **2019**, *60*, 1845-1852.
- [86] M. R. Hamblin, H. Abrahamse, Oxygen-Independent Antimicrobial Photoinactivation: Type III Photochemical Mechanism?, *Antibiotics* **2020**, *9*, 1-17.
- [87] L. Song, E. Hennink, I. T. Young, H. J. Tanke, Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy, *Biophysical Journal* **1995**, *68*, 2588-2600.

-
- [88] C. M. Wertheimer, B. Mendes, Q. Pei, K. Brandt, I. E. Kochevar, Arginine as an enhancer in rose bengal photosensitized corneal crosslinking, *Translational Vision Science & Technology* **2020**, *9*, 24-24.
- [89] E. I. Alarcon, H. Poblete, H. Roh, J.-F. Couture, J. Comer, I. E. Kochevar, Rose Bengal binding to collagen and tissue photobonding, *ACS omega* **2017**, *2*, 6646-6657.
- [90] M. G. Patino, M. E. Neiders, S. Andreana, B. Noble, R. E. Cohen, Collagen: an overview, *Implant dentistry* **2002**, *11*, 280-285.
- [91] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications, *Materials* **2010**, *3*, 1863-1887.
- [92] K. Lin, D. Zhang, M. H. Macedo, W. Cui, B. Sarmiento, G. Shen, Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine, *Advanced Functional Materials* **2019**, *29*, 1-16.
- [93] B. An, Y.-S. Lin, B. Brodsky, Collagen interactions: Drug design and delivery, *Advanced drug delivery reviews* **2016**, *97*, 69-84.
- [94] D. J. Hulmes, A. Miller, D. A. Parry, K. A. Piez, J. Woodhead-Galloway, Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing, *Journal of Molecular Biology* **1973**, *79*, 137-148.
- [95] M. D. Shoulders, R. T. Raines, Collagen structure and stability, *Annual review of biochemistry* **2009**, *78*, 929-958.
- [96] P. Fratzl, *Collagen: structure and mechanics, an introduction*, Springer, **2008**.
- [97] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner, Collagens—structure, function, and biosynthesis, *Advanced drug delivery reviews* **2003**, *55*, 1531-1546.
- [98] A. M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, G. Ciardelli, Collagen for bone tissue regeneration, *Acta biomaterialia* **2012**, *8*, 3191-3200.
- [99] R. S. Walton, D. D. Brand, J. T. Czernuszka, Influence of telopeptides, fibrils and crosslinking on physicochemical properties of type I collagen films, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2010**, *21*, 451-461.
- [100] J. Glowacki, S. Mizuno, Collagen scaffolds for tissue engineering, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **2008**, *89*, 338-344.
- [101] M. Maeda, S. Tani, A. Sano, K. Fujioka, Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs, *Journal of Controlled Release* **1999**, *62*, 313-324.
- [102] A. Lynn, I. Yannas, W. Bonfield, Antigenicity and immunogenicity of collagen, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2004**, *71*, 343-354.
- [103] A. Sionkowska, S. Skrzyński, K. Śmiechowski, A. Kołodziejczak, The review of versatile application of collagen, *Polymers for Advanced Technologies* **2017**, *28*, 4-9.
- [104] C. Meena, S. Mengi, S. Deshpande, Biomedical and industrial applications of collagen, *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences* **1999**, *111*, 319-329.

