

# Selektive Zellkontrolle und dreidimensionale Zellmodelle für biomedizinische Anwendungen

Kumulative Habilitationsschrift  
zur Erlangung der *Venia legendi*  
für das Fachgebiet  
Zellbiologie

An der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

vorgelegt im Dezember 2016  
von  
Dr. rer. nat. Sabrina Schlie-Wolter  
geboren am 05.10.1979, in Braunschweig



---

# 1 Zusammenfassung

Ausgehend von zellbiologischen Kenntnissen über Biomaterial-Zell-Wechselwirkungen und Gewebeformationen ist das Ziel der Regenerativen Medizin, Implantate zu optimieren und Alternativen zu Transplantaten zu finden, wobei gleichzeitig die natürlichen Regenerationsmechanismen im Körper aktiviert werden sollen. Implantatrevisionen durch verminderte Funktionalität und Lebensdauer sowie die begrenzte Verfügbarkeit von geeigneten Spenderorganen sind die limitierenden Faktoren für den Erfolg der klassischen Behandlungen.

Um die Implantatintegration in das Gewebe zu verbessern, ist die selektive Kontrolle des Zellverhaltens erforderlich. Die Ausbildung von Fibrose bestehend aus Fibroblasten als Folge der Implantat-assoziierten Abstoßungsreaktion muss verhindert werden; gleichzeitig soll die Regeneration des zu ersetzenden Gewebes stimuliert werden. Funktionalisierungen der Implantatoberfläche, die die natürliche Umgebung der Zellen nachahmen, gelten als vielversprechende Strategie zur Optimierung der Implantatfunktionalität. Im Rahmen der Habilitation wurde demonstriert, dass Laser-generierte Oberflächentopographien eine selektive Zellkontrolle im Bereich Neuroprothetik und für orthopädische Anwendungen zulassen, somit bioaktiv sind. Dies wurde über die Hemmung von Fibroblasten bei gleichzeitiger Stimulation der neuronalen und osteogenen Differenzierung belegt.

Um die selektive Zellkontrolle erklären zu können und die Materialsuche für andere biomedizinische Anwendungen zu erleichtern, lag die Vermutung nahe, dass es in zellspezifischen Adhäsionsmechanismen begründet ist. Die beobachtete selektive Stimulation von osteogenen Markern durch die Topographie muss wiederum mit einer spezifischen Rolle und Beeinflussung der molekularen Signalwege korrelieren. Es zeigte sich, dass die neu etablierten Parameter Adhäsionszeit und Adhäsionskraft zellspezifisch sind und insbesondere die Adhäsionsliganden der Extrazellulären Matrix eine bedeutende Rolle spielen: (a) sie steuern das gesamte Zellverhalten; (b) ihre Wirkung und damit die Adhäsionsmechanismen sind zellspezifisch; (c) Biomaterialien beeinflussen spezifisch ihre Adsorption und kontrollieren so indirekt und selektiv das Zellverhalten. Für die osteogene Differenzierung war die Zellbindung an die Matrix essentiell, wobei die Adhäsionsliganden selektiv die Zellmorphologie bestimmen und darüber die Differenzierung begünstigen. Darüber hinaus wurden verschiedene molekulare Signalwege und Wechselwirkungen der osteogenen Differenzierung untersucht. Ein Faktor konnte ermittelt werden, der eine regulatorische Funktion in den

---

Signalkaskaden übernimmt und sensitiv auf externe Einflüsse reagiert, was in Bezug zur Topographie-gesteuerten selektiven Kontrolle der osteogenen Marker gesetzt werden konnte. Die verwendeten humanen Mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe haben sich als ein neues und geeignetes Zellmodell für orthopädische Anwendungen erwiesen.

Als Alternative zu Transplantaten sollen im Bereich Tissue Engineering dreidimensionale (3D) Zellkonstrukte generiert werden, die das zu ersetzende Gewebe in ihrem multizellulären Aufbau und ihrer Funktionalität nachahmen. Derartige 3D Zellmodelle können auch in der zellbiologischen Grundlagenforschung, in der Tumorbilogie und bei der Entwicklung neuer Medikamente als Alternative zu Tierversuchen Anwendung finden. Im Rahmen der Habilitation wurden Scaffold-basierte und Scaffold-freie 3D Zellmodelle hergestellt und untersucht.

Bei der ersten Variante lag der Fokus auf der Etablierung von natürlichen Scaffold-Materialien, die sowohl biokompatibel und bioaktiv als auch für die definierte und reproduzierbare Scaffold-Herstellung mittels 2-Photonenpolymerisationstechnik geeignet sind. Darüber hinaus wurde die Mikroreplikationstechnik zur Scaffold-Produktion etabliert. Verschiedene Materialien wurden verglichen und die Besiedelung der Scaffolds überprüft. Der Parameter Scaffold-Porösität verbesserte selektiv die osteogene Differenzierung.

Bei der zweiten Variante wurde die Anwendbarkeit des Laser-basierten BioPrintings getestet und erweitert. Mit diesem Verfahren konnten Zellen schädigungsfrei gedruckt und beliebig in 3D-Mustern positioniert werden. Das Differenzierungspotential von Stammzellen wurde nicht verändert. In Hinblick auf das Vascular Tissue Engineering waren auch kontrollierte Zell-Zell- und Zell-Umgebungsstudien möglich. Es konnte ein funktionales 3D *in vitro* Hautmodell gedruckt werden.

Schlagnworte: Bioaktive Materialien, Materialfunktionalisierung, Tissue Engineering, Nanotechnologie, Scaffolds, Laser-BioPrinting, Selektive Zellkontrolle, Zelladhäsion, Extrazelluläre Matrix, Stammzellendifferenzierung

---

## 2 Abstract

Based on cell biological knowledge of biomaterial-cell interactions and tissue formation, the field of regenerative medicine aims to optimize implants and to find alternatives for transplants. At the same time the regeneration processes of the body shall be activated. The limiting factors for the success of the classical therapies refer to implant failure caused by a reduced functionality and lifespan as well as the limited availability of suitable donated organs.

To enhance the integration of implants into the tissue, a selective control of cellular behavior is required. The formation of fibrosis performed by fibroblasts as a consequence of implant-related immune rejections shall be inhibited, while the regeneration of the tissue, which is substituted, shall be stimulated. Functionalization of the implant surfaces, which mimic the natural environment of the cells, turned out to be a promising strategy in optimizing implant functionalities. In this work it was demonstrated that laser-generated surface topographies enable a selective cell control with regard to neuroprosthetic and orthopaedic applications, they are bioactive. Fibroblasts were inhibited, while neuronal and osteogenic differentiation were stimulated at the same time.

To explain the selective cell control and to facilitate material search for other biomedical applications, it was suggested that it originates from cell specific adhesion mechanisms. The obtained selective stimulation of osteogenic markers by the topography probably correlate with a specific role and influence on the molecular signaling cascades. It was shown that the new established parameters adhesion time and adhesion force are cell specific; above that adhesion ligands of the extracellular matrix play an important role: (a) they control cellular behavior; (b) their effect and by this means adhesion mechanisms are cell specific; (c) biomaterials guide their adsorption and control in an indirect and selective manner cell responses. For osteogenic differentiation cell anchorage to the matrix was essential; adhesion ligands affected cell morphology selectively followed by a promoted differentiation. Moreover, different molecular pathways and interactions in osteogenic differentiation were examined. One factor could be determined, which carries out a regulatory function in differentiation process and is sensitive to external influences, which correlated with the osteogenic marker-specific control caused by the topography. The used human mesenchymal stem cells derived from the adipose tissue were shown to be a new and appropriate cell model for orthopaedic applications.

---

To serve as an alternative for transplants the field of tissue engineering aims to generate three dimensional (3D) cell constructs, which shall mimic the multicellular composition and functions of the tissue to be replaced. Such 3D cell models can also find their application in basic cell biology research, in tumor biology, and in the development of drugs as an alternative for animal experiments. In this work scaffold-based and scaffold-free 3D cell models were fabricated and analyzed.

In the first approach natural scaffold-materials were established, which were supposed to be biocompatible and bioactive as well as suitable for the defined and reproducible scaffold generation using 2-photonpolymerization technique. Additionally, a microreplication procedure was established for scaffold fabrication. Different materials were compared and seeding onto to the scaffolds was investigated. The parameter scaffold-porosity improved selectively osteogenic differentiation.

In the second approach the application of laser-based BioPrinting was tested and expanded. Cells could be printed without any damages and could be positioned in any desired 3D patterns. The differentiation potential of stem cells was not negatively affected. In terms of Vascular Tissue Engineering cell-cell and cell-environment studies were possible. A functional 3D *in vitro* skin model could be printed.

Keywords: Bioactive Materials, Material Functionalization, Tissue Engineering, Nanotechnology, Scaffolds, Laser-BioPrinting, Selective Cell Control, Cell Adhesion, Extracellular Matrix, Stem Cell Differentiation

---

### 3 Inhaltsverzeichnis

1	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	1
2	<b>ABSTRACT</b> .....	3
3	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	5
4	<b>PUBLIKATIONEN DER KUMULATIVEN HABILITATIONSSCHRIFT</b>	7
5	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	11
6	<b>EINLEITUNG</b> .....	13
	6.1.1 Ursachen von Implantatversagen .....	13
	6.1.2 Probleme und Risiken von Transplantaten .....	15
	<b>6.2 BIOAKTIVE MATERIALIEN</b> .....	<b>17</b>
	6.2.1 Materialfunktionalisierung .....	18
	<b>6.3 TISSUE ENGINEERING</b> .....	<b>20</b>
	6.3.1 Scaffold-basiertes Tissue Engineering .....	21
	6.3.2 Scaffold-freies Tissue Engineering .....	24
	<b>6.4 ZIEL DER HABILITATION</b> .....	<b>25</b>
7	<b>SELEKTIVE ZELLKONTROLLE</b> .....	<b>27</b>
	7.1.1 Eigene Vorarbeiten und Zielsetzung .....	27
	<b>7.2 ROLLE DER ZELLADHÄSION</b> .....	<b>29</b>
	7.2.1 Biophysikalische Analyse der Zelladhäsion .....	30
	7.2.2 Hemmung von Fibroblasten: Korrelation zwischen Strukturabmessungen und Adhäsion .....	32
	7.2.3 Selektive Rolle der Adhäsionsliganden der EZM .....	33
	<b>7.3 NEURONALE ANWENDUNG</b> .....	<b>34</b>
	<b>7.4 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG</b> .....	<b>38</b>
	7.4.1 Lotus-Topographie und osteogene Differenzierung .....	39
	7.4.2 Einfluss auf osteogene Signalkaskaden .....	41
	<b>7.5 AUSBLICK „SELEKTIVE ZELLKONTROLLE“</b> .....	<b>46</b>
8	<b>SCAFFOLD-BASIERTE ZELLMODELLE</b> .....	<b>49</b>
	8.1.1 Eigene Vorarbeiten und Zielsetzung .....	49
	<b>8.2 EINFLUSS VON PHOTOINITIATOREN</b> .....	<b>50</b>
	<b>8.3 MIKROREPLIKATIONSTECHNIK</b> .....	<b>52</b>
	<b>8.4 SCAFFOLD-HERSTELLUNG AUS NATÜRLICHEN MATERIALIEN</b> .....	<b>53</b>
	<b>8.5 DER EINFLUSS DER SCAFFOLD-PORÖSITÄT AUF DIE OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG</b> .....	<b>56</b>
	<b>8.6 AUSBLICK „SCAFFOLD-BASIERTES TISSUE ENGINEERING“</b> .....	<b>59</b>
9	<b>SCAFFOLD-FREIE ZELLMODELLE</b> .....	<b>60</b>
	9.1.1 Eigene Vorarbeiten und Zielsetzung .....	60
	<b>9.2 LASER-BASIERTES BIOPRINTING VON STAMMZELLEN IN 3D</b> .....	<b>60</b>
	<b>9.3 ZELL-ZELL- UND ZELL-UMGEBUNGSTUDIEN</b> .....	<b>62</b>

---

9.4 LASER-BASIERTES BIOPRINTING VON EINEM 3D HAUTMODELL .....	63
9.5 AUSBLICK „SCAFFOLD-FREIES TISSUE ENGINEERING“ .....	65
<b>10 ANHANG .....</b>	<b>66</b>
10.1 LITERATURVERZEICHNIS .....	66
10.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	74
DANKSAGUNG .....	75
ERKLÄRUNG.....	76

---

## 4 Publikationen der kumulativen Habilitationsschrift

### Publikation 1:

Schlie, S., Gruene, M., Dittmar, H., Chichkov, B. „Dynamics of cell attachment: adhesion time and force.“ *Tissue Engineering Part C: Methods* 18 (9): 688-696 (2012)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskript

### Publikation 2:

Schlie, S., Fadeeva, E., Koroleva, A., Chichkov, B. „Laser-engineered microtopography: correlation between structure dimensions and cell control.“ *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23 (11): 2813-2819 (2012)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

### Publikation 3:

Schlie-Wolter, S., Ngezahayo, A., Chichkov, B. „The selective role of extracellular matrix components on cell adhesion, morphology, proliferation and communication in vitro.“ *Experimental Cell Research* 319: 1553-1561 (2013)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

### Publikation 4:

Schlie-Wolter, S., Deiwick, A., Fadeeva, E., Paasche, G., Lenarz, T., Chichkov, B. „Topography and coating improve the electrochemical properties and neuronal guidance.“ *Applied Materials and Interfaces* 5 (3): 1070-1077 (2013)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Aufnahme der Fotos, Quantifizierung der Daten und statistische Berechnungen, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

### Publikation 5:

Fadeeva, E., Deiwick, A., Chichkov, B., Schlie-Wolter, S. „Impact of laser-structured biomaterial interfaces on guided cell responses.“ *Interface Focus* 6: 20130048 (2014)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

### Publikation 6:

Fadeeva, E., Schlie-Wolter, S., Chichkov, B., Paasche, G., T. Lenarz. „Structuring of biomaterial surface with ultrashort pulsed laser radiation.“ Kapitel 5 in: *Laser Surface Modification of Biomaterials – Techniques and Applications*, Elsevier GmbH München, 1. Auflage, ISBN-10 008100883X (2016)

---

Eigener Beitrag: Literaturrecherche, Anfertigung und Korrektur des Manuskripts

**Publikation 7:**

Deiwick, A., Fadeeva, E., Koch, L., Gebauer, R., Chichkov, B., Schlie-Wolter, S. „Functional titanium topography promotes the osteoinduction of human adipose-derived stem cells in vitro.” *Nanomedicine & Nanotechnology* 5 (6): 239 doi.10.4172/2157-7439.1000239 (2014)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Aufnahme der Fotos, Quantifizierung der Daten und statistische Berechnungen, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

**Publikation 8:**

Keller, V., Deiwick, A., Pflaum, M., Schlie-Wolter, S. „Correlation between ECM guidance and actin polymerization on osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells.” *Experimental Cell Research* [doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.08.020](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.08.020) (2016)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

**Publikation 9:**

Deiwick, A., Schlie-Wolter, S. „Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (hASC): role of FAK and Ras-MAPK signaling.” *Journal of Stem Cell & Regenerative Biology* 2 (2): 1-19 doi: 10.15436/2471-0598.16.012 (2016)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Aufnahme der Fotos, Quantifizierung der Daten und statistische Berechnungen, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

**Publikation 10:**

Fadeeva, E., Deiwick, A., Chichkov, B., Schlie-Wolter, S. „Enhanced bioactivity of titanium by laser-generated lotus-topography: molecular insights in osteogenic signaling pathways of hASCs.” *Nanomedicine & Nanotechnology* doi 10.4172/2157-7439.1000403 (2016)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

**Publikation 11:**

Ovsianikov, A., Malinauskas, M., Schlie, S., Chichkov, B., Gittard, S., Narayan, R., Löbler, M., Sternberg, K., Schmitz, K.-P., Haverich, A. „Three-dimensional laser micro- and nanostructuring of polyethylene glycol materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications.” *Acta Biomaterialia* 7: 967-974 (2011)

Eigener Beitrag: Beratung bei den *in vitro* Versuchen, Durchführung und Auswertung Comet Assay (Daten nicht gezeigt), Korrektur des Manuskripts

---

**Publikation 12:**

Nguyen, A., Gittard, S. D., Koroleva, A., Schlie, S., Gaidukeviciute, A., Chichkov, B. N., Narayan, R. Y. „Two-photon polymerization of polyethylene glycol diacrylate scaffolds with riboflavin used as a water-soluble photoinitiator.” *Regenerative Medicine* 8 (6): 725-738 (2013)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuchen (außer Aufnahme der Fotos), Korrektur des Manuskripts

**Publikation 13:**

Koroleva, A., Schlie, S., Fadeeva, E., Gittard, S. D., Ovsianikov, A., Koch, J., Narayan, R. J., Chichkov, B. N. „Microreplication of laser-fabricated surface and three-dimensional structures.” *Journal of Optics* 12: 124009-124013 (2010)

Eigener Beitrag: Planung und Durchführung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts

**Publikation 14:**

A. Koroleva, A. Gill, I. Ortega, J.W. Haycock, S. Schlie, S.D. Gittard, B.N. Chichkov, F. Claeyssens. „Two-photon polymerization-generated and micromolding-replicated 3-D scaffolds for peripheral neural tissue engineering applications.” *Biofabrication* 4 (2): 025005-025016 (2012)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche mit SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen, Korrektur des Manuskripts

**Publikation 15:**

Koroleva, A., Gittard, S. D., Schlie, S., Deiwick, A., Jockenhoewel, S., Chichkov, B. N. „Fabrication of fibrin scaffolds with controlled microscale architecture by a two-photon polymerization–micromolding technique.” *Biofabrication* 4 (11): 015001-015008 (2012)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Korrektur des Manuskripts

**Publikation 16:**

Kufelt, O, El-Tamar, A., Sehring, C., Schlie-Wolter, S., Chichkov, B. „Hyaluronic acid-based materials for scaffolding via via two-photon polymerization.” *Biomacromolecules* 15 (2): 650-659 (2014)

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung und Korrektur des Manuskripts

**Publikation 17:**

Kufelt, O., Sehring, C., El-Tamar, A., Schlie-Wolter, S., Chichkov, B. „Water-soluble photopolymerizable chitosan hydrogels for biofabrication via two-photon polymerization.” *Acta Biomaterialia* 18: 186-195 (2015)

---

Eigener Beitrag: Planung, Durchführung und Auswertung der *in vitro* Versuche, Literaturrecherche, Anfertigung und Korrektur des Manuskripts

**Publikation 18:**

Koroleva, A., Deiwick, A., Nguyen, A., Schlie-Wolter, S., Narayan, R., Timashev, P., Popov, V., Bagratashvili, V., Chichkov, B. „Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3-D Zr-Si organic-inorganic scaffolds produced by two-photon polymerization technique.” *PLOS One* 10 (2) doi.org/10.1371/journal.pone0118164 (2015)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Korrektur des Manuskripts

**Publikation 19:**

Gruene, M., Deiwick, A., Koch, L., Schlie, S., Unger, C., Hofmann, N., Bernemann, I., Glasmacher, B., Chichkov, B. N. „Laser printing of stem cells for biofabrication of scaffold-free autologous grafts.” *Tissue Engineering Part C: Methods* 17 (1): 79-87 (2011)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Korrektur des Manuskripts

**Publikation 20:**

Gruene, M., Pflaum, M., Deiwick, A., Koch, L., Schlie, S., Unger, C., Wilhelmi, M., Haverich, A., Chichkov, B. N. „Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells.” *Biofabrication* 3 (1): 015005-015014 (2011)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Korrektur des Manuskripts

**Publikation 21:**

Gruene, M., Pflaum, M., Hess, C., Diamantouros, S., Schlie, S., Deiwick, A., Koch, L., Wilhelmi, M., Jockenhoevel, S., Haverich, A., Chichkov, B. „Laser printing of three-dimensional multicellular arrays for studies of cell-cell and cell-environment interactions.” *Tissue Engineering Part C: Methods* 17(10): 973-982 (2011)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Korrektur des Manuskripts

**Publikation 22:**

Koch, L., Deiwick, A., Schlie, S., Kuhn, S., Gruene, M., Coger, V., Zychlinski, D., Schambach, A., Reimers, K., Vogt, P. M., Chichkov, B. „Skin tissue generation by laser cell printing.” *Biotechnology and Bioengineering* 109 (7): 1855-1863 (2012)

Eigener Beitrag: Planung der *in vitro* Versuche, Durchführung der Gap Junction Nachweise, Korrektur des Manuskripts

---

## 5 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
2PP-Technik	2-Photonenpolymerisationstechnik
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
ASC	Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe
BMP	Knochenwachstumsfaktor
Bzw.	beziehungsweise
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECFC	endothelial colony forming cells
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanz
ERK	extracellular-signal regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
GFOGER	Glycin-Phenylalanin-Pyrrolisin-Glutamat-Arginin
HLA	human leukocyte antigen
HPMEC	human pulmonary endothelial microvascular cells
JNK	c-Jun N-terminale kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC	major histocompatibility complex
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NGF	neuronaler Wachstumsfaktor
PEG	Polyethylenglykol

---

PEGda	Polyethylenglykol-diacrylat
PDMS	Polydimethylsulfoxid
p-FAK	phosphorylierte FAK
PLA	Polymilchsäure
p-Runx2	phosphoryliertes Runx2
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
Runx2	runt-related transcription factor 2
TEOHA	Triethanolamin
Tyr	Tyrosin
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 6 Einleitung

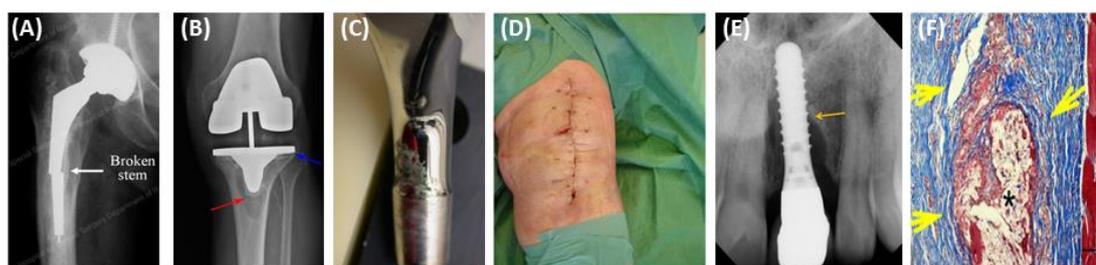
Die demographische Entwicklung hin zu einer alternden Bevölkerung führt zu einem wachsenden Bedarf an medizinischer Versorgung. Der Wunsch, die gesunde Lebenszeit zu verlängern und die Lebensqualität zu erhöhen, geht einher mit steigenden Kosten für das Gesundheitswesen. In diesem Zuge gewinnen die interdisziplinären Wissenschaften Regenerative Medizin und Biomedizintechnik zunehmend an Bedeutung. Weltweit wurde der Marktanteil dieser Disziplinen im Jahr 2012 auf 120 Milliarden Euro geschätzt – Tendenz steigend. Dies wirkt sich auch auf die deutsche Wirtschaft, in Konkurrenz stehend auf dem globalen Markt, aus, die viele Arbeitsplätze im Bereich Forschung und Entwicklung, Produktion, Qualitätssicherung, Vermarktung und im Vertrieb von Medizinprodukten umfasst. Deutsche Medizintechnikunternehmen konnten in den letzten Jahren eine Umsatzsteigerung von 4,2 % erzielen, hauptsächlich bedingt durch eine hohe Exportquote. Auf Grund der fortschreitenden Entwicklung in Technik und Forschung sind etwa 32 % der kommerziellen Medizinprodukte jünger als drei Jahre. Seit 1990 wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem Bundesforschungsministerium insgesamt 230 Millionen Euro in die biomedizinische Forschung investiert. (Spectaris Fachverband Medizintechnik)

Regenerative Medizin und Biomedizintechnik haben das Ziel, neue Strategien und Therapien zu entwickeln, geschädigte Gewebe oder Organe zu unterstützen oder zu ersetzen. Eine Weiterentwicklung ist notwendig, da die klassischen Therapiemaßnahmen in Form von Implantaten oder Transplantaten nicht zufriedenstellend sind. Es wird nicht nur Ersatz oder Unterstützung der Körperfunktionen angestrebt, man versucht außerdem, die Therapien dahingehend zu optimieren, auch die körpereigenen Regenerationsmechanismen stimulieren zu können (Holzapfel et al. 2013). Dies setzt zellbiologische Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen Gewebezellen und Implantaten, über die Gewebeformation, -funktionalität, -regeneration und geeigneten Zellmodelle voraus und äußert sich in erster Linie im Bereich Biomaterialentwicklung. Doch was sind die limitierenden Faktoren für den Erfolg der klassischen Behandlungen?

