

# **Entwicklung von Verfahren zur Erzeugung anisotroper Mikrostrukturen und VEGF-Gradienten auf Collagen Typ I-Scaffolds für Zellkulturanwendungen**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem

**Bereich Mathematik und Naturwissenschaften der  
Technischen Universität Dresden**

von

**Diplom-Chemieingenieur (FH) Steffen Berger**  
geboren am 02.01.1985 in Lauchhammer

Eingereicht am 30.03.2021

Verteidigt am 15.07.2021

Die Dissertation wurde in der Zeit von November 2010 bis März 2021 im Fachgebiet  
Naturstoffchemie der Hochschule Lausitz (FH) / BTU Cottbus-Senftenberg angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Katrin Salchert

Prof. Dr. rer. nat. Carsten Werner

# Danksagung

Diese Dissertation wurde im Fachgebiet Naturstoffchemie der Hochschule Lausitz (FH), später Brandenburgische Technische Universität Cottbus-Senftenberg, unter der Leitung von PROF. DR. KATRIN SALCHERT angefertigt.

Mein großer Dank geht an PROF. DR. SALCHERT für die Möglichkeit, dieses sehr interessante und interdisziplinäre Thema bearbeiten zu dürfen. Als meine persönliche Mentorin möchte ich ihr für die vielen fachlichen Diskussionen und Denkanstöße, das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit, die motivierenden Gespräche und besonders das freundschaftliche Arbeitsklima danken.

Ebenso möchte ich PROF. DR. CARSTEN WERNER vom Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden für die Bereitschaft danken, die Betreuung dieses kooperativen Promotionsverfahrens vonseiten der Technischen Universität Dresden zu übernehmen. Außerdem möchte ich ihm für den Zugang zum REM des IPF und seine hilfreichen Hinweise während der Vorbereitung des Promotionsverfahrens danken.

Ohne die Unterstützung der vielen internen und externen Kollegen wäre dieses Arbeit überhaupt gar nicht möglich gewesen. Jeder von ihnen ist ein Experte auf seinem Gebiet und ich hatte die Ehre, aus diesem Know-How-Pool zu schöpfen.

Danke an die internen Kollegen: JENNY SCHOLKA für die Unterweisung in den Zellkulturmethoden und die ständige Unterstützung bei den Zellexperimenten, PROF. JÖRG ACKER und TIM SIEBER für die Unterstützung bei den optischen Profilometer-Messungen, PROF. BERNHARD GLÜCK und SABINE SCHICKETANZ für die Unterstützung bei den REM-Messungen, STEFFEN WICHMANN und LUTZ WILK für die Hilfe bei der Anfertigung verschiedenster Apparaturen, PROF. ERHARDT STEIN und JAVOR TAKEV für die elektrotechnische Unterstützung bei der Anfertigung der Immersionsapparatur und des Kraftmessstands sowie PROF. RALF STOHWASSER, DR. STEFAN RÖDIGER, MELANIE GRUNER und HANES MEYER für die Unterstützung bei der Durchführung des VEGF-ELISA. Ein spezieller Dank geht an SUSANNE NIELAND, GLENN GRÖBE und besonders PETER ALLERTZ, bei denen das Unterstützungsspektrum so komplex und umfangreich war, dass der Platz für eine Aufzählung hier nicht reichen würde.

Danke an die externen Kollegen: DR. ILKA KNÜTTER von Generic Assays für die Bereitstellung des Blutplasmas, DR. RALF HELBIG und JULIANE DRICHEL vom Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden für die Einführung in die REM-Messungen und in die Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnur sowie PROF. DR. MARIO BIRKHOLOZ vom Leibniz-Institut für innovative Mikroelektronik Frankfurt (Oder) für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung von Mikrostrukturen auf Si-Wafern.

Ein besonderes Dankeschön für die geleistete Unterstützung auch an *meine* Hiwis, Projekt- und Ba-

---

chelorstudenten: JAN KIEBIST, ANDREAS BERNDT, ISABELL KÜHNEL, ANKE HAUSWALD, DANIEL FISCHBACH, SÖREN KOSCHNICKE, MARIANN HOYER, GRIT SELLENK, CHRISTIN DITTMER, RONNY GENIESER, ELISABETH PÖTSCHKE, HENRY LAGATZ, MAIK JUGENDHEIMER, MARKUS DIENER und OLAF KAMENZ.

PROF. KLAUS-PETER STAHMANN und PROF. MATTHIAS SUCKOW möchte ich für ihre *bohrende* Art danken, endlich zur Fertigstellung dieser Dissertation zu kommen. Obwohl es Tage gab, an denen es wirklich genervt hat, verstehe ich jetzt im Nachhinein endlich den Sinn...

Zu guter Letzt möchte ich einen lieben Dank an meine Familie für ihre Geduld aussprechen. Ihr habt mich auf diesem langen Weg begleitet und zur (schnelleren) Fertigstellung der Arbeit motiviert. Durch Euer Verständnis und Eure Überzeugung, alle Schwierigkeiten bewältigen zu können, habt Ihr mir sehr geholfen.

# Kurzfassung

Die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff in artifiziellen, 3D Scaffolds für das Tissue Engineering ist Grundvoraussetzung für die Viabilität darin kultivierter Zellen. Die Kombination aus definierter Architektur und biomimetischer Zusammensetzung ist dabei entscheidend, sodass neben dem Stofftransport auch die Adhäsion, Proliferation, Migration und Morphologie von Zellen gesteuert werden können. Die Verwendung von Komponenten der nativen Extrazellulären Matrix, wie Collagen Typ I (COL I), als Scaffold-Material wird dafür als optimal angesehen. Jedoch stellt die Gestaltung der Architektur und Bereitstellung instruktiver Elemente zur Steuerung der Zellverhaltens bei COL I-basierten Scaffolds, aufgrund der mechanischen und biochemischen Eigenschaften des COL I, besondere Ansprüche an die Bearbeitungsverfahren. Ziel dieser Arbeit war es daher, Verfahren zur Ausstattung von modularisierbaren, COL I-basierten Membranen mit einer instruktiven biochemischen Zusammensetzung, Mikroarchitekturen als Basis für ein initiales vaskuläres System und Gradienten des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) zu entwickeln. Diese Scaffolds sollten anschließend hinsichtlich der Beeinflussung des Wachstums, der Orientierung und der gerichteten Migration von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) charakterisiert werden.

COL I-Scaffolds konnten durch Plastic Compression in Membranform hergestellt und mit Fibronectin (FN) und Hyaluronsäure (HA, mit hohem Molekulargewicht) ausgestattet werden. Die Inkorporation von FN erhöhte die HUVEC-Proliferation, während die Proliferationsrate bei der verwendeten HA konstant blieb. Anisotrope Mikrostrukturen als Basis für ein vaskuläres System und zur HUVEC-Orientierung wurden durch einen 3-stufigen Prozess auf den COL I-Membranen erzeugt. Dabei wurde die Mikrostrukturübertragung durch mikrostrukturierte Polystyren-Stempel in einem Druckumformprozess realisiert. Die erhaltenen Mikrogräben mit Breiten von 10-40  $\mu\text{m}$  beeinflussten die Orientierung der HUVEC deutlich. Für die Erzeugung von VEGF-Gradienten zur Steuerung der gerichteten Migration von HUVEC wurde ein Immersionsverfahren mit Hilfe der Modellproteine Bovines Serumalbumin und Hyaluronidase entwickelt. Dieses ermöglichte die Erzeugung eines linearen, graduellen Konzentrationsverlaufs der Modellproteine auf der Membranoberfläche. Der entwickelte Prozess konnte auf VEGF mit einem minimalen Gradientenprofil von 3,8-11,8  $\text{pg}/\text{mm}^2$  nach Immersion in 100  $\text{ng}/\text{mL}$  VEGF-Lösung übertragen werden. Erste Versuche zur Induktion der HUVEC-Migration zeigten, dass ein erfolgreiches Gradientenprofil jedoch noch gefunden werden muss.

Die erzeugten COL I-Membranen bilden eine gute Ausgangsposition für die Bereitstellung modularer, biomimetischer Tissue-Engineering-Scaffolds, mit initialer Vaskularisierung und zellinstruktiven Elementen. Außerdem besitzen sie das Potential, durch eine Vielzahl von Bio-Engineering-Methoden modifiziert und biochemisch den Anforderungen an das zelluläre Mikromilieu ausgestattet zu werden.

---

The supply of nutrients and oxygen in artificial, three-dimensional scaffolds for tissue engineering is a basic prerequisite for the viability of cells cultivated therein. The combination of defined architecture and biomimetic composition are crucial in this context, so that besides the metabolic transport, the adhesion, proliferation, migration and morphology of cells can also be controlled. The use of native extracellular matrix components, such as collagen type I (COL I), as scaffold material is considered optimal for this purpose. However, designing the architecture and providing instructive elements to control cell behavior in COL I-based scaffolds poses special challenges to processing methods due to the mechanical and biochemical properties of COL I. Therefore, the aim of this work was to develop basic procedures to equip modularizable COL I-based membranes with instructive biochemical composition, microarchitectures as initial vascular system, and vascular endothelial growth factor (VEGF) gradients and to characterize the obtained scaffolds with respect to influencing human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) growth, orientation, and migration.

It was shown that COL I scaffolds can be prepared by Plastic Compression in membrane form and equipped with fibronectin (FN) and hyaluronic acid (HA, with high molecular weight). Incorporation of FN increased HUVEC proliferation, whereas the proliferation rate remained constant with the HA used. Anisotropic microstructures as a basis for a vascular system and for HUVEC orientation were generated by a 3-step process on the COL I membranes. In this process, the microstructure transfer was realized by microstructured polystyrene stamps in a pressure forming process. The obtained microtrenches with widths of 10-40  $\mu\text{m}$  significantly affected the orientation of HUVEC. For the generation of VEGF gradients to control the directional migration of HUVEC, an immersion technique was developed using the model proteins bovine serum albumin and hyaluronidase. This allowed the generation of a linear, gradual concentration gradient of the model proteins on the membrane surface. The developed process could be applied to VEGF with a minimum gradient profile of 3.8-11.8  $\text{pg}/\text{mm}^2$  after immersion in 100  $\text{ng}/\text{mL}$  VEGF solution. Initial experiments to induce HUVEC migration showed that a successful gradient profile still needs to be found, however.

The generated COL I membranes provide a good starting point for the provision of modular, biomimetic tissue engineering scaffolds, with initial vascularization and cell-instructive elements. They also possess the potential to be modified by a variety of bioengineering methods and biochemically equipped to meet the requirements of the cellular microenvironment.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagenwissen &amp; Stand der Technik</b>	<b>5</b>
2.1. Komponenten der Extrazellulären Matrix . . . . .	5
2.2. Interaktionen zwischen Endothelzellen und der ECM . . . . .	12
2.2.1. Biochemische Signale . . . . .	12
2.2.2. Räumliche Signale und CONTACT GUIDANCE . . . . .	14
2.2.3. Chemo- und Haptotaxis . . . . .	15
2.3. Aktuelle Konzepte im Tissue Engineering . . . . .	18
2.3.1. Anforderungen an einen Scaffold . . . . .	19
2.3.2. Materialien für Scaffolds . . . . .	20
2.3.3. Techniken zur Herstellung von Scaffolds . . . . .	21
2.3.4. Scaffold-free . . . . .	22
2.4. Scaffolds aus Collagen Typ I . . . . .	22
2.4.1. Ein Überblick: Typen, Herstellungstechniken, Anwendungsgebiete . . . . .	23
2.4.2. Hydrogele . . . . .	25
2.4.3. Mikrostrukturen zur Orientierung adhärenter Zellen . . . . .	31
2.4.4. <i>In Vitro</i> Protein-Gradienten zur Induktion der Zellmigration . . . . .	37
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>43</b>
3.1. Proteinisolierung, -charakterisierung und -modifizierung . . . . .	43
3.1.1. Isolierung von Collagen Typ I . . . . .	43
3.1.2. Isolierung von Fibronectin . . . . .	43
3.1.3. Proteinquantifizierung . . . . .	44
3.1.4. SDS-PAGE . . . . .	45
3.1.5. Turbidimetrische Analyse der COL I-Fibrillogenese in Anwesenheit von Hyaluronsäure und Fibronectin . . . . .	45
3.1.6. Fluoreszenzmarkierung von Fibronectin, BSA und Hyaluronidase . . . . .	45
3.2. Erzeugung und Strukturierung COL I-basierter Membranen . . . . .	46
3.2.1. Prozesse für die Herstellung planarer COL I-Membranen . . . . .	46
3.2.2. Prozesse für die Mikrostrukturierung von COL I-Membranen . . . . .	48
3.2.3. Immersionsprozess zur Erzeugung eines Protein-Gradienten . . . . .	51
3.3. Analyse COL I-basierter Membranen . . . . .	52
3.3.1. Enzymatische Hydrolyse . . . . .	52

3.3.2.	Kinetik der Freisetzung von Hyaluronsäure . . . . .	52
3.3.3.	Kinetik der Freisetzung von Fibronectin . . . . .	53
3.3.4.	Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	53
3.3.5.	Konfokale 3D-Profilometrie . . . . .	53
3.3.6.	Analyse der Stabilität von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen nach EDC-Anwendung und Quellung . . . . .	54
3.3.7.	Bestimmung der Beladungs-Zeit-Verläufe von BSA und Hyaluronidase . . . . .	54
3.3.8.	Fluoreszenzphotometrische Quantifizierung von BSA- und Hyaluronidase-Gradienten . . . . .	54
3.3.9.	Analyse der Diffusion von BSA-TAMRA in COL I-Membranen . . . . .	55
3.3.10.	Quantifizierung des VEGF-Gradienten . . . . .	55
3.4.	Zellkultur mit HUVEC . . . . .	56
3.4.1.	HUVEC-Isolierung . . . . .	56
3.4.2.	Standardkultivierung . . . . .	56
3.4.3.	Trypsinierung . . . . .	56
3.4.4.	Phalloidin-TRITC-Färbung . . . . .	56
3.4.5.	Untersuchung der Proliferation auf COL I-HA- und COL I-FN-Membranen . . . . .	57
3.4.6.	Analyse der Verteilung und Ausrichtung auf mikrostrukturierten COL I-Membranen . . . . .	57
3.4.7.	Migrationsanalyse entlang eines VEGF-Gradienten auf COL I-Membranen . . . . .	59
3.5.	Statistische Analyse . . . . .	59
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1.	COL I-basierte planare Membranen . . . . .	61
4.1.1.	Entwicklung von Verfahren zur Membranherstellung . . . . .	61
4.1.2.	Kinetik der Freisetzung von Hyaluronsäure . . . . .	63
4.1.3.	Kinetik der Freisetzung von Fibronectin . . . . .	67
4.1.4.	Analyse der Proliferation von HUVEC . . . . .	68
4.2.	Mikrostrukturierung auf der Oberfläche von COL I-Membranen . . . . .	71
4.2.1.	Drucklose Abformung . . . . .	72
4.2.2.	Entwicklung eines Druckumformverfahrens . . . . .	75
4.2.3.	Druckumformung mit mikrostrukturiertem Silizium- und PDMS-Master . . . . .	77
4.2.4.	Analyse der Anwendbarkeit mikrostrukturierter Stempel aus thermoplastischen Kunststoffen für die Druckumformung . . . . .	78
4.2.5.	Charakterisierung der Stabilität von Mikrostrukturen auf PS-Mastern . . . . .	82
4.2.6.	Optimierung der Krafteinwirkung während der Druckumformung mit PS-Mastern . . . . .	84
4.2.7.	Optimierung der Stabilität von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen in wässriger Lösung . . . . .	86
4.2.8.	Charakterisierung mikrostrukturierter EDC-vernetzter COL I-Membranen . . . . .	88
4.2.9.	Analyse der Verteilung von HUVEC auf mikrostrukturierten COL I-Membranen . . . . .	92

4.2.10. Bewertung des Einflusses der Mikrostrukturierung auf die Orientierung von HU-VEC . . . . .	94
4.3. VEGF-Gradient auf COL I-basierten planaren Membranen . . . . .	96
4.3.1. Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens der Modellproteine BSA und HYAL an COL I-Membranen . . . . .	97
4.3.2. Entwicklung eines Immersionsverfahrens . . . . .	99
4.3.3. Charakterisierung von BSA und HYAL-Gradienten . . . . .	102
4.3.4. Erzeugung und Analyse von VEGF-Gradienten . . . . .	105
4.3.5. Analyse der Migration von HUVEC entlang eines VEGF-Gradienten . . . . .	107
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>151</b>
A.1. Geräte, Chemikalien, biologische Materialien und Nährmedien . . . . .	151
A.2. Ergänzungen zu den Ergebnissen . . . . .	156
A.2.1. Übersicht des gesamten Prozesses der Mikrostrukturierung auf COL I-Membranen . . . . .	156
A.2.2. Programm zur Steuerung des <i>Arduino Uno</i> Mikrokontrollers . . . . .	157
A.2.3. Isolierung, SDS-PAGE und Quantifizierung von COL I und FN . . . . .	159
A.2.4. Einfluss von FN und HA auf die Dauer der COL I-Fibrillogenese . . . . .	160
A.2.5. Weitere erzeugbare Mikrostrukturen auf COL I-Membranen durch Druckumformung . . . . .	162
<b>B. Sonstiges</b>	<b>163</b>
B.1. Liste der Publikationen . . . . .	163
B.2. Erklärungen . . . . .	165



# Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD44	Cluster Determinat 44
Cdc42	Cell division control protein 42
CM	Collagenmembran
COL I	Collagen Typ I
DMAB	Dimethylaminobenzaldehyd
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOL	Degree of Labeling
E-Modul	Elastizitätsmodul
EACA	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure
EC	Endothelzelle
ECM	Extracellular Matrix
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum

---

FGF	Fibroblast Growth Factor
FN	Fibronectin
GAG	Glycosaminoglycan
HA	Hyaluronsäure
HA-CM	Hyaluronsäure-Collagen-Membran
HDMEC	Human dermal microvascular endothelial cells
HFTDCS	(Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)dimethylchlorsilan
HMVEC	Human dermal microvascular endothelial cells
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
HYAL	Hyaluronidase
LDV	Aminosäuresequenz Leucin-Asparaginsäure-Valin
LINC	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
MMP	Matrix Metalloprotease
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Polycarbonat
PCL	Poly- $\epsilon$ -caprolacton
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PHSRN	Aminosäuresequenz Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin
pI	Isoelektrischer Punkt
PLGA	Poly(milch-co-glycolsäure)
POM-C	Polyoxymethylen

PP	Polypropylen
PS	Polystyren
PTFE	Polytetrafluorethylen
Rac	Subfamilie der Rho-Familie von GTPasen
RCA	Radio Corporation of America
REDV	Aminosäuresequenz Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin
REM	Rasterelektronenmikroskop
rF	relative Feuchtigkeit
RGD	Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RHAMM	Receptor for HA-mediated motility
RhoA-ROCK	Ras homolog family member A - rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase
RW	Reinstwasser
SAN	Styrol-Acrylnitril-Copolymer
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor-1
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAMRA-SE	Carboxytetramethylrhodamin-Succinimidylester
TE	Tissue Engineering
TEC-Puffer	TRIS-EACA-Citrat-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor



# 1. Einleitung

In Deutschland wurden im Jahr 2019 2.995 Organe von 932 postmortalen Spendern an Empfänger transplantiert, bei denen Organschäden oder der Totalausfall einen Ersatz notwendig machten (DSO 2020). Die Zahl der auf ein Spenderorgan wartenden Menschen beträgt allerdings 9.271 und zeigt den großen Bedarf an Organ- und Gewebeersatzmaterial für den Funktionserhalt, die Reparatur oder den Ersatz nativer Organ- und Gewebefunktionen. Diese Lücke könnte durch die Verwendung funktionsfähiger, artifiziell erzeugter Gewebe und Organe geschlossen werden. Die richtige Kombination von Material, Zellen und räumlicher Gestaltung stellt die Life Sciences jedoch vor große Herausforderungen. Neben der generellen Erzeugung sind speziell die Versorgung der darin befindlichen Zellen mit Nährstoffen und der Abtransport von Stoffwechselprodukten, wie es *in vivo* durch vaskuläre Netzwerke gewährleistet wird, eine notwendige Grundvoraussetzung für deren Funktionalität. Bereits ab einem Abstand einer Zelle von etwa 500 µm zum nächsten Gefäß vermindert sich deren Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen (Johnson u. a. 2007; Rouwkema u. a. 2008). Hinzu kommt, dass die Zellen durch eine geeignete, instruktive Mikroarchitektur und biochemische Zusammensetzung ihrer Umgebung, zur Anpassung und Erweiterung des Gefäßnetzwerks befähigt werden müssen. Die Nutzung der Prinzipien des Tissue Engineerings (TE) ermöglicht die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, die das Potential haben, diese Herausforderungen zu bewältigen.

„Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Gebiet, das die Prinzipien der Ingenieur- und Lebenswissenschaften auf die Entwicklung von biologischen Ersatzstoffen, die die Funktion eines Gewebes oder eines ganzen Organs wiederherstellen oder erhalten, anwendet.“ (Langer und Vacanti 1993)

Die Prinzipien des TE können aber auch für die Erzeugung von Modellen für *in vitro*-Studien genutzt werden. Um diese Ziele zu erreichen, werden im TE aktuell drei Ansätze verfolgt: Die Modifizierung von Zellen, die Entwicklung geeigneter Materialien und die räumliche Gestaltung der Materialien (J. Wu u. a. 2018). Die Materialien bilden dabei die Grundlage für die oben erwähnten Ersatzstoffe. Sie bestehen aus einem synthetischen oder natürlichen Gerüstmaterial – dem Scaffold – und den gewebespezifischen Zellen, die entweder bereits daran gebunden sind oder im Nachhinein darauf aufgebracht werden. Die Verwendung geeigneter Materialien für die Erzeugung artifizieller Scaffolds ist jedoch eingeschränkt. Biokompatibilität und Remodellierbarkeit zur erfolgreichen Integration in das Zielgewebe müssen ebenso gewährleistet werden, wie auch die Ausstattung mit räumlichen, biochemischen und mechanischen Eigenschaften zur Steuerung des Zellverhaltens und zum Erhalt des Zellphenotyps. In Frage kommen dafür biodegradierbare synthetische und natürliche Polymere. Verschiedene synthetische Polymere, wie Polyester, Polycarbonate, Polyamide, Polyphosphazene, wurden bereits als Gerüstmaterialien sehr umfangreich verwendet. Sie können kostengünstig, in vielfäl-

---

tigen Formen und reproduzierbar hergestellt werden. Außerdem können spezifische mechanische Eigenschaften und Degradieraten eingestellt werden (Ulery u. a. 2011; Stevens u. a. 2008). Jedoch besitzen sie *per se* keine Adhäsionspunkte für Zellen, keine Bindungsstellen für bioaktive Moleküle zur Steuerung des Zellverhaltens und zeigen Limitationen in ihrer Fähigkeit zur Remodellierung. Mit Materialien biologischen Ursprungs könnten diese Nachteile überwunden werden.

*In vivo* befinden sich Zellen in einem für sie passgenauen Mikromilieu – der Extrazellulären Matrix (ECM). Sie bietet ihnen geeignete Adhäsionspunkte, Signale zur Regulation der Proliferation sowie Migration, sorgt für den Erhalt des Phenotyps oder die gezielte Differenzierung und ist außerdem verantwortlich für die mechanische Stabilität des Gewebes. Realisiert werden diese Fähigkeiten der ECM durch die Interaktion der Zellen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Struktur- und Glycoproteine (z.B. Collagen Typ I (COL I) und Fibronectin (FN)), Glycosaminoglycane (GAG, z.B. Hyaluronsäure (HA)) und Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) (siehe Abbildung 2.1b auf Seite 5). Um diese komplexen Zell-Matrix-Interaktionen nachzuahmen und zusätzlich die Remodellierbarkeit der ECM sicherzustellen, werden daher Scaffolds aus nativen ECM-Komponenten als ideale Materialien für das TE angesehen (Serban und Prestwich 2008). COL I ist der häufigste Vertreter der ECM-Proteine und wurde bisher am umfangreichsten für TE-Anwendungen untersucht. *In vivo* ist es wichtiger Bestandteil des strukturellen Aufbaus der ECM, sorgt mit für die mechanische Stabilität der Gewebe und bietet Adhäsions- und Migrationsmöglichkeiten für Zellen. Aus nativen Geweben kann es durch saure Extraktion in löslicher Form isoliert werden. Dabei werden die parallel in Bündeln vorliegenden Fibrillen zu einzelnen Tropocollagen-Molekülen oder -Multimeren degradiert. Diese können *in vitro* erneut zur Fibrillenbildung angeregt werden. Dabei entstehen stark hydratisierte Hydrogele, die jedoch nicht die vorteilhaften mechanischen Eigenschaften der nativen Fibrillen erreichen. Künstliche Vernetzungs- oder Verdichtungstechniken des Fibrillennetzwerkes sind eine Möglichkeit, diese teilweise wieder herzustellen. Folglich ist COL I, bei zuverlässiger Kontrolle seiner mechanischen Eigenschaften, eine geeignete, aus der nativen ECM stammende Komponente für die Erzeugung von Scaffolds im TE.

Im TE wurden bereits verschiedene Ansätze zur Erzeugung von Scaffolds auf Basis von COL I für die Bereitstellung vaskulärer Netzwerke verfolgt. Dazu gehören dezellularisierte Gewebe, dreidimensionales (3D) Bioprinting und poröse Schwämme. Bei dezellularisierten Geweben werden die natürlichen Mechanismen der Bildung einer spezifischen ECM ausgenutzt. Sie sind autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs und wurden von allen antigen wirkenden Bestandteilen befreit. Der gezielte Verbleib bioaktiver Substanzen, wie Wachstumsfaktoren oder GAG, und der Erhalt der räumlichen Strukturen, z.B. von vaskulären Netzen, ermöglicht es, Zellen in einer dem nativen Mikromilieu sehr ähnlichen Umgebung zu kultivieren und native Gewebeeigenschaften sofort bereitzustellen. Dezellularisierte Scaffolds finden bereits *in vivo* Anwendung, bspw. für die Therapie von Defekten bei Herzklappen (Sanders u. a. 2016). Problematisch ist jedoch die ausreichende Verfügbarkeit autologen sowie allogenen Gewebes und die Verwendung von Materialien xenogenen Ursprungs, die immunogenes und/oder pathogenes Potential besitzen (Hussein u. a. 2020). Dagegen ist das 3D Bioprinting eine Möglichkeit, Scaffolds mit definierter Architektur und Zusammensetzung sowie spezifischen mechanischen Eigenschaften vollständig neu zu erzeugen. Dabei wird COL I in geeigneter Form (evtl.

zusammen mit anderen ECM-Komponenten und Zellen) durch einen Inkjet-Druck-Prozess definiert zweidimensional (2D) angeordnet. Im layer-by-layer-Verfahren können anschließend 3D Scaffolds mit punktgenauer Platzierung von Zellen aufgebaut werden. Dadurch konnten bereits Scaffolds mit einer Prevascularisierung für potentielle Anwendungen mit künstlichen Geweben und Organen für die Regenerative Medizin erzeugt werden (Ashammakhi u. a. 2019). Allerdings ist diese Technik nicht für die Modifikation der Scaffolds im Mikro- und Nanobereich geeignet, da dessen Präzision auf Strukturen im unteren mm-Bereich limitiert ist. Ebenso ist die ausreichende Kontrolle der *in vitro* COL I-Fibrillogenese für die Verwendung ein limitierender Faktor (Meyer 2019). Poröse Schwämme aus COL I wurden ebenfalls für *in vitro*-Studien zur Gefäßneubildung verwendet. Interkonnektive Poren wurden hier durch Gefriertrocknung von fibrillären oder nicht-fibrillären COL I-Lösungen erzeugt und bildeten dadurch ein stark verzweigtes Gefäßnetzwerk. Dieses induzierte bei darin wachsenden Endothelzellen (EC) die Bildung kapillarähnlicher Strukturen (E. C. Chan u. a. 2016). Die geringe mechanische Stabilität ist jedoch der größte Nachteil dieser Scaffolds.

Die oben beschriebenen Methoden zeigen, dass weitere Herausforderungen bei der Erzeugung vaskulärer Strukturen in COL I-basierten Scaffolds im strukturellen Aufbau in Kombination mit einer ausreichenden mechanischen Stabilität bestehen. Ein Vergleich mit dem komplexen strukturellen Aufbau einzelner Gewebebereiche der nativen ECM, die sich in Dichte, Elastizität, Stabilität oder Zusammensetzung stark unterscheiden, lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Kombination mehrerer Technologien zur Erzeugung eines passgenauen COL I-Scaffolds verwendet werden muss. Zielführender ist daher ein Baukastensystem, mit dem komplexe, große Gewebestrukturen durch kleinere, modulare Mikroumgebungen, die eine definierte Mikroarchitektur und variable biochemische Zusammensetzung besitzen, aufgebaut werden können (Walters und Stegemann 2014). Anwendung *in vitro* fanden dahingehend bereits eine mit Stromazellen ausgestattete COL-Matrix, die mit EC beschichtet wurde. Nach Assemblierung dieser Mikromodule konnten größere vaskularisierte Organoiden erzeugt werden (McGuigan und Sefton 2006). Ähnliche Module wurden für die Neovaskularisierung und für kardiovaskuläre Anwendungen verwendet (Leung und Sefton 2010; Butler und Sefton 2012).

Artifizielle Mikromodule aus COL I können fibrilläre Hydrogele, poröse Schwämme oder kompakte Membranen sein, die sich aus mechanischer und architektonischer Sicht in ihren Anwendungsmöglichkeiten unterscheiden. Speziell kompakte Membranen aus COL I, die durch Kompression fibrillärer COL I-Hydrogele hergestellt werden können (Brown u. a. 2005), zeichnen sich durch vorteilhafte mechanische Eigenschaften aus. Durch die Implementation von Mikrostrukturen auf deren Oberfläche können sie zur Nachbildung eines Gefäßnetzwerks verwendet werden. Bisher entwickelte Technologien nutzten dafür sowohl Tropocollagen als auch fibrilläres COL I als Membranmaterial. Die Strukturübertragung erfolgte meist ausgehend von mikrostrukturiertem Polydimethylsiloxan (PDMS) oder Si. Das aufgetragene COL I-Hydrogel wurde darauf drucklos oder durch Aufpressen getrocknet und meist währenddessen chemisch vernetzt (Ber u. a. 2005; Vrana u. a. 2007; Zorlutuna, Hasirci u. a. 2008; S. Chen, Nakamoto u. a. 2015; Janakiraman u. a. 2007; Vernon u. a. 2005a; Alekseeva u. a. 2012). Im Ergebnis wurden zwar Mikrostrukturen erhalten, die einen Einfluss auf die Orientierung verschiedener Zellen zeigten, jedoch stellen die Qualität und mechanische Stabilität der

---

Mikrostrukturen und der Membranen noch große Herausforderungen dar. Daher sollte die Erzeugung von Gefäßstrukturen in Form von Mikrotopographien auf mechanisch stabilen Membranen aus COL I genauer charakterisiert werden.

Ein Ansatz für die Erweiterung bereits erzeugter, artifizierender Gefäßstrukturen und die Infiltration von modularen, COL I-basierten Scaffolds mit EC, kann die Induktion einer EC-Migration durch Gradienten des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) und der damit verbundenen *ex vivo* Neovaskularisierung sein. *In vivo* können diese Prozesse während der Angiogenese beobachtet werden. Als innerste Schicht vaskulärer Gefäße stehen EC in direktem Blutkontakt. Hypoxie, metabolische Ereignisse oder Verletzungen im umliegenden Gewebe führen dazu, dass die darin befindlichen Zellen den Prozess der Angiogenese durch die Sekretion pro-angiogener Faktoren, insbesondere VEGF, auslösen. EC migrieren nun gerichtet zur höchsten VEGF-Konzentration und formen so den Verlauf eines neuen Blutgefäßes (Sacchi u. a. 2020). In der Literatur werden verschiedene Techniken, wie Mikrofluidik, Microcontact-Printing oder Diffusionstechniken beschrieben (Garcia-Arcos u. a. 2019), mit denen VEGF-Gradienten in 2D oder 3D Anordnung meist auf synthetischen Materialien erzeugt werden können. In einem COL I-Hydrogel wurde ein VEGF-Gradient mit Hilfe einer mikrofluidischen Apparatur erzeugt. Darin kultivierte EC zeigten eine deutliche Migration in Richtung der höchsten Konzentration des Gradienten (Chung, Sudo u. a. 2009). Diese Hydrogele sind jedoch wegen ihrer bereits erwähnten geringen mechanischen Stabilität als TE-Scaffolds für den Gefäßersatz ungeeignet. Defizit aller beschriebenen Technologien zur Gradientenerzeugung ist außerdem die fehlende Charakterisierung des Gradientenprofils. Die Verwendung kompakter, mechanisch stabiler COL I-Membranen als modulare Scaffolds, wie im vorherigen Absatz beschrieben, kann hier die gezielte Infiltration oder Erweiterung bereits darauf bestehender Gefäßnetzwerke ermöglichen. In der Literatur ist diese Herangehensweise bisher noch nicht beschrieben. Folglich muss dafür eine Technik zur Erzeugung eines VEGF-Gradienten auf diesem Material entwickelt und das Ergebnis intensiv charakterisiert werden.

Die Ziele dieser Arbeit waren daher:

- Entwicklung von Verfahren zur Herstellung kompakter, frei handhabbarer COL I-Membranen, in die HA und FN inkorporiert werden können. Die verbleibenden Konzentrationen von HA und FN sollten geprüft und deren Beeinflussung auf das Proliferationsverhalten von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) näher charakterisiert werden.
- Ausstattung kompakter COL I-Membranen mit stabilen, anisotropen Mikrostrukturen als Startpunkt für artifizierender Gefäßsysteme. Dafür sollten limitierende Verfahrensparameter sowie die Persistenz der erzeugten Mikrostrukturierung unter Zellkulturbedingungen, aufgrund der beim COL I bekannten Quellungseigenschaften, ermittelt werden. Die Mikrostrukturen sollten außerdem hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Einstellung einer nativen, räumlichen Orientierung von HUVEC analysiert werden.
- Entwicklung eines Verfahrens zur Erzeugung eines VEGF-Gradienten auf der Membranoberfläche, Charakterisierung des Konzentrationsprofils und Analyse seiner Fähigkeit zur Induktion einer gerichteten Migration von HUVEC.

## 2. Grundlagenwissen & Stand der Technik

### 2.1. Komponenten der Extrazellulären Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) beschreibt den Gewebeanteil, der sich zwischen den Zellen befindet (s. Abbildung 2.1a). Die natürliche ECM bietet strukturelle Unterstützung für die darauf wachsenden Zellen und dadurch mechanische Stabilität für das gebildete Gewebe. Sie gewährleistet die Nährstoffversorgung der Zellen durch ein komplexes Gefäßnetzwerk und präsentiert instruktive topographische und biochemische Komponenten zur gezielten Steuerung des Zellverhaltens. Außerdem ist sie ein Reservoir für Wachstumsfaktoren und andere Biomoleküle und ermöglicht die Remodellierung durch Zellen (Chung und King 2011).

Die ECM besteht aus 2 Hauptgruppen von Makromolekülen:

- GAG, die normalerweise mit Proteinen verknüpft als Proteoglycane vorliegen, und
- fibrilläre Proteine.

Daneben existieren noch eine Vielzahl anderer Biomoleküle, z.B. Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsproteine. Diese Makromoleküle werden überwiegend durch die im Gewebe wachsenden Zellen gebildet bzw. umstrukturiert (Alberts u. a. 2002). In ihrer Summe steuern sie das native zelluläre Verhalten durch Zell-ECM-Interaktionen (s. Abbildung 2.1b) und sorgen so für die Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen im gesunden Gewebe.

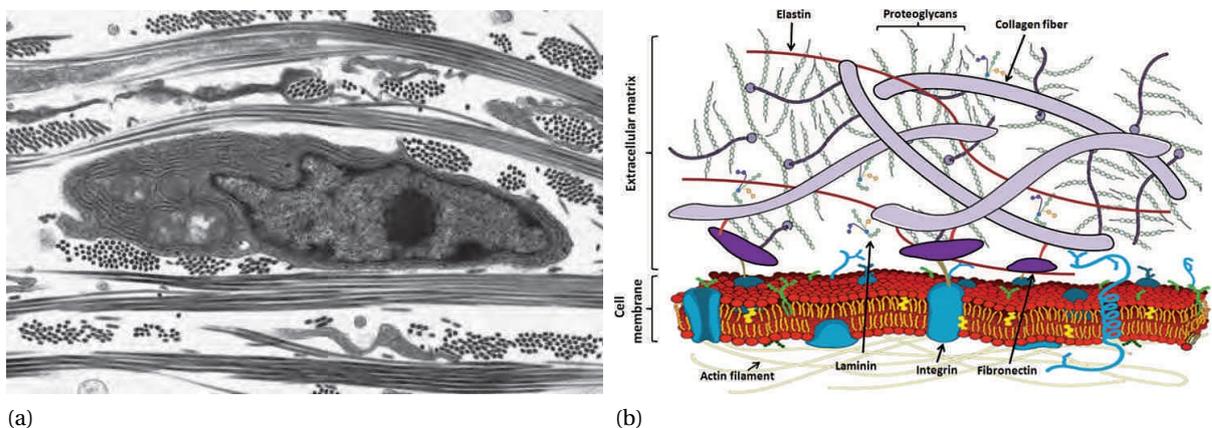


Abbildung 2.1.: Die Extrazelluläre Matrix. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch die ECM einer Fibroblastenzelle mit gut erkennbaren COL I-Faserbündeln (aus Alberts u. a. 2002). (b) Die Komponenten der ECM und ihre Wechselwirkungen untereinander sowie mit der Zellmembran (aus Xue und Jackson (2015)).

Dieser Abschnitt beschreibt vier Komponenten der ECM näher: Das fibrillenbildende Strukturprotein Collagen Typ I, das Adhäsion vermittelnde Glycoprotein FN, das GAG HA und den Wachstumsfaktor VEGF. Außerdem werden Möglichkeiten der Quantifizierung und teilweise der Isolierung vorgestellt.

## Collagen Typ I

Von den mindestens 29 bekannten Collagen-Typen (Soruschanova u. a. 2019) ist COL I das massenmäßig am meisten in der ECM vorkommende Protein. In Säugetieren ist es beispielsweise in Bändern, Sehnen, Bindegewebe, Knochen und in der Haut zu finden. Es verleiht den meisten Geweben Zugfestigkeit und Elastizität. In Knochen ist es im besonderen Maße, in Kombination mit der Kalzifizierung, verantwortlich für die mechanische Belastbarkeit und Verwindungssteifigkeit (Gelse u. a. 2003).

Wie alle anderen Collagene ist auch COL I ein tripelhelikales Protein, das aus zwei  $\alpha 1$ - und einer  $\alpha 2$ -Polypeptidkette aufgebaut ist. Die Aminosäuresequenz der Polypeptidketten folgt dem Muster Gly-X-Y, wobei jede dritte Aminosäure Glycin ist und X bzw. Y überwiegend durch Prolin und 4-Hydroxyprolin besetzt werden. Die so aufgebauten drei  $\alpha$ -Ketten bilden eine rechtsgewundene Tripelhelix, die über H-Brückenbindungen stabilisiert wird (Kleinig und Sitte 1999).

Die Einzelketten von COL I werden intrazellulär in membrangebundenen Ribosomen mit den nicht-helikalen Propeptiden an den Kettenenden gebildet und nach Hydroxylierung von Prolinen und Lysin im Endoplasmatischen Retikulum als *Procollagen* in den extrazellulären Raum segregiert (Alberts u. a. 2002). Dort werden durch Procollagen-N/C-Proteinasen die C- und N-terminalen, nicht-helikalen Propeptide abgespalten (s. Abbildung 2.2b) (Canty und Kadler 2005). Das dadurch entstandene *Tropocollagen* aggregiert bei neutralem pH-Wert, physiologischer Ionenstärke und einer Temperatur von 37 °C zu Fibrillen, die durch ihre versetzte laterale Zusammenlagerung eine cha-

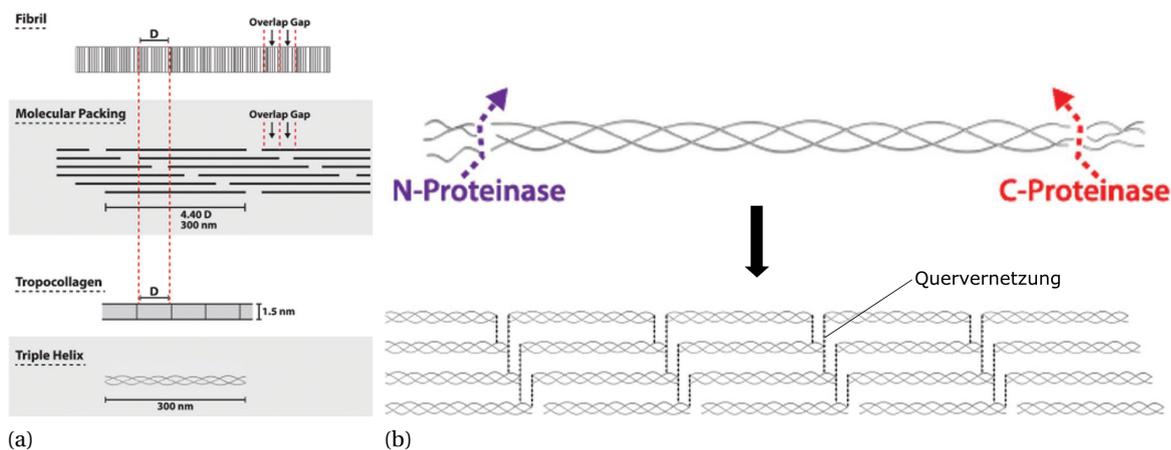


Abbildung 2.2.: Struktureller Aufbau und Assemblierung der COL I-Fibrille *in vivo*. (a) Die etwa 300 nm langen COL I-Tripelhelices lagern sich parallel an, sodass dazwischen Lücken entstehen. Diese führen zu charakteristischen Streifen im Elektronenmikroskop. (b) Nach Abspaltung von N- und C-terminalen Propeptiden durch N-/C-Proteinasen findet die spontane Assemblierung des Tropocollagens zur Fibrille statt. Anschließend erfolgt die Quervernetzung von Lysinseitenketten im Bereich der Telo-peptide (schwarze gestrichelte Linie) durch die Lysyl-Oxidase. Adaptiert aus Sorushanova u. a. (2019).

rakteristische, im Elektronenmikroskop sichtbare Querstreifung mit einem Abstand von 67 nm (D-Periodizität) im humanen Organismus zeigt (s. Abbildung 2.2a). Die Fibrillen haben einen Durchmesser von 20 - 100 nm und eine Länge von mehreren Mikrometern (Kleinig und Sitte 1999). COL I-Fibrillen werden *in vivo* an den Aminofunktionen der Lysinseitenketten durch eine Lysyl-Oxidase zunächst oxidiert und anschließend miteinander vernetzt (s. Abbildung 2.2b). Diese kovalente Verbindung erhöht die mechanische Stabilität, schützt vor Denaturierung bei 37 °C und reguliert die enzymatische Abbaubarkeit des COL I-Fibrillennetzwerks (Sorushanova u. a. 2019). Außerdem werden dadurch in Kombination mit der starken Verflechtung der COL I-Fibrillen Spannungen während Quellungsprozessen vermindert (Walters und Stegemann 2014). Die kovalente Quervernetzung tritt *in vitro* nicht auf, kann aber durch chemische oder biologische Methoden realisiert werden (s. auch Tabelle 2.2 auf Seite 28).

Die Entstehung sowie die Morphologie der COL I-Fibrillen kann durch die Anwesenheit verschiedener Komponenten der ECM während der *in vitro* Fibrillogenese beeinflusst werden. Zu ihnen zählen Proteoglycane, GAG und andere COL-Typen (Stamov 2009).

Die Fibrillen von COL I besitzen mindestens 50 Bindungsdomänen für sie umgebende zelluläre und extrazelluläre Komponenten. Zu ihnen gehören beispielsweise das GAG Heparin und das zelladhäsionsvermittelnde FN. Weiterhin sind Bindungsstellen für die zellulären Integrinrezeptoren  $\alpha1\beta1$  und  $\alpha2\beta1$ , die auch eine direkte Adhäsion von Zellen an das COL I ermöglichen, bekannt (Di Lullo u. a. 2002).

COL I kann in relativ hohen Ausbeuten durch verdünnte Säuren oder enzymatisch vorrangig aus der Haut oder aus Sehngewebe verschiedener Säugetiere isoliert werden (Walters und Stegemann 2014). Bevorzugt für *in-vitro*-Anwendungen im TE wird die Verwendung juveniler Haut von Rind, Schwein oder Ratte bzw. die Sehnen des Rattenschwanzes als COL I-Quelle beschrieben. Die Extraktionsmethoden basieren dabei vorrangig auf der Behandlung des nativen Gewebes mit verdünnter Essig- oder Salzsäure und degradieren die Fibrille (Bannister und Burns 1972a; Silver und Trelstad 1980; Rajan u. a. 2006; Chandrakasan u. a. 1976). Unausgereifte COL I-haltige Gewebe sind besser geeignet, da in diesem Stadium die Spaltung der vorrangig für die Quervernetzung verantwortlichen Aldimin-Bindung, zwischen Lysin-Aldehyd im Telozeptid und 5-Hydroxylysin in der tripelhelikalen Region, durch verdünnte Säure noch möglich ist (Avery und Bailey 2008). Die erhaltene Lösung enthält  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des COL I und meist unter 5% höher-molekulare Proteine. Die  $\alpha$ -Untereinheiten entsprechen dem  $\alpha1(l)$ - und  $\alpha2(l)$ -Monomeren, die  $\beta$ -Untereinheiten den  $[\alpha1(l)]_2$ - bzw.  $[\alpha2(l)]_2$ -Dimeren sowie die  $\gamma$ -Untereinheit dem  $[\alpha1(l)]_2\alpha2(l)$ -Trimer. Um die Extraktionslösung von allen unlöslichen oder niedermolekularen Bestandteilen zu befreien werden im weiteren Verlauf verschiedene Reinigungsmethoden, wie die fraktionierte Fällung mit NaCl (Chandrakasan u. a. 1976), Dialyse, Ultrafiltration und/oder Ultrazentrifugation angewendet (Rajan u. a. 2006). Als eine weitere Möglichkeit zur Isolierung des COL I wird eine Kombination aus saurer und Pepsin-katalysierter Behandlung beschrieben (Bannister und Burns 1972a; Epstein 1974; Maekawa u. a. 1970; Fujii und Kühn 1975). Der Einsatz von Pepsin führt zur Abspaltung nicht-helikaler Telozeptide an den Enden des COL I-Moleküls, lässt jedoch tripelhelikale Bereiche intakt. An diesen Telozeptiden befinden sich die intermolekulare Querverbindungen, die zwischen den Tropocollagenmolekülen aufgebaut werden.

---

Durch die Pepsinbehandlung wird daher die Quervernetzung unter den Tropocollagenmolekülen degradiert und damit eine Erhöhung der isolierbaren COL I-Untereinheiten erreicht. Die Telopeptide haben jedoch einen Einfluss auf die Fibrillogenese des COL I, sodass die Rekonstitution der verbleibenden tripelhelikalen COL I-Moleküle zu keiner nativen Fibrillenmorphologie führt (Bannister und Burns 1972b).

## **Fibronectin**

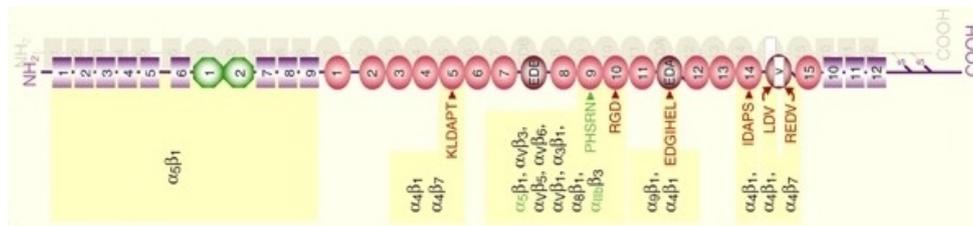
FN ist eines der größten Multi-Domänen-Proteine der ECM und reguliert durch eine Vielzahl von Zell-ECM-Interaktionen die Zelladhäsion, -migration und -differenzierung (Pankov und Yamada 2002; Carsons 1989; Hynes und Rich 1990). FN ist ein Dimer aus nahezu identischen Untereinheiten, jede mit einem Molekulargewicht von etwa 250 kDa, die in den Nähe des C-Terminus durch ein Paar Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Pankov und Yamada 2002).

FN existiert in zwei Formen. Das lösliche FN im Blutplasma wird durch Hepatocyten in der Leber gebildet. Die zweite Form sind FN-Fibrillen, die an die Zellmembran gebunden sind und dadurch unlöslich im Extrazellulärraum vorliegen. Es wird von den dort vorhandenen Zellen gebildet. Diesem FN wird auch die Aktivität hinsichtlich der Regulation des Zellwachstums zugeordnet (Zollinger und Smith 2017). Durch die integrienvermittelte Anbindung der FN-Fibrillen an die Zelle wird das FN-Molekül stark gestreckt, sodass vorher verborgene Bindungsdomänen freigelegt werden. Dadurch können weitere Zell-FN-Interaktionen oder auch Wechselwirkungen zwischen FN und anderen ECM-Molekülen aufgebaut werden (Zhong u. a. 1998; Alberts u. a. 2002). Residente Zellen bilden neue FN-Moleküle und fügen diese direkt zu vorhandenen Fibrillen hinzu. Ebenso unterliegt lösliches FN aus dem Blutplasma (z.B. zugegeben in eine Zellkultur) nach Anbindung an die Zellmembran durch Fokalkontakte, im weiteren Verlauf der zellinduzierten FN-Fibrillogenese (Dzamba u. a. 1994).

FN interagiert mit einer Vielzahl zellmembranständiger Integrin-Rezeptoren und verbindet so die ECM mit dem Zellcytoskelett. Dafür wurden mehrere Bereiche der FN-Aminosäuresequenz identifiziert (Abbildung 2.3a). Das wohl am besten bekannte Bindungsmotiv RGD im FN-Molekül bindet an den typischen  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinrezeptor, wie auch die AS-Sequenz PHSRN. Andere Sequenzen wie z.B. LDV und REDV binden dagegen an  $\alpha 4 \beta 1$ -Integrinrezeptor (Pankov und Yamada 2002).

Neben Zellkontakten ist FN auch in der Lage, andere ECM-Moleküle zu binden (Abbildung 2.3b). So besitzt es Bindungsdomänen für Collagen (Erat u. a. 2010) sowie Heparin, Heparansulfat und Chondroitinsulfat (Pankov und Yamada 2002). Außerdem wurden Anknüpfungspunkte für Wachstumsfaktoren der Gruppen Platelet Derived Growth Factor (PDGF), VEGF und Fibroblast-Growth-Factor (FGF) identifiziert (Martino und Hubbell 2010). Speziell für VEGF existieren zwei Domänen im FN-Molekül, die durch Heparin und Heparansulfat allosterisch reguliert werden. Darüber hinaus wird vermutet, dass neben den genannten GAG auch ebenfalls die mechanische Dehnung der FN-Fasern einen Einfluss auf die VEGF-Anbindung hat (Mitsi u. a. 2006).

FN kommt in vergleichsweise hoher Konzentration von  $\sim 300 \mu\text{g}/\text{mL}$  im humanen Blutplasma vor. Es besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Gelatine, sodass es durch Affinitätschromatographie mit



(a) Interaktionsdomänen mit Integrinen



(b) Interaktionsdomänen mit anderen ECM-Komponenten.

Abbildung 2.3.: Bindungsdomänen des FN mit zellmembranständigen Integrinen und anderen ECM-Komponenten. Adaptiert aus Pankov und Yamada (2002).

Gelatine-Agarose relativ einfach und mit guten Ausbeuten aus dem Blutplasma isoliert werden kann. Vorteil dieses Verfahrens ist auch, dass gleichzeitig eine Separation von anderen Bestandteilen des Blutplasmas erfolgt. Anleitungen zur Isolierung wurden von Brew und Ingram (1994), Speziale u. a. (2008) und Akiyama (2013) beschrieben.

Für die Entwicklung von FN-haltigen Scaffolds für TE-Anwendungen ist die Kenntnis der genauen FN-Konzentration von entscheidender Bedeutung. Die Quantifizierung von FN in reiner Form kann durch klassische Proteinbestimmungsverfahren, wie z.B. Bicinchoninsäure(BCA)- oder Bradford-Assay, erfolgen. In Anwesenheit anderer Proteine fehlt diesen Verfahren jedoch die Spezifität, sodass sie nicht angewendet werden können. In diesem Fall kann die Quantifizierung durch Fluoreszenzmarkierung (Pompe u. a. 2003) oder Radioisotopenmarkierung (Sottile und Hocking 2002) des FN bzw. mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Speziale u. a. 2008) durchgeführt werden.

## Hyaluronsäure

HA ist ein hochmolekulares, negativ geladenes Polysaccharid. Unter normalen physiologischen Bedingungen besteht es aus 2.000-25.000 wiederkehrenden Disaccharideinheiten mit einem Molekulargewicht von  $10^6 - 10^7$  kDa und einer Länge von 2 - 25  $\mu\text{m}$  (Toole 2004). Eine Disaccharideinheit besteht aus  $\beta(1,4)$ -N-Acetyl-D-glucosamin und  $\beta(1,3)$ -D-Glucuronsäure. Im Vergleich zu anderen GAG ist HA nicht sulfatiert oder an ein Kernprotein gebunden (Grandoch u. a. 2018).

HA kommt in allen Säugetier-Organismen vor, vor allem in Bindegewebe von Nabelschnur und Haut sowie in der Synovial- und Glaskörperflüssigkeit und bindet dort, relativ zu ihrer Masse, sehr große Mengen Wasser. Die Biosynthese von HA erfolgt durch HA-Synthasen (transmembrane Glycosyltransferasen) an der Plasmamembran der Zelle. Die HA-Degradierung realisieren Hyaluronidasen (Girish und Kemparaju 2007; Grandoch u. a. 2018).

Der Ablauf vieler physiologischer Prozesse wird durch HA reguliert. Dazu zählen die Zelladhäsion,

---

-migration, -proliferation und -differenzierung (Heldin 2003; Spicer und J. Y. L. Tien 2004), Entzündungsvorgänge (Day und La Motte 2005), die Wundheilung (W. Y. Chen und Abatangelo 1999), die Angiogenese (West u. a. 1985) sowie die Wasser-Homöostase, Viskoelastizität und biomechanische Integrität der ECM (McDonald und Camenisch 2002; Toole 2004). Die biologischen Funktionen hängen dabei vom Molekulargewicht des HA-Moleküls ab. HA mit hohem Molekulargewicht ist natürlicherweise anti-angiogen, anti-inflammatorisch und immunsuppressiv (Day und La Motte 2005) und fördert die Homöostase (Grandoch u. a. 2018). Dagegen stimuliert HA mit niedrigem Molekulargewicht die Angiogenese und induziert die Bildung von inflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Außerdem befördert sie die Proliferation von EC (Noble u. a. 1993; Girish und Kemparaju 2007).

HA geht Interaktionen mit Proteoglycanen, wie z.B. Aggrecan, Neurocan und Brevican, und anderen ECM-Makromolekülen ein und spielt daher eine wichtige Rolle im Aufbau der ECM. So ist HA im Knorpel der zentrale Baustein von Proteoglycan-Aggregaten, die verantwortlich für die Widerstandsfähigkeit gegenüber Kompression sind. Außerdem interagiert HA mit Rezeptoren an der Zellmembran, z.B. Cluster Determinant 44 (CD44) und Receptor for HA-mediated motility (RHAMM) (Toole 2004), wodurch die Zell-Zell-Aggregation, die Zell-Matrix-Signalgebung, der Rezeptor-vermittelte Abbau der HA oder die Regulation der Zellbewegung beeinflusst werden (Girish und Kemparaju 2007). Die Gesamtheit der HA-bindenden Proteine und Zellrezeptoren wird als Hyaladherine bezeichnet.

Die quantitative Analyse von HA kann nicht durch die für GAG bekannten Methoden, wie z.B. der Dimethylmethylenblau-Assay (Barbosa u. a. 2003; Farndale u. a. 1986), durchgeführt werden, da durch die fehlende Sulfatierung die ausreichende negative Ladung zur Bindung des Farbstoffs fehlt. Neben Methoden, die auf die Detektion des gesamten HA-Moleküls abzielen, wie Kapillarelektrophorese (Hayase u. a. 1997), ELISA-basierte Verfahren (Kongtawelert und Ghosh 1989; Kongtawelert und Ghosh 1990; Martins u. a. 2003), turbidimetrische Verfahren (Takei u. a. 2002) oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von enzymatisch erzeugten Molekülfragmenten (Chun u. a. 1988; Akiyama u. a. 1992; Ishimaru u. a. 2001; Grøndahl u. a. 2011), ist die Analyse der Monosaccharid-Bausteine eine gängige Methode. Die Quantifizierung des Glucosamin der HA, welches z.B. durch saure Totalhydrolyse freigesetzt werden kann, kann dafür durch Umsetzung mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB) zu einem farbigen Produkt, zur Spektralphotometer-basierten Quantifizierung der HA genutzt werden (Swann und Balazs 1966; Boas 1953; Elson und Morgan 1933).

## **Vascular Endothelial Growth Factor**

VEGF bezeichnet eine Proteinfamilie mit fünf Vertretern (VEGF-A bis -D und Placental Growth Factor), denen eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Blutgefäßen in der Angiogenese zugeschrieben wird (Hoeben u. a. 2004; Ferrara und Davis-Smyth 1997; Alberts u. a. 2002). Der am besten charakterisierte und verstandene Vertreter ist das VEGF-A, von welchem sieben Isoformen existieren. VEGF-A<sub>165</sub> mit 165 Aminosäuren, gehört zu dieser Gruppe und ist ein homodimeres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa (Ferrara und Davis-Smyth 1997). Das Molekül besitzt eine Heparin-Bindungsdomäne. Außerdem wird auch eine Bindungsaffinität zu FN (Goerges und Nugent 2004)

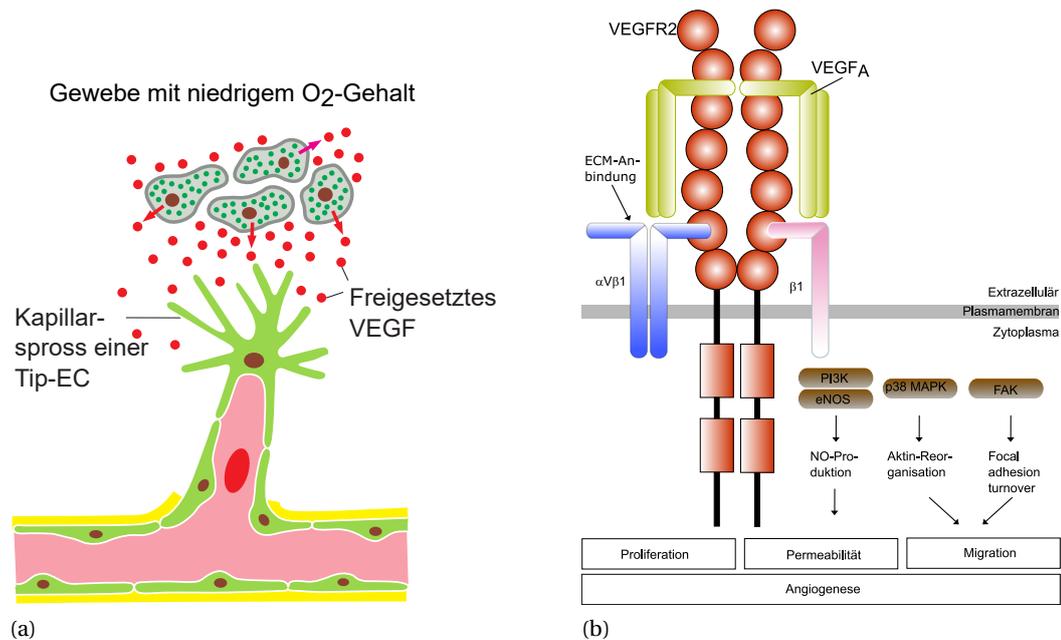


Abbildung 2.4.: Wirkungsweise von VEGF in der Angiogenese. (a) Zellen in hypoxischen Geweben setzen VEGF-A frei und induzieren dadurch die Angiogenese. Dabei migrieren und proliferieren EC in Richtung der VEGF-Quelle und führen zur Gefäßneubildung. (b) Die Anbindung von VEGF-A an den VEGFR-II führt zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität und fördert die Migration und Proliferation von EC. VEGF-A kann auch die Expression und Anbindung des Integrins  $\alpha V \beta 3$  an den VEGFR2 induzieren, was die Verknüpfung mit einer Vielzahl von ECM-Bestandteilen ermöglicht. Adaptiert aus Alberts u. a. (2002) und Koch u. a. (2011).

und anderen GAG, wie z.B. HA (Sugita u. a. 2013), in der Literatur beschrieben. Da VEGF moderat zur freien Diffusion durch die ECM befähigt ist, kann es sowohl an die Zellmembran oder an ECM-Bestandteile gebunden vorkommen. VEGF-A<sub>165</sub> kann ebenfalls durch proteolytische Degradierung längerer Isoformen für EC zugänglich gemacht werden (Hoeben u. a. 2004; Ferrara und Davis-Smyth 1997).

Hypoxie in einem Gewebe führt dazu, dass darin befindliche Zellen VEGF-A-Isoformen segregieren und damit die *in vivo* Angiogenese initiieren (siehe Abbildung 2.4a). Durch die Anknüpfung dieser VEGF-A-Isoformen an den zellmembranständigen VEGF-Rezeptor-II (VEGFR-II) wird die Proliferation und Migration von mikro- und makrovaskulären EC benachbarter Blutgefäße stimuliert. Dieser Effekt wurde auch *in vitro* beobachtet (Pepper u. a. 1992), jedoch muss VEGF in seiner Dosierung genau reguliert werden, da es bereits mit einer effektiven Dosis (ED<sub>50</sub>) von 2-10 pM wirkt (Yancopoulos u. a. 2000; Ferrara und Davis-Smyth 1997). Durch die Rezeptoraktivierung wird die vaskuläre Permeabilität durch die Bildung transzellulärer endothelialer Poren und die Öffnung zwischenzellulärer endothelialer Junctions durch VEGF-A induziert (Garrido-Urbani u. a. 2008), wie Abbildung 2.4b zeigt. Weiterhin wird die Expression von  $\alpha V \beta 3$ -Integrinen an der Membranoberfläche von EC, die sich an der Spitze sich verzweigender Kapillare befinden, befördert. Diese Integrine gehen Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von ECM-Molekülen ein und ermöglichen so die Zellmigration (Hoeben u. a. 2004). VEGF-A induziert auch die Bildung von Matrixmetalloproteasen (MMP), die die umliegen-

---

de Basallamina lysieren und ebenso die Migration unterstützen (Grunstein u. a. 1999).

Die am meisten genutzte Methode zur Quantifizierung von VEGF ist der ELISA (Scapini u. a. 1999; Weich u. a. 2004). Daneben wurden auch Immunoassays mit Detektion durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (Thompson u. a. 2010), fluoreszenzbasierte (Suzuki und Yokoyama 2009) oder auf Aptameren basierende Methoden (Dehghani u. a. 2018) entwickelt. Mittels ELISA lässt sich VEGF bis zu einer Konzentration von 63 pg/mL<sup>1</sup> detektieren.

## 2.2. Interaktionen zwischen Endothelzellen und der ECM

*In vivo* stehen EC als innerste Schicht von Blutgefäßen in direktem Blutkontakt und regulieren die Gefäßfunktion und -struktur. Sie kontrollieren den Stoff- und Zellaustausch zwischen Gewebe und Blut, verhindern die Thrombozytenaggregation, bspw. durch die Bildung von Heparin, regulieren den Tonus der Gefäßmuskulatur und damit den Blutdruck und führen durch Sprossung zur Bildung neuer Blutgefäße in der Angiogenese (Alberts u. a. 2002; Genasetti u. a. 2008).

Die für EC typische ECM ist die Basallamina, bestehend aus Collagen Typ IV, Lamininen und Heparansulfatproteoglycanen (HSPG) (Iivanainen u. a. 2003). In angiogenen Prozessen interagieren EC jedoch mit einer Vielzahl von ECM-Molekülen des unterliegenden Gewebes, z.B. COL I, Wachstumsfaktoren und anderen Proteoglycanen und werden dabei in ihrem Adhäsions-, Migrations-, Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten beeinflusst. Diese Wechselwirkungen werden durch zellmembranständige Integrine und an der Zelloberfläche befindliche, z.T. in die Membran integrierte HSPG realisiert und lösen so entweder Signalkaskaden in der Zelle aus oder führen durch die direkte Anknüpfung der ECM an das Aktinskelett zu zellmorphologischen Veränderungen. Diese Wechselwirkungen können sowohl biochemischer als auch physikalischer Art sein. Außerdem spielt die räumliche Anordnung der Signale in der ECM eine wesentliche Rolle.

In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten biochemischen und räumlichen Signale aus der ECM zur Beeinflussung des Wachstums von EC erläutert und ein Einblick in die Mechanismen der Chemo- bzw. Haptotaxis von EC gegeben werden.

### 2.2.1. Biochemische Signale

EC kommen nicht nur mit der Basallamina in Blutgefäßen in Kontakt, sondern speziell in der Angiogenese auch mit einer Vielzahl von ECM-Molekülen des interstitiellen Gewebes. Dieses besteht u.a. aus fibrillären Collagenen (z.B. COL I), Glykoproteinen (z.B. FN) und verschiedenen Wachstumsfaktoren in freier oder matrixgebundener Form. Die Erkennung dieser Moleküle und die Signaltransduktion erfolgt vorrangig durch zellmembranständige Integrine und HSPG (Iivanainen u. a. 2003). Eine Übersicht typischer ECM-EC-Interaktionen und deren Auswirkung auf das Verhalten von EC ist in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

---

<sup>1</sup>Angabe des Herstellers PeproTech GmbH

Tabelle 2.1.: Typische Rezeptoren in der Zellmembran von EC, deren übliche Liganden aus der ECM und Wirkung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung auf die EC-Funktion (Auswahl).

Rezeptor/Integrales Membranprotein	Typischer Ligand	Auswirkung auf EC-Funktion	Quelle
Integrin $\alpha V \beta 3$	FN	Expression durch Hypoxie, NO-Konzentration und VEGF; Adhäsionsvermittlung an FN über RGD-Motiv; Regulation des VEGFR-II	Soldi u. a. (1999) und Borges u. a. (2000)
Integrin $\alpha 5 \beta 1$	FN	Anreicherung von Signalmolekülen und Zytoskelettkomponenten zur Erzeugung fokaler Adhäsionspunkte und dadurch Ermöglichung der Migration	Dzamba u. a. (1994) und Hocking u. a. (1998)
Integrin $\alpha 2 \beta 1$	Fibrilläres COL	Induktion der ECM-Synthese	Jokinen u. a. (2004) und Zeltz und Gullberg (2016)
RHAMM, CD44	HA	Kurzkettige HA-Oligomere stimulieren Proliferation, Beweglichkeit und Tubulusbildung; langkettige HA sind anti-angiogen	Toole (2004), Slevin, Kumar u. a. (2002) und Genasetti u. a. (2008)
VEGFR-II	VEGF	Induktion von Mitose; Ermöglichung der Migration durch Stimulation der Expression von matrixdegradierenden Proteasen und von $\alpha V \beta 3$ -Integrinen	(Hoeben u. a. 2004)

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine mit einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Humphries u. a. 2006). Eine Vielzahl von Integrinrezeptoren wird in EC in Abhängigkeit von angiogenen und anti-angiogenen Prozessen exprimiert. So ermöglicht beispielsweise das  $\alpha V \beta 3$ -Integrin die EC-Adhäsion an FN über das RGD-Motiv. Dabei wird seine Expression durch Hypoxie und NO (Walton u. a. 2000; P. C. Lee u. a. 2000) sowie durch VEGF (Sepp u. a. 1994; Senger u. a. 1996) angeregt. Ebenfalls konnten das klassische FN-Rezeptor-Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  (Dzamba u. a. 1994; Hocking u. a. 1998) und die Collagen-Rezeptoren  $\alpha 1 \beta 1$  und  $\alpha 2 \beta 1$  (Jokinen u. a. 2004) an der EC-Membran gefunden werden. Das komplexe Zusammenspiel der genannten Integrine ermöglicht so gezielt die Adhäsion, Proliferation und Migration der EC.

RHAMM und CD44 sind HA-spezifische Rezeptoren, die auch in EC exprimiert werden. Sie interagieren sowohl mit langkettigen HA-Polymeren als auch mit kurzkettigen HA-Oligomeren. Erstgenannte wirken durch die Anknüpfung an die Rezeptoren anti-angiogen auf EC, da sie sowohl Zell-Zell als auch Zell-Rezeptor-Wechselwirkung wie eine Beschichtung auf der Zelloberfläche verhindern (D. Jiang u. a. 2005). Dagegen aktivieren HA-Oligomere verschiedene Signalwege und befördern so die Mitogenese von EC (Slevin, Kumar u. a. 2002; Slevin, Krupinski u. a. 1998) und auch die Migration durch Anregung der Expression von MMP.

Die Anknüpfung von VEGF an den VEGFR-II führt zu intrazellulären Signalereignissen, die die Mi-

---

gration, Proliferation, das Überleben der EC und die Durchlässigkeit des Endotheliums beeinflussen (Hoeben u. a. 2004). Zellmembranständige HSPG dienen dabei als Speicher und Aktivitätsregulatoren für Wachstumsfaktoren (Iivanainen u. a. 2003). Die Verankerung darin wird durch die Bindungsaffinität der Wachstumsfaktoren zu Heparin realisiert. Durch die Signaltransduktionsprozesse wird beispielsweise die Reorganisation des Aktinskeletts induziert, aber auch durch die Bildung neuer fokaler Adhäsionspunkte mit Hilfe von  $\alpha V \beta 3$ -Integrinen (Rousseau u. a. 1997) die EC-Migration ermöglicht. Eine ausführliche Beschreibung der VEGF-induzierten EC-Migration ist in Abschnitt 2.2.3 zu finden.