-
- [105] E. Davison-Kotler, W. S. Marshall, E. García-Gareta, Sources of collagen for biomaterials in skin wound healing, *Bioengineering* **2019**, *6*, 1-15.
- [106] T. Miyata, T. Taira, Y. Noishiki, Collagen engineering for biomaterial use, *Clinical materials* **1992**, *9*, 139-148.
- [107] X. Song, C. Zhu, D. Fan, Y. Mi, X. Li, R. Z. Fu, Z. Duan, Y. Wang, R. R. Feng, A novel human-like collagen hydrogel scaffold with porous structure and sponge-like properties, *Polymers* **2017**, *9*, 1-16.
- [108] M. Sheikholeslam, M. E. Wright, M. G. Jeschke, S. Amini-Nik, Biomaterials for skin substitutes, *Advanced healthcare materials* **2018**, *7*, 1-20.
- [109] J. Mano, R. Reis, Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **2007**, *1*, 261-273.
- [110] C. Dong, Y. Lv, Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives, *Polymers* **2016**, *8*, 1-20.
- [111] N. L'heureux, S. Paquet, R. Labbé, L. Germain, F. A. Auger, A completely biological tissue-engineered human blood vessel, *The FASEB Journal* **1998**, *12*, 47-56.
- [112] M. Ahearne, J. Fernández-Pérez, S. Masterton, P. W. Madden, P. Bhattacharjee, Designing scaffolds for corneal regeneration, *Advanced Functional Materials* **2020**, *30*, 1-24.
- [113] W. A. Lackington, A. J. Ryan, F. J. O'Brien, Advances in nerve guidance conduit-based therapeutics for peripheral nerve repair, *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2017**, *3*, 1221-1235.
- [114] A. Sano, M. Maeda, S. Nagahara, T. Ochiya, K. Honma, H. Itoh, T. Miyata, K. Fujioka, Atelocollagen for protein and gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 1651-1677.
- [115] S. Bettini, V. Bonfrate, Z. Syrgiannis, A. Sannino, L. Salvatore, M. Madaghiele, L. Valli, G. Giancane, Biocompatible collagen paramagnetic scaffold for controlled drug release, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2599-2608.
- [116] L. Yao, F. Phan, Y. Li, Collagen microsphere serving as a cell carrier supports oligodendrocyte progenitor cell growth and differentiation for neurite myelination in vitro, *Stem cell research & therapy* **2013**, *4*, 1-8.
- [117] D. Swatschek, W. Schatton, W. E. Müller, J. Kreuter, Microparticles derived from marine sponge collagen (SCMPs): preparation, characterization and suitability for dermal delivery of all-trans retinol, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* **2002**, *54*, 125-133.
- [118] Y.-K. Lin, T.-Y. Lin, H.-P. Su, Extraction and characterisation of telopeptide-poor collagen from porcine lung, *Food Chemistry* **2011**, *124*, 1583-1588.
- [119] Z. Zhang, G. Li, B. Shi, Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes, *Journal-society of leather technologists and chemists* **2006**, *90*, 23-28.

-
- [120] H. Xiufu, F. Daidi, L. Yan'e, X. Zhang, S. Huijuan, M. Yu, M. Xiaoxuan, Z. Guifang, Kinetics of high cell density fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* producing human-like collagen, *Chinese Journal of Chemical Engineering* **2006**, *14*, 242-247.
- [121] A. M. E. Matinong, Y. Chisti, K. L. Pickering, R. G. Haverkamp, Collagen extraction from animal skin, *Biology* **2022**, *11*, 1-15.
- [122] N. Davidenko, C. Schuster, D. Bax, N. Raynal, R. W. Farndale, S. Best, R. Cameron, Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics, *Acta biomaterialia* **2015**, *25*, 131-142.
- [123] L. O. Damink, P. Dijkstra, M. Van Luyn, P. Van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, *Journal of materials science: materials in medicine* **1995**, *6*, 460-472.
- [124] X. Wu, L. Black, G. Santacana-Laffitte, C. W. Patrick Jr, Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen–chitosan hydrogels for adipose tissue engineering, *Journal of biomedical materials research Part A* **2007**, *81*, 59-65.
- [125] M. D. Harriger, A. P. Supp, G. D. Warden, S. T. Boyce, Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* **1997**, *35*, 137-145.
- [126] M. Rafat, F. Li, P. Fagerholm, N. S. Lagali, M. A. Watsky, R. Munger, T. Matsuura, M. Griffith, PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen–chitosan hydrogels for corneal tissue engineering, *Biomaterials* **2008**, *29*, 3960-3972.
- [127] J. Pieper, T. Hafmans, J. Veerkamp, T. Van Kuppevelt, Development of tailor-made collagen–glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects, *Biomaterials* **2000**, *21*, 581-593.
- [128] E. Khor, Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses, *Biomaterials* **1997**, *18*, 95-105.
- [129] L. O. Damink, P. Dijkstra, M. Van Luyn, P. Van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1995**, *6*, 429-434.
- [130] W. Kamimura, H. Koyama, T. Miyata, T. Takato, Sugar-based crosslinker forms a stable atelocollagen hydrogel that is a favorable microenvironment for 3D cell culture, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2014**, *102*, 4309-4316.
- [131] C. F. Rousseau, C. H. Gagnieu, In vitro cytocompatibility of porcine type I atelocollagen crosslinked by oxidized glycogen, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1503-1510.
- [132] D. P. Speer, M. Chvapil, C. Eskelson, J. Ulreich, Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials, *Journal of biomedical materials research* **1980**, *14*, 753-764.
- [133] D. Simmons, J. Kearney, Evaluation of collagen cross-linking techniques for the stabilization of tissue matrices, *Biotechnology and applied biochemistry* **1993**, *17*, 23-29.