### 6.1.1 Ursachen von Implantatversagen

Implantate, hergestellt aus natürlichen oder synthetischen Biomaterialien, finden in Bereichen wie Orthopädie, Neuroprothetik, als dentale und cardiovaskuläre Produkte Anwendung. Die Materialauswahl ist für jede biomedizinische Nutzung

spezifisch und orientiert sich im wesentlichen an den mechanischen Eigenschaften des Gewebes wie die Elastizität, die Elongation und der Bruchwiderstand (Park et al. 2010). Der Erfolg des Biomaterials bzw. Implantats hängt von seinen Eigenschaften und der Biokompatibilität ab, was vor der Zulassung der Medizinprodukte von unabhängigen Prüflaboren gemäß der ISO 10993 nachgewiesen worden sein muss. Obwohl nur zugelassene Medizinprodukte verwendet werden dürfen, kommt es häufig zu Implantatrevisionen. Zu den technischen Ursachen zählt man: (a) Materialermüdung, was sich in einem Bruch des Implantats äußert; (b) schlechte mechanische Übereinstimmung zwischen Biomaterial und Gewebe, was in stress shielding Effekten mit verminderter Geweberegeneration und Implantatlockerung resultiert; und (c) Korrosion von metallischen Werkstoffen als Reaktion auf seine Umgebung und mechanische Beanspruchung mit der Freisetzung von Materialrückständen, die allergische, toxische und karzinogene Reaktionen im Gewebe hervorrufen können (Geetha et al. 2009). Bei den technischen Ursachen für Implantatversagen wird versucht, durch andere Materialauswahl, so auch Materialkombinationen, Herstellungsverfahren oder Optimierung der Biomechanik durch Änderungen der Bauform des Implantats entgegenzuwirken. Komplizierter wird die Verbesserung der Biomaterialien, wenn biologische Gründe für das Implantatversagen verantwortlich sind. Hierzu werden Implantat-assoziierte Infektionen und Abstoßungsreaktionen gezählt. Von den ein Millionen in Deutschland pro Jahr eingesetzten Zahnimplantaten kommt es bei jedem zweiten zu einer Infektion. Bei jedem dritten Zahnimplantat tritt die Peri-Implantitis auf, bei der zusätzlich der Kieferknochen zurückgebildet wird. Abstoßungsreaktionen treten bei jeder Implantation auf. (Abb. 1)



**Abbildung 1:** Beispiele für Implantatversagen: (A) Materialbruch; (B) Lockerung; (C) Korrosion; (D) Infektion; (E) Peri-Implantitis; (F) Fibrose als Folge der Abstoßungsreaktion

Quellen: (A) [https://www.hss.edu/images/articles/hip\\_prosthesis\\_implant\\_broken\\_stem\\_xray.jpg](https://www.hss.edu/images/articles/hip_prosthesis_implant_broken_stem_xray.jpg)  
 (B) <http://orthoinfo.aaos.org/figures/A00712F03.jpg>  
 (C) <http://www.andersonmaterials.com/wp-content/uploads/2013/07/DSCN5908.jpg>  
 (D) [http://www.oapublishinglondon.com/images/html\\_figures/OAO2\\_g001.jpg](http://www.oapublishinglondon.com/images/html_figures/OAO2_g001.jpg)  
 (E) <http://www.nocoperio.com/files/2013/06/Before-239x300.jpg>  
 (F) Onuki et al. 2008

Zu etwa 80 % werden Implantat-assoziierte Infektionen über Biofilme hervorgerufen. Hierbei handelt es sich um eine Kolonie verschiedener Bakterienarten, die innerhalb der Extrazellulären Polymeren Substanz (EPS) wechselwirken (Burmolle et al. 2013). Entscheidend ist, dass sich Biofilme bevorzugt auf Grenzflächen bilden, so dass Implantatoberflächen ein ideales Ziel darstellen. Auch Sekundärinfektionen und chronische Infektionen werden Biofilmen zugesprochen (Bjarnsholt 2013). Die EPS als Schutz vor äußeren mechanischen und chemischen Eigenschaften ist dafür verantwortlich, warum Bakterien des Biofilms schwer angreifbar durch Antibiotika sind. Dies hat nicht nur etwas mit spontan auftretenden Resistenzen durch genetische Veränderung oder Sporenbildung der Bakterien und der Nutzung selektiv wirkender Antibiotika trotz Bakteriendiversität innerhalb des Biofilms zu tun: die EPS vermindert die Eindringtiefe der Antibiotika; zugleich können Stoffwechselprodukte innerhalb des Biofilms die Aktivität der Antibiotika schwächen. Dadurch treten leicht Antibiotika-Resistenzen auf (de la Fuente-Núñez et al. 2013).

Implantat-assoziierte Abstoßungsreaktionen gelten als natürliche Immunantwort. Als Auslöser ist die Implantation an sich zu sehen, einem operativen Vorgang, bei dem Gewebe verletzt wird. Das bedeutet, dass jede Implantation eine Immunantwort zur Folge hat. Ein komplexes Wechselspiel zwischen verschiedenen Immunzellen und Mediatoren äußert sich in einem spezifischen und zeitlich festlegbarem Ablauf folgender Stadien: Proteinadsorption auf dem Implantat zur Aktivierung von Gerinnungsreaktionen und vom Komplementsystem, akute und chronische Entzündung, Bildung von Riesenkörperzellen und Granulationsgewebe einhergehend mit der Neovaskularisation zur Stimulation der Geweberegeneration. Primäres Ziel dieser Reaktionskette ist die Entfernung des Fremdkörpers. Da dies per Phagozytose beim Implantat nicht möglich ist, wird als Schutz eine Fibrose ausgebildet, ein Narbengewebe bestehend aus Fibroblasten, was das Implantat einkapselt und isoliert. Die Fibrose vermindert die Implantatfunktionalität und führt zu Implantatrevisionen. (Anderson 2001; Franz et al. 2011)

### 6.1.2 Probleme und Risiken von Transplantaten

Heutzutage ist man in der Lage, eine Vielzahl von Geweben und Organen per Transplantation zu ersetzen (Park et al. 2010). Transplantationen erfolgen autolog, syngen, allogenen oder xenogenen. Außerdem wird zwischen Lebendspende und postmortaler Spende unterschieden. Das Transplantationsgesetz regelt die Spende, Entnahme, Vermittlung und Übertragung von Organen und soll bei der Verteilung für

Transparenz und Chancengleichheit sorgen. Laut der Deutschen Stiftung für Organtransplantation warten etwa 12.000 Patienten jährlich in Deutschland auf ein neues Spenderorgan – aber nur knapp 5.000 Transplantationen können durchgeführt werden. Es wird vermutet, dass die Diskrepanz zwischen gespendeten und benötigten Organen auf die fehlende Akzeptanz von Organspenden zurückzuführen ist. Organspendeskandale aus der Vergangenheit haben diese Situation zudem verschlechtert. Auch die strukturellen Bedingungen der Krankenhäuser müssen verbessert werden, zumal nur eine kurze Übertragungszeit der gespendeten Organen von wenigen Stunden möglich ist.

Die Hauptproblematik bei der Verteilung der gespendeten Gewebe und Organe sowie die Erfolgsaussichten nach der Transplantation besteht aber in der immunologischen Übereinstimmung von Spender und Empfänger (Rink et al. 2012). Vorab muss deswegen die Blutgruppen-Kompatibilität und Übereinstimmung von Antigen-Systemen ermittelt werden. Bei der host-versus-graft-disease richtet sich das Immunsystem des Empfängers gegen das transplantierte Gewebe. Bei der graft-versus-host-disease lösen die transplantierten Immunzellen gegen den Empfängerorgansimus eine Immunantwort aus. Die eingesetzte Abstoßungsreaktion lässt sich, basierend auf den zeitlichen Verlauf, die aktivierten Zellen und induzierten Vorgänge, in verschiedene Kategorien einteilen. So wird eine hyperakute, beschleunigte, akute, chronische und immunpathologische Abstoßung beschrieben. (Rink et al. 2012)

Entscheidend für die Gewebeverträglichkeit bzw. Übereinstimmung von Spender und Empfänger ist die Antigenpräsentation verschiedener Zellen des Immunsystems. Die hierfür codierenden Gene werden als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, major histocompatibility complex) bezeichnet, befinden sich beim Menschen auf Chromosom 6 und heißen dort HLA (human leukocyte antigen). Hauptaufgabe ist die Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Antigenen. MHC Moleküle lassen sich in zwei Klassen aufteilen und weisen sowohl Polygenie als auch Polymorphismen auf. Hieraus ergibt sich eine große Vielzahl an theoretisch möglicher HLA-Proteinkombination – geschätzt auf etwa  $5 \times 10^{37}$  Möglichkeiten. Diese Zahl lässt die Diversität durch die Variation und Kombination der väterlichen und mütterlichen geerbten Allele und Kopplungsungleichgewichte außer acht. Daraus ergibt sich eine unbegrenzte Anzahl von HLA-Konstellationen. Dass ein transplantiertes Organ fremdes HLA aufweist, ist somit anzunehmen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein

körperfremdes Transplantat abgestoßen wird, ist um so größer, je mehr sich die HLA-Allele zwischen Spender und Empfänger unterscheiden. Es kann ausgeschlossen werden, eine vollständige genetische Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger zu finden. Das Eingreifen des HLA-Antigen-Systems kann somit nur durch die Nutzung von autologem Zell- und Gewebeersatz verhindert werden. (Rink et al. 2012)

Die Strategie zur Verhinderung der Transplantat-Abstoßungsreaktion basiert auf der Verabreichung von immunsupprimierenden Medikamenten. Die Wirkmechanismen der verschiedenen Wirkstoffklassen beruhen auf der allgemeinen Unterdrückung der Immunantwort und zeigen entzündungshemmende Eigenschaften. Diese unspezifische Unterdrückung der Immunabwehr schützt zwar das Transplantat, hemmt aber gleichzeitig die natürliche Immunabwehr. Die Patienten sind infektionsanfällig und zeigen bei Langzeitsuppression eine erhöhte Inzidenz von Krebs. (Rink et al. 2012)

## 6.2 Bioaktive Materialien

Um die Funktionalität und Langlebigkeit von Implantaten zu verbessern, wird nach biomimetischen und bioaktiven Materialien gesucht, die die Regeneration der geschädigten Gewebe nach der Implantation fördern und gleichzeitig von vornherein Infektionen und Abstoßungsreaktionen unterbinden (Holzapfel et al. 2013). Mit anderen Worten soll eine selektive Zellkontrolle erreicht werden. Doch wie macht man Biomaterialien bioaktiv? Welche zellulären und molekularen Mechanismen liegen der selektiven Steuerung des Zellverhaltens und Regenerationsvorgänge zugrunde?

Um Infektions-resistente Biomaterialien generieren zu können, werden verschiedene Forschungsansätze verfolgt: (a) die Modifizierung der Biomaterialoberfläche hin zu bakteriell anti-adhäsiven Eigenschaften; (b) die Anbindung oder Inkorporation von Antibiotika, was mit der lokalen und kontrollierten Freigabe derselben über Drug Delivery erfolgt; oder (c) beide Ansätze kombiniert (Arciola et al. 2012). Weitere innovative Ansätze aus dem Forschungsfeld Nanotechnologie beinhalten die Herstellung von Nanopartikel-beladenen Materialien. Nanopartikel aus Silber, Selen, Zink und Kupfer wurden antibakterielle Eigenschaften zugesprochen (Gallo et al. 2014).

Bei den Implantat-assoziierten Abstoßungsreaktionen wird vermutet, dass es an der Nutzung von synthetischen Implantatmaterialien der klassischen Materialklassen liegt. Natürliche Materialien versprechen zwar eine Unterdrückung der Immunantwort, jedoch sind sie auf Grund ihrer mechanischen Eigenschaften und schnellen Degradation eher als biodegradierbare Materialien einsetzbar; ein langfristiger Gewebe- und Funktionsersatz wäre erst nach chemischen Modifikationen möglich (Nair et al. 2007). Auf Grund dieser Problematik werden die synthetischen Materialien, die sich auf Grund ihrer Handhabung und mechanischen Eigenschaften bewährt haben, weiter genutzt. Stattdessen wird versucht, die Oberfläche dieser Materialien, die Grenzfläche zwischen Implantat und Gewebe, so zu verändern, dass diese wiederum nicht mehr als körperfremd erkannt wird (Sailaja et al. 2016). Hierfür fungiert die natürliche Zellumgebung innerhalb des Gewebes als Vorgabe. Ziel ist es, auf der synthetischen Implantatoberfläche die natürliche Zellumgebung dem *in vivo* Zustand nachzuahmen.

### 6.2.1 Materialfunktionalisierung

*In vivo* sind Zellen immer in die Extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet. Hierbei handelt es sich um ein dynamisches Netzwerk zur strukturellen und funktionellen Organisation des Gewebes. Die Hauptbestandteile Grundsubstanz, Fasern und Adhäsionsliganden werden selbst von den Zellen exprimiert, die detaillierte Zusammensetzung ist gewebespezifisch. (Alberts et al. 2011)

Die Grundsubstanz, bestehend aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen, sorgt für die Druckfestigkeit der Matrix und übernimmt Speicherfunktion. Die Fasern sind für die mechanischen Eigenschaften wie Zugfestigkeit und Dehnbarkeit des Gewebes verantwortlich. Adhäsionsliganden wie Fibronectin, Laminin oder Vitronectin sorgen für die Zellbindung und damit Verankerung der Zellen in die Matrix. Diese Adhäsionsliganden kennzeichnen spezifische Zell-Bindungsdomänen, an die die Zellbindung erfolgt. Eine RGD-Bindungssequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) ist für Fibronectin und Vitronectin beschrieben worden (Craig et al. 2004, Felding-Habermann et al. 1993). Laminin, bestehend aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten unterschiedlicher Längen, leiten über ihre  $\alpha$ -Kette die Zellbindung ein, wobei die Bindungsaktivität zusätzlich über die  $\gamma$ -Kette gesteuert wird (Tzu et al. 2008). Gewisse Kollagen-Typen, die eigentlich den Fasern zuzuordnen sind, lassen beim Vorhandensein einer GFOGER-Bindungssequenz (Glycin-Phenylalanin-Pyrrolisin-

Glutamat-Arginin) ebenfalls eine Zellbindung zu (Zeltz et al. 2016). (Alberts et al. 2011)

Auch wenn wenig über Gewebespezifität bekannt ist, kann man auf Grund ihrer Zusammensetzung und Funktion drei Hauptkriterien der EZM ausmachen: sie sind biologischer, chemischer und physikalischer Natur. So eröffnen sich verschiedene Strategien, die Materialien besser den biologischen Prozessen anpassen bzw. die natürliche Zellumgebung nachahmen zu können. Die Herstellung von derartigen biomimetischen Materialien erfolgt über die Materialfunktionalisierung.

Biologie	Chemie	Physik
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachstumsfaktoren</li> <li>• Adhäsionsliganden bzw. ihre Bindungsdomänen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EZM Komponenten</li> <li>• Ladung</li> <li>• Benetzbarkeit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Architektur und Größendimension der EZM Netzwerke und Bestandteile</li> <li>• Oberflächentopographie</li> <li>• Mechanische Eigenschaften</li> </ul>

**Abbildung 2:** Strategien der Materialfunktionalisierung

Laut (Barthes et al. 2014) sollen die spezifischen biologischen, chemischen und physikalischen Informationen der EZM auf die Biomaterialoberfläche übertragen werden (Abb. 2). Für die biologische und chemische Funktionalisierung kommen Beschichtungen und direkte Modifikationen der Materialoberfläche in Frage (Dugas et al. 2010; Saiz et al. 2013). Beide Verfahren werden eingesetzt, um die Oberflächeneigenschaften hinsichtlich der Mechanik, Benetzbarkeit und Ladung einstellen oder auf der Materialoberfläche funktionale Biomoleküle präsentieren zu können. Die Herausforderung besteht darin, dass die genutzten Biomoleküle wie Adhäsionsliganden oder deren Bindungssequenzen und Wachstumsfaktoren auch nach der Materialfunktionalisierung noch bioaktiv sind. Entscheidend ist die Anbindung bzw. Beschichtung der Biomoleküle in zellbiologisch wirksamer Konzentration und Konformation auf der Materialoberfläche, um eine Zellantwort induzieren zu können. Die Konformation von Biomolekülen stellt einen wichtigen Parameter dar, da die spezifische Zell-Bindungsdomäne der Biomoleküle für die Zellrezeptoren frei verfügbar sein muss. Alternativ können Biomoleküle oder therapeutisch wirksame Substanzen wie Antibiotika in degradierbare Matrices eingebaut und lokal und kontrolliert mittels Drug Delivery freigesetzt werden (Biondi et al. 2008).

Zur Erzeugung definierter Oberflächentopographien werden unterschiedliche Verfahren genutzt. So werden das chemische Ätzen, Plasmaätzen, die Photolithographie und die Laser-Ablation eingesetzt (Chichkov et al. 1996; Flemming et al. 1999; Coen et al. 2003). Die große Herausforderung bei der Oberflächenstrukturierung besteht darin, reproduzierbare Strukturen mit hoher Auflösung zu erzeugen. Da unklar ist, welche topographischen Eigenschaften für die jeweilige biomedizinische Anwendung bioaktiv wirken, ist es sinnvoll, unterschiedliche Strukturtypen und Größendimensionen herstellen und zellbiologisch austesten zu können.

Unabhängig von der technischen Herausforderung, reproduzierbare und bioaktive Materialfunktionalisierungen erzeugen zu können, haben zahlreiche Studien der Vergangenheit gezeigt, dass jeder getestete Parameter – Mechanik, Benetzbarkeit, Ladung, Topographie, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsliganden bzw. ihre spezifischen Bindungssequenzen – einen Einfluss auf das Zellverhalten hat. (Flemming et al. 1999; Lan et al. 2005; Engler et al. 2007; Ryes et al. 2007; Visser et al. 2012)

### 6.3 Tissue Engineering

Das Ziel von Tissue Engineering ist die Generierung von 3D Zellkonstrukten, die das Gewebe in ihrem Aufbau und ihrer Funktionalität nachahmen und geschädigtes Gewebe somit ersetzen sollen (Ikada 2006). Primäres Ziel ist also eine Alternative zu Transplantaten. Wartelisten mit den daraus folgenden belastenden Therapien, die Wartezeit überbrücken zu können, ließen sich verhindern bzw. wären kaum nötig, wenn sich die Gewebe oder Organe bei Dringlichkeit sofort im Labor herstellen ließen. Die Nutzung von autologen oder besser immunverträglichen Gewebekonstrukten minimiert die Abstoßungsgefahr und reduziert die Notwendigkeit der Verabreichung von Immunsuppressiva mit all ihren Nebenwirkungen.

*In vitro* Studien haben gezeigt, dass sich das Zellverhalten unter klassischen zweidimensionalen *in vitro* Kulturbedingungen ganz klar von dem in 3D Modellen unterscheidet (Cukiermann et al. 2002). Die Zelleigenschaften in den 3D *in vitro* Zellmodellen entsprechen viel eher dem *in vivo* Zustand. Aus diesem Grund sind 3D Zellmodelle nicht nur als Gewebeersatz für alternative Transplantate interessant. Andere Anwendungsbereiche liegen in der Zellbiologie, Stammzellforschung,

Tumorbiologie und Pharmakologie (Dutta et al. 2009). Die Verwendung von biomimetischen Materialien und Zellumgebungen lässt tiefere Einblicke in die zellulären Regenerationsmechanismen zu und gewährleistet eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse (Furth et al. 2007). Dies ist insbesondere bei Stammzellnischen von großer Bedeutung, wobei es sich um definierte 3D Bereiche handelt, die die Differenzierung von Stammzellen einleiten und kontrollieren (Dellatore et al. 2008). Auch in der Tumorforschung können 3D *in vitro* Zellmodelle einen Beitrag leisten. Obwohl die Isolation und Kultivierung von Tumorzellen bereits etabliert ist, wird auch hier die natürliche 3D und multizelluläre Tumorzusammensetzung nicht nachgeahmt (Zanoni et al. 2016). Auf diese Weise wird die Entwicklung neuer Wirkstoffe in der Pharmakologie erschwert.

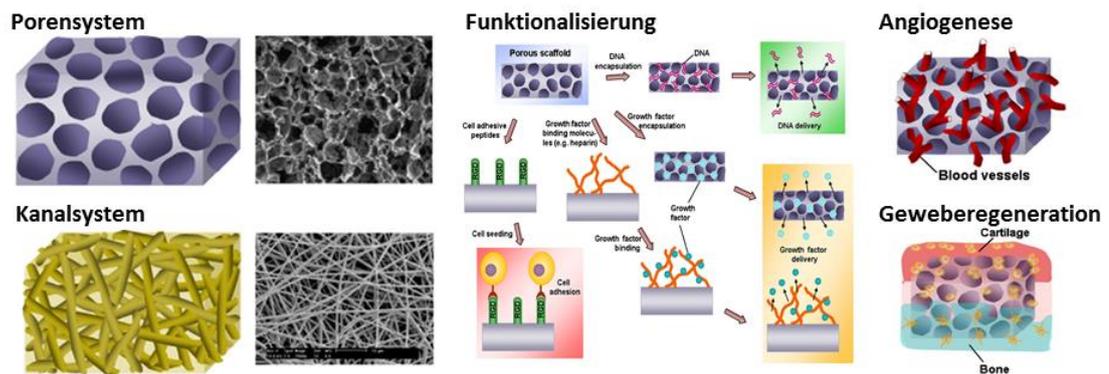
Die Entwicklung von Arzneistoffen ist untrennbar mit Tierversuche verbunden. Rechtliche Bestimmungen über den Sinn und Zweck, die Abläufe und Durchführungen von Tierversuchen sind im Tierschutzgesetz geregelt. Betrachtet man die Anzahl der für Versuche verwendeten Tiere in Deutschland, so ist ein starker Anstieg in den vergangenen Jahrzehnten zu beobachten. Aus ethischen Gründen wurde deshalb bereits 1959 von W. Russel und R. Burch das 3R-Prinzip formuliert. Das Ziel ist, Tierversuche bzw. das Leid der Versuchstiere zu vermeiden und zu verringern. Die drei R's stehen für Replace, Reduce and Refine; erstes also für den Ersatz von Tierversuchen durch alternative Methoden; zweites für die Verminderung der Zahl der Tiere; drittes für die Verminderung der Belastung und Verbesserung der Lebenssituation der Tiere. Gelingt es also, über Tissue Engineering funktionsfähige 3D Zellmodelle herzustellen, die mit ihren Eigenschaften dem *in vivo* Zustand entsprechen, stellt Tissue Engineering eine Alternative zu Tierversuchen dar. (Bundesinstitut für Risikobewertung)

Allgemein wird zwischen Scaffold-basierten und Scaffold-freien Strategien in Tissue Engineering unterschieden (Knight et al. 2015).