### 2.2.2. Räumliche Signale und CONTACT GUIDANCE

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Wechselwirkungen von ECM-Bestandteilen mit EC finden in der nativen Umgebung der Zellen in einem 3D-Kontext statt. Daher ist es ein Teilziel des vaskulären TE, auch die ECM-Architektur in synthetischen Scaffolds nachzuahmen (Tamiello u. a. 2016). Dadurch wird bspw. der notwendigen Orientierung von EC entlang der Längsachse in nativen Gefäßen Rechnung getragen, um das Thromboserisiko nach erfolgter Transplantation zu minimieren (Uttayarat, Toworfe u. a. 2005). Um diese Ziele zu erreichen, ist ein weitgehendes Verständnis der Mechanismen notwendig, die für die Zellorientierung und -migration verantwortlich sind. Im weiteren Verlauf des Abschnitts sollen die bisherigen Erkenntnisse dazu vorgestellt werden.

Die Beeinflussung der Orientierung von Zellen durch räumlich-strukturelle Vorgaben des Substrats (bspw. die natürliche ECM oder künstliche Trägermaterialien) wird als CONTACT GUIDANCE bezeichnet. *In vivo* wird dieser Prozess – neben der gerichteten, periodischen Einwirkung mechanischer Kräfte – auch durch die Anisotropie der geometrischen Anordnung von ECM-Biomolekülen hervorgerufen. Diese als MECHANOTRANSDUCTION-Signalweg bekannten Prozesse realisieren die Verbindung der ECM über Integrine, Fokaladhäsionskomplexe, Aktin-Fasern und LINC-Komplexe mit dem Zellkern (Tamiello u. a. 2016). Damit wird die direkte Beeinflussung der Zellfunktion durch mechanische Prozesse durch die ECM ermöglicht. Für die Beeinflussung der Orientierung der Zelle kommen nur die ersten drei Komponenten zum Tragen und sollen im Folgenden etwas genauer erklärt werden: Nach der an der Protrusionsseite stattfindenden, Integrin-vermittelten Anknüpfung der Zelle an die ECM erfolgt die Ausbildung von Integrinklustern (Puklin-Faucher und Sheetz 2009). Daran knüpfen auf der Innenseite der Zellmembran Aktin-Filamente unter Beteiligung einer Vielzahl von Proteinen an und bilden sogenannte FOCAL ADHESIONS (Tamiello u. a. 2016). Diese sind anfangs rund und haben einen Durchmesser von etwa 100 nm. Durch weitere Anlagerung von F-Aktin und Einwirkung mechanischer Kräfte vergrößern sich die FOCAL ADHESIONS und bilden als Kontaktfläche eine gestreckte, ellipsoide Geometrie mit einer maximalen Ausdehnung von 2-10  $\mu\text{m}$  aus (Choi u. a. 2008; Geiger u. a. 2009). Die F-Aktin-Synthese an maturierten FOCAL ADHESIONS erfolgt dadurch immer in eine definierte Richtung. Wenn durch räumliche Restriktionen die Orientierung der FOCAL ADHESIONS also vordefiniert ist, führt das automatisch zur Ausrichtung der gesamten Zelle.

Untersuchungen zum CONTACT GUIDANCE und zur Zellorientierung existieren seit mindestens 1945 (Weiss 1945) und wurden durch viele verschiedene Arbeitsgruppen in den darauffolgenden Jahren kontinuierlich weitergeführt (Buskermolen u. a. 2019; Ray u. a. 2017; Kubow u. a. 2017; Ramirez-San

Juan u. a. 2017; K. Lee u. a. 2016; Miyoshi und Adachi 2014; Czirok 2013; Hoffman-Kim u. a. 2010; Zhou u. a. 2009; Bettinger u. a. 2009; Uttayarat, Perets u. a. 2010; Manwaring u. a. 2004; Teixeira u. a. 2003; Andersson 2003). Aus diesen Untersuchungen etablierten sich drei Vorstellungen, wie die räumliche Anisotropie des Substrats Einfluss auf die Orientierung der Zellen nehmen kann. Sie sind grafisch in Abbildung 2.5 dargestellt.

- Die Substratgeometrie beschränkt die Ausbildung von Filopodien entgegen der Anisotropie und verhindert damit die Protrusion der Zelle. Dadurch kann kein F-Aktin und keine FOCAL ADHESIONS senkrecht zur Anisotropie gebildet werden und es erfolgt die Orientierung der Zelle parallel zur Kante/Ecke (Dunn und Heath 1976).
- Zellen sind grundsätzlich dazu bestrebt, ihre Fokalkontaktflächen mit dem Substrat zu vergrößern. Da diese Vergrößerung immer einer länglichen Form folgt, kann dies an Ecken und Kanten des Substrats nur parallel zur Ecke/Kante erfolgen und führt automatisch zur Ausrichtung der Zellen entlang dieser räumlichen Limitationen (Ohara und Buck 1979).
- Die Zellausrichtung wird an scharfen Ecken und Kanten des Substrats durch die Steuerung der Aktinpolymerisation parallel zur Graben-/Kantenlängsachse und der Bildung von ausgerichteten Fokalkontakten an diesen Stellen hervorgerufen (Curtis und Clark 1990).

### 2.2.3. Chemo- und Haptotaxis

Chemo- und Haptotaxis bezeichnen Prozesse, bei denen Zellen aufgrund löslicher oder an die ECM gebundener Gradienten von Signalmolekülen zu deren höchster Konzentration migrieren. Bei der Chemotaxis ist der diffusionsfähige, (bio-)chemische Signalstoff in der ECM gelöst, wohingegen bei der Haptotaxis dieser an Komponenten der ECM gebunden ist. Dabei können Signalstoffe, die chemotaktisch wirken, auch Haptotaxis hervorrufen und umgekehrt. Sie spielen bei vielen physiologischen Prozessen, bei denen EC beteiligt sind, wie z.B. der Vaskulogenese bei der Embryonalentwicklung, der Geweberegeneration und der Angiogenese in der Wundheilung, eine wichtige Rolle (Moissoglou u. a. 2014; Michaelis 2014; Kölsch u. a. 2008).

Im Vergleich zur durch CONTACT GUIDANCE geführten Migration von Zellen aufgrund räumlicher Limitation des Substrates, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, bei der die Zellen immer bidirektional entlang der vorgegebenen Orientierung migrieren, erfolgt bei der Chemo- und Haptotaxis eine gerichtete Migration ausschließlich in Richtung der höchsten Konzentration des Signalstoffes (Lara Rodriguez und Schneider 2013). Für die Zelle ist dabei vorrangig das Vorhandensein eines Konzentrationsunterschieds, weniger die Höhe des Unterschieds, für das Einsetzen der Migration von Bedeutung (Kleinig und Sitte 1999). Typische Signalstoffe zur Induktion der Chemotaxis bei EC sind VEGF und bFGF (Lamallice u. a. 2007; Michaelis 2014). Sie bewirken durch Rezeptoranbindung und komplexe Signaltransduktionswege, die durch Aktinsynthese und -abbau gesteuerte Zellmigration. Die mechanistisch bisher am besten untersuchte Möglichkeit zur Induktion der Chemo- und/oder Haptotaxis von EC erfolgt durch den Wachstumsfaktor VEGF in der Angiogenese. Dazu sind in Abbildung 2.6 die wesentlichen zellulären Migrationsschritte sowie dafür zugrunde liegende intrazelluläre Prozesse

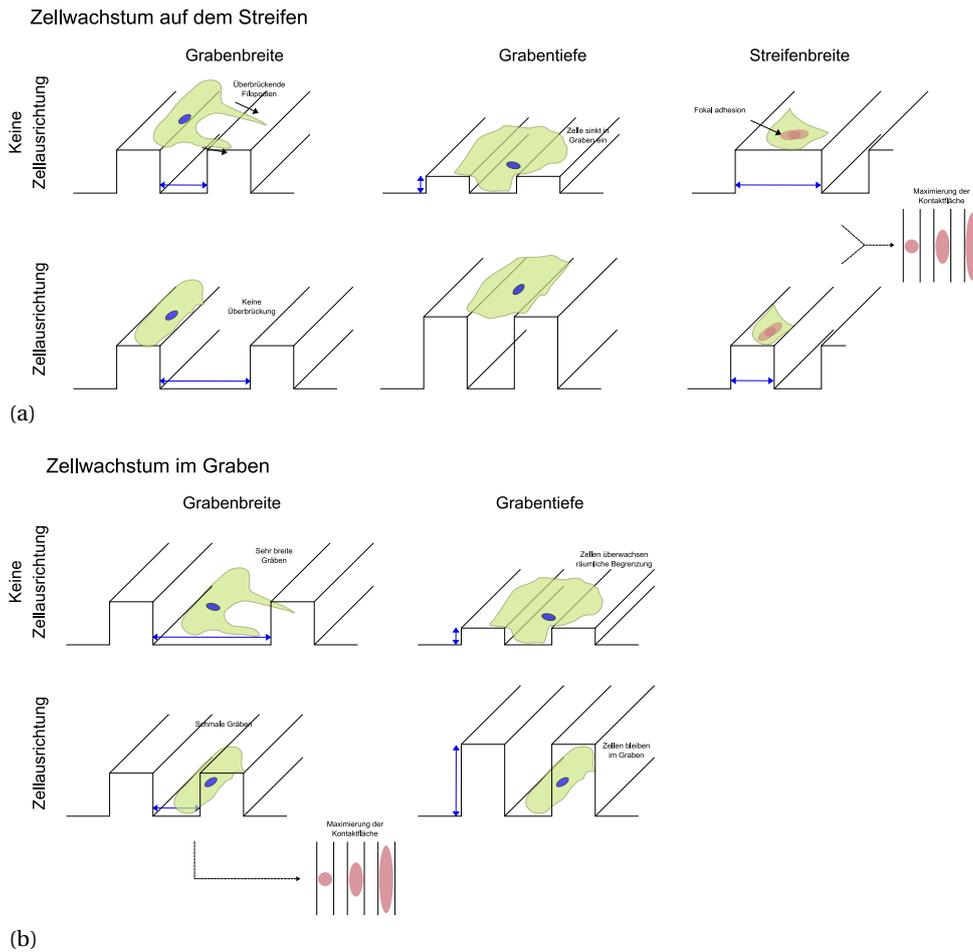


Abbildung 2.5.: Mechanismen des CONTACT GUIDANCE beim Zellwachstum auf anisotropen Mikro- und Nanotopographien. (a) Zellwachstum auf den Streifen. Bei ausreichend geringer Grabenbreite sind die Zellfilopodien in der Lage, den Abstand zu einem benachbarten Streifen zu überbrücken und sich somit homogen auszubreiten. Das entspricht der Theorie von Dunn und Heath (1976). Vergrößert man den Abstand, erreichen die Zellen keinen benachbarten Streifen und richten sich parallel zur Anisotropie aus. Bei sehr geringer Grabentiefe sinken die Zellen vom Streifen in den Graben ein und erfahren keine Ausrichtung. Wird die Grabentiefe erhöht, können die Zellen die Grabenwand hin zum Boden nicht überwinden und breiten sich ebenfalls parallel zur Anisotropie aus. Da Zellen bestrebt sind, ihre Kontaktfläche mit den Substrat zu vergrößern, richten sie sich auf schmalen Streifen stärker aus als auf breiten Streifen. (b) Zellwachstum in den Gräben. Die Bestrebung der Kontaktflächenvergrößerung gilt ebenso hier. Da das bei schmalen Gräben nur in Richtung der Anisotropie möglich ist, erfolgt die Ausrichtung der Zellen. Sind die Gräben dagegen breit, geschieht das nicht. Auch die Überwindung der Grabenwand kann nur bei flachen Gräben erfolgen, sodass die Zellen heraus auf den Streifen wachsen können und keine Ausrichtung stattfindet. Dagegen verbleiben die Zellen in tiefen Gräben und richten sich aus. Adaptiert aus Tamiello u. a. (2016) und erweitert.

dargestellt. Umfassende Übersichten geben Lamalice u. a. (2007) und Michaelis (2014).

In der Angiogenese im adulten Organismus werden neue Blutgefäße durch Sprossungs- oder Spaltungsvorgänge bestehender Vaskularitäten aufgebaut. Dafür müssen EC in die ECM migrieren, ein neues Lumen erzeugen und dieses stabilisieren. Die Migration der EC wird durch den Wachstums-

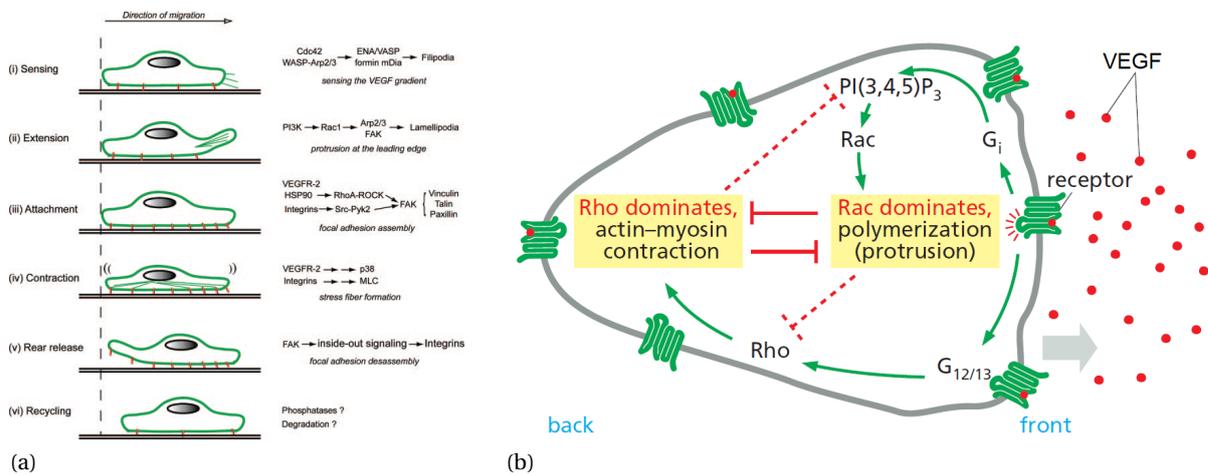


Abbildung 2.6.: Intra- und extrazelluläre Vorgänge bei der chemotaktischen Migration von EC.

(a) Die Endothelzellmigration kann in sechs Schritte eingeteilt werden: (i) Cdc42-abhängige Erkennung des Bewegungsstimulus durch Filopodien, (ii) Rac1-abhängige Zellstreckung durch hervorstehenden Lamellipodien, (iii) Anhaftung der Lamellipodien an die ECM (FOCAL ADHESION), (iv) Kontraktion der Zelle durch Stressfasern und Vorschub, (v) Ablösung des hinteren Zellendes durch Stressfaser-vermittelte Zugspannung und (vi) Recycling der beteiligten Komponenten. Entnommen und adaptiert aus Lamalice u. a. (2007). (b) An der Vorderseite der EC wird über den Rac-Signalweg die Aktinpolymerisation und damit der Vorschub in Richtung der VEGF-Konzentration hervorgerufen. Gleichzeitig blockiert die Rac-Aktivität antagonistisch die RhoA-ROCK-Aktivität und verschiebt sie an das Zellende. Durch RhoA-ROCK werden dort nun Stressfasern gebildet, deren Kontraktion zur Ablösung des Zellendes führt. Adaptiert und modifiziert aus Alberts u. a. (2002).

faktor VEGF angeregt, der von Zellen in einem Gewebe mit bspw. Hypoxie oder einem erhöhten Stoffwechsel in die ECM sezerniert wird. Bei der Chemotaxis diffundiert dieses unter Ausbildung eines Konzentrationsgradienten in das Gewebe, bindet an den VEGFR-II einer Endothelzelle (Tip-Zelle) und führt zur Polarisation dieser (Carter 1965) sowie zur Migration in Richtung der höchsten VEGF-Konzentration. Intrazellulär wird dabei durch die erhöhte VEGF-Anbindung an seinen Rezeptor an der Protrusionsseite der EC, durch Aktivierung des Rac- und Cell-division-control-protein-42-Signalweges (Cdc42), die Aktinpolymerisation in den vielen Filopodien in Richtung der ansteigenden VEGF-Konzentration hervorgerufen (Kater 1995; Welch und Mullins 2002; Cory und Ridley 2002; Gerhardt u. a. 2003) und rekrutierte FOCAL ADHESIONS an das Substrat gebunden. Gleichzeitig wird an der Vorderseite der Zelle die Aktivität von RhoA-ROCK blockiert und damit an die Zellrückseite verschoben. Das führt dort zur Ausbildung von Stressfasern (Aktin-Myosin-II-Filamente), die kontrahieren und damit die Ablösung vom Substrat realisieren (Sander u. a. 1999; S. Li u. a. 2005). Im weiteren Verlauf erfolgt der Abbau des Aktins in diesem Bereich der Zelle (Jay u. a. 1995; Lauffenburger und Horwitz 1996; Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996; Spiering und Hodgson 2011).

Im Vergleich zur Chemotaxis werden bei der Haptotaxis von EC die wesentlichen Signalwege zur Steuerung der Migration durch Integrinrezeptoren aktiviert. Dabei handelt es sich im Kern bei beiden Migrationsprozessen um die gleichen Signalwege (Legate u. a. 2009). Für die VEGF-induzierte EC-Migration werden die Integrine  $\alpha V \beta 3$ ,  $\alpha V \beta 5$  und  $\alpha 5 \beta 1$  benötigt und deren Expression hoch re-

---

guliert (Byzova u. a. 2000). Diese binden über fokale Adhäsionspunkte an die ECM und verknüpfen diese mit dem Zytoskelett der EC (Klemke u. a. 1997; Giancotti 2000). Dadurch können einerseits die Signalwege zur Induktion der Migration initiiert werden und andererseits mechanische Kräfte zur Bewerkstelligung der Migration direkt übertragen werden. Weiterhin können aber auch durch Integrinaktivierung an der Protrusionsseite weitere Integrine dorthin rekrutiert werden, was zu einer Verstärkung des Richtungssignals und damit zur Orientierung und gerichteten Migration führt (Hsu u. a. 2005).

Die Geschwindigkeit chemo- oder haptotaktischer Migration von Zellen *in vitro* hängt von den Kultivierungsbedingungen ab und liegt im Bereich von 10-50  $\mu\text{m}/\text{h}$  (Stokes u. a. 1991; Szabó u. a. 2010). *In vivo* können EC durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeiten von 10 - 20  $\mu\text{m}/\text{h}$  erreichen (Rupp u. a. 2004; Bauer u. a. 2009). Der Konzentrationsbereich von VEGF in Lösung, bei dem alle VEGFR-II an der Membranoberfläche von EC besetzt sind, wird mit 40 - 100  $\text{ng}/\text{mL}$  angegeben. Daher wird ein Gradientenprofil von 20  $\text{ng}/(\text{mL}\cdot\text{mm})$  VEGF als notwendig erachtet, um Chemotaxis auszulösen (R. R. Chen u. a. 2007; Shamloo u. a. 2008).

## 2.3. Aktuelle Konzepte im Tissue Engineering

Ziel des TE ist es, funktionsfähige Unterstützung oder Ersatz für beschädigte bzw. funktionsverminderte Gewebe oder Organe zu generieren. Dafür werden die natürlichen Eigenschaften und Fähigkeiten der Gewebe, insbesondere deren ECM, als Vorbild genommen, um so Zellfunktionen auf mehreren Ebenen zu regulieren.

Die Nachahmung der bereits in Abschnitt 2.1 auf Seite 5 genannten Eigenschaften der ECM ist Design-Grundlage für passgenaue TE-Anwendungen (Serban und Prestwich 2008). Der Fokus liegt dabei auf der Ableitung und Erzeugung von Zell- und Materialeigenschaften sowie der geeigneten Rekonstruktion der Gewebearchitektur (s. Abbildung 2.7). Die Kombination von Zell-Engineering, (bio-)chemischen Faktoren, besonderen Materialeigenschaften und geeigneten ingenieurwissenschaftlichen Verfahren ermöglicht anschließend die Förderung der Kultivierung von Zellen (Laurencin u. a. 1999).

In diesem Zusammenhang kann die Zellkultivierung auf Trägersystemen, den sogenannten Scaffolds, oder die Scaffold-freie Kultivierung unterschieden werden (Ovsianikov u. a. 2018). Scaffolds sind im TE eingesetzte, strukturelle Gerüste, die durch Auswahl geeigneter Materialien, Herstellungstechnologien und Zusatz biochemischer sowie biophysikalischer Komponenten ein vitales Zellwachstum fördern sollen. Sie werden entweder während oder nach deren Herstellung mit Zellen besiedelt. Dagegen wird das strukturelle Gerüst in der Scaffold-freien Zellkultur von den Zellen selbst produziert. Beide Herangehensweisen werden in der Grundlagen- und angewandten Forschung genutzt, um bspw. zelluläre Mechanismen zu untersuchen, Gewebeersatzmaterialien bereitzustellen oder definierte Zellfunktionen *in vitro* bspw. in Bioreaktoren oder Lab-on-a-Chip-Anwendungen zu nutzen (Moroni u. a. 2015).

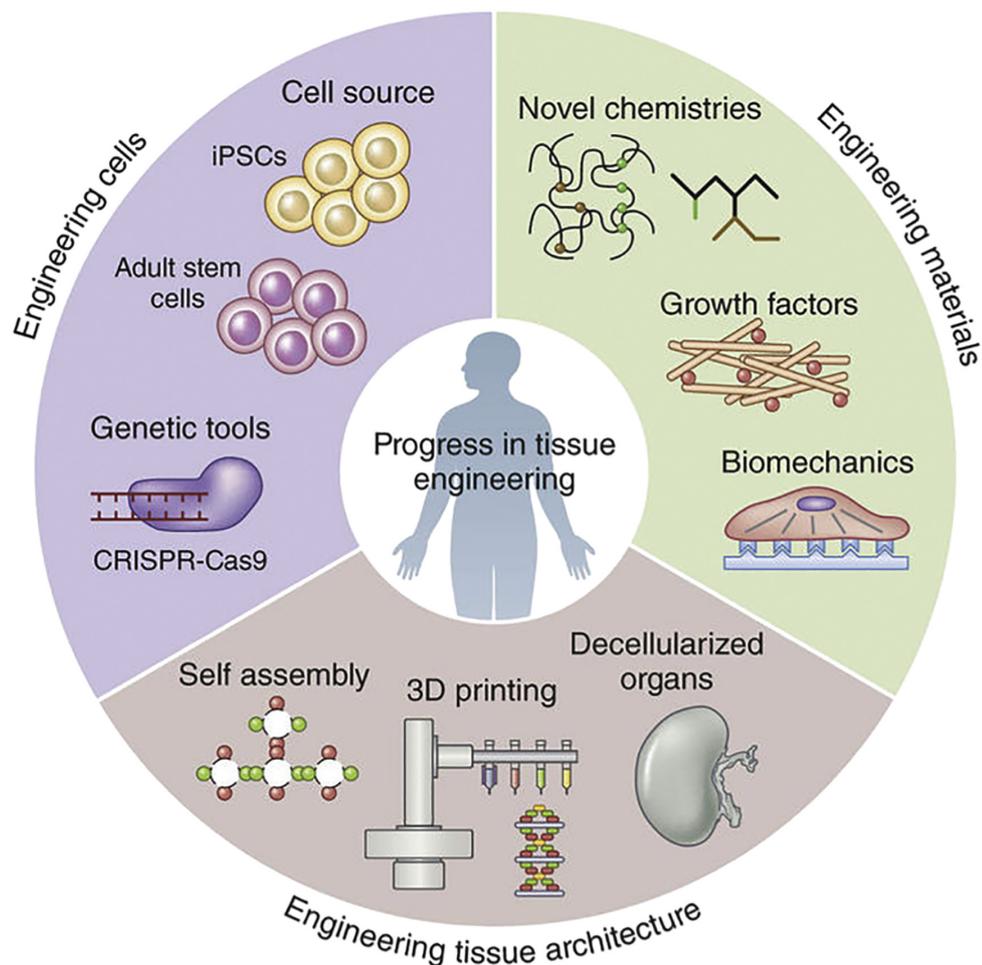


Abbildung 2.7.: Aktuelle Strategien im Tissue Engineering. Die technische Entwicklung der drei Komponenten Zellen, Scaffold-Material und Scaffold-Gewebe-architektur wird heutzutage als Voraussetzung für die erfolgreiche Anwendung von TE-Materialien angesehen. Entnommen aus Khademhosseini und Langer (2016).

### 2.3.1. Anforderungen an einen Scaffold

Die oben beschriebenen Basis-Anforderungen sowie spezielle Anforderungen, die sich aus der beabsichtigten Anwendung ergeben, müssen bei der Wahl des Scaffold-Materials besondere Berücksichtigung finden. Gleichzeitig muss das Material den Ansprüchen der Biokompatibilität gegenüber den *in vitro* verwendeten Zellen, dem umliegenden nativem Gewebe oder dem späteren Einsatzzweck gerecht werden. Beispielsweise darf es für den Einsatz in medizinischen Anwendungen nicht antigen, karzinogen, toxisch oder teratogen sein (Hutmacher u. a. 2015). Es bildet mit geeigneter, mindestens initialer mechanischer Stabilität und definierten biophysikalischen Eigenschaften den strukturellen Support für die darauf wachsenden Zellen. Darüber hinaus muss es die Erzeugung einer zweckmäßigen 3D Architektur des Scaffolds zur Förderung der Neuentwicklung des artifiziellen Gewebes, zur Infiltration von Zellen und für den Nährstoff-, Metabolit- sowie Gasaustausch ermöglichen. Dabei werden poröse Träger als vorteilhaft angesehen, da sie mit interkonnektiven Strukturen den Stofftransport, die Zellmigration und Zell-Zell-Kontakte ermöglichen. Grundvoraussetzung für ein geeignetes Scaffold-Material ist außerdem die Bereitstellung von Bindungsmotiven zur initialen Adhäsion der

---

Zellen. Dies kann direkt über das Material erfolgen (bspw. bei natürlichen ECM-Komponenten wie COL) oder durch die Ausstattung des Materials mit oberflächlich verankerten Adhäsionsmolekülen. Diese Oberflächeneigenschaften des Materials sollen außerdem für die gezielte Kontrolle der Zellmigration auf dem Trägermaterial nutzbar sein. Zur Steuerung des Zellverhaltens, zur Modulation der Differenzierung und damit zum Erhalt des Zellphenotyps spielt außerdem die zeitlich und räumlich kontrollierte Integration löslicher oder oberflächengebundener bioaktiver Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone und/oder Zytokine) in den Scaffold eine wesentliche Rolle. Mit Hinblick auf die Adaption des künstlichen Trägersystems in biologische Systeme muss auch die Degradier- und Remodellierbarkeit des Materials möglich sein, ohne dabei toxische Abbauprodukte zu generieren. Von besonderer Bedeutung beim Scaffold-Design sind außerdem Strategien zur Neovaskularisierung, die es ermöglichen, den *in vitro* erzeugten Träger an das bestehende Gefäßsystem anzubinden und durch integrierte Vaskularitäten im Scaffold die dauerhafte Versorgung der inhärenten Zellen zu gewährleisten (Nair und Laurencin 2006; Henkel und Hutmacher 2013; Giannitelli u. a. 2014; Hutmacher u. a. 2015; Ruvinov u. a. 2015; Mabrouk u. a. 2020).

### 2.3.2. Materialien für Scaffolds

Biodegradierbare synthetische und natürliche Polymere werden im TE als die idealen Scaffold-Materialien angesehen. Daneben werden zwar eine Vielzahl von nicht-degradierbaren Polymeren eingesetzt, die jedoch nur eingeschränkt biokompatibel sind und von darauf wachsenden Zellen nicht remodelliert werden können.

Die am meisten im TE angewendeten, synthetischen und biodegradierbaren Polymere sind Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA), Poly- $\epsilon$ -caprolacton (PCL) und ihre Copolymere. Aber auch Polyethylenoxid, Polyphosphoester und Polyanhydride stehen im Fokus der Untersuchungen. Sie zeichnen sich durch eine kostengünstige Herstellung mit spezifischen mechanischen Materialeigenschaften, eine einfache, vielfältige und reproduzierbare Prozessierbarkeit und definiert einstellbare Degradieraten aus. Jedoch sind sie stark in ihren Zell-Material-Interaktionen eingeschränkt und bedürfen zusätzlicher Modifikationen. Sie besitzen *per se* keine Adhäsionspunkte für Zellen, keine Bindungsstellen für bioaktive Moleküle zur Steuerung des Zellverhaltens und können nicht das morphologische Mikro- und Nanomilieu der Zellen nachahmen. Außerdem werden bei deren Remodellierung saure Degradierungsprodukte erzeugt, die zu lokalen Entzündungsreaktionen führen können (Fu u. a. 2000).

Dagegen besitzen natürliche biodegradierbare Polymere, wie z.B. COL, Gelatine, FN, HA oder Fibrin, für Zellen bekannte Adhäsionspunkte (z.B. RGD, LDV), stellen natürliche Reservoirs für Wachstumsfaktoren und Zytokine zur Verfügung, zeigen gute Hydratationseigenschaften und/oder besitzen in ihrer nativen Form mikro- und nanotopografische Eigenschaften, die für das native Zellwachstum von großer Bedeutung sind (Nair und Laurencin 2006). Die ECM-Vertreter zeigen zudem aufgrund ihres natürlichen Vorkommens die optimalen mechanischen Eigenschaften in nativer Form. Diesen Zustand zu rekonstruieren ist jedoch oftmals schwer. Auch die Isolierung aus nativen Geweben ist mit einem hohen Aufwand verbunden und sie unterliegen in ihren Eigenschaften „batch-to-batch“-

Unterschieden (Nair und Laurencin 2006; Davison u. a. 2015). Ebenso kann die Herkunft des natürlichen Polymers mit einem pathogenen oder antigenen Risiko behaftet sein.

### 2.3.3. Techniken zur Herstellung von Scaffolds

Unter Verwendung verschiedener Herstellungstechnologien werden Scaffolds mit den in Abschnitt 2.3.1 erwähnten biomimetischen Eigenschaften hergestellt. Aktuelle Entwicklungen fokussieren dabei auf

- Elektrosinning,
- 3D-Bioprinting-Techniken,
- Dezellularisierte Gewebe und
- Microfabrication-Techniken.

Beim Elektrosinning wird aus einer Polymerlösung oder -schmelze in einem Hochspannungsfeld ein Polymerfaden mit typischen Durchmessern von 0,2 - 5  $\mu\text{m}$  erzeugt. Elektrogewobene Fasern ermöglichen je nach Aufnahmeverfahren für den Faden die Erzeugung planarer oder tubulärer Konstrukte, die Ausrichtung der Fasern, die Einstellung einer definierten Porosität oder die Kombination mehrerer Polymere (Hutmacher u. a. 2015). Biodegradierbare Polymere wie Poly(milch-co-glycolsäure) (PLGA), PCL und Poly(L-lactid-co- $\epsilon$ -caprolacton) sowie COL und Elastin wurden dafür bereits verwendet (Pradeep Kumar u. a. 2019). Erste Anwendungen finden diese Scaffolds beispielsweise als Gefäßersatz (Karaman u. a. 2017) oder im TE von Knochengeweben (G. Chen und Kawazoe 2018) *in vivo* am Tiermodell.

3D-Bioprinting ist eine weiterentwickelte Form des Rapid Prototyping, bei dem durch schichtweises Auftragen biofunktionaler Materialien und Zellen, komplexe, heterogene und funktionale 3D-Scaffolds erzeugt werden (Ishita Matai u. a. 2020; Byambaa u. a. 2017). Dafür wurden Printing-Systeme entwickelt, die mit Mehrkanal-Druckköpfen mit parallelen oder Koaxial-Hohlnadeln oder mikrofluidischen Systemen, Ein- oder Mehrkomponenten-Tinten mit verschiedenen Komponenten auftragen können. Dafür wurden bereits Alginat, COL, Fibrin, Gelatine, Chitosan, HA, Polyethylenglykol, PLGA, Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat allein oder Kombinationen verwendet (Ashammakhi u. a. 2019). Die größte Herausforderung dieser Technologie ist die Konstruktion und Haltbarkeit der Architektur im Allgemeinen, da mit den oben genannten Tinten erzeugte Hydrogele nur geringe mechanische Stabilität, Resistenz gegen Degradierung und Langzeitstabilität von etwa 2-3 Wochen zeigen. Daraus lässt sich auch ein noch unzureichende Spektrum an verwendbaren Druckmaterialien(-kombinationen) schließen (Ashammakhi u. a. 2019). Außerdem sind die Anforderungen für eine geeignete Balance zwischen verwendeten Scaffold-Materialien, Zellen und Biomolekülen, noch Gegenstand aktueller Untersuchungen. Die Weiterentwicklung der Technologie wird beispielsweise bei der *in vitro* Konstruktion künstlicher Gewebe (Leber, Herz, Knorpel, Knochen, Gefäße) für die Regenerative Medizin durchgeführt (Khademhosseini und Langer 2016; Ashammakhi u. a. 2019; D. X. B. Chen 2019).

---

Eine weitere Möglichkeit multifunktionale Scaffolds für spezifische Anwendungen im TE zu generieren, ist die Verwendung dezellularisierter, nativer Gewebe (Herrmann u. a. 2015). Verwendet werden dabei autogene oder allogene native oder artifiziell erzeugte Gewebe, bei denen durch physikalische, enzymatische und/oder chemische Techniken, Zellen und immunogene Komponenten entfernt werden. Diese Scaffolds spiegeln wegen ihrer nativen Architektur, ihrer komplexen Zusammensetzung und des bestehenden vaskulären Netzwerkes die optimale Wachstums Umgebung der Zellen wider, sind jedoch in ihrer Verfügbarkeit eingeschränkt (Khademhosseini und Langer 2016; Hussein u. a. 2020). Anwendung findet diese Technik bspw. in der Erzeugung von Gewebe- und Organersatz für Herz und Blutgefäße (Amiel u. a. 2006).

Microfabrication-Techniken ermöglichen es ebenfalls, geeignete Zellkulturträger für TE-Anwendungen zu erzeugen. Unter diese Bezeichnung werden Verfahren zusammengefasst, mit denen Architekturen und Topographien im Mikrometermaßstab auf geeigneten Materialien generiert werden. Dazu zählen Photolithographie, Rapid Prototyping und Soft-Lithographie-Techniken, wie Microcontact-Printing, Mikroabformung und Mikrofluidik. Zusätzlich können mit diesen Techniken erzeugte Konstrukte durch Selbstassemblierung oder durch geführte Assemblierung zu hierarchisch aufgebauten 3D Scaffolds prozessiert werden (Cha u. a. 2015). Mit Microfabrication-Techniken lässt sich die Schnittstelle zwischen Zellen und dem Scaffold-Material im Mikrometermaßstab modifizieren, so dass den Anforderungen an oberflächliche Mikro- und Nanostrukturen, an die Präsentation und räumliche Verteilung bioaktiver Moleküle und an die Versorgung von Zellen gezielt nachgekommen werden kann.

#### **2.3.4. Scaffold-free**

Eine andere Möglichkeit zur Regeneration von Geweben sind Scaffold-freie Techniken. Dafür werden Zellen *in vitro* in Form von Sphroiden oder Cell-Sheets als multizelluläre Bausteine erzeugt, die gleichzeitig ihre eigene ECM mit spezifischen mechanischen und biofunktionalen Eigenschaften produzieren. Durch Fusion der Scaffold-freien Bausteine können 3D, multizelluläre Konstrukte realisiert werden, die mehrere Anforderungen an TE-Scaffolds erfüllen, wie bspw. die Ausstattung mit einer Vaskularisierung oder Nanotopographien (Takahashi und Okano 2015). Anwendung findet diese Herangehensweise z.B. bei der Erzeugung von Neovaskularitäten (Ovsianikov u. a. 2018) oder bei der gezielten Bereitstellung von Stammzellnischen (Prewitz u. a. 2013).

### **2.4. Scaffolds aus Collagen Typ I**

Durch sein verbreitetes Vorkommen in der nativen ECM verschiedener Organismen wird COL I als hervorragendes biomimetisches Scaffold-Material für TE-Anwendungen angesehen. Dabei existieren Organismen-übergreifend nur wenige Unterschiede in seinem Aufbau (Walters und Stegemann 2014). Es ist durch zelluläre Enzyme degradierbar und ermöglicht so die Remodellierung von Scaffolds und deren Integration in bestehende Gewebe (Hadjipanayi, Brown u. a. 2009). Außerdem besitzt

es eine vorteilhafte Immunogenität und ein kontrollierbares pathogenes Potential (z.B. Bovine Spongiforme Enzephalopathie), sodass Scaffolds daraus, im Vergleich zu synthetischen Biomaterialien, als körpereigenes Material angesehen werden (Sorushanova u. a. 2019). Durch inhärente biochemische und physikalische Signale kann COL I das Zellverhalten steuern. Beispielsweise vermitteln Bindungsmotive für Integrin-Rezeptoren die Zelladhäsion (Di Lullo u. a. 2002) oder die Festigkeit von COL I-Scaffolds beeinflusst die Zellproliferation (Hadjipanayi, Mudera u. a. 2009a), -migration (Hadjipanayi, Mudera u. a. 2009b) und -differenzierung (Buxton u. a. 2008). Herausforderungen bei der Erzeugung und dem Einsatz von COL I-Scaffolds stellen die mechanische und thermische Stabilität sowie die geringe Resistenz gegenüber enzymatischer Degradierung dar. Diese Eigenschaften können jedoch durch künstliche Vernetzung oder mechanische sowie thermische Behandlung des fibrillären COL I gezielt modifiziert werden (Gu u. a. 2019; Meyer 2019). Die inhärenten Eigenschaften des COL I und die exogenen, technischen Modifikationsmöglichkeiten machen es zu einem geeigneten Biomaterial für *in vitro*- oder klinische Anwendungen, das in einer Vielzahl 3D Scaffolds mit unterschiedlichen Formen, wie

- Dezellularisierte Gewebe (bestehend aus COL I und anderen Biomolekülen),
- Poröser Schwämme,
- Fasern,
- Mikrosphären sowie
- Hydrogele

erzeugt werden kann. Der folgende Abschnitt stellt die ersten vier Formen vor und gibt eine Übersicht über aktuelle Herstellungsmethoden und Anwendungsgebiete. Hydrogele und daraus erzeugbare Membranen aus COL I werden anschließend ausführlich in Abschnitt 2.4.2 erläutert.

### **2.4.1. Ein Überblick: Typen, Herstellungstechniken, Anwendungsgebiete**

#### **Dezellularisierte Gewebe**

Natürliche Gewebe stellen *per se* das ideale Wachstumsmilieu für Zellen dar. COL bildet dabei als Protein-Hauptbestandteil der meisten natürlichen ECM das mechanische Gerüst und stellt Interaktionsmöglichkeiten für Zellen und andere ECM-Moleküle bereit. Daher können durch die Dezellularisierung nativer Gewebe, biomimetische COL-basierte Scaffolds für TE-Anwendungen gewonnen werden. Eine Übersicht zu bereits verwendeten Ursprungsgeweben ist bei Abou Neel, Bozec u. a. (2012) zu finden.

Ziel bei der Erzeugung von dezellularisierten Gewebekonstrukten ist es, so viel von der ursprünglichen Zusammensetzung, der Mikro- und Makrostruktur, den mechanischen Eigenschaften und der biologischen Aktivität zu erhalten, um natives Zellwachstum zu ermöglichen (Abou Neel, Bozec u. a. 2012; Sicari u. a. 2015). Dabei werden nicht-collagene Bestandteile mit immunogenen Eigenschaften, wie z.B. globuläre Proteine, gebundene Glucose- und Galactose-Moleküle, Lipide, DNA und andere Zellkomponenten (Meyer 2019), entfernt. Signalmoleküle sollen dagegen teilweise erhalten bleiben.

---

Da autologe Transplantate in ihrer Verfügbarkeit limitiert sind, kommen vorrangig allogene oder xenogene Produkte aus Schwein, Rind oder Pferd (Badylak 2007; Song und Ott 2011), z.B. für die Regeneration in den Bereichen Haut (Annor u. a. 2012), Skelettmuskel (Borschel u. a. 2004) oder Herzklappen (Sanders u. a. 2016), zur Anwendung. Eine aktuelle Übersicht über klinisch angewendete dezellularisierte Konstrukte wurde von Sorushanova u. a. (2019) zusammengestellt. Die Verwendung dezellularisierter Gewebe im TE kann die Nachbildung komplexer Gewebe bis hin zu ganzen Organen ermöglichen. Allerdings bedürfen die Qualität und Kontrollierbarkeit der Dezellularisierungsprozesse sowie die anspruchsvolle Rezellularisierung intensiver Entwicklungsarbeit.

## **Poröse COL I-Scaffolds**

Die Erzeugung hochporöser COL I-Scaffolds ist eine weitere Möglichkeit zur Bereitstellung biomimetischer 3D Träger für TE-Anwendungen. Sie wurden durch Gefriertrocknung von COL I-Lösungen erzeugt, wobei die optimale Porengröße gleichermaßen für die erfolgreiche Zellinvasion und den Nährstoff- und Metabolittransport sowie die Zelladhäsion verantwortlich war (Byrne u. a. 2008). Die Porosität und Architektur konnte durch verschiedene Prozessparameter, wie z.B. die Geschwindigkeit der Gefriertrocknung oder die Eiskristallbildung, gesteuert werden (O'Brien 2004; Pawelec u. a. 2014; Pawelec u. a. 2015). Ebenso waren diese Scaffolds durch residierende Zellen remodellierbar, ermöglichten durch ihre Architektur die Erzeugung einer Vaskularisierung und vermittelten durch die Interkonnektivität der Poren Zell-Zell-Kontakte.

Poröse COL I-Schwämme wurden *in vitro* und *in vivo* am Tiermodell, vorrangig für die Wundheilung (Kanda, Morimoto, Takemoto u. a. 2012; Kanda, Morimoto, Ayvazyan u. a. 2014) oder die Regeneration von Knochengewebe (Pelaez u. a. 2014; R. Y. Kim u. a. 2014), aber auch im vaskulären TE angewendet und charakterisiert. Für eine ausführliche Übersicht siehe Sorushanova u. a. (2019) und Meyer (2019). Nach Besiedlung von COL I-Schwämmen mit einem einheitlichen Porendurchmesser von 80 µm mit humanen mikrovaskulären EC konnten kapillarähnliche Strukturen mit erkennbarem Lumen *in vitro* erzeugt werden. *In vivo* zeigten diese Scaffolds nach subkutaner Implantation in Mäusen ebenfalls eine Neovaskularisierung (E. C. Chan u. a. 2016). Klinische Anwendung finden poröse COL I-basierte Schwämme beispielsweise als blutstillende Mittel (Pachence 1996) oder in der Behandlung chronischer Hautgeschwüre (Morimoto u. a. 2013).

Neben reinen COL I-basierten porösen Schwämmen wurden ebenfalls umfangreiche Untersuchungen zu porösen COL I/HA-Kompositen durchgeführt. So wurden entsprechende Scaffolds für TE-Anwendungen entwickelt (Si-Nae Park, Jong-Chul Park u. a. 2002; Zhang u. a. 2005; Salchert u. a. 2004; S. Tang u. a. 2007) und auf deren Einsatzfähigkeit für bspw. die Haut- (Kubo und Kuroyanagi 2003; Si-Nae Park, Hye Jung Lee u. a. 2003), Knochen- (R. Fischer u. a. 2012) oder Nervengeweberegeneration (T.-W. Wang und Spector 2009) hin untersucht.

## **Fasern**

COL-Scaffolds in Form von (orientierten) Fasern können für TE-Anwendungen durch Extrusion oder elektrochemische Methoden erzeugt werden. Durch die geeignete Kombination von COL-Extrak-

tionsmethode, COL-Konzentration, Faserdurchmesser und Vernetzung der Fasern können dabei ähnliche mechanische Eigenschaften eingestellt werden, wie sie natürliche Gewebe besitzen (Ming-Che u. a. 1994; Gentleman u. a. 2003; Cheng u. a. 2008; Alfredo Uquillas u. a. 2012).

Das Elektrospinning von COL aus der Lösung heraus, wie es für viele synthetische Polymere (Fuller u. a. 2014) angewendet wird, ist dagegen nur sehr schwer möglich (Zeugolis, Khew u. a. 2008). Die Verwendung von reinem COL, gelöst in Wasser oder anderen organischen Lösungsmitteln, führt während des Elektrospinnings zur Denaturierung (Zeugolis, Khew u. a. 2008; Walters und Stegemann 2014). Neben toxischem 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (L. Buttafoco u. a. 2006; Matthews u. a. 2002) wurden COL-Fasern aus Kombinationen von wässrigem Ethanol, Natriumchlorid und Polyvinylalkohol erfolgreich erzeugt (Dong u. a. 2009). Zur weiteren Erhöhung der mechanischen Stabilität wurden Vernetzungsstrategien entwickelt (T. Liu, Teng u. a. 2010; Mekhail u. a. 2011; Q. Jiang u. a. 2013) und ebenso weitere Additive, wie z.B. Elastin (L. Buttafoco u. a. 2006; Rnjak-Kovacina u. a. 2012), HA (R. L. Fischer u. a. 2012), Chitosan (Z. G. Chen u. a. 2010; L. Chen u. a. 2011), Hydroxylapatit (Thomas u. a. 2007; Ji u. a. 2012) oder verschiedene synthetische Polymere (Yin u. a. 2013; D. W. Chen u. a. 2012; Powell und Boyce 2009), zum COL hinzugegeben. Mit diesen wurden Materialien für die Knochenregeneration, den Gefäßersatz oder die Hautregeneration erzeugt. Dabei zeigten durch Elektrospinning erzeugte COL-Fasern ein besseres Zelladhäsionsvermögen als ähnliche Materialien aus reinen synthetischen Polymeren. Sie besitzen aber nicht vollständig die Eigenschaften nativer COL-Fibrillen (Walters und Stegemann 2014).

## **Mikrospheren**

Mikrospheren aus COL I mit Dimensionen im unteren Mikrometer-Bereich finden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Speicherung von bioaktiven und therapeutischen Molekülen sowie ihrer kontrollierbaren Biodegradierbarkeit ebenfalls Einsatz als System zum Transport und zur lokalen und kontinuierlichen Bereitstellung der Moleküle. Die Herstellung erfolgt dabei durch Emulsions-, Spray-Trocknungs-, Mikrophasenseparation- oder Templat-Abformtechniken (Sehgal und Srinivasan 2009; O. C. M. Chan u. a. 2008; Browne u. a. 2012). Solche Scaffolds wurden bereits hinsichtlich ihrer Fähigkeiten zum Gen- (Browne u. a. 2012; Helary u. a. 2012), Wachstumsfaktor- (Kraskiewicz u. a. 2013), und Wirkstofftransport (Likhitanichkul u. a. 2015) untersucht bzw. angewendet.

### **2.4.2. Hydrogele**

COL I-Fibrillen aggregieren in nativen Weichteilgeweben zu kolloiden unlöslichen Fasernetzwerken, die einen sehr hohen Anteil Wasser binden können und dadurch in Form eines Hydrogels vorliegen – im Folgenden als COL I-Hydrogel bezeichnet. Durch die Zugabe verdünnter Säuren werden die Fibrillen in die Tropocollagen-Moleküle degradiert und können so in Lösung gebracht werden. Dieser Prozess ist umkehrbar und ermöglicht es, artifizielle COL I-Hydrogel-Scaffolds mit einer Vielzahl von Formen, Zusammensetzungen und biologischen sowie mechanischen Eigenschaften zu erzeugen. Diese Reassemblierung erfolgt unter physiologischen Bedingungen von neutralem pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur.

---

COL I-Hydrogele repräsentieren die Eigenschaften von Weichteilgeweben besser als andere Scaffold-Typen (Soruschanova u. a. 2019). Sie bilden ein flexibles Netzwerk aus COL I-Fasern, das durch Zellen leicht deformiert und remodelliert werden kann (Meghezi u. a. 2017) und *per se* geeignete Zelladhäsionspunkte besitzt. Das in der verflochtenen Struktur des COL I-Hydrogels enthaltene Wasser ermöglicht den einfachen Austausch von Ionen, Nährstoffen und Metaboliten mit der umliegenden Umgebung (Abou Neel, Cheema u. a. 2006).

Im Reassemblierungsprozess können, neben Zellen, weitere Komponenten zur Nachahmung gewebespezifischer Eigenschaften im Sinne eines modularen Baukastensystems hinzugegeben werden. Zu ihnen zählen synthetische Komponenten (für eine Übersicht siehe Walters und Stegemann (2014)), aber besonders auch natürliche ECM-Bestandteile, wie z.B.

- FN (Deister u. a. 2007),
- HA (W. Xu u. a. 2011; Franz u. a. 2013; R. L. Fischer u. a. 2012),
- VEGF (Guex u. a. 2014; Q. He u. a. 2011; Steffens u. a. 2004),
- Fibrin (Cummings u. a. 2004; Rowe und Stegemann 2006; Rowe und Stegemann 2009; Lai u. a. 2012),
- Hydroxylapatit (Cunniffe u. a. 2010; Sionkowska und Kozłowska 2013; Quinlan u. a. 2015; Calabrese u. a. 2016; Bharadwaz und Ambalangodage C. Jayasuriya 2020) oder
- Elastin (Berglund u. a. 2004; Grover u. a. 2012).

Mit diesen Bausteinen lässt sich *in vitro* die komplexe Zusammensetzungen nativer Gewebe auf zellulärer und biochemischer Ebene in COL I-basierten Scaffolds nachahmen und spezifisch an Zelltypen, Kultivierungsbedingungen und Kultivierungsziele anpassen (Leung und Sefton 2010; Eng u. a. 2013; Ruprecht u. a. 2017).

## Herstellungstechniken

3D-Hydrogele aus COL I-Fibrillen mit geeigneter Architektur lassen sich durch Mikrofluidik (M. D. Tang u. a. 2004; Nazhat u. a. 2007; Mu u. a. 2013), Microcontact-Printing (M. D. Tang u. a. 2003; Chrobak u. a. 2006) oder Abformungstechniken (Walters und Stegemann 2014) mit Auflösungen von  $< 1 \mu\text{m}$  erzeugen. Diese Verfahren sind auch für die Herstellung größerer Konstrukte für experimentelle und therapeutische Anwendungen geeignet. Überwiegend werden damit vorgefertigte Template ausgegossen, beschichtet oder frei handhabbare Konstrukte erzeugt. Für mechanische Analysen wurden aber auch Ringe, Scheiben, Quader oder Zylinder (Seliktar u. a. 2000; Rowe und Stegemann 2006) sowie individuelle Konstrukte, z.B. zur Integration in Messapparaturen (Liao u. a. 2005; Bian u. a. 2009; Legant u. a. 2009; B. K. Chan u. a. 2012), hergestellt.

Die räumliche Struktur der COL-Fibrillen in nativen Geweben basiert auf der komplexen und dynamischen Einwirkung mechanischer Kräfte, die durch Zellen oder andere Gewebekompartimente hervorgerufen werden. Daher wurden in Ergänzung der oben beschriebenen Technologien auch Verfahren entwickelt, die auf die gezielte Gestaltung der COL-Fibrillenstruktur abzielen. Dazu zählen

(zellinduzierte) Zugbelastungen des fibrillären Netzwerkes (Voge u. a. 2008), fluide Strömungen (Ng und Swartz 2003; Ng und Swartz 2006), mikrofluidische Techniken zur Erzeugung von Gradienten mechanischer Eigenschaften (Sundararaghavan, Monteiro u. a. 2009), die Ausrichtung von COL-Fibrillen durch Magnetfelder (Torbet und Ronzière 1984; Ceballos u. a. 1999; Yang u. a. 2009; Novak u. a. 2015) und Kompressionstechniken von COL I-Hydrogelen (Bitar u. a. 2007; Vader u. a. 2009; Serpooshan, Muja u. a. 2011).

### **Mechanische Eigenschaften**

Die Isolierung von COL I aus nativen Geweben führt zur Deassemblierung der nativen Fibrillenstruktur. Artificielle COL I-Hydrogele weisen außerdem durch den hohen Wassergehalt einen ausgeprägten Quellungszustand auf. Durch diese beiden Umstände besitzen reine reassemblierte COL-Hydrogele eine geringe mechanische sowie thermische Stabilität (Charulatha 2003; Delgado, Pandit u. a. 2014), eine hohe Degradationsanfälligkeit (K. Y. Lee und Mooney 2001; Roeder u. a. 2002; Achilli u. a. 2012; Meghezi u. a. 2017; L. Li u. a. 2019) und eine verminderte Biokompatibilität (Abou Neel, Bozec u. a. 2012). Die ursprüngliche mechanische Stabilität des Gewebes vor dem Isolationsprozess lässt sich durch die Reassemblierung des COL I nicht wieder erreichen (Meghezi u. a. 2017). Zu Verbesserung der mechanischen Festigkeit und Beanspruchbarkeit von COL-Hydrogelen wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die auf der Interaktion mit Zellen, der Inkorporation anderer Biomaterialien, der Vernetzung der COL-Fibrillen oder der Kompression des Hydrogels basieren (Abou Neel, Bozec u. a. 2012). Eine umfangreiche Übersicht zur mechanischen Stabilität von COL I-basierten Hydrogel-Scaffolds ist in Meghezi u. a. (2017) zu finden.

### **Chemische Vernetzung**

Zur Erhöhung der mechanischen Stabilität kann COL I durch physikalische, enzymatische und chemische Techniken vernetzt werden. Die beiden erstgenannten erzeugen deutlich schwächere Bindungen (Sorushanova u. a. 2019) und werden daher seltener angewendet (X. Tang und Bruce 2009). Ein Überblick über die Verfahren sind bei Gu u. a. (2019), Meyer (2019) und Sorushanova u. a. (2019) zu finden. Im Folgenden wird nur die chemische Vernetzung genauer erläutert.

Durch die chemische Vernetzung können COL I-basierte Scaffolds mit verbesserter Festigkeit (Charulatha 2003; Lakra u. a. 2015; Martínez u. a. 2015) und Zugbelastbarkeit, verbessertem Kompressionsmodul (Y.-C. Chen u. a. 2017) und reduzierter Dehnfähigkeit (Kishore u. a. 2016) erzeugt werden. Außerdem erhöht sie die Resistenz gegenüber thermischer Belastung (X. Wu, A. Liu u. a. 2018), enzymatischer Degradierung (Zeugolis, Paul u. a. 2009; Delgado, Bayon u. a. 2015) und ermöglicht eine Hydratationskontrolle (Rault u. a. 1996).

Für die inter- oder intramolekulare Vernetzung der COL I-Moleküle kommen die Carboxylfunktionen der Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure bzw. des C-Terminus sowie Amino- und Hydroxylfunktionen von Lysin, Serin, Tyrosin bzw. der N-Terminus in Frage. Durch deren Präsenz ergeben sich verschiedene Vernetzungsreagenzien, die entweder als Verbindungsmolekül eingebaut werden oder

Tabelle 2.2.: Potentielle chemische Vernetzer für COL I-basierte Hydrogele. Dargestellt sind Vor- und Nachteile bei der Anwendung, mechanische Eigenschaften von COL I-Hydrogelen als Bereich, basierend auf verschiedenen Präparationen nach Vernetzung, und Anwendungsbeispiele. <sup>1</sup>Aus Sorushanova u. a. (2019) und (Gu u. a. 2019).

Vernetzer	+ Vorteile – Nachteile	Mechanische Eigenschaften <sup>1</sup>	Anwendungsbeispiele
Kein	+ Gute Biokompatibilität – Geringe mechanische Stabilität	Druck 20-27 kPa, Dehnung 25-30 %, E-Modul 0,2-100 kPa	-
EDC	+ Zero-length Crosslinker (verbleibt nicht im Hydrogel) + geringe Toxizität + wasserlöslich – Geringe Entzündungsreaktionen	Druck 10-172 kPa, Dehnung 25-40 %, E-Modul 2-125 kPa	Pieper u. a. (2000), Sung u. a. (2003), Powell und Boyce (2006), Barnes u. a. (2007), J. Li u. a. (2013), J. C. Lee u. a. (2015), Y. Wang u. a. (2017), T. Liu, Dan u. a. (2017) und Versteegden u. a. (2017)
Glutaraldehyd	+ Sehr gute Verbesserung der mechanischen Eigenschaften und Widerstandsfähigkeit gegen Biodegradierung – Verbleibt im Hydrogel (kann wieder freigesetzt werden) – Hohe Toxizität – Selbstpolymerisation	Druck 10-188 kPa, Dehnung 25-30 %, E-Modul 4-100 kPa	Siriwardane u. a. (2014)
Genipin	+ Natürlicher Vernetzer + Gute Verbesserung der mechanischen Eigenschaften und Widerstandsfähigkeit gegen Biodegradierung – Geringe Entzündungsreaktionen	-	Sung u. a. (2003), Siriwardane u. a. (2014) und X. Li, J. Xu u. a. (2017)

nur die Reaktivität der COL I-eigenen funktionellen Gruppe verbessern. Intensiv untersucht für die Vernetzung von COL I wurden dabei bifunktionelle Aldehyde, Isocyanate, Carbodiimide (Rault u. a. 1996; Kozłowska und Sionkowska 2015), Epoxide (Meyer 2019) und natürliche Reagenzien (Nagaoka u. a. 2014; Seseogullari-Dirihan u. a. 2015; H. Tan u. a. 2015). Tabelle 2.2 fasst eine Auswahl wichtiger Vertreter zusammen und listet Vor- und Nachteile sowie die Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften von COL-Hydrogel-Scaffolds auf.

Glutaraldehyd wurde umfassend für *in vitro* Anwendungen im TE untersucht (Gu u. a. 2019; Meyer 2019). Es reagiert mit Aminofunktionen im COL I-Molekül zu stabilen Imingruppen. Da es jedoch eine hohe Zytotoxizität besitzt und im vernetzten Material verbleibt, führt es bei erneuter Freisetzung zu zellschädigenden Reaktionen. Obwohl es trotzdem Einsatzgebiete gibt (X. Wu, Black u. a. 2007; Siriwardane u. a. 2014), wird daher seine Anwendung im TE als kritisch angesehen.

Dagegen ist das wasserlösliche 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) ein zero-length-

Vernetzer, d.h. es wird nicht als Vernetzungsbaustein in das Material inkorporiert. EDC aktiviert die Carboxylgruppen von Asparagin- und Glutaminsäure durch Bildung eines reaktiven Intermediats, so dass dieses mit Nucleophilen anderer Aminosäuren reagieren kann. Die Reaktion wird meist durch N-Hydroxysuccinimid (NHS) unterstützt, welches mit den Carboxylgruppe stabile reaktionsfähige Zwischenprodukte bildet (Meyer 2019). Diese Technik führt zu COL-Hydrogelen mit verbesserter mechanischer Stabilität ohne toxische Eigenschaften (Everaerts u. a. 2008; Bou-Akl u. a. 2013).

Dem natürlich im Extrakt der Frucht des Jenipapo-Baums (*Genipa americana*) enthaltene Genipin wird aufgrund seiner Herkunft eine hohe Biokompatibilität zugeschrieben. Es reagiert mit den Aminogruppen der COL I-Moleküle und verbleibt als Vernetzungsbaustein im Material. Bei der Entscheidung zum Einsatz in TE-Anwendungen müssen jedoch sein hoher Preis, die bei natürlichen Vernetzern verbreitete geringe Lagerungsstabilität, das verminderte Vernetzungsvermögen im Vergleich zu synthetischen Vernetzern und das Risiko einer Verfärbung der vernetzten Biomaterialien berücksichtigt werden (Gu u. a. 2019).

### Plastic Compression

Die Steigerung der mechanischen Stabilität von COL I-Hydrogelen kann ebenfalls durch die Verdichtung des COL-Fibrillen-Netzwerks im Hydrogel mit Hilfe der Plastic-Compression-Technik erreicht werden (Busby u. a. 2013; Braziulis u. a. 2012; Engelhardt u. a. 2010; Hu u. a. 2010; Brown u. a. 2005). Die Kompression der COL I-Hydrogele wurde durch die Schwerkraft definierter Gewichte erreicht (s. Abbildung 2.8a) und ermöglichte gleichzeitig die Steuerung der Fibrillendichte (Bitar u. a. 2007) und Porengröße (Serpooshan, Muja u. a. 2011). Die Verdrängung der Flüssigkeit war dabei zeit- und gewichtsabhängig. Im Ergebnis wurden kompakte und irreversibel verformte COL I-Membranen mit Dicken von 30 - 50  $\mu\text{m}$  erhalten. Außerdem schrumpfte das Volumen der Hydrogele um etwa das

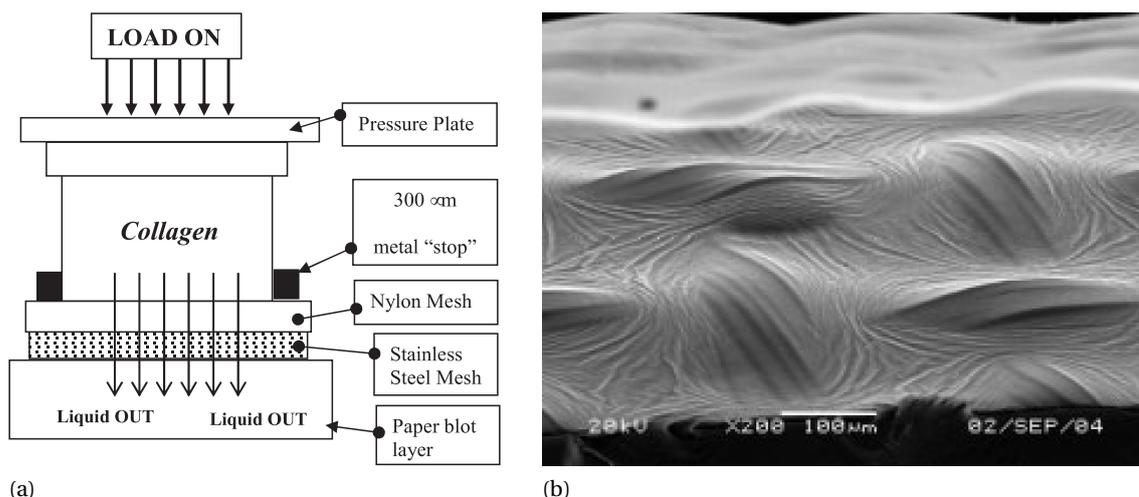


Abbildung 2.8.: Ablauf und Resultat des Plastic-Compression-Prozesses. (a) Durch Auflegen definierter Gewichte auf eine COL I-Hydrogel wurde die Flüssigkeit auf der gegenüberliegenden Seite durch einen Nylonfilter herausgepresst. (b) In der finalen komprimierten COL I-Membran war die Übertragung der Topographie des Nylonfilters mittels REM erkennbar. Aus Brown u. a. (2005).

---

100fache und zeigte einen Anstieg der COL I-Konzentration um den Faktor 7 - 10 (Abou Neel, Cheema u. a. 2006; Bitar u. a. 2007). Einen umfangreichen Überblick über den Plastic-Compression-Prozess liefern Abou Neel, Bozec u. a. (2012).

Die Anwendung dieser Technik auf COL I-Hydrogele ermöglicht eine räumliche Reorganisation und initiale Orientierung der Fibrillen, die bei anderen Scaffolds meist erst durch die darauf residierenden Zellen ausgeführt wird (Barocas und Tranquillo 1997; Vader u. a. 2009; Soares u. a. 2011). So wurden in dem Zusammenhang lamellare anisotrope COL-Fibrillenlagen an der Membranoberfläche beobachtet (Brown u. a. 2005). Weiterhin konnten auf der COL I-Membranoberfläche stabil eingeprägte Topographien nachgewiesen werden (s. Abbildung 2.8b), die sich beim Anlegen uniaxialer Spannungen ausrichteten (Brown u. a. 2005). Diese wurden vom Nylonnetz übertragen, welches als Drainage für das Abführen der Flüssigkeit während des Kompressionsprozesses diente. Dieser Effekt wurde auch für die gezielte Erzeugung anderer Mikro-Topographien verwendet (Alekseeva u. a. 2012).

Durch Plastic-Compression erzeugte COL I-Scaffolds zeigten *in vitro* einen Erhalt der Zellvitalität und eine Verbesserung von Wachstum und Stoffwechsel im Vergleich zu unkomprimierten Hydrogelen (Abou Neel, Cheema u. a. 2006; Nazhat u. a. 2007; Ghezzi u. a. 2011). Das wurde auf die Verkürzung des Diffusionsweges von Sauerstoff und Nährstoffen in den Kern des Scaffolds durch die Kompression zurückgeführt. Es zeigte sich jedoch bei mehrfachem Anwenden des Verfahrens, dass ab einem bestimmten Punkt die kontinuierliche Erhöhung der Dichte der COL I-Fibrillen zur Verminderung der Diffusionsfähigkeit von Nährstoffen und damit zur Unterversorgung der Zellen führt (Cheema u. a. 2012). Weiterhin wurde die Anwendbarkeit dieser Scaffolds für die Regeneration von Knochen (Serpooshan, Julien u. a. 2010), als Alternative für amniotische Membranen in der Regeneration des Augen-Hornhautepithels (Mi u. a. 2010; Levis u. a. 2010), in der Hautregeneration (Braziulis u. a. 2012; Hu u. a. 2010) und als Blasenersatz untersucht (Engelhardt u. a. 2010).

## **Membranen und Tubes aus Hydrogelen**

COL I findet als Film zur Beschichtung von weniger biokompatiblen Materialien (Meyer 2019; Soroushanova u. a. 2019) oder frei handhabbar als Membran Anwendung im TE (Vernon u. a. 2005b). Für die Herstellung Letzterer können viele der bereits erwähnten Techniken mit gelöstem oder bereits fibrillärem COL I verwendet werden. Am Ende des Herstellungsprozesses erfolgt lediglich die Verdampfung des enthaltenen Wassers. Durch den Zusammenfall der räumlichen Struktur des ursprünglichen Hydrogels und der damit einhergehenden Adhäsion der COL-Moleküle untereinander im getrockneten Zustand steigt die mechanische Stabilität der Membranen. Bei erneuter Quellung verlieren sie jedoch diese Eigenschaft wieder (Meyer 2019).

Membranen aus COL I können durch verschiedene Techniken, wie z.B. Soft Lithography oder mikrofluidische Verfahren, mit Mikro- und Nanostrukturen in Form von oberflächlichen Gräben, Kavitäten oder Noppen ausgestattet werden (Vernon u. a. 2005a; P. Lee u. a. 2006; Golden und J. Tien 2007; Zorlutuna, Hasirci u. a. 2008; Zorlutuna, Elsheikh u. a. 2009; Zorlutuna, Vadgama u. a. 2010). Ausführlichere Erläuterungen zu mikrostrukturierten COL I-Membranen und *in vitro* Anwendungen werden in Abschnitt 2.4.3 gegeben.

Durch Zusammenrollen von COL-Membranen und -Filmen lassen sich außerdem tubuläre Scaffolds erzeugen, die klinisch bspw. als Leitkanal (z.B. NeuraWrap, NeuroMend, NeuroMatrix und NeuraGen) für die Nervenregeneration angewendet werden (Abou Neel, Bozec u. a. 2012; S.-T. Li u. a. 1992). Ebenso können durch Elektrosponning oder 3D-Druck von COL I tubuläre Scaffolds erzeugt werden (Boland u. a. 2004; Ashammakhi u. a. 2019).

### **2.4.3. Mikrostrukturen zur Orientierung adhärenter Zellen**

Topografische Strukturen in der nativen ECM beeinflussen die Zellform, -adhäsion und -migration (Ramirez-San Juan u. a. 2017; D.-H. Kim, Provenzano u. a. 2012; Petrie u. a. 2009; Reig u. a. 2014). Dieser Einfluss wird bis auf subzelluläre Strukturen, wie Filopodien oder den Zellkern, übertragen (Fujita u. a. 2009; McKee u. a. 2011). Außerdem können durch anisotrope Mikro- und Nanostrukturen der Phenotyp primärer Zellen (Ballester-Beltrán u. a. 2015), die Differenzierung von Stammzellen (Watari u. a. 2012; P.-Y. Wang u. a. 2012) sowie die Genexpression gesteuert werden (Gasiorowski u. a. 2013). Dieser als CONTACT GUIDANCE bekannte Prozess wurde bereits in Abschnitt 2.2.2 auf Seite 14 genauer mechanistisch beschrieben.

*In vivo* weisen Basalmembranen einen komplexen Mix an Nanostrukturen, wie Kavitäten, Poren oder Riefen, im Größenbereich von 5 - 200 nm auf. Sie dienen ihnen zur Ausführung ihrer nativen Funktionen (Lim und Donahue 2007). Vaskuläre EC sind in ihrer nativen Umgebung entlang der Strömungsrichtung des Blutes ausgerichtet (Vartanian u. a. 2008). Da die Wechselwirkungen zwischen den EC und der zur Gefäßwand gehörenden Basallamina immer bidirektional sind (Ingber 2003; Discher u. a. 2005), haben sie dadurch direkten Einfluss auf die Struktur, mechanische Integrität und Elastizität der Gefäße. Ebenso ist das Vorhandensein von anisotropen Mikro- und Nanotopographien in der ECM ein Stimulus bei neuronalen Zellen zum gerichteten Auswachsen von Neuriten (M.-H. Kim u. a. 2014).

CONTACT GUIDANCE ist außerdem ein wichtiger Trigger für die Zellmigration (Kubow u. a. 2017). Sie spielt bei vielen biologischen Prozessen, wie z.B. der Chemo- und Haptotaxis (vgl. Abschnitt 2.2.3 auf Seite 15), der Wundheilung oder bei verschiedenen pathologischen Vorgängen, wie der Krebszellinvasion, eine wichtige Rolle. Bevor die Migration stattfindet, richten sich die Zellen durch regelmäßige mechanische Dehnung der ECM oder durch anisotrope Geometrien aus (Ray u. a. 2017). Basierend auf der dadurch induzierten Polarisierung und Organisation von Zellen im Gewebe besitzen anisotrope Strukturen daher die Fähigkeit, direkten Einfluss auf die Zellmigration auszuüben (Buskermolen u. a. 2019).

Neben *in vivo* Zellreaktionen auf anisotrope Strukturen konnten diese Prozesse auch *in vitro* bei Zellen auf strukturierten COL I-basierten TE-Scaffolds beobachtet werden. Daher gehört die Integration anisotroper Strukturen in die Herstellung dieser Scaffolds zu den grundlegenden Konzepten zur biomimetischen Kontrolle der Zellfunktion durch die Architektur des Scaffolds (vgl. Abschnitt 2.3 auf Seite 18). In diesem Zusammenhang angewendete anisotrope Strukturen können in drei Kategorien unterteilt werden: (1) 2-dimensionale Wachstumslimitationen, (2) 3-dimensionale Topographien oder (3) ausgerichtete COL-Fibrillenbündel (Provenzano u. a. 2008; Lanfer u. a. 2008; Ceballos u. a. 1999). Herstellungstechniken und Einflüsse auf das Zellverhalten für die beiden erstgenannten Kate-

---

gorien werden in diesem Abschnitt genauer erläutert. Einen ausführlicheren Überblick über Techniken zur Erzeugung von 2D Mikrostrukturen auf Oberflächen für TE-Anwendungen geben Falconnet u. a. (2006) , Lima u. a. 2014 und Cha u. a. 2015.