-
- [134] K. S. Weadock, E. J. Miller, L. D. Bellincampi, J. P. Zawadsky, M. G. Dunn, Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment, *Journal of biomedical materials research* **1995**, *29*, 1373-1379.
- [135] M. Nair, S. M. Best, R. E. Cameron, Crosslinking collagen constructs: Achieving cellular selectivity through modifications of physical and chemical properties, *Applied Sciences* **2020**, *10*, 1-14.
- [136] N. Davidenko, D. V. Bax, C. F. Schuster, R. W. Farndale, S. W. Hamaia, S. M. Best, R. E. Cameron, Optimisation of UV irradiation as a binding site conserving method for crosslinking collagen-based scaffolds, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2016**, *27*, 1-17.
- [137] B. Chan, K. F. So, Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005**, *75*, 689-701.
- [138] B. P. Chan, I. E. Kochevar, R. W. Redmond, Enhancement of porcine skin graft adherence using a light-activated process, *Journal of Surgical Research* **2002**, *108*, 77-84.
- [139] B. Chan, O. Chan, K.-F. So, Effects of photochemical crosslinking on the microstructure of collagen and a feasibility study on controlled protein release, *Acta Biomaterialia* **2008**, *4*, 1627-1636.
- [140] O. Chan, K.-F. So, B. Chan, Fabrication of nano-fibrous collagen microspheres for protein delivery and effects of photochemical crosslinking on release kinetics, *Journal of Controlled Release* **2008**, *129*, 135-143.
- [141] S. Eckes, J. Braun, J. S. Wack, U. Ritz, D. Nickel, K. Schmitz, Rose Bengal Crosslinking to Stabilize Collagen Sheets and Generate Modulated Collagen Laminates, *International journal of molecular sciences* **2020**, *21*, 1-18.
- [142] P. Gallego-Munoz, L. Ibares-Frías, E. Lorenzo, S. Marcos, P. Pérez-Merino, N. Bekesi, I. E. Kochevar, M. C. Martínez-García, Corneal wound repair after rose bengal and green light crosslinking: clinical and histologic study, *Investigative ophthalmology & visual science* **2017**, *58*, 3471-3480.
- [143] T. Chik, X. Ma, T. Choy, Y. Li, H. Diao, W. Teng, S. Han, K. Cheung, B. Chan, Photochemically crosslinked collagen annulus plug: a potential solution solving the leakage problem of cell-based therapies for disc degeneration, *Acta Biomaterialia* **2013**, *9*, 8128-8139.
- [144] I. Rink, *Untersuchungsmethoden für die chemokininduzierte Migration von Leukozyten*, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, **2016**.
- [145] G. Pohl, *Bewertung von Fluorophoren für die lichtinduzierte Proteinimmobilisierung*, Masterthesis, Technische Universität Darmstadt, **2020**.