### 6.3.1 Scaffold-basiertes Tissue Engineering

Das Scaffold-basierte Tissue Engineering ist von definierten und reproduzierbaren Gerüststrukturen abhängig, die das natürliche und komplexe 3D Netzwerk der Gewebe-Matrix nachahmen sollen (Chan et al. 2008). Es orientiert sich an dem Aufbau, den Komponenten und Funktionen der EZM. Charakteristisch ist die Ausbildung und spezifische Verteilung von Poren mit unterschiedlichen Porendurchmessern, die das Einwachsen von Zellen und den Nährstofftransport

ermöglichen. Bei größeren Zellmodellen muss die Ausbildung von Blutgefäßen gewährleistet sein. Dieses Netzwerk kennzeichnet zudem spezifische mechanische Eigenschaften und weist Anhaftungspunkte für die Zellen auf. Scaffolds klassifiziert somit eine Makro-, Mikro- und Nano-Größe: ersteres für die gesamte Scaffold-Stabilität in Abhängigkeit der Größendimensionen wie Höhe, Breite, Porenverteilung und Porenwanddicke; zweites für das Poren- oder Kanalsystem; drittes für die Oberflächenbeschaffenheit zur Steuerung der Zelladhäsion und des Zellverhaltens, wobei auch Oberflächenfunktionalisierungen in Frage kommen. (Abb. 3)



**Abbildung 3:** Scaffold-basiertes Tissue Engineering  
 Quelle: Chung et al. 2007

Nach der Scaffold-Generierung ist ein *in situ* oder *ex vivo* Tissue Engineering möglich. Bei der ersten Variante werden die Scaffolds ohne Zellen in das Gewebe implantiert, wo dort dynamisch und spontan die natürliche Besiedelung und Gewebekonstruktion stattfinden soll. Der Körper stellt den optimalen Bioreaktor dar. Nachteilig ist, dass nicht gesteuert werden kann, wie und ob die Zellen in den Scaffold einwachsen und die Nährstoffversorgung funktioniert. Bei der zweiten Variante werden diese Probleme umgangen, indem vor der Implantation eine Zellbesiedelung des Scaffolds im Labor erfolgt. Die Nutzung immunologisch verträglicher oder autologer Zellen mit hohem Regenerationspotential sind von Vorteil. Die Zellkulturbedingungen können genau eingestellt und optimiert werden. Ein einfaches und schnelles *in vitro* Screening bezogen auf die Funktionalität des Scaffold-Designs und Materials sind möglich. (Ikada 2006)

Zur Herstellung von Scaffolds kommen synthetische und natürliche Materialien zum Einsatz (Ikada 2006). Synthetische haben den Vorteil, dass die chemischen und mechanischen Eigenschaften optimal dem Gewebe nachempfunden werden können. Biokompatibilität und Zelladhäsion müssen aber erfüllt sein. Trotzdem besteht nach der Implantation das Risiko von Abstoßungsreaktionen. Natürliche

Materialien umgehen diese Probleme. Allerdings ist deren mechanische Stabilität schwieriger einstellbar und zu schnelle Degradationsraten in Zellkultur bzw. im Körper verhindern die rechtzeitige und vollständige Zellbesiedelung. Aufwendige chemische Modifikationen sind notwendig, um über Crosslinking natürliche Materialien mit synthetischen zu vernetzen, was der mechanischen Instabilität und Degradierbarkeit entgegenwirkt (Nair et al. 2007; Ikada 2006).

Die Materialauswahl geht einher mit den Produktionstechniken, mit Hilfe derer die definierte 3D Porenform des Scaffolds aufgebaut werden soll. Nicht jedes Material ist für jede Technik kompatibel. In der Literatur sind unterschiedliche Verfahren zur Scaffold-Herstellung wie Porogen Leaching, Gas Foaming, Freeze Drying oder Electrospinning beschrieben worden (Ikada 2006). Eine kontrollierte Porenerstellung mit hoher Reproduzierbarkeit ist nur begrenzt möglich. Stattdessen bieten sich Computer-basierte Verfahren an, die die Produktion definierter und reproduzierbarer Scaffolds in hohen Stückzahlen erlauben (Abboud et al. 2012). Mit Hilfe einer Software wird das gewünschte Design des Scaffolds entworfen, was im folgenden Schritt reproduzierbar umgesetzt wird. Hierfür hat sich die 2-Photonenpolymerisationstechnik (2PP) bewährt, die im Gegensatz zu anderen Computer-basierten Verfahren eine Strukturauflösung von bis zu 100 nm zulässt (Ovsianikov et al. 2006; Farsari et al. 2009). Sie ist jedoch von der Nutzung von photosensitiven Materialien und Photoinitiatoren abhängig, die über die Licht-induzierte Bildung von Radikalen die Vernetzung der Monomere des zu strukturierenden Materials im Laserfokus einleiten (Ovsianikov et al. 2012; Koroleva et al. 2013).

Die *in vitro* Analyse der Scaffold-Funktionalität umfasst folgende Aspekte: Besiedelungseffizienz, Lokalisation der Zellen in 3D, Einwachsen der Zellen in das Porensystem, Zellverhalten und Gewebeformation – durchgeführt an einem Zellmodell, das für die spezifische Anwendung die größte Aussagekraft liefert. Die Scaffold-Zell-Wechselwirkungen sind von dem Scaffold-Design, dem Porensystem und dem Scaffold-Material abhängig. Voraussetzung ist die Verwendung von biokompatiblen Materialien, mit denen gleichzeitig die Herstellung der Scaffolds möglich ist. Neue Materialien, die für die Scaffold-Generierung interessant scheinen, werden zunächst als Materialpellets, also zweidimensional, zum Nachweis der Biokompatibilität *in vitro* getestet.

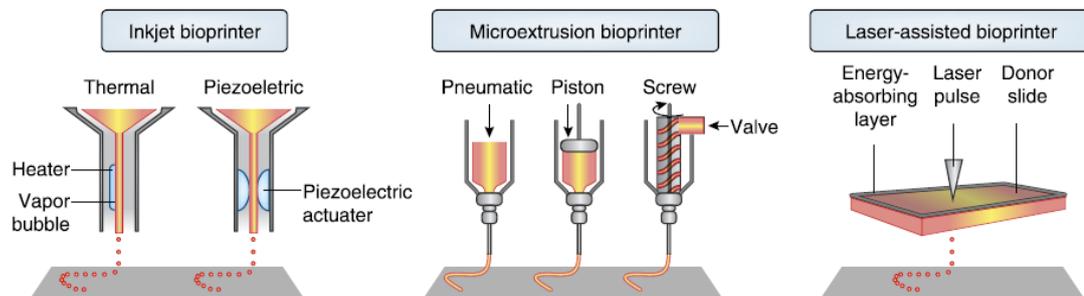
### 6.3.2 Scaffold-freies Tissue Engineering

Parallel zum Scaffold-basierten Tissue Engineering wird das Scaffold-freie Tissue Engineering zur Herstellung von 3D Zellmodellen verwendet. Doch wie lassen sich Zellen dreidimensional anordnen, wenn der Scaffold, die Stützstruktur, fehlt? Neben der Einkapselung von Zellen in Hydrogelen, zu der auch die Generierung von Sphäroiden gezählt wird, bietet sich ein Schichtsystem aus Zellmonolayern an, die sich in einem Gel oder in der natürlichen Matrix befinden (Chan et al. 2008). Bei der ersten Variante ist es schwierig, die Anordnung der Zellen und Stabilität der Sphäroide zu kontrollieren (Hildebrandt et al. 2011). Bei der zweiten Variante muss eine präzise Anordnung der Zellen im Schichtsystem erfolgen, um der multizellulären und spezifischen Gewebezusammensetzung gerecht zu werden.

In der Literatur sind verschiedene Druckverfahren beschrieben, mit denen es möglich ist, biologische Materialien wie Zellen Computer-gesteuert und gezielt auf einem Zielobjektträger beliebig zweidimensional und dreidimensional anordnen zu können (Abb. 4). Diese exakte und reproduzierbare Positionierung ist mit keinem anderen Verfahren, wie zum Beispiel das manuelle Auspipettieren der Zellen, umsetzbar. Voraussetzung ist, dass Zellen als Suspension im Medium oder in einem Gel vorliegen, weil Zellen nicht an der Luft übertragen werden können. Dieses Gel muss eine für den Druckvorgang nötige Viskosität aufweisen und biokompatibel sein. Generell wird zwischen Düsen-basierten und Düsen-freien BioPrintern unterschieden. Zur ersten Gruppe zählen Injekt-BioPrinter und Microextrusion-BioPrinter, wobei der Zellübertrag elektrisch, mechanisch oder akkustisch erfolgt. Auch wenn die Übertragungszeit der Zellen sehr schnell ist und die Anschaffung dieser BioPrinter relativ kostengünstig, sind sie für eine biomedizinische Anwendung schlecht geeignet. Auf Grund von Scherkräften innerhalb der Düsen werden die Zellen beschädigt und folglich sehr geringe Zellvitalitäten nach dem Druck erreicht. Da düsen-freie Verfahren dieses Problem umgehen, stellen sie eine sehr gute, wenn auch von der Anschaffung her teure, Alternative dar. Das Laser-assisted BioPrinting ist eine derartige Variante, weil der Zelltransfer indirekt durch einen Laserstrahl erfolgt. Der Laserstrahl wird in eine Energie-absorbierende Schicht aus Gold fokussiert, unter der sich die aufgetragene Zellsuspension befindet. Es entsteht eine Schockwelle, die dafür sorgt, dass die Zellen auf den darunter liegenden Zielobjektträger übertragen werden. Die Bewegung des Objektträgers lässt eine kontrollierte Positionierung der

übertragenden Zellen zu. (Tasoglu et al. 2013; Dababneh et al. 2014; Murphy et al. 2014)

Nach Etablierung der Druckverfahren besteht die Aufgabe darin, die multizelluläre 3D Gewebzusammensetzung mit einem adäquaten Zellmodell nachzunahmen und hinsichtlich ihrer zellbiologischen Funktionalität zu überprüfen.



**Abbildung 4:** Scaffold-freies Tissue Engineering: Druckverfahren  
 Quelle: Murphy et al. 2014

## 6.4 Ziel der Habilitation

Ein Ziel der Habilitation bestand darin, neue bioaktive und biomimetische Materialien für biomedizinische Anwendungen zu finden: diese nutzbar machen zu können für die Optimierung der Zellkulturbedingung und zellulären Regenerationsprozesse, zur Verbesserung der Implantatfunktionalität und Herstellung von 3D *in vitro* Zellmodellen über Scaffold-basierte und Scaffold-freie Verfahren (Laser-BioPrinting) in Tissue Engineering. Die getesteten Materialien und verwendeten Lasertechniken zur Generierung von Oberflächentopographien, 3D Scaffolds und das Laser-BioPrinting wurden von Kooperationspartnern aus dem Laser Zentrum Hannover e.V., Abteilung Nanotechnologie, bereitgestellt. Der Nachweis der neu entwickelter Materialien und 3D Zellmodelle erfolgte über *in vitro* Testungen an Zelllinien und humanen Primärzellen, insbesondere Stammzellen. Im Fokus stand die Verwendung von humanen Mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe, einem neuen Zellmodell, dessen Anwendbarkeit und Nutzarmachung zum Ziel gesetzt wurde. Da im gesunden Organismus die Regeneration durch die Teilung und Differenzierung spezialisierter Stammzellen erfolgt, wird ihnen eine große Bedeutung für künftige Strategien zugeschrieben (Wobus et al. 2006). Nachweise zur Biofilm-Bildung und *in vivo* Testungen hingegen wurden nicht selbst durchgeführt, sondern von Kooperationspartnern der Swinburne University of

Technology in Victoria (Australien) und Kooperationspartnern aus der Medizinischen Hochschule Hannover.

In Bezug zur Verbesserung der Bioaktivität von Implantatmaterialien sollten Oberflächentopographien gefunden werden, mit denen eine selektive Zellkontrolle möglich ist. Neben der Hemmung von Fibroblasten, die an der Ausbildung von Fibrose beteiligt sind, wurde die Anwendbarkeit im Bereich Neuroprothetik und für orthopädische und dentale Implantate über den Einfluss auf neuronale bzw. osteogene Differenzierung untersucht.

Im Thema „Scaffold-basierte 3D Zellmodelle“ sollten Materialien, bevorzugt natürliche Materialien gefunden werden, die biokompatibel sind und die Herstellung von Scaffolds erlauben. Im Anschluss war der Einfluss der Scaffold-Porosität auf das Zellverhalten von Interesse. Im Thema „Scaffold-freie 3D Zellmodelle“ sollte das Laser-BioPrinting für weitere Anwendungen etabliert und ausgetestet werden.

Der Fokus der Habilitation lag auf der Analyse der zellulären und molekularen Vorgänge, die für die selektive Zellkontrolle und die Differenzierungs- und Regenerationsmechanismen verantwortlich sind. Ausgehend von den Biomaterial-Zell-Wechselwirkungen wurden hierfür insbesondere Zelladhäsionsmechanismen, der Einfluss der Extrazellulären Matrix (EZM) und die Signalkaskaden der osteogenen Differenzierung untersucht. Einblicke und Verständnisse in diese Vorgänge sind nicht nur essentiell, um die Bioaktivität und selektive Zellkontrolle erklären zu können. Die in der Habilitation durchgeführte zellbiologische und Stammzell-Grundlagenforschung soll auch die Suche nach neuen bioaktiven Materialien und damit die Entwicklung neuer Strategien in der Regenerativen Medizin für künftige Anwendungen beschleunigen und erleichtern.

Die für die kumulative Habilitationsschrift zugrunde liegenden peer-reviewed Publikationen wurden im Zeitraum von 2010 bis 2016 am Laser Zentrum Hannover e.V. erstellt. Die ermittelten Forschungsdaten bildeten die Grundlage bzw. flossen in folgende Drittmittel-geförderte Projekte ein: Sonderforschungsbereich 599 „Zukunftsfähige bioresorbierbare und permanente Implantate aus metallischen und keramischen Werkstoffen“, Transregio 37 „Mikro- und Nanosysteme in der Medizin – Rekonstruktion biologischer Funktionen“, Remedis „Höhere Lebensqualität durch neuartige Mikroimplantate“, Exzellenzcluster Rebirth „Von Regenerativer Biologie zur Rekonstruktiver Therapie“, „Biofabrication for NIFE“ und „Optimierung von Nervenlektroden mittels Oberflächenfunktionalisierung über Mikroreplikation kombiniert mit adulten Stammzellen zur Zellersatztherapie“.

## 7 Selektive Zellkontrolle

### 7.1.1 Eigene Vorarbeiten und Zielsetzung

In den eigenen Vorarbeiten zur Habilitation lag der Fokus auf der physikalischen Materialfunktionalisierung, nämlich der Laser-basierten Herstellung von Oberflächentopographien. Im Vergleich zu den anderen Produktionstechniken hat die Laser-Ablation durch Femtosekundenlaser den großen Vorteil, dass sich eine große Vielzahl von Materialien reproduzierbar mit Rauigkeiten und definierten Topographien im Mikro- und Nanometer Bereich strukturieren lassen, je nach eingestellten Laser-Prozessparametern. Durch die minimale Kontaktzeit zwischen Laserfokus und Material entsteht keine Wärmeleitung und damit keine mechanische Schäden auf der Materialoberfläche. Die Strukturierung ist nicht nur auf flache Substrate beschränkt, sondern auch direkt am 3D Werkstück sprich Implantat anwendbar. Nicht nur die Herstellung unterschiedlicher Strukturtypen ist möglich, auch Größendimensionen des einzelnen Strukturtyps lassen sich beliebig einstellen. Dies eröffnet die Möglichkeit, das Zellverhalten in jeder gewünschten topographischen Umgebung studieren zu können.

Nach der Strukturierung wird der Wasserkontaktwinkel erhöht, die Substrate werden hydrophober (Fadeeva et al., 2009 a und b). Dieser Effekt ist nicht auf eine chemische Änderung des Substrats zurückzuführen, weil die chemische Zusammensetzung nach der Strukturierung gleich bleibt. Der Effekt beruht stattdessen auf einer Änderung der Materialfläche gemäß den theoretischen Modellen von (Cassie et al. 1944). Auch wenn sich insgesamt die Materialoberfläche vergrößert hat, wird durch die Topographie die Kontaktfläche für den Wassertropfen reduziert, was sich in der Verminderung der Benetzbarkeit des Substrats niederschlägt. Nach dem Strukturieren behalten alle getesteten Materialien ihre Biokompatibilität bei (Schlie 2010). Es treten auch keine Schäden der DNA auf. Nur das direkte Laser-basierte Strukturieren von Silikon zeigte cytotoxische Effekte, die vermutlich auf Materialrückstände nach der Ablation zurückzuführen sind (Schlie et al. 2010 a). Aus diesem Grund sollte Silikon alternativ strukturiert werden, wofür sich die Mikroreplikation von Laser-generierten Masterstrukturen anbietet.

Rillenstrukturen in Titan mit unterschiedlichen Rillenbreiten bewirkten eine selektive und zellspezifische Steuerung der Zellorientierung von humanen Fibroblasten und MG-63 Osteoblasten. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf die unterschiedlichen

Zellgrößen und dem sogenannten Contact Guidance zurückzuführen sind. Auf Nanorauhigkeiten in Platin mit zunehmendem Wasserkontaktwinkel, auf sogenannten Spike-Strukturen im Mikrometer Bereich in Silizium und Silikon und auf Lotus-Strukturen in Titan, die sich durch eine Mikrostrukturierung in Form von Spikes mit einer nano-rauen Oberfläche auszeichnen, war eine Hemmung der Proliferation von humanen Fibroblasten möglich. Gleichzeitig wurden SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen und MG-63 Osteoblasten nicht in ihrer Zellantwort gehemmt. In Hinblick auf die gewünschte Verbesserung der Bioaktivität und Erzielung der selektiven Zellkontrolle kann man dieser Art von Materialfunktionalisierung ein großes biomedizinisches Anwendungspotential zuschreiben. (Fadeeva et al. 2009 a und b, Schlie et al. 2010 a, Fadeeva et al. 2010, Schlie et al. 2011)

Die selektive Zellkontrolle wurde zwar belegt, aber die Ursache blieb unklar. Wie kann man zellbiologisch erklären, dass biokompatible Materialien, die sich nur durch eine unterschiedliche Topographie auszeichnen, derartige zellspezifische Effekte hervorrufen? Es wurde vermutet, dass die beobachtete selektive Zellkontrolle mit der für die Zellen angebotenen Kontaktfläche auf dem strukturierten Substrat zusammenhängt.

Ausgehend von den Adhäsionsmustern von Fibroblasten und SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen, aufgenommen über die Interferenzreflexionsmikroskopie, wurde deutlich, dass sich die Adhäsionsmuster auf Kontrollsubstraten zellspezifisch unterscheiden (Schlie et al. 2010 a). Auch wenn insgesamt die Materialoberfläche durch die Strukturierung vergrößert wurde, so ist der Adhäsionskontakt für die Zellen auf den Spitzen der Spikes begrenzt. Für Neuroblastoma Zellen mit Adhäsionsmustern aus fokalen Adhäsionskontakten ist nachwievor ausreichend Kontaktfläche auf den Spikes gegeben – für Fibroblasten scheint diese verminderte Kontaktfläche auf den Spikes nicht auszureichen. Sie waren stark abgerundet und bildeten deutlich weniger Zellausläufer aus. Gute bzw. schlechte Adhäsion könnte Einfluss auf das weitere Zellverhalten wie Proliferation haben und damit theoretisch die selektive Zellkontrolle bei Oberflächentopographien erklären.

Aufbauend auf den bisher durchgeführten Versuchen und Vermutungen, war ein Hauptziel der Habilitation, eine Erklärung für die gezeigte selektive Zellkontrolle zu finden. Im Detail wurden folgende Fragen für die Habilitation formuliert:

1. Stimmt die Vermutung, dass die selektive Zellkontrolle in der Zelladhäsion begründet ist? Sind die Adhäsionsmechanismen zellspezifisch, greift die

Materialfunktionalisierung spezifisch in die Zelladhäsion ein? Welche Rolle spielt die Zelladhäsion für eine Steuerung des Zellverhaltens?

2. Ist die Hemmung von Fibroblasten tatsächlich universell? Welchen Einfluss hat die Variation von Strukturabmessungen eines Strukturtyps?
3. Die genutzten Zelllinien SH-SY5Y Neuroblastoma und MG-63 Osteoblasten stellen keine idealen Zellmodelle zur Analyse der Bioaktivität dar. Gibt stattdessen es alternative Zellmodelle zum Nachweis der Differenzierungs- und Regenerationsvorgänge?

## 7.2 Rolle der Zelladhäsion

Die Vermutung, dass die selektive Zellkontrolle in der Zelladhäsion begründet ist, ist nicht nur in Hinblick auf die gezeigten zellspezifischen Adhäsionsmuster angebracht. Die Vermutung bekräftigt sich, wenn man bedenkt, wie Zellen grundsätzlich mit Biomaterialien wechselwirken. Die Biomaterial-Zell-Wechselwirkung laufen in einer fest definierbaren Reihenfolge ab. An erster Stelle steht die Zelladhäsion. Erst an zweiter Stelle folgt über verschiedene Signalkaskaden bis hin zur Transkription im Zellkern die Aktivierung des übrigen Zellverhaltens wie Ausbildung der Morphologie, Proliferation und Differenzierung. Wenn ein Biomaterial bzw. eine Materialfunktionalisierung die Zelladhäsion beeinflusst, positiv oder negativ, hat dies automatisch eine Konsequenz auf das übrige Zellverhalten.

Zellen adhären nie direkt mit ihrer Membran auf dem Material. Als Bindeglied fungiert die EZM mit ihren Adhäsionsliganden, genauer formuliert über ihre spezifischen Zell-Bindungssequenzen, die frei verfügbar vorliegen müssen. Erst wenn Zellen über ihre transmembranen Integrin-Rezeptoren mit den EZM-Liganden an das Material binden, was eine Inside-out Aktivierung der Integrine und Bindungsaffinitäten voraussetzt, werden in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren Outside-in Signalkaskaden nach der Formation eines fokalen Adhäsionskomplexes für das weitere Zellverhalten gestartet (Giancotti et al. 1999; Gahmberg et al. 2009). Die Zellkontrolle könnte so theoretisch in folgenden Punkten begründet sein: (a) Adsorption der EZM-Liganden auf das Material, (b) Integrin-Bindung, (c) fokaler Adhäsionskomplex und (d) Signalweiterleitung zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren (Abb. 5). Wenn darüber hinaus ein Material eine

zellspezifische Zellkontrolle hervorruft, kann dies nur geschehen, wenn sich die Adhäsionsmechanismen dieser verschiedenen Zelltypen unterscheiden.



**Abbildung 5:** Reihenfolge der Zelladhäsionsmechanismen

Über die Spezifität dieser Adhäsionsmechanismen ist wenig bekannt. Dies ist zurückzuführen auf die große Komplexität der Adhäsionsvorgänge, Bindungsüberschneidungen zwischen Integrinen und Liganden und den zahlreichen beteiligten Molekülen wie beispielsweise 24 beschriebene humane funktionale Integrin-Rezeptoren und 50 Moleküle innerhalb des fokalen Adhäsionskomplexes (Lo 2006; Alberts et al. 2011). Die Diversität aller beim Adhäsionsmechanismus beteiligten Komponenten führt zu der Schlussfolgerung, dass Zellspezifität sehr wahrscheinlich ist.

### 7.2.1 Biophysikalische Analyse der Zelladhäsion

Wie soll nun der Einfluss von bioaktiven Materialien auf die Zelladhäsion und der vermutete Zusammenhang mit der selektiven Zellkontrolle untersucht werden, wenn kaum etwas über die Zellspezifität der Adhäsionsmechanismen bekannt ist? Bei der Diversität der möglichen beteiligten zellulären Komponenten fällt es schwer, geeignete zelluläre Parameter auszuwählen, da unklar ist, wie spezifisch und essentiell ihre Funktion in den Adhäsionsmechanismen für den jeweiligen Zelltyp ausfällt.

Ausgehend von dieser Problematik wurden in der **Publikation 1** zwei neue biophysikalische Messverfahren entwickelt, mit denen eine Analyse der Zelladhäsion möglich ist, ohne Zellspezifität kennen zu müssen. Es handelt sich um

zwei neue Messparameter, die zuvor in der Form noch nicht in der Literatur beschrieben waren: Adhäsionszeit und Adhäsionskraft. Beide Parameter lassen sich über einfache Verfahren basierend auf der Bestimmung der Zelldichte über die Reaktion der ersten Ordnung quantifizieren und sind für jede adhärenz Zellart, jede Kulturbedingung und jedes beliebige Substrat sprich Biomaterial anwendbar. Der Vergleich zwischen verschiedenen Zelllinien, Tumorzellen und Stammzellen machte deutlich, dass beide Parameter zellspezifisch sind und zellspezifisch von Biomaterialien mit unterschiedlichen Hydrophobizitäten beeinflusst werden. Dies spiegelte sich auch in einem Material- und zellspezifischen Einfluss auf die Proliferation wieder. Der zuvor vermutete Zusammenhang zwischen der Zelladhäsion und dem Zellverhalten und damit einhergehend spezifische Materialeffekte konnten belegt werden.