## 2D Mikrostrukturen

Die Ausrichtung von Zellen kann auf planaren Oberflächen durch 2D Mikrostrukturen erfolgen, die in Form von alternierenden adhäsionsvermittelnden und adhäsionsverhindernden Mustern erzeugt werden. Typische Soft Lithography-Techniken zur Erzeugung der Strukturen sind Mikrofluidik, Microcontact Printing oder davon abgeleitete Verfahren (Anderson und Hinds 2011).

Bei Mikrofluidik werden 3D Mikrokanäle von einem Silizium-Wafer auf einen PDMS-Master übertragen. Diese werden anschließend auf Glasoberflächen aufgelegt, sodass die Mikrokanäle verschlossen sind und von Lösungen durchflossen werden können. Damit können definierte 2D Beschichtungen mit Strukturen bis zu 5 µm erzeugt werden (Anderson und Hinds 2011). Zum Beispiel wurden mit dieser Technik 25 µm breite Streifen aus nicht-fibrillärem COL I hergestellt, zwischen denen Bovines Serumalbumin (BSA) oder Pluronic F108 aufgebracht war. Ausgesäte EC sowie Endothelkoloniebildende Zellen wuchsen nur auf den Streifen und zeigten eine Streckung sowie die Ausrichtung des Aktins parallel zu den Streifen (Hagen und Hinds 2019; Vartanian u. a. 2008). Ebenso konnte auf 20 µm und 30 µm breiten Streifen aus COL I die Ausrichtung von bovinen glatten Muskelzellen, wie Abbildung 2.9a zeigt, erreicht werden (Thakar u. a. 2003). Eine Weiterentwicklung der mikrofluidischen Abscheidung von COL I beinhaltet die *in situ* Ausrichtung von COL I-Fibrillen durch laminare Strömung. Dazu wurde Tropocollagen-Lösung durch ein mikrofluidisches Kanalsystem gepumpt und gleichzeitig zur Fibrillogenese angeregt. Im Ergebnis konnten parallel ausgerichtete COL I-Fibrillen erhalten werden, die gleichzeitig die Möglichkeit zur 2D Wachstumslimitationen besitzen (Lanfer u. a. 2008).

Beim Microcontact Printing wird die mikrostrukturierte Oberfläche eines PDMS-Masters mit einer Lösung beschichtet. Anschließend wird dieser Stempel auf eine planare Oberfläche aufgepresst, sodass von den höheren Flächen des Stempels die Substanz auf die neue Oberfläche übertragen wird (Anderson und Hinds 2011). Häufig werden natürliche adhäsionsvermittelnde ECM-Bestandteile wie FN (Müller u. a. 2014; Hauff u. a. 2015) oder Laminin (D.-Y. Wang u. a. 2007) aufgetragen. Dagegen wird die Erzeugung von 2D COL I-Mikrostrukturen mit dieser Technik wenig in der Literatur beschrieben (C. S. Chen u. a. 1997).

Eine vom Microcontact Printing abgeleitete Technik wendeten G. Li u. a. (2019) an. Sie erzeugten hierarchisch angeordnete Mikrostreifen aus nicht-fibrillärem COL I von 10 - 50 µm durch Aufpressen eines PDMS-Stempels auf eine planare Glasoberfläche, auf der sich ein Tropfen nicht-fibrillärer COL I-Lösung befand. Nach der Trocknung waren die Kontaktbereiche zwischen PDMS-Stempel und Glas frei von COL und die dazwischen liegenden Gräben im PDMS mit COL I definiert beschichtet. Darauf kultivierte Schwann-Zellen zeigten eine deutliche Ausrichtung entlang der Mikrostrukturen, wobei breitere Streifen zu einer besseren Zellausrichtung führten.

2D Mikrostrukturen aus COL I zur Steuerung der Morphologie von Zellen sind leicht und reproduzierbar herstellbar, einfach zu handhaben und ermöglichen in der Zellkultur eine hervorragende analy-

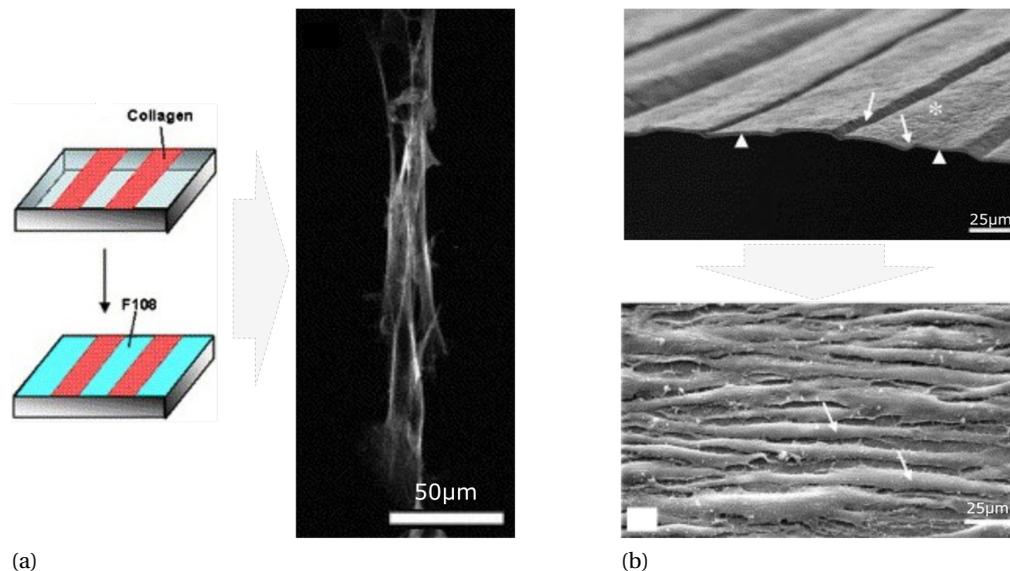


Abbildung 2.9.: Ausgerichtete Zellen auf 2D und pseudo-3D anisotropen Mikrostrukturen aus COL I. (a) 2D Streifen aus COL I wurden durch Mikrofluidik als Beschichtung auf einem Glassubstrat erzeugt. Die dazwischen liegenden Flächen wurden antiadhäsiv beschichtet. Darauf kultivierte glatte Muskelzellen zeigten eine parallele Anordnung der Aktin-Fasern und damit der Ausrichtung der Zellen entlang der Streifen. Aus Thakar u. a. (2003). (b) Gräben mit etwa 30µm Breite auf dünnen COL I-Membranen führen zur Ausrichtung von humanen dermalen Fibroblasten. Aus Vernon u. a. (2005a).

tische Zugänglichkeit. Jedoch spiegeln sie nicht die Komplexität des 3D Mikromilieus von Zellen wider, was zu grundlegenden Unterschieden im Zellverhalten führen kann. Daher werden heutzutage 2D Mikrostrukturen aus COL I als Supplementierung von realen 3D Scaffolds angesehen, da sie allein nicht das native Wachstumsmilieu von Zellen abbilden.

### Pseudo-3D Mikrostrukturen

Anisotrope pseudo-3D Mikrostrukturen beschreiben ausgerichtete Topographien auf planaren Scaffolds mit wenigen Mikrometern Tiefe (z.T. auch Nanometer). Sie sind eine weitere Möglichkeit zur Steuerung der Zellpolarisierung, -orientierung und -migration. Auf COL I-Membranen werden sie überwiegend in Form von Gräben und Streifen mit Breiten und Tiefen bis zu 100µm erzeugt. Im Vergleich zu den oben beschriebenen 2D anisotropen Strukturen werden dadurch reale räumliche Beschränkungen erzeugt, die die native Zellumgebung besser abbilden. Außerdem kann durch die gezielte Einstellung der Dimensionen von Mikrogräben und -streifen oder Substrukturierung des verwendeten Materials eine Nachahmung der Topographien der nativen ECM, z.B. in der Größe von COL-Fibrillen oder kleinen Fibrillenbündeln (Gasiorowski u. a. 2013), erreicht werden. Zudem werden durch die topografischen Vorgaben beeinflusste Zellen dazu animiert, bei der Remodellierung der ECM ausgerichtete Strukturen zu erzeugen (J. H.-C. Wang u. a. 2003; D.-H. Kim, Han u. a. 2009; Janson und Putnam 2015). Ein weiterer Vorteil von pseudo-3D Mikrostrukturen auf COL I-Scaffolds im Vergleich zu 2D Präparaten besteht in der Anwendungsbereitschaft für medizinische Zwecke (S.

---

Chen, Nakamoto u. a. 2015).

In der Literatur sind für die Erzeugung von pseudo-3D Strukturen auf COL I-Scaffolds

- drucklose Abformungsverfahren und
- Druckumformungstechniken

beschrieben. COL I wurde dafür sowohl in nicht-fibrillärer Tropo-COL-I-Form, die zu einem weniger mechanisch stabilen Scaffold führt, und nach der Fibrillogenese angewendet. Zum Teil wurde eine chemische Vernetzung der erzeugten Scaffolds zur Erhöhung der Stabilität angewendet. Die Reviews von Sorushanova u. a. (2019), Tamiello u. a. (2016), Lim und Donahue (2007), Craighead u. a. (2001) und Desai (2000) geben einen ausführlichen Überblick über das Thema.

### **Pseudo-3D Mikrostrukturen: Drucklose Abformung**

Bei Verfahren zur drucklosen Abformung von Mikrostrukturen in COL I-Membranen, die in Tabelle 2.3 aufgelistet sind, wurde häufig eine nicht-fibrilläre Tropo-COL I-Lösung auf mikrostrukturierte Template aufgetragen. Nach anschließender Luft- oder Gefriertrocknung befand sich die Mikrostrukturierung in der Membran. So verwendeten Ber u. a. (2005) für dieses Verfahren softlithografisch hergestellte Template mit Mikrogräben (rechteckiger Querschnitt) mit einer Breite von 2  $\mu\text{m}$  sowie einer Tiefe von 12  $\mu\text{m}$ . Durch EDC-Vernetzung, Glutaraldehydvernetzung, dehydrothermale Behandlung oder Kombinationen daraus wurden die Mikrostrukturen auf den COL I-Membranen fixiert. Osteoblasten konnten hier erfolgreich entlang der vorgegebenen Mikrogräben ausgerichtet werden. Ebenso wurden durch Vrana u. a. (2007) von PDMS-Templaten mit parallelen Mikrostrukturen (dreieckiger Querschnitt) mit einer Tiefe von 30  $\mu\text{m}$  und einer Breite im Bereich von 2 - 10  $\mu\text{m}$  die Mikrostrukturübertragung mit EDC/NHS-Vernetzung durchgeführt. Darauf kultivierte humane Keratinozyten der Augenhornhaut zeigten eine deutliche Ausrichtung entlang der vorgegebenen Mikrostrukturen und induzierten gleichzeitig eine Verbesserung der mechanischen Resistenz der Scaffolds gegen Zugbelastung. S. Chen, Nakamoto u. a. (2015) und S. Chen, Kawazoe u. a. (2017) nutzen als Templat parallele Mikrostreifen aus gefrorenem Wasser mit halbkreisförmigem Querschnittsprofil, die mit einem Dispenser erzeugt wurden. Nach Auftragen der Tropo-COL-I-Lösung, Gefriertrocknung und EDC/NHS-Vernetzung wurden Mikrogräben mit Breiten von 120-380  $\mu\text{m}$  und Tiefen von 65-188  $\mu\text{m}$  erhalten. Darauf co-kultivierte vaskuläre EC und Skelettmuskelmyoblasten richteten sich entlang der vorgegebenen Strukturen aus und bildeten anisotrope Muskelbündel mit integrierten Endothelzellröhren. Anisotrope Nanostrukturen erzeugten Zorlutuna, Hasirci u. a. (2008) auf COL I-Membranen. Dafür wurde auf ein mit 330 nm breiten und 100 nm tiefen Gräben ausgestatteter PDMS-Master COL I-Lösung aufgetragen, getrocknet, zu einer Röhre zusammengewickelt und mit EDC vernetzt. Darauf kultivierte humane glatte Muskelzellen zeigten eine Ausrichtung. Weitere Untersuchungen mit diesen Scaffolds hatten das Ziel, Scaffolds zur vaskuläre Regeneration zu entwickeln (Zorlutuna, Elsheikh u. a. 2009; Zorlutuna, Vadgama u. a. 2010).

Die Abformung von Mikrostrukturen in Membranen aus fibrillärem COL I wurde von Vernon u. a. (2005a) beschrieben. Dafür wurde eine Tropo-COL-I-Lösung auf die mikrostrukturierte Oberfläche

Tabelle 2.3.: Drucklose Abformungstechniken zur Erzeugung von Pseudo-3D Mikrostrukturen auf COL I-Membranen und -Filmen zur Beeinflussung des Zellwachstums.

Zustand des COL I	Templatmaterial/ Trocknung	Erzeugte Mikrogräben	Ausgerichtete Zelltypen	Besonderheiten	Quelle
Tropo-collagen	Nicht definiertes Templatmaterial/ Lufttrocknung	Rechteckiger Querschnitt, Breite 2 $\mu\text{m}$ , Tiefe 12 $\mu\text{m}$	Osteoblasten	Vernetzung mit EDC, Glutaraldehyd und/oder durch dehydrothermale Behandlung	Ber u. a. (2005)
Tropo-collagen	PDMS/ Lufttrocknung	Dreieckiger Querschnitt: Breite 2-10 $\mu\text{m}$ , Tiefe 30 $\mu\text{m}$	Keratinocyten	Vernetzung mit EDC/NHS, Optimierte Zugbelastbarkeit durch Keratinocyten-Zellkultur	(Vrana u. a. 2007)
Tropo-collagen	PDMS/ Lufttrocknung	Rechteckiger Querschnitt, Breite 330 nm, Tiefe 100 nm	EC und Skelettmuskel-myoblasten	Nach Mikrostrukturierung zu Röhre geformt und mit EDC vernetzt	(Zorlutuna, Hasirci u. a. 2008)
Tropo-collagen	Mikro-Eis-Streifen/ Gefriertrocknung	Halbkreisförmiger Querschnitt: Breite 120-380 $\mu\text{m}$ , Tiefe 65-188 $\mu\text{m}$	Vaskuläre EC und Skelettmuskel-Myoblasten	Vernetzung mit EDC/NHS	(S. Chen, Nakamoto u. a. 2015; S. Chen, Kawazoe u. a. 2017)
Fibrillär	Schallplatte, Beugungsgitter/ Lufttrocknung	Dreieckiger und ellipsoider Querschnitt: Breite bis 80 $\mu\text{m}$ , Tiefe bis 30 $\mu\text{m}$	Humane Hautfibroblasten und humane glatte Muskelzellen	keine Vernetzung, Ring aus Nylon zur Stabilisierung	(Vernon u. a. 2005a; Vernon u. a. 2005b)

von Schallplatten oder Beugungsgittern, innerhalb eines Ringes aus Nylongewebe aufgetragen, fibrilliert und ohne chemische Vernetzung luftgetrocknet. Der Nylonring dient dabei der Stabilisierung der sehr dünnen Membran mit Dicken bis 5,3  $\mu\text{m}$  (Vernon u. a. 2005b). Die übertragenen Mikrostrukturen beeinflussten die Ausrichtung darauf wachsender humaner Hautfibroblasten und humaner glatter Muskelzellen bei Struktur-tiefen von  $> 1 \mu\text{m}$  (s. auch Abbildung 2.9 auf Seite 33b). Die Mikrostrukturübertragung erfolgte hier in Form einer Wellung der sehr dünnen Membranen und legt eine unzureichende Tiefenabformung nahe. Ebenso kann die Wellung zu einem vollständigen Mikrostrukturverlust unter wässrigen Zellkulturbedingungen aufgrund der Quellung des COL I führen.

## Pseudo-3D Mikrostrukturen: Druckumformung

Bei den in Tabelle 2.4 aufgeführten Druckumformverfahren werden mikrostrukturierte Template in vorgefertigte COL I-Membranen mit definierten Kräften gepresst und in diesem Zustand getrocknet. Dieses Verfahren besitzt gegenüber der drucklosen Abformung das Potential, die Präzision der Mikrostrukturübertragung zu erhöhen, da durch das kontinuierliche Aufpressen der Einfluss mechanischer Spannungen in der trocknenden COL I-Membran verringert wird.

Tabelle 2.4.: Druckumformtechniken zur Erzeugung von pseudo-3D Mikrostrukturen auf COL I-Membranen und -Filmen. k.A. = keine Angabe.

Zustand des COL I	Templatmaterial  Druck(-kraft)  Trocknung	Erzeugte Mikrogräben	Besonderheiten	Quelle
Tropo-collagen	Photoresist-beschichtetes Silizium  880 Pa  Lufttrocknung	Komplexe Mikrokanäle, Breite 50-300 µm, Tiefe 100 µm	Vernetzung mit Glutaraldehyd	Janakiraman u. a. (2007)
Fibrillär	Glasfaser-, Edelstahl-fäden, Polyimid-Templat  k.A.  Lufttrocknung	Halbkreisförmiger Querschnitt: Durchmesser 50-200 µm; Rechteckiger Querschnitt: Breite 25-100 µm, Tiefe 75 µm	Keine Vernetzung	Alekseeva u. a. 2012; N. S. Tan u. a. 2014

So statteten Janakiraman u. a. (2007) Membranen aus nicht-fibrillärem COL I und Chondroitin-6-sulfat mit komplex verzweigten Mikrokanälen aus. Als Druckstempel dienten antiadhäsiv beschichtete Si-Wafer mit Mikrostruktur-Breiten im Bereich von 50 - 300 µm und einer Tiefe von 100 µm. Die Stempel wurden mit einem Druck von 880 Pa in die Membran gedrückt und gleichzeitig für mindestens 6 h mit Glutaraldehyd behandelt. Mit dieser Technik konnten schmale Mikrostrukturen im einstelligen Mikrometerbereich abgeformt werden. Außerdem konnte darauf das Wachstum boviner EC nachgewiesen werden, jedoch wurde deren Ausrichtung entlang der Mikrostrukturen nicht analysiert.

Eine andere Herangehensweise basiert auf der in Abschnitt 2.4.2 auf Seite 29 beschriebenen Plastic-Compression-Technik. Werden während des Kompressionsvorganges runde Glasfaser-, Edelstahl-fäden oder Kapton®-Template (Polyimid) mit Mikrostrukturen mit rechteckigem Querschnitt auf das Hydrogel aufgelegt, so wird die Topographie ohne chemische Vernetzung in das COL I übertragen. Die resultierenden Mikrostrukturen zeigten unter statischen Zellkulturbedingungen eine Stabilität über mindestens 14 Tage, jedoch wurde deren Fähigkeit zur Ausrichtung von Zellen nicht untersucht (Alekseeva u. a. 2012; N. S. Tan u. a. 2014).

Janakiraman u. a. (2007) beschreiben in ihrem Druckumformverfahren die Verwendung empfindlicher Si-Wafer als strukturgebendes Substrat. In eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass

dieses spröde Material bei hohen Druckkräften mechanisch sehr instabil ist. Mit der Herstellung mikrostrukturierter Thermoplaste beschreiben Charest u. a. (2004) ein Verfahren, um diese Problematik zu umgehen. Auf erhitzte mikrostrukturierte Si-Master wird ein Polyimid-Formkörper aufgelegt. Durch die erhöhte Temperatur schmolz das thermoplastische Polyimid und formte so die Mikrostrukturen exakt ab, sodass damit potentiell Stempel für die Druckumformung mit hoher mechanischer Stabilität erzeugt werden können. Die Grundsätze der Verfahren wurden in der hier vorliegenden Arbeit adaptiert.

### **3D mikrostrukturierte Scaffolds**

Bei 3D mikrostrukturierten Scaffolds wird durch den Mikrostrukturierungsprozess die gesamte Architektur des Scaffolds gestaltet. Bei COL I-basierten Scaffolds kann das in Form von Poren mit definierten Durchmessern und Interkonnektivität, durch 3D Bioprinting-Technologien oder durch den modularen Zusammenbau vorgefertigter Strukturbausteine mit 2D oder pseudo-3D Mikrostrukturen erfolgen. Anwendungsmöglichkeiten poröser COL I-Scaffolds wurden bereits in Abschnitt 2.4.1 auf Seite 24 näher beschrieben.

Das 3D Bioprinting hat den Vorteil, dass ECM-Bestandteile und Zellen präzise zu großvolumigen und komplexen Scaffolds angeordnet werden können. Die Architektur der Matrix stellt räumliche Limitationen für die Zellen dar und führt zu deren Ausrichtung und damit zur Beeinflussung ihres Verhaltens in einem 3D Kontext. Vier Technologien werden für das 3D Bioprinting von COL I beschrieben:

- Inkjet-Druck,
- Mikrotropfen-Druck,
- Extrusion mit Hohlnadeln und
- Laser-unterstütztes Bioprinting.

Diese Verfahren werden überwiegend zum Aufbau artifizieller Haut oder Knochen angewendet. Eine umfangreiche Übersicht über Bioprinting von COL ist in Wlodarczyk-Biegun und del Campo (2017) und Ishita Matai u. a. (2020) zu finden.

Wie bei anderen Herstellungstechniken zeigt COL I auch hier, dass seine mechanische Stabilität der limitierende Faktor bei der Scaffold-Präparation ist. Um diese zu verbessern, können unterstützende Konstruktionen, die Beimischung anderer Biomaterialien oder die Initiation der Fibrillogenese des COL I zu Hilfe genommen werden.

#### **2.4.4. *In Vitro* Protein-Gradienten zur Induktion der Zellmigration**

Gradienten von Signalmolekülen verschiedenster Art dienen Zellen *in vivo* als Orientierung zur Migration in eine definierte Richtung. Mit einer Vielzahl von Technologien wurde *in vitro* die Wirkung von meist Wachstumsfaktor-Gradienten auf Migrationsprozesse analysiert und das Ziel verfolgt, diese Techniken auf *in vivo* TE-Anwendungen zu übertragen. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

---

## Source-Sink-Techniken

Klassische Verfahren zur Erzeugung chemotaktischer Gradienten basieren auf der Source-Sink-Methode. Aus einem Reservoir (Source) diffundieren die Signalmoleküle in die umgebende, meist wässrige Matrix, sodass sich ein Konzentrationsgefälle bildet. Um dieses aufrecht zu erhalten, müssen die Signalmoleküle an einer anderen Stelle (Sink) entfernt werden. In vitro Studien nutzten dafür bspw. Boyden- oder Zigmond-und-Dunn-Kammern (Boyden 1962; Zigmond und Hirsch 1973; Zicha u. a. 1991), Mikropipetten (Bailly u. a. 1998) oder In-Agarose-Assays (Nelson u. a. 1975). Durch die schwierige Quantifizierung des Gradienten, die Erzeugung ungleichmäßiger und instabiler Gradienten und die für Langzeitstudien zu schnelle Freisetzung der Signalmoleküle werden diese Verfahren jedoch nicht mehr angewendet und wurden durch mikrofluidische Techniken ersetzt (Kothapalli und Honarmandi 2014).

## Aktuelle Technologien

Für die Integration haptotaktisch wirkender Proteingradienten (z.T. in Kombination mit chemotaktischen) in artifiziellen Scaffolds wurden in der Literatur Verfahren beschrieben, die überwiegend auf Adsorptions- und/oder Diffusionsprozessen basieren. Dazu gehören vakuuminduzierte Diffusionstechniken durch poröse Membranen (Baier und Bonhoeffer 1992), mikrofluidische Techniken (N. L. Jeon u. a. 2000), Mikro- und Nanokontakt-Printing (Fricke u. a. 2011; MacNearney u. a. 2016), Diffusionstechniken durch Hydrogele (Mai u. a. 2009) oder den schichtweisen Aufbau bzw. die kontrollierte Mischung photovernetzbarer Polymere (Ko u. a. 2019; O. Jeon u. a. 2013; Y. J. He u. a. 2018). Eine definierte Immobilisierung der Signalmoleküle im Vergleich zur gelösten Form ermöglicht zusätzlich die Kontrolle über den Erhalt des Gradientenprofils und dadurch die Dauer der Signalwirkung. Ito (2019) gibt z.B. einen ausführlichen Überblick über Immobilisierungstechniken für Wachstumsfaktoren. Die Techniken zur Gradientenerzeugung unterscheiden sich in der räumlichen Präsentation der Gradienten. 2D Gradienten sind dabei technisch einfacher zu erzeugen und analytisch besser zugänglich als 3D Gradienten, bilden aber schlechter die komplexen Vorgänge *in vivo* ab.

Obwohl für die Gradientenerzeugung und Migrationsassays verwendete Oberflächen meistens nicht-biologischen Ursprungs sind, wie z.B. PDMS, Glas oder Zellkulturplastik, wird in der Literatur auch die Anwendung von COL I berichtet. Zur Induktion der Migration von Nervenzellen wurden Gradienten des Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) auf elektrogesponnenen COL I-Matten durch eine Tintenstrahl-Drucktechnik erzeugt. In der Folge wanderten kultivierte neuronale Stammzellen tendenziell zur höchsten SDF-1-Oberflächenkonzentration (X. Li, Liang u. a. 2015). PDGF- und Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -Gradienten konnten mittels einer mikrofluidischen Apparatur in einem COL I-Hydrogel erzeugt werden. Das Hydrogel wurde zwischen zwei Kanälen der mikrofluidischen Apparatur erzeugt. Die Diffusion des Wachstumsfaktors erfolgte entsprechend der Source-Sink-Methode, indem im Source-Kanal die Konzentration des Wachstumsfaktors eingestellt wurde. Anschließend wurde der Konzentrationsunterschied zwischen Source und Sink mittels ELISA analysiert (Moreno-Arotzena u. a. 2014). Durch eine ähnliche Technik wurden Gradienten adhäsionsvermittelnder Oligopeptide (IKVAV, YIGSR) erzeugt. Diese waren an COL I kovalent gebunden und wurden im H-

förmigen mikrofluidischen System in den Source-Kanal gepumpt. Nach erfolgter Diffusion wurde die COL I-Fibrillogenese initialisiert, sodass der Gradient fixiert wurde. Neuriten von embryonalen Hühner-Spinalganglionen wuchsen entlang des Gradienten deutlich länger als auf den Kontrollproben (Sundararaghavan, Masand u. a. 2011). Eine erste Veröffentlichung der in dieser Arbeit entwickelten Immersionstechnik ermöglicht die Erzeugung von Protein-Gradienten auf kompakten COL I-Membranen (Berger u. a. 2018).

Ausführliche Übersichten zur Erzeugung haptotaktischer Gradienten zur Induktion der Zellmigration sind in Ricoult u. a. (2015), Garcia-Arcos u. a. (2019), Lara Rodriguez und Schneider (2013) und Singh u. a. (2008) zu finden.

### **Erzeugung von VEGF-Gradienten**

VEGF-Gradienten steuern in der Angiogenese und Vaskulogenese das Überleben, die Proliferation und Migration von EC. Sie sind damit ein essentieller Bestandteil für die Neubildung und Regeneration von Blutgefäßsystemen. Daher wird ihnen im TE, zur Realisierung des vaskulären Einwachsens in komplexe 3D Zellkultur-Scaffolds zur Versorgung von Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, eine zentrale Rolle beigemessen. Da das ECM-Protein COL I für solche TE-Scaffolds aufgrund seiner biomimetischen Fähigkeiten als vorteilhaft einsetzbar angesehen wird, sollen im Folgenden Verfahren aufgezeigt werden, die VEGF-Gradienten in COL I-basierten Scaffolds erzeugt haben. Diese sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

Gefriergetrocknete, hochporöse, COL I-basierte Konstrukte wurden mit VEGF-Gradienten zu Induktion der Endothelzellmigration und zur Generierung von Vaskularitäten ausgestattet. VEGF wurde dafür in das Zentrum eines zylindrischen Scaffolds injiziert. Anschließend erfolgte durch dessen Diffusion zu den Randbereichen eine omni-direktionale, graduelle Ausbreitung (Point-Source-Methode). Durch Vernetzung mittels EDC/NHS wurde der Gradient am Scaffold fixiert. Auf dem Scaffold ausgesäte EC infiltrierten diesen und migrierten in das Zentrum zur höchsten VEGF-165-Konzentration (Odedra u. a. 2011).

Ebenso ließ sich ein haptotaktischer VEGF-Gradient durch Benzophenon(BP)-vermittelte Laserphotolithographie erzeugen. Auf der Oberfläche des homogen mit VEGF und BP durchsetzten COL-Scaffolds wurden streifenförmige oder quadratische Bereiche mit einem Argon-Laser behandelt. Dadurch wurde die kovalente Verknüpfung des VEGF mit dem COL I durch BP initiiert. Die in das Scaffold-Material eindringende Energie des Lasers wurde kontinuierlich vermindert. Das führte zur Verringerung des Aufbaus kovalenter Bindungen, sodass daraus nach dem Entfernen ungebundenen VEGFs ein gradueller Verlauf der VEGF-Konzentration in das Innere resultierte. Auf diese Scaffolds aufgebraute HUVEC infiltrierten in das Material (Alsop u. a. 2014).

Durch Konjugation von VEGF an Heparin, Alginat oder HA und Anwendung der Point-Source-Methode konnten chemotaktische VEGF-Gradienten erzeugt werden. Dabei führte die Anbindung an die Biopolymere zum längeren Verbleib und zur verminderten bzw. kontrollierbaren Freisetzung des VEGF innerhalb des Scaffolds. Darauf kultivierte Scaffolds migrierten ebenfalls deutlich zum Ursprung des VEGF (Quade u. a. 2017).

Tabelle 2.5.: Techniken zur Erzeugung von VEGF-Gradienten auf/in COL I-Scaffolds.

Scaffold-Typ	Erzeugungstechnik	Ergebnisse	Quelle
Gefriergetrockneter COL I-Scaffold (d = 12 mm, h = 2,5 mm)	Point-Source-Methode: Applikation von ein- bis dreimal 5 µL 1 µg/mL VEGF-Lösung in die Mitte des Scaffolds im Abstand von 1 h, waschen mit PBS. Kovalente Vernetzung des VEGF mit COL-Scaffold durch EDC/NHS-Chemie.	2 ng/(mL·min) VEGF-Gradient von der Mitte des Scaffolds zum Rand. Mehr EC infiltrierten in den Scaffold im Vergleich zu homogen mit VEGF immobilisierten und VEGF-freien Scaffolds.	Odedra u. a. 2011
Gefriergetrockneter, dehydrothermal vernetzter COL I-CS-Scaffold (d = 6 mm, h = 1,5 mm)	Benzophenon (BP)-vermittelte Laserphotolithographie: Zugabe von VEGF zu BP enthaltenen Scaffolds mit homogener Verteilung. Kovalente Anbindung durch UV-Bestrahlung mit Argon-Laser. Erzeugung von Streifen (Breite 100 µm) und Quadraten (Kantenlänge 500 µm). Gradientenverlauf durch abnehmende Laserintensität bis zu 500 µm in das Innere des Scaffolds.	Morphologische Änderungen von HUVEC und Infiltration dieser in den Scaffold.	Alsop u. a. (2014)
Gefriergetrockneter, mineralisierter, EDC-vernetzter COL I-Scaffold (d = 8 mm, h = 3 mm)	Konjugation des VEGF an Heparin, Alginate, HA oder Kombinationen daraus. Injektion von 15 µL 100 ng oder 400 ng VEGF enthaltende Konjugatlösung in das Zentrum des Scaffolds. Zirkuläre Diffusion des VEGF in den Scaffold.	Erhöhte Migration von HDMEC in das Zentrum des Scaffolds im Vergleich zur Kontrolle.	Quade u. a. (2017)
COL I-Hydrogel (2 mg/mL)	COL I-Hydrogel in einer mikrofluidischen Apparatur mit drei Kanälen: Zwischen mittlerem und einem äußeren Kanal befand sich das Hydrogel. Konditionierung des äußeren Kanals mit 20 ng/mL VEGF und Diffusion durch das Gel zum mittleren Kanal.	Erzeugter VEGF-Gradient induziert Migration von HMVEC in das COL I-Hydrogel hinein.	Chung, Sudo u. a. (2009)
COL I-Hydrogel	Neuronale Stammzellen (NSC) in COL I-Hydrogel in 1 mm Abstand zu VEGF-beladenem Fibrinigel. Versuchsaufbau durch 3D Bioprinting erzeugt.	NSC migrieren 100 µm innerhalb 3 Tagen zur VEGF-Quelle.	Y.-B. Lee u. a. (2010)

Durch einen mikrofluidischen Aufbau konnten VEGF-Gradienten nach dem Source-Sink-Prinzip innerhalb eines COL I-Hydrogels erzeugt werden. Das Gel war zwischen zwei Kanälen platziert und das in einem Kanal befindliche VEGF diffundierte durch das Gel zum VEGF-freien Kanal. Der dadurch erzeugte Gradient führte dazu, dass EC in das COL I-Gel hinein migrierten (Chung, Sudo u. a. 2009).

Um neuronale Stammzellen zur Orientierung und Migration in Richtung einer VEGF-Quelle zu bewegen, entwickelten Y.-B. Lee u. a. (2010) ein Inkjet-Druckverfahren, bei dem sich Zellen in einem COL I-Hydrogel im Abstand von 1 mm zu einem mit VEGF beladenen Fibringel befanden. Neuronale Stammzellen migrierten im Vergleich zur Kontrolle etwa 100 µm innerhalb von 3 Tagen in Richtung der VEGF-Quelle.

### **Charakterisierung von VEGF-Gradienten**

Die Charakterisierung und Validierung eines VEGF-Gradienten kann einerseits direkt, typischerweise immunhistochemisch (Alsop u. a. 2014), mittels ELISA (Ren u. a. 2019; Helm u. a. 2005) oder an Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert (Quade u. a. 2017) erfolgen. Andererseits können in einer indirekten Herangehensweise Modell-Moleküle, wie Dextran (Chung, Sudo u. a. 2009) oder BSA (Odedra u. a. 2011), verwendet werden, die zur Verfahrensentwicklung dienen und idealerweise die Adsorptionseigenschaften des VEGF imitieren können. Sie sind meist kostengünstiger erhältlich.

### **Charakterisierung der Zellmigration**

Die Charakterisierung des Einflusses chemotaktischer Gradienten auf die 2D Single-Cell-Migration kann mit Hilfe von Trans-Well-, Kapillarkammer-, Kapillarröhren-Tests oder durch Time-lapse-Versuchsaufbauten durchgeführt werden.

Längliche Kapillarkammern oder -röhren werden meist durch softlithographische Verfahren erzeugt und auf das Wachstumssubstrat als räumliche Begrenzung aufgelegt. Nachdem ausreichend Zellen in dem Kanal gewachsen sind, wird vom gegenüberliegenden Ende des Kanals der Wachstumsfaktor in Lösung zugefügt, sodass der sich ausbildende Gradient zum Anlocken der Zellen genutzt werden kann (Garcia-Arcos u. a. 2019; Kraning-Rush u. a. 2013). Während zur Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit dabei meist die Zellen ermittelt werden, die nach einer definierten Zeit in einen definierten Bereich migriert sind, können durch Time-lapse-Versuchsanordnungen Migrationspfade detektiert werden. Dafür bedarf es eines Inkubatoraufsatzes für das verwendete Mikroskop und einer geeigneten Software für die Steuerung der Kamera und der Belichtungszeiträume. Als Wachstumssubstrate dienen dabei vollständig transparente Materialien, die auch beschichtet werden können. Für eine ausführliche Übersicht siehe Kramer u. a. (2013).

Prinzipiell sind diese Verfahren auch zur Charakterisierung der durch Wachstumsfaktorgradienten hervorgerufenen haptotaktischen Zellmigration anwendbar. Die Transparenz des Wachstumssubstrats, an dem der Gradient gebunden ist, ist dabei die Hürde für die mikroskopische Visualisierung adhärent wachsender Zellen. Während klassische Wachstumssubstrate, wie z.B. Glas oder PS, vollständig transparent sind und Hellfeld-, Phasenkontrast- oder Differentialinterferenzkontrast-Mikro-

---

skopie im Durchlichtmodus ermöglichen, müssen für transluzente oder lichtundurchlässige Träger andere Techniken angewendet werden. Hier ermöglicht die Auflichtmikroskopie von fluoreszenzgefärbten Zellen eine geeignete Visualisierung. Um jedoch die Zellen für Time-lapse-Experimente dauerhaft zu markieren, dürfen die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe nicht toxisch sein oder anderweitig Einfluss auf des Zellverhalten haben. Mögliche Fluoreszenzmarker können Fluorescein- oder Coumarin-Derivate, Green Fluorescent Protein, Paxillin oder Plasmamembranmarker, wie fluoreszenzmarkierte Phospholipide, sein (Lacoste u. a. 2013; Haugland 2005).

## 3. Material und Methoden

Die verwendeten Geräte, Chemikalien, Nährmedien und biologischen Materialien sind in Abschnitt A.1 auf Seite 151 aufgelistet.

### 3.1. Proteinisolierung, -charakterisierung und -modifizierung

#### 3.1.1. Isolierung von Collagen Typ I

Die Isolierung erfolgte aus den Sehnen des Rattenschwanzes (*Rattus norvegicus* forma domestica). Ein tiefgekühlter, etwa 20 cm langer Schwanz wurde in 150 ml 70%-igem Ethanol für 20 min aufgetaut. Anschließend wurde die Haut vollständig entfernt, die Sehnen entnommen und in Reinstwasser (RW) gelagert. Nach dem Zerkleinern der Sehnen wurden diese mit 150 mL 35 mM Essigsäure bei 4 °C für 48 h behandelt. Innerhalb dieses Zeitraums wurde die Suspension nach 3, 6 und 24 h gerührt. Die erhaltene Suspension wurde in 50-mL-Zentrifugenröhrchen aliquotiert und bei 4 °C und 8.000 g für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 50-mL-Zentrifugenröhrchen überführt und erneut unter o.g. Konditionen zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden zusammengeführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### 3.1.2. Isolierung von Fibronectin

Humanes Blutplasma verschiedener Spender wurde von Generic Assays GmbH zur Verfügung gestellt und bei 4 °C gelagert. Die Isolierung erfolgte durch Affinitätschromatographie. Dafür wurden zwei Kunststoffsäulen ( $l = 12 \text{ cm}$ ,  $d = 1,5 \text{ cm}$ ,  $V = 20 \text{ ml}$ ) in vertikaler Anordnung genutzt. Die obere Säule war mit 10 mL Sepharose CL4B befüllt, in der unteren Säule befanden sich 20 ml Gelatine-Agarose. Die Säulen wurden mit 60 mL 6 M Harnstoff-Lösung in Wasser, gefolgt von 60 mL TRIS-EACA-Citrat-Puffer (TEC-Puffer) äquilibriert.

Das Blutplasma wurde zunächst bei 2.000 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend im Überstand 0,1 M  $\epsilon$ -Aminocapronsäure (EACA) eingestellt. Anschließend wurde es in die obere Säule gegeben, nach erfolgter Elution mit 20 mL TEC-Puffer nachgespült und die obere Säule entfernt. Die untere Säule wurde mit 20 mL 1 M Natriumchlorid-Lösung in TEC-Puffer und anschließend solange mit TEC-Puffer gespült, bis die spektralphotometrisch verfolgte Absorption des Eluats bei 280 nm konstant blieb. Die Elution des FN erfolgte mit 100 mL Elutionspuffer, fraktioniert in 10 mL Aliquots. Nach Überprüfung der FN-Konzentration in den Aliquots bei 280 nm wurden die FN-haltigen Fraktionen zusammengeführt und die erhaltene Lösung mit 1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) auf

Tabelle 3.1.: Zusammensetzung von Lösungen mit mehreren Komponenten für die Isolierung von FN aus humanem Blutplasma. Lösungen, in denen nur eine Komponente im Lösungsmittel gelöst ist, sind im Text aufgeführt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
TEC-Puffer	0,05 M TRIS, 0,05 M EACA, 0,02 M Natriumcitrat·2 H <sub>2</sub> O, 0,02 % Natriumazid
Elutionspuffer	0,02 M Citratpuffer (pH = 5,5), 0,1 M Natriumchlorid, 0,02% Natriumazid
15 mM Glycin-Lösung	15 mM Glycin, 1 mM Natriumchlorid, 0,02 % Natriumazid

pH = 7,4 eingestellt.

In der erhaltenen FN-Lösung wurde unter Rühren bei 300 1/min 3 M Ammoniumsulfat innerhalb von 15 min eingestellt und für 10 min weiter gerührt. Die entstandene Suspension wurde bei 14.000 x g für 15 min zentrifugiert und das FN-Pellet in 15 mM Glycin-Lösung aufgenommen, sodass eine finale Konzentration von 1,0 mg/mL eingestellt wurde. Die erhaltene FN-Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

### 3.1.3. Proteinquantifizierung

**Sirius Red Assay** Die Quantifizierung des isolierten COL I wurde in Anlehnung an den Sircol<sup>®</sup> Soluble Collagen Assay (BioColor Ltd., Carrickfergus, Großbritannien) durchgeführt. Standardproben mit Konzentrationen im Bereich von 0 - 480 µg/mL wurden aus einer 3 mg/mL Standard-COL I-Lösung (PureCol<sup>®</sup>) durch Verdünnung mit 35 mM Essigsäure hergestellt. Zur Herstellung des Farbstoffreagenz wurden 100 mg Sirius Red in 100 mL einer gesättigten wässrigen Pikrinsäurelösung gelöst. Unbekannte Proben sowie Standards wurden in Dreifachbestimmung wie folgt untersucht: Zu 100 µL COL I-haltiger Lösung wurde 1 mL Farbstoffreagenz zugegeben und anschließend im Thermomixer bei 700 1/min und Raumtemperatur für 30 min geschüttelt. Die entstandene Suspension wurde zur Abtrennung des unlöslichen Farbstoff-COL I-Komplexes zweimal bei 10.000 x g für je 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 500 µL Ethanol gewaschen und erneut bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach wurde der Ethanol entfernt, 1 mL 0,5 M NaOH zugegeben und im Thermomixer bei 700 1/min und Raumtemperatur für 10 min geschüttelt. Anschließend wurde von der erhaltenen Lösung mittels Spektralphotometer die Absorption bei 540 nm bestimmt.

**BCA Assay** Die Quantifizierung von FN wurde mit dem Micro BCA Protein Assay Kit nach der Arbeitsanweisung des Herstellers (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) durchgeführt. Proteinstandards im Konzentrationsbereich von 0 - 40 µg/mL wurden aus einer 2 mg/mL BSA-Standardlösung hergestellt. Unbekannte Proben sowie Standards wurden in Dreifachbestimmung wie folgt untersucht: 500 µL BCA-Lösung, bestehend aus 50 % Reagenz A, 48 % Reagenz B und 2 % Reagenz C, wurden mit 500 µL Proteinlösung gemischt und im Thermomixer bei 60 °C und 700 1/min für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur gekühlt und innerhalb von 10 min mittels Spektralphotometer die Absorption bei 562 nm ermittelt.

### 3.1.4. SDS-PAGE

Polyacrylamidgele wurden mit einer Dicke von 1 mm und einer Größe von 8 x 10 cm erzeugt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Zum fertigen Gel wurde in die Elektrophoresekammer 500 mL Laufpuffer gegeben. Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt und bei 95 °C für 5 min erhitzt. 20 µL Proteinlösung, die 6 µg Protein enthielt, bzw. 10 µL Proteinmarker (für COL I: Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder, für andere Proteine: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder) wurde in die Probentaschen gegeben. Anschließend wurde die elektrophoretische Auftrennung bei 120 V und 15 mA für 1,5 h durchgeführt. Das resultierende Gel wurde für 30 min in der Färbelösung inkubiert, danach mehrmals mit Entfärbelösung gewaschen und abschließend mit Leitungswasser behandelt.

Tabelle 3.2.: Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen für die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen und die Durchführung der SDS-PAGE.

Lösung	Zusammensetzung
Trenngellösung (7,5 %)	4,85 mL RW, 2,5 mL Acrylamid-2K-Mix (30 %), 2,5 mL 1 M TRIS in RW (pH = 8,8), 50 µL 20 % SDS in RW, 0,1 mL 5 % Ammoniumpersulfat in RW, 10 µL N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Sammelgellösung (4 %)	3 mL RW, 0,67 mL Acrylamid-2K-Mix (30 %), 1,25 mL 1 M TRIS in RW (pH = 6,8), 25 µL 20 % SDS in RW, 50 µL 5 % Ammoniumpersulfat in RW, 15 µL TEMED
Laufpuffer	1 g SDS, 3,03 g TRIS, 14,41 g Glycin, auf 1 L mit RW auffüllen
Probenpuffer (2-fach)	10 mL 1,5 M TRIS-Puffer (pH = 6,8), 6 mL 20 % SDS in RW, 30 mL Glycerol, 15 mL Mercaptoethanol, 1,8 mg Bromphenolblau, auf 100 mL mit RW auffüllen
Färbelösung	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL Methanol, 100 mL 100 % Essigsäure, auf 1 L mit RW auffüllen
Entfärbelösung	450 mL Methanol, 100 mL 100 % Essigsäure, 400 mL RW

### 3.1.5. Turbidimetrische Analyse der COL I-Fibrillogenese in Anwesenheit von Hyaluronsäure und Fibronectin

Die Untersuchung erfolgte mit (1) reinem COL I, (2) COL I mit 0 - 2,0 mg/mL HA sowie (3) COL I mit 0 - 58,3 µg/mL FN und wurde in 6-fach-Bestimmung durchgeführt.

200 µL einer bei 4 °C gekühlten Lösung, bestehend aus 2,0 mg/mL COL I (PureCol®), 1 x phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 9,1 mM NaOH (pH = 7,4) und ohne bzw. mit der entsprechenden FN- oder HA-Konzentration wurden in eine Kavität einer vorgekühlten 96-Well Platte gegeben. Die Kinetik der Fibrillogenese wurde mittels TECAN SUNRISE Mikroplattenreader bei 405 nm und 37 °C über einen Zeitraum von 3 h verfolgt.

### 3.1.6. Fluoreszenzmarkierung von Fibronectin, BSA und Hyaluronidase

FN aus humanem Blutplasma, BSA und Hyaluronidase (HYAL) aus dem Rinder-Testikel (EC 3.2.1.35) wurden für die qualitative und quantitative Analyse kovalent mit Carboxytetramethylrhodamin-Succin-

---

imidylester (TAMRA-SE) konjugiert. Die Arbeiten wurden gemäß des Herstellerprotokolls (Thermo Fisher Scientific 2008) durchgeführt und erfolgten unter Lichtausschluss. Nach der Markierung wurde ungebundenes TAMRA-SE durch Größenausschlusschromatographie mit Illustra NAP-5 Sephadex G-25 Chromatographiesäulen (NAP-5) abgetrennt. Als Equilibrierungs- und Elutionspuffer diente bei der Verwendung von FN eine 15 mM Glycin-Lösung (s. Tabelle 3.1 auf Seite 44) bzw. bei Verwendung von BSA und HYAL 1 x PBS. Die NAP-5 wurden vor deren Verwendung mit je 10 mL Equilibrierungspuffer gespült.

In einem 2 mL Reaktionsgefäß wurde zu 40 µL einer 10 mg/mL TAMRA-SE-Lösung in Dimethylformamid, 400 µL einer 5 mg/mL Proteinlösung in 0,2 M Borat-Puffer (pH = 8,2) gegeben und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur und 200 1/min für 1 h gerührt. Anschließend wurden 40 µL 1,5 M Hydroxylamin-Lösung in RW (pH = 8,5) hinzugefügt und erneut unter o.g. Bedingungen für 1 h gerührt. Nach dem Auftragen der gesamten Protein-TAMRA-Lösung auf eine NAP-5 wurde im weiteren Verlauf 1 mL Elutionspuffer zugefügt und 800 µL des Eluats fraktioniert aufgefangen. Ein Teil jeder Fraktion wurde im Volumenverhältnis 1:40 mit Elutionspuffer verdünnt, mittels Spektralphotometer die Absorption bei 280 nm bestimmt und die proteinenthaltenden Fraktionen vereinigt.

Für die Bewertung des Markierungsprozesses wurde der Degree of Labeling (DOL) bestimmt. Dafür wurde mit Standardlösungen des betreffenden Proteins im Konzentrationsbereich von 0 - 0,5 mg/mL die Absorption bei 280 nm ermittelt und daraus eine Kalibriergerade generiert. Im Anschluss wurde der Einfluss des TAMRA-SE auf die Absorption des Proteins bei 280 nm ermittelt und von der gemessenen Absorption der Proteinlösung bei 280 nm subtrahiert. Aus der erhaltenen, korrigierten Absorption bei 280 nm wurde die Proteinkonzentration ( $c_{\text{Protein}}$ ) berechnet. Mit dieser und der zugehörigen Absorption der Proteinlösung bei 555 nm ( $A_{555}$ ) wurde durch Einsetzen in die Gleichung

$$DOL = \frac{A_{555} \cdot M}{c_{\text{Protein}} \cdot \epsilon_{\text{TAMRA}}}$$

der DOL bestimmt.  $M$  ist das Molekulargewicht des Proteins und  $\epsilon_{\text{TAMRA}}$  ( $= 65.000 \text{ l/cm} \cdot M$ ) ist der Absorptionskoeffizient des TAMRA-SE bei 555 nm.

## 3.2. Erzeugung und Strukturierung COL I-basierter Membranen

### 3.2.1. Prozesse für die Herstellung planarer COL I-Membranen

COL I-Membranen wurden in zwei verschiedenen Varianten hergestellt, die in Tabelle 3.3 näher erläutert sind. Für zellfreie Anwendungen wurden COL I-Membranen mit COL I-Lösung hergestellt, die gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.1.1 isoliert wurde. Dagegen wurden COL I-Membranen für Untersuchungen mit HUVEC ausschließlich mit steriler PureCol<sup>®</sup>-COL I-Lösung hergestellt.

#### 3.2.1.1. Herstellung von Silikonkissen

Die Erzeugung von COL I-basierten Membranen erfolgte auf runden Silikonkissen mit einem Durchmesser von 21 mm und einer Höhe von 3 mm. Diese ermöglichen einen praktikablen Transport des

Tabelle 3.3.: Parameter und Eigenschaften der COL I-Membran-Varianten.

Eigenschaft	Variante I	Variante II
Trockenmasse	1,0 mg oder 1,5 mg	10 mg, 20 mg, oder 40 mg
Grundform	rund, $d = 21 \text{ mm}$	quadratisch, $9 \times 9 \text{ mm}^2$
Behandlung des COL I-Hydrogels	keine	Zerkleinerung und Zentrifugation
Einsatzbereich	Untersuchungen zur Erzeugung von Proteingradienten, zur Freisetzung von FN und HA und zum Proliferationsverhalten von HUVEC	Erzeugung von Mikrostrukturen

initial erzeugten COL I-Hydrogels und ein einfaches Ablösen der finalen COL I-basierten Membran nach dem Herstellungsprozess. Für die Herstellung eines Silikonkissens wurden im Vorfeld Base und Härter des 2-Komponenten Silikon-Elastomers Sylgard 184<sup>®</sup> im Verhältnis 10:1 intensiv gemischt und im Vakuum für 10 min entgast. 1 mL der Monomerlösung wurde in je eine Kavität einer 12-Well Platte gefüllt und bei 65 °C für 4 h polymerisiert. Das entstandene Silikonkissen wurde anschließend in Ethanol und Wasser für je 30 min im Ultraschallbad gereinigt und final getrocknet.

### 3.2.1.2. Variante I: Membranen aus unbehandeltem Collagenhydrogel

**Membranherstellung** Eine auf 4 °C gekühlte Lösung bestehend aus 66,6 vol-% COL I-Lösung mit einer Konzentration von 3,0 mg/mL, 10 vol-% 10 x PBS, 6,6 vol-% 0,136 M NaOH-Lösung und 16,6 vol-% Wasser wurde sorgfältig vermischt und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Zur Herstellung von COL I-Membranen mit einem Trockengewicht von 1,0 mg oder 1,5 mg wurden 0,5 mL oder 0,75 mL Lösung in Abhängigkeit ihrer Anwendung auf ein Silikonkissen oder in eine 12- oder 24-Well-Zellkulturplatte gegeben und bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde das entstandene Hydrogel bei 37 °C für 48 h vollständig getrocknet und nachfolgend mit je 500 µL Wasser für je 5 min gewaschen. Die erhaltenen Membranen wurden abschließend bei 37 °C über Nacht getrocknet.

**EDC-Vernetzung** COL I-Membranen wurden bei 37 °C und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit auf ein Silikonkissen platziert, vollständig mit 250 µL einer 2 mg/mL wässrigen EDC-Lösung benetzt und für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Membranen bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

### 3.2.1.3. Variante II: Gepresste Membranen aus hochkonzentriertem, zerkleinertem Collagenhydrogel

Eine Fibrillogenese-Lösung bestehend aus 66,6 vol-% COL I-Lösung mit einer Konzentration von 3,0 mg/mL, 10 vol-% 10 x PBS, 6,6 vol-% 0,136 M NaOH-Lösung und 16,6 vol-% Wasser wurde bei 4 °C sorgfältig vermischt und auf pH = 7,4 eingestellt. Diese Lösung wurde bei 37 °C für 2 h inkubiert. Das entstandene COL I-Gel wurde mittels Ultra-TURRAX mit Dispergierwerkzeug bei 7.000 1/min für 1 min

zerkleinert und anschließend bei 8.300 1/min für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde der Zentrifugationsprozess wiederholt. Das verbliebene Sediment mit einem Volumen von 1 mL wurde auf ein Silikonkissen überführt und über Nacht vollständig getrocknet. Nach der dreimaligen Entsalzung der entstandenen Rohmembran in 75 mL RW für 30 min wurde sie anschließend in eine Kavität der Apparatur zur Herstellung planarer Membranen (s. Abbildung 4.1 auf Seite 62) überführt. Nach dem Einsetzen des Zylinders aus Polytetrafluorethylen (PTFE) wurden die Druckfedern aufgesetzt, mit einer Druckkraft von 370 N je Feder belastet und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Das vollständige Ablösen der COL I-Membranen vom Nylon-Filterpapier erfolgte nach Benetzung der Filterpapierrückseite mit 50 µL Wasser für 5 min.

In Abhängigkeit der angestrebten Masse einer COL I-Membran  $m_{CM}$  (10 mg, 20 mg oder 40 mg) wurde mit der Gleichung

$$V_{FL} = \frac{m_{CM} - \beta_V \cdot V_R}{\beta_{FL} - \beta_V} \quad (3.1)$$

das zu verwendende Volumen der Fibrillogenese-Lösung  $V_{FL}$  bestimmt.  $\beta_{FL}$  ist die COL I-Konzentration in der Fibrillogenese-Lösung ( $\beta_{FL} = 2,0$  mg/mL),  $\beta_V$  ist die COL I-Konzentration im Zentrifugationsüberstand ( $\beta_V = 0,5$  mg/mL) und  $V_R$  das Volumen des Sediments ( $V_R = 1,0$  mL bei 10 mg und 20 mg Membranen,  $V_R = 2,0$  mL bei 40 mg Membranen).

#### 3.2.1.4. Fibronectin- und Hyaluronsäure-Inkorporation

Zur Einstellung von 0 - 50 µg FN (mit 1 mg/mL FN-Lösung, vgl. Abschnitt 3.1.2) pro 1 mg COL I bzw. 0 - 1000 µg HA (mit 6 mg/mL HA-Stammlösung in RW) pro 1 mg COL I wurden anstatt 16,6 vol-% Wasser 16,6 vol-% FN- bzw. HA-Lösung eingesetzt. Abweichend vom o.g. Zeitraum erfolgte die Fibrillogenese bei der Erzeugung FN-haltiger COL I-Membranen für 3 h.

### 3.2.2. Prozesse für die Mikrostrukturierung von COL I-Membranen

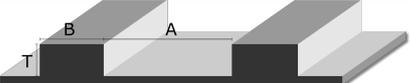
Der gesamte Prozess zur Mikrostrukturierung von COL I-Membranen ist im Anhang in Abschnitt A.1 auf Seite 156 dargestellt.

#### 3.2.2.1. Übersicht der angewendeten Mikrostrukturen

Silizium-Wafer (10 x 10 mm<sup>2</sup>) mit oberflächlich erzeugten Mikrostrukturen in Form von Streifen mit rechteckiger Querschnittfläche wurden durch die Firma GeSiM - Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH (Großerkmannsdorf, Deutschland) bereitgestellt (im Weiteren als GeSiM-Wafer bezeichnet). Ein Verfahren zur Erzeugung von Silizium-Wafern (10 x 10 mm<sup>2</sup>) mit oberflächlich erzeugten Mikro-Streifen mit dreieckiger Querschnittfläche wurde in einem Gemeinschaftsprojekt mit dem Leibniz-Institut für innovative Mikroelektronik in Frankfurt (Oder) entwickelt, sodass entsprechend strukturierte Silizium-Wafer zur Verfügung standen (im Weiteren als IHP-Wafer bezeichnet).

Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über die Mikrostrukturen auf Silizium-Wafern, die zur Übertragung

Tabelle 3.4.: Übersicht der Maße und effektiven Kontaktfläche der mikrostrukturierten Silizium-Wafer. Die effektive Kontaktfläche beschreibt die Summe der Flächen auf den Streifen bzw. zwischen den V-förmigen Gräben.

	Breite B [ $\mu\text{m}$ ]	Abstand A [ $\mu\text{m}$ ]	Tiefe T [ $\mu\text{m}$ ]	Effektive Kontaktfläche [ $\text{mm}^2$ ]
	10	20	10	27
	20	40	20	27
	40	80	20	27
	5	15	3,3	79,75
	15	5	10	39,25

in COL I-Membranen zur Anwendung kamen. GeSiM-Wafer waren teilweise mit  $120 \pm 20$  nm Teflon beschichtet. Unbeschichtete GeSiM- und IHP-Wafer wurden mit (Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)dimethylchlorosilan (HFTDCS) passiviert. Dafür wurden die Wafer mittels Ultraschallbad in Ethanol und RW für jeweils 30 min gereinigt und anschließend gemäß dem Protokoll der Radio-Corporation-of-America (RCA) von Kern und Puotinen (1970) weiterbehandelt. Demnach wurden sie in einem Teflon-Karussell platziert, welches in eine Quarzglasschale überführt wurde und vollständig bedeckt mit einer Lösung bestehend aus 30 Gew.-%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30 Gew.-%  $\text{NH}_3$  und RW im Volumenverhältnis von 1 : 1 : 5 bei  $70^\circ\text{C}$  für 10 min temperiert. Anschließend wurden die Silizium-Wafer zweimal mit RW gespült und bei  $120^\circ\text{C}$  für 1 h getrocknet. Die gereinigten Silizium-Wafer wurden in eine Petrischale ( $d = 150$  mm) gelegt und  $100 \mu\text{L}$  HFTDCS auf einem Uhrglas zugegeben. Die Petrischale wurde mit Parafilm verschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht belassen. Abschließend wurden die Wafer mit Toluol gespült und mit Stickstoff getrocknet.

### 3.2.2.2. Erzeugung mikrostrukturierter Kunststoffstempel

**Mikrostrukturierung von PDMS** Mikrostrukturierte Silizium-Wafer wurden im Ultraschallbad mit RW und anschließend mit Ethanol für je 30 min gereinigt. Danach wurde ein Si-Wafer passgenau auf die quadratische Öffnung ( $9 \times 9 \text{ mm}^2$ ) eines selbstgefertigten PDMS-Rahmens ( $35 \times 35 \times 2 \text{ mm}^3$ ) platziert und diese Konstruktion in ein Gießmodul überführt (für eine grafische Darstellung siehe Abbildung A.1 auf Seite 156, „PDMS-Casting“). Base und Härter des 2-Komponenten Silikon-Elastomers Sylgard 184<sup>®</sup> wurden im Massenverhältnis 10 : 1 sorgfältig gemischt und im Vakuum für 10 min entgast. 4 mL der erhaltenen Lösung wurden in das Gießmodul überführt und die Polymerisation bei  $65^\circ\text{C}$  für 4 h durchgeführt. Nach dem Ablösen des Silizium-Wafers wurde der erzeugte PDMS-Master

---

mit Ethanol und Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.

**Thermisches Umformen** Die verwendeten thermoplastischen Kunststoffe und Parameter für deren thermische Umformung sind in Tabelle 4.2 auf Seite 81 dargestellt, die grafische Darstellung des Prozesses ist in Abbildung A.1 auf Seite 156, „Thermoumformung“, ersichtlich.

Ein mit den Mikrostrukturen nach oben zeigender PDMS-Master auf einem Objektträger wurde auf einer Heizplatte platziert und bei Temperaturen von 275 °C oder 300 °C (Einstellung am Heizgerät) für 10 min vorgeheizt. Ein Thermoplast mit den Maßen 8 x 8 x 4 mm<sup>3</sup> wurde vor dessen Verwendung mit Ethanol und RW gespült, mit Stickstoff getrocknet und anschließend für einen definierten Zeitraum auf dem vorgeheizten PDMS-Master platziert. Im Anschluss wurde ein Gewicht von 400 g auf den Thermoplast aufgelegt, erneut für einen definierten Zeitraum temperiert und nachfolgend mittels Eisbad auf Raumtemperatur gekühlt. Nach dem Ablösen des Thermoplast-Masters wurden diese für nachfolgenden Anwendungen ohne weitere Behandlung verwendet.

### 3.2.2.3. Bestimmung der mechanischen Stabilität der Kunststoffstempel

Für die Untersuchung der Stabilität mikrostrukturierter Thermoplast-Master gegenüber vertikal einwirkenden Druckkräften wurde eine Kraftmessapparatur, ausgestattet mit einem Drucksensor (maximal anlegbare Kraft 1 kN), und eine Justiermechanik zur Einstellung der Druckkräfte im Bereich von 150 - 950 N verwendet. Die Messsignale wurden über ein LabView-Programm ausgewertet.

Der Thermoplast-Master wurde mit der strukturierten Seite auf eine PS-Platte (50 x 40 x 4 mm<sup>3</sup>) gelegt, welche auf dem Drucksensor platziert war. Durch Betätigung der Justiermechanik wurde die Druckkraft für 1 min eingestellt. Anschließend wurde der Thermoplast-Master entfernt und mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) bzw. 3D-Profilometer bewertet.

### 3.2.2.4. Druckloses Abformverfahren

**O<sub>2</sub>-Plasmabehandlung** Mikrostrukturierte PDMS-Master wurden in der Plasmakammer platziert, eine O<sub>2</sub>-Atmosphäre mit einem Druck von 1,3 bar eingestellt und anschließend der Druck auf 24 mbar verringert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nachdem abschließend ein Druck von 24 mbar erreicht war, wurde das O<sub>2</sub>-Plasma bei einer Anregungsfrequenz von 5 kHz erzeugt und der PDMS-Master für 150 s behandelt. Nach der Entnahme des PDMS-Master wurde er sofort weiter verwendet.

**Vorinkubation** 0,5 mL unfibrillierte COL I-Lösung wurde auf einem mit O<sub>2</sub>-Plasma behandelten PDMS-Master in einer 6-Well-Platte gegeben und bei 4 °C für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Fibrillogenese wie in Abschnitt 3.2.1.2 auf Seite 47 beschrieben.

**Mikrostrukturabformung** Auf unbehandelten und mit O<sub>2</sub>-Plasma behandelten PDMS-Mastern wurden COL I-Membranen nach Variante I (siehe Abschnitt 3.2.1.2) unter Verwendung von 0,5 mL COL I-Lösung erzeugt.

Weiterhin wurde zur Erzeugung der COL I-Membranen nach Variante I zerkleinertes COL I-Hydrogel verwendet. Dafür wurde nach der COL I-Fibrillogenese das erhaltene Hydrogel mittels Ultra-TURRAX mit Dispergierwerkzeug bei 7.000 1/min für 1 min zerkleinert. Anschließend erfolgte das Auftragen der COL I-Suspension auf mit O<sub>2</sub>-Plasma behandelten PDMS-Mastern und die weitere Prozessierung.

**Nachbehandlungen mit Methanol/Aceton** Nach der vollständigen Trocknung der COL I-Membran auf dem PDMS-Master wurde das gesamte Konstrukt in einer Methanol-Aceton-Lösung (Volumenverhältnis 1 : 1) bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran vom PDMS-Master abgelöst.

### 3.2.2.5. Druckumformverfahren

Mikrostrukturierte PS-Master wurden gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.2.2.2 hergestellt. Zur Übertragung der Mikrostrukturen von PS-Master auf COL I-Membranen wurde die in Abbildung A.1 auf Seite 156, „Druckumformung“, gezeigte Druckumformapparatur, ausgestattet mit einer Druckfeder mit Distanzbolzen, einer PS-Unterlage und einer Justiervorrichtung, entwickelt. Die getrocknete COL I-Membran mit einer Masse von 20 mg wurde auf die PS-Unterlage (50 x 50 x 4 mm<sup>3</sup>) platziert und mit 100 µL 100 mg/mL EDC-Lösung bei Raumtemperatur für 5 min vollständig benetzt. Anschließend wurde der mikrostrukturierte PS-Master (Herstellung siehe Abschnitt 3.2.2.2) aufgelegt und mittels Justiervorrichtung eine Druckkraft von 950 N eingestellt, sobald sich die Distanzbolzen der Druckfeder berührten. Die COL I-Membran trocknete in einer Laminar-Flow-Box bei Raumtemperatur über Nacht und konnte anschließend vom PS-Master abgelöst werden.

### 3.2.3. Immersionsprozess zur Erzeugung eines Protein-Gradienten

Zur Erzeugung von Proteingradienten auf COL I-Membranen wurde die in Abbildung 4.18 auf Seite 101 gezeigte Apparatur konstruiert und verwendet. Diese besteht aus einem computergesteuerten *EM-43*-Schrittmotor mit Antriebsachse und daran aufgewickeltem Faden, den Klemmbacken für die Befestigung von COL I-Membranen und einem Becherglas mit einem Innendurchmesser von 3 cm. Der Schrittmotor wurde über einen *Arduino Uno* Mikrokontroller mit der Steuerungssoftware *Arduino 1.0.1* gesteuert. Für die Programmierung des Schrittmotors wurden die Gesamtimmersionszeit, die Gesamt-Schrittzahl, um die COL I-Membran vollständig in die Immersionslösung einzutauchen, sowie die in Tabelle 4.7 auf Seite 100 ermittelten Kennwerte für die Beladung-Zeit-Verläufe berücksichtigt. Der zugehörige Quelltext ist in Abschnitt A.2.2 auf Seite 157 dargestellt. Der gesamte Prozess fand unter Lichtausschluss statt. Die Herstellung der COL I-Membranen erfolgte in Abhängigkeit zum erzeugten Proteingradienten wie folgt:

- BSA- oder HYAL-Gradienten: nach Variante II (s. Abschnitt 3.2.1.3) auf reinen COL I-Membranen (10 mg)
- VEGF-Gradienten: nach Variante I (s. Abschnitt 3.2.1.2) auf reinen COL I-Membranen bzw. COL I-HA-Membranen (1,5 mg)

---

Eine COL I-Membran wurde in die Klemmbacken eingesetzt, sodass durch die vorhandene Aussparung ein Bereich von  $6 \times 10 \text{ mm}^2$  in direktem Kontakt mit der Immersionslösung stehen konnte. Die Klemmvorrichtung wurde anschließend am Faden der Antriebsachse des Schrittmotors befestigt und unmittelbar über 6 mL Immersionslösung im Becherglas platziert. Die Immersionslösung wurde während des Immersionsprozesses bei 300 l/min gerührt. Nach erfolgtem Immersionsprozess wurde der im Kontakt mit der Immersionslösung gestandene Bereich der COL I-Membran aus der Klemmvorrichtung geschnitten und in 50 mL RW am Orbitalschüttler bei 60 l/min für 10 min gewaschen.

### **3.3. Analyse COL I-basierter Membranen**

#### **3.3.1. Enzymatische Hydrolyse**

Für analytische Zwecke wurden COL I-Membranen mit Hilfe von Papain oder Collagenase hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte in Lösung gebracht. Eine COL I-Membran wurde dafür mit 1 mL Papainlösung (3,0 mg/mL Papain, 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 M NaCl, 5 mM L-Cystein) versetzt und bei 60 °C und 600 l/min im Thermomixer für 18 h inkubiert. Oder ein COL I-Membransegment ( $2 \times 6 \text{ mm}^2$ ) wurde in 350  $\mu\text{L}$  0,25 mg/mL wässriger Collagenase-Typ-1A-Lösung bei 37 °C für 24 h hydrolysiert.

#### **3.3.2. Kinetik der Freisetzung von Hyaluronsäure**

##### **3.3.2.1. Freisetzungsprozess**

COL I-Membranen mit einer Trockenmasse COL I von 1 mg und einer HA-Masse von 0 - 1.000  $\mu\text{g}$  (Herstellung siehe Abschnitt 3.2.1.2), wurden unvernetzt sowie nach Vernetzung mit EDC analysiert. Eine Membran wurde in eine Kavität einer 12-Well Platte überführt, 1 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (enthält 10 % Fetales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 0,1 %  $\text{NaN}_3$ ) hinzugefügt und bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiträumen wurde das Medium entfernt, die Membranen mit 15 mL RW auf einem Orbitalschüttler bei 100 l/min für 10 min gewaschen und anschließend sauer hydrolysiert.

##### **3.3.2.2. Saure Gasphasenhydrolyse**

Verwendete Glas-Reaktionsgefäße und -Probenvials wurden mittels Ultraschall in Wasser und Ethanol für je 30 min und anschließend gemäß RCA-Protokoll (Kern und Puotinen 1970) gereinigt (s. auch Abschnitt 3.2.2.1). Nach intensivem Spülen mit RW wurden die Glasgeräte bei 65 °C getrocknet.