-
- [146] A. Kling, L. Dirscherl, P. S. Dittrich, Laser-assisted protein micropatterning in a thermoplastic device for multiplexed prostate cancer biomarker detection, *Lab on a Chip* **2023**, *23*, 534-541.
- [147] T. M. Nargang, M. Runck, D. Helmer, B. E. Rapp, Functionalization of paper using photobleaching: A fast and convenient method for creating paper-based assays with colorimetric and fluorescent readout, *Engineering in Life Sciences* **2016**, *16*, 525-531.
- [148] P. Bowers, G. Porter, Triplet state quantum yields for some aromatic hydrocarbons and xanthene dyes in dilute solution, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1967**, *299*, 348-353.
- [149] P. Murasecco-Suardi, E. Gassmann, A. M. Braun, E. Oliveros, Determination of the quantum yield of intersystem crossing of rose bengal, *Helvetica Chimica Acta* **1987**, *70*, 1760-1773.
- [150] E. Hipper, F. Lehmann, W. Kaiser, G. Hübner, J. Buske, M. Blech, D. Hinderberger, P. Garidel, Protein photodegradation in the visible range? Insights into protein photooxidation with respect to protein concentration, *International Journal of Pharmaceutics: X* **2023**, *5*, 1-14.
- [151] L. Zhao, X. Li, J. Zhao, S. Ma, X. Ma, D. Fan, C. Zhu, Y. Liu, A novel smart injectable hydrogel prepared by microbial transglutaminase and human-like collagen: Its characterization and biocompatibility, *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *68*, 317-326.
- [152] C. Nagorski, D. Opalecky, F. A. Bettelheim, A study of collagen-hyaluronan interaction through swelling in polyacrylamide gels, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* **1995**, *89*, 179-188.
- [153] G. Tronci, J. Yin, R. A. Holmes, H. Liang, S. J. Russell, D. J. Wood, Protease-sensitive atelocollagen hydrogels promote healing in a diabetic wound model, *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, *4*, 7249-7258.
- [154] H. Liang, S. J. Russell, D. J. Wood, G. Tronci, Monomer-induced customization of UV-cured atelocollagen hydrogel networks, *Frontiers in chemistry* **2018**, *6*, 1-14.
- [155] Y. Huang, K. M. Meek, Swelling studies on the cornea and sclera: the effects of pH and ionic strength, *Biophysical journal* **1999**, *77*, 1655-1665.
- [156] A. R. Khare, N. A. Peppas, Swelling/deswelling of anionic copolymer gels, *Biomaterials* **1995**, *16*, 559-567.
- [157] K. Vizarova, D. Bakoš, M. Rehakova, V. Macho, Modification of layered atelocollagen by ultraviolet irradiation and chemical cross-linking: structure stability and mechanical properties, *Biomaterials* **1994**, *15*, 1082-1086.
- [158] A. Shrestha, M. R. Hamblin, A. Kishen, Photoactivated rose bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-collagen, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2014**, *10*, 491-501.

-
- [159] H. M. Powell, S. T. Boyce, EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability, *Biomaterials* **2006**, *27*, 5821-5827.
- [160] R.-N. Chen, H.-O. Ho, M.-T. Sheu, Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase, *Biomaterials* **2005**, *26*, 4229-4235.
- [161] J. Rosenblatt, W. Rhee, D. Wallace, The effect of collagen fiber size distribution on the release rate of proteins from collagen matrices by diffusion, *Journal of controlled release* **1989**, *9*, 195-203.
- [162] M. Singh, J. A. Lumpkin, J. Rosenblatt, Mathematical modeling of drug release from hydrogel matrices via a diffusion coupled with desorption mechanism, *Journal of controlled release* **1994**, *32*, 17-25.
- [163] C. C. Coelho, S. R. Sousa, F. J. Monteiro, Heparinized nanohydroxyapatite/collagen granules for controlled release of vancomycin, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, *103*, 3128-3138.
- [164] J. A. Uquillas, O. Akkus, Modeling the electromobility of type-I collagen molecules in the electrochemical fabrication of dense and aligned tissue constructs, *Annals of biomedical engineering* **2012**, *40*, 1641-1653.
- [165] M. B. E. Turbay, V. Rey, N. M. Argañaraz, F. E. M. Vieyra, A. Aspée, E. A. Lissi, C. D. Borsarelli, Effect of dye localization and self-interactions on the photosensitized generation of singlet oxygen by rose bengal bound to bovine serum albumin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2014**, *141*, 275-282.
- [166] M. F. Kilb, Y. Moos, S. Eckes, J. Braun, U. Ritz, D. Nickel, K. Schmitz, An Additively Manufactured Sample Holder to Measure the Controlled Release of Vancomycin from Collagen Laminates, *Biomedicines* **2021**, *9*, 1-13.
- [167] J. Braun, S. Eckes, M. F. Kilb, D. Fischer, C. Eßbach, P. M. Rommens, P. Drees, K. Schmitz, D. Nickel, U. Ritz, Mechanical characterization of rose bengal and green light crosslinked collagen scaffolds for regenerative medicine, *Regenerative Biomaterials* **2021**, *8*, 1-14.
- [168] M. F. Kilb, U. Ritz, D. Nickel, K. Schmitz, pH-Dependent Release of Vancomycin from Modularly Assembled Collagen Laminates, *Polymers* **2022**, *14*, 1-9.
- [169] W. N. Drohan, M. J. MacPhee, S. I. Miekka, M. S. Singh, C. Elson, J. R. Taylor Jr, Google Patents, **2000**.
- [170] M. J. MacPhee, W. N. Drohan, C. J. Woolverton, Google Patents, **2000**.
- [171] P. G. Campbell, L. E. Weiss, J. Smith, Google Patents, **2010**.
- [172] X. Wen, K. L. Kirkwood, Google Patents, **2011**.
- [173] L. Bracaglia, P. Sharma, J. P. Fisher, Google Patents, **2017**.
- [174] N. J. Shah, J. Hong, N. Hyder, P. T. Hammond, Google Patents, **2013**.