Doch wie lassen sich beide biophysikalischen Parameter Adhäsionszeit und Adhäsionskraft zellbiologisch erklären? Die Adhäsionszeit hängt ausschließlich von dem Vorhandensein der Adhäsionsliganden auf der Materialoberfläche ab. Dies erklärt, warum die Adhäsionszeit bei dem beschichteten EZM-Substraten im Vergleich zu den anderen Proben stark beschleunigt war: eine Adsorption der Liganden war nicht notwendig. Neben elektrostatischen Wechselwirkungen und Van der Waals-Kräfte hängt die Adsorption der Liganden von dem Protein-Oberflächen-Abstand, der Kontaktzeit, der Größe und Form der Liganden, konkurrierenden Proteinen, die bereits auf der Oberfläche adhärenz sind, und den Eigenschaften des Mediums und Materials ab (Bongrand et al. 1982). Dabei ist die Adsorptionskinetik von den Liganden unabhängig von den chemischen Eigenschaften des Materials (Baujart-Lamotte et al. 2008). Für die nun folgende Zellbindung sind die Dichte, Orientierung und Konformation der Liganden auf den Materialoberflächen entscheidend. In der **Publikation 1** wurde mittels eines enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) gezeigt, dass Fibronectin in höherer Konzentration auf dem hydrophilen Material vorliegt als auf dem hydrophoben; bei Laminin war dies umgekehrt. Andere Studien belegen zusätzlich, dass der Parameter Benetzbarkeit die Konformation und damit Verfügbarkeit der RGD-Bindungssequenz von Fibronectin maßgeblich steuert: auf hydrophilen Materialien wird eine gestreckte Konformation erzielt, bei der die RGD-Bindungssequenz frei verfügbar ist, auf hydrophoben ist dies nicht der Fall (Keselowsky et al. 2008). Überträgt man diese Kenntnisse auf die selektive Zellkontrolle, so ergibt sich folgende Korrelation: Fibroblasten adhärenz besser auf Fibronectin, Fibronectin adsorbiert in höherer

Dichte und mit bindungsaktiver Konformation auf hydrophilen Materialien – dies erklärt, warum Fibroblasten hydrophile Materialien bevorzugen. Endothelzellen adhären besser auf Laminin, Laminin adsorbiert in höherer Dichte auf hydrophoben Materialien, die wiederum von Endothelzellen bevorzugt werden. Für einen Einfluss auf die Adhäsionskinetik sind somit Kenntnisse der Adhäsionsliganden-Adsorption auf den Biomaterialien hilfreich.

Mit welcher Kraft Zellen auf dem Material adhären setzt die Adhäsion der Zellen voraus. Zur Überprüfung musste die Ausbildung des Adhäsionskomplexes nachgewiesen werden, was über die Fokalen Adhäsionskinase, phosphoryliert an Tyrosin<sup>397</sup> (p-FAK Tyr<sup>397</sup>) und Vinculin erfolgte (Lo 2006). Die Rekrutierung von Vinculin innerhalb des fokalen Adhäsionskomplexes baut eine intrazelluläre Spannung auf, die die Zell-Oberflächen-Abstände minimiert, die Adhäsion stabilisiert und Adhäsionskraft verstärkt (Fereol et al. 2009, Galbraith et al. 2002). Fibroblasten adhärten stärker auf hydrophilen Materialien, weil dort nicht nur Fibronectin besser adsorbiert, was Fibroblasten bevorzugen, sondern weil Fibroblasten verstärkt fokale Adhäsionskomplexe auf Fibronectin ausbildeten. Endothelzellen folgten der gleichen Korrelation, jedoch über Laminin und hydrophobe Materialien. Während bei der Erklärung der Adhäsionszeit Aussagen über die Adsorption der Liganden ausreichen, kommen für die Erklärung der Adhäsionskraft zusätzlich der Nachweis der Zellbindung und cytoskeletalen Komponenten innerhalb des fokalen Adhäsionskomplexes zum Tragen.

### 7.2.2 Hemmung von Fibroblasten: Korrelation zwischen Strukturabmessungen und Adhäsion

Der Fokus der **Publikation 2** lag auf der zuvor gezeigten Hemmung von Fibroblasten auf Spike-Strukturen im Mikrometer Bereich in Silizium (Schlie et al. 2010 a und 2011). Da die Laser-Materialbearbeitung die Herstellung eines Strukturtyps mit variablen Strukturabmessungen ermöglicht, wurde untersucht, welchen Einfluss eine Variabilität der Spike-Spike-Abstände auf die Fibroblasten hat. Dafür wurden mittlere Spike-Abstände von 2  $\mu\text{m}$  (kleine Spikes) und 7  $\mu\text{m}$  (große Spikes; wie in den vorausgegangenen Arbeiten genutzt) generiert. Wie in **Publikation 1**, bislang nur an unstrukturierten Materialien gezeigt, sollte ein Zusammenhang zwischen Zellkontrolle auf Oberflächentopographien und Zelladhäsion gezogen werden.

Die Hemmung der Fibroblasten war nicht universell; sie ist zwar auf jedem beliebigen Strukturtyp unabhängig vom Material möglich, hängt aber von den eingestellten Strukturabmessungen ab. Es wurde ein sogenannter Turnover-Point der Topographie formuliert, der zell- und strukturspezifisch zwischen positiver und negativer Zellantwort unterscheidet. Nur auf den großen Spikes wurde die Zellantwort der Fibroblasten, gemessen an der Morphologie, Lokalisation und Proliferation, unterdrückt. Das Ergebnis korrelierte mit einer strukturspezifischen Hemmung des fokalen Adhäsionskomplexes und reduzierter Fibronectin Adsorption. Der Zusammenhang zwischen Zellkontrolle und Adhäsion mittels Liganden Adsorption und Adhäsionskomplex konnte auch auf der Topographie bestätigt werden.

Unklar ist, ob die verminderte Kontaktfläche nachteilig für die Integrine und anschließende Outside-in Signalkaskade ist. Integrin-Clustering und folgende Signalweiterleitung sind nur möglich, wenn die angebotene Kontaktfläche über die Adhäsionsliganden mit den Integrin-Abständen innerhalb der Zellmembran übereinstimmt (Cavalcanti-Adam et al. 2007). Morphologische Veränderungen, die einhergehen mit geänderten intrazellulären Spannungen, können die Zellantwort ebenso stören (Ingber 2003). Das Ausbleiben von Zell-Zell-Kontakten auf der Topographie und damit verminderte Kommunikation zwischen benachbarten Zellen kann die Zellfunktionen minimieren und zu Apoptose führen (Schlie et al. 2010 b).

### 7.2.3 Selektive Rolle der Adhäsionsliganden der EZM

Die Untersuchungen zur Material- bzw. Materialfunktionalisierung-gesteuerten Adhäsion der Zellen verdeutlichten, dass die Adhäsionsliganden der EZM eine wichtige Rolle spielen. Die Liganden gelten ohnehin als das Bindeglied zwischen dem Material und den Zellen. Beeinflusst das Material die Adsorption dieser Liganden, wirkt sich das immer auf das Zellverhalten aus. Aber steuert die EZM tatsächlich selektiv das Zellverhalten?

In der **Publikation 3** wurde der Einfluss von Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ I im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle auf das Zellverhalten untersucht. Unter standardisierten Beschichtungs- und Kulturbedingungen erfolgte die Analyse an unterschiedlichen Zelltypen, was in der Literatur in dem Umfang noch nicht beschrieben worden war. Alle durchgeführten Versuche zeigten, dass die EZM Adhäsionsliganden das gesamte Zellverhalten wie Adhäsion, Morphologie, Proliferation und interzelluläre Kommunikation steuern; dies sowohl im

Kurzzeitversuch ohne Serum als auch im Langzeitversuch mit Serum. Es traten signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle auf. Die genutzten Zellen adhärten zwar auf sämtlichen Adhäsionsliganden – es gab aber eine zellspezifische Ligandenrangfolge. Gemessen und beurteilt an dem Ausmaß der Effekte der untersuchten Parameter des Zellverhaltens und signifikanten Unterschiede zur Kontrolle, gestaltet sich die Rangfolge folgendermaßen: Fibroblasten bevorzugten klar Fibronectin, Endothelzellen klar Laminin, glatte Muskelzellen eher Laminin, Chondrozyten eher Kollagen Typ I, Osteoblasten eher Laminin und Fibronectin. Auch der Vergleich unterschiedlicher Fibroblasten Spezies vom Menschen mit zwei verschiedenen Maus-Fibroblasten-Zelllinien zeigte, dass Fibroblasten generell Fibronectin favorisierten. Es wurde somit belegt, dass die EZM das Zellverhalten steuert. Offen ist, wie die Signalweiterleitung von der Adhäsion hin zu den Transkriptionsfaktoren molekular abläuft.

### 7.3 Neuronale Anwendung

Der Bereich Neuroprothetik beschäftigt sich unter anderem mit der Herstellung und Optimierung von implantierbaren Elektroden, die zur gezielten Stimulation von Nerven- und Muskelgewebe zum Einsatz kommen. Um selektiv Neurone stimulieren zu können, wurden in der Vergangenheit die Elektrodenkontakte zunehmend verkleinert (Cogan 2008). Dies hatte jedoch eine Verschlechterung der elektrischen Leistung und Signalübertragung zur Folge. Versucht man, diesen Effekt durch eine hohe Stimulationsdichte auszugleichen, kann dabei das umliegende Gewebe geschädigt werden. Diesem Punkt kann man durch Oberflächenstrukturierung entgegenwirken (Kovacs 1994): die Oberfläche wird vergrößert und dadurch die elektrische Leistung trotz verminderter Elektrodenfläche aufrecht erhalten. Laser-generierte Topographien könnten somit beiden entscheidenden Anforderungen für implantierbare Elektroden gerecht werden: technische und biologische Optimierung, elektrochemische Eigenschaften und Bioaktivität durch selektive Zellkontrolle über die Hemmung von Fibrose.

Obwohl die bisher durchgeführten *in vitro* Versuche andeuteten, dass sich neuronale Zellen auf den Topographien normal verhielten (Schlie et al. 2010 a), reicht dies jedoch nicht als abschließender Beweis der verbesserten Bioaktivität und selektiven Zellkontrolle aus. Die neuronale Differenzierung wie zum Beispiel die Ausbildung von Synapsen muss belegt werden. Hierfür wurden in der **Publikation 4**

PC-12 Zellen verwendet, die über die Zugabe vom Neuronalem Wachstumsfaktor (NGF) neuronal-ähnliche Eigenschaften aufweisen (Hans et al. 2001). Es wurde der Einfluss von nano-strukturiertem Platin getestet, von dem bekannt war, dass es die Proliferation von Fibroblasten hemmt (Fadeeva et al. 2009). Neben dem Einfluss der Strukturierung wurde auch die Effektivität von Beschichtungen der Proben analysiert, die generell nötig sind, damit PC-12 Zellen adhären und differenzieren können (Keshmirian et al. 1989).

Zunächst wurde anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt, dass Beschichtungen die Topographie nicht verändern. Dies bedeutet, dass zwei verschiedene Materialfunktionalisierungen miteinander kombiniert werden können: physikalisch über Strukturierung und chemisch über Beschichtung. Die Impedanz wurde durch die Nano-Strukturierung, nicht aber durch zusätzliche Beschichtungen, im niedrigen Frequenzbereich reduziert. Die Reduktion der Impedanz ist ein wichtiges Kriterium zur Optimierung der elektrochemischen Eigenschaften. Weil die Laser-basierte Strukturierung die Biokompatibilität der Proben nicht mindert, ist diese Materialoptimierung für medizinische Anwendungen besser geeignet als toxische Elektrolytbeschichtungen (Stieglitz 2004).

Die Adhäsion wurde durch die Nano-Strukturierung signifikant verbessert, reichte allein aber für die Initiierung der Differenzierung nicht aus. Ohne NGF trat keine Differenzierung ein. Undifferenzierte Zellen unter NGF-Zugabe konnten im Kontakt mit sämtlichen Materialien differenzieren, vordifferenzierte Zellen behielten ihre neuronalen Eigenschaften bei und dedifferenzierten nicht. Das Ausmaß der Differenzierung war aber umso besser, wenn zusätzlich eine Beschichtung bzw. die Nano-Strukturierung vorlag. Diese waren für jeden getesteten neuronalen Marker (Mikrotubuli-assoziierte Proteine, Beta III Tubulin als Bestandteil von Dendriten und Synaptophysin, zugehörig zu Synapsen) spezifisch. Nur Laminin war nicht förderlich, weil es eher die Zellaggregation anstatt Neuritenwachstum stimulierte. Am effektivsten war die Nano-Strukturierung kombiniert mit einer Beschichtung aus Kollagen Typ I und Poly-D-Lysin.

Die Beschichtung als Nachahmung der natürlichen EZM-Zellumgebung kopiert die mechanischen Eigenschaften und dient als Speicher für die Wachstumsfaktoren, ohne die eine neuronale Differenzierung nicht möglich ist. Ergänzend zu den Nano-Struktur-Effekten auf Fibroblasten, die dort gehemmt werden, konnte die erforderliche selektive Zellkontrolle und Bioaktivität über die neuronale Differenzierung *in vitro* belegt werden.

Als eingeladenes Review greift die **Publikation 5** die Ergebnisse der PC-12 Zellen auf Nano-strukturiertem Platin und Topographie-bedingte Hemmung von Fibroblasten nochmal auf. Außerdem wurden Versuche mit SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen ergänzt und der Zusammenhang zur Rolle der Zelladhäsion gezogen. Da PC-12 Zellen eine zusätzliche Beschichtung zur Adhäsion benötigen, konnte diese Korrelation zuvor nicht untersucht werden. Im Vergleich zu humanen Fibroblasten wurde gezeigt, dass SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen weder auf Spike-Strukturen im Mikrometer Bereich in unterschiedlichen Materialien, noch auf Nano-Strukturen in Platin gehemmt wurden. Aufbauend auf den Studien in **Publikation 3** wurde demonstriert, dass Neuroblastoma Zellen Laminin bevorzugten. Über die Adsorption von Laminin auf Biomaterialien ist in der Literatur nichts bekannt. Eigene, allerdings unveröffentlichte Daten mittels ELISA zeigten aber, dass Laminin sowohl auf Nano-Strukturen als auch auf Mikro-Strukturen in hoher Konzentration vorliegt. Mit diesem Hintergrund lässt sich die selektive Zellkontrolle zwischen Fibroblasten (negative Zellantwort) und SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen (positive Zellantwort) erklären: Neuroblastoma Zellen bevorzugen Laminin, was gut auf den Strukturen adsorbiert, so dass eine folgende gute Adhäsion das Zellverhalten einleiten kann. Die Adhäsionsmuster, sprich Integrin-Bindungen zum Substrat, sind mit der veränderten Kontaktfläche der Topographie kompatibel (Schlie et al. 2010 a). Fibroblasten bevorzugen Fibronectin, was nicht gut adsorbiert und damit eine schlechte Adhäsion mit Minderung der Zellantwort hervorruft (**Publikation 2**). Die Ergebnisse der Neuroblastoma Zellen bestätigen den Nachweis der Bioaktivität der Laser-generierten Oberflächentopographien und lassen Aussagen über die Rolle der Zelladhäsion zu.

Als Abschluss der Arbeiten zum Thema neuronale Anwendung, die maßgeblich in den DFG-geförderten Sonderforschungsbereich 599 einfließen, wurde die **Publikation 6** geschrieben. Die Publikation umfasst umfangreiche technische Informationen zur Laser-Materialbearbeitung und Analyse, die hier nicht genannt werden sollen, und sämtliche *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse.

Zuvor sind allerdings kurz technische Informationen zu nennen, die für die Handhabung Laser-strukturierter Proben in Zellkultur und Beurteilung der Struktur-Zell-Wechselwirkungen wichtig sind. Die Strukturierung der Proben verändert die Benetzbarkeit, der Wasserkontaktwinkel wird erhöht, weil sich die Kontaktfläche für den Wassertropfen vermindert. Der Anstieg der Hydrophobizität ist aber nur struktur-bedingt und nicht auf chemische Veränderungen nach dem Strukturieren

zurückzuführen. In **Publikation 6** wurde gezeigt, dass sich Luftblasen zwischen den Strukturen einlagern, die allerdings nach kurzer Inkubationszeit in Flüssigkeiten verschwinden. Im Anschluss sind die Proben wieder vollständig benetzbar, die zuvor erhöhte Hydrophobizität verschwindet. Eine Steuerung des Zellverhaltens ist ausschließlich durch die physikalische Funktionalisierung, der Oberflächenstrukturierung mit veränderter Kontaktfläche für die Zellen, und nicht wegen der direkt nach Struktur-Herstellung gemessenen erhöhten Hydrophobizität begründbar.

Zunächst wurde überprüft, welchen Einfluss die Oberflächenstrukturierung auf die Ansiedelung von pathogenen Bakterien und die Ausbildung der EPS *in vitro* hat. Ziel war es, die initiale Adhäsion der Bakterien zu verhindern ehe eine vollständige Schutzschicht bestehend aus der EPS aufgebaut werden konnte. Auf diese Weise erhofft man sich, dass die Biofilm-Bildung unterbunden wird und damit das Risiko von Implantat-assoziierten Infektionen und Sekundärinfektionen ausgeschlossen werden kann. Auf Lotus-Strukturen in Titan konnte die initiale Adhäsion von Bakterien nicht verhindert werden (Truong et al. 2012). Auf Rillenstrukturen mit 1 µm Rillenbreite wurde die adhärenente Bakteriendichte halbiert. Nach diesen *in vitro* Ergebnissen scheint diese Strukturvariante vielversprechend zu sein, die initiale Adhäsion und Ausbreitung von Bakterien zu hemmen.

Ausgehend von den vorangegangenen *in vitro* Versuchen wurden die Strukturvarianten ausgewählt, mit denen eine selektive Zellkontrolle und Verbesserung der Bioaktivität belegt worden war: Mikro-Rillenstrukturen mit einer Rillenbreite von 5 µm und Periodizität von 10 µm und Nano-Strukturen (**Publikation 4**; Fadeeva et al. 2009; Reich et al. 2008 und 2012). Für zwei folgende *in vivo* Tests an Meerschweinchen wurden Cochlea Implantate der Firma Cochlear Technology (Mechelen, Belgien), bestehend aus flexiblem Silikon mit einem Durchmesser kleiner als 500 µm und 8-Kanal-Platin-Elektroden, wie folgt strukturiert: für den ersten Versuch wurden auf den Platin-Elektroden und dem umliegenden Silikon Rillenstrukturen erzeugt, eine Variante in Längs-, die andere in Querrichtung zur Elektrodenachse; für den zweiten Versuch wurden auf den Platin-Elektroden Nano-Strukturen unterschiedlicher Rauigkeiten erzeugt (Linke et al. 2015). Impedanzmessungen sollten Aussagen über die Bildung von Fibrose zulassen.

Auf unstrukturierten Cochlea Implantaten war die Impedanz erhöht. Die Erhöhung war noch stärker, wenn die Implantate eine Längsrichtung der Rillenstrukturen hatten. Die Ausrichtung der Rillen hatte somit das Einwachsen der Fibroblasten und

die Ausbildung von Fibrose begünstigt. Die Rillenstrukturen jedoch, die in Querrichtung zur Elektrodenachse aufgebracht waren, konnten die Impedanz reduzieren. In dem Fall wurden die Cochlea Implantate nicht von Fibroblasten besiedelt, es bildete sich keine Fibrose aus. Man nimmt an, dass die Querrillen eine Barriere für die Zellen darstellt, die eine Ansiedelung verhindert. Somit ist nicht nur die Größenabmessung der Rillenstrukturen zur Hemmung der Fibroblasten entscheidend, wie *in vitro* gezeigt, sondern auch die Orientierung der Rillen auf dem Implantat.

Auf allen getesteten Nano-Strukturen der Platin-Elektroden wurde eine Reduktion der Impedanz erzielt. Allerdings nahmen über die Zeit die Impedanzwerte wieder zu, so dass keine vollständige Hemmung der Fibroblasten, sondern nur eine Adhäsionsverzögerung der Zellen möglich war. Nach den *in vivo* Tests wurden die Implantate re-implantiert und histologisch untersucht. Ein Nachweis der Fibroblasten auf den Elektroden ergab, dass die Nano-Strukturen 1 und 2, erste hergestellt mit einer Laserfluenz von 1,23 J/cm<sup>2</sup> und zweite mit 4,02 J/cm<sup>2</sup>, die Adhäsion von Fibroblasten um ein Drittel reduziert hatten. Somit wurde *in vivo* die Adhäsion von Fibroblasten verhindert, die Bioaktivität der Materialien auch durch diese Strukturvariante verbessert.

### 7.4 Osteogene Differenzierung

Nach den Studien zur neuronalen Anwendung, stellte sich die Frage, ob Oberflächentopographien auch bei anderen biomedizinischen Anwendungen die erforderliche selektive Zellkontrolle und Verbesserung der Bioaktivität ermöglichen. In den eigenen Vorarbeiten war bereits die selektive Kontrolle der Orientierung bzw. Proliferation durch Rillenstrukturen im Mikrometer Bereich bzw. Lotus-Strukturen in Titan für orthopädische Anwendung getestet worden (Fadeeva et al. 2010, Schlie et al. 2011).

Zum Nachweis der Knochenregeneration bzw. osteogenen Differenzierung bieten sich Mesenchymale Stammzellen (MSC) an, adulte Stammzellen, die aus unterschiedlichen Geweben gewonnen werden können. MSCs können sich selbst erneuern, sind multipotent und differenzieren gemäß ihres Ursprungs aus dem Mesoderm in Richtung Binde- und Stützgewebe, somit auch in Richtung Knochengewebe (Alberts et al. 2011). In der Vergangenheit wurden MSCs hauptsächlich aus dem Knochenmark isoliert und verwendet. Abgesehen davon,

dass die Entnahme der Zellen ein Risiko für den Spender birgt, ist die Zellausbeute der Vorläuferzellen sehr gering und besteht aus einer heterogenen Population. Phänotypisch unterschiedliche Zellen müssen zuvor voneinander getrennt werden, andernfalls nimmt das Differenzierungspotential und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung ab. Auf Grund dieser Nachteile wurde verstärkt nach neuen MSC-Quellen, kommend aus anderen Geweben, gesucht. MSCs, gewonnen aus dem Fettgewebe, wird ein großes Anwendungspotential für die Stammzellforschung und Regenerative Medizin zugesprochen. Benannt als adipose-derived stem cells (ASCs) werden sie in hoher Zellzahl nach routinemäßigen Fettabsaugungen gewonnen. Sie weisen immunsuppressive Eigenschaften auf, können sich selbst erneuern und haben ein effizientes Differenzierungspotential. (Asatrian et al. 2015)

Auf Grund der genannten Vorteile wurde im Rahmen der Habilitation diese neue, wenn auch in der Literatur noch wenig beschriebene, MSC-Quelle zur Untersuchung der Knochenregeneration verwendet. Zu osteogenen Markern zählen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP), Kollagen Typ I Produktion, Calciumproduktion und diverse Knochenproteine wie Osteocalcin und Osteopontin (Alberts et al. 2011).

### 7.4.1 Lotus-Topographie und osteogene Differenzierung

In der **Publikation 7** war es das Ziel, den Einfluss des Lotus-strukturierten Titans auf die osteogene Differenzierung von humanen ASCs zu untersuchen. Doch warum scheint die Verwendung von Titan in Kombination mit einer Lotus-Topographie sinnvoll zu sein? Titan ahmt auf Grund der hohen Härte und Elastizität sehr gut die mechanischen Eigenschaften von Knochengewebe nach, so dass es häufig bei orthopädischen und dentalen Implantaten Anwendung findet (Geetha et al. 2009). Eine Funktionalisierung der Titan-Oberfläche soll biomimetischen Anforderungen gerecht werden. In dem Fall kann besonders die physikalische Funktionalisierung zur Nachahmung der Größendimensionen innerhalb der EZM und Architektur der Gewebe dienlich sein, weil Knochengewebe durch komplexe Strukturen im Mikrometer und Nanometer Bereich gekennzeichnet ist. Die Lotus-Strukturen, bestehend aus Spikes im Mikrometer Bereich mit Nanorauheit auf der Oberfläche, setzen diese Anforderungen um.

Die Proben waren für die Zellen nicht toxisch. Es zeigte sich, dass die Morphologie und Integrin-Expression für jeden Differenzierungszustand der ASCs, undifferenziert bzw. osteogen vordifferenziert, spezifisch sind. Es fiel auf, dass die Lotus-strukturierte Fläche viel stärker besiedelt war. Dies wurde bei der Bestimmung der

Zelldichte bestätigt, wobei die proliferative Aktivität der Zellen auf der unstrukturierten Fläche viel höher war. Laut (Birmingham et al. 2012) war nach diesem Ergebnis auf der unstrukturierten Fläche eine verminderte Differenzierung zu erwarten, weil Stammzellen entweder proliferieren oder differenzieren. Die Lotus-Struktur reduzierte zwar die Zelllänge signifikant, jedoch blieb die Zellelongation gleichzeitig signifikant größer. Zudem reduzierte die Lotus-Struktur den Anteil runder adhärenter Zellen und sorgte für eine bessere Zellorientierung.