Nach dem Freisetzungsprozess erhaltene COL I-HA-Membranen wurden gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.3.1 durch enzymatische Hydrolyse mit Papain in Lösung gebracht, definierte Volumina in Probenvials überführt und unter reduziertem Druck für 1 - 8 h getrocknet. Nach dem Trocknen der Proben wurden 10  $\mu\text{L}$  6 M HCl (enthält 1,4 Vol-% Phenol) je 1 mL Volumen des Reaktionsgefäßes zugefügt, das Reaktionsgefäß verschlossen, für 10 s entgast und anschließend mit Stickstoff begast. Dieser

Prozess wurde zweimal wiederholt. Nach der Hydrolyse der Proben bei 100 °C für 3 h wurden die Proben vials an der Außenfläche mit Ethanol gespült und zur Neutralisation des Hydrolyserückstands in jedes Vial 30 µL eines Reagenzes bestehend aus RW, Ethanol und Triethylamin (Volumen-Verhältnis 2:2:1) gegeben. Nach abschließender Trocknung unter vermindertem Druck für mindestens 45 min wurden die Hydrolyserückstände in 200 µL RW gelöst.

### **3.3.2.3. Elson-Morgan-Assay**

120 µL der hydrolysierten Proben wurden mit 240 µL 2 Vol-%iger Acetylaceton-Lösung in 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gemischt und bei 90 °C für 1 h inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 450 µL Ethanol zugefügt und die entstandene Lösung bei 25 °C für 10 min temperiert. Abschließend wurden 240 µL EHRLICH-REAGENZ (bestehend aus 530 mg 4-(N,N-Dimethylamino)-benzaldehyd, 20 mL Ethanol und 15 mL 37 % HCl-Lösung) hinzugefügt und die Absorption der Lösung bei 527 nm innerhalb von 10 min mittels Spektralphotometer bestimmt. Bei der Untersuchung wurden COL I-Membranen ohne HA als Blanks mit analysiert. Eine Standardkurve wurde im Bereich von 0 - 30 µg HA generiert.

### **3.3.3. Kinetik der Freisetzung von Fibronectin**

COL I-FN-Membranen mit einer Trockenmasse von 1 mg und einem FN-Gehalt von 0 - 50 µg wurden wie in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben hergestellt. Zur fluoreszenzbasierten Quantifizierung wurde das FN mit TAMRA gemäß Abschnitt 3.1.6 konjugiert.

Eine COL I-FN-TAMRA-Membran wurde in einem Well einer 12-Well Platte platziert, 1 mL DMEM (enthält 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 % NaN<sub>3</sub>) hinzugefügt und bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Membranen mit 15 mL RW auf einem Orbital-schüttler bei 100 1/min für 10 min gewaschen und vollständig bei Raumtemperatur getrocknet. Nach erfolgter Hydrolyse mit Papain gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.3.1 wurde die Fluoreszenzintensität der Proben mittels Fluoreszenzphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 555 nm und einer Emissionswellenlänge von 577 nm analysiert. Bei der Untersuchung dienten COL I-Membranen ohne FN als Blanks. Eine Standardkurve wurde im Bereich von 0 - 100 µg/mL FN-TAMRA generiert.

### **3.3.4. Rasterelektronenmikroskopie**

Morphologische Untersuchungen erfolgten mittels Philips XL 30 REM mit SE-Detektor. Die Proben wurden mit einem Sputter-Coater mit einer Goldschicht von etwa 8 nm beschichtet und anschließend horizontal oder vertikal auf einem Aluminium-Probenteller fixiert.

### **3.3.5. Konfokale 3D-Profilometrie**

Die Analysen erfolgten mittels optischem 3D-Profilometer Sensofar<sup>®</sup> S neox. Monochromatische Bildaufnahmen wurden mit LED-Licht bei einer Wellenlänge von 460 nm erzeugt. Das Höhen-Tiefen-

---

Profil auf jeder Probe wurde an insgesamt fünf Punkten gemessen und aus den Maßen Mittelwerte gebildet. Die erzeugten Daten wurden mit dem Programm Gwyddion 2.47 ausgewertet.

### **3.3.6. Analyse der Stabilität von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen nach EDC-Anwendung und Quellung**

COL I-Membranen mit einer Trockenmasse von 20 mg wurden wie in Abschnitt 3.2.2.5 beschrieben mit der Mikrostruktur B40A80T20 ausgestattet. Während des Mikrostrukturierungsprozesses wurde die EDC-Vernetzung mit EDC-Konzentrationen von 25, 50 bzw. 100 mg/mL durchgeführt. Anschließend erfolgte die Behandlung der Membranen mit 1 x PBS bei 37 °C für 24 h, gefolgt von einer Wäsche mit 75 mL RW für 10 min und der Trocknung bei Raumtemperatur über Nacht. Die Mikrostrukturierung wurde mittels REM und konfokalem 3D-Profilometer analysiert.

### **3.3.7. Bestimmung der Beladung-Zeit-Verläufe von BSA und Hyaluronidase**

Die Adsorptionskinetik von BSA bzw. HYAL an COL I-Membranen (10 mg, Herstellung siehe Abschnitt 3.2.1.3) wurde für BSA-Konzentrationen von 100, 200 und 500 µg/mL bzw. HYAL-Konzentrationen von 0,5 und 10 µg/mL HYAL in Dreifachbestimmung analysiert. Dafür wurden die betreffenden Proteine gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.1.6 mit TAMRA konjugiert.

COL I-Membranen wurden in 5 mL der entsprechenden Protein-TAMRA-Lösung für 5 - 240 min gelagert, anschließend mit 50 mL RW am Orbitalschüttler bei 60 l/min für 10 min gewaschen. Nach erfolgter Hydrolyse mit Papain, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, wurde die entstandene Lösung fluoreszenzphotometrisch (Anregungswellenlänge 555 nm, Emissionswellenlänge 577 nm) analysiert. Bei dem Experiment wurden COL I-Membranen ohne Inkubation in Protein-TAMRA-Lösung als Blanks mit untersucht. Eine Standardkurve für BSA- und HYAL-TAMRA wurde im Bereich von 0 - 10 µg/mL Protein generiert und die zu analysierenden Proben entsprechend verdünnt.

Mit den ermittelten BSA- bzw. HYAL-Konzentrationen wurden Beladung-Zeit-Kurven für die jeweilige Protein-COL-I-Kombination durch Anpassung nach dem Modell nach Box und Lucas (1959) generiert. Gleichung 4.1 auf Seite 99 zeigt die allgemeine Funktionsgleichung.

### **3.3.8. Fluoreszenzphotometrische Quantifizierung von BSA- und Hyaluronidase-Gradienten**

Die mit einem Gradienten ausgestattete COL I-Membran wurde quer zur Eintauchrichtung in 2 mm breite Segmente (es wurden 5 Segmente á 2 x 6 mm<sup>2</sup> erhalten) geschnitten und jedes Segment zur Generierung einer Doppelbestimmung nochmals halbiert. Nach erfolgter enzymatischer Hydrolyse mit Papain (s. Abschnitt 3.3.1) wurde die enthaltene BSA- bzw. HYAL-Konzentration mittels Fluoreszenzphotometer bei einer Anregungswellenlänge von 555 nm und einer Emissionswellenlänge von 577 nm quantifiziert. Bei der Untersuchung wurden COL I-Membranen ohne BSA-TAMRA bzw. HYAL-TAMRA als Blanks mit analysiert. Eine Standardkurve des entsprechenden Proteins wurde im Bereich von 0 - 2 µg/mL generiert.

### 3.3.9. Analyse der Diffusion von BSA-TAMRA in COL I-Membranen

Eine planare COL I-Membran wurde entsprechend der Anleitung in Abschnitt 3.2.1.3 auf Seite 47 mit einer Trockenmasse von 10 mg hergestellt und anschließend dem Immersionsprozess, wie in Abschnitt 3.2.3 auf Seite 51 beschrieben, in 100 µg/mL BSA-Lösung unterzogen. Die erhaltene Membran wurde geteilt, eine Hälfte mit der Schnittfläche nach oben senkrecht auf Kryo-Probenteller mit Kryo-Medium präpariert und auf -25 °C gekühlt. Mittels Mikrotom wurden Schnitte mit einer Dicke von 9 µm angefertigt, auf Objektträger überführt und mittels Fluoreszenzmikroskop (TRITC-Filter, Anregung 550 nm, Emission 580 nm) bewertet.

### 3.3.10. Quantifizierung des VEGF-Gradienten

Die Quantifizierung von VEGF auf COL I-Membranen wurde mittels ELISA für humanes VEGF bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gelieferten Antikörper und Avidin-Meerrettichperoxidase (HRP) wurden entsprechend den Herstellerangaben gelöst, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Tabelle 3.5 gibt einen Überblick über weitere benötigte Lösungen. Die in eine VEGF-Lösung getauchten COL I-Membranen wurden segmentiert (es wurden 5 Segmente á 2 x 6 mm<sup>2</sup> erhalten) und die Segmente wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben mit Collagenase hydrolysiert. Aus jedem hydrolysierten Segment wurde eine 6-fach-Bestimmung generiert.

Tabelle 3.5.: Zusammensetzung der Lösungen für den VEGF-spezifischen ELISA.

Bezeichnung der Lösung	Zusammensetzung
Waschlösung	0,05 % Tween-20 in 1 x PBS
Block-Lösung	1 % BSA in 1 x PBS
ABTS-Lösung	1,8 mM ABTS und 0,333 mg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 0,1 M Citrat-Puffer, pH = 4,3

Capture-Antibody (rabbit anti-hVEGF) wurde im Volumenverhältnis 1:200 mit 1 x PBS verdünnt, 100 µL in je 1 Well einer 96-Well Platte gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Danach wurde die Platte viermal mit je 300 µL Waschlösung gewaschen, 300 µL Block-Lösung zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde in die so vorbereiteten Wells 100 µL der Probenlösung gegeben und für 2 h inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurde anschließend der Detection-Antibody (biotinylierter rabbit anti-hVEGF) im Volumenverhältnis 1:100 mit Waschlösung verdünnt, 100 µL je Well zugegeben und für 2 h inkubiert. Nachfolgend wurde erneut unter den o.g. Konditionen gewaschen und abschließend die Avidin-HRP-Lösung im Volumenverhältnis 1:2.000 mit Waschlösung verdünnt, 100 µL je Well hinzugefügt und für 30 min in den Wells belassen. Nach dem Entfernen der Avidin-HRP-Lösung und dem erneuten Waschen des Wells, wie oben beschrieben, wurden 10 µL 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Lösung (ABTS) in jedes Well gegeben. Die spektralphotometrische Verfolgung der HRP-Aktivität erfolgte mittels SUNRISE Plattenreader bei 405 nm über einen Zeitraum von 20 min (Messzyklus 2 min). Standard-Proben mit VEGF-Konzentrationen im Bereich von 0 - 2.000 pg/mL wurden in Dreifachbestimmung mitgeführt.

---

## **3.4. Zellkultur mit HUVEC**

### **3.4.1. HUVEC-Isolierung**

Humane Nabelschnüre wurden durch die Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Niederlausitz GmbH in Lauchhammer nach entsprechender Einwilligung des Spenders zur Verfügung gestellt. Ein positives Votum zur Isolierung und Verwendung der HUVEC durch die Ethikkommission der Landesärztekammer Brandenburg lag vor. Die Nabelschnur wurde unmittelbar nach der Geburt in 1 x PBS mit 100 Unit/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin und 0,25 µg/mL Amphotericin B überführt und auf 6 °C gekühlt. Humane EC wurden nach einer modifizierten Methode von Weis u. a. (1991) isoliert. Im Folgenden sind nur Abweichungen von der genannten Quelle aufgeführt:

Anstatt Hepes Buffered Saline wurde 1 x PBS zum Spülen der Nabelschnurvene verwendet. Anschließend wurde 2 mg/mL Collagenase-Lösung (in 1 x PBS) in die Vene gespritzt, bis am gegenüberliegenden Ende die Lösung wieder hervortrat, und danach diese verschlossen. Nachfolgend wurde die Vene vollständig mit Collagenase-Lösung gefüllt und in einem Becherglas mit 1 x PBS bei 37 °C für 20 min inkubiert. Die EC enthaltende Collagenase-Lösung wurde in ein mit 10 mL PBS-FCS (10 % FCS in 1 x PBS) gefülltem 50-mL-Reaktionsgefäß gefüllt und die Vene abschließend mit wenig 1 x PBS gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 1.200 1/min für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 25 mL EC-Medium (enthält 1 x Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und in eine T-175 Zellkulturflasche überführt, die vorher für 20 min mit 3 mL 20 µg/mL FN (Isolierung siehe Abschnitt 3.1.2) beschichtet wurde. Die HUVEC standen nach anschließender Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für etwa 8 - 10 Tage, mit Mediumwechsel nach 2 - 3 Tagen, zur Verfügung oder wurden in Aliquots zu 5·10<sup>5</sup> Zellen für spätere Untersuchungen bei -196 °C gelagert.

### **3.4.2. Standardkultivierung**

VON-WILLEBRAND-Faktor positiv getestete HUVEC wurden für alle Untersuchungen maximal bis zur 5. Passage verwendet. Die Standardkultivierung wurde dabei auf FN-beschichteten T-75 Zellkulturflasche bei 37 °C, 100 % rF und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt, bis der Zellrasen konfluent war.

### **3.4.3. Trypsinierung**

Zum Ablösen von HUVEC vom Boden der Zellkulturflasche wurden diese in Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in Wasser) für 3 - 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in PBS-FCS (10 % FCS in 1 x PBS) aufgenommen und bei 1.200 1/min für 3 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in EC-Medium resuspendiert und entsprechend weiterverwendet.

### **3.4.4. Phalloidin-TRITC-Färbung**

Die Färbung des Aktinskeletts der HUVEC wurde nach Kultivierung auf COL I-Membranen durchgeführt. Die COL I-Membran wurde mit 1 x PBS gespült und nachfolgend in 2 mL 4 % wässriger Formaldehyd-Lösung bei 4 °C für 10 min inkubiert. Nach weiterem viermaligen Spülen mit 1 x PBS wurde

die Membran in 2 mL Methanol-Aceton (Volumenverhältnis 1 : 1) bei -20 °C für 10 min belassen und nach erneutem Spülen (s.o.) mit 500 µL 0,33 µg/mL Phalloidin-TRITC-Lösung in Methanol bei Raumtemperatur für 30 min versetzt. Nach abschließender viermaliger Wäsche mit RW wurde die COL I-Membran zwischen 2 Objektträgern fixiert und die gefärbten HUVEC mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 3.4.5. Untersuchung der Proliferation auf COL I-HA- und COL I-FN-Membranen

Mit 1,0 mg COL I und 0 - 1.000 µg inkorporierter HA bzw. 0 - 50 µg inkorporiertem FN beschichtete 12-Well Zellkulturplatten wurden gemäß der Anleitung in den Abschnitten 3.2.1.2 und 3.2.1.4 hergestellt. Teilweise erfolgte eine EDC-Vernetzung. Abweichend von der beschriebenen Vorgehensweise waren in diesen Untersuchungen finale Trocknungszeiten von bis zu 4 Tagen notwendig. HUVEC wurden vor ihrer Verwendung gemäß 3.4.2 kultiviert. Die Proliferationsuntersuchungen wurden in 6-fach Bestimmung durchgeführt.

Je nach Kultivierungszeitraum wurden unterschiedliche HUVEC-Anfangskonzentrationen angewendet (siehe Tabelle 3.6). Während des Kultivierungszeitraums von 7 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel nach 4 Tagen. Nach erfolgter Inkubation für den jeweiligen Zeitraum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das überstehende Zellkulturmedium entfernt, in jedes Well gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.4.3 trypsiniert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 mL 1 x PBS aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Tabelle 3.6.: Initiale HUVEC-Anzahl für die Bestimmung der Proliferationsrate auf COL I-HA- bzw. COL I-FN-Membranen.

	COL I-FN-Membran		COL I-HA-Membran	
	1 Tag	7 Tage	1 Tag	7 Tage
Anfangszellzahl je Well	2·10 <sup>5</sup>	2·10 <sup>4</sup>	2·10 <sup>4</sup>	1,7·10 <sup>3</sup>

### 3.4.6. Analyse der Verteilung und Ausrichtung auf mikrostrukturierten COL I-Membranen

**Zellkultur** Alle Arbeiten wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Sterile, planare COL I-Membranen wurden wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben hergestellt. Sterile PS-Master wurden durch den Thermoumformprozess erhalten. COL I-Membranen wurden gemäß der Anleitung in Abschnitt 3.2.2.5 mit den in Tabelle 3.4 auf Seite 49 gezeigten Mikrostrukturen ausgestattet. Zur Kultivierung von HUVEC auf mikrostrukturierten COL I-Membranen wurde die in Abbildung 3.1a gezeigte Apparatur verwendet. Diese verhinderte ein Herunterlaufen der Zellsuspension nach dem Auftragen auf die Membran.

Eine mikrostrukturierte Membran wurde in die gezeigte Apparatur überführt und 100 µL 20 µg/mL FN-Lösung zugefügt. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 min wurde die FN-Lösung entfernt und 200 µL

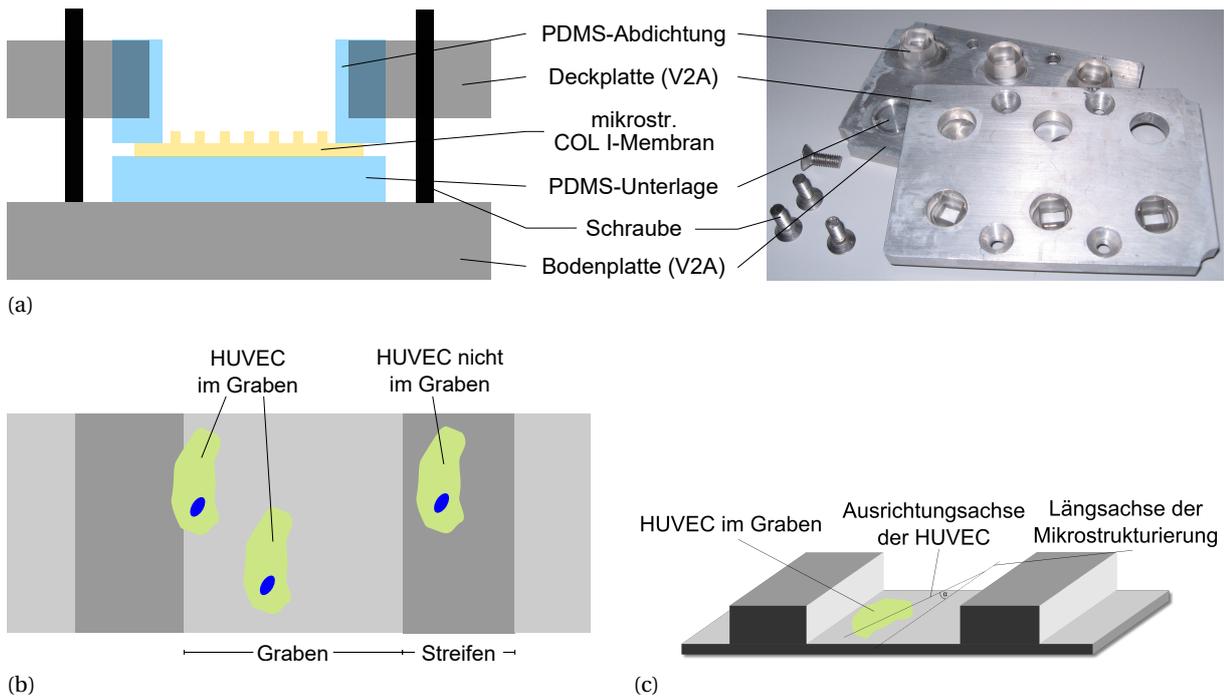


Abbildung 3.1.: (a) Abbildung und schematische Darstellung der Apparatur für die Kultivierung von HUVEC auf mikrostrukturierten COL I-Membranen. Durch die PDMS-Abdichtung wurde sichergestellt, dass die gesamte HUVEC-Suspension auf der mikrostrukturierten Oberfläche der COL I-Membran verbleibt. (b) Schematische Darstellung der Bewertung der Verteilung von HUVEC am Beispiel der Struktur B40A80T20. Wenn sich mindestens 50 % der Kontaktfläche einer Zelle im Graben befand, wurde sie als im Graben wachsend definiert. (c) Schematische Darstellung zur Ermittlung des Ausrichtungswinkels von HUVEC auf mikrostrukturierten COL I-Membranen am Beispiel der Struktur B40A80T20. Eine Gerade wurde generiert, die durch die zwei Punkte der längsten Ausdehnung einer Zelle verläuft. Anschließend wurde der Winkel  $\alpha$  dieser Geraden zur Längsachse der Mikrostreifen ermittelt.

HUVEC-Suspension mit  $5 \cdot 10^3$  Zellen in EC-Medium (Passage 2 - 5) ausgesät. Die Verteilung der HUVEC auf den COL I-Membranen wurde ohne und nach Zentrifugation der gesamten Zellkultivierungsapparatur bei 1.000 1/min analysiert. Nach der anschließenden Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 h wurde das EC-Medium entfernt und die darauf befindlichen Zellen mit Phalloidin-TRITC (s. Anleitung in Abschnitt 3.4.4 auf Seite 56) gefärbt.

**Single-Cell-Analysis** Die Analyse der Zellverteilung und Ausrichtung der visualisierten HUVEC wurde mit der Software ImageJ 1.44o durchgeführt.

Die Auswertung der Zellverteilung erfolgte wie in Abbildung 3.1b dargestellt durch Ermittlung der auf den Grabenböden wachsenden Zellen, die ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt wurden. Eine Zelle wurde als „im Graben wachsend“ zugeordnet, wenn sich mehr als 50 % des Zytoskeletts im Graben befanden.

Zur Bewertung der Ausrichtung von im Graben wachsenden HUVEC wurde, wie in Abbildung 3.1c dargestellt, in der maximalen Ausdehnung des Zellzytoskeletts eine Gerade erzeugt und der Abwei-

chungswinkel zur Längsachse der Mikrostrukturierung bestimmt. Die ermittelten Winkel wurden zu Gruppen von je  $10^\circ$  zusammengefasst.

### 3.4.7. Migrationsanalyse entlang eines VEGF-Gradienten auf COL I-Membranen

**Zellkultur und Time-lapse-Mikroskopie** Die unter sterilen Bedingungen mit einem VEGF-Gradienten ausgestattete COL I-Membranen wurden auf ein rundes Deckglas ( $d = 22 \text{ mm}$ ) platziert und anschließend eine Silikonform mit quadratischer Kavität (vgl. Abb. 3.1a) aufgelegt, sodass eine Membranfläche von  $9 \times 9 \text{ mm}^2$  frei zugänglich war. Der Membranrand war dabei zwischen Silikonform und Deckglas gepresst. Die gesamte Konstruktion wurde in eine 35-mm-Petrischale überführt,  $400 \mu\text{L}$  einer  $20 \mu\text{g/mL}$  FN-Lösung in die Kavität gegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  für 30 min inkubiert. Nach dem Auftragen von  $400 \mu\text{L}$  HUVEC-Suspension in EC-Medium (Passage 2-5, zur Standardkultivierung siehe Abschnitt 3.4.2) mit einer Zellzahl von  $5 \cdot 10^4$  Zellen wurde die Petrischale in den Stage-Top-Mikroskopinkubator so überführt, dass der ansteigende Verlauf der VEGF-Konzentration auf den 2D-Aufnahmen des Mikroskops entlang der x-Achse mit steigendem x-Wert verläuft. Nach Vorinkubation bei  $5\% \text{ CO}_2$ ,  $100\% \text{ rF}$  und  $37^\circ\text{C}$  für 1 h wurden unter selben Konditionen für einen Zeitraum von 20 h Bildaufnahmen im Abstand von 3 min mittels Phasenkontrastmikroskop Olympus CKX-41 und des Programms CellSense Entry erzeugt.

**Single-Cell-Tracking** Die Bildauswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ 1.52e und dem Plugin TrackMate 3.4.2. Auf jedes Bild einer Bilderreihe wurde ein Raster mit 30 Feldern projiziert. Im ersten Bild ( $t = 0 \text{ min}$ ) wurde aus jedem Rasterfeld eine Zelle ausgewählt. Für alle Rasterfelder auf Bild 1, in denen keine Zelle vorhanden war, wurde entweder aus einem anderen Rasterfeld zum Zeitpunkt  $t = 0 \text{ min}$  oder zu einem anderen Zeitpunkt eine Zelle gewählt. Nachdem für eine Zelle die Anfangsposition in Form der x- und y-Koordinaten bestimmt worden war, wurde die Bewegung der jeweiligen Zelle verfolgt und die letzte erkennbare Position bestimmt. Aus der Änderung der x-Koordinaten im zugehörigen Zeitraum wurde die Migrationsgeschwindigkeit entlang der x-Achse berechnet.

## 3.5. Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Programms Origin 2017G durchgeführt. Die angewendeten statistischen Verfahren werden im Ergebnisteil genauer aufgeführt.

---

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, grundlegende Analysen zur Erzeugung und technischen sowie biochemischen Modifizierbarkeit von kompakten COL I-basierten Membranen für TE-Anwendungen durchzuführen. Die in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse zur Prozessentwicklung und Charakterisierung der dabei entstandenen Präparate wurde in die Bereiche

- COL I-basierte planare Membranen,
- Mikrostrukturen auf der Oberfläche von COL I-basierten Membranen als Basis-Technologie für die Erzeugung vaskulärer Netzwerke und zur nativen Orientierung von HUVEC und
- VEGF-Gradienten auf COL I-basierten planaren Membranen als Technologie zur Induktion der gerichteten Migration von HUVEC

unterteilt. Die zugehörigen Analysen, Ergebnisse und deren Einordnung werden in den folgenden Abschnitten genauer ausgeführt.

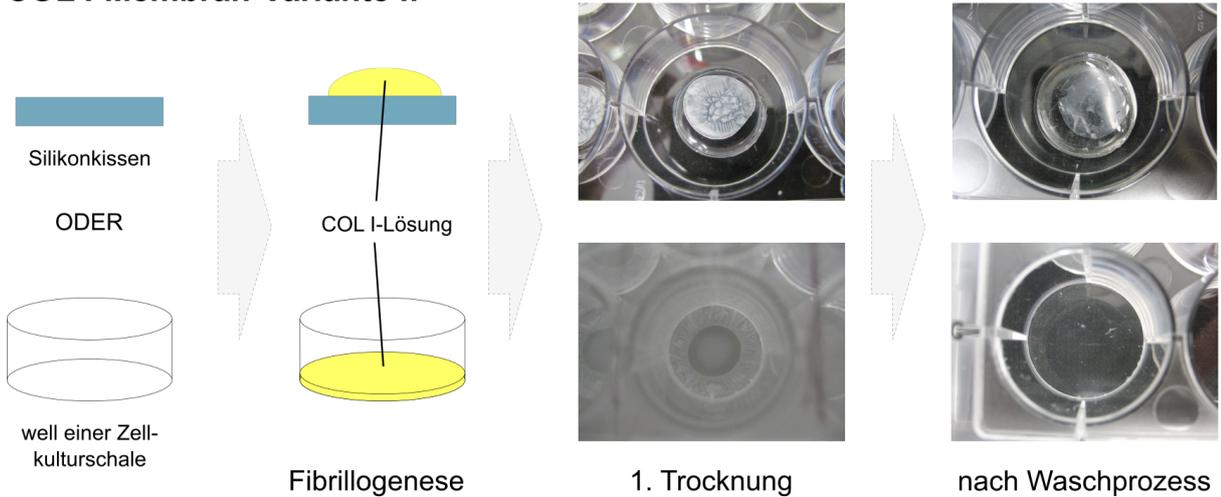
### 4.1. COL I-basierte planare Membranen

#### 4.1.1. Entwicklung von Verfahren zur Membranherstellung

Voraussetzung zur Durchführung der Entwicklungsschritte und Analysen zum Erreichen der zwei oben zuletzt genannten Ziele war die Erzeugung stabiler, COL I-basierter planarer Membranen. Dies erfolgte in zwei verschiedenen Varianten. Vorversuche zeigten, dass die Erzeugung von Mikrostrukturen von bis zu 40  $\mu\text{m}$  Tiefe eine ausreichende Membrandicke von mindestens 100  $\mu\text{m}$  erforderten. Außerdem wurde von dicken Membranen eine höhere Stabilität während des geplanten Druckumformens zur Mikrostrukturherzeugung und ein besseres Handling erwartet. Im Gegensatz dazu wird COL I-Membranen oder -Beschichtungen von wenigen  $\mu\text{m}$  Dicke eine bessere Eignung in der Zellkultur zugesprochen, da darauf befindliche Zellen sowohl überhaupt durchlichtmikroskopisch als auch mit besserem Kontrast dargestellt werden können. Zusätzlich sollte deren Herstellung schneller und mit geringerem Aufwand erfolgen. Die in Abschnitt 3.2.1 auf Seite 46 beschriebenen Ergebnisse der Prozessentwicklung zur Herstellung beider Membranvarianten ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt.

COL I-Membranen nach Variante I sind rund, haben einen Durchmesser von 21 mm und eine Trockenmasse von 1,0 mg oder 1,5 mg, die zur freien Handhabung auf Silikonkissen oder nicht ablösbar in den Wells von Zellkulturschalen erzeugt wurden. Die jeweilige Präparation hing von der Verwendung für die nachfolgenden Experimente ab. Sie wurden aus einem unbehandelten COL I-Hydrogel

### COL I-Membran-Variante I:



### COL I-Membran-Variante II:



Abbildung 4.1.: Prozessschritte zur Herstellung von 2 Varianten planarer COL I-Membranen. Membranen nach Variante I waren dünn und transluzent und wurden aus unbehandeltem, fibrillärem COL I-Hydrogel auf Silikonkissen oder in Zellkulturschalen erzeugt. Membranen nach Variante II waren quadratisch mit einer Fläche von 9 x 9 mm<sup>2</sup> und besaßen eine Dicke von mind. 100 µm. Hohe Membrandicken wurden durch den Einsatz hoher COL I-Massen erreicht, indem fibrilläres COL I erst zerkleinert und anschließend zentrifugiert wurde. Variante-II-Membranen wurden für die Entwicklung eines Mikrostrukturierungsprozesses auf der Membranoberfläche und dazugehörige Zellkultur-Experimente verwendet. Für alle anderen Untersuchungen wurden Variante-I-Membranen verwendet.

hergestellt, anschließend salzfrei gewaschen und getrocknet. Der Waschprozess war maßgeblich notwendig, um auskristallisierende Salze des PBS zu entfernen und dadurch eine gute Transparenz der dünnen Membranen für die Mikroskopie zu erreichen. Mit den Membranen wurden Untersuchungen zur Freisetzung von FN und HA, zur Analyse des Proliferationsverhaltens von HUVEC, zur Erzeugung eines VEGF-Gradienten und zum Migrationsverhalten von HUVEC entlang des Gradienten durchgeführt.

COL I-Membranen mit einer Dicke von mindestens 100  $\mu\text{m}$  wurden mittels Herstellungsvariante II erzeugt. Die notwendige COL I-Masse von 10 mg, 20 mg oder 40 mg wurde durch mechanische Zerkleinerung eines großvolumigen COL I-Hydrogels erreicht, das anschließend zentrifugiert wurde. Durch die Unlöslichkeit von COL I-Fibrillen in Wasser reicherten sie sich sehr stark im Sediment an und führten damit zur Zunahme der Fibrillendichte. Danach erfolgte die Trocknung zur Rohmembran. Die Planarität und Formgebung der Rohmembran wurde durch einen Pressvorgang realisiert. Die Pressapparatur (s. Abbildung 4.1) wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Brown u. a. (2005) entwickelt. Die quaderförmigen Kavitäten der Apparatur besaßen eine horizontale Querschnittsfläche von  $9 \times 9 \text{ mm}^2$  und gaben dadurch die Membranmaße vor. Zur Ableitung des Wassers aus den gequollenen Rohmembranen wurde ein Drainage-System, bestehend aus einem Nylon-Filterpapier ( $0,2 \mu\text{m}$ ) und einem groben Zellulose-Filterpapier, angewendet. Die angelegte Druckkraft von 370 N wurde im Vorfeld empirisch ermittelt und entspricht dem Wert, bei dem die Dichtheit der Apparatur gewährleistet war und kein COL I der Rohmembran aus der Kavität austrat. Die resultierenden COL I-Membranen mit einer quadratischen Grundfläche von  $9 \times 9 \text{ mm}^2$  besaßen z.T. dünne Häute bestehend aus COL I, senkrecht zur Membranfläche aufstehend an den Rändern der Membran. Sie entstanden durch das Eindringen von COL I der Rohmembran zwischen die Wand der Kavität und den PTFE-Presszylinder. Nach der finalen Trocknung wurden sie entfernt. Auf diesen Membranen wurden Mikrostrukturen durch einen Druckumformprozess erzeugt und die Beeinflussbarkeit von HUVEC durch diese räumlichen Restriktionen untersucht.

Bei beiden Varianten der Membranherstellung bestand die Möglichkeit der Inkorporation weiterer Biopolymere der ECM, wie z.B. FN oder HA, die in nachfolgenden Untersuchungen genauer analysiert wurde.

#### **4.1.2. Kinetik der Freisetzung von Hyaluronsäure**

Mit der Inkorporation von HA in COL I-Membranen wurde das Ziel verfolgt, das Proliferationsverhalten von HUVEC zu beeinflussen und einen Anbindungspunkt zur Verankerung des Wachstumsfaktors VEGF in den Membranen bereitzustellen. Da die Wechselwirkungen zwischen HA und COL I nur von elektrostatischer Natur sind und in den Arbeiten von Stamov (2009) gezeigt werden konnte, dass Abstoßungskräfte zwischen geladenen GAG (hier Heparin) die Anbindung an COL I behindern, wurde analysiert, wie stabil HA in die Membranen inkorporiert werden kann. Dazu wurden COL I-Membranen der Variante I (s. Abschnitt 3.2.1.2 auf Seite 47) mit unterschiedlichem HA-Anteil hergestellt und die Freisetzung der HA aus der Membran heraus über einen Zeitraum von 7 Tagen quantifiziert. Mit dem Ziel der Erhöhung der eingelagerten HA-Menge und Verbesserung der COL I-HA-Verknüpfung

Tabelle 4.1.: Wiedergefundene HA-Konzentration in COL I-basierten Membranen mit HA-Anfangskonzentrationen von 100, 500 und 1.000  $\mu\text{g}$  HA pro 1 mg COL I. Die mit dem Elson-Morgan-Assay detektierbaren Konzentrationen sind als prozentualer Anteil der theoretischen Anfangskonzentration angegeben. Die tatsächlich detektierbare HA wurde in Abhängigkeit zur Vernetzung der COL I-basierten Membranen mit EDC und einer Hydrolyse der Membranen mit Papain untersucht. n = 6.

HA-Anfangskonzentration [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]	Ohne EDC-Vernetzung	
	Ohne Papain-Hydrolyse	Mit Papain-Hydrolyse
	Wiedergefundener HA-Anteil [%]	Wiedergefundener HA-Anteil [%]
100	75,7 $\pm$ 24,2	89,9 $\pm$ 21,8
500	67,8 $\pm$ 16,5	89,3 $\pm$ 6,5
1.000	62,9 $\pm$ 10,9	88,4 $\pm$ 6,8

HA-Anfangskonzentration [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ]	Mit EDC-Vernetzung	
	Ohne Papain-Hydrolyse	Mit Papain-Hydrolyse
	Wiedergefundener HA-Anteil [%]	Wiedergefundener HA-Anteil [%]
100	104,7 $\pm$ 11,8	111,7 $\pm$ 22,3
500	96,5 $\pm$ 7,4	114,9 $\pm$ 17,2
1.000	84,3 $\pm$ 9,1	115,8 $\pm$ 7,9

durch kovalente Vernetzung wurde auch der Einfluss der Behandlung mit dem Vernetzer EDC untersucht. Die Quantifizierung der HA erfolgte nach saurer Gasphasenhydrolyse mit dem Elson-Morgan-Assay.

Die komplex zusammengesetzte Analysenmatrix machte es initial notwendig, die tatsächlich detektierbare HA nach Durchführung der analytischen Prozesse zu bewerten (Wiederfindungsrate). In diesem Zusammenhang sollte außerdem geprüft werden, inwiefern eine enzymatische Hydrolyse des fibrillären COL I durch die Protease Papain vor der Gasphasenhydrolyse die analytische Zugänglichkeit zur HA verbessern kann. Dafür wurden COL I-Membranen mit initial 100  $\mu\text{g}$ , 500  $\mu\text{g}$  oder 1.000  $\mu\text{g}$  HA pro 1 mg COL I erzeugt und auf die analytisch wiederfindbare HA-Masse sowohl (1) als unbehandelte Träger, als auch unter dem Einfluss (2) einer EDC-Vernetzung, (3) einer Papainbehandlung oder (4) der Kombination beider untersucht.

Die Ergebnisse in Tabelle 4.1 zeigen, dass der papainvermittelte Abbau der COL I-Membranen vor der sauren Totalhydrolyse immer zu höheren detektierten HA-Mengen führte. Die Wiederfindung von HA aus Membranen, die nicht durch Papain hydrolysiert wurden, war für fast alle Proben unzureichend. Dort wurde in unvernetzten Membranen die niedrigste wiedergefundene HA-Menge detektiert, während auch weniger als 100 % in EDC-vernetzten Membranen nachgewiesen wurden (Ausnahme: bei 100  $\mu\text{g}$  HA pro 1 mg COL I). Als ursächlich für diese Ergebnisse wird der Zustand der COL I-Membranen vor der sauren Totalhydrolyse vermutet. Die Behandlung von COL I-Membranen mit Papain stellte eine Lösung bereit, von der eine geringe Menge direkt der vollständigen sauren

Hydrolyse unterzogen wurde. Dagegen führte die Verwendung einer gesamten COL I-Membran zu einer deutlich höheren Probenmenge, die unter gleichen Bedingungen der sauren Hydrolyse ausgesetzt wurde. Dabei waren in einigen Fällen Reste der COL I-Membran nach saurer Hydrolyse in den Probengefäßen noch sichtbar, was darauf hinweist, dass der Membranabbau durch die größere Probenmenge vermutlich unvollständig war. Obwohl diese Proben in den Reagenzien für den Elson-Morgan-Assay löslich waren, wurde die vollständige, anfänglich zugegebene HA-Menge wahrscheinlich aufgrund des Verbleibs von HA-Abbauprodukten am unvollständig hydrolysierten COL I nicht wiedergefunden. Darüber hinaus hängt die Wiederfindung von HA in Membranen ohne Papainbehandlung offensichtlich von der initialen HA-Menge ab, da die geringste Wiederfindungsrate für die höchsten eingesetzten HA-Mengen gemessen wurde. Zurückzuführen ist das wahrscheinlich auf eine höhere Anzahl von Wechselwirkungen zwischen einem hohen Anteil an HA und COL I, die der HA eine Art Schutz vor Hydrolyse bieten. Zusammenfassend hat die Anwendung von Papain verschiedene Vorteile:

- COL I wird in Peptidfragmente zerlegt, die leichter zugänglich für die weitere saure Gasphasenhydrolyse sind.
- Die Möglichkeit, bestimmte Aliquots der Gasphasenhydrolyse zu unterziehen, verringert die individuelle Probenmenge und erhöht die Löslichkeit der Hydrolyseprodukte.
- Der Abbau von COL I vermindert die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen COL I und HA und verbessert daher die Empfindlichkeit von HA gegenüber Hydrolyse.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die papaininduzierte Hydrolyse der Membranen standardmäßig in den analytischen Prozess zur Quantifizierung von HA integriert und die Wiederfindungsrate bei der Korrektur der gemessenen HA-Massen berücksichtigt.

Die Ergebnisse in Tabelle 4.1 zeigen auch, dass für EDC-vernetzte Proben die Wiederfindungsrate für alle verwendeten HA-Mengen im Vergleich zu Proben, die ohne EDC hergestellt wurden, höher war. In diesem Zusammenhang wurde bei EDC-vernetzten und mit Papain behandelten Proben die maximal wiederfindbare HA-Menge überschritten. Für die Wechselwirkungen zwischen COL I und HA wird angenommen, dass negativ geladene HA und positiv geladenes COL I ( $pI = 9.2$ ) in Lösung einen Polyionenkomplex bilden und dadurch HA gegen Hydrolyse geschützt ist (Taguchi u. a. 2002). EDC aktiviert Carboxylfunktionen von Glucuronsäuregruppen der HA oder Glutamin-, Asparaginsäure bzw. den C-Terminus im COL I, die in einer weiteren Reaktion mit Nukleophilen wie Aminen oder Hydroxylgruppen reagieren können. Somit können Amid- oder Esterbindungen zwischen oder innerhalb von HA- bzw. COL I-Molekülen sowie zwischen HA und COL I gebildet werden. Diese Reaktionen vermindern die Anzahl funktioneller Gruppen, die die Nettoladung der Moleküle bestimmen, was zur Verminderung der polyionischen COL I-HA-Interaktion führt. Daher lässt auch die verstärkte Wiederfindung von HA, die bei mit EDC behandelten Proben beobachtet wurde, einen Rückgang von COL I-HA-Wechselwirkungen vermuten.

Während der HA-Quantifizierung unter Verwendung des Elson-Morgan-Assays traten hohe Abweichungen der bestimmten HA-Menge auf (s. Tabelle 4.1). In der Literatur wird für diese Analysemethode eine relative Standardabweichung von ca. 10 % für die Quantifizierung von löslichem Glucosamin

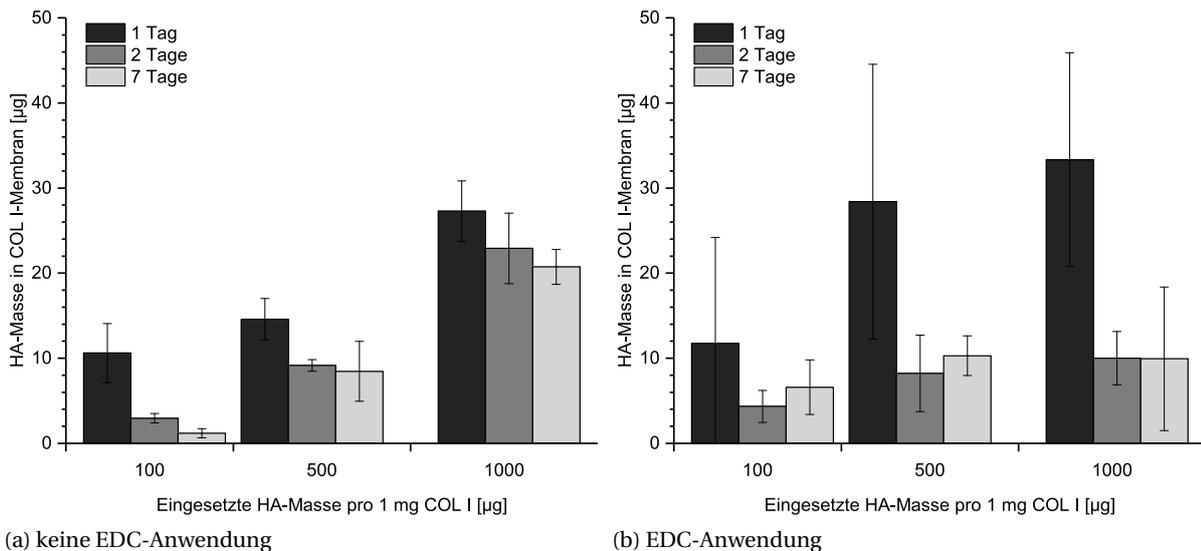


Abbildung 4.2.: Verbleibende HA-Masse in (a) unvernetzten und (b) EDC-vernetzten COL I-HA-Membranen. Die Membranen wurden mit einer COL I-Masse von 1 mg und initial 100 µg, 500 µg bzw. 1.000 µg HA pro 1 mg COL I nach Variante I (s. Abschnitt 3.2.1.2 auf Seite 47) erzeugt. Nach Inkubation in DMEM für 1-7 Tage wurde die verbleibende HA-Masse quantifiziert. Alle Membranen wurden mit Papain hydrolysiert. Auf Basis der Ergebnisse aus Tabelle 4.1 wurden daher die gemessenen HA-Konzentrationen korrigiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = 6.

berichtet (Fournier 2001). In diesen Untersuchungen wurden jedoch relative Standardabweichungen von bis zu 24,2 % bestimmt, die besonders bei niedrigen initialen HA-Mengen am höchsten waren. Es wird vermutet, dass die komplexe Zusammensetzung der COL I-Membran, die Interaktion von HA mit COL I sowie die angewendete, umfangreiche Probenbehandlung dafür ursächlich sind und die exakte HA-Wiederfindung in COL I-basierten Membranen erschweren.

Nach der Charakterisierung der Einflussgrößen auf den analytischen Prozess wurde im weiteren Verlauf die Freisetzung von HA aus EDC-vernetzten und unvernetzten Membranen analysiert. Dafür wurden getrocknete Membranen mit initial 100 µg, 500 µg oder 1.000 µg HA pro 1 mg COL I in DMEM bei 37 °C für bis zu 7 Tage inkubiert. Alle Proben wurden anschließend mit Papain behandelt und die detektierten HA-Massen mit Hilfe der Werte aus Tabelle 4.1 korrigiert.

Abbildung 4.2 zeigt, dass bei allen untersuchten Proben eine deutliche Abnahme der membranassoziierten HA-Menge beobachtet werden kann. Die höchste Abnahme der HA-Masse wurde während der ersten 24 Stunden unabhängig von der eingesetzten HA-Masse und der Vernetzung mit EDC festgestellt. Bei nahezu allen untersuchten Proben konnte bereits nach 48 h ein konstanter Endwert der verbleibenden HA-Masse bestimmt werden. Zwar konnte bei EDC-freien Membranen mit steigender initialer HA-Masse auch ein Anstieg der nach 7 Tagen verbliebenen HA-Masse von etwa 1-2 % des Anfangswertes bestimmt werden, jedoch betrug bei mit EDC behandelten Membranen, unabhängig von der initialen HA-Menge, die finale HA-Masse nach 7 Tagen etwas weniger als 10 µg. Die Daten bestätigen die kontinuierliche Freisetzung von HA aus den Membranen und zeigen weiterhin die fehlende Wirkung von EDC auf die Erhöhung der eingelagerten HA-Menge. Die Ähnlichkeit der verbleibenden HA-Massen in vernetzten und nicht-vernetzten Membranen bestätigt die oben bereits

geäußerte Annahme, dass eine kovalente Bindungen zwischen COL I und HA durch EDC nicht gebildet wurde. Untersuchungen zur kovalenten Verbindung von COL und HA waren bereits Gegenstand anderer Studien, die jedoch anhand von FT-IR-Spektren nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten. So berichteten es Taguchi u. a. (2002) für die kovalente Anbindung von HA an COL II. Dagegen behandelten Si-Nae Park, Jong-Chul Park u. a. (2002) gefriergetrocknete HA-COL I-Scaffolds mit EDC und ordneten die durch IR-Messungen nachgewiesenen Ester- und Amidbindungen Verknüpfungen zwischen COL I und HA bzw. nur zwischen COL I- oder HA-Molekülen zu.

Aus den Untersuchungen kann geschlussfolgert werden, dass eine Erhöhung der HA-Menge in den COL I-Membranen durch EDC-Vernetzung nicht möglich ist. Jedoch bieten die geringen, in den Membranen verbleibenden HA-Mengen weiterhin das Potenzial für die weitere Interkalation des Wachstumsfaktors VEGF über elektrostatische Wechselwirkungen.

### 4.1.3. Kinetik der Freisetzung von Fibronectin

Als wichtiger Baustein zur Vermittlung der Zelladhäsion durch die enthaltene RGD-Aminosäuresequenz und zur Förderung der Proliferation von HUVEC sollte FN in die zu erzeugenden COL I-basierten Membranen integriert und im Folgenden die Freisetzungskinetik analysiert werden. Die gute analytische Zugänglichkeit nach enzymatischer Hydrolyse der Membranen mit Papain wurde auch hier bei der Analyse der FN-Freisetzung genutzt. Es war davon auszugehen, dass FN ebenso wie COL I durch Papain hydrolysiert und die Peptidfragmente in Lösung gebracht werden. Um trotzdem eine Quantifizierung durchzuführen, wurde das aus humanem Blutplasma selbst isolierte FN mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA-SE konjugiert. Dadurch konnte in der entstandenen Lösung direkt die FN-Konzentration fluoreszenzphotometrisch analysiert werden.

Zur Analyse der Freisetzung von inkorporiertem FN wurde ausgehend von COL I-Membranen (Herstellung nach Variante I, siehe Abschnitt 3.2.1.2 auf Seite 47) mit einem FN-Anteil von 5-50 µg pro 1 mg COL I, der nach Inkubation in DMEM bei 37 °C für 1-7 Tagen noch verbleibende FN-Anteil ermittelt. Da im Vergleich zur HA am FN *per se* Domänen zur Anbindung von COL I vorhanden sind, wurde auf den Einsatz von EDC zur Optimierung der FN-Anbindung an die COL I-Membran verzichtet.

Abbildung 4.3 zeigt, dass bei allen gewählten initialen FN-Anteilen eine kontinuierliche Verarmung des FN-Anteils in den Membranen ermittelt wurde, sodass etwa 5 - 10 % des anfänglich zugegebenen FN darin verblieben. Dieser FN-Gehalt könnte auf die im FN-Molekül enthaltene COL I-Bindungsdomäne zurückgeführt werden, die sich zwischen den Aminosäuren Ala-464 und Met-477 befindet und eine stabile Verbindung beider Moleküle ermöglicht (Pankov und Yamada 2002; Erat u. a. 2010). Weiterhin ist mit höherer FN-Anfangsmasse auch eine höhere finale FN-Masse verbunden, sodass bei der höchsten FN-Anfangsmasse von 50 µg und nach der längsten Inkubationsdauer von 7 Tagen eine FN-Masse von 4 µg pro 1 mg COL I verblieb.

Die Ergebnisse zeigen zwar in dem für spätere Zellkulturversuche anvisierten Untersuchungszeitraum das ausreichende Vorhandensein von FN in den Membranen, lassen aber auch die Vermutung zu, dass die Desorption des FN aus der COL I-Membran noch nicht abgeschlossen ist. Dies wäre erreicht, wenn mit steigender Inkubationszeit die verbleibende FN-Konzentration konstant bleibt. Mit

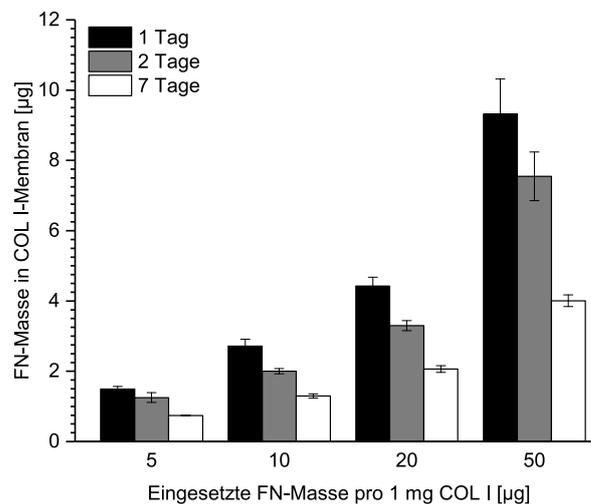


Abbildung 4.3.: Verbleibende FN-Masse in COL I-Membranen. FN wurde mit TAMRA-SE markiert und damit Membranen aus 1 mg COL I und initial 5-50 µg FN nach Variante I hergestellt (s. Abschnitt 3.2.1.2 auf Seite 47). Nach Inkubation in DMEM bei 37 °C für 1 – 7 Tage wurde die verbliebene FN-Masse nach Hydrolyse mit Papain mittels Fluoreszenzphotometer (Anregungswellenlänge 555 nm, Emissionswellenlänge 577 nm) quantifiziert. Ebenso wurde die Fluoreszenzintensität von Membranen mit FN-Anteilen von 5-50 µg unmittelbar nach deren Herstellung analysiert und die ermittelte Wiederfindungsrate für die Korrektur der Messwerte verwendet. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = 6.

den hier untersuchten initialen FN-Anteilen sollte in weiterführenden Experimenten das Proliferationsverhalten von HUVEC auf COL I-basierten Membranen charakterisiert werden.

#### 4.1.4. Analyse der Proliferation von HUVEC

Mit den nachfolgenden Untersuchungen sollte der Einfluss der in den Membranen verbleibenden HA-Massen aus Abbildung 4.2 auf das Proliferationsverhalten von HUVEC analysiert werden. Außerdem sollte untersucht werden, welchen Einfluss die EDC-Anwendung bei COL I-HA-Membranen auf das Wachstum der HUVEC ausübt. Ebenso sollte die Frage beantwortet werden, ob durch FN-Inkorporation in die Membranen eine Verbesserung der HUVEC-Proliferation im Vergleich zur reinen COL I-Membran hervorgerufen werden kann.

Untersucht wurden COL I-Membranen mit initialen HA-Massen im Bereich von 0 - 1.000 µg pro 1 mg COL I bzw. mit initialen FN-Massen im Bereich von 0 - 50 µg pro 1 mg COL I. Die EDC-Anwendung erfolgte mit einer 2 mg/mL Lösung. Anschließend wurden die Proben EDC-frei gewaschen. Verschiedene initiale HUVEC-Zellzahlen wurden ausgesät, um eine Konfluenz der Zellschicht zu vermeiden. Die Zellzahlen wurden nach 1 Tag und nach 7 Tagen Kultivierung bestimmt und daraus ein Proliferationsfaktor gebildet, der den Quotienten aus der Zellzahl zum Untersuchungszeitpunkt und der initialen Zellzahl abbildet. Da FN ein akzeptiertes Substrat für die Kultivierung von HUVEC ist (Pankov und Yamada 2002; Pompe u. a. 2003), wurde als Referenz eine mit FN beschichtete Zellkulturschale verwendet.

Beim Vergleich der Proliferationsraten auf den mit EDC behandelten und unbehandelten COL I-HA-

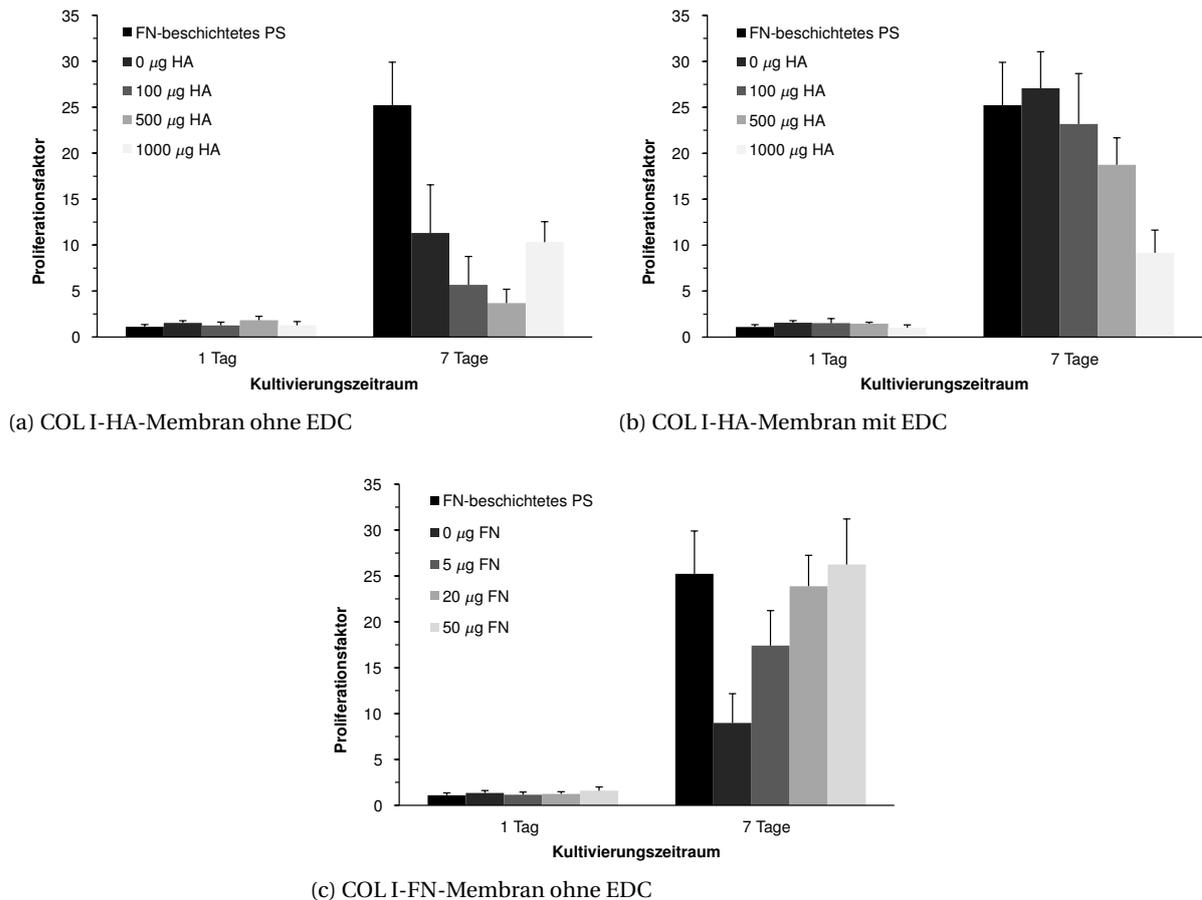


Abbildung 4.4.: Proliferationsverhalten von HUVEC auf COL I-HA-Membranen (a) ohne und (b) mit EDC-Behandlung der Träger sowie auf (c) COL I-FN-Membranen. Entsprechende Membranen wurden in Form der Beschichtung einer 12-Well Zellkulturschale wie in Abschnitt 3.4.5 auf Seite 57 beschrieben mit HA-Massen von 0 - 1.000  $\mu\text{g}$  bzw. FN-Massen von 0 - 50  $\mu\text{g}$  pro 1 mg COL I hergestellt. Als Vergleich dienten mit FN beschichtete Zellkulturschalen. Die initial ausgesäte Zellzahl der HA-haltigen Membranen betrug für Tag 1  $2 \cdot 10^4$  Zellen und für Tag 7  $1,7 \cdot 10^3$  Zellen. Bei FN-haltigen Membranen betrug die initial ausgesäte Zellzahl für Tag 1  $2 \cdot 10^5$  Zellen und für Tag 7  $2 \cdot 10^4$  Zellen. Nach 1 bzw. 7 Tagen Kultivierung wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und aus dem Verhältnis zur Anfangszellzahl der Proliferationsfaktor berechnet. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $n = 6$ .

Membranen am Tag 1 wurden nahezu keine Unterschiede beobachtet (Abb. 4.4a und 4.4b). Weder das Vorhandensein der HA noch die ansteigende, verbleibende HA-Masse in den COL I-Matrizes zeigten im Vergleich zum FN-beschichteten Referenzsubstrat einen wesentlichen Einfluss auf den Proliferationsfaktor. Am Tag 7 wurde für alle HA-haltigen Substrate eine deutliche Erhöhung des Proliferationsfaktors festgestellt. Trotz offensichtlich geringer Unterschiede der verbliebenen HA-Mengen in verschiedenen COL I-HA-Membranen (s. Abschnitt 4.1.2) führte das zu differenzierten Reaktionen der HUVEC auf diesen Substraten. Zu erkennen ist ein Hemmeffekt auf die HUVEC-Proliferation mit steigender initialer HA-Masse, wie bereits von Allison und Grande-Allen (2006) berichtet. Als Ursache dafür wird die verwendete HA mit einem mittleren Molekulargewicht von 3,5 MDa vermutet. Dieser werden anti-angiogene, proliferationshemmende Eigenschaften zugesprochen (Day und La Mot-

---

te 2005), wohingegen niedermolekulare HA die Proliferation von HUVEC beschleunigt (Girish und Kemparaju 2007).

Durch die EDC-Behandlung der COL I-HA-Membranen konnte eine schnellere HUVEC-Proliferation beobachtet werden als ohne EDC. Die EDC-Anwendung führte bei reinen COL I-Membranen zu einem nahezu gleichen Proliferationsverhalten wie beim Wachstum auf dem FN-beschichteten Referenzsubstrat. Ursächlich dafür könnte eine Verringerung der mechanischen Elastizität der Membranoberfläche sein, die aus der kovalenten Vernetzung der Membranbestandteile resultiert. Es ist bekannt, dass ein verbessertes Zellwachstum auf Oberflächen mit geringer Elastizität beobachtet werden kann (Discher u. a. 2005), wie es auch beim FN-beschichteten Referenzsubstrat der Fall ist. Der gleiche Effekt könnte hier mit den EDC-behandelten Membranen erzielt worden sein. Da die Vernetzungsfähigkeiten von EDC mutmaßlich keinen Einfluss auf die Verbindung zwischen COL I und HA hatten (s. Abschnitt 4.1.2), legt das gesteigerte Proliferationsverhalten von HUVECs auf den EDC-vernetzten COL I-HA-Membranen im Vergleich zu unbehandelten Membranen die Vermutung nahe, dass kovalente Bindungen nur zwischen COL I-Molekülen gebildet wurden.

Mit steigender HA-Menge wurde bei EDC-behandelten COL I-HA-Membranen ebenfalls eine Hemmung der Zellproliferation beobachtet, die insgesamt jedoch in einem höheren Bereich liegt. Das lässt die Vermutung zu, dass beim Wachstum auf EDC-vernetzten Membranen sowohl die bereits diskutierte Wirkung der hochmolekularen HA als auch die vermutete Verringerung der Membranelastizität durch die Vernetzung Gegenspieler sein könnten.

Ähnlich wie bei HA-haltigen Membranen war bei COL I-FN-Matrices, wie in Abb. 4.4c dargestellt, kein wesentlicher Unterschied im Proliferationsverhalten der HUVEC nach 1 Tag Kultivierung in Abhängigkeit zum eingebrachten FN-Anteil zu beobachten. Nach 7 Tagen hatten FN-haltige Träger im Vergleich zur reinen COL I-Membran einen durchweg verstärkenden Einfluss auf die HUVEC-Proliferation, der mit steigender FN-Menge zunimmt. Mit der Zugabe von initial 20 µg bzw. 50 µg FN pro 1 mg COL I konnte nahezu das gleiche Proliferationsverhalten beobachtet werden wie bei der Kultivierung auf dem Referenzsubstrat. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass die steigende Anzahl an Adhäsionspunkten durch FN-Moleküle in der Membran die Proliferation der adhärent wachsenden HUVEC förderte. Dabei führt die Anbindung des FN an die Integrinrezeptoren über Bindungsmotive wie die Aminosäuresequenzen RGD oder LDV zu Signaltransduktionsprozessen, die direkten Einfluss auf das Proliferationsverhalten besitzen (Pankov und Yamada 2002).

FN ist in diesem Zusammenhang in zweierlei Hinsicht eine wichtige Komponente für artifizielle Scaffolds auf COL I-Basis: (1) Es adhärert selbstständig und über einen genügend langen Zeitraum im Scaffold ohne die Verwendung synthetischer Vernetzer und (2) es stellt spezifische Bindungsdomänen für die Zelladhäsion bereit. Daher wurde es in weiterführenden Experimenten in allen COL I-basierten Membranen, die für die HUVEC-Kultivierung vorgesehen waren, standardmäßig mit einer initialen Konzentration von 20 µg pro 1 mg COL I inkorporiert. Nach 7 Tagen verblieben bei dieser FN-Anfangskonzentration  $0,8 \pm 0,03$  µg FN pro 1 mg COL I in der Membran.

## 4.2. Mikrostrukturerzeugung auf der Oberfläche von COL I-Membranen

Die exakte Erzeugung von stabilen Mikrostrukturen auf der Oberfläche von COL I-Membranen ist ein Kernstück dieser Arbeit. Damit sollte die Morphologie von HUVEC gezielt beeinflusst und eine Basis für die Erzeugung vaskulärer Netzwerke geschaffen werden. Basierend auf den Arbeiten von Vernon u. a. (2005a) und Janakiraman u. a. (2007) wurden dafür die zwei in Abbildung 4.5 gezeigten Herangehensweisen entwickelt:

- Zum einen sollte geprüft werden, ob durch *druckloses Abformen* eine Mikrostrukturübertragung von einem PDMS-Master möglich ist. Eine COL I-Lösung wurde dafür darauf aufgetragen und nach anschließender Fibrillogenese des COL I das entstandene Hydrogel getrocknet.
- Zum anderen sollte die Mikrostrukturübertragung durch *Druckumformung* untersucht werden. Dafür sollte ein mikrostrukturierter Master (Stempel) in eine zuvor erzeugte, kompakte COL I-Membran gepresst werden. Für die Verfahrensentwicklung wurden Silizium-, PDMS- als auch Kunststoff-Master als potentielle Stempel analysiert.

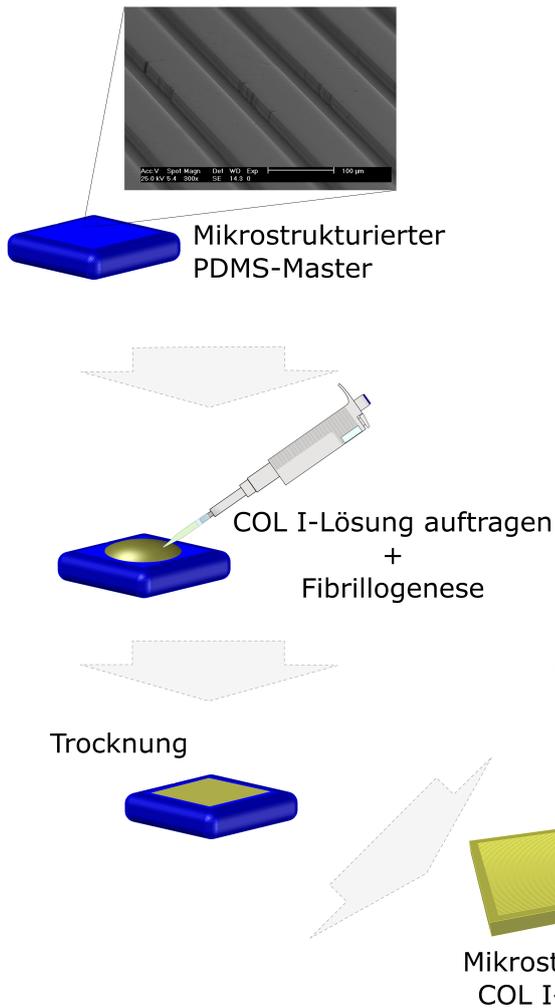
Bedeutendster Unterschied beider Verfahren ist, dass bei der drucklosen Abformung in einem ersten Schritt die aufgetragene COL I-Lösung die vorgelegten Mikrostrukturen benetzen und anschließend, nach Fibrillogenese und Trocknung, abformen sollte. Dagegen sollte bei der Druckumformung der mikrostrukturierte Stempel und die vorgefertigte COL I-Membran aktiv zusammengepresst werden. Für beide Verfahren waren Masterformen aus unterschiedlichen Materialien angedacht (s. Abbildung 4.5, Master in blau), die die Mikrostrukturierung auf ihrer Oberfläche enthielten. Ausgangspunkt aller mikrostrukturierten Master waren mikrostrukturierte Silizium-Wafer, die von der Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH (GeSiM, Großerkmannsdorf, Deutschland) bezogen wurden.

Da für PDMS bekannt ist, dass es hydrophobe Oberflächeneigenschaften besitzt, stand bei der drucklosen Abformung die Erhöhung der Benetzbarkeit des Masters im Fokus. Damit verbunden war jedoch das Risiko, dass getrocknete COL I-Membran und Master nicht mehr voneinander getrennt werden konnten. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass mikrostrukturierte Si-Wafer ebenfalls geeignet wären. Sie mussten jedoch aufwendig von noch anhaftenden COL I-Resten nach den Abformuntersuchungen gereinigt werden. Daher wurden die Mikrostrukturen von den Si-Wafern in PDMS übertragen. Das hatte die Vorteile, dass sich viele Replikat für die Analysen herstellen ließen, die PDMS-Master meist wiederverwendbar waren oder mit weniger wirtschaftlichen Nachteilen entsorgt werden konnten.

Um die mechanische Stabilität und Bedienbarkeit der Apparatur zur Druckumformung zu gewährleisten, sollten Druckkräfte bis max. 950 N für das Aneinanderpressen von Membran und Stempel angewendet werden. Dafür musste ein Material gefunden werden, auf dem die Mikrostrukturen präzise, reproduzierbar und ausreichend stabil erzeugt werden konnten.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der zwei Herangehensweisen hinsichtlich Verfahrensentwicklung und Charakterisierung der erzeugten mikrostrukturierten COL I-Membranen dargestellt. Spe-

## Drucklose Abformung



## Druckumformung

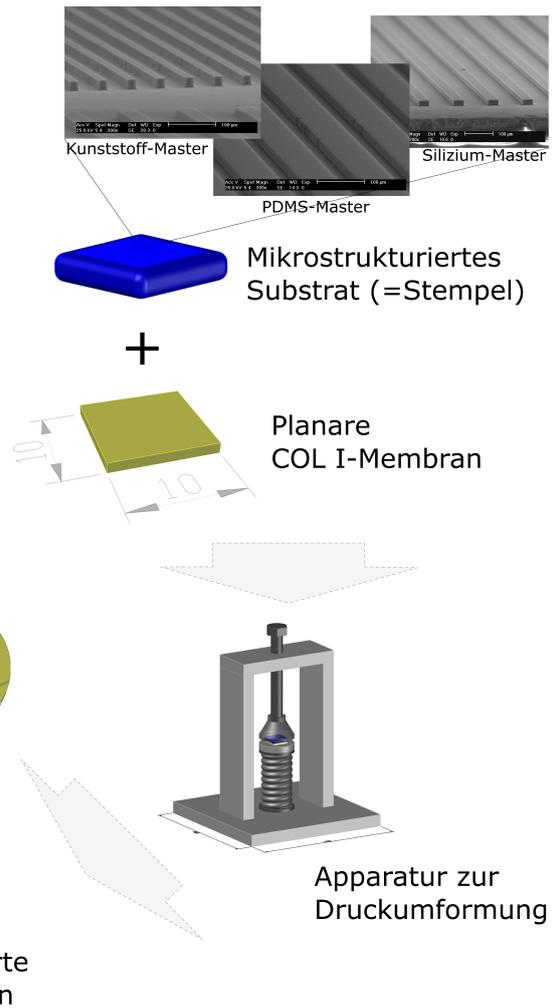


Abbildung 4.5.: Übersicht der geplanten zwei Verfahren zur Erzeugung von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen. Ziel war es zu analysieren, ob durch drucklose Abformung oder durch Druckumformung Mikrostrukturen auf der Oberfläche von COL I-Membranen generiert werden können. Für die drucklose Abformung wurde auf einem (modifizierten) PDMS-Master COL I-Lösung aufgetragen und nach erfolgter Fibrillogenese und Trocknung die Mikrostrukturierung auf der erhaltenen Membran bewertet.