-
- [175] J. P. C. J. M. Bélisle, P. W. Wiseman, T. E. Kennedy, S. Costantino, Patterning protein concentration using laser-assisted adsorption by photobleaching, LAPAP, *Lab on a Chip* **2008**, 8, 2164–2167.
- [176] M. Kilb, *Modification of biomaterials for the immobilization and release of chemokines*, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, **2023**.



7 Anhang

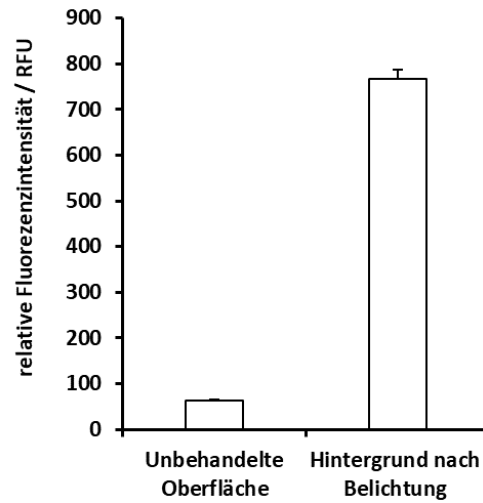


Abbildung 7.1: Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf einem NH₂-funktionalisierten Glasobjektträger mittels DMD. 80 µM IL-8-S72C-Fluorescein wurden für 3 min mittels DMD auf einem NH₂-funktionalisierten Glasobjektträger bestrahlt. Der Glasobjektträger wurde anschließend mittels Microarray Scanner (Pixelauflösung 5 µm, Laserleistung 100 %, Anregung 532 nm, Emissionsfilter optimiert für Cy3) aufgenommen. Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2) der relativen Fluoreszenzintensitäten des unbehandelten NH₂-funktionalisierten Glasobjektträgers und des Hintergrunds von immobilisiertem IL-8-S72C-Fluorescein nach Belichtung und vor Inkubation mit Antikörpern.

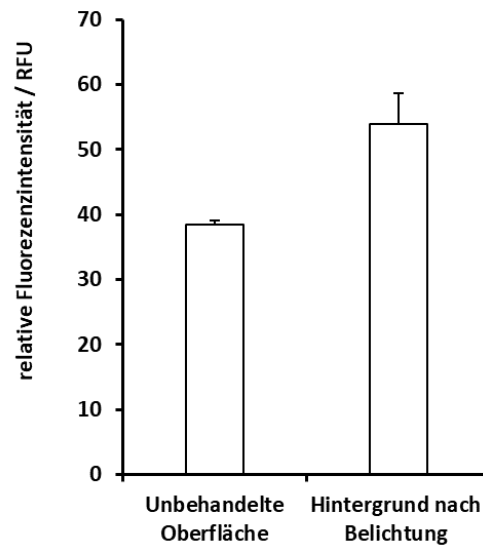


Abbildung 7.2: Immobilisierung von IL-8-S72C-Fluorescein auf einem MACS-funktionalisierten Glasobjektträger mittels DMD. 80 µM IL-8-S72C-Fluorescein wurden für 3 min mittels DMD auf einem MACS-funktionalisierten Glasobjektträger bestrahlt. Der Glasobjektträger wurde anschließend mittels Microarray Scanner (Pixelauflösung 5 µm, Laserleistung 100 %, Anregung 532 nm, Emissionsfilter optimiert für Cy3) aufgenommen. Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2) der relativen Fluoreszenzintensitäten des unbehandelten MACS-funktionalisierten Glasobjektträgers und des Hintergrunds von immobilisiertem IL-8-S72C-Fluorescein nach Belichtung und vor Inkubation mit Antikörpern.