Die Adhäsion der ASCs wurde über Integrine, den fokalen Adhäsionskomplex und funktionell über eine Bestimmung der Adhäsionskraft (**Publikation 1**) ermittelt. Die Lotus-Struktur veränderte die Lokalisation  $\alpha 5$ - und  $\beta 3$ -Integrin Untereinheiten, wobei  $\alpha 5$  in der Kluft zwischen den Spikes lokalisiert war und auf den Spike-Spitzen nur die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit vorlag. Generell waren weniger Integrin-Untereinheiten auf der Lotus-Struktur quantifizierbar, auch der fokale Adhäsionskomplex wurde weniger ausgebildet. Trotzdem wurde die Adhäsionskraft signifikant auf der Lotus-Struktur erhöht, was vermutlich auf geringere Abstände zwischen den Zellen und der Lotus-Struktur zurückzuführen ist.

Die Lotus-Strukturen in Titan verbesserten nicht nur die Adhäsionskraft der Zellen, sondern auch die osteogene Differenzierung. Allerdings reichte die Lotus-Struktur allein nicht aus, um auch bei Kontrollzellen die osteogene Differenzierung zu induzieren. Betrachtet man die einzelnen osteogenen Marker im Detail, so traten Topographie-spezifische Effekte auf: ALP mit einem Maximum an Tag 14 war auf der Lotus-Struktur niedriger; Osteocalcin und Calcium waren an Tag 21 auf der Lotus-Struktur höher nachweisbar.

Biomedizinischen Anwendungen entsprechend wurde bei diesen *in vitro* Versuchen mit ASCs bestätigt, dass Lotus-Strukturen in Titan die Bioaktivität erhöhen. Auch für orthopädische Anwendungen kann der Laser-basierten Herstellung von Oberflächentopographien ein hohes Potential zugesprochen werden, was künftig in *in vivo* Testungen belegt werden muss. In Hinblick auf die Zellbiologie blieben bei den Untersuchungen aber einige Fragen offen. Nicht nur eine selektive Zellkontrolle wurde erzielt, sondern auch ein selektiver Einfluss auf die Expression der osteogenen Marker. Doch wie greift die Strukturierung in die osteogenen Signalkaskaden ein? Um diese Frage beantworten zu können, ist zellbiologische Grundlagenforschung notwendig. In dem Fall um so mehr, weil wenig über ASCs bekannt ist. Im Anschluss sollten diese Kenntnisse in Bezug zu den Lotus-

Strukturen gesetzt werden, um zu ermitteln, inwiefern die Funktionalisierung die osteogenen Signalkaskaden beeinflusst.

#### 7.4.2 Einfluss auf osteogene Signalkaskaden

Bevor osteogene Signalkaskaden untersucht wurden, war es das Ziel, neue Nachweismethoden der osteogenen Marker zu etablieren. Eine Quantifizierung war wünschenswert, die nicht auf relative Fluoreszenzwerte beruht (**Publikation 7**), sondern die Marker hinsichtlich ihrer Aktivität oder vorliegenden Konzentration bezogen auf die Fläche oder vorliegende Zelldichte normiert. Diese zellbiologischen Methoden zum Nachweis der ALP Aktivität und der Calciumproduktion wurden für ASCs in **Publikation 8** verwendet. Außerdem wurden die üblichen zellbiologischen Methoden mit Western Blot Ergebnissen, einem molekularbiologischen Messverfahren, verglichen (**Publikation 9**). Allgemein war eine Diskrepanz bei den Ergebnisse im Bezug zum Western Blot festzustellen, so dass für die eigenen Arbeiten die Aussagekraft der Western Blot Ergebnisse weniger berücksichtigt wurde. Laut (Schindeler et al. 2006) sind diese Unterschiede nicht nur bei der Nutzung verschiedener Messmethoden auffällig. Diskrepanzen sind auch bei verschiedenen Stammzell-Herkünften, bezogen auf das Gewebe und bezogen auf unterschiedliche Spender, zu erwarten. Dies konnte ebenfalls in **Publikation 9** an ASCs von vier verschiedenen Spendern belegt werden.

Die osteogenen Signalkaskaden, stimuliert über die Outside-in Signalweiterleitung nach der Integrin-EZM Bindung in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, resultieren in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Diese bestimmen die Aktivierung unterschiedlicher Gene wie Spp1, Col1a1 und Bglap, die für die Expression der osteogenen Marker zuständig sind. Die vollständige osteogene Transkriptionsfunktionalität wird bei einem Komplex aus den Transkriptionsfaktoren Runt-related transcription factor 2 (Runx2) und Osterix erreicht (Artigas et al. 2014). Die Aktivität beider Transkriptionsfaktoren wird über Kofaktoren und Phosphorylierungen reguliert. Die phosphorylierte Form von Runx2 kennzeichnet die erfolgte Aktivierung. Unabhängig davon, welche intrazellulären molekularen Komponenten diese Aktivierung einleiten, so spielen auch externe Faktoren wie die Zellbindung an die Adhäsionsliganden der EZM und mechanischen Eigenschaften der EZM eine Rolle. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Elastizitäten der EZM selektiv die neuronale, myogene oder osteogene Differenzierung induzieren (Engler et al. 2007). Die Erklärung baut auf einer Korrelation zwischen intrazellulärer

Spannung und Zellmorphologie auf, die von der Polymerisation des Aktin-Cytoskeletts abhängen (Kelly et al. 2010). Starke intrazelluläre Spannungen wegen hoher Aktinpolymerisation spiegelt sich in ausgestreckter Zellform wieder, was für die osteogene Differenzierung charakteristisch ist.

Die Wichtigkeit der Adhäsionsliganden für das Zellverhalten ist an Zelllinien bereits in der **Publikation 3** bestätigt worden. Ihr Einfluss auf die osteogene Differenzierung von ASCs ist aber unklar und wurde in der **Publikation 8** untersucht. Außerdem galt es in der Publikation zu klären, ob die Zellform und Aktinpolymerisation, dies ebenfalls in Abhängig der Adhäsionsliganden, die osteogene Differenzierung und Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Eine Blockierung der Aktinpolymerisation wurde über eine Inkubation mit Cytochalsin D und Y-27632, einem Inhibitor der Rho-assoziierten Kinase (ROCK), erzielt. Cytochalasin D verhindert die Polymerisation, indem es über die Bindung an das Plus-Ende des Aktinfilaments wie ein Capping Protein die Elongation verhindert (Müller et al. 2013). ROCK stabilisiert die Aktinpolymerisation und wechselwirkt über die Myosin Leichte Kette mit Myosin II, wobei ein Bezug zur Myosin II-bestimmten Spannungsabhängigkeit gezogen werden kann (Amano et al. 2010). Gelöst werden beide Aktinpolymerisations-Inhibitoren in Dimethylsulfoxid (DMSO). Vortests ergaben, dass DMSO das Zellverhalten und osteogene Differenzierung von ASCs nicht negativ beeinträchtigt.

Wie in **Publikation 3** wurden Kollagen Typ I, Laminin und Fibronectin als Adhäsionsliganden der EZM ausgewählt. Die Proliferation war zwischen Kontroll- und osteogenen Zellen vergleichbar. Kein signifikanter Effekt der EZM lag vor, nur eine Tendenz, dass Fibronectin bei Kontrollzellen und Laminin bei osteogenen Zellen förderlich war. Obwohl die Adhäsionsliganden der EZM allein nicht ausreichten, wie bei den Kontrollzellen, die osteogene Differenzierung der ASCs zu stimulieren, so konnte doch ein Zusammenhang zwischen EZM, Zellform und Differenzierung gezogen werden. Auch wenn Fibronectin die Zellelongation verbesserte, wirkte sich das nicht signifikant auf die Differenzierung aus. Allgemein hatten die Liganden bei osteogenen Zellen nur einen unterstützenden Effekt mit einer scheinbar wichtigen Rolle von Osterix. Beide verwendeten Inhibitoren der Aktinpolymerisation führten zu einer Verminderung der Zellelongation, jedoch war der Einfluss auf die osteogene Differenzierung von dem Inhibitor abhängig. Eine Blockierung über Cytochalasin D störte nicht die Differenzierung, begründet darin, dass die Transkriptionsfaktoren aktiv waren. Eine Hemmung von ROCK über Y-

27632, eine spannungsabhängige Blockierung der Aktinpolymerisation, stoppte hingegen die Differenzierung vollständig. Erst die Kombination von Adhäsionsliganden und ROCK-Inhibitor griff positiv in die Differenzierung ein. Wird spannungsabhängig geblockt, hat Fibronectin einen schützenden Effekt: durch die weiterhin aufrecht erhaltende Zellelongation und Expression der Transkriptionsfaktoren fand die osteogene Differenzierung statt. Von allen getesteten Adhäsionsliganden spielte Fibronectin für ASCs die wichtigste Rolle.

Nachdem die Rolle der Adhäsionsliganden in Korrelation mit der Zellform untersucht worden war, sollte in der **Publikation 9** herausgefunden werden, über welche intrazellularen molekularen Signalwege die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Runx2, p-Runx2 und Osterix, damit einhergehend die Aktivierung – in Hinblick auf die Ergebnisse der **Publikation 7** selektive Aktivierung – der osteogenen Marker, abläuft. In der Literatur sind verschiedene Signalwege beschrieben worden.

Ein Weg hängt von den Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPK) ab, die zu den Seronin/Threonin spezifischen Kinasen gehören. Neben regulatorischen Funktionen in Proliferation und Überleben, greifen sie über eine Phosphorylierung an Runx2 und Osterix, damit deren Aktivierung, direkt in die osteogene Differenzierung ein und fördern die Stimulation der osteogenen Marker. Zuvor sind jedoch andere Kinasen erforderlich, die über die Phosphorylierung an MAPK selbst deren Aktivität induzieren (Davis 2002). Diese MAPK-Kinasen Kaskade ist auch von externen Faktoren abhängig. Wachstumsfaktoren stimulieren die MAPK extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK), Stress und Cytokine die MAPKs p38 und c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Suzuki et al. 2002). Darüber hinaus aktiviert die Bindung an die EZM MAPKs. Regulatorische Funktion innerhalb der MAPK Kaskade übernehmen die fokale Adhäsionskinase (FAK) und Ras. FAK, als Bestandteil des fokalen Adhäsionskomplexes, wird nach der Integrin-EZM-Bindung phosphoryliert, was die Adhäsion kennzeichnet, und kann so direkt ERK aktivieren (Salasznyk et al. 2007). Ras wird entweder vom fokalen Adhäsionskomplex nach der Zell-EZM-Bindung oder über Wachstumsfaktoren aktiviert. Voraussetzung ist die Bildung eines Komplexes bestehend aus Signalmolekülen mit einer Src homologen 2 Domäne, dem Adapter Grb2 und Son of Sevenless. Im Anschluss aktiviert Ras JNK und ERK (Vojtek et al. 1998).

Neben dem MAPK-Signalweg ist auch ein BMP-Smad Weg identifiziert worden. Der Knochenwachstumsfaktor BMP (bone morphogenic protein) bindet an den BMP-Rezeptor innerhalb der Zellmembran, woraufhin ein phosphorylierter Komplex aus

R-Smads (Smad 1, 5) und Co-Smads (Smad 4) gebildet wird, der in den Zellkern gelangt und als Kofaktor die osteogenen Transkriptionsfaktoren stimuliert (Wu et al. 2008). Dieser Signalweg steht mit dem MAPK-Signalweg in Wechselwirkung. Der Wachstumsfaktor BMP2 aktiviert direkt JNK, p38 und ERK (Zhao et al. 2012). ERK wiederum verbessert die Transkriptionsaktivität von Smad (Salaszyk et al. 2004).

Um Einblicke in diese Signalwege und Wechselwirkungen zu bekommen und bestimmen zu können, welche für die Expression der Transkriptionsfaktoren und osteogenen Marker bei humanen ASCs eine Rolle spielen, wurden in der **Publikation 9** selektiv Ras, FAK, ERK und JNK über spezifische Inhibitoren geblockt. Im Anschluss wurde überprüft, ob sich das Zellverhalten und die osteogene Differenzierung verändern. Außerdem sollte ein Zusammenhang zum BMP / Smad und ERK / p-ERK Signalweg überprüft werden.

Den Ergebnissen entsprechend, scheinen JNK und FAK die wichtigsten molekularen Signalgeber bei humanen ASCs zu sein, um die osteogene Differenzierung einzuleiten. Ihre Hemmung schaltete sämtliche osteogenen Marker aus. ERK spielte eine untergeordnete Rolle und scheint mehr für die Calciumproduktion als für die ALP Aktivität und Expression der Knochenproteine Osteocalcin und Osteopontin verantwortlich zu sein. Eine Blockierung von Ras hingegen wirkte sich nicht nachteilig auf die Differenzierung aus, auch wenn die Knochenproteine leicht vermindert vorlagen. Entweder ist es bei ASCs grundsätzlich nicht involviert oder die Blockierung induziert auf Grund des Wechselspiels mit JNK oder p38, was nicht gemessen wurde, als positive Rückkopplung die Differenzierung ein. Ras war vom ERK / p-ERK Signalweg unabhängig, während JNK und FAK damit wechselwirkten. Eine eindeutige Korrelation zum BMP2 / Smad-Signalweg war hier nicht zu belegen. Runx2 und Osterix sind an allen Signalwegen beteiligt. Wie in der **Publikation 8** konnte kein Zusammenhang zwischen erhöhter Zellelongation und verbesserter osteogenen Differenzierung gezogen werden. Jedoch war die Formation des fokalen Adhäsionskomplexes, damit die Adhäsion der Zellen, essentiell.

In der **Publikation 10** galt es, die Kenntnisse über die molekularen Signalwege der osteogenen Differenzierung von humanen ASCs aus **Publikation 8 und 9** auf die Laser-generierte Lotus-Struktur in Titan zu übertragen. Da die Strukturierung selektiv osteogene Marker stimulierte (**Publikation 7**), sollte herausgefunden werden, welche Signalwege in Abhängigkeit der Materialfunktionalisierung dafür verantwortlich waren. Es wurden die Signalwege über ERK, JNK und p38

klassifiziert, erneut über die Blockierung mit spezifischen Inhibitoren erreicht; nur durchgeführt an osteogenen ASCs, da Kontrollzellen nicht ohne Differenzierungszusätze im Medium differenzierten.

Die Zellen besiedelten vollständig die Struktur, zeigten eine lang ausgestreckte Zellform über die Spikes hinaus mit Anhaftungspunkten auf der Nano-Rauheit. Das Aktin-Cytoskelett war normal mit Stressfasern ausgebildet und wies in den Zellausläufern p-FAK Tyr<sup>397</sup> auf; ein Kennzeichen für die Ausblidung des fokalen Adhäsionskomplexes und gute Adhäsion auf dem Substrat. Alle Inhibitoren von ERK, p38 und JNK wirkten sich nicht nachteilig auf die Morphologie und Adhäsion aus. Die Strukturierung beeinflusste nicht die Proliferation, generell wurden aber höhere Zelldichte auf dem Wellplatten-Boden (Kontrolle) erzielt. Jedoch griffen die Inhibitoren in das Wachstumsverhalten ein: JNK sorgte für eine Reduktion; p38 für eine Erhöhung; ERK hatte keinen Einfluss auf beiden Titan-Proben. Bezogen auf die Stimulation der osteogenen Marker und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren traten Inhibitor- und Substrat-spezifische Unterschiede auf. Es wurde erneut wie in **Publikation 7** eine selektive Stimulation der osteogenen Marker auf der Lotus-Struktur nachgewiesen. Jedoch war in dieser Arbeit die ALP Aktivität erhöht und Calciumproduktion vergleichbar. Dies ist auf die verschiedenen Messverfahren zurückzuführen (Schindeler et al. 2006).

ERK und JNK aus der MAPK Kaskade konnten erneut wie in **Publikation 9** als wichtige Signalgeber der osteogenen Differenzierung von humanen ASCs bestimmt werden. In Abhängigkeit beider Transkriptionsfaktoren Osterix und Runx2 bzw. p-Runx2 leiteten sie die Aktivierung der osteogenen Marker ALP Aktivität und Calciumproduktion ein. Wurden ERK und JNK geblockt, fand keine osteogene Differenzierung statt. Gleichzeitig wurden auch die ERK / p-ERK- und BMP2 / p-Smad Signalwege reduziert. All diese Effekte traten unabhängig von dem Material auf. Deswegen sind JNK und ERK nicht für die selektive Markerstimulation (**Publikation 7**) verantwortlich.

Auf dem Kontrollsubstart wurde deutlich, dass p38 eine regulatorische Rolle in der osteogenen Differenzierung von humanen ASCs spielen muss. Wurde p38 geblockt, konnte trotzdem Calcium produziert werden und auch die ALP Aktivität war nachweisbar. Wie konnte trotz der p38 Blockierung die osteogenen Marker stimuliert werden? Ist p38 gehemmt, wurden auch BMP2 und p-Smad reduziert. Allerdings sorgte die p38 Hemmung für eine Aktivierung des ERK / p-ERK-Signalweges. Diese positive Rückkopplung und Korrelation muß dafür verantwortlich sein, dass trotzdem

die osteogene Differenzierung möglich war. Nur bei aktiviertem ERK findet die Differenzierung statt. Diese muss primär über Runx2 und p-Runx2 ablaufen, weil beide höher als Osterix vorlagen.

Das Ausmaß der osteogenen Marker nach der p38 Hemmung war aber vom Material abhängig. Die regulatorische Funktion von p38 muss somit von äußeren Einflüssen wie dem Substrat bestimmt werden. Die Calciumproduktion war auf der Kontrolle und unstrukturiertem Titan höher, auf der Lotus-Struktur gleich; die ALP Aktivität auf auf letzterem reduziert, auf unstrukturiertem Titan erhöht und auf der Kontrolle gleich – alles bezogen auf die Ergebnisse der osteogenen Zellen ohne Inhibitor-Zugabe. Es traten auch Substrat-spezifische Unterschiede bei dem Ausmaß der Transkriptionsfaktoren auf, die überall exprimiert wurden. Wenn einer der untersuchten Signalwege für die Lotus-Struktur bedingte selektive Stimulation der osteogenen Marker verantwortlich ist, so ist es vermutlich p38. Ein Beleg dafür ist in der ALP Aktivität zu finden: diese war auf der Lotus-Topographie selektiv nach Blockierung mit dem p38-Inhibitor reduziert worden. Die Calciumproduktion wurde in der Form nicht beeinträchtigt.

Wenn p38 mit dieser regulatorischen Funktion über die Verknüpfung zum Erk / p-ERK-Signalweg als Rückkopplungsmechanismus die selektive Stimulation der osteogenen Marker beeinflussen kann, stellt sich die Frage, welche äußeren Einflüsse diese Sensitivität bestimmen. In Hinblick auf **Publikation 7** muss es in der besseren Adhäsion der ASCs auf den Lotus-Strukturen begründet sein. Die erhöhte Adhäsionskraft scheint sich positiv auszuwirken. Inwiefern diese, einhergehend mit einer unterschiedlichen Lokalisation der Integrin-Untereinheiten auf der Topographie, im Zusammenhang mit dem p38 Signalweg steht, bedarf noch weiterer Grundlagenforschung.

### 7.5 Ausblick „Selektive Zellkontrolle“

Eine Erklärung der selektiven Zellkontrolle durch Biomaterialien ist nach den **Publikation 1 bis 3** nun möglich. Sie hängt von der Adhäsion der Zellen ab: der Adsorption der EZM Adhäsionsliganden auf dem Material, der Integrin-Bindung und Formation des fokalen Adhäsionskomplexes. Dass Zellen spezifisch Adhäsionsliganden bevorzugen, fließt in diese Erklärung mit ein. Das Finden dieser zellspezifischen Ligandenrangfolge hat für die biomedizinische Anwendung einen klaren Vorteil: sie erleichtert die Suche nach neuen bioaktiven Materialien. Da nun

bekannt ist, welcher Ligand für welchen Zelltyp die wichtigste Rolle spielt, kann dieser Ligand bei der Materialfunktionalisierung berücksichtigt werden. Zum einen dahingehend, die Materialien direkt mit diesem Liganden zu beschichten, ihn oder seine spezifische Bindungssequenz an die Materialoberfläche anzubinden. Zum anderen dahingehend, den Materialeinfluss auf die Adsorption dieses spezifischen Liganden untersuchen zu können. Eine Steuerung seiner Adsorption steuert indirekt das Zellverhalten. Beide Strategien tragen zur Verbesserung der Bioaktivität von Materialien bei.

Für weitere Analysen der selektiven Zellkontrolle muss künftig die Rolle der Integrine und Signalweiterleitung untersucht werden – dies an unterschiedlichen Zelltypen, in Abhängigkeit der EZM und Biomaterialien.

Abschließend zu den Untersuchungen der osteogenen Differenzierung von humanen ASCs kann gesagt werden, dass es sich um ideales Zellmodell zum Nachweis der Knochenregeneration handelt. Neue Kenntnisse der molekularen osteogenen Signalwege, auch der Zusammenhang zur Zellform und Rolle von Adhäsionsliganden konnte erbracht werden, was für die Stammzellforschung und Nutzbarmachung der Zellen für viele Anwendungen von Vorteil ist.

Mit diesem Zellmodell konnte die verbesserte Bioaktivität der Lotus-Strukturen in Titan belegt werden. Eine Erklärung der selektiven Stimulation der osteogenen Marker ist auf die Sensitivität der beteiligten MAPK-Signalwege und Adhäsion zurückzuführen. Die Tatsache, dass die Lotus-Strukturen *in vitro* gleichzeitig eine Hemmung von Fibroblasten verursachten, eine selektive Zellkontrolle ermöglichen, macht diese Topographie für orthopädische und dentale Anwendungen interessant. Die Bioaktivität muss aber *in vivo* noch bestätigt werden.

Auch wenn die Strukturierung die Adhäsion der ASCs stark verbesserte, reichte dies allein nicht aus, um die osteogene Differenzierung einzuleiten. Die Zellen waren immer auf lösliche Differenzierungsfaktoren angewiesen. Dies muss bei einer *in vivo* Anwendung nicht nachteilig sein. Dort sind alle nötigen Differenzierungsfaktoren im umliegenden Gewebe vorhanden, so dass auch wie *in vitro* eine verbesserte Differenzierung wahrscheinlich ist. Trotzdem ist es wünschenswert, wenn ein bioaktives Material von vornherein osteogen-stimulierend wirken könnte. In der Zukunft soll deswegen versucht werden, die Lotus-Topographie weiter zu funktionalisieren. Hierfür bieten sich Kombinationen mit der biologischen Funktionalisierung an, indem spezifisch RGD-Bindungssequenzen oder der wichtige Knochenwachstumsfaktor BMP2 auf die Lotus-Struktur aufgebracht werden sollen.

Nach der Etablierung der chemischen Protokolle muss die biologische Wirksamkeit getestet werden.

Für die neuronale biomedizinische Anwendung ist die Laser-basierte Herstellung von Oberflächenstrukturierung aus technischer und zellbiologischer Sicht vielversprechend. Für die Strukturierung von Cochlea Implantaten scheint eine Struktur-Kombination am effektivsten: Querrillen im Mikrometer Bereich auf Silikon als Einwuchsbarriere für Fibroblasten und Nano-Rauheiten auf den Platin-Elektroden, zum einen zur Verhinderung der Fibroblasten-Adhäsion und zum anderen zur Stimulation der neuronalen Regeneration bei gleichzeitiger Optimierung der elektrochemischen Eigenschaften auf Grund der vergrößerten Elektrodenoberfläche. *In vivo* Studien belegten, dass dabei die Impedanzwerte reduziert wurden. Dieses Ergebnis ist auf eine Verminderung der Implantat-Besiedelung mit Fibroblasten zurückzuführen. Der Isolation und folgende Funktionsverlust des Implantats durch die Ausbildung von Fibrose kann entgegengewirkt werden. Mit der Oberflächenstrukturierung ist eine selektive Zellkontrolle möglich, die die Bioaktivität von implantierbaren Elektroden verbessern kann.