Für die Druckumformung wurden mikrostrukturierte Silizium-, PDMS- bzw. Kunststoff-Master als Stempel verwendet und in vorgefertigte, kompakte COL I-Membranen gepresst. Bei den Stempeln wurde die reproduzierbare Erzeugbarkeit und Stabilität der Mikrostrukturierung analysiert. Ebenso wurden die Mikrostrukturen auf den finalen Membranen charakterisiert.

ziell die Qualität und Stabilität der Mikrostrukturen beider Strukturübertragungsverfahren sowie die Beeinflussung der Morphologie von HUVEC standen im Fokus der Analysen.

### 4.2.1. Drucklose Abformung

Durch Auftragen einer wässrigen 2,0 mg/mL COL I-Lösung auf mikrostrukturierte PDMS-Master mit 10 µm bis 40 µm breiten Streifenstrukturen sollte nach anschließender Fibrillogenese sowie Trock-

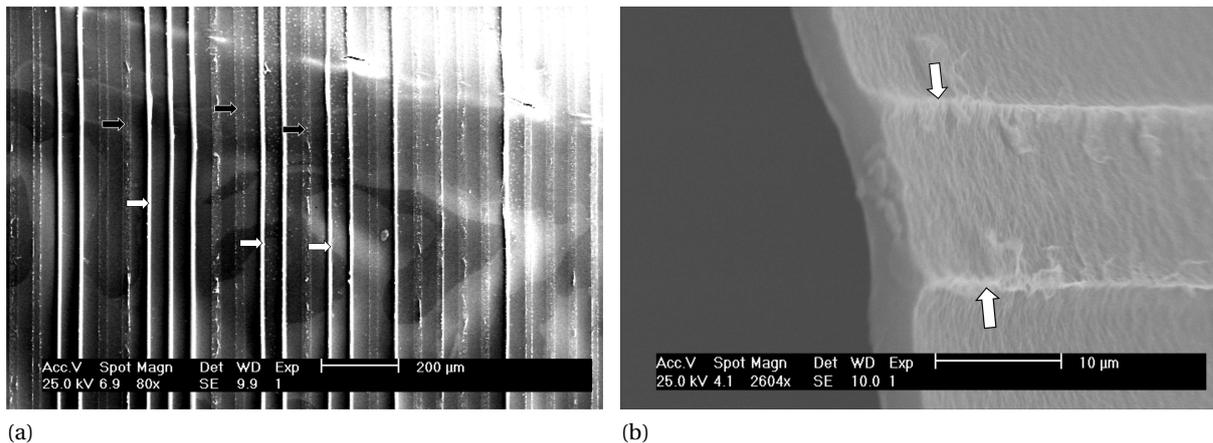


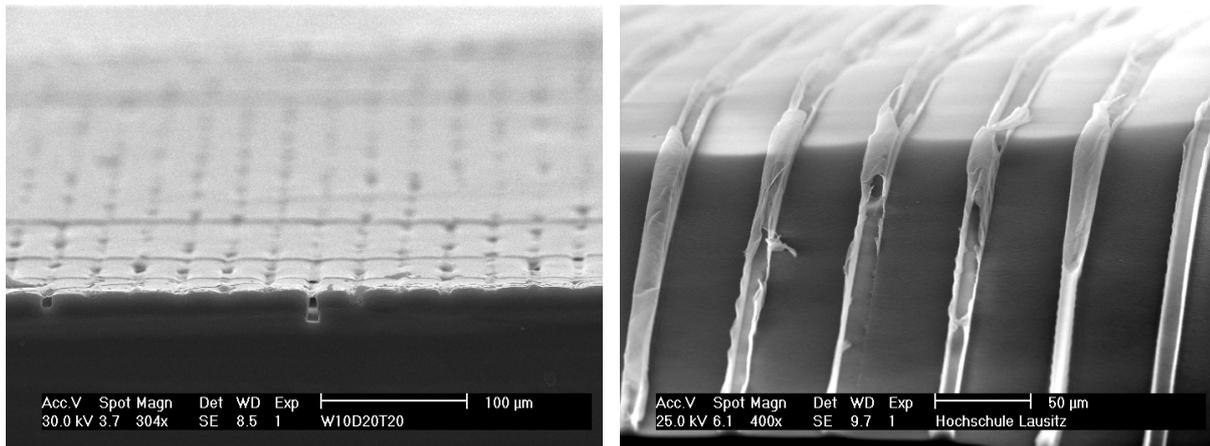
Abbildung 4.6.: REM-Aufnahmen von COL I-Membranen nach druckloser Abformung vom PDMS-Master mit der Mikrostruktur B20A40T20 (vgl. Tabelle 3.4 auf Seite 49). Der PDMS-Master wurde nach der Erzeugung ohne weitere Behandlung für den Abformprozess eingesetzt. (a) Schwarze Pfeile markieren beispielhaft Bereiche ohne Abformung der Mikrostrukturierung, weiße Pfeile zeigen die Erzeugung dünner Folien aus COL I an der Position der Mikrostreifen. (b) Pfeile zeigen die Basis der zu erzeugenden Mikrostreifen.

nung geprüft werden, ob eine Mikrostrukturübertragung auf die gebildeten Membranen möglich ist. Die Membranen wurden vom Master abgelöst und mittels REM analysiert.

In der Bewertung der Aufnahmen in Abbildung 4.6a zeigte sich jedoch, dass die zu erzeugenden Streifenstrukturen zu einem beträchtlichen Anteil gar nicht (schwarzer Pfeil) abgeformt wurden oder nur ansatzweise die senkrechten Flächen der Mikrostreifen in Form dünner COL I-Folien (weißer Pfeil) ohne Ausfüllung des Streifens mit COL I übertragen wurden. Ebenso konnte nur eine unvollständige Streifenbildung beobachtet werden (s. Pfeile in Abbildung 4.6b), die überwiegend mit einer Wellung der Membran an dieser Stelle verbunden war. Weiterhin wurde beobachtet, dass die wässrige COL I-Lösung tropfenförmig auf dem PDMS-Master auflag. Daraus und aus den Beobachtungen nach der REM-Analyse wurde geschlossen, dass ein unvollständiger Kontakt der COL I-Suspension mit der schlecht benetzbaren, hydrophoben PDMS-Oberfläche vorlag, was sich speziell an der Abformung der Tiefe der Grabenstrukturen bemerkbar machte.

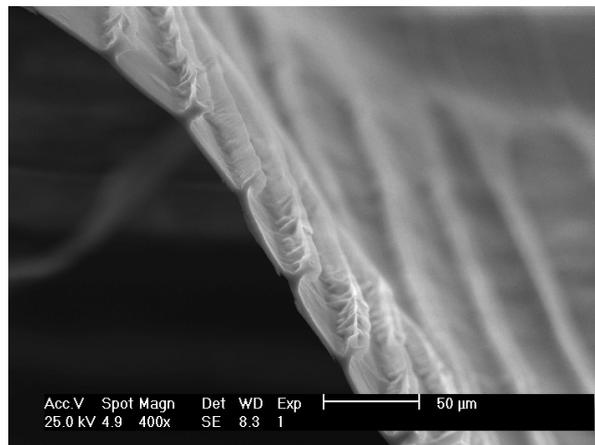
Im weiteren Verlauf wurde daher die Verbesserung der Benetzung des PDMS-Masters durch Behandlung mit reinem  $O_2$ -Plasma für 150 s untersucht. Der anschließende Versuch der Mikrostrukturabformung ermöglichte nach Trocknung zwar eine deutlich bessere Benetzung zwischen COL I-Membran und PDMS-Master, wie Abbildung 4.7a zeigt. Allerdings führte die Vorbehandlung zur verstärkten Adhäsion der COL I-Membranen am nun hochenergetischen PDMS-Master. Eine Ablösung der getrockneten Membran vom PDMS-Master war folglich nur unter Zerstörung der Mikrostrukturen oder Zerreißen der gesamten COL I-Membran möglich.

Um das starke Anhaften der erzeugten COL I-Membran am PDMS-Master nach dem Abformprozess zu verhindern, wurde nach dem Auftragen der nicht-fibrillären COL I-Lösung ein Inkubationsschritt bei  $4^\circ C$  von 48 h eingeführt. Dadurch sollten die starken hydrophilen Eigenschaften des PDMS-Masters, die unmittelbar nach der  $O_2$ -Plasmabehandlung auftraten, deutlich verringert werden. Diese



(a)

(b)



(c)

Abbildung 4.7.: REM-Aufnahmen nach druckloser Abformung von PDMS-Mastern. Die PDMS-Master wurden wie in Abschnitt 3.2.2.4 auf Seite 50 beschrieben mit  $O_2$ -Plasma behandelt. (a) COL I-Membran unablösbar auf PDMS-Master (Mikrostrukturmaße B10A20T20). Die COL I-Lösung wurde unmittelbar nach der Plasmabehandlung aufgetragen. (b) COL I-Membran (Mikrostrukturmaße B20A40T20) nach initialer Vorinkubation der COL I-Lösung auf dem PDMS-Master bei  $4^\circ C$  für 48 h. (c) COL I-Membran (Mikrostrukturmaße B20A40T20) nach Vorinkubation wie bei (b) unter Verwendung einer vorfibrillierten, zerkleinerten COL I-Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/mL. Die Ablösung der Membran erfolgte mit einer Methanol-Aceton-Lösung im Vol.-verhältnis 1:1.

Vorinkubation ermöglichte nur eingeschränkt die vollständige Ablösung der Membran vom PDMS-Master, da die Membranen beim Entfernen regelmäßig zerrissen. Außerdem zeigt Abbildung 4.7b exemplarisch, dass die Mikrostreifen auch hier in Form dünner Folien erzeugt wurden bzw. im Inneren hohl waren. Daher sollte nachfolgend die Ablösbarkeit der Membranen vom PDMS-Master und die Erzeugung vollständiger Mikrostrukturen optimiert werden.

Um die Ablösung der getrockneten, auf dem PDMS-Master befindlichen COL I-Membranen zu erreichen, wurden diese in einem Methanol-Aceton-Gemisch (1 : 1) für 30 min inkubiert. Anschließend konnte die Membran problemlos vom PDMS-Master entfernt werden. Das Lösungsmittelgemisch benetzte offenbar die Kontaktflächen zwischen Membran und PDMS-Master ohne Einfluss auf die

Mikrostrukturierung zu nehmen. Dadurch wurden mutmaßlich die Adhäsionskräfte verringert und eine Trennung voneinander ermöglicht. Im Gegensatz dazu hätte sich die Verwendung von Wasser, das zur Quellung der Membran geführt hätte, vermutlich nachteilig auf den Erhalt der Mikrostrukturen ausgewirkt. Die Behandlung des anhaftenden COL I mit einem Methanol-Aceton-Gemisch wurde jedoch im Hinblick auf die perspektivische Verwendung der COL I-Membranen für die Kultivierung von HUVEC als kritisch angesehen.

Die nachfolgende Verfahrensoptimierung konzentrierte sich auf die vollständige Ausfüllung der übertragenen Mikrostreifen mit COL I. Dies sollte durch die Erhöhung der eingesetzten COL I-Menge erreicht werden. Dafür wurde die Membranerzeugung und Mikrostrukturabformung auf den mit O<sub>2</sub>-Plasma behandelten PDMS-Mastern mit vorfibrilliertem, zerkleinertem COL I mit einer Konzentration von 5 mg/mL durchgeführt. Die in Abbildung 4.7c exemplarisch gezeigte Membran wies Mikrostreifen mit deutlicher Abformung der Mikrostrukturhöhe auf, jedoch wurde die Streifenbreite nicht ausreichend abgebildet. Es waren erneut dünne COL I-Folien erkennbar, die z.T. einen Y-förmigen Querschnitt besaßen. Außerdem war erneut die Wellung der Membran an den Positionen erkennbar, wo sich die Mikrostreifen befanden. Dies scheint eine generelle Problematik bei der Verwendung zu dünner Membranen zu sein. Wenn Mikrostrukturen auf COL I-Membranen mit Dicken erzeugt werden sollten, die deutlich unterhalb der Mikrostrukturtiefe lagen, dann führte das zur Wellung der Membran. An den Positionen, wo die Mikrostruktur erzeugt werden sollte, wurde die Membran lediglich geknickt. Die Ausfüllung der Form mit COL I blieb jedoch aus. Dies ist auch bei den sehr dünnen Membranen in den Studien von Vernon u. a. (2005a) und Vernon u. a. (2005b) zu sehen.

Weiterhin wurde beobachtet, dass sich während der Trocknung mechanische Spannungen innerhalb der Membran aufbauten und zu einer frühzeitigen Ablösung von der PDMS-Oberfläche führten. Diese können durch die Schrumpfung der Membran während der Dehydratisierung aufgetreten sein, aber auch durch die Hydrophobie der Oberfläche hervorgerufen worden sein. Für die erfolgreiche Mikrostrukturübertragung wird jedoch der durchgängige Kontakt des COL I mit der PDMS-Oberfläche bis zur vollständigen Trocknung als Voraussetzung für eine erfolgreiche Mikrostrukturierung angesehen.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Vorgehensweisen führten nicht zur erfolgreichen Erzeugung von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen, sodass eine Strategieänderung notwendig war. Es wurde daher die Prozessentwicklung für ein Druckumformverfahren zur Ausstattung der Oberfläche bereits vorgefertigter, kompakter COL I-Membranen mit Mikrostrukturen unter Anwendung hoher Druckkräfte durchgeführt.

#### **4.2.2. Entwicklung eines Druckumformverfahrens**

Um Mikrostrukturen mit Grabenbreiten von 5 - 40 µm und Grabentiefen von 10 - 40 µm auf der Oberfläche von COL I-Membranen zu erzeugen, sollte im weiteren Verlauf ein Verfahren zur Druckumformung entwickelt werden. Dafür sollten die auf einem Stempel enthaltenen Mikrostrukturen, im Sinne eines Prägeprozesses unter Anwendung einer definierten Druckkraft, auf eine planare COL I-Membran übertragen werden.

Zur Durchführung des Druckumformprozesses wurde die in Abbildung 4.8 schematisch dargestellte Apparatur mit den Maßen 10 cm x 10 cm x 8 cm (ohne Verspannvorrichtung) entwickelt und selbst angefertigt. Diese sollte es ermöglichen, Druckkräfte bis zu einer festgelegten Maximalkraft von 950 N senkrecht zur mikrostrukturierten Fläche zu erzeugen. Die Apparatur wurde aus Edelstahl (Werkstoffnummer 1.4301) gefertigt. Der angewendete Master wurde mit der mikrostrukturierten Seite nach unten auf die planare COL I-Membran in die Apparatur gelegt. Die Verspannvorrichtung ist über ein Gewinde als Linearführung in die Apparatur eingelassen und ermöglichte durch Drehen, die jeweilige Druckkraft präzise einzustellen. Die gezielte senkrechte Krafteinwirkung wurde durch die Verwendung eines beweglichen Kopfes der Verspannvorrichtung noch zusätzlich unterstützt.

COL I-Membranen mit einer Trockenmasse ab 20 mg wiesen eine für die Anwendung des Druckumformverfahrens geeignete Materialdicke auf. Berücksichtigte man die zu erzeugenden Mikrostruktur-tiefen von 10 - 40  $\mu\text{m}$ , so stellte der Einsatz von COL I-Membranen mit Massen < 20 mg keine geeignete Option dar. Diese Membranen waren deutlich dünner, sodass für das Einprägen der Mikrostrukturen nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Die Oberseite der COL I-Membran wurde mit 100  $\mu\text{L}$  wässriger Lösung für 5 min inkubiert. Das führte zur oberflächlichen Quellung der Membran und ermöglichte das Eindringen der Mikrostrukturen des Stempels in die Membran. Außerdem blieben die Bereiche der Membran ohne Wasserkontakt weiterhin getrocknet, was zu einer wesentlich höheren mechanische Stabilität der gesamten Membran führte. Die vollständige Inkubation der Membran führte in Vorversuchen zum vollständigen Zerdrücken während des Druckumformprozesses.

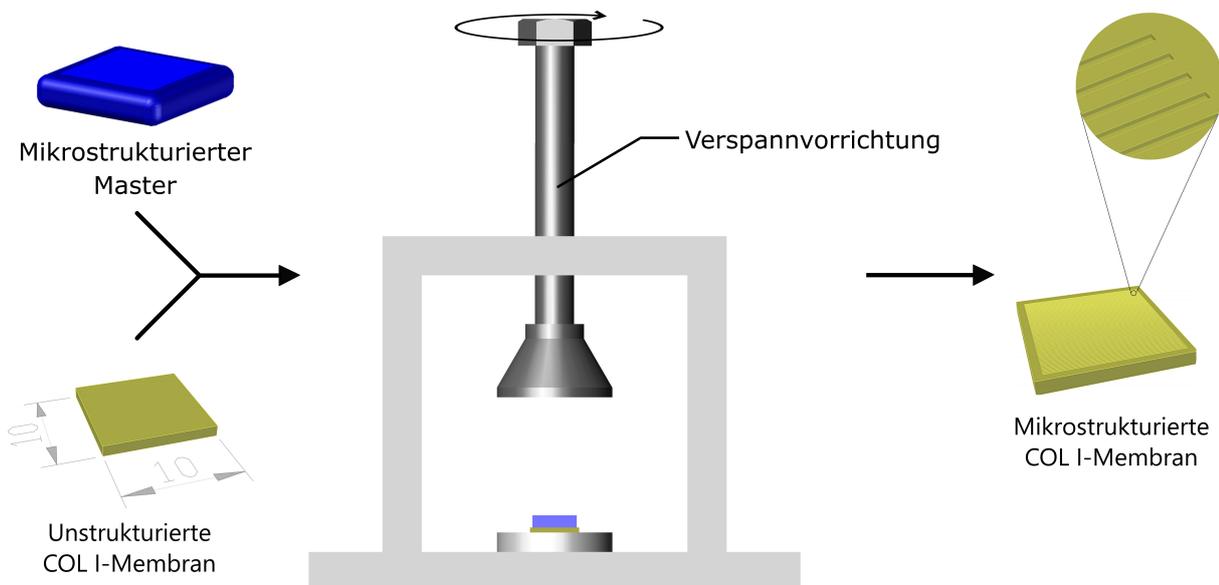


Abbildung 4.8.: Schematische Darstellung des Druckumformverfahrens. Die Oberseite der verwendeten COL I-Membran wurde in wässriger Lösung für 5 min vorbehandelt. Anschließend wurde der Master mit der mikrostrukturierten Fläche auf die COL I-Membran gelegt. Nach der Trocknung wurde die Druckkraft gelöst und die Mikrostrukturen auf der COL I-Membran bewertet.

### 4.2.3. Druckumformung mit mikrostrukturiertem Silizium- und PDMS-Master

Geeignete Stempelmateriale für den Druckumformprozess mussten einerseits mit Mikrostrukturen ausgestattet werden können und andererseits eine ausreichende mechanische Stabilität der darauf befindlichen Mikrostrukturen gewährleisten. Initial wurden dafür mikrostrukturierte Si- bzw. PDMS-Master auf deren Anwendbarkeit überprüft. Beide Master unterschieden sich maßgeblich in ihrer mechanischen Stabilität und Elastizität. Si-Wafer werden schon seit langem für die Erzeugung von Mikrostrukturen auf deren Oberfläche durch photolithographische Verfahren bis in den nm-Bereich verwendet. Sie sind dadurch das klassische Ausgangsmaterial für die Bereitstellung von Mikroarchitekturen in TE-Anwendungen geworden. Außerdem lassen sich auf Si-Wafern befindliche Mikrostrukturen absolut identisch als Negativbild in PDMS übertragen (Kane u. a. 1999).

Si-Master wurden mit der Struktur B20A40T20 und PDMS-Master mit der Struktur B40A80T20 ausgestattet. Unstrukturierte COL I-Membranen mit einer Breite und Länge von je 10 mm wurden gemäß Abschnitt 3.2.1.3 hergestellt. Die Druckumformung der COL I-Membranoberfläche erfolgte wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben. Die Si- und PDMS-Master wurden mit gleicher undefinierter Kraft in die COL I-Membranen gepresst und die erhaltenen Membranen mittels REM charakterisiert.

Die mit Si-Master erzeugte Mikrostrukturierung auf der COL I-Membran (s. Abbildung 4.9a) ist zwar deutlich erkennbar, jedoch besitzen die Mikrostreifen eine inhomogene Morphologie der Graben- und Streifenflächen und sind durch Abrundungen an der Oberkante der Streifen charakterisiert. Außerdem deutet die Aufnahme darauf hin, dass es zu keiner exakten Übertragung der Grabentiefe und Streifenhöhe gekommen ist. Diese Beobachtungen werden auf zu geringe Druckkräfte zurückgeführt. Die Erhöhung der Druckkraft führte im weiteren Verlauf zum Zerschneiden des gesamten Wafers und zu Scherbrüchen der darauf befindlichen Mikrostreifen, wie die Pfeile in Abbildung 4.9b zeigen. Dies stellt eine deutliche Limitation für den Einsatz von mikrostrukturierten Si-Wafern bei hohen Druckkräften dar. Das führte dazu, dass von deren weiterer Verwendung als Stempelmaterial, auch unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten, abgesehen und die Anwendbarkeit von PDMS-Mastern als Stempel untersucht wurde.

Abbildung 4.9c zeigt exemplarisch die Morphologie der abgeformten Mikrostreifen auf der COL I-Membran nach Druckumformung mit dem PDMS-Master. Es konnte beobachtet werden, dass ansatzweise nur die Basis der Mikrostreifen, jedoch nicht die vorgegebene Streifenhöhe abgeformt wurden. Die Breite der erzeugten Basis entsprach aber den Vorgaben vom PDMS-Master. Zurückgeführt wird das auf die starke Deformation des Stempels während des Druckprozesses. PDMS gehört zur Polymergruppe der Elastomere, d.h. unter Krafteinwirkung verformt es sich elastisch. Das konnte makroskopisch für den gesamten Stempel beobachtet werden und es wird auch bei den darauf befindlichen Mikrostrukturen während des Druckumformprozesses vermutet. Die Mikrostrukturierung auf COL I-Membranen durch ein Druckumformverfahren mit PDMS-Stempeln wurde daher als nicht erfolgversprechend bewertet.

Aufgrund der oben dargestellten Beobachtungen sollten im weiteren Verlauf thermoplastische Kunststoffe auf deren Anwendbarkeit als Stempelmaterial für die Druckumformung untersucht werden.

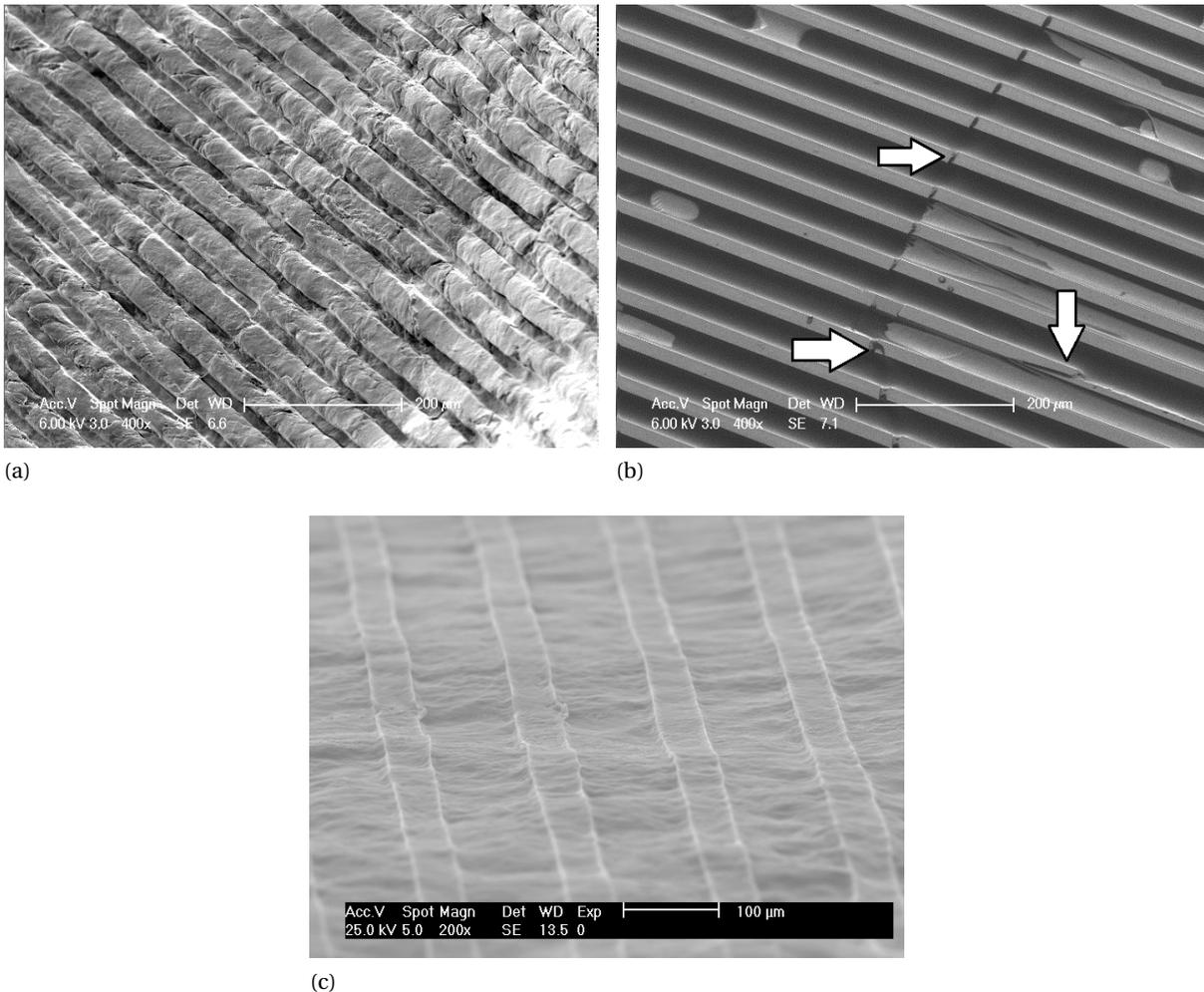


Abbildung 4.9.: REM-Aufnahmen von COL I-Membran nach Druckumformung mit (a) Si-Master (Mikrostruktur B20A40T20) und (c) PDMS-Master (Mikrostruktur B40A80T20) sowie (b) Si-Master nach Druckumformung zur Veranschaulichung unzureichender mechanischer Stabilität des Masters oder fehlender Mikrostrukturübertragung mittels Druckumformung. COL I-Membranen mit einer Masse von 10 mg und einer quadratischen Grundfläche von 10 x 10 mm<sup>2</sup> kamen zur Anwendung. Die Druckumformung wurde mit gleicher undefinierter Kraft durchgeführt. Die Pfeile in Abbildung (b) kennzeichnen Bruchstellen des Si-Masters und der darauf befindlichen Mikrostrukturierung.

Von diesen wurde erwartet, dass sie widerstandsfähig gegenüber mechanischer Beanspruchung während der Druckumformung sind.

#### 4.2.4. Analyse der Anwendbarkeit mikrostrukturierter Stempel aus thermoplastischen Kunststoffen für die Druckumformung

Die Anwendbarkeit von Mastern aus thermoplastischen Kunststoffen wurde für die weitere Entwicklung des Druckumformverfahrens geprüft. Von ihnen wurde erwartet, dass darauf erzeugte Mikrostrukturen eine geeignete Resistenz gegenüber Druckbelastung besitzen. Die Ausstattung dieser mit Mikrostrukturen sollte durch die Adaption des von Charest u. a. (2004) angewendeten thermischen Um-

formverfahrens erreicht werden. Sie nutzten die Fähigkeit des Thermoplasts Polyimid, durch Temperaturerhöhung in einen geschmolzenen und zäh fließenden Zustand überzugehen. Durch Erhitzung des Polyimids auf einem mikrostrukturierten Si-Master wurde nach anschließender Abkühlung die Mikrostrukturübertragung erreicht. Dieser Prozess sollte auf das bereits angewendete Verfahren zur Übertragung der Strukturen von Si-Templaten in PDMS folgen. Da eine thermische Behandlung des PDMS erst ab etwa 250 °C zu einer beginnenden Degradierung führt (Radhakrishnan 2006), wurde von seiner Eignung als mikrostrukturierter Master für die Strukturübertragung in Thermoplaste ausgegangen. Diese sollten perspektivisch als primäre Träger der Mikrostrukturen für die nachfolgende Strukturübertragung auf COL I-Membranen im Sinne eines dreistufigen Strukturübertragungsprozesses dienen.

Bei der Auswahl geeigneter Kunststoffe waren mehrere Kriterien, wie thermische und mechanische Eigenschaften sowie die Wirtschaftlichkeit, zu beachten. Entscheidend bei den thermischen Eigenschaften war die Schmelz- und Glasübergangstemperatur, da mit den angewandten PDMS-Mastern nur in einem begrenzten Temperaturintervall gearbeitet werden konnte. In Anbetracht dessen, dass die Kunststoffe im späteren Verlauf als Stempel dienen, wurde im Bereich der mechanischen Eigenschaften die Kugeldruckhärte als Richtwert genutzt. Des Weiteren war die Wasseraufnahme einiger Kunststoffe und eine damit verbundene thermische Vorbehandlung zu beachten.

Untersucht wurden Polystyren (PS), Polycarbonat (PC), Polyoxymethylen (POM-C), Polypropylen (PP), Polyethylen (PE) und Styrol-Acrylnitril-Copolymer (SAN), welche initial als Blöcke mit den Maßen 8 x 8 x 4 mm<sup>3</sup> zur Verfügung standen. Für alle Thermoplaste sollten die individuellen Prozessparameter, wie Temperatur, Vorwärmzeit und Haltezeit, für das thermische Umformverfahren ermittelt werden, mit dem sich die Mikrostruktur B20A40T20 vom PDMS-Master auf diese übertragen lassen. Anschließend sollte die maximale Druckstabilität der Mikrostrukturen charakterisiert und damit der für das zu entwickelnde Druckumformverfahren geeignetste Thermoplast gefunden werden.

Für das thermische Umformen der Thermoplaste wurde ein Verfahren (s. Abbildung 4.10 und Abschnitt 3.2.2.2 auf Seite 49) entwickelt, bei dem der PDMS-Master in einer selbst angefertigten Apparatur aus Aluminium auf eine definierte Temperatur erhitzt wurde. Anschließend wurde der jeweilige Thermoplast für einen bestimmten Zeitraum aufgelegt, weiter temperiert und nachfolgend das Gewichtrohr zum Aufpressen des jetzt viskosen Thermoplasts auf den PDMS-Master eingeführt. Nach der finalen Abkühlung konnten die übertragenen Mikrostrukturen charakterisiert bzw. weiterverwendet werden.

Die analysierten Prozessparameter Vorwärmzeit, Haltezeit und die Temperatur am Heizgerät sollten so gewählt werden, dass sie die kürzeste Zeit bzw. niedrigste Temperatur darstellen, die zur exakten Abformung der Mikrostruktur B20A40T20 nötig war. Die Vorwärmzeit beschreibt dabei die Zeit vom Einschalten der Heizplatte bis zum Auflegen des Thermoplasts und die Haltezeit die Dauer der thermischen Behandlung des Thermoplasts. Die Temperatur wurde direkt am Regler der Heizplatte eingestellt. Die Mikrostrukturen wurden mittels REM charakterisiert.

In den in Tabelle 4.2 zusammengefassten Untersuchungen wurde festgestellt, dass alle oben genannten Kunststoffe prinzipiell für die Master-Erzeugung nutzbar sind. Unterschiede zeigten sich insbe-

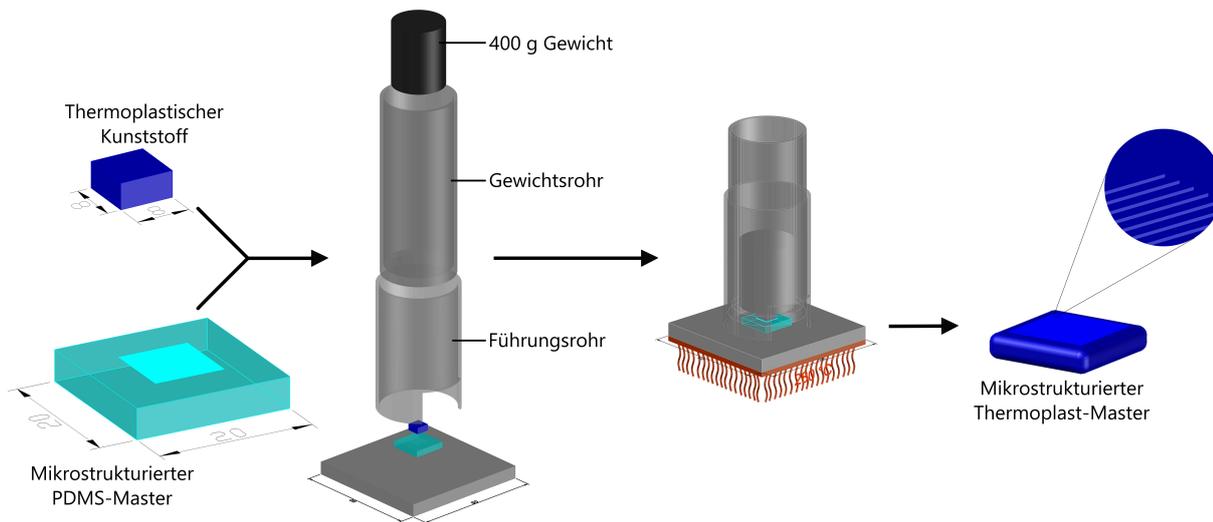


Abbildung 4.10.: Schematische Darstellung des Verfahrens zur thermischen Umformung von Thermoplasten. Der mikrostrukturierte PDMS-Master wurde auf die Basisplatte der Apparatur platziert und auf eine definierte Temperatur erhitzt. Anschließend wurde der Thermoplast ( $8 \times 8 \times 4 \text{ mm}^3$ ) darauf ohne Belastung weiter temperiert und nachfolgend durch Einführen des Gewichtsrohrs mit 400 g belastet. Nach weiterem Temperieren wurde die gesamte Apparatur abschließend gekühlt. Zur besseren Veranschaulichung ist die unerhitzte Apparatur zum thermischen Umformen als Explosionszeichnung dargestellt.

sondere in den notwendigen Zeiten für den Thermoumformprozess. Eine zu kurze Temperierung bei zu niedriger Temperatur führte zur unvollständigen Mikrostrukturübertragung. Dagegen konnte eine vollständige Mikrostrukturübertragung auf POM-C bereits nach einer Gesamtzeit (Vorwärm- und Haltezeit) von 15 min beobachtet werden. Bei PS und PE dauerte der Vorgang insgesamt 20 min. PC konnte trotz höchster eingestellter Temperatur von  $300^\circ\text{C}$  erst nach 40 min vollständig mit den Mikrostreifen ausgestattet werden. Zu lange Zeiträume und zu hohe Temperaturen führten zum Herunterfließen des Kunststoffes vom PDMS-Master oder zu einem sehr dünnen und damit mechanisch instabilen Stempel. Außerdem verlängerten niedrige Temperaturen und kurze Prozesszeiten die Anwendbarkeit der PDMS-Master.

Die verwendeten Kunststoffe PS, PC und SAN werden den amorphen Thermoplasten zugeordnet, während POM-C, PE und PP zu den teilkristallinen Thermoplasten gehören. Die teilkristallinen Polymere besitzen sehr niedrige Glasübergangstemperaturen unter  $0^\circ\text{C}$  und die in Tabelle 4.2 auf der nächsten Seite gezeigten Schmelztemperaturen. Bei amorphen Thermoplasten beginnen die Glasübergangstemperaturen erst im Bereich der Schmelztemperaturen der teilkristallinen Thermoplaste. Daraus ergibt sich, dass bei den hier angewendeten Temperaturen die teilkristallinen Polymere bereits eine dünnflüssige Schmelze bildeten, während die amorphen Thermoplaste eine viskose Masse aufzeigten. Die eingestellte Temperatur am Heizgerät scheint dabei relativ unerheblich zu sein. Dieser Unterschied ist speziell zwischen dem amorphen PC und dem teilkristallinen PE zu erkennen. Während die Werte für die Glasübergangs- bzw. Schmelztemperatur relativ ähnlich sind und die Temperatur am Heizgerät gleich gewählt wurde, benötigt man für die vollständige Mikrostrukturübertragung auf PC insgesamt 40 min Prozesszeit, bei der Verwendung von PE waren es nur 20 min.

Tabelle 4.2.: Materialeigenschaften der angewendeten Thermoplaste, optimierte Prozessparameter des Thermoumformverfahrens für den jeweiligen Thermoplast und maximale Druckstabilität der mit diesen Prozessparametern erzeugten Mikrostruktur B20A40T20 auf den Kunststoffstempeln. n.n. = nicht notwendig. <sup>1</sup>Werte aus: Domininghaus u. a. 2012

	PS	PC	SAN	POM-C	PE	PP
Schmelz(S)-/Glasübergangs(G)-Temperatur [°C] <sup>1</sup>	100 (G)	148 (G)	106 (G)	167 (S)	134 (S)	163 (S)
Thermische Vorbehandlung	n.n.	120 °C, 24 h	90 °C, 4 h	n.n.	n.n.	n.n.
Vorwärmzeit [min]	10	15	10	10	15	15
Haltezeit [min]	10	25	15	5	5	10
Temperatur am Heizgerät [°C]	275	300	275	275	300	300
Kugeldruckhärte [MPa] <sup>1</sup>	150	110	175	145	38	72
max. Druckstabilität der Mikrostruktur B20A40T20 [N]	950	950	800	150	200	600

Innerhalb der amorphen Thermoplaste zeigten sich ebenso Unterschiede in den notwendigen Temperierzeiten, die auf die unterschiedlichen Glasübergangstemperaturen zurückgeführt werden konnten. Je höher diese sind, desto länger ist der Zeitraum für den Temperierschritt. Die langen Zeiträume bspw. beim PC führten zu Alterungserscheinungen bei den verwendeten PDMS-Mastern. Sie wurden spröde, hart und verfärbten sich. Dadurch wurde deren mehrfacher Einsatz deutlich limitiert.

Weiterhin musste bei PC und SAN das Vorhandensein von Feuchtigkeit innerhalb des Polymers berücksichtigt werden, was sich in der Ausbildung von Blasen im Polymer während des thermischen Umformens ausdrückte. In der Folge wurde das großflächige Ausbleiben der Mikrostrukturübertragung beobachtet. Diese Restfeuchte konnte vor deren Verwendung zwar durch thermische Vorbehandlung bei 90 - 120 °C entfernt werden, jedoch bedeutete das einen zusätzlichen Prozessschritt im Vergleich zu den anderen Thermoplasten.

Als weiteres Entscheidungskriterium für die Wahl eines geeigneten Stempelmaterials für den Druckumformprozess sollte die Stabilität der auf den Thermoplasten erzeugten Mikrostruktur B20A40T20 gegen Krafteinwirkung genutzt werden. Daher wurde die maximale Kraft ermittelt, bei der die Mikrostreifen einer Druckbelastung standhalten. Dafür wurden die thermoplastischen Stempel mit der mikrostrukturierten Seite gegen eine planare Fläche gepresst und anschließend mittels REM charakterisiert. Als höchste anzuwendende Kraft wurden 950 N definiert, um die mechanische Stabilität und Bedienbarkeit der Druckumformapparatur zu gewährleisten.

Tabelle 4.2 zeigt, dass die Mikrostrukturen auf PS und PC die beste Resistenz gegen die angelegten Druckkräfte besaßen, da sie die zweit- und vierthöchste Kugeldruckhärte der verwendeten Thermoplaste besitzen. Auch sehr hohe Kugeldruckhärten im Vergleich besitzen SAN und POM-C. Jedoch war die maximal anlegbare Kraft etwas bzw. deutlich geringer. Möglicherweise war bei diesen beiden Thermoplasten noch Feuchtigkeit absorbiert, die die mechanische Stabilität verringert hat. Dieses Verhalten wurde jedoch wegen erfolgversprechenderen Thermoplast-Kandidaten nicht weiter analy-

---

siert. Bedingt durch die im Vergleich geringen Kugeldruckhärten von PE und PP, war die Anwendung hoher Druckkräfte auf die Mikrostrukturierung nur unzureichend möglich.

Unter Berücksichtigung der ermittelten Werte können auf Grund der geringeren mechanischen Beständigkeit SAN, POM-C, PE und PP für die weitere Entwicklung eines Druckumformverfahrens nicht verwendet werden. Die Verwendung von PC bedarf im Vergleich zu PS einer thermischen Vorbehandlung zur Entfernung von Restfeuchtigkeit und führte zu längeren Prozesszeiten für den thermischen Umformprozess. Daher wurde PS für die weitere Erzeugung mikrostrukturierter Stempel für den angestrebten Druckumformprozess zur Erzeugung mikrostrukturierter COL I-Membranen ausgewählt.

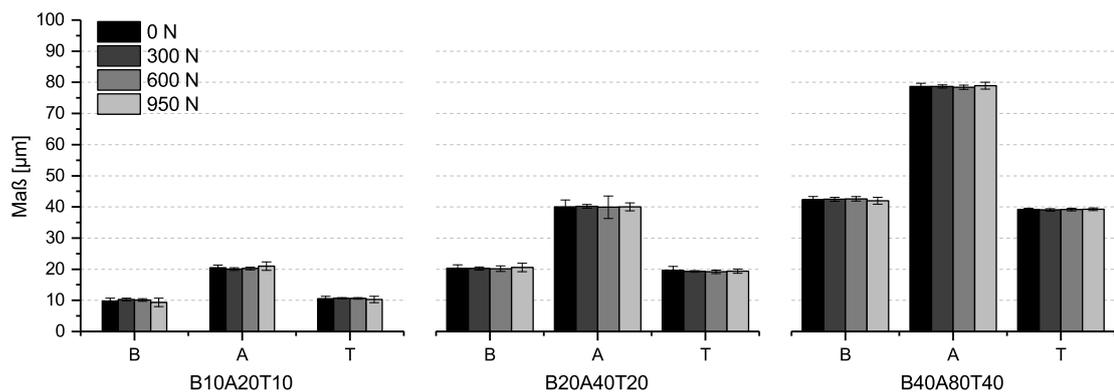
#### 4.2.5. Charakterisierung der Stabilität von Mikrostrukturen auf PS-Mastern

Die Resistenz der auf PS-Mastern erzeugten Mikrostrukturen in Form von Streifen mit rechteckigen Querschnitt mit Breiten von  $10\ \mu\text{m}$  -  $40\ \mu\text{m}$  und Streifen mit dreieckigem Querschnitt gegenüber Druckkräften wurde im Folgenden geprüft. Dafür wurden die jeweiligen PS-Master mit der strukturierten Seite (Kontaktfläche  $9 \times 9\ \text{mm}^2$ ) gegen eine planare Glasoberfläche mit den definierten Kräften 0 N, 300 N, 600 N bzw. 950 N gepresst. Anschließend wurden die Mikrostrukturmaße Breite (B), Abstand (A) und Tiefe (T) mittels konfokalem 3D-Profilometer bestimmt.

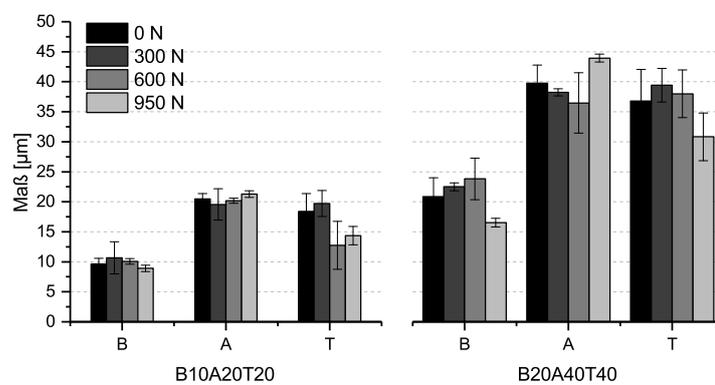
Abbildung 4.11a-c zeigt die Maße der Mikrostrukturen, gruppiert nach dem Verhältnis Strukturbreite : Strukturtiefe. Alle Mikrostreifen mit rechteckigem Querschnitt auf PS-Mastern, bei denen das Breite-Tiefe-Verhältnis gleich 1 : 1 ist (B10A20T10, B20A40T20, B40A80T20) und Mikrostreifen mit dreieckigem Querschnitt, bei denen das Breite-Tiefe-Verhältnis gleich 1 : 0,6 ist (Bs5As15T3,3, Bs15As5T10), zeigten mit steigender angelegter Kraft keine Veränderungen der Maße der Mikrostrukturen. Daher konnte für diese Strukturen auf PS-Mastern eine Resistenz gegenüber Druckkräften von bis zu 950 N identifiziert werden.

Veränderungen der Maße durch die angewendeten Druckkräfte wurden dagegen bei den Strukturen B10A20T20 bzw. B20A40T40 beobachtet, bei denen ein Breite-Tiefe-Verhältnis von 1 : 2 vorlag (Abbildung 4.11b). Mit steigender Druckkraft war ein deutlicher Rückgang der Mikrostrukturtiefe zu erkennen, der nach Anwendung der höchsten Kraft von 950 N bei etwa dreiviertel der Anfangstiefe liegt. Während bei der Struktur B10A20T20 mit steigender Kraft keine Veränderungen von Breite und Abstand gemessen wurden, war bei der Struktur B20A40T40 eine Zunahme der Streifenbreite und damit verbunden eine Abnahme des Streifenabstands bis zu einer Druckkraft von 600 N zu beobachten. Nach rasterelektronenmikroskopischer Kontrolle konnte das auf das senkrecht zur Strukturierungsebene verlaufende Eindringen der Mikrostreifen zurückgeführt werden. Weiterhin nahm bei 950 N die Streifenbreite sprunghaft ab und der Streifenabstand zu. Hier zeigte die REM-Analyse, dass die Mikrostreifen großflächig umknickten.

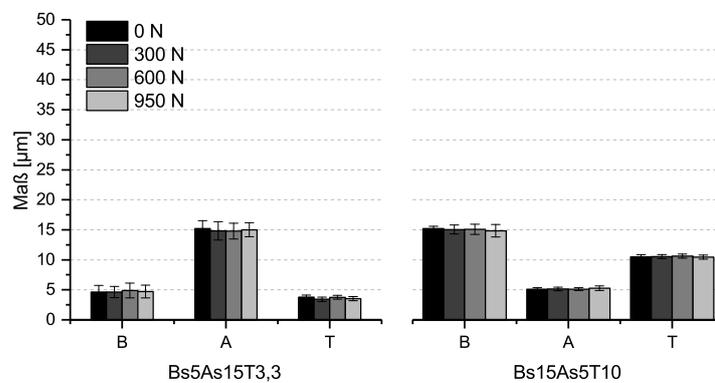
Tabelle 4.3 fasst die oben beschriebenen Deformationen nach Anwendung von Druckkräften auf PS-Master mit den Strukturen B10A20T20 und B20A40T40 (rechteckiger Querschnitt), bei denen ein zu geringes Breite-Tiefe-Verhältnis (1 : 2) vorlag, zusammen. Zusätzlich traten vereinzelt auch lokal eingeschränkte Deformationen auf, die auf Verunreinigungen zwischen Membran und Stempel oder auf



(a) Breite-Tiefe-Verhältnis 1 : 1



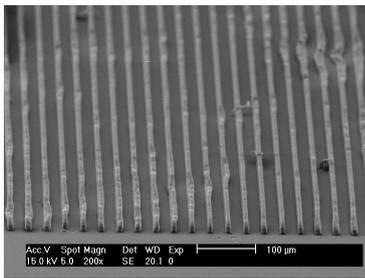
(b) Breite-Tiefe-Verhältnis 1 : 2



(c) Breite-Tiefe-Verhältnis 1 : 0,6

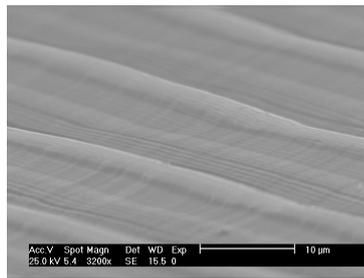
Abbildung 4.11.: Analyseergebnisse der mechanischen Stabilität von mikrostrukturierten PS-Mastern. Zu sehen sind Breite (B), Abstand (A) und Tiefe (T) verschiedener Mikrostreifen mit (a, b) rechteckigem Querschnitt und (c) mit dreieckigem Querschnitt auf PS-Mastern nach Anwendung definierter Druckkräfte im Bereich von 0 - 950 N. Die untersuchten Mikrostrukturen sind nach ihrem Breite-Tiefe-Verhältnis von (a) 1 : 1, (b) 1 : 2 bzw. (c) 1 : 0,6 gruppiert. Die mikrostrukturierte Seite der PS-Master wurden mit der jeweiligen Druckkraft gegen eine planare Glasoberfläche gedrückt und anschließend am konfokalen 3D-Profilometer vermessen. Je Mikrostruktur und Kraft erfolgte eine Dreifachbestimmung. Bei (a, b) 5-Punktmessung je PS-Master, bei (c) 10-Punktmessung je PS-Master.

Tabelle 4.3.: Übersicht der Deformationen der Mikrostrukturen auf PS-Stempeln nach Krafteinwirkung von mindestens 600 N.



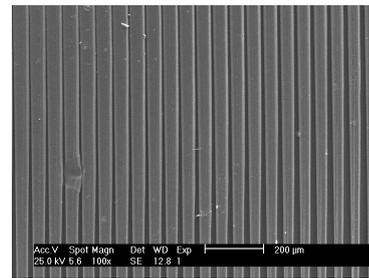
B10A20T20

Durch deren mechanische Stabilität widerstehen die Mikrostrukturen noch flächendeckend der angewendeten Druckkraft. Nur **lokales Eindringen und Umknicken** sind erkennbar.



B10A20T20

Die angewendete Druckkraft ist so hoch, dass Mikrostreifen mit sehr geringer Breite **flächendeckend** an deren Basis **umknicken**.



B20A40T40

Die Breite der Mikrostreifen ist zwar ausreichend, um ein Umknicken durch die Druckbelastung zu verhindern, aber die hohe angewendete Kraft führt zum **flächendeckenden Eindringen**.

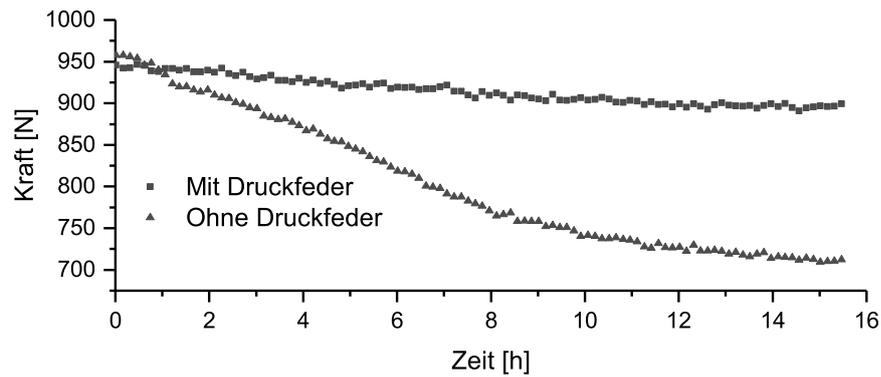
eine inhomogene Dichte der zerkleinerten COL I-Fibrillen in der getrockneten Membran zurückgeführt wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass mikrostrukturierte PS-Master als Stempel für das angestrebte Druckumformverfahren nur dann geeignet sind, wenn die darauf generierten Mikrostreifen ein Breite-Tiefe-Verhältnis von mindestens 1 : 1 besitzen. Mikrostrukturen auf PS-Mastern mit kleineren Breite-Tiefe-Verhältnissen besitzen dagegen eine eingeschränkte mechanische Stabilität. Diese Limitationen gelten für Mikrostreifenstrukturen mit rechteckigen Querschnitt. Die verwendeten Mikrostrukturen mit dreieckigem Querschnitt besitzen ein konstantes Breite-Tiefe-Verhältnis von 1 : 0,6̄. Daher ist auch bei diesen die mechanische Stabilität gegeben.

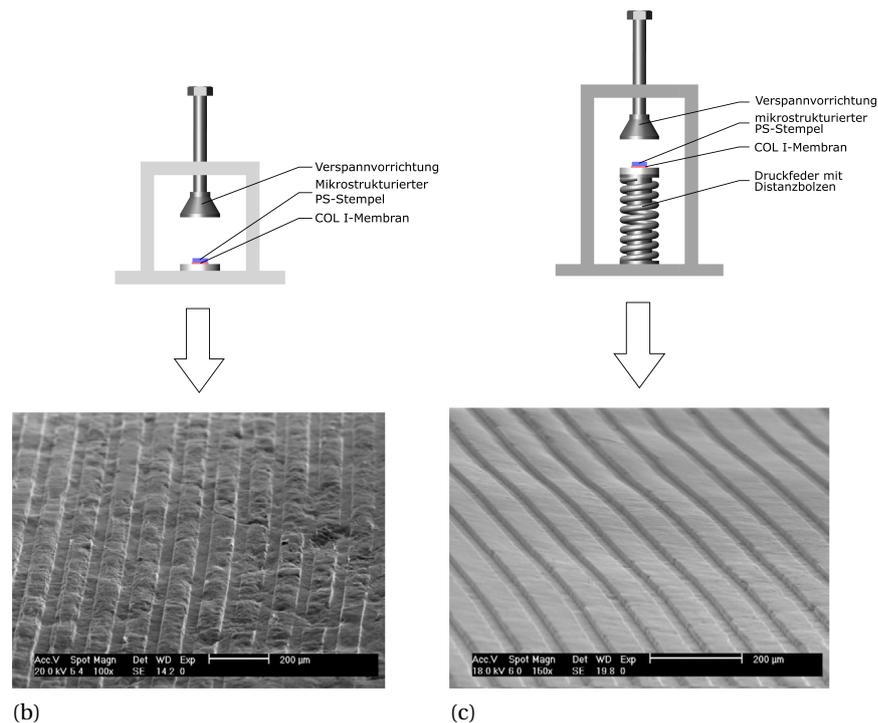
#### 4.2.6. Optimierung der Krafteinwirkung während der Druckumformung mit PS-Mastern

PS-Master mit der Mikrostruktur B40A80T20 wurden als Stempel verwendet und die Mikrostruktur mit dem in Abschnitt 4.2.2 auf Seite 75 beschriebenen Druckumformverfahren in 10 mg schwere COL I-Membranen übertragen. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Membran mittels REM.

Die REM-Aufnahme in Abbildung 4.12b zeigt, dass zwar die genaue Abformung der Grabenbreiten und -abstände realisiert werden konnte, jedoch nicht die Strukturtiefe von 20 µm übertragen wurde. Als Ursache wurde vermutet, dass die vor der Druckumformung oberflächlich mit Wasser gequollene COL I-Membran während der im Prozess stattfindenden Trocknung einer maßgeblichen Schrumpfung unterliegt. Die damit einhergehende Abnahme der Membrandicke könnte dabei zu einer schnell-



(a)



(b)

(c)

Abbildung 4.12.: Analyseergebnisse der angewendeten Druckkraft und Weiterentwicklung des Druckumformverfahrens durch Integration einer Druckfeder. (a) Kraftverlauf während der Druckumformung von COL I-Membranen durch PS-Master mit und ohne Druckfeder in der Apparatur. Die Kraft wurde durch einen Drucksensor kontinuierlich während der finalen Trocknung der Membran gemessen. (b) Apparatur zur Druckumformung ohne Druckfeder und REM-Aufnahme der damit erzeugten mikrostrukturierten COL I-Membran. (c) Apparatur zur Druckumformung mit Druckfeder und REM-Aufnahme der damit erzeugten mikrostrukturierten COL I-Membran. Die REM-Aufnahmen zeigen die Mikrostruktur B40A80T20.

len Verringerung der initial angelegten Druckkraft von 950 N führen und damit zum verminderten oder fehlenden Kontakt zwischen PS-Master und COL I-Membran.

Daher sollte im weiteren Verlauf geprüft werden, ob durch die Installation einer Druckfeder in die Apparatur zur Druckumformung die Druckkraft von 950 N während der Trocknung der COL I-Membran konstant gehalten werden kann. Dafür wurde der Verlauf der Druckkraft über den Trocknungszeitraum von 16 h ohne und mit Druckfeder durch einen in die Apparatur zur Druckumformung inte-

---

grierten Drucksensor analysiert.

Abbildung 4.12a zeigt, dass sich ohne Druckfeder die initiale Druckkraft durch die Trocknung der Membran um fast 250 N verringerte. Dagegen nahm bei Verwendung der Druckfeder die Kraft nur noch um etwa 50 N ab. Die Anwendung der Druckfeder in der Druckumformapparatur führte, wie Abbildung 4.12c zeigt, zu einer deutlich verbesserten Abformung der Mikrostrukturbreite und -tiefe. Die damit erzeugten Mikrostreifen zeigten außerdem kaum abgerundete Kanten. Die Druckfeder gewährleistete dabei den dauerhaften Kontakt zwischen Membran und PS-Stempel, indem sie die bei der Trocknung schrumpfende Membran kontinuierlich wieder gegen den Stempel drückte.

Da in späteren Versuchen in der Zellkultivierung der in die Apparatur zur Druckumformung integrierte Drucksensor hinderlich sein würde, wurden Distanzbolzen für die Druckfeder angefertigt. Diese sind so konstruiert, dass beim Kontakt des oberen und unteren Distanzbolzens eine Kraft von 950 N erreicht ist.

#### **4.2.7. Optimierung der Stabilität von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen in wässriger Lösung**

In initialen Versuchen wurde bereits beobachtet, dass die COL I-Membranen in wässrigen Lösungen einer Quellung unterlagen, die sowohl die mechanischen Eigenschaften des fibrillären COL I-Netzwerks beeinflusste, als auch zur erheblichen Änderung des Volumens des Materials führte. Da die anvisierten Zellkulturexperimente ebenfalls in wässrigem Medium durchgeführt werden sollten, sollte in nachfolgenden Untersuchungen die Veränderung der Maße der Mikrostrukturen in diesem Zustand bewertet werden. Mit dem Einsatz von EDC zur chemischen Vernetzung des fibrillären COL I sollte außerdem geprüft werden, ab welcher optimalen EDC-Konzentration eine Konservierung der Mikrostrukturmaße erreicht werden kann. Der zero-length Crosslinker wurde ausgewählt, da er anders als der häufig eingesetzte Glutaraldehyd nicht im Material verbleibt, nicht toxisch ist und zudem zur Ausbildung einer stabilen Amid- oder Esterbindung zwischen den Reaktionspartnern führt. EDC-Konzentrationen von 0 - 100 mg/mL in der Lösung zur oberflächlichen Quellung der planaren COL I-Membran (vgl. Abschnitt 4.2.2) wurden angewendet und die Druckumformung mit PS-Master (Mikrostruktur B40A80T20) durchgeführt. Nach erfolgter Trocknung wurden die Membranen in Wasser bei Raumtemperatur für 32 h inkubiert. Die anschließende Charakterisierung erfolgte mittels REM und konfokalem 3D-Profilometer.

Die REM-Aufnahme in Abbildung 4.13a zeigt, dass ohne den Einsatz von EDC die Inkubation der mikrostrukturierten COL I-Membran in Wasser zum vollständigen Verlust der Mikrostreifen führte. Das wird auf die starke Expansion des fibrillären COL I in wässriger Umgebung zurückgeführt, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Charulatha 2003; Delgado, Pandit u. a. 2014). Dieser Effekt wirkte sich nachteilig auf den Verbleib oberflächlich erzeugter Mikrostrukturen aus, die dabei vollständig verschwanden.

Mit steigender EDC-Konzentration (s. Abbildung 4.13b-d) war eine Verbesserung des Erhalts der Mikrostreifen während der Quellung zu erkennen. Jedoch konnte erst bei 100 mg/mL EDC in der Lösung

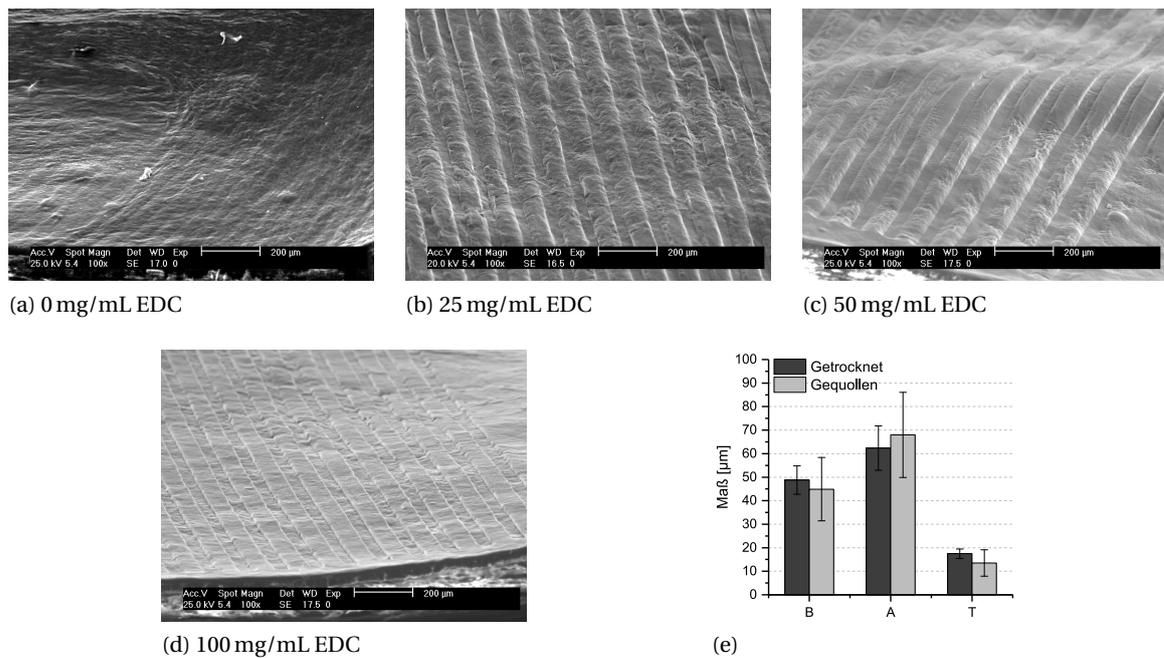


Abbildung 4.13.: Einfluss der chemischen Vernetzung durch EDC auf den Erhalt von Mikrostrukturen während Quellung der COL I-Membran. (a)-(d) REM-Aufnahmen von EDC-behandelten COL I-Membranen mit der Mikrostruktur B40A80T20 nach Inkubation in Wasser für 32 h. Vor der Druckumformung wurde die Fläche der Membranoberseite mit 100 µL 0-100 mg/mL EDC-Lösung für 5 min inkubiert. (e) Breite (B), Abstand (A) und Tiefe (T) der Mikrostreifen auf COL I-Membranen im getrockneten und gequollenen Zustand. Die planaren Membranen wurden mit 100 µL einer 100 mg/mL EDC-Lösung auf der Oberseite inkubiert und darauf anschließend durch Druckumformung die Mikrostruktur B40A80T20 erzeugt. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung mit 2-Punktmessung je COL I-Membran.

die flächendeckende Erhaltung der Mikrostrukturierung beobachtet werden. Die EDC-Anwendung führte vermutlich zur kovalenten Verknüpfung von COL I-Fibrillen, wie es schon von Everaerts u. a. (2008) berichtet wurde. Folglich konnte eine bessere Formstabilität der Mikrostrukturierung während der Inkubation in wässriger Lösung und eine deutlich geringere Flüssigkeitsaufnahme beobachtet werden, die mit anderen Untersuchungen vergleichbar sind (Rault u. a. 1996; Charulatha 2003). Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 erwähnt, wurde die Oberfläche der COL I-Membran vor der Mikrostrukturübertragung mit Wasser vorgequollen. In diesen Prozessschritt wurde die EDC-Behandlung integriert, sodass die Lösung gleichzeitig für die Hydratation sowie die Vernetzung der Membran verwendet wurde.

Von COL I-Membranen mit der Mikrostruktur B40A80T20, die durch Vorinkubation der Oberfläche mit 100 mg/mL EDC-Lösung und anschließender Druckumformung hergestellt wurden, wurde nachfolgend die Veränderungen der Mikrostreifen während der Quellung detailliert durch Vermessung der Streifenbreite, des -abstand und der -tiefe mittels konfokalem 3D-Profilometer analysiert (s. Abbildung 4.13e). Für die Vermessung im gequollenen Zustand wurden die Proben unmittelbar nach Entnahme aus dem Wasser analysiert. Es wurde beobachtet, dass sich im Durchschnitt Streifenbreite und -abstand geringfügig um weniger als 10 % veränderten. Dabei nahm die Streifenbreite im ge-

---

quollenen Zustand sogar leicht ab. Die Strukturtiefe verringerte sich um etwa 23 %. Es wird darauf hingewiesen, dass der angestrebte Streifenabstand von 80 µm in diesen Untersuchungen nicht erreicht werden konnte, was möglicherweise auf Schrumpfungprozesse zurückgeführt werden kann.

#### 4.2.8. Charakterisierung mikrostrukturierter EDC-vernetzter COL I-Membranen

Das in den vorherigen Abschnitten beschriebene und optimierte Druckumformverfahren wurde genutzt, um verschiedene Mikrostrukturen auf der Oberfläche von COL I-Membranen zu erzeugen. Mit Mikrostreifen mit rechteckigem Querschnitt sollte der Einfluss der Grabenbreiten auf die Zellmorphologie bewertet werden. Da diese Untersuchung nur mit am Grabenboden wachsenden HUVEC durchgeführt werden sollte, wurde ebenso die Erzeugung von Mikrostrukturen mit dreieckigem Querschnitt auf COL I-Membranen fokussiert. Aufgrund der dort vorhandenen, schräg verlaufenden Flanken wurde eine Ableitung darauf ausgesäeter HUVEC auf den Boden erwartet.

Für die durch Druckumformung auf COL I-Membranen erzeugten Mikrostrukturen B10A20T10, B20A40T20, B40A80T20, B40A80T40, B<sub>5</sub>5A<sub>5</sub>15T3,3 und B<sub>5</sub>5A<sub>5</sub>15T10 erfolgte im Folgenden eine Begutachtung der Mikrostruktur-Morphologie und der übertragenen Mikrostrukturmaße sowie häufig auftretender Fehlstellen bei der Mikrostrukturierung. Die erzeugten mikrostrukturierten COL I-Membranen wurden mittels REM und konfokalem 3D-Profilometer analysiert.

Die Ergebnisse des Druckumformprozesses mit den verschiedenen Mikrostrukturen sind exemplarisch in Abbildung 4.14 gezeigt. Es sind deutlich ausgeprägte Mikrostrukturen mit rechteckigem bzw. dreieckigen Querschnitt erkennbar. Wegen der gleichen Streifenbreite und des gleichen Streifenabstands der Mikrostreifenstrukturen B40A80T20 und B40A80T40 wurden letztere in nachfolgenden Zellkulturexperimenten nicht angewendet.

In den Studien von Vrana u. a. (2007) und Zorlutuna, Hasirci u. a. (2008) wurden ebenfalls Mikrostrukturen in COL I-Scaffolds erzeugt. Jedoch nutzten sie nicht-fibrilläres Tropocollagen, das eine intensive mechanische Stabilisierung benötigte. Dagegen verwendeten Vernon u. a. (2005a) und Vernon u. a. (2005b) Membranen aus fibrillärem COL I und statteten diese mit Mikrostrukturen aus, jedoch konnte die Stabilität der sehr dünnen Scaffolds nur durch die Verwendung eines Stützrahmens aus Polyamid gewährleistet werden. Jegliche mechanische Stabilisierung und Unterstützung wird jedoch für den Einsatz im TE als nachteilig angesehen. Außerdem wurden bei beiden Studien die Mikrostrukturen durch Abformung übertragen. Wie bereits erwähnt, war in eigenen Untersuchungen die Qualität der erzeugten Mikrostreifen gering (vgl. Abschnitt 4.2.1).

Tabelle 4.4 zeigt die Ergebnisse der Vermessung der auf COL I-Membranen erzeugten Mikrostrukturen mit dem konfokalen 3D-Profilometer. Die Abstandsmessung erfolgte auf Höhe der halben Grabentiefe, sodass ein Einfluss abgerundeter Kanten auf das Messverfahren verringert werden konnte. Es ist erkennbar, dass die Breiten von Mikrogräben mit rechteckigem Querschnitt zwischen 9-29 % über dem vorgegebenen Maß lagen. Im Gegenteil dazu befand sich der Grabenabstand zwischen 17 % und 22 % unterhalb des angestrebten Wertes. Weiterhin konnte die vorgegebene Grabentiefe bei allen untersuchten Streifenstrukturen nicht vollständig erreicht werden.