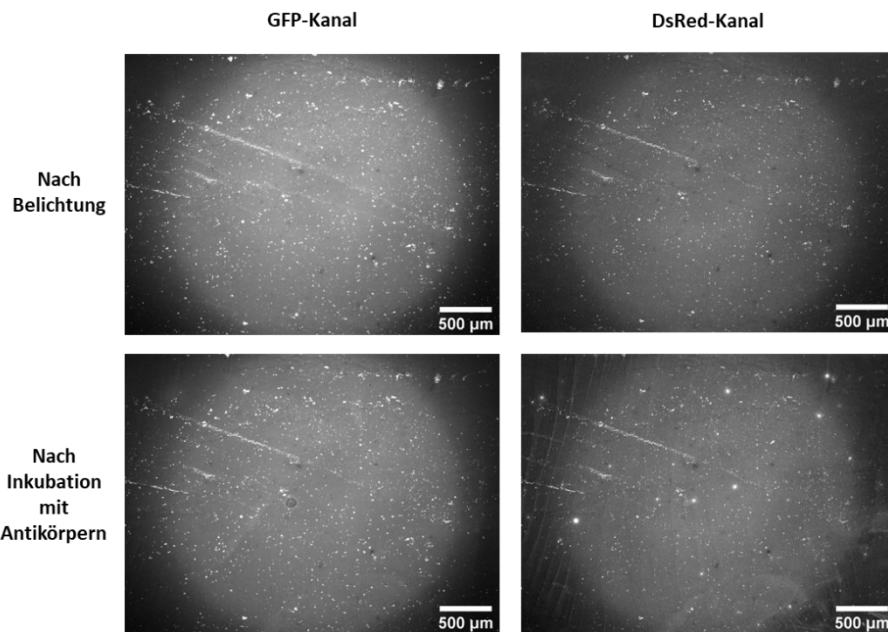


Abbildung 7.3: Fluoreszenzmikroskopische Kontrollaufnahmen des Immobilisierungsversuches von IL-8 wt mit freiem Fluorescein mittels Power-LED. Eine Lösung aus 80 μM IL-8 wt und 80 μM Fluorescein wurde für 30:00 min bei 490 nm (Power-LED) auf einem BSA beschichteten Glasobjektträger belichtet. Der Nachweis erfolgte mit anti-IL-8 (1:1000) und Cy3-konjugiertem anti-Maus (1:1000) und Inkubationszeiten von je 1 h. Links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen im GFP-Kanal nach Belichtung (oben) und nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper (unten). Rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen im DsRed-Kanal nach Belichtung (oben) und nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper. Belichtungszeit am Mikroskop im GFP-Kanal: 2,05 s.

Erklärungen

§8 Abs. 1 lit. c der Promotionsordnung der TU Darmstadt

Ich versichere hiermit, dass die elektronische Version meiner Dissertation mit der schriftlichen Version übereinstimmt und für die Durchführung des Promotionsverfahrens vorliegt.

§8 Abs. 1 lit. d der Promotionsordnung der TU Darmstadt

Ich versichere hiermit, dass zu einem vorherigen Zeitpunkt noch keine Promotion versucht wurde und zu keinem früheren Zeitpunkt an einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht wurde. In diesem Fall sind nähere Angaben über Zeitpunkt, Hochschule, Dissertationsthema und Ergebnis dieses Versuchs mitzuteilen.

§9 Abs. 1 der Promotionsordnung der TU Darmstadt

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen verfasst wurde.

§9 Abs. 2 der Promotionsordnung der TU Darmstadt

Die Arbeit hat bisher noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.

Darmstadt, den

Stefanie Eckes