## 8 Scaffold-basierte Zellmodelle

### 8.1.1 Eigene Vorarbeiten und Zielsetzung

In den eigenen Vorarbeiten zur Habilitation sind mit der 2PP-Technik unterschiedliche Scaffolds generiert worden (Schlie et al. 2007, Ovsianikov et al. 2007). Verwendet wurden die MaterialienOrmocomp, ein anorganisches-organisches Hybridmaterial, und SU-8, ein Epoxid-basierter Polymer. Die Polymerisation wurde über Zugabe des Photoinitiators Irgacure 369 realisiert. Ein Vergleich an unterschiedlichen Zelllinien belegte, dass beide Materialien biokompatibel sind. Dies wurde über Proliferationsmessungen, Untersuchungen zur DNA-Schädigung und interzellulären Kommunikation über Gap Junctions erbracht. Für die 3D Zellkultur wurde ein Bioreaktor entwickelt, der zur Zellbesiedelung eingesetzt wurde und ein Anhaften der Zellen auf dem Petrischalenboden verhinderte. Es zeigte sich, dass eine 3D Besiedelung möglich war.

Aufbauend auf den bisher durchgeführten Versuchen sollte die 2PP-Technik weiter nutzbar gemacht werden. Es sollten weitere Materialien getestet werden, die medizinisch relevant sind. Die Materialien müssen sowohl für die 2PP-basierte Scaffold Erstellung als auch für die Zellen kompatibel sein. Nach technischen Herausforderungen, Scaffolds aus beliebigen Materialien herstellen zu können, die zellverträglich sind, folgte die Studie des Zellverhaltens in 3D, die notwendig ist, um die Gewebeformation auf den Scaffolds beurteilen zu können. Im Detail wurden folgende Aufgaben für die Habilitation formuliert:

1. Welchen Einfluss haben Photoinitiatoren auf die Zellen, die für die Scaffold-Erstellung mittels 2PP-Technik essentiell sind?
2. Die 2PP-Technik dauert unter Umständen lange und ist nicht für jedes Material anwendbar. Gibt es eine Alternative, Scaffolds herstellen zu können?
3. Lassen sich neben den gezeigten synthetischen Materialien Scaffolds auch aus natürlichen Materialien herstellen?
4. Wie verhalten sich die Zellen auf den Scaffolds in 3D? Kontrolliert die Scaffold-Porösität das Zellverhalten, wie ist der Einfluss auf die osteogene Differenzierung? Sind humane Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark oder aus dem Fettgewebe das ideale Zellmodell?

## 8.2 Einfluss von Photoinitiatoren

In der **Publikation 11** wurde der ISO 10993 Norm entsprechend anhand von direkten Tests und Eluattests die Biokompatibilität von Polyethylenglycol diacrylat (PEGda) mit zwei verschiedenen Molekulargewichten verglichen. Der besondere Fokus lag auf dem Einfluss der Photoinitiatoren Irgacure 369, 2959 und Michler's Keton in unterschiedlichen Konzentrationen. Als Zellmodell wurden L929 Fibroblasten verwendet, deren Vitalität in Kontakt mit dem Material bzw. Eluat bestimmt wurde. Außerdem wurde eine Alterung der Proben induziert, indem diese für sechs Tage bei 37°C inkubierten. Auch von diesen gealterten Proben wurden Eluate für die Zelltests hergestellt. Der direkte Materialtest erfolgte an frischen bzw. gealterten PEGda Pellets.

Vor den Zelltests wurde technische Studien durchgeführt. Die Auswahl des Molekulargewichts ließ eine Variation der mechanischen und Schwellungseigenschaften zu, was generell für zelluläre Studien interessant ist. Die Wasseraufnahme verändert die Scaffold-Struktur, gleichzeitig verbessert es die Porosität, weil mehr Flüssigkeitstransport im Scaffold stattfindet. Dies könnte bei der Inkorporation von Wachstumsfaktoren oder Antibiotika ausgenutzt werden. Bei den verglichenen Laser-Prozessparametern hatte die Laserenergie einen Einfluss auf die produzierten Liniendimensionen nach dem 2PP-Technik Vorgang. Von dem Material ließen sich definierte Scaffolds herstellen.

Die Zellvitalität war von den verschiedenen Photoinitiatoren, deren eingesetzter Konzentration und der Materialalterung abhängig. Das Molekulargewicht von PEGda hatte keinen Einfluss. Je höher die Konzentration der Photoinitiatoren war, um so toxischer waren die Proben. Da auch die Eluate die Zellvitalität reduzierten, macht dies deutlich, dass die Proben toxische Substanzen freigesetzt hatten. Allgemein reduzierte die Materialalterung die Toxizität. Von den getesteten Photoinitiatoren war Michler's Keton am problematischsten, der einzig wasserlösliche Photoinitiator Irgacure 2959 schnitt am besten ab.

Die Toxizität von den Photoinitiatoren und weiteren wie Irgacure 184 oder 651 wurde auch in anderen Studien demonstriert (Williams et al. 2005). Da für die 2PP-Technik die Nutzung von Photoinitiatoren essentiell ist (Ovsianikov et al. 2012; Koroleva et al. 2013), stellt dies die biomedizinische Anwendung der Scaffolds vor ein Problem: es müssen Photoinitiatoren verwendet werden, noch dazu in einer Konzentration, die die Scaffold-Erstellung erlaubt, diese können aber toxisch sein. Wie in **Publikation 11** gezeigt, kann die Materialalterung die Biokompatibilität

toxischer Proben verbessern. Die Inkubation im Medium kann aber die erzeugte Scaffold-Struktur beeinflussen, sofern er aus einem Material mit hohen Schwellungseigenschaften generiert worden war. An diese Problematik schließt sich die **Publikation 12** an. Es sollten alternative, natürliche Photoinitiatoren gefunden werden, die gut für die 2PP-Bearbeitung und nicht cytotoxisch sind.

Erneut wurde das Material PEGda verwendet. Im Vergleich zu den Photoinitiatoren Irgacure 2959 und 369 wurde die Anwendbarkeit von Riboflavin, Vitamin B<sub>2</sub>, getestet. Es wurde gezeigt, dass es über Photon-Absorption anregbar ist (Lu et al. 1999). Damit Riboflavin eine Polymerisation einleiten kann, bedarf es den Coinitiator Triethanolamin (TEOHA), der Riboflavin oxidiert und die Radikalbildung unterstützt (Orellana et al. 1999). Riboflavin-gesteuerte Vernetzungen von 2-Hydroxyethylmethacrylat oder Kollagen sind in der Literatur beschrieben (Orellana et al. 1999; Wollensak et al. 2004).

Die Aufnahme von Absorptionsspektren sollte bestimmen, bei welcher Laser-Wellenlänge die Polymerisation stattfindet. Dies war bei Wellenlängen nahe dem Infraroten Bereich möglich. Für die Scaffold-Erstellung sind die eingestellten Laser-Prozessparameter entscheidend. Die beste Auflösung wird erzielt, wenn die Laserintensität über dem Polymerisationsschwellenwert liegt. Höhere Intensitäten beschleunigen zwar die Prozesszeit, jedoch kann dann auch ein sogenannter Burning-Effekt auftreten, bei dem Gasblasen entstehen, die das Material degradieren. Schon geringe Laserenergien von 90 mW reichten aus, um PEGda mit Irgacure 369 zu strukturieren. Beim Photoinitiator 2959 waren 60 bis 100 mW ausreichend. Die Strukturierung mit Riboflavin hingegen benötigte mindestens 244 mW, also eine sehr hohe Energie, die in einer langsamen Prozesszeit resultiert. Nichtsdestotrotz ließen sich definierte Scaffolds bestehend aus Zylindern mit unterschiedlichen Durchmessern aus PEGda mit Riboflavin herstellen, was anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen belegt werden konnte.

Im Gegensatz zu beiden Irgacure 369 bzw. 2959 polymerisierten PEGda Proben waren die mittels Riboflavin erzeugten Pellets nicht toxisch. Weder im direkten Materialtest noch die generierten Eluate. Dies wurde über Proliferationsmessungen, spezifische Färbungen und Untersuchungen der DNA Schädigungen an GM-7373 Endothelzellen belegt. Riboflavin ist somit biokompatibel. Auch eine Zellbesiedelung der Scaffolds war möglich. Auf den Scaffolds waren die Zellen vital und zeigten ihre normale Morphologie. Detailfotos zeigten, dass die Zellen an dem inneren und äußeren Zylinder einen Monolayer mit Zell-Zell-Kontakten ausbildeten.

Auch wenn Riboflavin auf Grund der hohen Biokompatibilität eine gute Alternative zu den herkömmlichen Photoinitiatoren darstellt, eine für die Scaffold-Stabilität eventuell kritische Materialalterung nicht erforderlich ist, so ist es aus technischer Sicht nicht ideal. Zwar ist die 2PP-Generierung von Scaffolds mit definierten und reproduzierbaren Abmessungen möglich, aber die Prozesszeiten dauern lange und sind nicht effizient.

### 8.3 Mikroreplikationstechnik

Im folgenden sollte versucht werden, eine andere Technik zur Herstellung von Scaffolds zu etablieren, die effizienter ist, die Produktion von Scaffolds in hohen Stückzahlen bei schnellen und damit kostengünstigeren Prozesszeiten zulässt. In der **Publikation 13** wurde die Anwendbarkeit der Mikroreplikationstechnik erprobt, die bereits zur Erzeugung von Oberflächentopographien in Form von Spikes in Silikon verwendet wurde (Fadeeva et al. 2009, Schlie et al. 2010 a).

Die Masterstrukturen wurden mittels Laser hergestellt; Oberflächentopographien in Form von Spikes im Mikrometer Bereich über Laser-Ablation bzw. Scaffolds über die 2PP-Technik. Für ersteres wurde Silizium, für letzteresOrmocomp mit Irgacure 369 verwendet. Die Mikroreplikation basiert auf der Abformung der Struktur, wobei zunächst negative Replikas erzeugt werden. Eine erneute Abformung der negativen Replikas führt zur Ausgangsstruktur zurück. Für die Abformungen bieten sich Polydimethylsulfoxid (PDMS) oder Silikon Elastomer Med-4234 an. Sie penetrieren gut in die Ausgangsstruktur und sind im Anschluss leicht ablösbar (Xia et al. 1998).

Die Spikes wurden mit PDMS und Silikon Elastomer abgeformt. Negative Replikas aus PDMS wurden im zweiten Schritt mit Ormocore repliziert. Nach der Abformung mit PDMS wurden die Ausgangs-Scaffolds aus Ormocomp in Ormocore und Polymilchsäure (PLA) überführt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten keine strukturellen Unterschiede zwischen den Masterstrukturen, den negativen Replikas und final abgeformten Proben. Dies wurde über ein Ausmessen der Strukturgrößen bestätigt. Die mikroreplizierten Proben ließen sich gut mit den Zellen besiedeln. Fibroblasten waren auch in der Lage, in die Poren der Scaffolds einzuwachsen und adhärirten an der lateralen Wand.

Die Mikroreplikation stellt somit eine schnelle und effiziente Alternative zur Generierung von Oberflächentopographien und 3D Scaffolds dar. Sie ist auch von Vorteil, wenn eine direkte Laserbearbeitung wie bei Silikon nicht möglich ist, weil

dabei die Biokompatibilität reduziert wird (Schlie et al. 2010 a). Eine Laser-generierte Masterstruktur kann mehr als 100 Mal für die Replikation verwendet werden.

In der **Publikation 14** wurden replizierte Scaffolds aus PLA hinsichtlich ihrer neuronalen Anwendung getestet. Bei Erkrankungen des peripheren Nervensystems können Scaffolds insofern dienlich sein, weil sie die Regeneration von Neuronen auch über lange Strecken fördern. Andernfalls bleiben Schäden in der Sensorik und Motorfunktion zurück. PLA scheint sich dabei positiv auf den Wiederauswuchs von Axonen auszuwirken. Aus diesen Gründen werden Scaffolds aus PLA ein hohes Anwendungspotential zugesprochen. (Schmidt et al. 2003; Bell et al. 2011)

Als Masterstruktur wurde ein Scaffold aus PLA mit Irgacure 369 mittels 2PP-Technik generiert. Abgeformt in PDMS wurden daraus für die *in vitro* Tests Scaffolds aus PLA hergestellt. Die Herstellungsvariante über Mikroreplikation wurde gewählt, um das Vorhandensein des toxischen Photoinitiators ausschließen zu können. Die Polymerisation von PLA erfolgte über Methacrylierung, was über die Kernresonanzspektroskopie bestätigt wurde. Es wurde ein Scaffold mit einer Gesamthöhe von 300 µm, einem Durchmesser von 100 µm und Porenwanddicken von 20 µm erzeugt.

Materialpellets aus PLA waren weder für SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen noch primäre Schwann-Zellen aus der Ratte toxisch. Dies wurde über Proliferationsmessungen, Untersuchungen zur DNA Schädigung, morphologischen Studien und neuronal-spezifischen Immunofärbungen belegt. Die PLA Scaffolds ließen sich gut mit den Schwann-Zellen besiedeln. Sie adhärten auch an den lateralen Wänden.

### 8.4 Scaffold-Herstellung aus natürlichen Materialien

Nachdem in den **Publikationen 11 bis 14** synthetische Materialien zur Scaffold-Erstellung genutzt wurden, erzeugt mittels 2PP-Technik oder Mikroreplikation, sollten in den folgenden Arbeiten Scaffolds aus natürlichen Materialien hergestellt werden.

Zunächst wurde in der **Publikation 15** mit Hilfe der Mikroreplikation Scaffolds produziert. Von Interesse war die Nutzung von Fibrin, das bei der Gerinnung über die Vernetzung von Fibrinogen und Thrombin entsteht (Franz et al. 2011). Fibrin

kann direkt vom Patienten gewonnen werden und ist nicht toxisch. Gerade bei der Generierung von Blutgefäßen, dem Vascular Tissue Engineering, wird häufig Fibrin verwendet (Ahmann et al. 2010). Implantate lassen sich leicht damit beschichten und fördern die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Dies ist auch in *in vivo* Versuchen im Schaf gezeigt worden (Koch S. et al. 2010). Jedoch benötigen beide Zelltypen zum Einwachsen eine definierte poröse Umgebung, was die Nutzung von Scaffolds erfordert. Bislang war es aber nicht möglich, aus Fibrin direkt definierte 3D Scaffolds herstellen zu können.

Werden HPMECs (human pulmonary endothelial microvascular cells) in Fibrin-Gelen eingekapselt, wirkte sich das nicht nachteilig auf das Zellverhalten aus. Sie zeigten auch über sieben Tage ihre normale Morphologie. 2PP-Scaffolds als Masterstruktur wurden aus dem Material E-Shell hergestellt und in PDMS als negative Replikas abgeformt. Im Anschluss wurde Fibrinogen, danach Thrombin auf die PDMS-Replikas gegossen. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde der Fibrin-Scaffold abgezogen. Es wurde ein Scaffold mit einer Gesamtgröße von 4 mm erzeugt, der aus zwei übereinander gelagerten Porenschichten mit Wanddicken von 20 µm bestand. Die Besiedlung mit HPMECs war einheitlich, auch in die Poren hinein, die Zellen wiesen auch auf dem Scaffold ihre normale Morphologie auf. Somit ist eine weitere biomedizinische Anwendung von Fibrin in Form von Scaffolds möglich.

Doch es wurde sich im Rahmen der Habilitation auch zum Ziel gesetzt, direkt mit der 2PP-Technik Scaffolds aus natürlichen Materialien herstellen zu lassen. Von Interesse waren natürlich vorkommende Hydrogele auf Polysaccharid- oder Proteinbasis, die durch ihre hydrophile und vernetzte Struktur hoch permeabel für Sauerstoff, Nährstoffe und Metaboliten sind. Auf Grund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften sind sie für Anwendungen im Weichgewebe wie Nervengewebe, für Haut oder Blutgefäße ideal. Da diese Hydrogele aber nicht photosensitiv sind, können sie normal nicht über die 2PP-Technik polymerisiert werden. Dafür waren vorab chemische Modifikationen notwendig, um sie mit photosensitiven funktionellen Gruppen ausstatten zu können. Die Steuerung der Degradierbarkeit und Einstellung der mechanischen Eigenschaften solcher Materialien sollte durch die kovalente Verlinkung mit synthetischen biokompatiblen Polymeren in Form von Hybridmaterialien erreicht werden (Bencherif et al. 2008). Zudem war es von Interesse, die natürlichen Materialien zusätzlich mit Wachstumsfaktoren zu funktionalisieren (Biondi et al. 2008).

In der **Publikation 16** wurde Hyaluronsäure, in der **Publikation 17** Chitosan als natürliche Materialien ausgewählt. Hyaluronsäure gehört als Hauptbestandteil zur Grundsubstanz der EZM (Alberts et al. 2011). Chitosan, ein Polysaccharid aus Krebsen, ahmt die Glycosaminoglycan-reiche EZM von Knorpel nach (Yang 2011). Beide Materialien sind schon *in vitro* Versuchen getestet worden, die die Biokompatibilität bestätigten. Jedoch ließ sich keine definierte und reproduzierbare Porosität der Materialien einstellen, was das Einwachsen der Zellen verhinderte. Die durchgeführte chemische Konvertierung der Materialien in photosensitive Spezies beruhte auf Methacrylierungsreaktionen, was über die Zugabe von Glycidylmethacrylat erfolgte (Bencherif et al. 2008). Chitosan wurde zuvor in N-Succinyl-Chitosan überführt, um Carboxyl-Gruppen für die folgende Vernetzung einbringen zu können (Yamaguchi et al. 1981). Der Grad der Acrylierung wurde variabel eingestellt. Außerdem erfolgte eine Copolymerisation mit dem synthetischen Polymer PEG. Durch eine Variation der PEG-Kettenlänge und unterschiedliche Mischungsverhältnisse zwischen Hyaluronsäure bzw. Chitosan mit PEG wurden Hybridmaterialien erzeugt, deren mechanischen Eigenschaften und Degradierbarkeit eingestellt und gesteuert werden sollten (Nicodemus et al. 2008). Für eine Verbesserung der Bioaktivität wurde Hyaluronsäure mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und Chitosan mit dem vascular endothelial Wachstumsfaktor (VEGF) funktionalisiert. Zum Nachweis der chemischen Modifizierungsschritte und Bestimmung des Vernetzungsgrades kamen spektroskopische Methoden wie Kernresonanzspektroskopie oder Infrarot-Spektroskopie zur Anwendung. Rheologische Messungen und Quantifizierung der Schwellungseigenschaften und Degradierbarkeit vervollständigten die chemischen Analysen. In beiden Publikationen wurde der Photoinitiator Irgacure 2959 für die 2PP-Technik basierte Polymerisation verwendet. Vor den *in vitro* Testungen wurden die Materialien gealtert, um die Biokompatibilität nicht negativ zu beeinträchtigen (**Publikation 11**).

In beiden Fällen war die chemische Modifikation erfolgreich. Sowohl die Succinyl-Gruppen als auch eingefügte Methacrylate waren nachweisbar. Auch die Modifikation mit den Wachstumsfaktoren ließ sich bestätigen. Bei Hyaluronsäure wurde ein Vernetzungsgrad von 60 %, bei Chitosan von bis zu 72 % erzielt. Bei den reinen Materialien hing die Steifigkeit allein von der Hydrogelkonzentration ab. Die Steifigkeit wurde durch Zugabe von PEG erhöht. Außerdem reduzierte der PEG-Anteil in den Hybridmaterialien die Schwellungseigenschaften. Stärker vernetzte

Hyaluronsäure konnte weniger Wasser aufnehmen. Aus beiden Materialien ließen sich reproduzierbar Scaffolds mit definierten Porengrößen herstellen. Allerdings war die Prozesszeit bei den Hybridmaterialien kürzer.

In der **Publikation 16** wurde die Biokompatibilität mit Hilfe von humanen Fibroblasten und MG-63 Osteoblasten untersucht. LDH-Tests zur Bestimmung der Zellvitalität und Proliferationsmessungen erfolgten bei direkten Materialtests an Materialpellets und bei erzeugten Eluat. In der **Publikation 17** wurde auf ein Eluattest verzichtet; stattdessen diente die Trypan-Blau Messung als zusätzlicher Nachweis zur Bestimmung der Zellvitalität. Hier wurden die Versuche mit HPMECs durchgeführt. Modifizierte Hyaluronsäure bzw. Chitosan und aus beiden mit PEG erzeugten Hybridmaterialien waren biokompatibel. Unter serumfreien Bedingungen sollte die biologische Wirksamkeit der angebondenen Wachstumsfaktoren EGF bzw. VEGF mittels Proliferationsmessung untersucht werden. In beiden Publikationen wurde gezeigt, dass die Wachstumsfaktoren das Proliferationsverhalten der Zellen erhöhten. Chitosan-PEG Scaffolds ließen sich mit den Zellen besiedeln. Die Zellen waren vital und zeigten ihre normale Morphologie. Über einen Zeitraum von sieben Tagen war auch eine Proliferation auf den Scaffolds zu beobachten.

Hyaluronsäure und Chitosan konnten somit beide über chemische Modifikationen als neue natürliche und biokompatible 2PP-Scaffold-Materialien etabliert werden. Die Erzeugung von Hybridmaterialien lässt die mechanischen Eigenschaften und die Degradierbarkeit variabel einstellen. Eine biologischen Funktionalisierung mit Wachstumsfaktoren wie EGF oder VEGF ist möglich, was die Bioaktivität nachweislich verbesserte. Hiermit eröffnen sich zahlreiche biomedizinische Anwendungsfelder, wo die Materialien und ihre Scaffolds eingesetzt werden könnten.

### **8.5 Der Einfluss der Scaffold-Porösität auf die osteogene Differenzierung**

Die vorangegangenen Arbeiten waren aus zellbiologischer Sicht im wesentlichen auf Biokompatibilitätstests und einen Nachweis der Besiedlungseffizienz auf den Scaffolds beschränkt. Ersteres ist die Grundvoraussetzung, neue Materialien überhaupt biomedizinisch einsetzen zu können und wird der Einfachheit halber an Materialpellets untersucht. Letzteres erfolgte rein qualitativ hinsichtlich der

Zelllokalisierung und Morphologie. Für eine Analyse des Zellverhaltens in 3D sind jedoch weitere, vor allen Dingen quantitative Studien notwendig. Ein wichtiges Kriterium von Scaffolds ist das Design der Poren, die für das Einwachsen der Zellen oder Blutgefäße und damit biologische Funktionalität der Scaffolds eine entscheidende Bedeutung spielen. Das Einwachsen der Zellen konnte bereits gezeigt werden (**Publikation 13** und **15**). Doch steuert der Durchmesser der Poren, die Porosität des Scaffolds, auch das Zellverhalten?

Hierbei stellte sich in der **Publikation 18** die Frage, ob Porendurchmesser von 150, 200 und 250  $\mu\text{m}$  die osteogene Differenzierung beeinflussen. Die Scaffolds wurden aus dem Hybridmaterial Zirkonium-Silizium hergestellt, dessen Biokompatibilität bereits bekannt ist (Skoog et al. 2014). Es wird vermutet, dass der weiche organische Anteil die Zellproliferation fördert, während der anorganische Anteil für die mechanische Stabilität und Härte des 3D Scaffolds sorgt (Psycharakis et al. 2011). Die Anwendungen von Zirkonium liegen als Keramik im dentalen und orthopädischen Bereich (Park et al. 2010).

Da für die Scaffold-Herstellung mittels 2PP-Technik der cytotoxische Photoinitiator Michler's Keton verwendet wurde, wurden die Proben vor ihrem Einsatz in der Zellkultur gealtert (**Publikation 11**). Die Materialalterung beeinflusste die Elastizität und Härte der Materialien, die im Anschluss weniger elastisch waren. Eine Zunahme der Härte ist darauf zurückzuführen, dass organische nicht-vernetzte Komponenten entfernt wurden (Skarmoutsou et al. 2013). In dem Fall um so mehr, wenn mit Ethanol die Materialalterung erfolgte. Vortests belegten, dass die Biokompatibilität der gealterten Proben in Ordnung war. Allerdings verlangsamte die Materialalterung, je nach Inkubation in Wasser oder Ethanol, die Calciumproduktion. Dies muss mit der Veränderung der mechanischen Eigenschaften der Materialien zusammenhängen, was einen entscheidenden Einfluss auf Stammzell-Differenzierungen hat (Engler et al. 2007; Kelly et al. 2010). Anhand der eingestellten Porendurchmesser wurde für jede Probe die Porosität ermittelt. Es beschreibt das Verhältnis des Volumens der inneren Zylinder bezogen auf das Volumen der Gesamtfläche. Daraus ergab sich eine Porosität von 54 % bei 150  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser, von 60 % bei 200  $\mu\text{m}$  und 65 % bei 250  $\mu\text{m}$ .