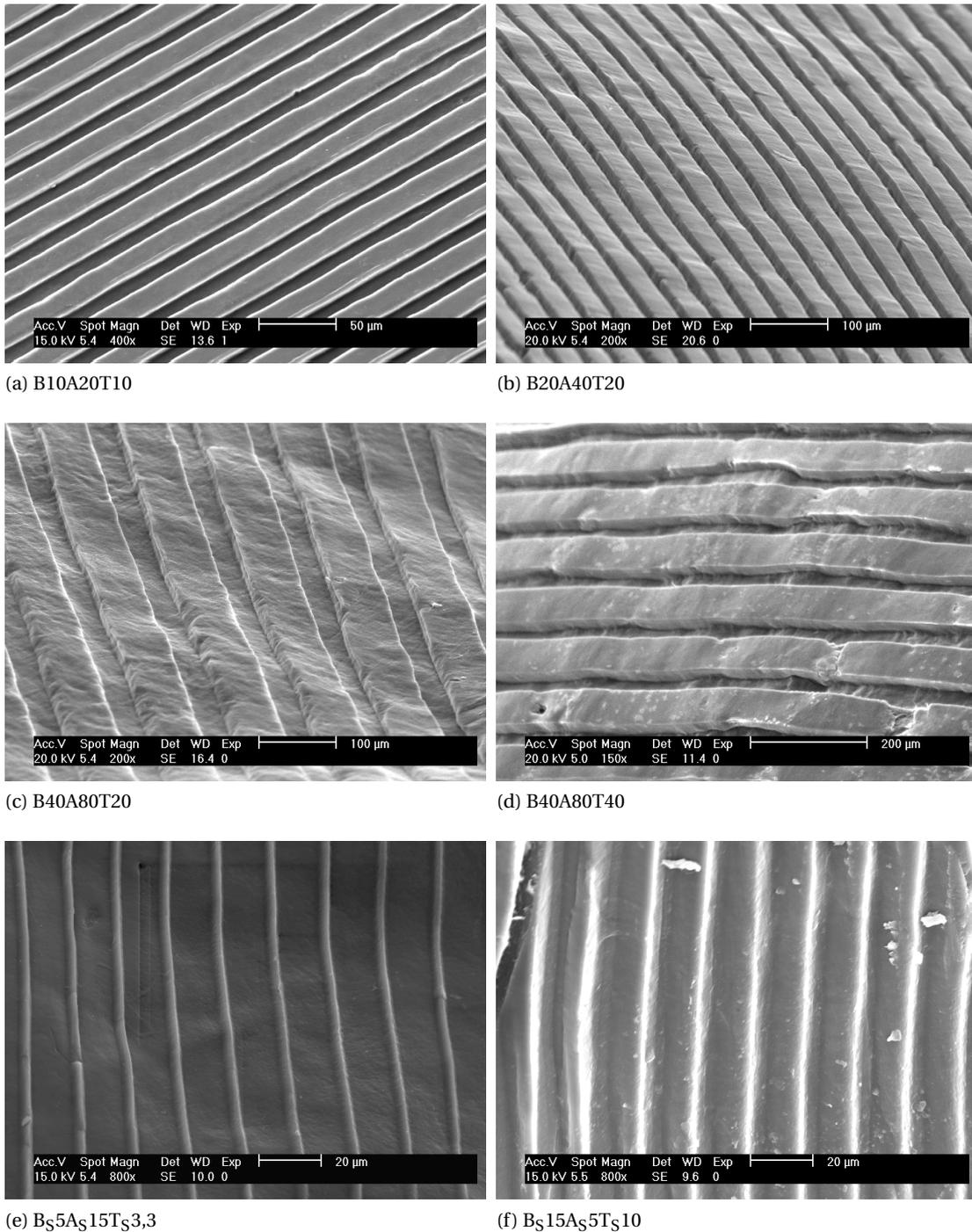


Abbildung 4.14.: REM-Aufnahmen von Mikrostreifen und Mikrospitzstreifen auf COL I-Membranen. Diese wurden durch Druckumformung mit Druckfeder bei 950 N vom PDMS-Master abgeformt.

Als Ursache dafür wird vermutet, dass die Druckumformung zu mechanischen Spannungen innerhalb der getrockneten COL I-Membran führte, solange sich das Fibrillen-Netzwerk in den Mikrostrukturen des PS-Stempels befand. Sobald die festen räumlichen Begrenzungen entfernt wurden, dehnte sich das gesamte Material aus. Diese Spannungen wurden auch bei der Verwendung nativer COL I-haltiger Gewebe beobachtet (Walters und Stegemann 2014) und auch in den Arbeiten von Brown u. a. (2005) erwähnt. Damit könnte sich die unvollständige Tiefenabformung der vorgegebenen Mi-

Tabelle 4.4.: Übersicht der Maße von Grabenbreite (B), Grabenabstand (A) und Grabentiefe (T) von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen nach der Druckumformung. Die Werte wurden mittels konfokalem 3D-Profilometer ermittelt. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung mit 5-Punkt-Messung je Membran.

Mikrostrukturtyp	B [ $\mu\text{m}$ ]	A [ $\mu\text{m}$ ]	T [ $\mu\text{m}$ ]
Streifen B10A20T10	$11,8 \pm 5,1$	$20,6 \pm 2,4$	$6,8 \pm 2,4$
Streifen B20A40T20	$25,7 \pm 3,0$	$32,5 \pm 3,4$	$10,2 \pm 4,1$
Streifen B40A80T20	$48,8 \pm 6,0$	$62,4 \pm 9,4$	$17,5 \pm 2,0$
Streifen B40A80T40	$43,7 \pm 1,9$	$66,5 \pm 3,3$	$29,2 \pm 7,5$
Spitzstreifen B <sub>S</sub> 5A <sub>S</sub> 15T <sub>S</sub> 3,3	$6,7 \pm 1,1$	$14,2 \pm 1,1$	$1,5 \pm 0,2$
Spitzstreifen B <sub>S</sub> 15A <sub>S</sub> 5T <sub>S</sub> 10	$15,9 \pm 2,2$	$4,4 \pm 1,9$	$4,0 \pm 2,1$

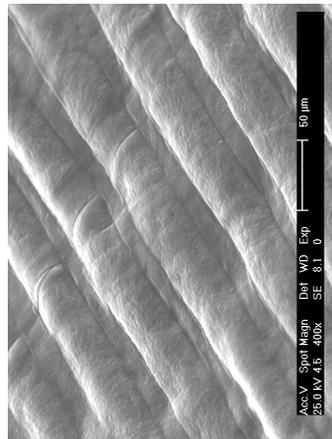
strukturmaße erklären lassen, wenn die Ausdehnung des COL I auch in z-Richtung stattfand. Obwohl die Maße von den vorgegebenen Werten leicht abwichen, konnten mit dem entwickelten Verfahren definierte Mikrostrukturen in COL I-Membranen erzeugt werden, die in dieser Qualität bisher noch nicht in der Literatur charakterisiert wurden.

Mikrospitzstreifen auf COL I-Membranen weichen nach der Druckumformung hinsichtlich ihrer Breite um 34 % bzw. 6 % sowie um 6 % bzw. 12 % hinsichtlich ihres Abstandes von den vorgegebenen Strukturen des PS-Masters ab. Auch hier war bei Abnahme der Breite, eine Zunahme des Abstandes und umgekehrt zu beobachten. Bei der Abformung der Strukturtiefe konnten 45 % bzw. 40 % des vorgegebenen Wertes erreicht werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass im Vergleich zur Vermessung der Mikrostrukturen auf PS-Mastern hier die Standardabweichung des Mittelwertes der ermittelten Maße zum Teil deutlich erhöht ist. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die exakte Übertragung dieser Mikrostrukturen auf COL I-Membranen nicht in vollem Umfang möglich ist.

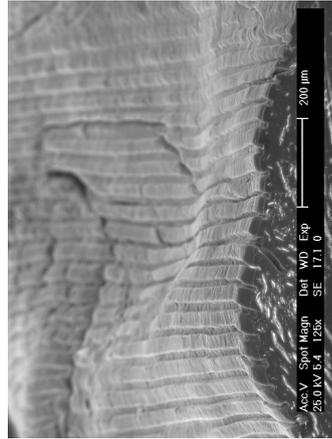
Ähnliche Verfahren zur Druckumformung von COL I-Membranen mit dem Ziel der Erzeugung von Mikrostrukturen auf deren Oberfläche nutzten deutlich geringere Kräfte, um die mikrostrukturierten Template in die COL I-Scaffolds hineinzudrücken. So wendeten Alekseeva u. a. (2012) einen Druck von max. 1.165 Pa an, wohingegen Janakiraman u. a. (2007) mit einem Wert von 880 Pa arbeiteten. Diese Werte sind geeignet, um mit mechanisch weniger stabilen Stempelmaterialien, wie z.B. Si, Mikrostrukturen in vollständig gequollene COL I-Scaffolds zu übertragen. Der Druck zur Mikrostrukturübertragung in den hier vorliegenden Untersuchungen betrug 33,3 MPa und ist damit um den Faktor 28.600 bzw. rund 37.800 höher. Aus den oben benannten Studien gehen keine Informationen zur Qualität der abgeformten Mikrostrukturen hervor, da die angegebenen Mikrostrukturmaße sich immer auf den Stempel beziehen. Daher lassen sich die Auswirkungen des hohen Druckunterschieds nicht quantitativ vergleichen und nur die Qualität der hier erzeugten Mikrostrukturen diskutieren.

Die beschriebenen Abweichungen von den vorgegebenen Strukturmaßen deuten bereits auf die nicht exakte Abformung der Mikrostrukturen des PS-Stempels hin. Tabelle 4.5 fasst regelmäßig beobachtete Fehlstellen auf den mikrostrukturierten COL I-Membranen zusammen. Dabei waren die verwendeten PS-Stempel fehlerfrei. Bei allen untersuchten Mikrostrukturen auf COL I-Membranen traten

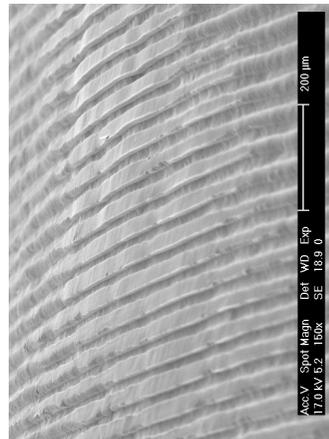
Tabelle 4.5.: Übersicht der aufgetretenen lokalen oder flächendeckenden Fehlstellen bei der Erzeugung von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen durch Druckumformung mit PS-Mastern.



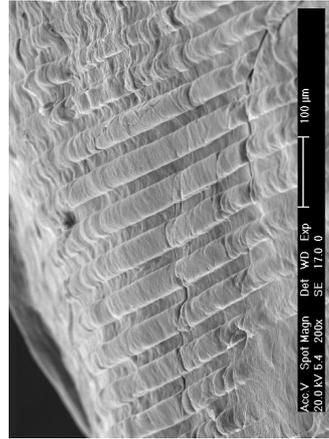
**Abrundung der Kanten der Mikrostrukturen**, vermutlich durch unvollständiges Eindringen des PS-Masters in die gequollene COL I-Membran während der Druckumformung aufgrund lokal zu geringer Druckkraft.



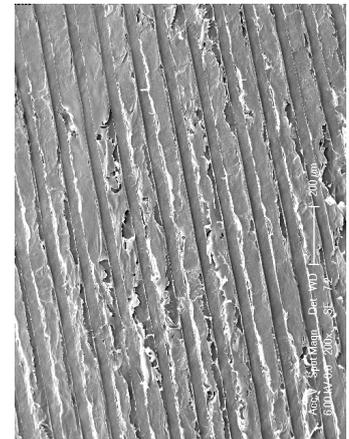
**Wellung der gesamten COL I-Membran**, hervorgerufen durch Quellungs- und Trocknungsprozesse (Anwendung von EDC fixiert Mikrostrukturierung).



**Heterogene Mikrostrukturübertragung**, möglicherweise durch lokal unterschiedliche Druckkräfte bzw. inhomogene Dicke der COL I-Membran.



**Übergeordnete Furchen in der COL I-Membran**. Vermutlich konnte die Zerkleinerung des COL I-Hydrogels für die Herstellung planarer Membranen nicht ausreichend homogenen erfolgen, sodass sich zwischen aggregierten COL I-Aggregaten Furchen bildeten.



**Ausfransung der mikrostrukturierten Membranoberfläche**, vermutlich durch Adhäsion der COL I-Membran am PS-Master während der Druckumformung und Abreißen bei Trennung vom PS-Master; hervorgerufen durch heterogene Verteilung der Druckkraft während der Druckumformung.

---

Abrundungen in den Bereichen der Kanten auf. Diese waren entweder flächendeckend auf der gesamten Membran oder nur lokal zu beobachten. Es wird vermutet, dass die Mikrostrukturen im PS-Stempel nicht vollständig mit COL I ausgefüllt waren, was die Folge einer heterogenen Verteilung der Druckkraft sein könnte. Weiterhin wurden COL I-Fasern auf der mikrostrukturierten Oberfläche beobachtet, die aus dem Fibrillenverband der Membran herausgerissen waren und zu Löchern mit unterschiedlicher Morphologie in den Mikrostrukturen führten. Diese könnten durch das Abreißen anhaftender COL I-Fasern vom PS-Stempel während des Ablösens der COL I-Membran entstanden sein. Außerdem deuten diese Ausfransungen und Löcher auf eine ungleichmäßige Dichte der Fibrillen in der Membran hin, die während der Herstellung der planaren Membran generiert wurde. Ebenso wurde die Wellung der getrockneten COL I-Membran nach der Druckumformung beobachtet, die durch die bereits oben erwähnten mechanischen Spannungen im COL I-Fibrillengefüge aufgetreten sein könnte. Außerdem traten Furchen vorrangig quer zur Längsachse der Mikrostrukturen auf. Bei diesen wird vermutet, dass sie ihren Ursprung in der heterogenen Zusammenlagerung zerkleinerter Fibrillen-Aggregate während der Membranherstellung haben.

Mit dem entwickelten Verfahren zur Druckumformung der Oberfläche von COL I-Membranen konnte eine universelle Plattform geschaffen werden, die perspektivisch die Erzeugung von Mikrostrukturen mit einfachen oder komplexen Geometrien ermöglicht. Neben den bereits erwähnten Mikrostreifen und -spitzstreifen konnten bereits zirkuläre Mikrokavitäten und dreieckige Mikrokeile erzeugt werden (siehe Abschnitt A.2.5 auf Seite 162). Daher wird davon ausgegangen, dass eine Vielzahl von Mikrostrukturen, die auf einem Si-Master erzeugbar sind und den beschriebenen mechanischen Stabilitätskriterien der PS-Stempel entsprechen, auf die COL I-Membranoberfläche übertragen werden können. Diese wären ein Ausgangspunkt für die Erzeugung initialer mikrovaskulärer Netzwerke in künstlichen TE-Scaffolds auf COL I-Basis, könnten aber auch als Wachstumsnischen für Stammzellen oder als Wachstumskanäle für neuronale Zellen verwendet werden.

#### **4.2.9. Analyse der Verteilung von HUVEC auf mikrostrukturierten COL I-Membranen**

Um die Grundlagen für vaskuläre Gefäße durch die Auskleidung der Kanäle mit HUVEC zu legen und die Beeinflussung der Morphologie darin kultivierter HUVEC zu analysieren, war es notwendig, dass sich alle HUVEC auf dem Boden der erzeugten Mikrogräben befanden. Daher wurde die Verteilung der ausgesäten HUVEC zwischen Grabenboden und Trennstreifenfläche analysiert und das Ziel verfolgt, eine Adhäsion auf der Trennstreifenfläche zu verhindern. Als initiales Testsystem diente ein PS-Master mit der Mikrostruktur B20A40T20. Es hat den Vorteil, dass es keiner Quellung durch das Nährmedium unterlag und fehlerstellenfreie, exakte Mikrostrukturen erzeugt werden konnten. Mit den Erkenntnissen aus dem Testsystem wurden anschließend mikrostrukturierte COL I-Membranen analysiert.

Auf einem PS-Master wurden  $5 \cdot 10^3$  HUVEC ausgesät und bei 37 °C für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Färbung des Cytoskeletts mit Phalloidin-TRITC und die Bewertung der Verteilung. Dabei wurde eine Zelle als „im Graben wachsend“ zugeordnet, wenn sich mindestens 50 % des Cytoskeletts

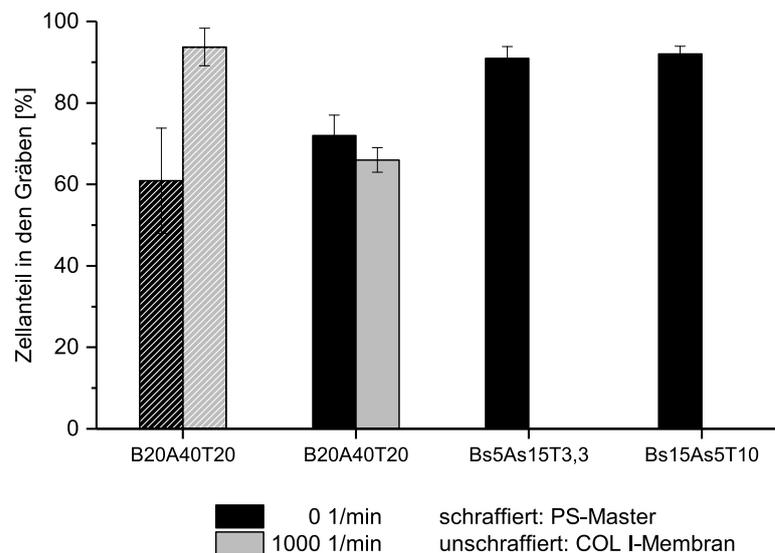


Abbildung 4.15.: Anteil HUVEC in den Gräben auf PS-Master und COL I-Membran mit der Mikrostruktur B20A40T20 (rechteckiger Querschnitt) ohne und nach Zentrifugation für 5 min bei 1.000 1/min sowie auf COL I-Membran mit den Mikrostrukturen Bs5As15T3,3 und Bs15As5T10 (dreieckiger Querschnitt). COL I-Membranen mit Mikrostrukturen mit dreieckigem Querschnitt wurden nicht zentrifugiert. n = 3.

im Graben befand. Die selektive Zelladhäsion innerhalb der Gräben war jedoch schwierig, da Zellen sowohl innerhalb der Gräben als auch auf den dazwischen befindlichen Streifenstrukturen beobachtet wurden. In Abbildung 4.15 ist eine Verteilung im Verhältnis von ca. 60 : 40 mit einer erkennbaren Präferenz für den Grabenboden des PS-Masters zu erkennen.

Um den Anteil der HUVEC in den Gräben zu erhöhen, wurden in weiterführenden Untersuchungen zwei unterschiedliche Strategien verfolgt:

- Zentrifugation des PS-Masters mit den darauf ausgesäten Zellen bei 1.000 1/min. Durch die Zentrifugalkräfte sollten die HUVEC in die tiefer liegenden Gräben transportiert werden.
- Verwendung von Mikrostrukturen in Form von Streifen mit dreieckigem Querschnitt auf COL I-Membranen (vgl. Tabelle 3.4 auf Seite 49). Diese spitz zulaufenden Mikrostreifen besaßen keine Auflagefläche für Zellen auf den Streifen und sollten durch deren Geometrie die Ablenkung der HUVEC auf den Grabenboden gewährleisten.

Nach der bereits oben beschriebenen Kultivierung und Färbung der HUVEC mit Phalloidin-TRITC wurde die Verteilung anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen analysiert. Die in Abbildung 4.15 gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass sich der Anteil der im Graben des PS-Masters wachsenden HUVEC auf über 90 % erhöhte, wenn unmittelbar nach dem Aussäen ein Zentrifugationsschritt bei 1.000 1/min für 5 min angewendet wurde. Wurde dagegen der Zentrifugationsschritt bei der Aussaat von HUVEC auf mikrostrukturierten COL I-Membranen angewendet, so war keine Verbesserung der Zellverteilung hinsichtlich der Erhöhung des Zellanteils im Graben erkennbar. Für harte Oberflächen (z.B. PS) ist bekannt, dass Zellen daran besser adhäreren als an weichen (Discher u. a. 2005; Schwarz 2007). Daher wird vermutet, dass während der Zentrifugationszeit von 5 min die in den Gräben befindlichen HUVEC bereits an die Oberfläche anknüpften. Die Adhäsion von Zellen an

---

die weiche Oberfläche der COL I-Membran benötigte dagegen mehr Zeit, sodass nach der Zentrifugation die HUVEC noch nicht adhären waren und sich durch Erschütterungen der Proben während des Handlings wieder aus dem Graben herausbewegten. Es kann jedoch eine grundsätzliche Präferenz der HUVEC für den Grabenboden, wie oben bereits erwähnt, diskutiert werden. Mindestens 60 % aller adhären Zellen befanden sich innerhalb der Gräben, obwohl bei allen untersuchten Mikrostreifenstrukturen die Streifenoberfläche doppelt so groß war wie die Grabenbodenfläche.

Wurden dagegen HUVEC auf COL I-Membranen ausgesät, die anstatt der Mikrostreifen mit rechteckigem Querschnitt spitz zulaufende Streifen mit dreieckigem Querschnitt mit den Maßen B<sub>S</sub>5A<sub>S</sub>15T<sub>3,3</sub> bzw. B<sub>S</sub>15A<sub>S</sub>5T<sub>10</sub> besaßen, konnte ohne Zentrifugationsschritt eine Ansammlung der analysierten HUVEC von über 90 % in den Gräben bestimmt werden. Ursächlich dafür wurde die Architektur der Mikrospitzstreifen mit dreieckigem Querschnitt gemacht, deren schräge Flanken zur Ableitung der Zellen auf den Grabenboden dienten. Dadurch existierte keine Auflagefläche für die HUVEC auf der Oberfläche der Streifen mehr, sodass mit diesen eine Verteilung der Zellen von fast 100 % in den Grabenboden erreicht wurde.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass eine Steuerung der Zellverteilung auf mikrostrukturierten COL I-Membranen durch Zentrifugation nicht möglich ist. In weiterführenden Untersuchungen wurden daher ausschließlich HUVEC analysiert, die am Grabenboden wuchsen. Weiterhin zeigten Mikrostrukturen mit dreieckigem Querschnitt die Fähigkeit der vollständigen Lenkung der HUVEC auf den Grabenboden, sodass diese in den nachfolgenden Untersuchungen zur Beeinflussung der Orientierung von HUVEC mit einbezogen wurden.

#### **4.2.10. Bewertung des Einflusses der Mikrostrukturierung auf die Orientierung von HUVEC**

Abschließend wurde das Ziel verfolgt, mit Hilfe der durch die Gräben bereitgestellten räumlichen Limitationen die Morphologie von HUVEC gezielt zu steuern. Ähnlich wie bei EC der Blutgefäße, die aufgrund der Strömungsrichtung des Blutes eine langgestreckte Form parallel dazu einnehmen, sollten sich HUVEC in den Mikrogräben parallel zur Längsachse der Mikrostrukturierung ausrichten. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob HUVEC Mikrogräben mit den Maßen B10A20T10, B20A40T20 und B40A80T20 erkennen und sich morphologisch daran anpassen können. Da die in Abschnitt 4.2.9 analysierten Mikrostreifen B<sub>S</sub>5A<sub>S</sub>15T<sub>3,3</sub> und B<sub>S</sub>15A<sub>S</sub>5T<sub>10</sub> (dreieckiger Querschnitt) eine bessere Verteilung von HUVEC auf den Grabenböden zeigten, wurde deren Fähigkeit zur Beeinflussung der Zellmorphologie ebenfalls untersucht. Auf den mikrostrukturierten COL I-Membranen sowie auf planaren COL I-basierten Trägern wurden dafür HUVEC ausgesät und nach 24 h bzw. 48 h Kultivierung und Färbung des Zytoskeletts mit Phalloidin-TRITC die Zellmorphologie ausschließlich der im Graben befindlichen Zellen fluoreszenzmikroskopisch erfasst. Für die Bestimmung der Ausrichtung einer Zelle relativ zur Grabenlängsachse wurde der Ausrichtungswinkel gemäß Abbildung 3.1 auf Seite 58 bestimmt. Die ermittelten Ausrichtungswinkel wurden in Winkelgruppen zu je 10° zusammengefasst und der Anteil der Zellen, die einer Winkelgruppe angehörten, gegen die Winkelgruppen für jede analysierte Mikrostruktur aufgetragen.

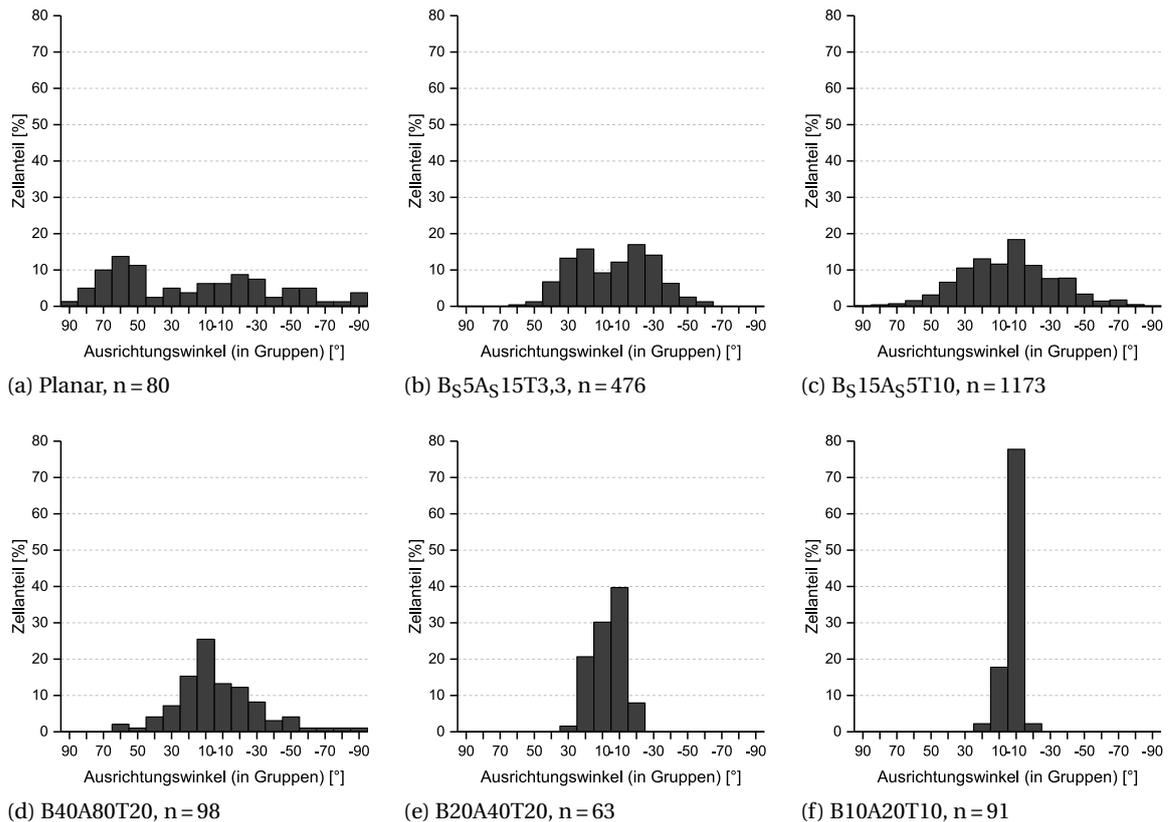


Abbildung 4.16.: Darstellung der Ausrichtung des Cytoskeletts von HUVEC auf (a) planarer COL I-Membran und (b)-(f) mikrostrukturierter COL I-Membran. HUVEC wurden bei (a) und (d)-(f) für 48 h bzw. bei (b)-(c) für 24 h kultiviert, anschließend das Aktin-Skelett mit Phalloidin-TRITC gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch erfasst. Die 2 Punkte der maximalen Ausdehnung einer Zelle wurden ermittelt und der Winkel zwischen der dadurch verlaufenden Geraden und der Längsachse der Mikrostreifen bestimmt. Dieser Ausrichtungswinkel wurde für jede einzelne HUVEC bestimmt, zur besseren Übersichtlichkeit in Winkelgruppen zu je 10° eingeteilt und gegen den Zellanteil aufgetragen.

In Abbildung 4.16b und c ist zu erkennen, dass Mikrostreifen mit dreieckigem Querschnitt eine im Vergleich zur planaren COL I-Membran (s. Abbildung 4.16a) geringe Ausrichtung der HUVEC entlang der Mikrostrukturlängsachse hervorriefen. Dabei war keine Abhängigkeit des Ausrichtungswinkels von der Grabenbreite erkennbar. Sowohl bei 5  $\mu\text{m}$  als auch 15  $\mu\text{m}$  Grabenbreite waren die Zellanteile in den einzelnen Winkelgruppen ähnlich. Jedoch betragen die Zellanteile in den jeweiligen Winkelgruppen immer weniger als 20 % und die Gesamtverteilung war im Vergleich zu Mikrostreifen mit rechteckigem Querschnitt breit. Möglicherweise könnte dafür die Architektur der Spitzstreifen selbst verantwortlich sein. Die Wachstumsfläche auf dem Grabenboden wurde hier durch keine senkrechten Wände begrenzt, sondern durch Schrägen mit einem theoretischen Winkel von 54,7° in Bezug zur Bodenfläche. Dadurch könnte möglicherweise keine ausreichende räumliche Limitation erreicht und eine Ausbreitung der Zelle auf diese schrägen Flächen ermöglicht worden sein. Weiterhin könnte die Höhe der Mikrospitzstreifen zu gering sein, um ein Überwachsen der Limitationen durch die HUVEC zu verhindern. Demnach sind Mikrostreifen mit dreieckigem Querschnitt gut in der Lage, HUVEC bei der Aussaat definiert auf die Grabenböden abzuleiten (s. Abschnitt 4.2.9). Jedoch sind sie

---

nur in geringem Maße geeignet, die Morphologie von HUVEC gezielt zu beeinflussen.

Wurden dagegen HUVEC in Gräben mit rechteckigem Querschnitt kultiviert (s. Abbildung 4.16d-f), so ist eine im Vergleich zu planaren COL I-Membranen deutliche Ausrichtung des Zellkörpers erkennbar. Diese ist jedoch von der Breite des vorgegebenen Grabens abhängig, wie bereits Vernon u. a. (2005a) ebenfalls für Mikrostrukturen auf COL I-Membranen berichteten. In Gräben mit einer Breite von 10  $\mu\text{m}$  zeigten etwa 95 % der darin wachsenden Zellen eine Ausrichtung entlang der Grabenlängsachse mit Abweichungswinkeln im Bereich von  $-10^\circ$  bis  $+10^\circ$ . Ursächlich dafür wird die bei schmalen Gräben vorherrschende geringere Distanz zu scharfen Ecken und Kanten gesehen (vgl. Abschnitt 2.2.2 auf Seite 14). Dadurch kann die angestrebte Vergrößerung der Fokalkontaktflächen nur in Richtung der Grabenlängsachse erfolgen. Das führt zur parallelen Polymerisation von Aktinfasern und damit zur Orientierung der gesamten Zelle entlang der vorgegebenen anisotropen Strukturen. Eine Verbreiterung der Mikrogräben auf 20  $\mu\text{m}$  führte zur Zunahme der Zellanteile mit Ausrichtungswinkeln größer  $\pm 10^\circ$ . Dieser Effekt verstärkte sich nochmals, wenn die Grabenbreite auf 40  $\mu\text{m}$  erhöht wurde, sodass in diesem Fall noch 45 % der Zellen mit Ausrichtungswinkeln im Bereich  $\pm 10^\circ$  beobachtet werden konnten. Für die Orientierung von Zellen ist bekannt, dass Strukturen ab etwa 20  $\mu\text{m}$  keinen wesentlichen Einfluss mehr spielen und als planares Substrat angesehen werden (Wilkinson u. a. 2002). Vermutlich ist dafür die Verfügbarkeit von mehr Protrusionsfläche quer zur Grabenlängsachse bei höheren Grabenbreiten verantwortlich, was zu einer weniger stark ausgeprägten Orientierung der HUVEC führt.

Um die selektive Zelladhäsion zu verbessern scheint perspektivisch der Einsatz von Mikrostreifen mit spitz zulaufender, dreieckiger Architektur ein vielversprechender Ansatz zu sein. Sie sind zwar weniger effektiv in der Beeinflussung der Zellorientierung, können aber eine vollständige Ableitung der Zellen in die Mikrostrukturen gewährleisten. Daher könnte die Kombination von senkrechten Seitenwänden als Grabenbegrenzung und daran nach oben hin anschließenden schrägen Ableitflächen fast alle Zellen nur durch Gravitation auf den Graben lenken und nachfolgend die Orientierung der Zellen hervorrufen.

### **4.3. VEGF-Gradient auf COL I-basierten planaren Membranen**

Durch die Erzeugung eines Konzentrationsgradienten mit dem Wachstumsfaktor VEGF-165 sollte eine Möglichkeit zur Induktion der gerichteten Migration von HUVEC auf planaren COL I-Membranen entwickelt werden. Die wenigen bisher in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Erzeugung von Wachstumsfaktorgradienten auf COL I-basierten Scaffolds nutzen Diffusions- und Ink-Jet-Printing-Techniken (Odedra u. a. 2011; X. Li, Liang u. a. 2015). Die Nutzung planarer kompakter COL I-Membranen zur Erzeugung von migrationsinduzierenden Wachstumsfaktorgradienten ist jedoch noch nicht beschrieben. Ebenso fehlen im Allgemeinen Informationen zu Charakterisierung von Wachstumsfaktorgradienten. In dieser Arbeit sollte daher ein Immersionsverfahren entwickelt werden, bei dem die planaren COL I-Membranen computergesteuert in eine VEGF-Lösung getaucht werden und dadurch das adsorptiv an der Membranoberfläche gebundene VEGF einen linearen Anstieg der Oberflächenkonzentration aufzeigt.

Tabelle 4.6.: Molekülmasse, Isoelektrischer Punkt (pI) und Labelgrad mit TAMRA-SE (DoL) von BSA, HYAL und VEGF-165. <sup>1</sup>Daten aus UniProt (2017).

Protein	Uniprot-ID <sup>1</sup>	Molekülmasse [kDa] <sup>1</sup>	pI <sup>1</sup>	DoL
BSA	P02769	66,43	5,6	3,7
HYAL	Q5E985	46,54	8,0	3,5
VEGF-165	P15692-4	38,29	7,6	-

Zur Verfahrensentwicklung kamen zunächst die Modellproteine BSA und HYAL aus dem Rindertestikel zur Anwendung. Die Verwendung von VEGF für diese Zwecke war zunächst aus wirtschaftlicher Sicht ungünstig. Bei der Entscheidung zur Wahl als Modellprotein wurden jedoch auch Ähnlichkeiten in den biochemischen und molekularen Eigenschaften zum VEGF einbezogen. Diese waren der isoelektrische Punkt (pI) und das Molekulargewicht.

BSA erfüllte vor allem den wirtschaftlichen Aspekt und ließ sich in gutem Maße mit TAMRA-SE zur Quantifizierung konjugieren, obwohl es ein deutlich schwereres Molekül mit einem stark abweichenden pI ist als VEGF. Daher sollte damit die wesentliche Verfahrensentwicklung für ein Immersionsverfahren durchgeführt und die grundsätzliche Erzeugbarkeit eines Proteingradienten charakterisiert werden.

Um jedoch eine genauere Modellierung des Adsorptionsverhaltens von VEGF bei Konzentrationen in der Immersionslösung von wenigen µg pro mL zu ermöglichen, wurde anschließend BSA gegen HYAL wegen seiner zum VEGF-165 ähnlichen Molekülmasse (HYAL ist nur etwa 8 kDa schwerer), seines ähnlichen pI und der immer noch deutlich geringeren Anschaffungskosten ausgetauscht (s. dazu Tabelle 4.6). Es wurde erwartet, dass somit auch das Adsorptionsverhalten ähnlich ist. Hinzu kommt, dass es zur Quantifizierung ebenfalls mit TAMRA-SE fluoreszenzmarkiert werden konnte. Mit HYAL sollte vorab geprüft werden, ob die in späteren Untersuchungen anvisierten VEGF-Gradienten im unteren ng/mm<sup>2</sup>-Bereich erzeugt werden können. Dafür sollte die minimale HYAL-Konzentration in der Immersionslösung ermittelt werden, mit der ein HYAL-Gradient erzeugt werden kann.

Die am Modell ermittelten Parameter für den Immersionsprozess sollten abschließend auf die Erzeugung eines VEGF-Gradienten übertragen werden. Die Quantifizierung des VEGF auf der COL I-Membran erfolgte hier mittels VEGF-spezifischem ELISA.

#### 4.3.1. Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens der Modellproteine BSA und HYAL an COL I-Membranen

Für die gradierte Immobilisierung von BSA und HYAL wird bei dem zu entwickelnden Immersionsverfahren angenommen, dass die Adsorptionsgeschwindigkeit der Proteine an die COL I-Membran ein maßgeblicher Prozessparameter ist. Daher sollte bei Kontaktzeiten von 1 - 240 min einer gesamten COL I-Membran mit 100 µg/mL und 500 µg/mL BSA-Lösungen bzw. 10 µg/mL und 0,5 µg/mL HYAL-Lösungen gemessen werden, wie viel Protein auf dem Träger adsorbiert wird. Für die sich dar-

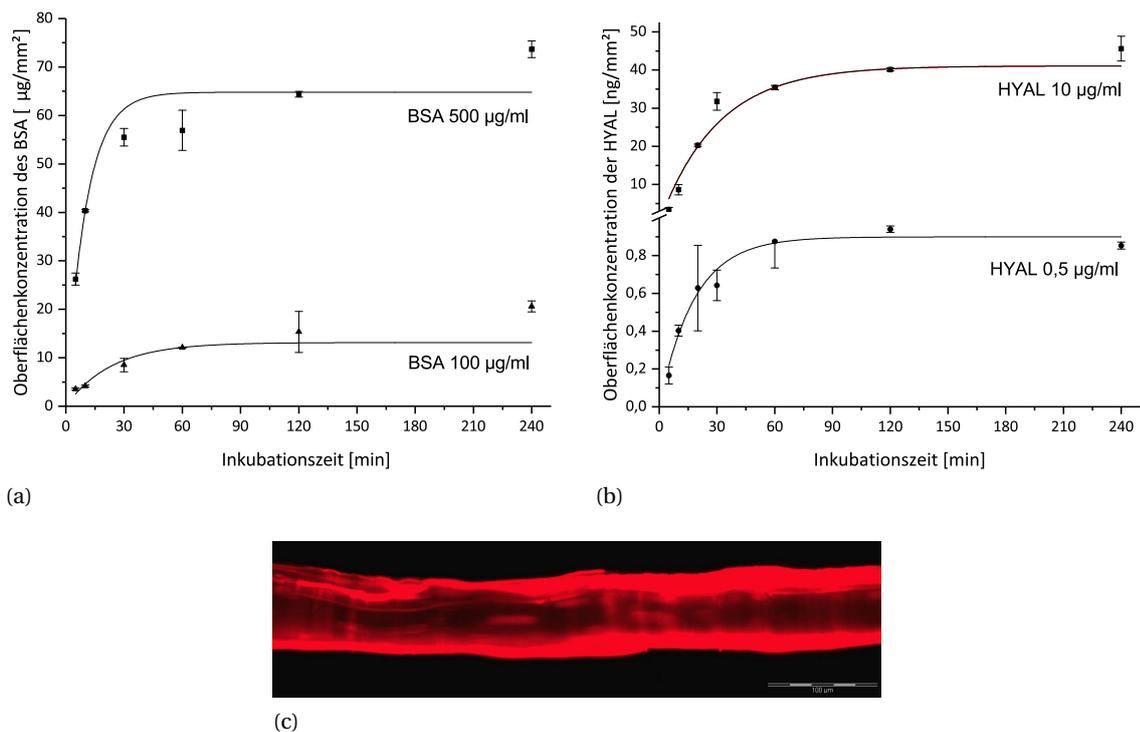


Abbildung 4.17.: Oberflächenkonzentrationen von (a) BSA und (b) HYAL auf COL I-Membranen nach Inkubation in Proteinlösungen mit unterschiedlicher Konzentration und Dauer. Die COL I-Membranen wurden für 1 - 240 min in BSA- bzw. HYAL-Lösungen (beide Proteine wurden vorher mit TAMRA-SE konjugiert) inkubiert und anschließend die daran verbleibende Proteinmenge in Abhängigkeit zur verfügbaren Oberfläche fluoreszenzphotometrisch ermittelt (Anregungswellenlänge 550 nm, Emissionswellenlänge 580 nm). Aus den ermittelten Oberflächenkonzentrationen wurden durch Anpassung an die Gleichung 4.1 des Box-Lucas-Modells Beladungs-Zeit-Kurven berechnet. (c) Querschnitt einer COL I-Membran nach Inkubation in 100 µg/mL BSA-TAMRA für 10 min. Die rote Färbung zeigt TAMRA-SE-markiertes BSA.

aus ergebenden Beladungs-Zeit-Verläufe sollten Funktionsgleichungen bestimmt werden. Im weiteren Verlauf sollte mit diesen die Geschwindigkeit der Immersion einer COL I-Membran in die Proteinlösung zur Erzeugung eines Gradienten gesteuert werden (s. Abschnitt 4.3.2).

Für die Präsentation eines VEGF-Gradienten für adhären wachsende HUVEC ist es optimal, dass dieser tatsächlich nur oberflächlich verläuft. Daher sollte geprüft werden, wie sich die adsorbierten Proteine im Querschnitt der COL I-Membran verteilen. Dafür wurde eine COL I-Membran (10 x 10 mm<sup>2</sup>, 10 mg) in 100 µg/mL BSA-Lösung für 10 min inkubiert und anschließend die mittels Mikrotom erzeugten Querschnitte am Fluoreszenzmikroskop bewertet.

Für die beschriebenen Untersuchungen wurden BSA und HYAL mit TAMRA-SE mit den in Tabelle 4.6 gezeigten Labelgraden (DoL) konjugiert, sodass die Quantifizierung der Proteine fluoreszenzphotometrisch erfolgen konnte.

Wie aus Abbildung 4.17a und b ersichtlich wird, ist bei allen untersuchten BSA- und HYAL-Konzentrationen nach einer anfänglich schnellen Zunahme der Oberflächenkonzentration eine deutliche

Verlangsamung zu beobachten. Im Unterschied zur Inkubation in HYAL-Lösung ist bei den BSA-Lösungen keine Ausbildung einer ausgeprägten Plateau-Phase zu beobachten. Daher kann noch von einer weiteren BSA-Adsorption über den Untersuchungszeitraum hinaus ausgegangen werden. Es wird vermutet, dass die hohen BSA-Konzentrationen in einem ersten Schritt zu einer schnellen Besetzung der Membranoberfläche führten. Im weiteren Verlauf findet dann die langsamere Diffusion des BSA in das Innere der Membran statt, was möglicherweise die Ursache für die stetig zunehmenden BSA-Konzentration ist. Außerdem ist zu erkennen, dass mit höherer BSA- bzw. HYAL Konzentration in der Immersionslösung eine höhere adsorbierte BSA- bzw. HYAL-Menge an die Oberfläche verbunden ist. Wurde BSA mit einer Konzentration von 500 µg/mL eingesetzt, so wurde nach etwa 30 min eine deutliche Verlangsamung der BSA-Adsorption auf den Träger beobachtet, bei einer BSA-Konzentration von 100 µg/mL dagegen erst nach 60 min. Die Inkubation der COL I-Membranen in 10 µg/mL HYAL-Lösung führte nach etwa 120 min zur konstanten Proteinkonzentration auf der Membranoberfläche, bei 0,5 µg/ml HYAL-Lösung waren es etwa 60 min. In diesem letzten Fall wurde auch keine weitere langsame Zunahme der BSA-Oberflächenkonzentration beobachtet. Da diese Konzentration für die Übertragung des Verfahrens auf die Erzeugung von VEGF-Gradienten vorgesehen war, wurde daher auf eine genaue Analyse des Einflusses der Diffusion in das Innere der COL I-Membran bei hohen Proteinkonzentrationen verzichtet.

Mit Hilfe der ermittelten Oberflächenkonzentrationen zur jeweiligen Inkubationszeit wurde durch Anpassung der Gleichung 4.1 nach dem BOX-LUCAS-Modell (Box und Lucas 1959) eine Funktion ermittelt, die den zeitlichen Verlauf der BSA- bzw. HYAL-Adsorption an eine COL I-Membran beschreibt. Diese zeigte im Vergleich zu anderen Modellen (Ergebnisse nicht gezeigt) bei den vorgegebenen zeitlichen Verläufen der Proteinadsorption die beste Anpassung, gemessen am Bestimmtheitsmaß  $R^2$ . Der Verlauf der jeweiligen Funktion folgt der allgemeinen exponentiellen Gleichung

$$q = a \cdot (1 - e^{-b \cdot t}) \quad (4.1)$$

mit  $q$  als Oberflächenkonzentration und  $t$  als Zeit. Aus der Anpassung wurden auch die spezifischen Konstanten  $a$  und  $b$  für jede BSA- bzw. HYAL-Konzentration ermittelt (s. Tabelle 4.7), die weiterführend für die computerbasierte Steuerung des Immersionsverfahren verwendet wurden.

Auf dem in Abbildung 4.17c gezeigten Querschnitt einer COL I-Membran nach Inkubation in einer 100 µg/mL BSA-Lösung (BSA ist mit TAMRA-SE konjugiert) ist erkennbar, dass nach einer Inkubationszeit von 10 min die Fluoreszenzintensität des adsorbierten BSA-TAMRA-Konjugats auf der Oberfläche der Membran deutlich größer ist und zum Membrankern hin schnell abnimmt. Trotzdem wurden Eindringtiefen des Proteins von 10 - 20 µm beobachtet. Als Ursache für das geringe Eindringen wird die netzartige Struktur der COL I-Fibrillen vermutet, die, bedingt durch die Quellung im wässrigen Milieu, auflockert und eine senkrechte Diffusion ermöglicht.

### 4.3.2. Entwicklung eines Immersionsverfahrens

Für die definierte Immersion einer COL I-Membran in eine Proteinlösung zur Erzeugung eines Proteingradienten wurde die in Abbildung 4.18 schematisch dargestellte Apparatur entwickelt. In diese

Tabelle 4.7.: Konstanten  $a$  und  $b$  sowie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der durch Anpassung der Beladung-Zeit-Verläufe erzeugten Graphen. Diese wurden durch Inkubation von COL I-Membranen in der jeweiligen Proteinlösung bestimmt. Die Anpassung erfolgte nach dem BOX-LUCAS-Modell und entspricht dem in Gleichung 4.1 gezeigten allgemeinen Verlauf. Alle Parameter wurden zur Programmierung des Schrittmotors für die definierte Immersion verwendet.

Protein und Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$a$	$b$	$R^2$ (COD)	Gesamtimmersionszeit [min]
BSA 500	$64,80 \pm 1,76$	$0,097 \pm 0,005$	0,979	40
BSA 100	$13,14 \pm 0,87$	$0,042 \pm 0,012$	0,973	40
HYAL 10	$41,06 \pm 1,19$	$0,033 \pm 0,003$	0,989	20
HYAL 0,5	$0,89 \pm 0,02$	$0,055 \pm 0,009$	0,967	20

wurde eine quadratische COL I-Membran mit einer Größe von  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  in eine Halterung eingespannt, sodass eine Fläche von  $10 \times 6 \text{ mm}^2$  der Membran in direktem Kontakt mit der in einem Becherglas befindlichen Proteinlösung stehen konnte. Der Innendurchmesser des Becherglases war so gewählt, dass die Halterung mit der Membran eben noch hineinpasste. Die Halterung wurde über einen Faden hängend an der Antriebsachse eines Schrittmotors befestigt. Zum definierten Absenken der COL I-Membran in die jeweilige Proteinlösung wurde der Schrittmotor mit einem programmierbaren *Arduino Uno* Mikrokontroller gesteuert.

Die aus der Literatur bekannten Verfahren zur Erzeugung von VEGF-Gradienten auf COL I-Scaffold verwenden COL I-Hydrogele oder poröse COL I-Scaffolds, in denen die Diffusion des VEGF zur Gradientenerzeugung genutzt werden kann (s. Tabelle 2.5 auf Seite 40). Auf planaren Trägern, die meist aus verschiedenen Kunststoffen bestehen, wurden durch bspw. Mikrofluidik oder Microcontact-Printing eine Vielzahl von Signalmolekülgradienten erzeugt (für Beispiel siehe „Aktuelle Technologien“ in Abschnitt 2.4.4 auf Seite 38). Um jedoch einen VEGF-Gradienten auf der Oberfläche einer COL I-Membran zu erzeugen, muss das direkte Auftragen des VEGF mit steigender Konzentration über die Oberfläche hinweg erfolgen. Dafür wurde ein Immersionsprozess als geeignet erachtet, bei dem das schrittweise Eintauchen einer Membran in eine VEGF-Lösung genutzt wird, um stetig ansteigende Kontaktzeiten in aufeinanderfolgenden Bereichen der Membranoberfläche mit einer VEGF-Lösung zu generieren. Durch die dabei stattfindende Adsorption des VEGF mit konstant größer werdenden Kontaktzeiten sollte ein gradueller Verlauf der VEGF-Konzentration erzeugt werden.

Das entwickelte Immersionsverfahren nutzte einen Schrittmotor zum Eintauchen der COL I-Membran in die Proteinlösung. Das hatte den Vorteil, dass während des Prozesses die Membranoberfläche theoretisch in 544 Kontaktsegmente eingeteilt werden konnte. Durch die Berechnung der Verweilzeit jedes Segments in der VEGF-Lösung konnte dadurch eine definierte Proteinkonzentration auf dem betreffenden Membransegment eingestellt und damit ein gradueller Verlauf der VEGF-Konzentration erzeugt werden. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass die Gesamtimmersionszeit unterhalb der Zeit für die Sättigung der Membran mit Protein liegt. Die Bestimmung der Verweilzeiten erfolgte mit Hilfe der in Abschnitt 4.3.1 bestimmten Kurven für die Beladung-Zeit-Verläufe. Sie sind wesentliche Vor-

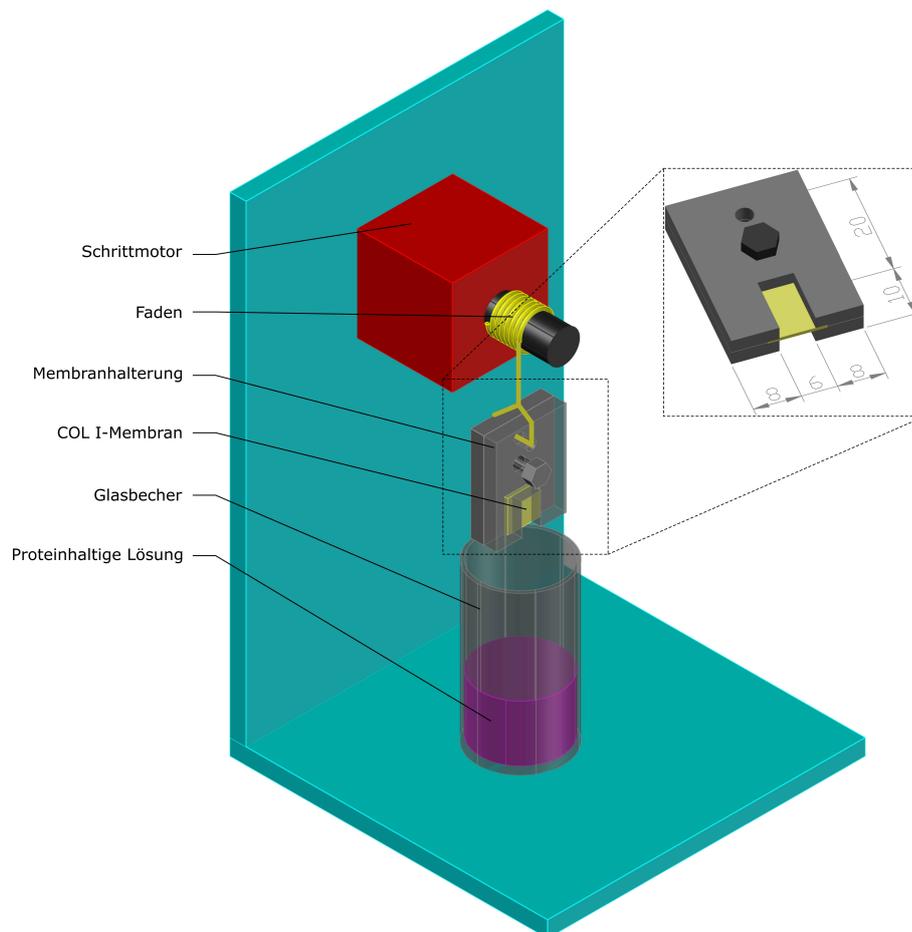


Abbildung 4.18.: Schematische Darstellung der Immersionsapparatur zur Erzeugung eines Proteingradienten auf COL I-Membranen. Die Membran wurde in eine Halterung eingespannt, sodass eine Fläche von  $10 \times 6 \text{ mm}^2$  in direktem Kontakt mit der Proteinlösung stehen konnte. An einem Faden hängend wurde die Membran mittels programmierbarem Schrittmotor in die Proteinlösung eingetaucht. Für die komplette Immersion der COL I-Membran benötigte der Schrittmotor 544 Schritte. Der Schrittmotor wurde so programmiert, dass nach jedem Schritt eine definierte Pause eingehalten wurde, die aus den für jedes Protein und jede Proteinkonzentration ermittelten Beladungs-Zeit-Kurven berechnet wurde. Der gesamte Programmquelltext befindet sich in Abschnitt A.2.2 auf Seite 157.

aussetzung für die definierte Steuerung des Immersionsvorgangs und mussten für jede Proteinkonzentration und jede Art des Proteins separat bestimmt werden.

Die Steuerung des Schrittmotors wurde mit Hilfe eines programmierbaren *Arduino-Uno*-Mikrocontrollers realisiert. Im Folgenden sind die für die Berechnung der Verweilzeit wesentlichen Abschnitte der Programmierung erläutert und der dazugehörige Quellcode aufgelistet:

1. Mit Hilfe der durch Anpassung der Gleichung 4.1 an die Messwerte bestimmten Konstanten  $a$  und  $b$  sowie der Festlegung der Gesamtzeit  $zeit$  (s. Tabelle 4.7) für die Immersion wurde die maximal erzielbare Proteinkonzentration (Beladung)  $q$  auf der Oberfläche der Membran ermittelt.

```
float q = a*(1-exp(-b*zeit));
```

- 
2. Für die vollständige Immersion der COL I-Membran unter Berücksichtigung der Flüssigkeitsverdrängung der Halterung benötigt der Schrittmotor 544 Schritte. Das bedeutet, dass die Membran in 544 Segmente unterteilt wurde, bei denen sich die Konzentrationen eines Segments zum Nachbarsegment um den Wert  $y$  unterschied. Zur Erzeugung eines linearen Konzentrationsverlaufs wurde aus dem Quotienten von maximal erzielbarer Proteinkonzentration  $q$  und Gesamtschrittzahl *schritte* der Konzentrationsanstieg  $y$  von einem Segment zum benachbarten ermittelt.

**float**  $y = q / \text{schritte};$

3. Mittels einer Schleife, deren Abbruchbedingung das Erreichen der Gesamtschrittzahl war, wurde für jeden Schritt die auf dem zugehörigen Membransegment zu erreichende Proteinkonzentration  $g$  ermittelt. Der aktuelle Schritt wurde durch den Schrittwert *incr* dargestellt. Das Membransegment 1 besaß dabei die höchste Proteinkonzentration  $q$ , da es am längsten in der Proteinlösung inkubiert wurde. Das Membransegment 2 besaß die um  $2y$  verminderte Proteinkonzentration  $q$  usw.

**float**  $g = q - \text{incr} * y;$

4. Nach Umstellung der Gleichung 4.1 nach der Zeit  $t$  und Ersetzen von  $q$  durch  $g$  konnte für jeden Schritt die Verweilzeit  $t$  (in min) jedes einzelnen Segmentes der Membran in der BSA-Lösung zur Einstellung der jeweiligen Konzentration  $g$  berechnet werden.

**float**  $t = -(\log(1-g/a) / b) * 60000;$

5. Die anzuwendende Wartezeit *time* zwischen zwei Schrittmotorschritten wurde aus der Differenz der Verweilzeiten (*tvorher* -  $t$ ) benachbarter Segmente in der Proteinlösung bestimmt.

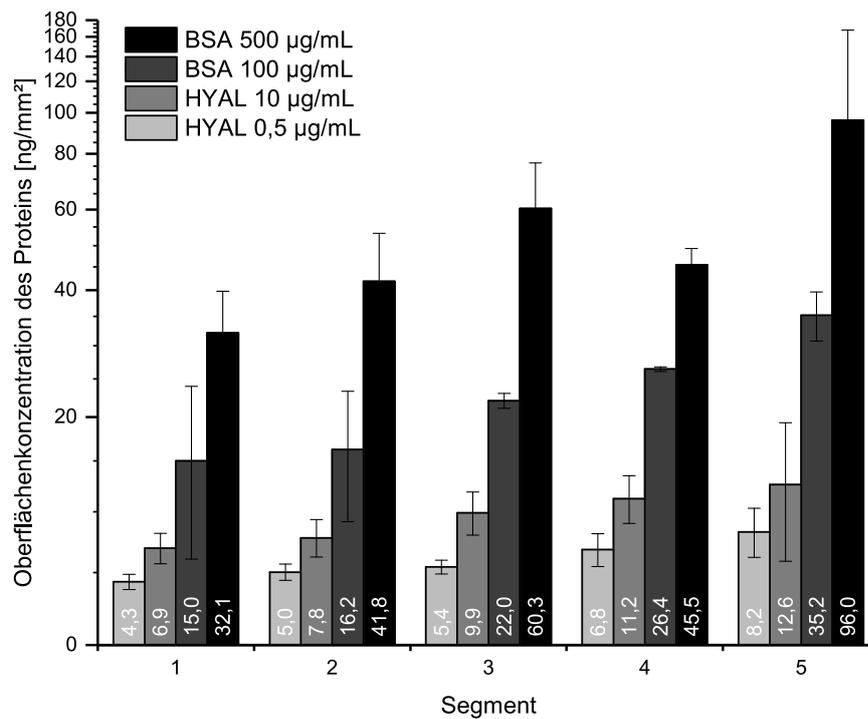
$\text{time} = \text{tvorher} - t;$

Der vollständige Programm-Quelltext zur Steuerung des Schrittmotors über den *Arduino Uno* Mikrocontroller ist in Abschnitt A.2.2 auf Seite 157 dargestellt.

### 4.3.3. Charakterisierung von BSA und HYAL-Gradienten

Mit dem entwickelten Immersionsverfahren wurde im weiteren Verlauf geprüft, ob durch Eintauchen in 100 µg/mL und 500 µg/mL BSA-Lösungen jeweils ein detektierbarer Gradient der Proteinkonzentration auf einer COL I-Membran erzeugbar ist und ob der Konzentrationsunterschied der Immersionslösung auch einen Einfluss auf den Anstieg des Gradienten hat. Dafür wurden die jeweiligen Konstanten  $a$  und  $b$  sowie die festgelegte Immersionszeit *zeit* (s. Tabelle 4.7) in das Steuerprogramm des Schrittmotors eingesetzt und die Membran eingetaucht. Anschließend wurde die COL I-Membran quer zur Eintauchrichtung in 5 Segmente mit jeweils einer Größe von 2 x 6 mm<sup>2</sup> geteilt. Das erste Segment hatte dabei den kürzesten Kontakt mit der BSA-Lösung. Nach erfolgter Hydrolyse der Segmente mittels Papain wurde die enthaltene BSA-Konzentration fluoreszenzphotometrisch quantifiziert.

Wie in Abbildung 4.19 zu erkennen ist, wurde eine kontinuierliche Zunahme der BSA-Konzentration



Protein und Konzentration in der Immersionslösung [µg/mL]	$m$	$R^2$
BSA 500 <sup>1</sup>	$13,58 \pm 1,84$	0,947
BSA 100	$4,56 \pm 0,53$	0,948
HYAL 10	$1,46 \pm 0,14$	0,964
HYAL 0,5	$0,73 \pm 0,14$	0,864

<sup>1</sup> Die lineare Regression erfolgte ohne die BSA-Konzentration auf Segment 4, da sie als Ausreißer erkannt wurde.

Abbildung 4.19.: Oberflächenkonzentrationen von BSA und HYAL auf den Segmenten 1 - 5 von COL I-Membranen nach computergesteuerter Immersion in 500 µg/mL und 100 µg/mL BSA-Lösung bzw. 10 µg/mL und 0,5 µg/mL HYAL-Lösung. Die Quantifizierung des jeweiligen Proteins erfolgte nach vollständiger Hydrolyse der in Segmente (2 x 6 mm<sup>2</sup>) geteilten Membran mittels Papain fluoreszenzphotometrisch (Proteine waren mit TAMRA-SE konjugiert). Für die lineare Regression der jeweiligen Proteinkonzentrationen auf Segment 1 bis Segment 5 ist der Anstieg  $m$  und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  dargestellt.  $n = 3$ .

mit steigender Segmentnummer gemessen. Nach Immersion von COL I-Membranen in 500 µg/mL BSA-Lösung wurden gut 32 ng/mm<sup>2</sup> BSA in Segment 1 und knapp 100 ng/mm<sup>2</sup> BSA im Segment 5 detektiert. Durch Verringerung der BSA-Konzentration in der Immersionslösung von 500 µg/mL auf 100 µg/mL wurde außerdem eine Abnahme der BSA-Konzentrationen innerhalb gleicher Segmente um 42 - 63 % detektiert.

Um den unterschiedlichen Verlauf der BSA-Oberflächenkonzentrationen in Abhängigkeit von der Immersionslösungskonzentration zu quantifizieren und um die Linearität des erzeugten Gradienten zu überprüfen, wurde eine lineare Regression der ermittelten Oberflächenkonzentrationen durchgeführt. Dabei wurde die BSA-Konzentration des Segments 4 nach Immersion in 500 µg/mL BSA-

---

Lösung nicht berücksichtigt, da sie bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 als Ausreißer erkannt wurde. Die Tabelle in Abbildung 4.19 zeigt den Anstieg  $m$  und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der linearen Regression. Es ist erkennbar, dass bei Verringerung der BSA-Konzentration in der Immersionslösung um den Faktor 5 eine Abnahme des Anstiegs  $m$  um etwa den Faktor 3 ermittelt werden kann. Das zeigt den maßgeblichen Einfluss der Proteinkonzentration in der Immersionslösung auf das Gesamtlevel des Konzentrationsprofils. Der t-Test auf Unabhängigkeit und das Bestimmtheitsmaß von fast 95% bei beiden berechneten Geraden belegen einen linearen BSA-Gradienten auf der Oberfläche der COL I-Membranen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit dem Modellprotein BSA und seinem zuvor ermittelten und mathematisch beschriebenen Adsorptionsverhalten, ein computergesteuertes Immersionsverfahren erfolgreich für die Erzeugung eines linearen BSA-Gradienten auf einer COL I-Membran entwickelt werden konnte.

Im weiteren Verlauf der Verfahrensentwicklung sollte die Modellierung der anvisierten Erzeugung von VEGF-Gradienten präzisiert und die kleinste Proteinkonzentration in der Immersionslösung ermittelt werden, mit der ein messbarer Gradient im unteren ng/mm<sup>2</sup>-Bereich auf der Oberfläche einer COL -Membran erzeugt werden kann. Dazu wurde BSA gegen HYAL ausgetauscht, da der Einsatz von VEGF für die umfangreichen Experimente kostenintensiv wäre und HYAL vergleichbare biochemische und molekulare Eigenschaften besitzt. Ebenso wie bei BSA-Lösungen wurden die in Tabelle 4.7 gezeigten Konstanten aus den Beladung-Zeit-Kurven für HYAL in die Programmierung des Schrittmotors eingefügt und COL I-Membranen in 10 µg/mL bzw. 0,5 µg/mL HYAL-Lösung definiert eingetaucht. Die eingesetzte HYAL war ebenfalls mit TAMRA-SE fluoreszenzmarkiert und wurde nach Teilung der Membran in fünf Segmente quer zur Eintauchrichtung durch Fluoreszenzphotometrie quantifiziert.

Abbildung 4.19 zeigt, dass die Absenkung der Proteinkonzentration in der Immersionslösung von 100 µg/mL BSA auf 10 µg/mL HYAL und weiter auf 0,5 µg/mL HYAL zu einer kontinuierlichen Verringerung des Gesamtniveaus an immobilisiertem Protein führte. 0,5 µg/mL HYAL war dabei die geringste Konzentration in der Immersionslösung, bei der eine Gradient detektiert werden konnte. Außerdem konnte, ebenso wie beim BSA, bei beiden eingesetzten HYAL-Lösungskonzentrationen eine kontinuierliche Zunahme der HYAL-Menge auf der COL I-Membran mit steigender Segmentnummer festgestellt werden. Es wurde jeweils in etwa eine Verdopplung der HYAL-Oberflächenkonzentration von Segment 1 zu Segment 5 bestimmt. Nach linearer Regression beider Konzentrationsverläufe wurde durch die Abnahme der HYAL-Konzentration in der Immersionslösung in etwa eine Halbierung des Anstiegs  $m$  ermittelt. Außerdem konnte für die lineare Regression der HYAL-Segmentkonzentrationen nach Immersion in 10 µg/mL HYAL-Lösung ein Bestimmtheitsmaß von über 95 % und für 0,5 µg/mL von etwa 86 % ermittelt werden.

Somit waren die Voraussetzungen für die Übertragung des Prozesses auf VEGF gegeben. Darüber hinaus kann mit dem entwickelten Immersionsprozess vermutlich jedes Profil eines Proteingradienten auf COL I-Membranen durch Wahl der passenden Prozessparameter erzeugt werden. Auch die Übertragung der Methode auf andere Proteine, andere Proteinkonzentrationen und andere Trägermaterialien scheint perspektivisch einfach realisierbar. Einzige Voraussetzung dafür ist die Kenntnis des

Adsorptionsverhaltens des Proteins in Form der Beladung-Zeit-Verläufe und deren mathematische Beschreibung.

#### **4.3.4. Erzeugung und Analyse von VEGF-Gradienten**

Zur Erzeugung von VEGF-Gradienten wurde das entwickelte Immersionsverfahren mit den Prozessparametern für die Immersion in 0,5 µg/mL HYAL-Lösung (s. Tabelle 4.7) auf die Verwendung von VEGF-Lösungen mit 100 ng/mL und 500 ng/mL übertragen. Neben reinen COL I-Membranen wurde auch die Gradientenerzeugung auf HA-haltigen Membranen mit 1 mg HA pro 1 mg COL I und Inkubation in 500 ng/mL VEGF-Lösung analysiert. Voruntersuchungen zeigten, dass eine Fluoreszenzmarkierung des VEGF mit TAMRA-SE in den gewählten Konzentrationsbereichen nicht möglich war. Daher wurde die Quantifizierung durch einen VEGF-spezifischen ELISA mit einer Nachweisgrenze von 63 pg/mL<sup>1</sup> durchgeführt. COL I-basierte Membranen wurden wie für die Immersion in BSA- oder HYAL-Lösungen präpariert.

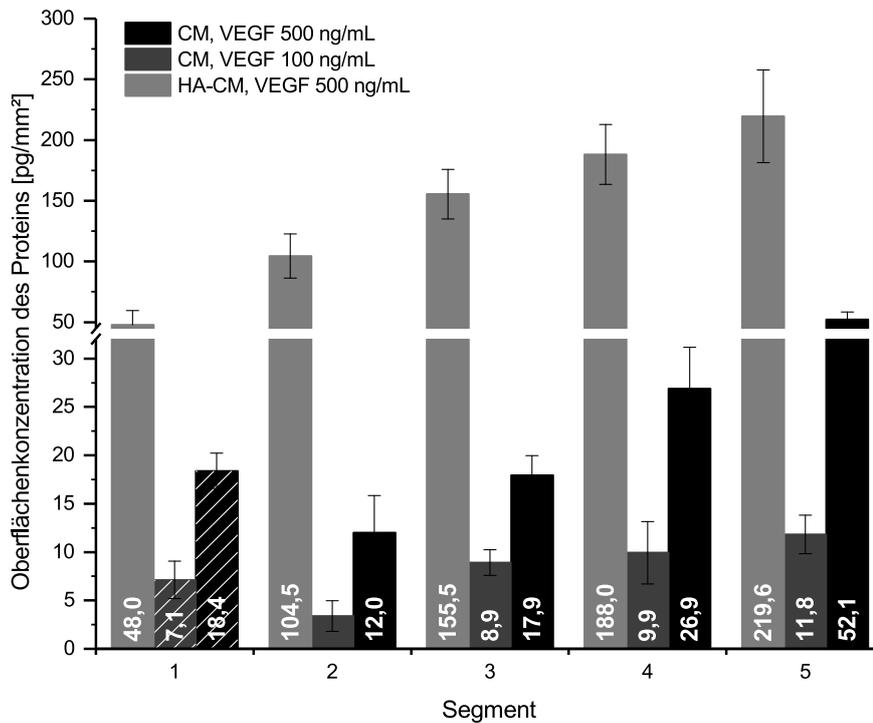
Die in Abbildung 4.20 zusammengefassten Untersuchungen zeigen, dass zur Steuerung des Immersionsvorgangs für die Erzeugung von VEGF-Gradienten auf COL I-Membranen die Verwendung der Prozessparameter aus der Immersion in 0,5 µg/mL HYAL-Lösung genutzt werden konnten. Auf reinen COL I-Membranen konnte sowohl mit 500 ng/mL VEGF in der Immersionslösung als auch mit 100 ng/mL ein messbarer VEGF-Gradient mit kontinuierlichem Konzentrationsanstieg bei zunehmender Segmentnummer nachgewiesen werden. Dabei war der Konzentrationsverlauf nach Immersion in 500 ng/mL VEGF-Lösung auf einem höheren Gesamtniveau als mit 100 ng/mL.

Da initiale Versuche zur Fluoreszenzmarkierung des VEGF mit TAMRA-SE, wie bei BSA und HYAL, nicht erfolgreich waren, erfolgte die Quantifizierung des VEGF auf den Membranen mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), der standardmäßig zur Quantifizierung von VEGF in Lösungen angewendet wird (Scapini u. a. 1999). Dafür musste die gesamte Membran in Lösung gebracht werden, was jedoch mit dem bisher verwendeten Papain nicht erfolgen konnte. Vorversuche haben gezeigt, dass nach Papainbehandlung kein VEGF mittels ELISA mehr detektiert werden konnte. Es wird vermutet, dass dadurch die für den ELISA notwendigen spezifischen Bindungsdomänen im VEGF-Molekül abgebaut wurden. Die Verwendung von Collagenase V anstatt Papain ermöglichte ebenfalls die vollständige Lösung der COL I-Membran und zeigte keinen negativen Einfluss auf die VEGF-Detektion.

Weiterhin konnte bei beiden untersuchten VEGF-Konzentrationen in der Immersionslösung beobachtet werden, dass der Verlauf des Gradienten in den Segmenten 1 und 2 ein Absinken der VEGF-Konzentration beschrieb, bevor über einen kontinuierlichen Anstieg das Maximum in Segment 5 erreicht wurde. Ursächlich dafür ist möglicherweise die Immobilisierung von VEGF an den frei zugänglichen Seitenflächen der Membran an deren Ober- und Unterkante. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die BSA-Immobilisierung überwiegend oberflächlich auf der COL I-Membran stattfindet, war davon auszugehen, dass neben dem VEGF auf der Membranfläche auch VEGF an den Seitenflächen in der Quantifizierung mit berücksichtigt wird. Daher wurden die Messwerte der Segmente 1 bei der

---

<sup>1</sup>Angabe des Herstellers PeproTech GmbH



Zusammensetzung der COL I-Membran	VEGF-Konzentration in der Immersionslösung [ng/mL]	<i>m</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
Reines COL I	500	11,38 ± 3,33	0,854
Reines COL I	100	2,70 ± 0,87	0,829
1 mg HA / 1 mg COL I	500	46,75 ± 3,32	0,985

Schraffiert: Datenpunkte bei der linearen Regression nicht berücksichtigt.