Die Differenzierung wurde an humanen Mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC) und Fettgewebe (ASC) im Vergleich untersucht. Es sollte das Zellmodell mit dem höchsten osteogenen Potential gefunden werden. Sämtliche Proben waren für die Zellen biokompatibel. Die Besiedlungseffizienz war von den

Porengrößen unabhängig. MSCs wiesen eine deutlich geringere Überlebensrate auf. 20 % der ausgesäten MSCs überlebten die Besiedelung nicht, während alle ASCs vital blieben. Nach 21 Tagen in Kultur waren nur noch 50 % der ausgesäten MSCs auf den Scaffolds zu bestimmen. Hinsichtlich der Besiedelung war das Zellmodell ASC deutlich besser geeignet. An Tag 21 war der gesamte Scaffold mit ihnen vollständig besiedelt. Die Besiedelung und das Einwachsen in die Poren war bereits vier Stunden nach der Zellaussaat nachweisbar.

ASCs proliferierten auf den Scaffolds in osteogenem Medium besser als unter Kontrollbedingungen, während keine Unterschiede bei MSCs auftraten. Die Porendurchmesser hatten keinen eindeutigen Effekt auf das Wachstumsverhalten beider Zelltypen. ASCs zeigten ihr ALP Aktivitäts-Maximum bereits an Tag 3, MSCs an Tag 7. ASCs zeigten allgemein eine höhere ALP Aktivität als MSCs; dies war auch bei Osteocalcin zu beobachten. Nur die Calciumwerte waren zwischen ASCs und MSCs vergleichbar. Die Calciumproduktion war bei ASCs bereits ab Tag 3 nachweisbar.

Der Poreneinfluss war auf Osteocalcin schwer erkennbar, jedoch waren die ALP-Aktivität und Calciumproduktion davon abhängig. Unter osteogenen Mediumbedingungen zeigten ASCs den höchsten Anteil beider osteogenen Marker bei 150 µm Porendurchmesser; MSCs ihre ALP Aktivität bei 200 µm und Calciumproduktion ebenfalls bei 150 µm. EDX Analysen von Calcium und Phosphat bestätigten die Mineralisation. Unabhängig des Zellmodells wurde deutlich, dass die Porosität die osteogene Differenzierung beeinflusst. Bei den Porendurchmessern von 150 µm bzw. bei der geringsten Porosität war die Differenzierung am besten. Dies geht einher mit einer dichteren Besiedlung und stärkeren Zell-Zell-Kontakten, gezeigt an elektronenmikroskopischen Aufnahmen, was für die osteogene Differenzierung generell förderlich ist (Tang et al. 2010). Ob auch im Körper die Osteogenese und Osseinduktion von der Porosität der Scaffolds abhängt, soll in künftigen *in vivo* Testungen ermittelt werden.

Hinsichtlich der Besiedelungseffizienz und dem Ausbilden der osteogenen Marker, die zum Teil doppelt so hoch waren wie bei MSCs, stellten ASCs das bessere Zellmodell dar. Die Tatsache, dass humane ASCs nach routinemäßigen Fettabsaugungen in hoher Zelldichte isoliert werden können, macht sie für ein autologes Knochen Tissue Engineering sehr interessant (Asatrian et al. 2015).

Die 3D Kultivierung von ASCs auf den Scaffolds hatte das Eintreten der osteogenen Marker ALP Aktivität und Calciumproduktion deutlich beschleunigt, da diese sonst

erst an Tag 14 bzw. Tag 21 auftraten (**Publikation 7 bis 10**). Auch unter Kontrollbedingungen konnten die ASCs spontan osteogen differenzieren, gezeigt an erhöhter ALP Aktivität, insbesondere auf 200 µm Porendurchmessern, und Calciumproduktion. Bei der EDX Analyse traten nur kleinere Calciumpartikel auf, was bedeuten kann, dass die Mineralisation zeitlich verzögert eintrat. Zuvor konnte in den eigenen Arbeiten nie gezeigt werden, dass ASCs unter Kontrollbedingungen differenzierten. Diese Ergebnisse bestätigen, dass sich 3D Zellmodelle klar von den herkömmlichen *in vitro* Tests unterscheiden (Cukierman et al. 2002). Nicht nur für Tissue Engineering, sondern allgemein in Zellbiologie und bei der Stammzellforschung sind somit 3D Zellmodelle förderlich, um tiefere Einblicke in die zellulären Vorgänge und Differenzierungsmechanismen zu erlangen. Welche Ursachen für die 2D versus 3D Unterschiede verantwortlich sind, bedarf weiterer zellbiologischer Grundlagenforschung.

## **8.6 Ausblick „Scaffold-basiertes Tissue Engineering“**

Mit Hilfe von Scaffolds lassen sich 3D Zellmodelle herstellen. Bei dem aktuellen Stand der Forschung wird aber deutlich, dass eine breite biomedizinische Nutzung noch nicht realisierbar ist. Selbst detaillierte Zellstudien über die molekularen Mechanismen und Gewebeformationen in 3D fehlen. Bislang beschränkte sich die Arbeit auf Besiedlungseffizienzen und Funktionsnachweise einzelner Zelltypen; die multizelluläre Zusammensetzung wurde nicht umgesetzt. Diese Defizite lassen sich insofern begründen, weil vorab erst noch technische Hürden überwunden werden müssen. Sie beziehen sich auf die geeignete Materialauswahl und Technik zur Scaffold-Erstellung. Die Materialien, bevorzugt natürliche Materialien, müssen nicht nur biokompatibel sein, sondern auch für die 3D Scaffold-Generierung anwendbar sein. Hier fallen viele Materialien heraus, die technisch von Vorteil wären. Es sind zum Teil aufwendige chemische Modifikationen notwendig, die erst etabliert werden müssen. Viele Techniken sind nicht befriedigend, weil sie keine hohe Strukturauflösung und reproduzierbare Herstellung definierter Scaffolds zulassen. Probleme hinsichtlich der Degradation und mechanischen Instabilität der Scaffolds und Materialien müssen vermieden werden. Danach hängt es von weiterer Forschung ab, welche Scaffold-Eigenschaften, welches Material, welche bioaktive Funktionalisierung in Kombination, welche Mechanik, welche Porösität, welches Design und Zellbesiedelung ja oder nein, wenn ja, mit welchem Zellmodell, den größten *in vitro* bzw. *in vivo* Erfolg versprechen.

## 9 Scaffold-freie Zellmodelle

### 9.1.1 Eigene Vorarbeiten und Zielsetzung

In den eigenen Vorarbeiten zum Laser-basierten BioPrinting konnte gezeigt werden, dass sich Zellen aus der Haut wie Fibroblasten und Keratinozyten und humane Mesenchymale Stammzellen beliebig in 2D drucken lassen (Koch et al. 2010). Im Gegensatz zu den Düsen-basierten Verfahren traten keine Zellschädigungen auf. Dies wurde anhand der metabolischen Aktivität, des Proliferationsverhaltens, über Apoptose-Nachweise und Untersuchungen zur DNA Schädigung sowie über Stammzellmarker belegt. Die hohe Zellvitalität nach dem Druck ist auf den Jet-Transfer des Geltropfens zurückzuführen (Unger et al. 2011). Das Laser-BioPrinting ist auch dazu geeignet, unterschiedliche Zelltypen direkt in einen Scaffold zu drucken (Ovsianikov et al. 2010).

Um *ex vivo* Gewebekonstrukte herstellen zu können, scheint das Laser-basierte BioPrinting vielversprechend zu sein. Doch im Rahmen der Habilitation waren weitere Studien notwendig, um die Anwendungen hinsichtlich der Positionierung und Zell- bzw. Gewebemodelle optimieren zu können. Im Detail wurden folgende Aufgaben und Fragen für die Habilitation formuliert:

1. Wie lässt sich die kontrollierte Positionierung der Zellen erweitern? Ist eine multizelluläre Anordnung in 3D möglich? Kann man diese Technik auch dazu nutzen, gezielt Zell-Zell- und Zell-Umgebungsstudien in 3D durchführen zu können?
2. Beeinflusst das Laser-BioPrinting das Differenzierungspotential von Stammzellen, den Zellen mit dem höchsten Regenerationspotential?
3. Lässt sich funktionales Gewebe drucken? Dies sollte am Beispiel Haut erfolgen.

### 9.2 Laser-basiertes BioPrinting von Stammzellen in 3D

In den **Publikation 19 und 20** war es das Ziel, das Laser-BioPrinting für den dreidimensionalen Zelldruck zu etablieren. Der anschließende Nachweis der Zellfunktionalität fand in 2D und 3D statt. In der 2D-Methode wurden die Zellen direkt nach dem Druck vom Zielobjektträger abgespült und neu ausgesät. Es sollte so getestet werden, ob der Druck an sich die Zellen verändert. In 2D war in beiden

Publikationen die Proliferation der übertragenden Zellen im Anschluss normal, es trat auch kein Hitzschockprotein 70 auf. Auch für diese Stammzellen war der Druckvorgang nicht schädlich. In der 3D-Methode wurden definierte 3D Gitter-Strukturen aus den Zellen erzeugt und weiter in Kultur gehalten. Eine Studie des Zellverhaltens sollte zeigen, ob sich Zellen nach dem Druck in 3D anders verhalten. Dafür wurden Stammzellen zum Vergleich in Kontrollmedium und spezifischem Differenzierungsmedium kultiviert.

In der **Publikation 19** wurden MSCs aus dem Knochenmark von Schweinen gedruckt und ihr Differenzierungspotential in Richtung osteogen und chondrogen überprüft. Primäre Chondrozyten aus dem Schwein dienten als Referenzzellen. Osteogene Differenzierung wurde über die ALP Aktivität und Osteocalcin Expression nachgewiesen, chondrogene Differenzierung über Kollagen Typ II, Aggrecan und Glykosaminoglykan.

Eine 2D Parameterstudie belegte, dass sich die Anzahl der übertragenden Zellen genau einstellen lässt. Zellen werden nicht einzeln, sondern in Geltropfen übertragen. Indem man die Viskosität der Gele und eingestellte Laserpulsenergie variiert, lassen sich unterschiedliche Tröpfchengrößen drucken. Durch eine zusätzliche Variation der Zelldichte innerhalb der Zellsuspension kann man so reproduzierbar kontrollieren, wie viele Zellen und wohin gedruckt werden. Das kann für die Gewebeformation und Herstellung von Stammzellnischen mittels Laser-BioPrinting vorteilhaft ausgenutzt werden. Bezogen auf die Stammzelldifferenzierung stellt die Zelldichte einen kritischen Parameter dar (Solchaga et al. 2006; Takagi et al. 2007).

Fotos belegten, dass sich die Zellen in 2D und 3D drucken ließen. Auch nach 25 Tagen Kulturdauer unter osteogenen Bedingungen waren die Zellen im 3D Muster vital. Der Druckvorgang an sich und auch die 3D Zellanordnung hatte keinen negativen Einfluss auf die osteogenen und chondrogenen Marker. Es gab keine Unterschiede zwischen den primären Chondrozyten und chondrogen differenzierten MSCs. Auch in 3D gedruckte MSCs, kultiviert mit Kontrollmedium, wurde leicht Aggrecan, nicht aber Kollagen Typ II gebildet. Dieses Ergebnis reichte aber nicht aus, es mit einer spontanen chondrogenen Differenzierung in 3D gleichzusetzen.

In der **Publikation 20** wurde das adipogene Differenzierungspotential von humanen MSCs aus dem Fettgewebe, den ASCs, untersucht. Als adipogene Marker dienten Lipoprotein Lipase, Adipozyten Fettsäure-Bindungsproteine und Peroxisome Proliferations-aktivierter Rezeptor. Außerdem wurde mittels OilRed die Fettvakuolen

angefärbt und quantifiziert. Der Druck an sich und auch die Zellanordnung in 3D wirkten sich nicht nachteilig auf die adipogene Differenzierung aus. Auch der Druck von adipogen vordifferenzierten ASCs war möglich, ohne dass die Zellen im Anschluss dedifferenzierten.

### 9.3 Zell-Zell- und Zell-Umgebungsstudien

Für die geplante Anwendung zu Zell-Zell- und Zell-Umgebungsstudien wurden die Zellen ebenfalls in 3D gedruckt. Ziel war es, einen Versuchsaufbau zu generieren, mit dem man kontrolliert und reproduzierbar diese Wechselwirkungen auch in 3D für zellbiologische Grundlagenforschung nutzen kann. Es baut auf die Kenntnisse auf, dass sich Zellen unter den klassischen Kulturbedingungen in 2D klar vom *in vivo* Zustand unterscheiden (Cukiermann et al. 2002).

In der **Publikation 21** wurden hierfür die Zellen auf ein Gel aus Hyaluronsäure, vermischt mit Fibrinogen, gedruckt und anschließend mit Thrombin beschichtet. Es kamen humane ASCs und humane ECFCs (endothelial colony-forming cells) zum Einsatz. Die Studie war dazu gedacht, die spontane Bildung von Blutgefäßen zwischen den Zellen in beliebig einstellbarer Umgebung untersuchen zu können. Es ist bekannt, dass diese Zellen die Neovaskularisation in Gewebekonstrukten fördern, jedoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen unklar (Merfeld-Clauss et al. 2010; Verseijden et al. 2010).

Die Überlebensrate beider Zelltypen war nach dem Druck außerordentlich hoch. Es traten keine Schädigungen der DNA auf. Die Zellen proliferierten normal. Demnach war der Zellübertrag nicht schädigend. Die Zellen wurden in Tröpfchen übertragen, dabei unterschiedliche Mischungsverhältnisse beider Zelltypen getestet. Mikroskopische Aufnahme belegten, dass auch dieser multizelluläre Zelltransfer in einem Schritt in 2D mit gleichbleibendem Mischungsverhältnis möglich ist. Für den Nachweis des multizellulären 3D Drucks wurde eine andere Variante erprobt. Hierfür wurden zunächst Tröpfchen von ASCs in einer Schicht übertragen. Die zweite Schicht setzte sich aus Tröpfchen mit ECFCs zusammen. Beide Arbeitsschritte lassen sich beliebig wiederholen und somit viele Schichten übereinander erzeugen, bei der bestimmt werden kann, in welcher Schicht sich welche Zellen und wie viele befinden. Da die Druckplanung und der Druckablauf Computer-basiert erfolgt, lassen sich die Zell-Tröpfchen in jeder Schicht beliebig, so auch versetzt zueinander, positionieren.

Für die geplante Untersuchung wurde ein sogenanntes Spot-Array gedruckt. In 2D wurden dafür spezifisch Tröpfchen der Zellen in festgelegtem Abstand zu einander übertragen. Im ersten Ansatz wurden nur ASCs, im zweiten nur ECFCs und dritten beide Zellen nebeneinander gedruckt und ohne den Wachstumsfaktor VEGF kultiviert. Eine Beurteilung des Zellverhaltens erfolgte lichtmikroskopisch zu verschiedenen Messzeitpunkten. Es zeigte sich, dass ASCs allein kultiviert bereits nach 3 Tagen anfangen zu migrieren; ECFCs hingegen veränderten nicht ihre Lokalisation und blieben in den Spots. Dies bestätigte, dass ECFCs für ihr Zellverhalten auf VEGF angewiesen sind (Akeson et al. 2010). Wurden beide Zelltypen nebeneinander unter VEGF-freien Bedingungen gedruckt, migrierten die ASCs ab Tag 3 gezielt in Richtung ECFCs. Da ECFCs nicht in Richtung ASCs migrierten, bedeutet, dass ASCs nicht VEGF freisetzen. Wurde ein Kontakt zwischen den Zelltypen aufgebaut, wurden auch die ECFCs aktiv. Ab Tag 7 entstanden aus beiden Zelltypen gemeinsam tubuläre Strukturen, die sich auch verzweigten. Es entstanden Vaskular-ähnliche Netzwerke. Vermutlich exprimieren ECFCs den platelet-derived Wachstumsfaktor, der die ASCs zur gezielten Migration stimulierte (Hellström et al. 1999). Ein Einfluss der verwendeten Gele auf die gezielte Migration kann in diesem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden (Wirz et al. 2011).

#### 9.4 Laser-basiertes BioPrinting von einem 3D Hautmodell

Die Haut als Gewebemodell zu nutzen und *in vitro* über Tissue Engineering herstellen zu wollen, hat ein breites Anwendungspotential. In erster Linie ist es dazu gedacht, Verbrennungspatienten helfen zu können und die Regeneration von Narbengewebe zu fördern (Michael et al. 2013). Neben der Grundlagenforschung über Wundheilungsvorgänge und Pigmentierung könnten sich an solchen Modellen auch die Einwirkungen von UV-Licht oder Schadstoffablagerungen und Medikamente austesten lassen.

In der einfachen Zusammensetzung muss ein Schichtsystem bestehend aus Keratinozyten und Fibroblasten generiert werden. In den eigenen Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass sich diese Zellen schädigungsfrei mittels Laser-BioPrinting drucken lassen (Koch et al. 2010). In der **Publikation 22** wurden beide Zelltypen mit dem Ziel gedruckt, ein funktionales *in vitro* 3D Hautmodell aufzubauen. Eine Analyse der Gewebeformation erfolgte zehn Tage nach dem Druck. Sowohl in

einem 3D Gitter als auch in einem 3D Schichtsystem konnten rot-markierte Fibroblasten und grün-markierte Keratinozyten gedruckt werden. Das Schichtsystem bestand aus sieben roten bzw. grünen Farbschichten, aus denen jede Schicht sich aus je vier Zellschichten zusammensetzte. Der gesamte multizelluläre Schichtaufbau war 2 mm hoch, dies auf einer gesamten Fläche von 10 x 10 mm. Für die folgende Analysen wurden 20 Schichten generiert, Keratinozyten oben und Fibroblasten unten.

Färbungen, die unspezifisch alle Zellen detektieren, zeigten den allgemeinen Schichtaufbau beider Zelltypen. In einer Fluoreszenzaufnahme befanden sich rote Fibroblasten unten und grüne Keratinozyten oben in dem Schichtsystem; über zellspezifische Färbungen wurde dies bestätigt. Der generierte Schichtaufbau blieb über die gesamte Kulturzeit stabil; die Zellen migrierten nicht aus ihren Schichten heraus.

Die Funktionalität des gedruckten Hautkonstrukts wurde anhand verschiedener Kriterien nachgewiesen. Zunächst wurde die proliferative Aktivität der Zellen untersucht. Diese kommt in der Haut nur bei Keratinozyten vor. Der Farbstoff Ki-67, der proliferativ aktive Zellen anfärbt, war nur in den oberen Schichten detektierbar – nur dort lagen Keratinozyten vor. Zwischen den beiden Schichten aus Keratinozyten und Fibroblasten ließ sich spezifisch Laminin nachweisen. Laminin muss demnach von den Zellen selbst innerhalb der 10 Tage Kulturdauer exprimiert worden sein und sich zwischen den Zelltypen angelagert haben. Dies kennzeichnet die Ausbildung der Basallamina, die für die Haut sehr charakteristisch ist (Alberts et al. 2011). Bei funktionalem Gewebe ist es ebenfalls entscheidend, dass Zell-Zell-Kontakte aufbaut und Zellen interzellulär miteinander kommunizieren können (Alberts et al. 2011). Bei dem Nachweis der Adhärenz Junctions trat Cadherin in sämtlichen Schichten zwischen allen Zellen auf. Dies bestätigte, dass Zell-Zell-Kontakte generiert worden waren. Das Ausmaß war in der Schicht der Keratinozyten deutlicher, was der natürlichen Haut entspricht (Niessen 2007). Connexin 43, ein Bestandteil von Gap Junctions, ließ sich ebenfalls bei allen Zellen in allen Schichten anfärben, was die Ausbildung dieser Zell-Zell-Kanäle andeutete. Für einen Funktionsnachweis der Gap Junction Zellkanäle wurde ein Farbstofftransfer durchgeführt (**Publikation 3**). Es zeigte sich, dass in dem gesamten 3D Konstrukt funktionale Zell-Zell-Kanäle vorlagen.

Ein Funktionsnachweis des mittels Laser-BioPrinting gedruckten Hautmodells konnte *in vitro* erbracht werden. Auch bei *in vivo* Studien an der Maus ließ sich das gedruckte Hautmodell implantieren, war stabil und funktional (Michael et al. 2013).

### 9.5 Ausblick „Scaffold-freies Tissue Engineering“

Das Laser-basierte BioPrinting stellt ein attraktives Verfahren dar, Zellen in einer Matrix in beliebiger Zelldichte und Position in 2D und 3D kontrolliert und reproduzierbar anordnen zu können. Auch multizelluläre Systeme können aufgebaut werden. Der Druck ist auf Grund des Jet-Transfers des düsenfreien Systems für die Zellen absolut schädigungsfrei. Stammzellen behalten ihr Differenzierungspotential bei. Spezifische Zell-Zell- und Zell-Umgebungsstudien können realisiert werden. Nicht nur die Herstellung von Stammzellnischen, sondern auch die Generierung von funktionalen *ex vivo* Gewebekonstrukten wie die Haut sind möglich. Demnach kann dieser Technik ein hohes Anwendungspotential zugesprochen werden und ist eine vielversprechende Alternative zum Scaffold-basierten Tissue Engineering.

In der Zukunft soll versucht werden, das Laser-basierte BioPrinting auch für andere Gewebemodelle nutzen zu können. Generell ist es wünschenswert, die multizellulären 3D Schichten noch weiter zu funktionalisieren. Neben der Einbindung weiterer Zelltypen, die für das Gewebe spezifisch sind, ist das große Ziel, direkt beim Gewebedruck Blutgefäße generieren zu können, dem Vascular Tissue Engineering gerecht zu werden. Hierfür hat das Laser BioPrinting auf Grund der Handhabung und des kontrollierten Zelltransfers gute Erfolgsaussichten.