Abbildung 4.20.: Oberflächenkonzentration von VEGF auf den Segmenten 1 - 5 von COL I-basierten Membranen nach definierter Immersion in verschiedene VEGF-Lösungen. Reine COL I-Membranen wurden in 500 ng/mL bzw. 100 ng/mL VEGF-Lösung getaucht, HA-COL I-Membranen mit 1 mg HA pro mg COL I wurden in 500 ng/mL VEGF-Lösung getaucht. Für die lineare Regression der jeweiligen VEGF-Konzentrationen von Segment 1 bis Segment 5 ist der Anstieg *m* und das Bestimmtheitsmaß *R*<sup>2</sup> dargestellt. Dabei ist bei reinen COL I-Membranen die VEGF-Konzentration des Segments 1 nicht berücksichtigt worden. n = 2.

Analyse des linearen Verlaufs nicht mit berücksichtigt. Es wird auch vermutet, dass diese Beeinflussung der Gradientenerzeugung erst bei niedrigen Proteinkonzentrationen in der Immersionslösung einen messbaren Einfluss besitzt, da bei den Modellproteinen dieser Verlauf nicht erkennbar war. In nachfolgenden Untersuchungen mit COL I-HA-Membranen wurde nach dem Immersionsprozess an der Unter- und Oberkante der COL I-Membran jeweils ein Streifen von 0,5 x 6 mm<sup>2</sup> abgeschnitten und verworfen.

Gegenüber reinen COL I-Membranen zeigte sich bei der Immersion von COL I-HA-Membranen in 500 ng/mL VEGF-Lösung eine deutliche Erhöhung der VEGF-Menge in den jeweiligen Segmenten im Bereich von Faktor 4,2 - 8,7. Für sulfatierte GAG, wie etwa Heparin, ist bekannt, dass sie Interaktions-

domänen für VEGF bereitstellen (Ono u. a. 1999; Macri u. a. 2007). Daher wurde vermutet, dass HA ebenfalls diese Eigenschaft besitzt, wie zuvor auch Sugita u. a. (2013) berichteten. Durch die fehlende Sulfatierung zeigt es zwar eine geringere Polarisierung, die für die Wechselwirkungen zwischen GAG und VEGF verantwortlich gemacht wird (Ori u. a. 2008; Zhao u. a. 2012). Jedoch scheinen die Interaktionen für eine vermehrte Anbindung des VEGF auszureichen.

Zur Beurteilung der Linearität des graduellen Konzentrationsverlaufs wurde eine lineare Regression durchgeführt. Da bei reinen COL I-Membranen auf Segment 1 nach Inkubation in 100 ng/mL bzw. 500 ng/mL VEGF-Lösung eine höhere VEGF-Konzentration detektiert wurde als auf Segment 2, wurden diese Datenpunkte bei der linearen Regression nicht berücksichtigt. Der Anstieg  $m$  der Regressionsgeraden nach Immersion reiner COL I-Membranen in 500 ng/mL VEGF war nahezu 5-mal höher als bei 100 ng/mL. Es ist jedoch bei beiden Funktionen eine leichte Verringerung des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  auf unter 0,9 erkennbar. Dagegen zeigte der Anstieg nach Immersion einer COL I-HA-Membran in 500 ng/mL VEGF-Lösung eine Vervierfachung und die Messwerte eine deutlich bessere Anpassung an die lineare Funktion.

Die erzeugten VEGF-Gradienten hatten eine maximale VEGF-Oberflächenkonzentration auf einem Membransegment von 52,1 pg/mm<sup>2</sup> für reine COL I-Membranen und 219,6 pg/mm<sup>2</sup> auf COL I-HA-Membranen. Für VEGF in Lösung ist bekannt, dass bei einer VEGF-Konzentration von 40 - 100 ng/mL alle VEGFR-II an der Membranoberfläche von EC besetzt sind (R. R. Chen u. a. 2007; Shamloo u. a. 2008). Mit Hilfe des Anstiegs der linearen Regression aus Abb. 4.20 kann die Differenz der VEGF-Konzentration über die Membranlänge hinweg bestimmt werden. Auf reinen COL I-Membranen hätte der Gradient demnach eine Konzentrationsänderung von 5,69 pg/mm<sup>2</sup>·mm und auf COL I-HA-Membranen von 23,38 pg/mm<sup>2</sup>·mm. R. R. Chen u. a. (2007) und Shamloo u. a. (2008) erachten in diesem Zusammenhang ein Gradientenprofil von 20 ng/(mL·mm) VEGF als notwendig, um Chemotaxis in einem 3D Gradientensystem auszulösen, bei dem nicht das gesamte VEGF in Kontakt mit Zellen treten kann. Dieser Wert lässt sich jedoch nur schwer mit der notwendigen Konzentration für einen haptotaktischen VEGF-Gradienten vergleichen, wie er in dieser Arbeit erzeugt wurde. Da adhärenente Zellen in ihrer nativen Umgebung jedoch immer einer Kombination aus haptotaktischem und chemotaktischem Gradienten ausgesetzt sind, ist es notwendig, genauere Charakterisierungen artifiziel-ler Gradienten durchzuführen. In der Literatur sind zu wenige Informationen dazu vorhanden.

#### **4.3.5. Analyse der Migration von HUVEC entlang eines VEGF-Gradienten**

Die mit einem VEGF-Gradienten ausgestatteten COL I-basierten Membranen sollten weiterführend einer ersten Bewertung unterzogen werden, inwiefern der Wachstumsfaktorgradient die gezielte Migration von HUVEC in Richtung seiner höchsten Konzentration ermöglichen kann. Dafür wurden reine COL I-Membranen sowie COL I-HA-Membranen verwendet, die mit einem VEGF-Gradienten durch Immersion der Membran in 500 ng/mL VEGF-Lösung ausgestattet wurden. Zum Vergleich dienten gradientenlose COL I-Membranen.

Die Membranen wurden so auf einem Phasenkontrastmikroskop mit Stagetop-Inkubator platziert, dass bei Betrachtung mit der integrierten Kamera die steigende x-Koordinate auf dem Bild dem An-

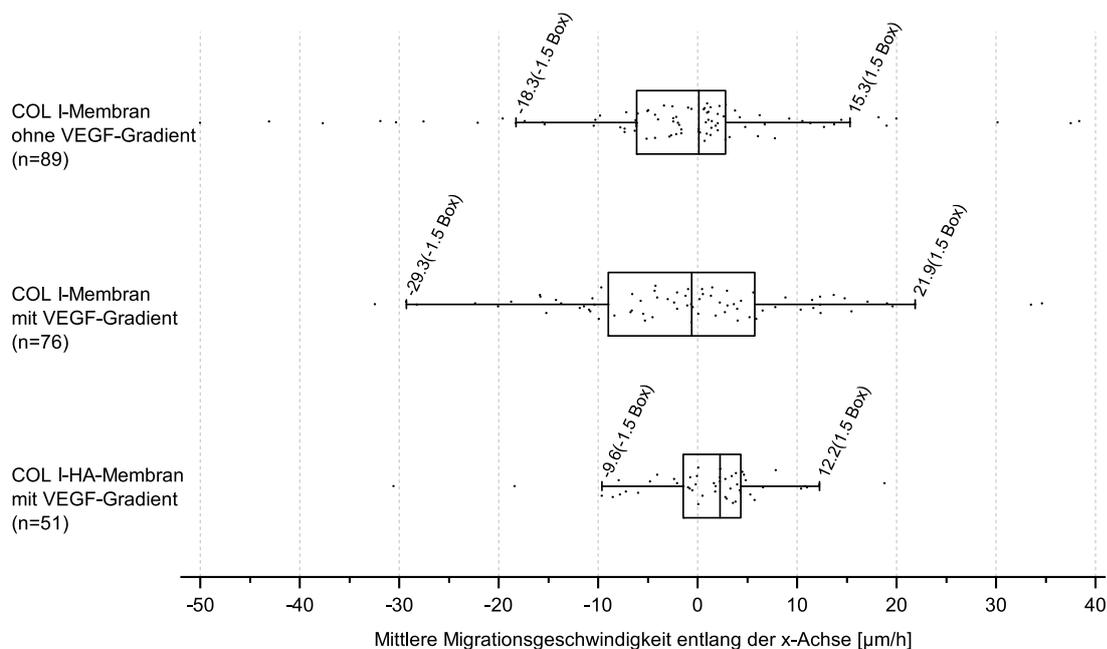


Abbildung 4.21.: Boxplot-Darstellung der mittleren Migrationsgeschwindigkeit von HUVEC entlang der x-Achse auf reinen COL I-Membranen ohne sowie auf COL I- bzw. COL I-HA-Membranen mit VEGF-Gradienten. Der Gradient wurde durch Immersion der Membranen in 500 ng/mL VEGF-Lösung erzeugt. Die mittlere Migrationsgeschwindigkeit wurde aus der Änderung der x-Koordinate jeder analysierten Zelle im Untersuchungszeitraum von max. 20 h ermittelt. Eine positive Migrationsgeschwindigkeit bedeutet eine Bewegung der Zellen in Richtung der höchsten VEGF-Konzentration, eine negative die entgegengesetzte. Jeder Membrantyp wurde in Dreifachbestimmung analysiert. (n = analysierte Zellzahl je Membrantyp)

stieg der VEGF-Konzentration auf den Membranen entsprach. Auf diesen Membranen wurde die Bewegung von HUVEC verfolgt, indem Bildaufnahmen im Abstand von 3 min gemacht wurden. Anschließend wurden von den darauf befindlichen Zellen die x-Koordinaten bestimmt und daraus die mittlere Migrationsgeschwindigkeit entlang der x-Achse ermittelt. Ein positiver Wert zeigt dabei die durchschnittliche Bewegung in Richtung der höchsten VEGF-Konzentration an, ein negativer die entgegengesetzte Bewegung. Die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten sind in Abbildung 4.21 dargestellt. Die Whisker sind so gewählt, dass deren eingefasster Bereich das 1,5-fache des Interquartilsabstandes beinhaltet. Weiterhin wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt.

Sowohl auf reinen COL I-Membranen ohne VEGF-Gradienten mit einem Median von 0,1 µm/h und einem Abstand der Whisker von 33,6 µm/h als auch auf reinen COL I-Membranen mit VEGF-Gradienten mit einem Abstand der Whisker von 51,2 µm/h bei einem Median von -0,6 µm/h konnte eine große Streuung der Migrationsgeschwindigkeiten ermittelt werden. Demnach kann hier nicht von einer Vorzugsrichtung für die Zellmigration gesprochen werden. Ursächlich dafür könnte ein zu geringer Anstieg der VEGF-Konzentration über die Membran hinweg sein. Möglicherweise könnten auch insgesamt zu geringe VEGF-Konzentrationen auf der Oberfläche der Membran, hervorgerufen durch die oben beschriebene Diffusion in das Membraninnere, vorliegen, die kein ausreichend starkes Locksignal hervorrufen.

Die mittleren Migrationsgeschwindigkeiten von HUVEC auf COL I-HA-Membranen mit VEGF-Gradienten könnten auf eine tendenziell vermehrte Bewegung der Zellen in Richtung der höchsten VEGF-Konzentration hindeuten. Dort wurde eine deutliche Verringerung der Boxbreite (Abstand zwischen den Whiskern 21,8  $\mu\text{m}/\text{h}$ ) und eine Erhöhung des Medians auf 2,2  $\mu\text{m}/\text{h}$  beobachtet. Durch die im Vergleich zur reinen COL I-Membran deutlich höhere VEGF-Konzentration im Gesamtprofil des Gradienten könnte das hier als Tendenz der Zellen zur Migration in Richtung der höchsten VEGF-Konzentrationen interpretiert werden. Die durchgeführte ANOVA zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte der mittleren Migrationsgeschwindigkeiten, sodass hier höchstens eine Tendenz zur Migration in Richtung der höchsten VEGF-Konzentration angedeutet wird.

*In vivo* können EC durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeiten von 10 - 20  $\mu\text{m}/\text{h}$  erreichen (Rupp u. a. 2004; Bauer u. a. 2009), die *in vitro* auf bis zu 150  $\mu\text{m}/\text{h}$  erhöht werden können (Sales u. a. 2019). Dieser Unterschied zeigt deutlich, dass die zu einer HUVEC-Migration durch einen VEGF-Gradienten führenden Parameter für den Immersionsprozess in weiteren Untersuchungen noch definiert werden müssen.



## 5. Zusammenfassung

Für die Entwicklung von TE-Scaffolds zur Bereitstellung künstlicher Systeme zur Gewebeversorgung ist es zielführend, Vorgaben aus der nativen ECM hinsichtlich instruktiver Zusammensetzung und Architektur zu nutzen. Die Verwendung von COL I als Scaffold-Material wird dafür als optimal angesehen. Seine technische Bearbeitung ist jedoch anspruchsvoll, da es nach der Rekonstitution eine geringe mechanische Stabilität und ausgeprägte Dimensionsänderungen durch Quellung aufweist. Diese Arbeit hatte daher das Ziel, mechanisch stabile Membranen aus COL I zu erzeugen und als potentielle Träger für zellinstruktive Elemente und Basis für vaskuläre Gefäßnetzwerke zu charakterisieren. Dazu gehörte die Analyse ihrer Fähigkeit zur Inkorporation von FN und HA. Außerdem wurde das Ziel verfolgt, grundlegende Verfahren zur Erzeugung von räumlichen, anisotropen Mikrotopographien und VEGF-Gradienten auf deren Oberfläche zu entwickeln. Die Beeinflussung der Proliferation, Orientierung und Migration der modifizierten Membranen sollte abschließend charakterisiert werden.

Durch Kompression fibrillärer COL I-Hydrogele wurden Membranen mit den Maßen 10 x 10 mm<sup>2</sup>, einer Trockenmasse von 20 mg und einer Membrandicke von etwa 100 µm generiert, auf denen anisotrope Mikrostrukturen erzeugt werden sollten. Für Untersuchungen zur Proliferation von HUVEC und zur VEGF-Gradientenerzeugung wurden wegen der besseren Mikroskopierbarkeit Membranen mit Massen von 1,5-2,0 mg als Beschichtung verwendet.

Die Analyse der Freisetzung inkorporierter HA aus der Membran zeigte einen Verbleib von etwa 1-2 % nach Inkubation in DMEM für 7 Tage. Der Versuch der Verwendung von EDC zur Vernetzung von HA mit COL I in der Membran und damit zur Steigerung der HA-Menge war erfolglos, lieferte jedoch Hinweise darauf, dass dadurch COL I-Moleküle untereinander vernetzt werden. FN wurde nach Inkubation der damit ausgestatteten Membranen in DMEM für 7 Tage zu etwa 90 % wieder freigesetzt. Nur bei niedrigen initialen Anteilen von 5 µg/mg wurde ein Verbleib von etwa 35 % bestimmt.

Eine steigende inkorporierte FN-Masse in den Membranen führte dazu, dass die Proliferationsrate darauf kultivierter HUVEC zunahm. Mit dem höchsten Wert von 50 µg FN pro 1 mg COL I konnte ein Proliferationsverhalten beobachtet werden, das vergleichbar mit dem Wachstum auf einer als klassisches Zellkultursubstrat verwendeten, FN-beschichteten PS-Oberfläche war. Eine steigende HA-Menge in der COL I-Membran führte zur Abnahme der Proliferationsrate von HUVEC. Das bestätigte den für hochmolekulare HA bekannten Effekt auf das Proliferationsverhalten von Zellen. Dagegen ermöglichte die EDC-Behandlung der COL I-HA-Membranen eine Kompensation dieses Effekts.

Anisotrope Mikrostrukturen wurden durch die Entwicklung eines dreistufigen Prozesses mit einem Druckumformverfahren als finalen Schritt auf COL I-Membranen erzeugt. Die Herausforderungen

---

bestanden dabei in der Ermittlung geeigneter, mechanisch stabiler Stempelmaterialien und der Qualität sowie Stabilität der Mikrostrukturen. In der ersten Stufe diente ein Si-Master als mikrostrukturgebendes Templat, von dem die Mikrostrukturen in PDMS übertragen wurden. In einer zweiten Prozessstufe wurden die Mikrostrukturen vom PDMS-Master in mechanisch stabile Thermoplast-Master übertragen. Von den auf deren Eignung hin untersuchten Thermoplasten PS, PC, SAN, POM-C, PE und PP wurde für PS die günstigste Kombination von Prozessparametern und mechanischer Stabilität ermittelt. Bei der Analyse der Stabilität verschiedener Mikrostrukturen mit rechteckigem und dreieckigem Querschnitt auf PS-Mastern gegenüber Druckbelastung bei 950 N wurde festgestellt, dass Mikrostrukturen mit rechteckigem Querschnitt bis zu einem Tiefe-Breite-Verhältnis von 1:1 und Mikrostrukturen mit dreieckigem Querschnitt durchweg stabil waren. Als dritte Prozessstufe wurde ein Druckumformverfahren entwickelt, bei dem die Mikrostrukturen vom PS-Master in die oberflächlich vorgequollene COL I-Membran durch Aufpressen bei 950 N und unter Verwendung einer Druckfeder übertragen wurden. Während des Prozesses erfolgte außerdem die Behandlung der zu mikrostrukturierenden Oberfläche mit 100 mg/mL EDC-Lösung.

Mit diesem dreistufigen Prozess konnten erfolgreich Mikrostrukturen in Form von Gräben auf kompakten und stabilen COL I-Membranen erzeugt werden, die nur geringe Abweichungen von den vorgegebenen Mikrostrukturmaßen mit Breiten von 10-40  $\mu\text{m}$  und Tiefen von 10-20  $\mu\text{m}$  zeigten. Hierbei wurde teilweise beobachtet, dass die Breiten größer und die Abstände kleiner als die Vorgaben waren und dass z.T. die vorgegebenen Strukturiefen nicht erreicht wurden. Das wird auf mechanische Spannungen innerhalb des Fibrillennetzwerks und auf eine inhomogene Kraftverteilung und Membrandicke während der Druckumformung zurückgeführt.

Gegenüber planaren Membranen wurde bei mikrostrukturierten Membranen die Orientierung von HUVEC auf dem Grabenboden in Richtung der Längsachse der Mikrostrukturen bereits bei einer Grabenbreite von 40  $\mu\text{m}$  beobachtet. Mit Verringerung der Grabenbreite auf bis zu 10  $\mu\text{m}$  erhöhte sich der Anteil parallel ausgerichteter HUVEC nochmal deutlich auf über 90 %.

Ein Immersionsverfahren wurde entwickelt, mit dem durch definiertes Eintauchen der COL I-Membran in eine VEGF-Lösung die graduelle Adsorption des Proteins über die Membranoberfläche hinweg gezielt gesteuert werden konnte. Für die Verfahrensentwicklung wurden BSA und HYAL als Modellproteine verwendet. Beide Proteine wurden zur analytischen Charakterisierung mit TAMRA-SE fluoreszenzmarkiert. Für die Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens wurden Beladungs-Zeit-Verläufe aufgenommen, deren Verlauf durch mathematische Anpassung der exponentiellen Gleichung nach dem Box-Lucas-Modell beschrieben wurde. Mit diesen Gleichungen wurde die Steuerung eines Schrittmotors realisiert, der die definierte Immersion der Membranen in die jeweilige Proteinlösung realisierte und dadurch ein linearer Konzentrationsgradient auf der Oberfläche erzeugt wurde. Anfänglich mit BSA und später mit HYAL wurde die Proteinkonzentration in der Immersionslösung so weit abgesenkt, dass final mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HYAL die geeigneten Prozessparameter für die Übertragung des Verfahrens auf VEGF bestimmt werden konnten. Nach der Immersion reiner COL I- und COL I-HA-Membranen (1 mg HA pro 1 mg COL I) in VEGF-Lösungen mit Konzentrationen von 100 ng/mL und 500 ng/mL konnte bestätigt werden, dass das mit Modellproteinen entwickelte Verfahren für die VEGF-Gradientenerzeugung auf den Membranen anwendbar ist. So wurden ansteigende Verläufe

der VEGF-Konzentrationen im Bereich von 3,8-11,8 pg/mm<sup>2</sup> bzw. 12,0-52,1 pg/mm<sup>2</sup> generiert. Die Inkorporation von HA in COL I-Membranen führte bei der Immersion dieser in 500 ng/mL VEGF-Lösung sogar zu einem deutlichen Anstieg des linearen Gradientenprofils auf einen Bereich von 48,0-219,6 ng/mm<sup>2</sup>.

Eine erste Analyse der Fähigkeit der VEGF-Gradienten auf COL I-Membranen zur Steuerung der Migration von darauf adhärent wachsenden HUVEC zeigte zwar noch keine deutliche Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit in Richtung der höchsten VEGF-Konzentration. Jedoch können durch das entwickelte Immersionsverfahren Modifikationen im Gradientenprofil erzeugt werden, die eine Migrationsbeeinflussung möglich machen können.

Wenn durch geeignete Bearbeitungsverfahren die durch das rekonstituierte COL I gegebenen größten Herausforderungen in Form der Quellung in wässriger Umgebung und von mechanischen Spannungen im getrockneten Zustand bewältigt werden, besitzen kompakte, mechanisch stabile Membranen aus COL I das Potential, definiert mit Biomolekülen und anisotropen Mikrostrukturen ausgestattet zu werden. Mit der Bereitstellung einer Oberflächentopographie in Form von Mikrogräben kann nach der Orientierung von EC perspektivisch die Bildung von Vaskularitäten angeregt werden. Werden diese Scaffolds mit anderen bioartifiziellen Materialbausteinen kombiniert, können sie ein Puzzleteil zur Herstellung komplexer biomimetischer Systeme zur Versorgung von (artifiziellen) Geweben mit Nährstoffen sein. Die Modifizierung der Oberfläche durch instruktive biochemische Strukturierungen, wie sie durch VEGF-Gradienten erfolgt ist, ist eine Voraussetzung für die Anpassung und Erweiterung des vaskulären Systems. Da das entwickelte Immersionsverfahren auf den Adsorptionseigenschaften des Wachstumsfaktors an eine Scaffold-Oberfläche basiert, kann es jedoch auch für andere migrationsinduzierende Signalmoleküle in anderen TE-Systemen angewendet werden, die z.B. die Fortbewegung neuronaler Axone steuern.



# Literaturverzeichnis

- Abou Neel, E. A., L. Bozec, J. C. Knowles, O. Syed, V. Mudera, R. Day und J. K. Hyun (2012). “Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient”. In: *Advanced drug delivery reviews*. DOI: 10.1016/j.addr.2012.08.010.
- Abou Neel, E. A., U. Cheema, J. C. Knowles, R. A. Brown und S. N. Nazhat (2006). “Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties”. In: *Soft Matter* 2.11, S. 986. DOI: 10.1039/b609784g.
- Achilli, M., S. Meghezi und D. Mantovani (2012). “On the Viscoelastic Properties of Collagen-Gel-Based Lattices under Cyclic Loading: Applications for Vascular Tissue Engineering”. In: *Macromolecular Materials and Engineering* 297.7, S. 724–734. DOI: 10.1002/mame.201100363.
- Akiyama, H., S. Shidawara, A. Mada, H. Toyoda, T. Toida und T. Imanari (1992). “Chemiluminescence high-performance liquid chromatography for the determination of hyaluronic acid, chondroitin sulphate and dermatan sulphate”. In: *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 579.2, S. 203–207. DOI: 10.1016/0378-4347(92)80383-2.
- Akiyama, S. K. (2013). “Purification of fibronectin”. In: *Current protocols in cell biology* 60, Unit 10.5. DOI: 10.1002/0471143030.cb1005s60.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4. Aufl. Garland Science.
- Alekseeva, T., E. Hadjipanayi, E. A. Abou Neel und R. A. Brown (2012). “Engineering stable topography in dense bio-mimetic 3D collagen scaffolds”. In: *European Cells and Materials* 23, S. 28–40.
- Alfredo Uquillas, J., V. Kishore und O. Akkus (2012). “Genipin crosslinking elevates the strength of electrochemically aligned collagen to the level of tendons”. In: *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 15, S. 176–189. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.06.012.
- Allison, D. D. und K. J. Grande-Allen (2006). “Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool”. In: *Tissue Engineering* 12.8, S. 2131–2140. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2131.
- Alsop, A. T., J. C. Pence, D. W. Weisgerber, B. A. C. Harley und R. C. Bailey (2014). “Photopatterning of vascular endothelial growth factor within collagen-glycosaminoglycan scaffolds can induce a spatially confined response in human umbilical vein endothelial cells”. In: *Acta biomaterialia* 10.11, S. 4715–4722. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.07.002.
- Amiel, G. E., M. Komura, O. Shapira, J. J. Yoo, S. Yazdani, J. Berry, S. Kaushal, J. Bischoff, A. Atala und S. Soker (2006). “Engineering of blood vessels from acellular collagen matrices coated with human endothelial cells”. In: *Tissue Engineering* 12.8, S. 2355–2365. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2355.

- 
- Anderson, D. E. und M. T. Hinds (2011). "Endothelial Cell Micropatterning: Methods, Effects, and Applications". In: *Annals of Biomedical Engineering* 39.9, S. 2329–2345. DOI: 10.1007/s10439-011-0352-z.
- Andersson, A. (2003). "The effects of continuous and discontinuous groove edges on cell shape and alignment". In: *Experimental Cell Research* 288.1, S. 177–188. DOI: 10.1016/S0014-4827(03)00159-9.
- Annor, A. H., M. E. Tang, C. L. Pui, G. C. Ebersole, M. M. Frisella, B. D. Matthews und C. R. Deeken (2012). "Effect of enzymatic degradation on the mechanical properties of biological scaffold materials". In: *Surgical endoscopy* 26.10, S. 2767–2778. DOI: 10.1007/s00464-012-2277-5.
- Ashammakhi, N., S. Ahadian, C. Xu, H. Montazerian, H. Ko, R. Nasiri, N. Barros und A. Khademhossaini (2019). "Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs". In: *Materials Today Bio* 1, S. 100008. DOI: 10.1016/j.mtbio.2019.100008.
- Avery, N. C. und A. J. Bailey (2008). "Restraining cross-links responsible for the mechanical properties of collagen fibres: Natural and artificial". In: *Collagen*. Hrsg. von P. Fratzl. Boston, MA: Springer US, S. 81–110.
- Badylak, S. F. (2007). "The extracellular matrix as a biologic scaffold material". In: *Biomaterials* 28.25, S. 3587–3593.
- Baier, H. und F. Bonhoeffer (1992). "Axon guidance by gradients of a target-derived component". In: *Science* 255.5043, S. 472–475. DOI: 10.1126/science.1734526.
- Bailly, M., L. Yan, G. M. Whitesides, J. S. Condeelis und J. E. Segall (1998). "Regulation of protrusion shape and adhesion to the substratum during chemotactic responses of mammalian carcinoma cells". In: *Experimental Cell Research* 241.2, S. 285–299. DOI: 10.1006/excr.1998.4031.
- Ballester-Beltrán, J., M. J. P. Biggs, M. J. Dalby, M. Salmerón-Sánchez und A. Leal-Egaña (2015). "Sensing the Difference: The Influence of Anisotropic Cues on Cell Behavior". In: *Frontiers in Materials* 2.Suppl. 1, S. 483. DOI: 10.3389/fmats.2015.00039.
- Bannister, D. W. und A. B. Burns (1972a). "An investigation of the content and solubility of muscle collagen in the chick (*Gallus domesticus*)". In: *International Journal of Biochemistry* 3.13, S. 78–88. DOI: 10.1016/0020-711X(72)90029-8.
- (1972b). "Pepsin treatment of avian skin collagen. Effects on solubility, subunit composition and aggregation properties". In: *Biochem. J.* 129.3, S. 677–681.
- Barbosa, I., S. Garcia, V. Barbier-Chassefière, J.-P. Caruelle, I. Martelly und D. Papy-García (2003). "Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies". In: *Glycobiology* 13.9, S. 647–653. DOI: 10.1093/glycob/cwg082.
- Barnes, C. P., C. W. Pemble, D. D. Brand, D. G. Simpson und G. L. Bowlin (2007). "Cross-linking electropun type II collagen tissue engineering scaffolds with carbodiimide in ethanol". In: *Tissue Engineering* 13.7, S. 1593–1605. DOI: 10.1089/ten.2006.0292.
- Barocas, V. H. und R. T. Tranquillo (1997). "An anisotropic biphasic theory of tissue-equivalent mechanics: the interplay among cell traction, fibrillar network deformation, fibril alignment, and cell

- contact guidance". In: *Journal of biomechanical engineering* 119.2, S. 137–145. DOI: 10.1115/1.2796072.
- Bauer, A. L., T. L. Jackson und Y. Jiang (2009). "Topography of extracellular matrix mediates vascular morphogenesis and migration speeds in angiogenesis". In: *PLoS computational biology* 5.7, e1000445. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000445.
- Ber, S., G. Torun Köse und V. Hasirci (2005). "Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study". In: *Biomaterials* 26.14, S. 1977–1986. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.007.
- Berger, S., J. Kiebig, E. Pötschke und K. Salchert (2018). "Immersion technique for the preparation of protein gradients on Collagen Type I membranes to control cell migration". In: *Journal of Cellular Biotechnology* 4.1-2, S. 43–49. DOI: 10.3233/JCB-180012.
- Berglund, J. D., R. M. Nerem und A. Sambanis (2004). "Incorporation of intact elastin scaffolds in tissue-engineered collagen-based vascular grafts". In: *Tissue Engineering* 10.9-10, S. 1526–1535. DOI: 10.1089/ten.2004.10.1526.
- Bettinger, C. J., R. Langer und J. T. Borenstein (2009). "Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function". In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48.30, S. 5406–5415. DOI: 10.1002/anie.200805179.
- Bharadwaz, A. und Ambalagodage C. Jayasuriya (2020). "Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration". In: *Materials Science and Engineering: C* 110, S. 110698. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110698.
- Bian, W., B. Liau, N. Badie und N. Bursac (2009). "Mesoscopic hydrogel molding to control the 3D geometry of bioartificial muscle tissues". In: *Nature Protocols* 4.10, S. 1522–1534. DOI: 10.1038/nprot.2009.155.
- Bitar, M., V. Salih, R. A. Brown und S. N. Nazhat (2007). "Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering". In: *0957-4530* 18.2, S. 237–244. DOI: 10.1007/s10856-006-0685-1.
- Boas, N. F. (1953). "Method for the determination of hexosamines in tissues". In: *The Journal of biological chemistry* 204.2, S. 553–563.
- Boland, E. D., J. A. Matthews, K. J. Pawlowski, D. G. Simpson, G. E. Wnek und G. L. Bowlin (2004). "Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering". In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, S. 1422–1432. DOI: 10.2741/1313.
- Borges, E., Y. Jan und E. Ruoslahti (2000). "Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain". In: *The Journal of biological chemistry* 275.51, S. 39867–39873. DOI: 10.1074/jbc.M007040200.
- Borschel, G. H., R. G. Dennis und W. M. Kuzon (2004). "Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold". In: *Plastic and reconstructive surgery* 113.2, 595–602, discussion 603–4. DOI: 10.1097/01.PRS.0000101064.62289.2F.
- Bou-Akl, T., R. Banglmaier, R. Miller und P. VandeVord (2013). "Effect of crosslinking on the mechanical properties of mineralized and non-mineralized collagen fibers". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 101.9, S. 2507–2514. DOI: 10.1002/jbm.a.34549.

- 
- Box, G. E. und H. L. Lucas (1959). "Design of Experiments in Non-linear Situations". In: *Biometrika* 46.1-2, S. 77–90. DOI: 10.1093/biomet/46.1-2.77.
- Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes". In: *The Journal of experimental medicine* 115.3, S. 453–466. DOI: 10.1084/jem.115.3.453.
- Braziulis, E., M. Diezi, T. Biedermann, L. Pontiggia, M. Schmucki, F. Hartmann-Fritsch, J. Luginbühl, C. Schiestl, M. Meuli und E. Reichmann (2012). "Modified plastic compression of collagen hydrogels provides an ideal matrix for clinically applicable skin substitutes". In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 18.6, S. 464–474. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0561.
- Brew, S. A. und K. C. Ingram (1994). "Purification of human plasma fibronectin". In: *Journal of Tissue Culture Methods* 16.3-4, S. 197–199. DOI: 10.1007/BF01540650.
- Brown, R. A., M. Wiseman, C.-B. Chuo, U. Cheema und S. N. Nazhat (2005). "Ultraprapid Engineering of Biomimetic Materials and Tissues: Fabrication of Nano- and Microstructures by Plastic Compression". In: *Adv. Funct. Mater.* 15.11, S. 1762–1770.
- Browne, S., G. Fontana, B. J. Rodriguez und A. Pandit (2012). "A protective extracellular matrix-based gene delivery reservoir fabricated by electrostatic charge manipulation". In: *Molecular pharmaceutics* 9.11, S. 3099–3106. DOI: 10.1021/mp300231d.
- Busby, G. A., M. H. Grant, S. P. Mackay und P. E. Riches (2013). "Confined compression of collagen hydrogels". In: *Journal of Biomechanics* 46.4, S. 837–840. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2012.11.048.
- Buskermolen, A. B. C., H. Suresh, S. S. Shishvan, A. Vigliotti, A. DeSimone, N. A. Kurniawan, C. V. C. Bouten und V. S. Deshpande (2019). "Entropic Forces Drive Cellular Contact Guidance". In: *Biophysical journal* 116.10, S. 1994–2008. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.04.003.
- Butler, M. J. und M. V. Sefton (2012). "Cotransplantation of adipose-derived mesenchymal stromal cells and endothelial cells in a modular construct drives vascularization in SCID/bg mice". In: *Tissue engineering. Part A* 18.15-16, S. 1628–1641. DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0467.
- Buxton, P. G., M. Bitar, K. Gellynck, M. Parkar, R. A. Brown, A. M. Young, J. C. Knowles und S. N. Nazhat (2008). "Dense collagen matrix accelerates osteogenic differentiation and rescues the apoptotic response to MMP inhibition". In: *Bone* 43.2, S. 377–385. DOI: 10.1016/j.bone.2008.03.028.
- Byambaa, B., N. Annabi, K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, W. Jia, M. Kazemzadeh-Narbat, S. R. Shin, A. Tamayol und A. Khademhosseini (2017). "Bioprinted Osteogenic and Vasculogenic Patterns for Engineering 3D Bone Tissue". In: *Advanced healthcare materials* 6.16. DOI: 10.1002/adhm.201700015.
- Byrne, E. M., E. Farrell, L. A. McMahon, M. G. Haugh, F. J. O'Brien, V. A. Campbell, P. J. Prendergast und B. C. O'Connell (2008). "Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen-glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation". In: *0957-4530* 19.11, S. 3455–3463. DOI: 10.1007/s10856-008-3506-2.
- Byzova, T. V., C. K. Goldman, N. Pampori, K. A. Thomas, A. Bett, S. J. Shattil und E. F. Plow (2000). "A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins". In: *Molecular cell* 6.4, S. 851–860.

- Calabrese, G., R. Giuffrida, C. Fabbi, E. Figallo, D. Lo Furno, R. Gulino, C. Colarossi, F. Fullone, R. Giuffrida, R. Parenti, L. Memeo und S. Forte (2016). "Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro". In: *PloS one* 11.3, e0151181. DOI: 10.1371/journal.pone.0151181.
- Canty, E. G. und K. E. Kadler (2005). "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis". In: *Journal of Cell Science* 118.Pt 7, S. 1341–1353. DOI: 10.1242/jcs.01731.
- Carsons, S. E., Hrsg. (1989). *Fibronectin in health and disease*. CRC revivals. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Carter, S. B. (1965). "Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion". In: *Nature* 208.5016, S. 1183–1187. DOI: 10.1038/2081183a0.
- Ceballos, D., X. Navarro, N. Dubey, G. Wendelschafer-Crabb, W. R. Kennedy und R. T. Tranquillo (1999). "Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration". In: *Experimental Neurology* 158.2, S. 290–300. DOI: 10.1006/exnr.1999.7111.
- Cha, C., F. Piraino und A. Khademhosseini (2015). "Microfabrication Technology in Tissue Engineering". In: *Tissue engineering*. Hrsg. von C. A. van Blitterswijk und J. de Boer. Amsterdam, Boston und Heidelberg: Elsevier Academic Press, S. 283–310. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00009-2.
- Chan, B. K., C. C. Wippich, C.-J. Wu, P. M. Sivasankar und G. Schmidt (2012). "Robust and semi-interpenetrating hydrogels from poly(ethylene glycol) and collagen for elastomeric tissue scaffolds". In: *Macromolecular bioscience* 12.11, S. 1490–1501. DOI: 10.1002/mabi.201200234.
- Chan, E. C., S.-M. Kuo, A. M. Kong, W. A. Morrison, G. J. Dusting, G. M. Mitchell, S. Y. Lim und G.-S. Liu (2016). "Three Dimensional Collagen Scaffold Promotes Intrinsic Vascularisation for Tissue Engineering Applications". In: *PloS one* 11.2, e0149799. DOI: 10.1371/journal.pone.0149799.
- Chan, O. C. M., K.-F. So und B. P. Chan (2008). "Fabrication of nano-fibrous collagen microspheres for protein delivery and effects of photochemical crosslinking on release kinetics". In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 129.2, S. 135–143. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.04.011.
- Chandrakasan, G., D. A. Torchia und K. A. Piez (1976). "Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution". In: *Journal of Biological Chemistry* 251.19, S. 6062–6067.
- Charest, J. L., L. E. Bryant, A. J. Garcia und W. P. King (2004). "Hot embossing for micropatterned cell substrates". In: *Biomaterials* 25.19, S. 4767–4775.
- Charulatha, V. (2003). "Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes: Biomaterials, 24(5), 759-767". In: *Biomaterials* 24.5, S. 759–767. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00412-X.
- Cheema, U., Z. Rong, O. Kirresh, A. J. MacRobert, P. Vadgama und R. A. Brown (2012). "Oxygen diffusion through collagen scaffolds at defined densities: implications for cell survival in tissue models". In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 6.1, S. 77–84. DOI: 10.1002/term.402.
- Chen, C. S., M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides und D. E. Ingber (1997). "Geometric control of cell life and death". In: *Science* 276.5317, S. 1425–1428. DOI: 10.1126/science.276.5317.1425.
- Chen, D. X. B. (2019). *Extrusion Bioprinting of Scaffolds for Tissue Engineering Applications*. Cham: Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-030-03460-3.

- 
- Chen, D. W., Y.-H. Hsu, J.-Y. Liao, S.-J. Liu, J.-K. Chen und S. W.-N. Ueng (2012). "Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes". In: *International Journal of Pharmaceutics* 430.1-2, S. 335–341. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.010.
- Chen, G. und N. Kawazoe (2018). "Porous Scaffolds for Regeneration of Cartilage, Bone and Osteochondral Tissue". In: *Advances in experimental medicine and biology* 1058, S. 171–191. DOI: 10.1007/978-3-319-76711-6{\textunderscore}8.
- Chen, L., C. Zhu, D. Fan, B. Liu, X. Ma, Z. Duan und Y. Zhou (2011). "A human-like collagen/chitosan electrospun nanofibrous scaffold from aqueous solution: electrospun mechanism and biocompatibility". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 99.3, S. 395–409. DOI: 10.1002/jbm.a.33202.
- Chen, R. R., E. A. Silva, W. W. Yuen, A. A. Brock, C. Fischbach, A. S. Lin, R. E. Guldberg und D. J. Mooney (2007). "Integrated approach to designing growth factor delivery systems". In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21.14, S. 3896–3903. DOI: 10.1096/fj.06-7873com.
- Chen, S., N. Kawazoe und G. Chen (2017). "Biomimetic Assembly of Vascular Endothelial Cells and Muscle Cells in Microgrooved Collagen Porous Scaffolds". In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 23.6, S. 367–376. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0088.
- Chen, S., T. Nakamoto, N. Kawazoe und G. Chen (2015). "Engineering multi-layered skeletal muscle tissue by using 3D microgrooved collagen scaffolds". In: *Biomaterials* 73, S. 23–31. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.09.010.
- Chen, W. Y. und G. Abatangelo (1999). "Functions of hyaluronan in wound repair". In: *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 7.2, S. 79–89. DOI: 10.1046/j.1524-475x.1999.00079.x.
- Chen, Y.-C., M. Chen, E. A. Gaffney und C. P. Brown (2017). "Effect of crosslinking in cartilage-like collagen microstructures". In: *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 66, S. 138–143. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.10.006.
- Chen, Z. G., P. W. Wang, B. Wei, X. M. Mo und F. Z. Cui (2010). "Electrospun collagen-chitosan nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell". In: *Acta biomaterialia* 6.2, S. 372–382. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.07.024.
- Cheng, X., U. A. Gurkan, C. J. Dehen, M. P. Tate, H. W. Hillhouse, G. J. Simpson und O. Akkus (2008). "An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles". In: *Biomaterials* 29.22, S. 3278–3288. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.028.
- Choi, C. K., M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L. A. Whitmore, A. Mogilner und A. R. Horwitz (2008). "Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner". In: *Nature Cell Biology* 10.9, S. 1039–1050. DOI: 10.1038/ncb1763.
- Chrobak, K. M., D. R. Potter und J. Tien (2006). "Formation of perfused, functional microvascular tubes in vitro". In: *Microvascular research* 71.3, S. 185–196. DOI: 10.1016/j.mvr.2006.02.005.

- Chrzanowska-Wodnicka, M. und K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions". In: *The Journal of cell biology* 133.6, S. 1403–1415. DOI: 10.1083/jcb.133.6.1403.
- Chun, L. E., T. J. Koob und D. R. Eyre (1988). "Quantitation of hyaluronic acid in tissues by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography of oligosaccharide cleavage products". In: *Analytical Biochemistry* 171.1, S. 197–206. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90142-X.
- Chung, S. und M. W. King (2011). "Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds". In: *BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY* 58.6, S. 423–438. DOI: 10.1002/bab.60.
- Chung, S., R. Sudo, P. J. Mack, C.-R. Wan, V. Vickerman und R. D. Kamm (2009). "Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform". In: *Lab on a Chip* 9.2, S. 269–275. DOI: 10.1039/b807585a.
- Cory, G. O. C. und A. J. Ridley (2002). "Cell motility: braking WAVES". In: *Nature* 418.6899, S. 732–733. DOI: 10.1038/418732a.
- Craighead, H., C. James und A. Turner (2001). "Chemical and topographical patterning for directed cell attachment". In: *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 5.2-3, S. 177–184. DOI: 10.1016/S1359-0286(01)00005-5.
- Cummings, C. L., D. Gawlitta, R. M. Nerem und J. P. Stegemann (2004). "Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures". In: *Biomaterials* 25.17, S. 3699–3706. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.073.
- Cunniffe, G. M., G. R. Dickson, S. Partap, K. T. Stanton und F. J. O'Brien (2010). "Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering". In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 21.8, S. 2293–2298. DOI: 10.1007/s10856-009-3964-1.
- Curtis, A. S. und P. Clark (1990). "The effects of topographic and mechanical properties on cell behaviour". In: *Crit Rev Biocompatibility* 5, S. 343–362.
- Czirok, A. (2013). "Endothelial cell motility, coordination and pattern formation during vasculogenesis". In: *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 5.5, S. 587–602. DOI: 10.1002/wsbm.1233.
- Davison, N. L., F. Barrère-de Groot und D. W. Grijpma (2015). "Degradation of Biomaterials". In: *Tissue engineering*. Hrsg. von C. A. van Blitterswijk und J. de Boer. Amsterdam, Boston und Heidelberg: Elsevier Academic Press, S. 177–215. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00006-7.
- Day, A. J. und C. A. de La Motte (2005). "Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?" In: *Trends in immunology* 26.12, S. 637–643. DOI: 10.1016/j.it.2005.09.009.
- Dehghani, S., R. Nosrati, M. Yousefi, A. Nezami, F. Soltani, S. M. Taghdisi, K. Abnous, M. Alibolandi und M. Ramezani (2018). "Aptamer-based biosensors and nanosensors for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF): A review". In: *Biosensors & bioelectronics* 110, S. 23–37. DOI: 10.1016/j.bios.2018.03.037.
- Deister, C., S. Aljabari und C. E. Schmidt (2007). "Effects of collagen 1, fibronectin, laminin and hyaluronic acid concentration in multi-component gels on neurite extension". In: *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 18.8, S. 983–997. DOI: 10.1163/156856207781494377.

- Delgado, L. M., Y. Bayon, A. Pandit und D. I. Zeugolis (2015). "To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices". In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 21.3, S. 298–313. DOI: 10.1089/ten.TEB.2014.0290.
- Delgado, L. M., A. Pandit und D. I. Zeugolis (2014). "Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties". In: *Expert review of medical devices* 11.3, S. 305–314. DOI: 10.1586/17434440.2014.900436.
- Desai, T. A. (2000). "Micro- and nanoscale structures for tissue engineering constructs". In: *Medical Engineering & Physics* 22.9, S. 595–606.
- Di Lullo, G. A., S. M. Sweeney, J. Korkko, L. Ala-Kokko und J. D. San Antonio (2002). "Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen". In: *The Journal of biological chemistry* 277.6, S. 4223–4231. DOI: 10.1074/jbc.M110709200.
- Discher, D. E., P. Janmey und Y.-I. Wang (2005). "Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate". In: *Science (New York, N.Y.)* 310.5751, S. 1139–1143. DOI: 10.1126/science.1116995.
- Domininghaus, H., P. Elsner, P. Eyerer und T. Hirth (2012). *Kunststoffe*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-16173-5.
- Dong, B., O. Arnoult, M. E. Smith und G. E. Wnek (2009). "Electrospinning of Collagen Nanofiber Scaffolds from Benign Solvents". In: *Macromolecular Rapid Communications* 30.7, S. 539–542. DOI: 10.1002/marc.200800634.
- DSO (2020). *Jahresbericht 2019: Organspende und Transplantation in Deutschland*. Frankfurt am Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation.
- Dunn, G. A. und J. P. Heath (1976). "A new hypothesis of contact guidance in tissue cells". In: *Experimental Cell Research* 101.1, S. 1–14. DOI: 10.1016/0014-4827(76)90405-5.
- Dzamba, B. J., H. Bultmann, S. K. Akiyama und D. M. Peters (1994). "Substrate-specific binding of the amino terminus of fibronectin to an integrin complex in focal adhesions". In: *The Journal of biological chemistry* 269.30, S. 19646–19652.
- Elson, L. A. und W. T. Morgan (1933). "A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine". In: *The Biochemical journal* 27.6, S. 1824–1828. DOI: 10.1042/bj0271824.
- Eng, G., B. W. Lee, H. Parsa, C. D. Chin, J. Schneider, G. Linkov, S. K. Sia und G. Vunjak-Novakovic (2013). "Assembly of complex cell microenvironments using geometrically docked hydrogel shapes". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.12, S. 4551–4556. DOI: 10.1073/pnas.1300569110.
- Engelhardt, E.-M., E. Stegberg, R. A. Brown, J. A. Hubbell, F. M. Wurm, M. Adam und P. Frey (2010). "Compressed collagen gel: a novel scaffold for human bladder cells". In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 4.2, S. 123–130. DOI: 10.1002/term.222.
- Epstein, E. H. (1974). "[alpha1(III)]3 Human Skin Collagen : RELEASE BY PEPSIN DIGESTION AND PREPONDERANCE IN FETAL LIFE". In: *Journal of Biological Chemistry* 249.10, S. 3225–3231.
- Erat, M. C., U. Schwarz-Linek, A. R. Pickford, R. W. Farndale, I. D. Campbell und I. Vakonakis (2010). "Implications for collagen binding from the crystallographic structure of fibronectin 6FnI1-2FnII7FnI". In: *The Journal of biological chemistry* 285.44, S. 33764–33770. DOI: 10.1074/jbc.M110.139394.

- Everaerts, F., M. Torrianni, M. Hendriks und J. Feijen (2008). "Biomechanical properties of carbodiimide crosslinked collagen: influence of the formation of ester crosslinks". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 85.2, S. 547–555. DOI: 10.1002/jbm.a.31524.
- Falconnet, D., G. Csucs, H. M. Grandin und M. Textor (2006). "Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays". In: *Biomaterials* 27.16, S. 3044–3063. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.12.024.
- Farndale, R. W., D. J. Buttle und A. BARRETT (1986). "Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 883.2, S. 173–177. DOI: 10.1016/0304-4165(86)90306-5.
- Ferrara, N. und T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor". In: *Endocrine reviews* 18.1, S. 4–25. DOI: 10.1210/edrv.18.1.0287.
- Fischer, R. L., M. G. McCoy und S. A. Grant (2012). "Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes". In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 23.7, S. 1645–1654. DOI: 10.1007/s10856-012-4641-3.
- (2012). "Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes". In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23.7, S. 1645–1654.
- Fournier, E. (2001). "Colorimetric Quantification of Carbohydrates". In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 00.1, E1.1.1–E1.1.8. DOI: 10.1002/0471142913.fae0101s00.
- Franz, S., F. Allenstein, J. Kajahn, I. Forstreuter, V. Hintze, S. Möller und J. C. Simon (2013). "Artificial extracellular matrices composed of collagen I and high-sulfated hyaluronan promote phenotypic and functional modulation of human pro-inflammatory M1 macrophages". In: *Acta biomaterialia* 9.3, S. 5621–5629. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.11.016.
- Fricke, R., P. D. Zentis, L. T. Rajappa, B. Hofmann, M. Banzet, A. Offenhäusser und S. H. Meffert (2011). "Axon guidance of rat cortical neurons by microcontact printed gradients". In: *Biomaterials* 32.8, S. 2070–2076. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.11.036.
- Fu, K., D. W. Pack, A. M. Klibanov und R. Langer (2000). "Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres". In: *Pharmaceutical research* 17.1, S. 100–106. DOI: 10.1023/a:1007582911958.
- Fujii, T. und K. Kühn (1975). "Isolation and characterization of pepsin-treated type III collagen from calf skin". In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 356.11, S. 1793–1801. DOI: 10.1515/bchm2.1975.356.2.1793.
- Fujita, S., M. Ohshima und H. Iwata (2009). "Time-lapse observation of cell alignment on nanogrooved patterns". In: *Journal of the Royal Society, Interface* 6 Suppl 3, S269–77. DOI: 10.1098/rsif.2008.0428.focus.
- Fuller, K., A. Pandit und D. I. Zeugolis (2014). "The Multifaceted Potential of Electro-spinning in Regenerative Medicine". In: *Pharmaceutical Nanotechnology* 2.1, S. 23–34. DOI: 10.2174/221173850266\6140328223829.
- Garcia-Arcos, J. M., R. Chabrier, M. Deygas, G. Nader, L. Barbier, P. J. Sáez, A. Mathur, P. Vargas und M. Piel (2019). "Reconstitution of cell migration at a glance". In: *Journal of Cell Science* 132.4. DOI: 10.1242/jcs.225565.

- 
- Garrido-Urbani, S., P. F. Bradfield, B. P.-L. Lee und B. A. Imhof (2008). "Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration". In: *Biochemical Society transactions* 36.Pt 2, S. 203–211. DOI: 10.1042/BST0360203.
- Gasiorowski, J. Z., C. J. Murphy und P. F. Nealey (2013). "Biophysical cues and cell behavior: the big impact of little things". In: *Annual review of biomedical engineering* 15, S. 155–176. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150021.
- Geiger, B., J. P. Spatz und A. D. Bershadsky (2009). "Environmental sensing through focal adhesions". In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10.1, S. 21–33. DOI: 10.1038/nrm2593.
- Gelse, K., E. Pöschl und T. Aigner (2003). "Collagens - structure, function, and biosynthesis". In: *Adv. Drug Delivery Rev.* 55.12, S. 1531–1546. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002.
- Genasetti, A., D. Vigetti, M. Viola, E. Karousou, P. Moretto, M. Rizzi, B. Bartolini, M. Clerici, F. Pallotti, G. de Luca und A. Passi (2008). "Hyaluronan and human endothelial cell behavior". In: *Connective Tissue Research* 49.3, S. 120–123. DOI: 10.1080/03008200802148462.
- Gentleman, E., A. N. Lay, D. A. Dickerson, E. A. Nauman, G. A. Livesay und K. C. Dee (2003). "Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering". In: *Biomaterials* 24.21, S. 3805–3813. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00206-0.
- Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima und C. Betsholtz (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia". In: *The Journal of cell biology* 161.6, S. 1163–1177. DOI: 10.1083/jcb.200302047.
- Ghezzi, C. E., N. Muja, B. Marelli und S. N. Nazhat (2011). "Real time responses of fibroblasts to plastically compressed fibrillar collagen hydrogels". In: *Biomaterials* 32.21, S. 4761–4772. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.043.
- Giancotti, F. G. (2000). "Complexity and specificity of integrin signalling". In: *Nature Cell Biology* 2.1, E13–4. DOI: 10.1038/71397.
- Giannitelli, S. M., D. Accoto, M. Trombetta und A. Rainer (2014). "Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering". In: *Acta biomaterialia* 10.2, S. 580–594. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.10.024.
- Girish, K. S. und K. Kemparaju (2007). "The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview". In: *Life sciences* 80.21, S. 1921–1943. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.02.037.
- Goerges, A. L. und M. A. Nugent (2004). "pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release". In: *The Journal of biological chemistry* 279.3, S. 2307–2315. DOI: 10.1074/jbc.M308482200.
- Golden, A. P. und J. Tien (2007). "Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element". In: *Lab on a Chip* 7.6, S. 720–725. DOI: 10.1039/b618409j.
- Grandoch, M., P. L. Bollyky und J. W. Fischer (2018). "Hyaluronan: A Master Switch Between Vascular Homeostasis and Inflammation". In: *Circulation research* 122.10, S. 1341–1343. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312522.

- Grøndahl, F., H. Tveit, L. K. Akslen-Hoel und K. Prydz (2011). "Easy HPLC-based separation and quantitation of chondroitin sulphate and hyaluronan disaccharides after chondroitinase ABC treatment". In: *Carbohydrate research* 346.1, S. 50–57. DOI: 10.1016/j.carres.2010.10.025.
- Grover, C. N., R. E. Cameron und S. M. Best (2012). "Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering". In: *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 10, S. 62–74. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.02.028.
- Grunstein, J., W. G. Roberts, O. Mathieu-Costello, D. Hanahan und R. S. Johnson (1999). "Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function". In: *Cancer research* 59.7, S. 1592–1598.
- Gu, L., Tiantian Shan, Yu-xuan Ma, Franklin R. Tay und Lina Niu (2019). "Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen". In: *Trends in biotechnology* 37.5, S. 464–491. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.10.007.
- Guex, A. G., D. Hegemann, M. N. Giraud, H. T. Tevaearai, A. M. Popa, R. M. Rossi und G. Fortunato (2014). "Covalent immobilisation of VEGF on plasma-coated electrospun scaffolds for tissue engineering applications". In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 123, S. 724–733. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.10.016.
- Hadjipanayi, E., R. A. Brown und V. Mudera (2009). "Interface integration of layered collagen scaffolds with defined matrix stiffness: implications for sheet-based tissue engineering". In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 3.3, S. 230–241. DOI: 10.1002/term.157.
- Hadjipanayi, E., V. Mudera und R. A. Brown (2009a). "Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness". In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 3.2, S. 77–84. DOI: 10.1002/term.136.
- Hadjipanayi, E., V. Mudera und R. A. Brown (2009b). "Guiding cell migration in 3D: a collagen matrix with graded directional stiffness". In: *Cell Motil. Cytoskeleton* 66.3, S. 121–128. DOI: 10.1002/cm.20331.
- Hagen, M. W. und M. T. Hinds (2019). "Static spatial growth restriction micropatterning of endothelial colony forming cells influences their morphology and gene expression". In: *PloS one* 14.6, e0218197. DOI: 10.1371/journal.pone.0218197.
- Hauff, K., C. Zambarda, M. Dietrich, M. Halbig, A. L. Grab, R. Medda und E. A. Cavalcanti-Adam (2015). "Matrix-Immobilized BMP-2 on Microcontact Printed Fibronectin as an in vitro Tool to Study BMP-Mediated Signaling and Cell Migration". In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3, S. 62. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00062.
- Haugland, R. P. (2005). *The handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies*. 10. ed. Carlsbad, California: Invitrogen Corp.
- Hayase, S., Y. Oda, S. Honda und K. Kakehi (1997). "High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid: determination of its amount and molecular mass". In: *Journal of Chromatography A* 768.2, S. 295–305. DOI: 10.1016/S0021-9673(96)01095-3.

- 
- He, Q., Y. Zhao, B. Chen, Z. Xiao, J. Zhang, L. Chen, W. Chen, F. Deng und J. Dai (2011). "Improved cellularization and angiogenesis using collagen scaffolds chemically conjugated with vascular endothelial growth factor". In: *Acta biomaterialia* 7.3, S. 1084–1093.
- He, Y. J., D. A. Young, M. Mededovic, K. Li, C. Li, K. Tichauer, D. Venerus und G. Papavasiliou (2018). "Protease-Sensitive Hydrogel Biomaterials with Tunable Modulus and Adhesion Ligand Gradients for 3D Vascular Sprouting". In: *Biomacromolecules* 19.11, S. 4168–4181. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00519.
- Helary, C., S. Browne, A. Mathew, W. Wang und A. Pandit (2012). "Transfection of macrophages by collagen hollow spheres loaded with polyplexes: a step towards modulating inflammation". In: *Acta biomaterialia* 8.12, S. 4208–4214. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.06.017.
- Heldin, P. (2003). "Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation". In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 36.8, S. 967–973. DOI: 10.1590/s0100-879x2003000800002.
- Helm, C.-L. E., M. E. Fleury, A. H. Zisch, F. Boschetti und M. A. Swartz (2005). "Synergy between interstitial flow and VEGF directs capillary morphogenesis in vitro through a gradient amplification mechanism". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.44, S. 15779–15784. DOI: 10.1073/pnas.0503681102.
- Henkel, J. und D. W. Hutmacher (2013). "Design and fabrication of scaffold-based tissue engineering". In: *BioNanoMaterials* 14.3-4. DOI: 10.1515/bnm-2013-0021.
- Herrmann, M., M. W. Laschke, M. Alini, A. Scherberich und S. Verrier (2015). "Vascularization, Survival, and Functionality of Tissue-Engineered Constructs". In: *Tissue engineering*. Hrsg. von C. A. van Blitterswijk und J. de Boer. Amsterdam, Boston und Heidelberg: Elsevier Academic Press, S. 471–496. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00014-6.
- Hocking, D. C., J. Sottile und P. J. McKeown-Longo (1998). "Activation of distinct alpha5beta1-mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains". In: *The Journal of cell biology* 141.1, S. 241–253. DOI: 10.1083/jcb.141.1.241.
- Hoeben, A., B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. van Oosterom und E. A. de Bruijn (2004). "Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis". In: *Pharmacological Reviews* 56.4, S. 549–580. DOI: 10.1124/pr.56.4.3.
- Hoffman-Kim, D., J. A. Mitchel und R. V. Bellamkonda (2010). "Topography, cell response, and nerve regeneration". In: *Annual review of biomedical engineering* 12, S. 203–231. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105351.
- Hsu, S., R. Thakar, D. Liepmann und S. Li (2005). "Effects of shear stress on endothelial cell haptotaxis on micropatterned surfaces". In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337.1, S. 401–409. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.08.272.
- Hu, K., H. Shi, J. Zhu, D. Deng, G. Zhou, W. Zhang, Y. Cao und W. Liu (2010). "Compressed collagen gel as the scaffold for skin engineering". In: *Biomedical microdevices* 12.4, S. 627–635. DOI: 10.1007/s10544-010-9415-4.
- Humphries, J. D., A. Byron und M. J. Humphries (2006). "Integrin ligands at a glance". In: *Journal of Cell Science* 119.19, S. 3901–3903. DOI: 10.1242/jcs.03098.

- Hussein, K. H., Kyung-Mee Park, Lina Yu, Su-Hyeon Song, Heung-Myong Woo und Ho-Hyun Kwak (2020). "Vascular reconstruction: A major challenge in developing a functional whole solid organ graft from decellularized organs". In: *Acta biomaterialia* 103, S. 68–80. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.12.029.
- Hutmacher, D. W., T. B. Woodfield und P. D. Dalton (2015). "Scaffold Design and Fabrication". In: *Tissue engineering*. Hrsg. von C. A. van Blitterswijk und J. de Boer. Amsterdam, Boston und Heidelberg: Elsevier Academic Press, S. 311–346. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00010-9.
- Hynes, R. O. und A. Rich (1990). *Fibronectins*. N. New York: Springer New York.
- Iivanainen, E., V.-M. Kähäri, J. Heino und K. Elenius (2003). "Endothelial cell-matrix interactions". In: *Microscopy research and technique* 60.1, S. 13–22. DOI: 10.1002/jemt.10238.
- Ingber, D. E. (2003). "Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks". In: *Journal of Cell Science* 116.Pt 8, S. 1397–1408. DOI: 10.1242/jcs.00360.
- Ishimaru, J. I., N. Ogi, S. Mizuno und A. N. Goss (2001). "Quantitation of chondroitin-sulfates, disaccharides and hyaluronan in normal, early and advanced osteoarthritic sheep temporomandibular joints". In: *Osteoarthritis and cartilage* 9.4, S. 365–370. DOI: 10.1053/joca.2000.0397.
- Ishita Matai, Gurvinder Kaur, Amir Seyedsalehi, Aneesah McClinton und Cato T. Laurencin (2020). "Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering". In: *Biomaterials* 226, S. 119536. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119536.
- Ito, Y. (2019). "Growth Factor Engineering for Biomaterials". In: *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5.11, S. 5597–5609. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.8b01649.
- Janakiraman, V., B. L. Kienitz und H. Baskaran (2007). "Lithography Technique for Topographical Micropatterning of Collagen-Glycosaminoglycan Membranes for Tissue Engineering Applications". In: *J Med Device* 1.3, S. 233–237. DOI: 10.1115/1.2775937.
- Janson, I. A. und A. J. Putnam (2015). "Extracellular matrix elasticity and topography: material-based cues that affect cell function via conserved mechanisms". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 103.3, S. 1246–1258. DOI: 10.1002/jbm.a.35254.
- Jay, P. Y., P. A. Pham, S. A. Wong und E. L. Elson (1995). "A mechanical function of myosin II in cell motility". In: *Journal of Cell Science* 108 ( Pt 1), S. 387–393.
- Jeon, N. L., S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock und G. M. Whitesides (2000). "Generation of Solution and Surface Gradients Using Microfluidic Systems". In: *Langmuir* 16.22, S. 8311–8316. DOI: 10.1021/1a000600b.
- Jeon, O., D. S. Alt, S. W. Linderman und E. Alsberg (2013). "Biochemical and physical signal gradients in hydrogels to control stem cell behavior". In: *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 25.44, S. 6366–6372. DOI: 10.1002/adma.201302364.
- Ji, J., B. Bar-On und H. D. Wagner (2012). "Mechanics of electrospun collagen and hydroxyapatite/collagen nanofibers". In: *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 13, S. 185–193. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.04.016.
- Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G. D. Prestwich, M. M. Mascarenhas, H. G. Garg, D. A. Quinn, R. J. Homer, D. R. Goldstein, R. Bucala, P. J. Lee, R. Medzhitov und P. W. Noble (2005).

- 
- “Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan”. In: *Nature medicine* 11.11, S. 1173–1179. DOI: 10.1038/nm1315.
- Jiang, Q., N. Reddy, S. Zhang, N. Roscioli und Y. Yang (2013). “Water-stable electrospun collagen fibers from a non-toxic solvent and crosslinking system”. In: *J. Biomed. Mater. Res.* 101.5, S. 1237–1247. DOI: 10.1002/jbm.a.34422.
- Johnson, P. C., A. G. Mikos, J. P. Fisher und J. A. Jansen (2007). “Strategic directions in tissue engineering”. In: *Tissue Engineering* 13.12, S. 2827–2837. DOI: 10.1089/ten.2007.0335.
- Jokinen, J., E. Dadu, P. Nykvist, J. Käpylä, D. J. White, J. Ivaska, P. Vehviläinen, H. Reunanen, H. Larjava, L. Häkkinen und J. Heino (2004). “Integrin-mediated Cell Adhesion to Type I Collagen Fibrils”. In: *J. Biol. Chem.* 279.30, S. 31956–31963. DOI: 10.1074/jbc.M401409200.
- Kanda, N., N. Morimoto, A. A. Ayvazyan, S. Takemoto, K. Kawai, Y. Nakamura, Y. Sakamoto, T. Taira und S. Suzuki (2014). “Evaluation of a novel collagen-gelatin scaffold for achieving the sustained release of basic fibroblast growth factor in a diabetic mouse model”. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 8.1, S. 29–40. DOI: 10.1002/term.1492.
- Kanda, N., N. Morimoto, S. Takemoto, A. A. Ayvazyan, K. Kawai, Y. Sakamoto, T. Taira und S. Suzuki (2012). “Efficacy of novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor for dermis-like tissue regeneration”. In: *Annals of plastic surgery* 69.5, S. 569–574. DOI: 10.1097/SAP.0b013e318222832f.
- Kane, R. S., S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber und G. M. Whitesides (1999). “Patterning proteins and cells using soft lithography”. In: *Biomaterials* 20.23-24, S. 2363–2376. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00165-9.
- Karaman, O., M. Şen und E.A. Demirci (2017). “11 - Electrospun scaffolds for vascular tissue engineering”. In: *Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications*. Hrsg. von Tamer Uyar und Erich Kny. Woodhead Publishing, S. 261–287. DOI: 10.1016/B978-0-08-101022-8.00006-5.
- Kater, S. (1995). “The sensory-motor role of growth cone filopodia”. In: *Current Opinion in Neurobiology* 5.1, S. 68–74. DOI: 10.1016/0959-4388(95)80089-1.
- Kern, W. und D. A. Puotinen (1970). “Cleaning Solutions Based on Hydrogen Peroxide for Use in Silicon Semiconductor Technology”. In: *RCA Reviews* 31, S. 187–206.
- Khademhosseini, A. und R. Langer (2016). “A decade of progress in tissue engineering”. In: *Nature Protocols* 11.10, S. 1775–1781. DOI: 10.1038/nprot.2016.123.
- Kim, D.-H., K. Han, K. Gupta, K. W. Kwon, K.-Y. Suh und A. Levchenko (2009). “Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients”. In: *Biomaterials* 30.29, S. 5433–5444. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.042.
- Kim, D.-H., P. P. Provenzano, C. L. Smith und A. Levchenko (2012). “Matrix nanotopography as a regulator of cell function”. In: *The Journal of cell biology* 197.3, S. 351–360. DOI: 10.1083/jcb.201108062.
- Kim, M.-H., M. Park, K. Kang und I. S. Choi (2014). “Neurons on nanometric topographies: insights into neuronal behaviors in vitro”. In: *Biomater. Sci.* 2.2, S. 148–155. DOI: 10.1039/C3BM60255A.

- Kim, R. Y., J. H. Oh, B. S. Lee, Y.-K. Seo, S. J. Hwang und I. S. Kim (2014). "The effect of dose on rhBMP-2 signaling, delivered via collagen sponge, on osteoclast activation and in vivo bone resorption". In: *Biomaterials* 35.6, S. 1869–1881. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.029.
- Kishore, V., R. Iyer, A. Frandsen und T.-U. Nguyen (2016). "In vitro characterization of electrochemically compacted collagen matrices for corneal applications". In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 11.5, S. 055008. DOI: 10.1088/1748-6041/11/5/055008.
- Kleinig, H. und P. Sitte (1999). *Zellbiologie: Ein Lehrbuch / begr. von Hans Kleinig und Peter Sitte*. 4. Aufl. Stuttgart u. a.
- Klemke, R. L., S. Cai, A. L. Giannini, P. J. Gallagher, P. de Lanerolle und D. A. Cheresh (1997). "Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase". In: *The Journal of cell biology* 137.2, S. 481–492. DOI: 10.1083/jcb.137.2.481.
- Ko, H., K. Suthiwanich, H. Mary, S. Zanganeh, S.-K. Hu, S. Ahadian, Y. Yang, G. Choi, K. Fetah, Y. Niu, J. J. Mao und A. Khademhosseini (2019). "A simple layer-stacking technique to generate biomolecular and mechanical gradients in photocrosslinkable hydrogels". In: *Biofabrication* 11.2, S. 025014. DOI: 10.1088/1758-5090/ab08b5.
- Koch, S., S. Tugues, X. Li, L. Gualandi und L. Claesson-Welsh (2011). "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors". In: *The Biochemical journal* 437.2, S. 169–183. DOI: 10.1042/BJ20110301.
- Kölsch, V., P. G. Charest und R. A. Firtel (2008). "The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling". In: *Journal of Cell Science* 121.Pt 5, S. 551–559. DOI: 10.1242/jcs.023333.
- Kongtawelert, P. und P. Ghosh (1989). "An enzyme-linked immunosorbent-inhibition assay for quantitation of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids". In: *Analytical Biochemistry* 178.2, S. 367–372. DOI: 10.1016/0003-2697(89)90654-4.
- (1990). "A method for the quantitation of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids using a labeled avidin-biotin technique". In: *Analytical Biochemistry* 185.2, S. 313–318. DOI: 10.1016/0003-2697(90)90300-x.
- Kothapalli, C. R. und P. Honarmandi (2014). "Theoretical and experimental quantification of the role of diffusive chemogradients on neuritogenesis within three-dimensional collagen scaffolds". In: *Acta biomaterialia* 10.8, S. 3664–3674. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.05.009.
- Kozłowska, J. und A. Sionkowska (2015). "Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen-calcium phosphate composite materials". In: *International journal of biological macromolecules* 74, S. 397–403. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.12.023.
- Kramer, N., A. Walzl, C. Unger, M. Rosner, G. Krupitza, M. Hengstschläger und H. Dolznig (2013). "In vitro cell migration and invasion assays". In: *Mutation research* 752.1, S. 10–24. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001.
- Kraning-Rush, C. M., S. P. Carey, M. C. Lampi und C. A. Reinhart-King (2013). "Microfabricated collagen tracks facilitate single cell metastatic invasion in 3D". In: *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 5.3, S. 606–616. DOI: 10.1039/c3ib20196a.