## 10 Anhang

### 10.1 Literaturverzeichnis

- Abboud, M., Orentlicher, G. „Computer-aided manufacturing in medicine.” *Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics* 20: 19-36 (2012)
- Ahmann, K. A., Weinbaum, J. S., Johnson, S. L., Tranquillo, R. T. „Fibrin degradation enhances vascular smooth muscle cell proliferation and matrix deposition in fibrin-based tissue constructs fabricated *in vitro*.” *Tissue Engineering Part A* 16: 3261-3270 (2010)
- Akeson, A., Herman, A., Wiginton, D., Greenberg, J. „Endothelial cell activation in a VEGF-a gradient: relevance to cell fate decisions.” *Microvascular Research* 80 : 65-74 (2010)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Walter, P. „Molekularbiologie der Zelle.” *Wiley-VHC Verlag Weinheim*, 5. Auflage, ISBN-10: 3527323845 (2011)
- Amano, M., Nakayama, M., Kaibuchi, K. „Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity.” *Cytoskeleton* 67: 545-555 (2010)
- Anderson, J. M. „Biological responses to biomaterials.” *Annual Review of Materials Research* 31: 81-110 (2001)
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., Costerton, J. W. „Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanism and implications for biofilm-resistant materials.” *Biomaterials* 33: 5967-5982 (2012)
- Artigas, N., Urena, C., Rodriguez-Carballo, E., Rosa, J. L., Ventura, F. „Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-regulated interactions between osterix and Runx2 are critical for the transcriptional osteogenic program.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (39): 27105-27117 (2014)
- Asatrian, G., Pham, D., Hardy, W. R., James, A. W., Peault, B. „Stem cell technology for bone regeneration: current status and potential applications.” *Stem Cells Cloning* 8: 39-48 (2015)
- Barthes, J., Özcelik, H., Hindie, M., Ndreu-Halili, A., Hasan, A., Vrana, N. E. „Cell microenvironment engineering and monitoring for tissue engineering and regenerative medicine: the recent advances.” *BioMed Research International* Article ID 921905 (2014)
- Baujart-Lamotte, L., Noinville, S., Goubard, F., Marque, P., Pauthe, E. „Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 63: 129-137 (2008)
- Bell, J. H. A., Haycock, J. W. „Next generation nerve guides: materials, fabrication, growth factors, and cell delivery.” *Tissue Engineering Part B: Reviews* 18: 116-128 (2011)
- Bencherif, S. A., Srinivasan, A., Horkay, F., Hollinger, J. O., Matyjaszewski, K., Washburn, N. R. „Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties.” *Biomaterials* 29: 1739-1749 (2008)
- Biondi, M., Ungaro, F., Quaglia, F., Netti, P. A. „Controlled drug delivery in tissue engineering.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 229-242 (2008)
- Birmingham, E., Niebur, G. L., McHugh, P. E., Shaw, G., Barry, F. P., McNamara, L. M. „Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte

- and osteoblast cells in a simplified bone niche." *Journal of European Cells and Materials* 21: 407-429 (2012)
- Bjarnsholt, T. „The role of bacterial biofilms in chronic infections." *APMIS* 121: 1-58 (2013)
- Bongrand, P., Capo, C., Depiedes, R. „Physics of cell adhesion." *Progress in Surface Science* 12: 217-286 (1982)
- Burmolle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., Sorensen, S. „Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?" *Trends in Microbiology* 22 (2): 84-91 (2013)
- Cassie, A. B. D., Baxter, S. „Wettability of porous surfaces." *Transactions of the Faraday Society* 40: 546-551 (1944)
- Cavalcanti-Adam, E. A., Volberg, T., Micoulet, A., Kessler, H., Geiger, B., Spatz, J. P. „Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands." *Biophysical Journal* 92: 2964-2974 (2007)
- Chan, P. B., Leong, K. W. „Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations." *European Spine Journal* 17: 467-479 (2008)
- Chichkov, B., Momma, C., Nolte, S., Alvensleben, F., Tunnermann, A. „Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids." *Applied Physics* 63: 109-115 (1996)
- Chung, H. J., Park, T. G. „Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering." *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 249-262 (2007)
- Coen, M. C., Lehmann, R., Groening, P., Schlapbach, L. „Modification of the micro- and nanotopography of several polymers by plasma treatment." *Applied Surface Science* 207: 276-286 (2003)
- Cogan, S. F. „Neural stimulation and recording electrodes." *Annual Review of Biomedical Engineering* 10: 275-309 (2008)
- Craig, D., Gao, M., Schulten, K., Vogel, V. „Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force." *Structure* 12: 2049-2058 (2004)
- Cukiermann, E., Pankov, R., Yamada, K. M. „Cell interactions with three-dimensional matrices." *Current Opinion in Cell Biology* 14: 633-639 (2002)
- Dababneh, A. B., Ozbolat, I. T. „Bioprinting technology: a current state-of-the-art review." *Journal of Manufacturing Science and Engineering* 136: 0610161-1-0610161-11 (2014)
- Davis, R. J. „Signal transduction by the JNK group of MAP kinase." *Cell* 103 (2): 239-252 (2002)
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., Hancock, R. E. W. „Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies." *Current Opinion in Microbiology* 16 (5): 580-589 (2013)
- Dellatore, S. M., Garcia, A. S., Miller, W. M. „Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion." *Current Opinion in Biotechnology* 19 (5): 534-540 (2008)
- Dugas, V., Elaissari, A., Chevalier, Y. „Surface sensitization techniques and recognition receptors immobilization on biosensors and microarrays." Kapitel 2 in *Recognition Receptors in Biosensors Springer Verlag Berlin* ISBN 978-1-4419-0918-3 (2010)

- Dutta, R. C., Dutta, A. K. „Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications.” *Biotechnology Advances* 27: 334-339 (2009)
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., Discher, D. E. „Matrix elasticity directs stem cell lineage specification.” *Cell* 126 (4): 677-689 (2007)
- Fadeeva, E., Schlie, S., Koch, J., Chichkov, B. N., Vorobyev, A. Y., Guo, C. „Femtosecond laser-induced surface structures on platinum and their effects on surface wettability and fibroblast cell proliferation.” In *Contact Angle, Wettability and Adhesion* Vol. 6: 163-171. CRC Press ISBN 9789004169326 (2009 a)
- Fadeeva, E., Schlie, S., Koch, J., Ngezahayo, A., Chichkov, B. N. „The hydrophobic properties of femtosecond laser fabricated spike structures and their effects on cell proliferation.” *Physica Status Solidi A*: 1-4 (2009 b)
- Fadeeva, E., Schlie, S., Koch, J., Chichkov, B. N. „Selective cell control provided by surface structuring for orthopedic applications.” *Journal of Adhesion Science and Technology* 24: 2257-2270 (2010)
- Farsari, M., Chichkov, B. N. „Two-photon fabrication.” *Nature Photonics* 3: 450-452 (2009)
- Felding-Habermann, B., Cheresch, D. A. „Vitronectin and its receptors.” *Current Opinion in Cell Biology* 5: 864-868 (1993)
- Fereol, S., Fodil, R., Laurent, V. M., Balland, M., Louis, B., Pelle, G., Henon, S., Planus, E., Isabey, D. „Prestress and adhesion site dynamics control cell sensitivity to extracellular stiffness.” *Biophysical Journal* 96: 2009-2022 (2009)
- Flemming, R. C., Murphy, C. J., Abrams, G. A., Goodman, S. L., Nealey, P. F. „Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior.” *Biomaterials* 20: 573-588 (1999)
- Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D., Simon, J. C. „Immune responses to implants – a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials.” *Biomaterials* 32 (28): 6692-6709 (2011)
- Furth, M. E., Atala, A., Van Dyke, M. E. „Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine.” *Biomaterials* 28: 5068-5073 (2007)
- Gahmberg, C. G., Fagerholm, S. C., Nurmi, S. M., Chavakis, T., Machersan, S., Grönholm, M. „Regulation of integrin activity and signalling.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1790 (6): 431-444 (2009)
- Galbraith, C. G., Yamada, K. M., Sheetz, M. P. „The relationship between force and focal complex development.” *The Journal of Cell Biology* 159 (4): 695-705 (2002)
- Gallo, J., Holinka, M., Moucha, C. S. „Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants.” *International Journal of Molecular Science* 15: 13849-13880 (2014)
- Geetha, M., Singh, A. K., Asokamani, R., Gogia, A. K. „Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – a review”, *Progress in Material Science*, 54: 397-425 (2009)
- Giancotti, F. G., Ruoslathi, E. „Integrin signalling.” *Science* 285: 1028-1032 (1999)
- Hans, A., Syan, S., Crosio, C., Sassone-Corsi, P., Brahic, M., Gonzalez-Dunia, D. „Borna disease virus persistent infection activates mitogen-activated kinase and blocks neuronal differentiation of PC-12 cells.” *Journal of Biological Chemistry* 276: 7258-7265 (2001)

- Hellström, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A., Betsholtz, C. „Role of PDGF-B and PDGF- $\beta$  in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse.“ *Development* 126: 3047-3055 (1999)
- Hildebrandt, C., Büth, H., Thielecke, H. „A scaffold-free in vitro model for osteogenesis of human mesenchymal stem cells.“ *Tissue and Cell* 43 (2): 91-100 (2011)
- Holzappel, B. M., Reichert, J. C., Schantz, J.-T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Nöth, U., Jakob, F., Rudert, M., Groll, J., Hutmacher, D. W. „How smart to biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view.“ *Advances in Drug Delivery Reviews* 65: 581-603 (2013)
- Ikada, Y. „Tissue Engineering – Fundamentals and Applications.“ *Interface Science and Technology* 8: 1-469 (2006)
- Ingber, D. E. „Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology.“ *Journal of Cell Science* 116: 1157-1173 (2003)
- Kelly, D. J., Jacobs, C. R. „The role of mechanical signals regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells.“ *Birth Defects research C Embryo Today* 90 (1): 75-85 (2010)
- Keselowsky, B. G., Collard, D. M., Garcia, A. J. „Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion.“ *Journal of Biomedical Material Research A* 66: 247-259 (2003)
- Keshmirian, J., Bray, G., Carbonetto, S. „The extracellular matrix modulates the response of PC12 cells to nerve growth factor: cell aggregation versus neurite outgrowth on 3-dimensional laminin substrata.“ *Journal of Neurocytology* 18: 491-504 (1989)
- Knight, E., Przyborski, S. „Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro.“ *Journal of Anatomy* 227: 746-756 (2015)
- Koch, L., Kuhn, S., Sorg, H., Gruene, M., Schlie, S., Gaebel, R., Polchow, P., Reimers, K., Stoelting, S., Ma, N., Vogt, P. M., Steinhoff, G., Chichkov, B. N. „Laser printing of skin cells and human stem cells.“ *Tissue Engineering Part C: Methods* 16 (5): 847-854 (2010)
- Koch, S., Flanagan, T. C., Sachweh, J. S., Tanios, F., Schnoering, H., Deichmann, T., Ellä, V., Kellomäki, M., Gronloh, N., Gries, T., Tolba, R., Schmitz-Rode, T., Jockenhoevel, S. „Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation.“ *Biomaterials* 31 (17): 4731-4739 (2010)
- Koroleva, A., Kufelt, O., Schlie-Wolter, S., Hinze, U. Chichkov, B. „Laser microstructured biodegradable scaffolds.“ *Biomedical Engineering* 58 (5): 399-405 (2013)
- Kovacs, G. T. A. „Introduction to the theory, design, and modeling of thin-film microelectrodes for neural interfaces. Enabling technologies for cultured neural networks. *Academic Press, San Diego* 121-165 (1994)
- Lan, M. A., Gersbach, C. A., Micheal, K. E., Keselowsky, B. G., Garcia, A. J. „Myoblast proliferation and differentiation on fibronectin-coated self-assembled monolayers presenting different surface chemistries.“ *Biomaterials* 26: 4523-4531 (2005)
- Linke, I., Fadeeva, E., Scheper, V., Esser, K.-H., Koch, J., Chichkov, B. N., Lenarz, T., Paasche, G. „Nanostructuring of cochlear implant electrode contacts induces

- delayed impedance increase in vivo." *Physica Status Solidi A* 212 (6): 1210-1215 (2015)
- Lo, S. H. „Focal adhesions: what's new insight?" *Developmental Biology* 294: 280-291 (2006)
- Lu, C. Y., Wang, W. F., Lin, W. Z., Han, Z. H., Yao, S. D., Lin, N. Y. „Generation and photosensitization properties of the oxidized radical of riboflavin: a laser flash photolysis study." *Journal of Photochemistry and Photobiology B*52: 111-116 (1999)
- Merfeld-Clauss, S., Gollahalli, N., March, K. L., Traktuev, D. O. „Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation." *Tissue Engineering Part A* 16: 2953-2966 (2010)
- Michael, S., Sorg, H., Peck, C.-T., Koch, L., Deiwick, A., Chichkov, B., Vogt, P. M., Reimers, K. „Tissue engineered skin substitutes created by laser-assisted bioprinting form skin-like structures in the dorsal skin fold chamber mice." *PLOS One* e57741 (2013)
- Murphy, S. V., Atala, A. „3D bioprinting of tissues and organs." *Nature Biotechnology* 33 (8): 773-785 (2014)
- Müller, P., Langenbach, A., Kaminski, A., Rychly, J. „Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells." *PLOS One* 8 (7): e71283 (2013)
- Nair, L. S., Laurencin, C. T. „Biodegradable polymers as biomaterials." *Progress in Polymer Science* 32: 762-798 (2007)
- Nicodemus, G. D., Bryant, S. J. „Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 14: 149-165 (2008)
- Niessen, C. M. „Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." *Journal of Investigative Dermatology* 127: 2525-2532 (2007)
- Onuki, Y., Bhardway, U., Papadimitrakopoulus, F., Burgess, D. J. „A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response." *Journal of Diabetes Science and Technology* 2 (6): 1003-1015 (2008)
- Orellana, B., Rufs, A. M., Encinas, M. V., Previtali, C. M., Bertolotti, S. „The photoinitiation mechanism of vinyl polymerization by riboflavin/triethanolamine in aqueous medium." *Macromolecules* 32: 6570-6573 (1999)
- Ovsianikov, A., Passinger, S., Houbertz, R., Chichkov, B. N. „Three-dimensional material processing with femtosecond lasers." *Laser Ablation and its Application* 129 of the series *Springer Series in Optical Science Berlin* 121-157 (2006)
- Ovsianikov, A., Schlie, S., Ngezhahayo, A., Haverich, A., Chichkov, B. N. „Two-photon polymerization technique for microfabrication of CAD-designed 3D scaffolds from commercially available photosensitive materials." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 1: 443-449 (2007)
- Ovsianikov, A., Gruene, M., Pflaum, M., Koch, L., Maiorana, F., Wilhelmi, M., Haverich, A., Chichkov, B. „Laser printing of cells into 3D scaffolds." *Biofabrication* 2: 014104 (2010)
- Ovsianikov, A., Mironov, V., Stampfl, J., Liska, R. „Engineering 3D cell-culture matrices: multiphoton processing technologies for biological and tissue engineering applications." *Expert Review of Medical Devices* 9 (6): 613-633 (2012)

- Park, J., Lakes, R. S. „Biomaterials – An Introduction.” *Springer Science + Business Media, LLC New York*, 3. Auflage, ISBN 978-1-4419-2281-6 (2010)
- Psycharakis, S., Tosca, A., Melissinaki, V., Giakoumaki, A., Ranella, A. „Tailor-made three-dimensional hybrid scaffolds for cell cultures.” *Biomedical Materials* 6 (4): 045008 (2014)
- Reich, U. Mueller, P. P., Fadeeva, E., Chichkov, B. N., Stoever, T., Fabian, T., Lenarz, T., Reuter, G. „Differential fine-tuning of cochlear implant meaterial cell interactions by femtosecond laser microstructuring.” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 87B (1): 146-153 (2008)
- Reich, U., Fadeeva, E., Warnecke, A., Paasche, G., Mueller, P., Chichkov, B., Stoever, T., Lenarz, T., Reuter, G. „Directing neuronal cell growth on implant material surfaces by microstructuring.” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100B: 940-947 (2012)
- Reyes, C. D., Petrie, T. A., Burns, K. L., Schwartz, Z., Garica, A. J. „Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration.” *Biomaterials* 28: 3228-3235 (2007)
- Rink, L., Kruse, A., Haase, H. „Immunologie für Einsteiger.” *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, ISBN 978-3-8274-2439-6 (2012)
- Sailaja, G. S., Ramesh, P., Vellappally, S., Anil, S., Varma, H. K. „Biomimetic approaches with smart interfaces for bone regeneration.” *Journal of Biomedical Science* 23:77 (2016)
- Saiz, E., Zimmermann, E. A., Lee, J. S., Wegst, U. G. K., Tomsia, A. P. „Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering.” *Dental Materials* 29: 103-115 (2013)
- Salasznyk, R. M. Klees, R. F., Hughlock, M. K., Plopper, G. E. „ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin.” *Cell Communication and Adhesion* 11 (5-6): 137-153 (2004)
- Salasznyk, R. M., Klees, R. F., Williams, W. A., Boskey, A., Plopper, G. E. „Focal adhesion kinase signaling pathways regulate osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.” *Experimental Cell Research* 313 (1): 22-37 (2007)
- Schindeler, A., Little, D. G. „Ras-MAPK signaling in osteogenic differentiation: friend or foe?” *Journal of Bone Mineral Research* 21 (9): 1331-1338 (2006)
- Schlie, S., Ngezahayo, A., Ovsianikov, A., Fabian, T., Kolb, H.-A., Haferkamp, H., Chichkov, B. N. „Three-dimensional cell growth on structures fabricated from Ormocer<sup>®</sup> by two-photon polymerisation technique.” *Journal of Biomaterials Applications* Vol. 22, No. 3: 275-287 (2007)
- Schlie, S., Fadeeva, E., Koch, J., Ngezahayo, A., Chichkov, B. N. „Femtosecond laser fabricated spike structures for selective control of cellular behavior.” *Journal of Biomaterials Applications* 25 (3): 217-233 (2010 a)
- Schlie, S., Mazur, K., Bintig, W., Ngezahayo, A. „Cell cycle dependent regulation of gap junction coupling and apoptosis in GFSHR-17 granulosa cells.” *Journal of Biomedical Science and Engineering* 3: 884-891 (2010 b)
- Schlie, S., Fadeeva, E., Koroleva, A., Ovsianikov, A., Koch, J., Ngezahayo, A., Chichkov, B. N. „Laser-based nanoengineering of surface topographies for biomedical applications.” *Photonics and Nanostructures – Fundamentals and Applications* 9: 159-162 (2011)

- Schmidt, C. E., Leach, J. B. „Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration.“ *Annual Review of Biomedical Engineering* 5: 293-347 (2003)
- Skarmoutsou, A., Lolas, G., Charitidis, C. A., Chatzinikolaidou, M., Vamvakaki, M., Farsari, M. „Nanomechanical properties of hybrid coatings for bone tissue engineering.“ *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 25: 48-62 (2013)
- Skoog, S., Nguyen, A. K., Kumar, G., Zheng, J., Goering, P. L., Koroleva, A., Chichkov, B. N., Narayan, R. J. „Two-photon polymerization of 3-D zirconium oxide hybrid scaffolds for long-term stem cell growth.“ *Biointerphases* 9: 029014 (2014)
- Solchaga, L. A., Tognana, E., Penick, K., Baskaran, H., Goldberg, V. M., Caplan, A. I., Welter, J. F. „A rapid seeding technique for the assembly of large cell/scaffold composite constructs.“ *Tissue Engineering* 12 (7): 1851-1863 (2006)
- Stieglitz, T. „Electrode materials for recording and stimulation.“ In *Neuroprosthetics: theory and practice Series on Bioengineering and Biomedical Engineering* 2: 475-516 (2004)
- Suzuki, A., Guicheux, J., Palmer, G., Miura, Y., Oiso, Y., Bonjour, J. P., Caverzasio, J. „Evidence for the role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation.“ *Bone* 30 (1): 91-98 (2002)
- Takagi, M., Umetsu, Y., Fujiwara, M., Wakitani, S. „High inoculation cell density could accelerate the differentiation of human bone marrow cells to chondrocyte cells.“ *Journal of Bioscience and Bioengineering* 103: 98-100 (2007)
- Tang, J., Peng, R., Ding, J. „The regulation of stem cell differentiation by cell-cell contact on micropatterned material surfaces.“ *Biomaterials* 31: 2470-2476 (2010)
- Tasoglu, S., Demirci, U. „Bioprinting for stem cell research.“ *Trends in Biotechnology* 31 (1): 10-19 (2013)
- Truong, V., Webb, H., Fadeeva, E., Chichkov, B., Wu, A., Lamb, R., Wang, J., Crawford, R., Ivanova, E. „Air-directed attachment of coccooid bacteria to the surface of superhydrophobic lotus-like titanium.“ *Biofouling* 28 (6): 539-550 (2012)
- Tzu, J., Marinkovich, M. P. „Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins“, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40: 199-214 (2008)
- Unger, C., Gruene, M., Koch, L., Koch, J., Chichkov, B. N. „Time-resolved imaging of hydrogel printing via laser-induced forward transfer.“ *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 103: 271-277 (2011)
- Verseijden, F., Posthumus-van Sluijjs, S. J., Pavljasevic, P., Hofer, S. O. P., van Osch, G. J. V. M., Farrell, E. „Adult human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells support the formation of prevascular-like structures from endothelial cells.“ *Tissue Engineering Part A* 16: 101-114 (2010)
- Visser, R., Arrabal, P. M., Santos-Ruiz, L., Becerra, J., Cifuentes, M. „Basic fibroblast growth factor enhances the osteogenic differentiation induced by bone morphogenic protein-6 *in vitro* and *in vivo*.“ *Cytokine* 58: 27-33 (2012)
- Vojtek, A. B., Der, C. J. „Increasing complexity of the ras signaling pathway.“ *Journal of Biological Chemistry* 273 (32): 19925-19928 (1998)
- Williams, C. G., Malik, A. N., Kim, T. K., Manson, P. N., Elisseeff, J. H. „Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation.“ *Biomaterials* 26: 1211-1218 (2005)

- Wirz, S., Dietrich, M., Flanagan, T. C., Bokermann, G., Wagner, W., Schmitz-Rode, T., Jockenhoevel, S. „Influence of PDGF-AB on tissue development in autologous platelet-rich plasma gels.“ *Tissue Engineering Part A* 17: 1891-1899 (2011)
- Wobus, A.M., Hucho, F., van den Daele, W., Köchy, K., Reich, J., Rheinberger, H.-J., Müller-Röber, B., Sperling, K., Boysen, M., Kölsch, M. „Stammzellforschung und Zelltherapie – Stand des Wissens und der Rahmenbedingungen in Deutschland, Supplement zum Gentechnologiebericht“. *Elsevier GmbH München*, 1. Auflage, ISBN-13: 978-3-8274-1790-9 (2006)
- Wollensak, G., Wilsch, M., Spoerl, E., Seiler, T. „Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA.“ *Cornea* 23: 503-507 (2004)
- Wu, C. J., Lu, H. K. „Smad signal pathway in BMP2 induced osteogenesis – a mini review.“ *Journal of Dental Science* 3 (1): 13-21 (2008)
- Xia, Y., Whitesides, G. M. „Soft lithography.“ *Annual Review of Materials Science* 28: 153-184 (1998)
- Yamaguchi, R., Arai, Y., Itho, T., Hirano, S. „Preparation of partially N-succinylated chitosans and their cross-linked gels.“ *Carbohydrate Research* 88:172-175 (1981)
- Yang, T. L. „Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organs.“ *International Journal of Molecular Sciences* 12: 1936-1963 (2011)
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., Tesei, A. „3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained.“ *Scientific Reports* 6: DOI: 10.1038/srep19103 (2016)
- Zeltz, C., Gullberg, D. „The integrin-collagen connection – a glue for tissue repair?“ *Journal of Cell Science* 129: 653-664 (2016)
- Zhao, Y., Song, T., Wang, W., Wang, J., He, J., Wu, N., Tang, M., He, B., Luo, J. „P38 and ERK 1/2 MAPKs act in opposition to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells.“ *PLOS One* 7 (8): e43383 (2012)

## 10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele für Implantatversagen: (A) Materialbruch; (B) Lockerung; (C) Korrosion; (D) Infektion; (E) Peri-Implantitis; (F) Fibrose als Folge der Abstoßungsreaktion.....	14
Abbildung 2: Strategien der Materialfunktionalisierung .....	19
Abbildung 3: Scaffold-basiertes Tissue Engineering .....	22
Abbildung 4: Scaffold-freies Tissue Engineering: Druckverfahren.....	25
Abbildung 5: Reihenfolge der Zelladhäsionsmechanismen .....	30

## Danksagung

Für die Finanzierung meiner Stelle danke ich Prof. Dr. Boris Chichkov vom Laser Zentrum Hannover e. V. / Institut für Quantenoptik der Leibniz Universität Hannover und dem Gleichstellungsbüro der Leibniz Universität Hannover.

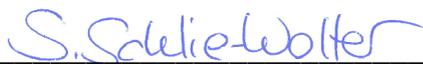
Ich danke Prof. Dr. Peter Behrens vom Institut für Anorganische Chemie, Prof. Dr. Boris Chichkov, Marc Müller vom Institut für Mehrphasenprozesse, Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo vom Institut für Biophysik, Prof. Dr. Thomas Scheper und Dr. Fank Stahl vom Institut für Technische Chemie, dass ich mit ihrer Hilfe Lehrerfahrungen sammeln konnte.

Besonderer Dank gilt Dr. Elena Fadeeva, Dr. Martin Grüne, Dr. Lothar Koch, Anastasia Koroleva Ph. D., Dr. Olga Kufelt, Alexander Nguyen und Dr. Alexandr Ovsianikov vom Laser Zentrum Hannover e.V. für die Herstellung der Materialien bzw. das Laser-basierte BioPrinting. Vielen Dank an Andrea Deiwick vom Laser Zentrum Hannover e.V. für die Unterstützung in der Zellkultur und an Katrin Pfennig und Natalie Koberstein vom Institut für Quantenoptik für die Organisation der Verwaltungsaufgaben.

## Erklärung

Ich versichere, die angefertigte Habilitationsschrift sowie die darin enthaltenen wissenschaftlichen Publikationen ohne andere als die darin angegebenen Hilfen oder Hilfsmittel verfasst zu haben. Alle wörtlich oder sinngemäß den Arbeiten anderer entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass keine anderen Habilitationsverfahren vorliegen.



---

Dr. Sabrina Schlie-Wolter

Im Dezember 2016