- 
- Kraskiewicz, H., B. Breen, T. Sargeant, S. McMahon und A. Pandit (2013). "Assembly of protein-based hollow spheres encapsulating a therapeutic factor". In: *ACS chemical neuroscience* 4.9, S. 1297–1304. DOI: 10.1021/cn400080h.
- Kubo, K. und Y. Kuroyanagi (2003). "Spongy matrix of hyaluronic acid and collagen as a cultured dermal substitute: evaluation in an animal test". In: *Journal of Artificial Organs* 6.1, S. 0064–0070.
- Kubow, K. E., V. D. Shuklis, D. J. Sales und A. R. Horwitz (2017). "Contact guidance persists under myosin inhibition due to the local alignment of adhesions and individual protrusions". In: *Scientific reports* 7.1, S. 14380. DOI: 10.1038/s41598-017-14745-7.
- L. Buttafoco, N.G. Kolkman, P. Engbers-Buijtenhuijs, A.A. Poot, P.J. Dijkstra, I. Vermes und J. Feijen (2006). "Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications". In: *Biomaterials* 27.5, S. 724–734. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.024.
- Lacoste, J., K. Young und C. M. Brown (2013). "Live-cell migration and adhesion turnover assays". In: *Cell Imaging Techniques*. Hrsg. von D. J. Taatjes und J. Roth. Bd. 931. SpringerLink Bücher. Totowa, NJ: Humana Press, S. 61–84. DOI: 10.1007/978-1-62703-056-4{\textunderscore}3.
- Lai, V. K., S. P. Lake, C. R. Frey, R. T. Tranquillo und V. H. Barocas (2012). "Mechanical behavior of collagen-fibrin co-gels reflects transition from series to parallel interactions with increasing collagen content". In: *Journal of biomechanical engineering* 134.1, S. 011004. DOI: 10.1115/1.4005544.
- Lakra, R., M. S. Kiran und K. P. Sai (2015). "Fabrication of homobifunctional crosslinker stabilized collagen for biomedical application". In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 10.6, S. 065015. DOI: 10.1088/1748-6041/10/6/065015.
- Lamalice, L., F. Le Boeuf und J. Huot (2007). "Endothelial cell migration during angiogenesis". In: *Circulation research* 100.6, S. 782–794. DOI: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e.
- Lanfer, B., U. Freudenberg, R. Zimmermann, D. Stamo, V. Körber und C. Werner (2008). "Aligned fibrillar collagen matrices obtained by shear flow deposition". In: *Biomaterials* 29.28, S. 3888–3895.
- Langer, R. und J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering". In: *Science* 260.5110, S. 920–926. DOI: 10.1126/science.8493529.
- Lara Rodriguez, L. und I. C. Schneider (2013). "Directed cell migration in multi-cue environments". In: *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 5.11, S. 1306–1323. DOI: 10.1039/c3ib40137e.
- Lauffenburger, D. A. und A. F. Horwitz (1996). "Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process". In: *Cell* 84.3, S. 359–369. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81280-5.
- Laurencin, C. T., A. M. Ambrosio, M. D. Borden und J. A. Cooper (1999). "Tissue engineering: orthopedic applications". In: *Annual review of biomedical engineering* 1, S. 19–46. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.1.1.19.
- Lee, J. C., C. T. Pereira, X. Ren, W. Huang, D. Bischoff, D. W. Weisgerber, D. T. Yamaguchi, B. A. Harley und T. A. Miller (2015). "Optimizing Collagen Scaffolds for Bone Engineering: Effects of Cross-linking and Mineral Content on Structural Contraction and Osteogenesis". In: *The Journal of craniofacial surgery* 26.6, S. 1992–1996. DOI: 10.1097/SCS.0000000000001918.
- Lee, K. Y. und D. J. Mooney (2001). "Hydrogels for tissue engineering". In: *CHEMICAL REVIEWS* 101.7, S. 1869–1879. DOI: 10.1021/cr000108x.

- Lee, K., E. H. Kim, N. Oh, N. A. Tuan, N. H. Bae, S. J. Lee, K. G. Lee, C.-Y. Eom, E. K. Yim und S. Park (2016). "Contribution of actin filaments and microtubules to cell elongation and alignment depends on the grating depth of microgratings". In: *Journal of nanobiotechnology* 14.1, S. 35. DOI: 10.1186/s12951-016-0187-8.
- Lee, P. C., M. R. Kibbe, M. J. Schuchert, D. B. Stolz, S. C. Watkins, B. P. Griffith, T. R. Billiar und L. L. Shears (2000). "Nitric oxide induces angiogenesis and upregulates alpha(v)beta(3) integrin expression on endothelial cells". In: *Microvascular research* 60.3, S. 269–280. DOI: 10.1006/mvres.2000.2265.
- Lee, P., R. Lin, J. Moon und L. P. Lee (2006). "Microfluidic alignment of collagen fibers for in vitro cell culture". In: *Biomedical microdevices* 8.1, S. 35–41. DOI: 10.1007/s10544-006-6380-z.
- Lee, Y.-B., S. Polio, W. Lee, G. Dai, L. Menon, R. S. Carroll und S.-S. Yoo (2010). "Bio-printing of collagen and VEGF-releasing fibrin gel scaffolds for neural stem cell culture". In: *Experimental Neurology* 223.2, S. 645–652. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.02.014.
- Legant, W. R., A. Pathak, M. T. Yang, V. S. Deshpande, R. M. McMeeking und C. S. Chen (2009). "Micro-fabricated tissue gauges to measure and manipulate forces from 3D microtissues". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.25, S. 10097–10102. DOI: 10.1073/pnas.0900174106.
- Legate, K. R., S. A. Wickström und R. Fässler (2009). "Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling". In: *Genes & development* 23.4, S. 397–418. DOI: 10.1101/gad.1758709.
- Leung, B. M. und M. V. Sefton (2010). "A modular approach to cardiac tissue engineering". In: *Tissue engineering. Part A* 16.10, S. 3207–3218. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0746.
- Levis, H. J., R. A. Brown und J. T. Daniels (2010). "Plastic compressed collagen as a biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture". In: *Biomaterials* 31.30, S. 7726–7737. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.012.
- Li, G., S. Chen, M. Zeng, Y. Kong, F. Zhao, L. Zhang und Y. Yang (2019). "Hierarchically aligned gradient collagen micropatterns for rapidly screening Schwann cells behavior". In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 176, S. 341–351. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.019.
- Li, J., N. Ren, J. Qiu, H. Jiang, H. Zhao, G. Wang, R. I. Boughton, Y. Wang und H. Liu (2013). "Carbodiimide crosslinked collagen from porcine dermal matrix for high-strength tissue engineering scaffold". In: *International journal of biological macromolecules* 61, S. 69–74. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.038.
- Li, L., Fei Yu, Liming Zheng, Rongliang Wang, Wenqiang Yan, Zixu Wang, Jia Xu, Jianxiang Wu, Dongquan Shi, Liya Zhu, Xingsong Wang und Qing Jiang (2019). "Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application". In: *Journal of Orthopaedic Translation* 17, S. 26–41. DOI: 10.1016/j.jot.2018.09.003.
- Li, S.-T., S. J. Archibald, C. Krarup und R. D. Madison (1992). "Peripheral nerve repair with collagen conduits". In: *Clinical Materials* 9.3-4, S. 195–200. DOI: 10.1016/0267-6605(92)90100-8.
- Li, S., N. F. Huang und S. Hsu (2005). "Mechanotransduction in endothelial cell migration". In: *Journal of Cellular Biochemistry* 96.6, S. 1110–1126. DOI: 10.1002/jcb.20614.

- 
- Li, X., H. Liang, J. Sun, Y. Zhuang, B. Xu und J. Dai (2015). "Electrospun Collagen Fibers with Spatial Patterning of SDF1 $\alpha$  for the Guidance of Neural Stem Cells". In: *Advanced healthcare materials* 4.12, S. 1869–1876. DOI: 10.1002/adhm.201500271.
- Li, X., J. Xu, C. T. Nicolescu, J. T. Marinelli und J. Tien (2017). "Generation, Endothelialization, and Microsurgical Suture Anastomosis of Strong 1-mm-Diameter Collagen Tubes". In: *Tissue engineering. Part A* 23.7-8, S. 335–344. DOI: 10.1089/ten.TEA.2016.0339.
- Liao, S., W. Wang, M. Uo, S. Ohkawa, T. Akasaka, K. Tamura, F. Cui und F. Watari (2005). "A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration". In: *Biomaterials* 26.36, S. 7564–7571. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.050.
- Likhitpanichkul, M., Y. Kim, O. M. Torre, E. See, Z. Kazezian, A. Pandit, A. C. Hecht und J. C. Iatridis (2015). "Fibrin-genipin annulus fibrosus sealant as a delivery system for anti-TNF $\alpha$  drug". In: *The spine journal: official journal of the North American Spine Society* 15.9, S. 2045–2054. DOI: 10.1016/j.spinee.2015.04.026.
- Lim, J. Y. und H. J. Donahue (2007). "Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning". In: *Tissue Engineering* 13.8, S. 1879–1891. DOI: 10.1089/ten.2006.0154.
- Lima, M. J., V. M. Correlo und R. L. Reis (2014). "Micro/nano replication and 3D assembling techniques for scaffold fabrication". In: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 42, S. 615–621. DOI: 10.1016/j.msec.2014.05.064.
- Liu, T., W. Dan, N. Dan, X. Liu, X. Liu und X. Peng (2017). "A novel grapheme oxide-modified collagen-chitosan bio-film for controlled growth factor release in wound healing applications". In: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 77, S. 202–211. DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.256.
- Liu, T., W. K. Teng, B. P. Chan und S. Y. Chew (2010). "Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: synthesis, characterization and neural stem cell interactions". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 95.1, S. 276–282. DOI: 10.1002/jbm.a.32831.
- Mabrouk, M., Hanan H. Beherei und Diganta B. Das (2020). "Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering". In: *Materials Science and Engineering: C* 110, S. 110716. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110716.
- MacNearney, D., B. Mak, G. Ongo, T. E. Kennedy und D. Juncker (2016). "Nanocontact Printing of Proteins on Physiologically Soft Substrates to Study Cell Haptotaxis". In: *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 32.50, S. 13525–13533. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03246.
- Macri, L., D. Silverstein und R. A. F. Clark (2007). "Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering". In: *Advanced drug delivery reviews* 59.13, S. 1366–1381. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.015.
- Maekawa, T., T. K. Rathinasamy, K. I. Altman und W. F. Forbes (1970). "Changes in collagen with age-I: The extraction of acid soluble collagens from the skin of mice". In: *Experimental Gerontology* 5.2, S. 177–186. DOI: 10.1016/0531-5565(70)90007-0.

- Mai, J., L. Fok, H. Gao, X. Zhang und M.-m. Poo (2009). "Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients". In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29.23, S. 7450–7458. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1121-09.2009.
- Manwaring, M. E., J. F. Walsh und P. A. Tresco (2004). "Contact guidance induced organization of extracellular matrix". In: *Biomaterials* 25.17, S. 3631–3638. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.043.
- Martínez, A., M. D. Blanco, N. Davidenko und R. E. Cameron (2015). "Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties". In: *Carbohydrate polymers* 132, S. 606–619. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.06.084.
- Martino, M. M. und J. A. Hubbell (2010). "The 12th-14th type III repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth factor-binding domain". In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24.12, S. 4711–4721. DOI: 10.1096/fj.09-151282.
- Martins, J. R. M., C. C. Passerotti, R. M. B. Maciel, L. O. Sampaio, C. P. Dietrich und H. B. Nader (2003). "Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients". In: *Analytical Biochemistry* 319.1, S. 65–72. DOI: 10.1016/s0003-2697(03)00251-3.
- Matthews, J. A., G. E. Wnek, D. G. Simpson und G. L. Bowlin (2002). "Electrospinning of collagen nanofibers". In: *Biomacromolecules* 3.2, S. 232–238. DOI: 10.1021/bm015533u.
- McDonald, J. A. und T. D. Camenisch (2002). "Hyaluronan: genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide". In: *Glycoconjugate Journal* 19.4-5, S. 331–339. DOI: 10.1023/A:1025369004783.
- McGuigan, A. P. und M. V. Sefton (2006). "Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.31, S. 11461–11466. DOI: 10.1073/pnas.0602740103.
- McKee, C. T., V. K. Raghunathan, P. F. Nealey, P. Russell und C. J. Murphy (2011). "Topographic modulation of the orientation and shape of cell nuclei and their influence on the measured elastic modulus of epithelial cells". In: *Biophysical journal* 101.9, S. 2139–2146. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.09.042.
- Meghezi, S., B. Drouin und D. Mantovani (2017). "16 - Collagen hydrogel-based scaffolds for vascular tissue regeneration: Mechanical and viscoelastic characterization". In: *Characterization of Polymeric Biomaterials*. Hrsg. von Maria Cristina Tanzi und Silvia Farè. Woodhead Publishing, S. 397–439. DOI: 10.1016/B978-0-08-100737-2.00016-9.
- Mekhail, M., K. K. H. Wong, D. T. Padavan, Y. Wu, D. B. O’Gorman und W. Wan (2011). "Genipin-cross-linked electrospun collagen fibers". In: *Journal of biomaterials science. Polymer edition* 22.17, S. 2241–2259. DOI: 10.1163/092050610X538209.
- Meyer, M. (2019). "Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties". In: *BIOMEDICAL ENGINEERING ONLINE* 18. DOI: 10.1186/s12938-019-0647-0.
- Mi, S., B. Chen, B. Wright und C. J. Connon (2010). "Plastic compression of a collagen gel forms a much improved scaffold for ocular surface tissue engineering over conventional collagen gels". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 95.2, S. 447–453. DOI: 10.1002/jbm.a.32861.

- Michaelis, U. R. (2014). "Mechanisms of endothelial cell migration". In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71.21, S. 4131–4148. DOI: 10.1007/s00018-014-1678-0.
- Ming-Che, W., G. PINS und F. SILVER (1994). "Collagen fibres with improved strength for the repair of soft tissue injuries: Biomaterials, 15(7), 507-512". In: *Biomaterials* 15.7, S. 507–512. DOI: 10.1016/0142-9612(94)90016-7.
- Mitsi, M., Z. Hong, C. E. Costello und M. A. Nugent (2006). "Heparin-mediated conformational changes in fibronectin expose vascular endothelial growth factor binding sites". In: *Biochemistry* 45.34, S. 10319–10328. DOI: 10.1021/bi060974p.
- Miyoshi, H. und T. Adachi (2014). "Topography design concept of a tissue engineering scaffold for controlling cell function and fate through actin cytoskeletal modulation". In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 20.6, S. 609–627. DOI: 10.1089/ten.TEB.2013.0728.
- Moreno-Arotzena, O., G. Mendoza, M. Córdor, T. Rüberg und J. M. García-Aznar (2014). "Inducing chemotactic and haptotactic cues in microfluidic devices for three-dimensional in vitro assays". In: *Biomicrofluidics* 8.6, S. 064122. DOI: 10.1063/1.4903948.
- Moissoglu, K., R. Majumdar und C. A. Parent (2014). "Cell migration: sinking in a gradient". In: *Current biology : CB* 24.1, R23–R25. DOI: 10.1016/j.cub.2013.10.075.
- Morimoto, N., K. Yoshimura, M. Niimi, T. Ito, R. Aya, J. Fujitaka, H. Tada, S. Teramukai, T. Murayama, C. Toyooka, K. Miura, S. Takemoto, N. Kanda, K. Kawai, M. Yokode, A. Shimizu und S. Suzuki (2013). "Novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor: clinical trial for chronic skin ulcers". In: *Tissue engineering. Part A* 19.17-18, S. 1931–1940. DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0634.
- Moroni, L., J. Schrooten, R. Truckenmüller, J. Rouwkema, J. Sohier und C. A. van Blitterswijk (2015). "Tissue Engineering". In: *Tissue engineering*. Hrsg. von C. A. van Blitterswijk und J. de Boer. Amsterdam, Boston und Heidelberg: Elsevier Academic Press, S. 1–21. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00001-8.
- Mu, X., W. Zheng, Le Xiao, W. Zhang und X. Jiang (2013). "Engineering a 3D vascular network in hydrogel for mimicking a nephron". In: *Lab on a Chip* 13.8, S. 1612–1618. DOI: 10.1039/c3lc41342j.
- Müller, A., J. Meyer, T. Paumer und T. Pompe (2014). "Cytoskeletal transition in patterned cells correlates with interfacial energy model". In: *Soft Matter* 10.14, S. 2444–2452. DOI: 10.1039/c3sm52424h.
- Si-Nae Park, Hye Jung Lee, Kwang Hoon Lee und Hwal Suh (2003). "Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration". In: *Biomaterials* 24.9, S. 1631–1641. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00550-1.
- Si-Nae Park, Jong-Chul Park, Hea Ok Kim, Min Jung Song und Hwal Suh (2002). "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking". In: *Biomaterials* 23.4, S. 1205–1212. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00235-6.
- Nagaoka, H., H. Nagaoka, R. Walter, L. W. Boushell, P. A. Miguez, A. Burton, A. V. Ritter und M. Yamachi (2014). "Characterization of genipin-modified dentin collagen". In: *BioMed research international* 2014, S. 702821. DOI: 10.1155/2014/702821.
- Nair, L. S. und C. T. Laurencin (2006). "Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery". In: *Tissue Engineering I*. Hrsg. von K. Lee und D. Kaplan. Bd. 102. Advances in

- Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer Berlin / Heidelberg, S. 47–90. DOI: 10.1007/b137240.
- Nazhat, S. N., E. A. A. Neel, A. Kidane, I. Ahmed, C. Hope, M. Kershaw, P. D. Lee, E. Stride, N. Saffari, J. C. Knowles und R. A. Brown (2007). “Controlled microchannelling in dense collagen scaffolds by soluble phosphate glass fibers”. In: *Biomacromolecules* 8.2, S. 543–551. DOI: 10.1021/bm060715f.
- Nelson, R. D., P. G. Quie und R. L. Simmons (1975). “Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes”. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 115.6, S. 1650–1656.
- Ng, C. P. und M. A. Swartz (2003). “Fibroblast alignment under interstitial fluid flow using a novel 3-D tissue culture model”. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 284.5, H1771–7. DOI: 10.1152/ajpheart.01008.2002.
- (2006). “Mechanisms of interstitial flow-induced remodeling of fibroblast-collagen cultures”. In: *Annals of Biomedical Engineering* 34.3, S. 446–454. DOI: 10.1007/s10439-005-9067-3.
- Noble, P. W., F. R. Lake, P. M. Henson und D. W. Riches (1993). “Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages”. In: *J Clin Invest* 91.6, S. 2368–2377. DOI: 10.1172/JCI116469.
- Novak, T., S. L. Voytik-Harbin und C. P. Neu (2015). “Cell encapsulation in a magnetically aligned collagen-GAG copolymer microenvironment”. In: *Acta biomaterialia* 11, S. 274–282. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.09.031.
- O’Brien, F. (2004). “Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds: Biomaterials, 25(6), 1077-1086”. In: *Biomaterials* 25.6, S. 1077–1086. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00630-6.
- Odedra, D., L. L. Y. Chiu, M. Shoichet und M. Radisic (2011). “Endothelial cells guided by immobilized gradients of vascular endothelial growth factor on porous collagen scaffolds”. In: *Acta biomaterialia* 7.8, S. 3027–3035. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.05.002.
- Ohara, P. T. und R. C. Buck (1979). “Contact guidance in vitro”. In: *Experimental Cell Research* 121.2, S. 235–249. DOI: 10.1016/0014-4827(79)90002-8.
- Ono, K., H. Hattori, S. Takeshita, A. Kurita und M. Ishihara (1999). “Structural features in heparin that interact with VEGF165 and modulate its biological activity”. In: *Glycobiology* 9.7, S. 705–711. DOI: 10.1093/glycob/9.7.705.
- Ori, A., M. C. Wilkinson und D. G. Fernig (2008). “The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges”. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, S. 4309–4338. DOI: 10.2741/3007.
- Ovsianikov, A., A. Khademhosseini und V. Mironov (2018). “The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies”. In: *Trends in biotechnology* 36.4, S. 348–357. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.01.005.
- Pachence, J. M. (1996). “Collagen-based devices for soft tissue repair”. In: *J. Biomed. Mater. Res.* 33.1, S. 35–40. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199621)33:1<35::AID-JBM6>3.0.CO;2-N.
- Pankov, R. und K. M. Yamada (2002). “Fibronectin at a glance”. In: *J. Cell Sci.* 115.20, S. 3861–3863. DOI: 10.1242/jcs.00059.

- 
- Pawelec, K. M., A. Husmann, S. M. Best und R. E. Cameron (2014). "A design protocol for tailoring ice-templated scaffold structure". In: *Journal of the Royal Society, Interface* 11.92, S. 20130958. DOI: 10.1098/rsif.2013.0958.
- (2015). "Altering crystal growth and annealing in ice-templated scaffolds". In: *Journal of materials science* 50.23, S. 7537–7543. DOI: 10.1007/s10853-015-9343-z.
- Pelaez, M., C. Susin, J. Lee, T. Fiorini, F. C. Bisch, D. R. Dixon, J. C. McPherson, A. N. Buxton und U. M. E. Wikesjö (2014). "Effect of rhBMP-2 dose on bone formation/maturation in a rat critical-size calvarial defect model". In: *Journal of clinical periodontology* 41.8, S. 827–836. DOI: 10.1111/jcpe.12270.
- Pepper, M. S., N. Ferrara, L. Orci und R. Montesano (1992). "Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro". In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189.2, S. 824–831. DOI: 10.1016/0006-291X(92)92277-5.
- Petrie, R. J., A. D. Doyle und K. M. Yamada (2009). "Random versus directionally persistent cell migration". In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10.8, S. 538–549. DOI: 10.1038/nrm2729.
- Pieper, J., T. Hafmans, J. Veerkamp und T. van Kuppevelt (2000). "Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects". In: *Biomaterials* 21.6, S. 581–593. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00222-7.
- Pompe, T., F. Kobe, K. Salchert, B. Jorgensen, J. Oswald und C. Werner (2003). "Fibronectin anchorage to polymer substrates controls the initial phase of endothelial cell adhesion". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 67.2, S. 647–657. DOI: 10.1002/jbm.a.10130.
- Powell, H. M. und S. T. Boyce (2006). "EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability". In: *Biomaterials* 27.34, S. 5821–5827. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.030.
- (2009). "Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties". In: *Tissue engineering. Part A* 15.8, S. 2177–2187. DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0473.
- Pradeep Kumar, Lisa C. du Toit, Priyamvada Pradeep, Yahya E. Choonara und Viness Pillay (2019). "Chapter 6 - Nanoengineered biomaterials for vascular tissue engineering". In: *Nanoengineered Biomaterials for Regenerative Medicine*. Hrsg. von Masoud Mozafari, Jayakumar Rajadas und David Kaplan. Micro and Nano Technologies. Elsevier, S. 125–144. DOI: 10.1016/B978-0-12-813355-2.00006-5.
- Prewitz, M. C., F. P. Seib, M. von Bonin, J. Friedrichs, A. Stißel, C. Niehage, K. Müller, K. Anastassiadis, C. Waskow, B. Hoflack, M. Bornhäuser und C. Werner (2013). "Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments". In: *Nature methods* 10.8, S. 788–794. DOI: 10.1038/nmeth.2523.
- Provenzano, P. P., D. R. Inman, K. W. Eliceiri, S. M. Trier und P. J. Keely (2008). "Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization". In: *Biophysical journal* 95.11, S. 5374–5384. DOI: 10.1529/biophysj.108.133116.
- Puklin-Faucher, E. und M. P. Sheetz (2009). "The mechanical integrin cycle". In: *Journal of Cell Science* 122.Pt 2, S. 179–186. DOI: 10.1242/jcs.042127.

- Quade, M., S. Knaack, A. R. Akkineni, A. Gabrielyan, A. Lode, A. Rösen-Wolff und M. Gelinsky (2017). "Central Growth Factor Loaded Depots in Bone Tissue Engineering Scaffolds for Enhanced Cell Attraction". In: *Tissue engineering. Part A* 23.15-16, S. 762–772. DOI: 10.1089/ten.TEA.2016.0483.
- Quinlan, E., E. M. Thompson, A. Matsiko, F. J. O'Brien und A. López-Noriega (2015). "Functionalization of a Collagen-Hydroxyapatite Scaffold with Osteostatin to Facilitate Enhanced Bone Regeneration". In: *Advanced healthcare materials* 4.17, S. 2649–2656. DOI: 10.1002/adhm.201500439.
- Radhakrishnan, T. S. (2006). "Thermal degradation of poly(dimethylsilylene) and poly(tetramethyldisilylene-co-styrene)". In: *Journal of Applied Polymer Science* 99.5, S. 2679–2686. DOI: 10.1002/app.22813.
- Rajan, N., J. Habermehl, M.-F. Coté, C. J. Doillon und D. Mantovani (2006). "Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications". In: *Nature Protocols* 1.6, S. 2753–2758. DOI: 10.1038/nprot.2006.430.
- Ramirez-San Juan, G. R., P. W. Oakes und M. L. Gardel (2017). "Contact guidance requires spatial control of leading-edge protrusion". In: *Molecular biology of the cell* 28.8, S. 1043–1053. DOI: 10.1091/mbc.E16-11-0769.
- Rault, I., V. Frei, D. Herbage, N. Abdul-Malak und A. Huc (1996). "Evaluation of different chemical methods for cross-linking collagen gel, films and sponges: Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 7(4), 215-221". In: *0957-4530* 7.4, S. 215–221. DOI: 10.1007/BF00119733.
- Ray, A., O. Lee, Z. Win, R. M. Edwards, P. W. Alford, D.-H. Kim und P. P. Provenzano (2017). "Anisotropic forces from spatially constrained focal adhesions mediate contact guidance directed cell migration". In: *Nature communications* 8, S. 14923. DOI: 10.1038/ncomms14923.
- Reig, G., E. Pulgar und M. L. Concha (2014). "Cell migration: from tissue culture to embryos". In: *Development (Cambridge, England)* 141.10, S. 1999–2013. DOI: 10.1242/dev.101451.
- Ren, X., J. Akimoto, H. Miyatake, S. Tada, L. Zhu, H. Mao, T. Isoshima, S. Müller, S. M. Kim, Y. Zhou und Y. Ito (2019). "Cell migration and growth induced by photo-immobilised vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms". In: *Journal of Materials Chemistry B* 7.27, S. 4272–4279. DOI: 10.1039/C9TB00407F.
- Ricoult, S. G., T. E. Kennedy und D. Juncker (2015). "Substrate-bound protein gradients to study haptotaxis". In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3, S. 40. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00040.
- Rnjak-Kovacina, J., S. G. Wise, Z. Li, P. K. M. Maitz, C. J. Young, Y. Wang und A. S. Weiss (2012). "Electrospun synthetic human elastin:collagen composite scaffolds for dermal tissue engineering". In: *Acta biomaterialia* 8.10, S. 3714–3722. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.06.032.
- Roeder, B. A., K. Kokini, J. E. Sturgis, J. P. Robinson und S. L. Voytik-Harbin (2002). "Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure". In: *Journal of biomechanical engineering* 124.2, S. 214–222. DOI: 10.1115/1.1449904.
- Rousseau, S., F. Houle, J. Landry und J. Huot (1997). "p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells". In: *Oncogene* 15.18, S. 2169–2177. DOI: 10.1038/sj.onc.1201380.

- 
- Rouwkema, J., N. C. Rivron und C. A. van Blitterswijk (2008). "Vascularization in tissue engineering". In: *Trends in biotechnology* 26.8, S. 434–441. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.04.009.
- Rowe, S. L. und J. P. Stegemann (2006). "Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios". In: *Biomacromolecules* 7.11, S. 2942–2948. DOI: 10.1021/bm0602233.
- (2009). "Microstructure and mechanics of collagen-fibrin matrices polymerized using anurod snake venom enzyme". In: *Journal of biomechanical engineering* 131.6, S. 061012. DOI: 10.1115/1.3128673.
- Rupp, P. A., A. Czirók und C. D. Little (2004). "alpha5beta3 integrin-dependent endothelial cell dynamics in vivo". In: *Development (Cambridge, England)* 131.12, S. 2887–2897. DOI: 10.1242/dev.01160.
- Ruprecht, V., P. Monzo, A. Ravasio, Z. Yue, E. Makhija, P. O. Strale, N. Gauthier, G. V. Shivashankar, V. Studer, C. Albiges-Rizo und V. Viasnoff (2017). "How cells respond to environmental cues - insights from bio-functionalized substrates". In: *Journal of Cell Science* 130.1, S. 51–61. DOI: 10.1242/jcs.196162.
- Ruvinov, E., Y. Shandalov, S. Levenberg und S. Cohen (2015). "Principles of Cardiovascular Tissue Engineering". In: *Tissue engineering*. Hrsg. von C. A. van Blitterswijk und J. de Boer. Amsterdam, Boston und Heidelberg: Elsevier Academic Press, S. 627–683. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00018-3.
- S. Lilja und H.-J. Barrach (1983). "Normally sulphated and highly sulphated glycosaminoglycans (GAG) affecting fibrillogenesis of type I and type II collagen in vitro". In: *Experimental pathology* 23.3, S. 173–181. DOI: 10.1016/S0232-1513(83)80055-3.
- Sacchi, V., R. Mittermayr und M. Ehrbar (2020). "Therapeutic Angiogenesis in Regenerative Medicine". In: *Vascularization for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Hrsg. von W. Holthöner, A. Banfi, J. Kirkpatrick und H. Redl. Bd. 11. Cham: Springer International Publishing, S. 1–22. DOI: 10.1007/978-3-319-21056-8\_textunderscore6-2.
- Salchert, K., U. Streller, T. Pompe, N. Herold, M. Grimmer und C. Werner (2004). "In Vitro Reconstitution of Fibrillar Collagen Type I Assemblies at Reactive Polymer Surfaces". In: *Biomacromolecules* 5.4, S. 1340–1350. DOI: 10.1021/bm0499031.
- Sales, A., C. Picart und R. Kemkemer (2019). "Age-dependent migratory behavior of human endothelial cells revealed by substrate microtopography". In: *Experimental Cell Research* 374.1, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.10.008.
- Sander, E. E., J. P. ten Klooster, S. van Delft, R. A. van der Kammen und J. G. Collard (1999). "Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior". In: *The Journal of cell biology* 147.5, S. 1009–1022. DOI: 10.1083/jcb.147.5.1009.
- Sanders, B., S. Loerakker, E. S. Fioretta, D. J. P. Bax, A. Driessen-Mol, S. P. Hoerstrup und F. P. T. Baaijens (2016). "Improved Geometry of Decellularized Tissue Engineered Heart Valves to Prevent Leaflet Retraction". In: *Annals of Biomedical Engineering* 44.4, S. 1061–1071. DOI: 10.1007/s10439-015-1386-4.

- Scapini, P., F. Calzetti und M. A. Cassatella (1999). "On the detection of neutrophil-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)". In: *Journal of Immunological Methods* 232.1-2, S. 121–129. DOI: 10.1016/S0022-1759(99)00170-2.
- Schwarz, U. (2007). "Soft matters in cell adhesion: rigidity sensing on soft elastic substrates". In: *Soft Matter* 3.3, S. 263–266. DOI: 10.1039/b606409d.
- Scott, J. E. (1988). "Proteoglycan-fibrillar collagen interactions". In: *Biochem. J.* 252.2, S. 313–323.
- Sehgal, P. K. und A. Srinivasan (2009). "Collagen-coated microparticles in drug delivery". In: *Expert opinion on drug delivery* 6.7, S. 687–695. DOI: 10.1517/17425240903025736.
- Seliktar, D., R. A. Black, R. P. Vito und R. M. Nerem (2000). "Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro". In: *Annals of Biomedical Engineering* 28.4, S. 351–362. DOI: 10.1114/1.275.
- Senger, D. R., S. R. Ledbetter, K. P. Claffey, A. Papadopoulos-Sergiou, C. A. Peruzzi und M. Detmar (1996). "Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, osteopontin, and thrombin". In: *The American journal of pathology* 149.1, S. 293–305.
- Sepp, N. T., L. J. Li, K. H. Lee, E. J. Brown, S. W. Caughman, T. J. Lawley und R. A. Swerlick (1994). "Basic fibroblast growth factor increases expression of the  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells". In: *The Journal of investigative dermatology* 103.3, S. 295–299. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12394617.
- Serban, M. A. und G. D. Prestwich (2008). "Modular extracellular matrices: Solutions for the puzzle". In: *Methods* 45.1, S. 93–98.
- Serpooshan, V., M. Julien, O. Nguyen, H. Wang, A. Li, N. Muja, J. E. Henderson und S. N. Nazhat (2010). "Reduced hydraulic permeability of three-dimensional collagen scaffolds attenuates gel contraction and promotes the growth and differentiation of mesenchymal stem cells". In: *Acta biomaterialia* 6.10, S. 3978–3987. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.04.028.
- Serpooshan, V., N. Muja, B. Marelli und S. N. Nazhat (2011). "Fibroblast contractility and growth in plastic compressed collagen gel scaffolds with microstructures correlated with hydraulic permeability". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 96.4, S. 609–620. DOI: 10.1002/jbm.a.33008.
- Seseogullari-Dirihan, R., M. M. Mutluay, P. Vallittu, D. H. Pashley und A. Tezvergil-Mutluay (2015). "Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity". In: *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 31.8, S. 941–947. DOI: 10.1016/j.dental.2015.05.002.
- Shamloo, A., N. Ma, M.-m. Poo, L. L. Sohn und S. C. Heilshorn (2008). "Endothelial cell polarization and chemotaxis in a microfluidic device". In: *Lab on a Chip* 8.8, S. 1292–1299. DOI: 10.1039/b719788h.
- Sicari, B. M., R. Londono und S. F. Badylak (2015). "Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering". In: *Tissue engineering*. Hrsg. von C. A. van Blitterswijk und J. de Boer. Amsterdam, Boston und Heidelberg: Elsevier Academic Press, S. 149–175. DOI: 10.1016/B978-0-12-420145-3.00005-5.

- 
- Silver, F. H. und R. L. Trelstad (1980). "Type I collagen in solution. Structure and properties of fibril fragments". In: *The Journal of biological chemistry* 255.19, S. 9427–9433.
- Singh, M., C. Berklund und Michael S. Detamore (2008). "Strategies and Applications for Incorporating Physical and Chemical Signal Gradients in Tissue Engineering". In: *TISSUE ENGINEERING: Part B* 14.4, S. 341–366.
- Sionkowska, A. und J. Kozłowska (2013). "Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites". In: *International journal of biological macromolecules* 52, S. 250–259. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.10.002.
- Siriwardane, M. L., K. DeRosa, G. Collins und B. J. Pfister (2014). "Controlled formation of cross-linked collagen fibers for neural tissue engineering applications". In: *Biofabrication* 6.1, S. 015012. DOI: 10.1088/1758-5082/6/1/015012.
- Slevin, M., J. Krupinski, S. Kumar und J. Gaffney (1998). "Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation". In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 78.8, S. 987–1003.
- Slevin, M., S. Kumar und J. Gaffney (2002). "Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses". In: *The Journal of biological chemistry* 277.43, S. 41046–41059. DOI: 10.1074/jbc.M109443200.
- Soares, A. L. E., M. Stekelenburg und F. P. T. Baaijens (2011). "Remodeling of the collagen fiber architecture due to compaction in small vessels under tissue engineered conditions". In: *Journal of biomechanical engineering* 133.7, S. 071002. DOI: 10.1115/1.4003870.
- Soldi, R., S. Mitola, M. Strasly, P. Defilippi, G. Tarone und F. Bussolino (1999). "Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2". In: *The EMBO journal* 18.4, S. 882–892. DOI: 10.1093/emboj/18.4.882.
- Song, J. J. und H. C. Ott (2011). "Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds". In: *Trends in Molecular Medicine* 17.8, S. 424–432. DOI: 10.1016/j.molmed.2011.03.005.
- Sorushanova, A., L. M. Delgado, Z. Wu, N. Shologu, A. Kshirsagar, R. Raghunath, A. M. Mullen, Y. Bayon, A. Pandit, M. Raghunath und D. I. Zeugolis (2019). "The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development". In: *Advanced Materials* 31.1. DOI: 10.1002/adma.201801651.
- Sottile, J. und D. C. Hocking (2002). "Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions". In: *Molecular biology of the cell* 13.10, S. 3546–3559. DOI: 10.1091/mbc.e02-01-0048.
- Speziale, P., L. Visai, S. Rindi und A. Di Poto (2008). "Purification of human plasma fibronectin using immobilized gelatin and Arg affinity chromatography". In: *Nature Protocols* 3.3, S. 525–533. DOI: 10.1038/nprot.2008.12.
- Spicer, A. P. und J. Y. L. Tien (2004). "Hyaluronan and morphogenesis". In: *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews* 72.1, S. 89–108. DOI: 10.1002/bdrc.20006.
- Spiering, D. und L. Hodgson (2011). "Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility". In: *Cell adhesion & migration* 5.2, S. 170–180. DOI: 10.4161/cam.5.2.14403.

- Stamov, D. (2009). "Structural Analysis of Reconstituted Collagen Type I - Heparin Cofibrils". Dissertation. Dresden: TU Dresden.
- Stamov, D., M. Grimmer, K. Salchert, T. Pompe und C. Werner (2008). "Heparin intercalation into reconstituted collagen I fibrils: Impact on growth kinetics and morphology". In: *Biomaterials* 29.1, S. 1–14. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.009.
- Steffens, G., C. Yao, P. Prével, M. Markowicz, P. Schenck, E. M. Noah und N. Pallua (2004). "Modulation of Angiogenic Potential of Collagen Matrices by Covalent Incorporation of Heparin and Loading with Vascular Endothelial Growth Factor". In: *Tissue Engineering* 10.9/10, S. 1502–1509. DOI: 10.1089/ten.2004.10.1502.
- Stevens, B., Y. Yang, A. Mohandas, B. Stucker und K. T. Nguyen (2008). "A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues". In: *J Biomed Mater Res* 85B.2, S. 573–582.
- Stokes, C. L., D. A. Lauffenburger und S. K. Williams (1991). "Migration of individual microvessel endothelial cells: stochastic model and parameter measurement". In: *Journal of Cell Science* 99 ( Pt 2), S. 419–430.
- Sugita, I., M. Yoneda, M. Iwaki und M. Zako (2013). "Comparative analysis of hyaluronan's affinity for antivascular endothelial growth factor agents". In: *Ophthalmic research* 49.1, S. 43–48. DOI: 10.1159/000342975.
- Sundararaghavan, H. G., S. N. Masand und D. I. Shreiber (2011). "Microfluidic generation of haptotactic gradients through 3D collagen gels for enhanced neurite growth". In: *Journal of neurotrauma* 28.11, S. 2377–2387. DOI: 10.1089/neu.2010.1606.
- Sundararaghavan, H. G., G. A. Monteiro, B. L. Firestein und D. I. Shreiber (2009). "Neurite growth in 3D collagen gels with gradients of mechanical properties". In: *Biotechnol. Bioeng.* 102.2, S. 632–643. DOI: 10.1002/bit.22074.
- Sung, H.-W., W.-H. Chang, C.-Y. Ma und M.-H. Lee (2003). "Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide". In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 64.3, S. 427–438. DOI: 10.1002/jbm.a.10346.
- Suzuki, Y. und K. Yokoyama (2009). "Development of a fluorescent peptide for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF)". In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10.11, S. 1793–1795. DOI: 10.1002/cbic.200900190.
- Swann, D. A. und E. A. Balazs (1966). "Determination of the hexosamine content of macro-molecules with manual and automated techniques using the p-dimethylaminobenzaldehyde reaction". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 130.1, S. 112–129. DOI: 10.1016/0304-4165(66)90014-6.
- Szabó, A., R. Unnep, E. Méhes, W. O. Twal, W. S. Argraves, Y. Cao und A. Czirók (2010). "Collective cell motion in endothelial monolayers". In: *Physical biology* 7.4, S. 046007. DOI: 10.1088/1478-3975/7/4/046007.
- Taguchi, T., T. Ikoma und J. Tanaka (2002). "An improved method to prepare hyaluronic acid and type II collagen composite matrices". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 61.2, S. 330–336.

- 
- Takahashi, H. und T. Okano (2015). "Cell Sheet-Based Tissue Engineering for Organizing Anisotropic Tissue Constructs Produced Using Microfabricated Thermoresponsive Substrates". In: *Advanced healthcare materials* 4.16, S. 2388–2407. DOI: 10.1002/adhm.201500194.
- Takei, Y. G., T. Honma und A. Ito (2002). "Quantitation of hyaluronic acid in serum with automated microparticle photometric agglutination assay". In: *Journal of immunoassay & immunochemistry* 23.1, S. 85–94. DOI: 10.1081/IAS-120002276.
- Tamiello, C., A. B. C. Buskermolen, F. P. T. Baaijens, J. L. V. Broers und C. V. C. Bouten (2016). "Heading in the Right Direction: Understanding Cellular Orientation Responses to Complex Biophysical Environments". In: *Cellular and molecular bioengineering* 9, S. 12–37. DOI: 10.1007/s12195-015-0422-7.
- Tan, H., B. Wu, C. Li, C. Mu, H. Li und W. Lin (2015). "Collagen cryogel cross-linked by naturally derived dialdehyde carboxymethyl cellulose". In: *Carbohydrate polymers* 129, S. 17–24. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.029.
- Tan, N. S., T. Alekseeva und R. A. Brown (2014). "Roofed grooves: Rapid layer engineering of perfusion channels in collagen tissue models". In: *Journal of Biomaterials Applications* 29.4, S. 605–616.
- Tang, M. D., A. P. Golden und J. Tien (2004). "Fabrication of Collagen Gels That Contain Patterned, Micrometer-Scale Cavities". In: *Advanced Materials* 16.15, S. 1345–1348. DOI: 10.1002/adma.200400766.
- Tang, M. D., A. P. Golden und J. Tien (2003). "Molding of three-dimensional microstructures of gels". In: *Journal of the American Chemical Society* 125.43, S. 12988–12989. DOI: 10.1021/ja037677h.
- Tang, S., S. M. Vickers, H.-P. Hsu und M. Spector (2007). "Fabrication and characterization of porous hyaluronic acid-collagen composite scaffolds". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 82A.2, S. 323–335.
- Tang, X. und J. E. Bruce (2009). "Chemical cross-linking for protein-protein interaction studies". In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 492, S. 283–293. DOI: 10.1007/978-1-59745-493-3{\\textunderscore}17.
- Teixeira, A. I., G. A. Abrams, P. J. Bertics, C. J. Murphy und P. F. Nealey (2003). "Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates". In: *Journal of Cell Science* 116.Pt 10, S. 1881–1892. DOI: 10.1242/jcs.00383.
- Thakar, R. G., F. Ho, N. F. Huang, D. Liepmann und S. Li (2003). "Regulation of vascular smooth muscle cells by micropatterning". In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307.4, S. 883–890. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)01285-3.
- Thermo Fisher Scientific (2008). *Amine-Reactive Probe Labeling Protocol*.
- Thomas, V., D. R. Dean, M. V. Jose, B. Mathew, S. Chowdhury und Y. K. Vohra (2007). "Nanostructured biocomposite scaffolds based on collagen coelectrospun with nanohydroxyapatite". In: *Biomacromolecules* 8.2, S. 631–637. DOI: 10.1021/bm060879w.
- Thompson, D. F., W. Eborall, A. Dinsmore, C. J. Smith und C. J. Duckett (2010). "Development and validation of a NANOGold immunoassay for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human serum using inductively coupled plasma mass spectrometry". In: *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 24.7, S. 927–932. DOI: 10.1002/rcm.4456.

- Toole, B. P. (2004). "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue". In: *Nature reviews. Cancer* 4.7, S. 528–539. DOI: 10.1038/nrc1391.
- Torbet, J. und M. C. Ronzière (1984). "Magnetic alignment of collagen during self-assembly". In: *The Biochemical journal* 219.3, S. 1057–1059. DOI: 10.1042/bj2191057.
- Ulery, B. D., L. S. Nair und C. T. Laurencin (2011). "Biomedical applications of biodegradable polymers". In: *J Polym Sci B Polym Phys* 49.12, S. 832–864.
- UniProt (2017). *UniProt: The universal protein knowledgebase*.
- Uttayarat, P., A. Perets, M. Li, P. Pimton, S. J. Stachelek, I. Alferiev, R. J. Composto, R. J. Levy und P. I. Leikes (2010). "Micropatterning of three-dimensional electrospun polyurethane vascular grafts". In: *Acta biomaterialia* 6.11, S. 4229–4237. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.06.008.
- Uttayarat, P., G. K. Toworfe, F. Dietrich, P. I. Leikes und R. J. Composto (2005). "Topographic guidance of endothelial cells on silicone surfaces with micro- to nanogrooves: Orientation of actin filaments and focal adhesions". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 75A.3, S. 668–680. DOI: 10.1002/jbm.a.30478.
- Vader, D., A. Kabla, D. Weitz und L. Mahadevan (2009). "Strain-induced alignment in collagen gels". In: *PloS one* 4.6, e5902. DOI: 10.1371/journal.pone.0005902.
- Vartanian, K. B., S. J. Kirkpatrick, S. R. Hanson und M. T. Hinds (2008). "Endothelial cell cytoskeletal alignment independent of fluid shear stress on micropatterned surfaces". In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371.4, S. 787–792. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.04.167.
- Vernon, R. B., M. D. Gooden, S. L. Lara und T. N. Wight (2005a). "Microgrooved fibrillar collagen membranes as scaffolds for cell support and alignment". In: *Biomaterials* 26.16, S. 3131–3140. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.011.
- (2005b). "Native Fibrillar Collagen Membranes Of Micron-scale And Submicron Thicknesses For Cell Support And Perfusion". In: *Biomaterials* 26.10, S. 1109–1117. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.019.
- Versteegden, L. R., K. A. van Kampen, H. P. Janke, D. M. Tiemessen, H. R. Hoogenkamp, T. G. Hafmans, E. A. Roozen, R. M. Lomme, H. van Goor, E. Oosterwijk, W. F. Feitz, T. H. van Kuppevelt und W. F. Daamen (2017). "Tubular collagen scaffolds with radial elasticity for hollow organ regeneration". In: *Acta biomaterialia* 52, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.02.005.
- Voge, C. M., M. Kariolis, R. A. MacDonald und J. P. Stegemann (2008). "Directional conductivity in SWNT-collagen-fibrin composite biomaterials through strain-induced matrix alignment". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 86.1, S. 269–277. DOI: 10.1002/jbm.a.32029.
- Vrana, N. E., A. Elsheikh, N. Builles, O. Damour und V. Hasirci (2007). "Effect of human corneal keratocytes and retinal pigment epithelial cells on the mechanical properties of micropatterned collagen films". In: *Biomaterials* 28.29, S. 4303–4310. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.013.
- Walters, B. D. und J. P. Stegemann (2014). "Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales". In: *Acta biomaterialia* 10.4, S. 1488–1501. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.08.038.
- Walton, H. L., M. H. Corjay, S. N. Mohamed, S. A. Mousa, L. D. Santomena und T. M. Reilly (2000). "Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5)

- 
- in cultured human endothelial cells". In: *Journal of Cellular Biochemistry* 78.4, S. 674–680. DOI: 10.1002/1097-4644(20000915)78:4<\textless\textless\674::aid-jcb16{\textgreater\textgreater}3.0.co;2-g.
- Wang, J. H.-C., F. Jia, T. W. Gilbert und S. L.-Y. Woo (2003). "Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix". In: *Journal of Biomechanics* 36.1, S. 97–102.
- Wang, P.-Y., W.-T. Li, J. Yu und W.-B. Tsai (2012). "Modulation of osteogenic, adipogenic and myogenic differentiation of mesenchymal stem cells by submicron grooved topography". In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 23.12, S. 3015–3028. DOI: 10.1007/s10856-012-4748-6.
- Wang, T.-W. und M. Spector (2009). "Development of hyaluronic acid-based scaffolds for brain tissue engineering". In: *Acta biomaterialia* 5.7, S. 2371–2384. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.03.033.
- Wang, Y., X. Wang, J. Shang, H. Liu, Y. Yuan, Y. Guo, B. Huang und Y. Zhou (2017). "Repairing the ruptured annular fibrosus by using type I collagen combined with citric acid, EDC and NHS: an in vivo study". In: *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 26.3, S. 884–893. DOI: 10.1007/s00586-016-4898-1.
- Wang, D.-Y., Y.-C. Huang, H. Chiang, A. M. Wo und Y.-Y. Huang (2007). "Microcontact printing of laminin on oxygen plasma activated substrates for the alignment and growth of Schwann cells". In: *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 80.2, S. 447–453. DOI: 10.1002/jbm.b.30616.
- Watari, S., K. Hayashi, J. A. Wood, P. Russell, P. F. Nealey, C. J. Murphy und D. C. Genetos (2012). "Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves". In: *Biomaterials* 33.1, S. 128–136. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.058.
- Weich, H. A., H. Bando, M. Brokelmann, P. Baumann, M. Toi, B. Barleon, K. Alitalo, B. Sipos und J. Sleeman (2004). "Quantification of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) by a novel ELISA". In: *Journal of Immunological Methods* 285.2, S. 145–155.
- Weis, J. R., B. Sun und G. M. Rodgers (1991). "Improved method of human umbilical arterial endothelial cell culture". In: *Thrombosis research* 61.2, S. 171–173.
- Weiss, P. (1945). "Experiments on cell and axon orientation in vitro: The role of colloidal exudates in tissue organization". In: *J. Exp. Zool.* 100.3, S. 353–386.
- Welch, M. D. und R. D. Mullins (2002). "Cellular control of actin nucleation". In: *Annual review of cell and developmental biology* 18, S. 247–288. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.18.040202.112133.
- West, D. C., I. N. Hampson, F. Arnold und S. Kumar (1985). "Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid". In: *Science* 228.4705, S. 1324–1326. DOI: 10.1126/science.2408340.
- Wilkinson, C., M. Riehle, M. Wood, J. Gallagher und A. Curtis (2002). "The use of materials patterned on a nano- and micro-metric scale in cellular engineering". In: *Materials Science and Engineering: C* 19.1-2, S. 263–269. DOI: 10.1016/S0928-4931(01)00396-4.
- Wlodarczyk-Biegun, M. K. und A. del Campo (2017). "3D bioprinting of structural proteins". In: *Biomaterials* 134, S. 180–201. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.04.019.
- Wu, J., Changming Hu, Zengchao Tang, Qian Yu, Xiaoli Liu und Hong Chen (2018). "Tissue-engineered Vascular Grafts: Balance of the Four Major Requirements". In: *Colloid and Interface Science Communications* 23, S. 34–44. DOI: 10.1016/j.colcom.2018.01.005.

- Wu, X., A. Liu, W. Wang und R. Ye (2018). "Improved mechanical properties and thermal-stability of collagen fiber based film by crosslinking with casein, keratin or SPI: Effect of crosslinking process and concentrations of proteins". In: *International journal of biological macromolecules* 109, S. 1319–1328. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.144.
- Wu, X., L. Black, G. Santacana-Laffitte und C. W. Patrick (2007). "Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering". In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 81.1, S. 59–65. DOI: 10.1002/jbm.a.31003.
- Xu, W., R. Hu, E. Fan und D. Han (2011). "Adipose-derived mesenchymal stem cells in collagen-hyaluronic acid gel composite scaffolds for vocal fold regeneration". In: *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 120.2, S. 123–130. DOI: 10.1177/000348941112000209.
- Xue, M. und C. J. Jackson (2015). "Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring". In: *Advances in wound care* 4.3, S. 119–136. DOI: 10.1089/wound.2013.0485.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand und J. Holash (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation". In: *Nature* 407.6801, S. 242–248. DOI: 10.1038/35025215.
- Yang, Y., M. Ahearne, I. Wimpenny und J. Torbet (2009). "Monitoring the effect of magnetically aligned collagen scaffolds on tendon tissue engineering by PSOCT". In: *Optics in Tissue Engineering and Regenerative Medicine III*. Hrsg. von S. J. Kirkpatrick und R. Wang. SPIE Proceedings. SPIE, S. 717903. DOI: 10.1117/12.809231.
- Yin, A., K. Zhang, M. J. McClure, C. Huang, J. Wu, J. Fang, X. Mo, G. L. Bowlin, S. S. Al-Deyab und M. El-Newehy (2013). "Electrospinning collagen/chitosan/poly(L-lactic acid-co- $\epsilon$ -caprolactone) to form a vascular graft: mechanical and biological characterization". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 101.5, S. 1292–1301. DOI: 10.1002/jbm.a.34434.
- Zeltz, C. und D. Gullberg (2016). "The integrin-collagen connection—a glue for tissue repair?" In: *Journal of Cell Science* 129.4, S. 653–664. DOI: 10.1242/jcs.180992.
- Zeugolis, D. I., S. T. Khew, E. S. Y. Yew, A. K. Ekaputra, Y. W. Tong, L.-Y. L. Yung, D. W. Hutmacher, C. Sheppard und M. Raghunath (2008). "Electro-spinning of pure collagen nano-fibres - just an expensive way to make gelatin?" In: *Biomaterials* 29.15, S. 2293–2305. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.02.009.
- Zeugolis, D. I., G. R. Paul und G. Attenburrow (2009). "Cross-linking of extruded collagen fibers—a biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications". In: *J. Biomed. Mater. Res.* 89.4, S. 895–908. DOI: 10.1002/jbm.a.32031.
- Zhang, J., B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J.-C. Voegel und P. Lavalle (2005). "Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid". In: *Biomaterials* 26.16, S. 3353–3361.
- Zhao, W., S. A. McCallum, Z. Xiao, F. Zhang und R. J. Linhardt (2012). "Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides". In: *Bioscience reports* 32.1, S. 71–81. DOI: 10.1042/BSR20110077.

- 
- Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, J. Brown, A. Shaub, A. M. Belkin und K. Burridge (1998). "Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly". In: *The Journal of cell biology* 141.2, S. 539–551. DOI: 10.1083/jcb.141.2.539.
- Zhou, F., L. Yuan, H. Huang und H. Chen (2009). "Phenomenon of "contact guidance" on the surface with nano-micro-groove-like pattern and cell physiological effects". In: *Chinese Science Bulletin* 54.18, S. 3200–3205. DOI: 10.1007/s11434-009-0366-1.
- Zicha, D., G. A. Dunn und A. F. Brown (1991). "A new direct-viewing chemotaxis chamber". In: *Journal of Cell Science* 99 ( Pt 4), S. 769–775.
- Zigmond, S. H. und J. G. Hirsch (1973). "Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor". In: *The Journal of experimental medicine* 137.2, S. 387–410. DOI: 10.1084/jem.137.2.387.
- Zollinger, A. J. und M. L. Smith (2017). "Fibronectin, the extracellular glue". In: *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 60-61, S. 27–37. DOI: 10.1016/j.matbio.2016.07.011.
- Zorlutuna, P., A. Elsheikh und V. Hasirci (2009). "Nanopatterning of collagen scaffolds improve the mechanical properties of tissue engineered vascular grafts". In: *Biomacromolecules* 10.4, S. 814–821. DOI: 10.1021/bm801307y.
- Zorlutuna, P., N. Hasirci und V. Hasirci (2008). "Nanopatterned collagen tubes for vascular tissue engineering". In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2.6, S. 373–377. DOI: 10.1002/term.99.
- Zorlutuna, P., P. Vadgama und V. Hasirci (2010). "Both sides nanopatterned tubular collagen scaffolds as tissue-engineered vascular grafts". In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 4.8, S. 628–637. DOI: 10.1002/term.278.

# Abbildungsverzeichnis

2.1. Die Extrazelluläre Matrix. . . . .	5
2.2. Struktureller Aufbau und Assemblierung der COL_I-Fibrille in vivo. . . . .	6
2.3. Bindungsdomänen des FN mit zellmembranständigen Integrinen und anderen ECM-Komponenten. . . . .	9
2.4. Wirkungsweise von VEGF in der Angiogenese. . . . .	11
2.5. Mechanismen des CONTACT GUIDANCE beim Zellwachstum auf anisotropen Mikro- und Nanotopographien. . . . .	16
2.6. Intra- und extrazelluläre Vorgänge bei der chemotaktischen Migration von EC. . . . .	17
2.7. Aktuelle Strategien im Tissue Engineering. . . . .	19
2.8. Ablauf und Resultat des Plastic-Compression-Prozesses . . . . .	29
2.9. Ausgerichtete Zellen auf 2D und pseudo-3D anisotropen Mikrostrukturen aus COL I. . . . .	33
3.1. Abbildung bzw. schematische Darstellung (a) der Apparatur für die Kultivierung von HUVEC, (b) der Bewertung der Verteilung von HUVEC am Beispiel der Struktur B40A80T20 und (c) zur Ermittlung des Ausrichtungswinkels von HUVEC auf mikrostrukturierten COL I-Membranen am Beispiel der Struktur B40A80T20. . . . .	58
4.1. Prozessschritte zur Herstellung von 2 Varianten planarer COL I-Membranen . . . . .	62
4.2. Verbleibende HA-Masse in (a) unvernetzten und (b) EDC-vernetzten COL I-HA-Membranen. . . . .	66
4.3. Verbleibende FN-Masse in COL I-Membranen. . . . .	68
4.4. Proliferationsverhalten von HUVEC auf COL I-HA- bzw. COL I-FN-Membranen . . . . .	69
4.5. Übersicht der geplanten zwei Verfahren zur Erzeugung von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen. . . . .	72
4.6. REM-Aufnahmen von COL I-Membranen nach druckloser Abformung vom PDMS-Master mit der Mikrostruktur B20A40T20. . . . .	73
4.7. REM-Aufnahmen nach druckloser Abformung von PDMS-Mastern. Die PDMS-Master wurden mit O <sub>2</sub> -Plasma behandelt. . . . .	74
4.8. Schematische Darstellung des Druckumformverfahrens. . . . .	76
4.9. REM-Aufnahmen von (a) COL I-Membran nach Druckumformung mit Si-Master (Mikrostruktur B20A40T20), (b) Si-Master nach Druckumformung und (c) COL I-Membran nach Druckumformung mit PDMS-Master (Mikrostruktur B40A80T20). . . . .	78
4.10. Schematische Darstellung des Verfahrens zur thermischen Umformung von Thermo- plasten. . . . .	80

4.11. Analyseergebnisse der mechanischen Stabilität von mikrostrukturierten PS-Mastern. . . . .	83
4.12. Analyseergebnisse der angewendeten Druckkraft und Weiterentwicklung des Druckumformverfahrens durch Integration einer Druckfeder. . . . .	85
4.13. Einfluss der chemischen Vernetzung durch EDC auf den Erhalt von Mikrostrukturen während Quellung der COL I-Membran. . . . .	87
4.14. REM-Aufnahmen von Mikrostreifen und Mikrospitzstreifen auf COL I-Membranen. Diese wurden durch Druckumformung mit Druckfeder bei 950 N vom PDMS-Master abgeformt. . . . .	89
4.15. Anteil HUVEC in den Gräben auf PS-Master und COL I-Membran mit der Mikrostruktur B20A40T20 (rechteckiger Querschnitt) ohne und nach Zentrifugation für 5 min bei 1.000 1/min sowie auf COL I-Membran mit den Mikrostrukturen B <sub>5</sub> 5A <sub>5</sub> 15T3,3 und B <sub>5</sub> 15A <sub>5</sub> 5T10 (dreieckiger Querschnitt). . . . .	93
4.16. Darstellung der Ausrichtung des Cytoskeletts von HUVEC auf (a) planarer COL I-Membran und (b)-(f) mikrostrukturierter COL I-Membran. . . . .	95
4.17. Oberflächenkonzentrationen von (a) BSA und (b) HYAL auf COL I-Membranen nach Inkubation in Proteinlösungen mit unterschiedlicher Konzentration und Dauer sowie Querschnitt einer COL I-Membran nach Inkubation in 100 µg/mL BSA-TAMRA. . . . .	98
4.18. Schematische Darstellung der Immersionsapparatur zur Erzeugung von Proteingradienten auf COL I-Membranen. . . . .	101
4.19. Oberflächenkonzentrationen von BSA und HYAL auf den Segmenten 1 - 5 von COL I-Membranen nach computergesteuerter Immersion in 500 µg/mL und 100 µg/mL BSA-Lösung bzw. 10 µg/mL und 0,5 µg/mL HYAL-Lösung. . . . .	103
4.20. Oberflächenkonzentration von VEGF auf den Segmenten 1 - 5 von COL I-basierten Membranen nach definierter Immersion in verschiedene VEGF-Lösungen. . . . .	106
4.21. Boxplot-Darstellung der mittleren Migrationsgeschwindigkeit von HUVEC entlang der x-Achse auf reinen COL I-Membranen ohne sowie auf COL I- bzw. COL I-HA-Membranen mit VEGF-Gradienten. . . . .	108
A.1. Übersichtsdarstellung des gesamten 3-stufigen Prozesses zur Mikrostrukturerzeugung auf COL I-Membranen, bestehend aus PDMS-Casting, Thermoumformung und Druckumformung. . . . .	156
A.2. Qualitative und quantitative Ergebnisse der Isolierung von COL I aus dem Rattenschwanz und FN aus humanem Blutplasma. . . . .	159
A.3. Turbidimetrische Analyse der Co-Fibrillogenese von 2 mg/mL COL I mit verschiedenen Konzentrationen von HA und FN. . . . .	161
A.4. REM-Darstellung von mikrostrukturierten PS-Mastern (a, b) und COL I-Membranen (c, d) mit Mikronoppen/-kavitäten (a, c) bzw. Mikrokeilstrukturen (b, d). . . . .	162

# Tabellenverzeichnis

2.1. Typische Rezeptoren, übliche Liganden und Wirkung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung bei EC. . . . .	13
2.2. Potentielle chemische Vernetzer für COL I-basierte Hydrogele. . . . .	28
2.3. Drucklose Abformungstechniken zur Erzeugung von Pseudo-3D Mikrostrukturen auf COL I-Membranen und -Filmen zur Beeinflussung des Zellwachstums. . . . .	35
2.4. Druckumformtechniken zur Erzeugung von Pseudo-3D Mikrostrukturen auf COL I-Membranen und -Filmen. . . . .	36
2.5. Techniken zur Erzeugung von VEGF-Gradienten auf/in COL I-Scaffolds. . . . .	40
3.1. Lösungen für die Isolierung von FN aus humanem Blutplasma. . . . .	44
3.2. Lösungen für die Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen und die Durchführung der SDS-PAGE. . . . .	45
3.3. Parameter und Eigenschaften der Varianten der COL I-Membranen. . . . .	47
3.4. Übersicht der Maße und effektiven Kontaktfläche der mikrostrukturierten Si-Wafer. . .	49
3.5. Zusammensetzung der Lösungen für den VEGF-spezifischen ELISA. . . . .	55
3.6. Initiale HUVEC-Anzahl für die Bestimmung der Proliferationsrate auf COL I-HA- bzw. COL I-FN-Membranen. . . . .	57
4.1. Wiedergefundene HA-Konzentration in COL I-basierten Membranen mit HA-Anfangskonzentrationen von 100, 500 und 1.000 µg HA pro 1 mg COL I. . . . .	64
4.2. Materialeigenschaften der angewendeten Thermoplaste, optimierte Prozessparameter des Thermoumformverfahrens für den jeweiligen Thermoplast und maximale Druckstabilität der mit diesen Prozessparametern erzeugten Mikrostruktur B20A40T20 auf den Kunststoffstempeln. . . . .	81
4.3. Übersicht der Deformationen der Mikrostrukturen auf PS-Stempeln nach Krafteinwirkung von mindestens 600N. . . . .	84
4.4. Übersicht der Maße von Grabenbreite (B), Grabenabstand (A) und Grabentiefe (T) von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen nach der Druckumformung. . . . .	90
4.5. Übersicht der aufgetretenen lokalen oder flächendeckenden Fehlstellen bei der Erzeugung von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen durch Druckumformung mit PS-Mastern. . . . .	91
4.6. Molekülmasse, Isoelektrischer Punkt (pI) und Labelgrad mit TAMRA-SE (DoL) von BSA, HYAL und VEGF-165. . . . .	97

---

4.7. Konstanten $a$ und $b$ sowie das Bestimmtheitsmaß $R^2$ der durch Anpassung der Beladungs- Zeit-Verläufe erzeugten Graphen. Die Gesamtimmersionszeit beschreibt die Gesamt- dauer des vollständigen Eintauchens der Membran in die Proteinlösung. . . . .	100
A.1. Verwendete Geräte . . . . .	151
A.2. Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Nährmedien. . . . .	152
A.3. Verwendete biologische Materialien . . . . .	155

# A. Anhang

## A.1. Geräte, Chemikalien, biologische Materialien und Nährmedien

Die verwendeten Geräte, Chemikalien, Nährmedien und biologischen Materialien sind in Tabelle A.1, Tabelle A.2 und Tabelle A.3 aufgelistet.

Tabelle A.1.: Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Biofuge Primo R	Thermo Scientific Heraeus
Multifuge 1SR	Thermo Scientific Heraeus
Heizplatte MR Hei-Standard	Heidolph
Schrittmotor Typ EM-43 (48 Schritte/Umdrehung) für die Immersionsapparatur	Epson
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Roth
Spektralphotometer Specord 250 Plus	Analytik Jena
Ultra-Turrax	IKA-Werke
Ultraschallbad SONOREX SUPER RK 514 BH	Bandelin
Rasterelektronenmikroskop XL-30	Philips
Rasterelektronenmikroskop XL-30 ESEM FEG (im IPF DD)	FEI-Philips
Optisches 3D-Profilometer Sensofar S neox	Keyence
Vakuum-Plasmaanlage Plasma Clean 4	Ilmvac
Drucksensor Typ 8415	Burster Präzisionstechnik
Microcontroller UNO	Arduino
Orbitalschüttler Unimax 2010	Heidolph
Glasgeräte zur sauren Gasphasenhydrolyse	Glasbläserei Hellbach

Fortsetzung auf nächster Seite

---

Fortsetzung von Tabelle A.1

Gerätebezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzphotometer Fluoromax-4	Horiba
Sputter-Coater K 550	Emitech
Stereomikroskop	
Kryomikrotom Microm HM 550	Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop IX-81	Olympus
Plattenreader SUNRISE	TECAN
Inkubator CB150 (für Zellkultur)	Binder
INUG2A/E-ONICS CO2	Tokai Hit Co., Ltd.
Stage-Top-Mikroskopinkubator	
Phasenkontrastmikroskop CKX-41	Olympus

Tabelle A.2.: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Materialien und Nährmedien.

Produkt	Hersteller
Ethanol (p.A.)	Roth, VWR
Collagen Typ I (PureCol)	Advanced Biomatrix
Natriumhydroxid	Roth
PBS	Biochrom, Applichem, Fisher Scientific, PAA
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Merck
Kunststoff-Chromatographiesäulen	Bio-Rad
Säulenverbinder	Bio-Rad
Phenyl-Sepharose CL4B	Sigma Aldrich
Gelatine-Agarose	Sigma Aldrich
Essigsäure	Roth
Harnstoff	VWR
TRIS	VWR
Zitronensäure	Roth
Natriumchlorid	Roth
Ammoniumsulfat	Roth

Fortsetzung auf nächster Seite

Fortsetzung von Tabelle A.2

Produkt	Hersteller
Glycin	Alfa Aesar
Natriumazid	VWR
Sirius Red (Direct Red 80)	Sigma Aldrich
Pikrinsäure	Sigma Aldrich
Micro BCA Assay Kit	Pierce, USA
Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Scientific
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific
Acrylamid-2K-Mix	AppliChem
Natriumdodecylsulfat	VWR
Ammoniumpersulfat	AppliChem
TEMED	AppliChem
Glycerin	Roth
Mercaptoethanol	Fluka
Bromphenolblau	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue R-250	VWR
Methanol	Roth
Hyaluronsäure	Sigma Aldrich
Fibronectin	Selbsterzeugtes Isolat aus humanem Blutplasma
Hyaluronidase-1	Sigma Aldrich
TAMRA-SE	Thermo Fisher Scientific
Chromatographiesäule Illustra NAP-5 Sephadex G-25	GE Healthcare
Dimethylformamid	Roth
Borsäure	Roth
Hydroxylammoniumchlorid	Merck
Bovines Serumalbumin	Roth
PDMS Sylgard 184®	Dow Corning
Nylon-Filterpapier	PALL Life Sciences

Fortsetzung auf nächster Seite

---

Fortsetzung von Tabelle A.2

---

Produkt	Hersteller
Blottingpapier	Whatman
Mikrostrukturierte Si-Wafer (rechteckiger Querschnitt der Mikrostrukturen)	Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH (GeSiM mbH)
Mikrostrukturierte Si-Wafer (dreieckiger Querschnitt der Mikrostrukturen)	Leibniz- Institut für innovative Mikroelektronik
(Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl) dimethylchlorosilan	ABCR GmbH
Teflonkarussell	Entegris GmbH
Quarzglasschale	Roth
30 % Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich
30 % Ammoniak	Roth
Toluol p.A.	Roth
Polystyren	Gutta Gliss
Polycarbonat	PCH Technischer Handel
Styrol-Acrylnitril-Copolymer	PCH Technischer Handel
Polyoxymethylen	PCH Technischer Handel
Polyethylen	PCH Technischer Handel
Polypropylen	PCH Technischer Handel
Stickstoff (Gas)	Air Products
Sauerstoff (Gas BIP)	Air Products
Aceton (p.A.)	Roth, VWR
EDC	Fluka Chemie AG
Humanes VEGF-A <sub>165</sub>	CellSystems GmbH
Papain	Applichem
L-Cystein	Labor Service GmbH
Collagenase Typ 1A	Sigma Aldrich
EDTA	VWR
DMEM	Biochrom AG
Fetales Kälberserum	PAA

---

Fortsetzung auf nächster Seite

Fortsetzung von Tabelle A.2

Produkt	Hersteller
L-Glutamin	Biochrom AG
Rauchende Salzsäure	Roth
Triethylamin	Merck
Acetylaceton	Merck
Natriumcarbonat	Acros Organics
4-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)-benzaldehyd	Merck
Human VEGF ELISA Kit	PeptoTech
100 x Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B	Biochrom AG
Verschiedenes Einwegmaterial für die Zellkultur	Biochrom AG, VWR
Endothelzellmedium Kit	PromoCell
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG
4 % Formaldehyd-Lösung	Biochrom AG
Phalloidin-TRITC	Sigma Aldrich

Tabelle A.3.: Verwendete biologische Materialien

Produkt	Bezugsquelle
Rattenschwänze	Medizinisch Theoretisches Zentrum Dresden
Humane Nabelschnur	Klinikum Niederlausitz GmbH
Humanes Blutplasma	Generic Assay GmbH

## A.2. Ergänzungen zu den Ergebnissen

### A.2.1. Übersicht des gesamten Prozesses der Mikrostrukturierung auf COL I-Membranen

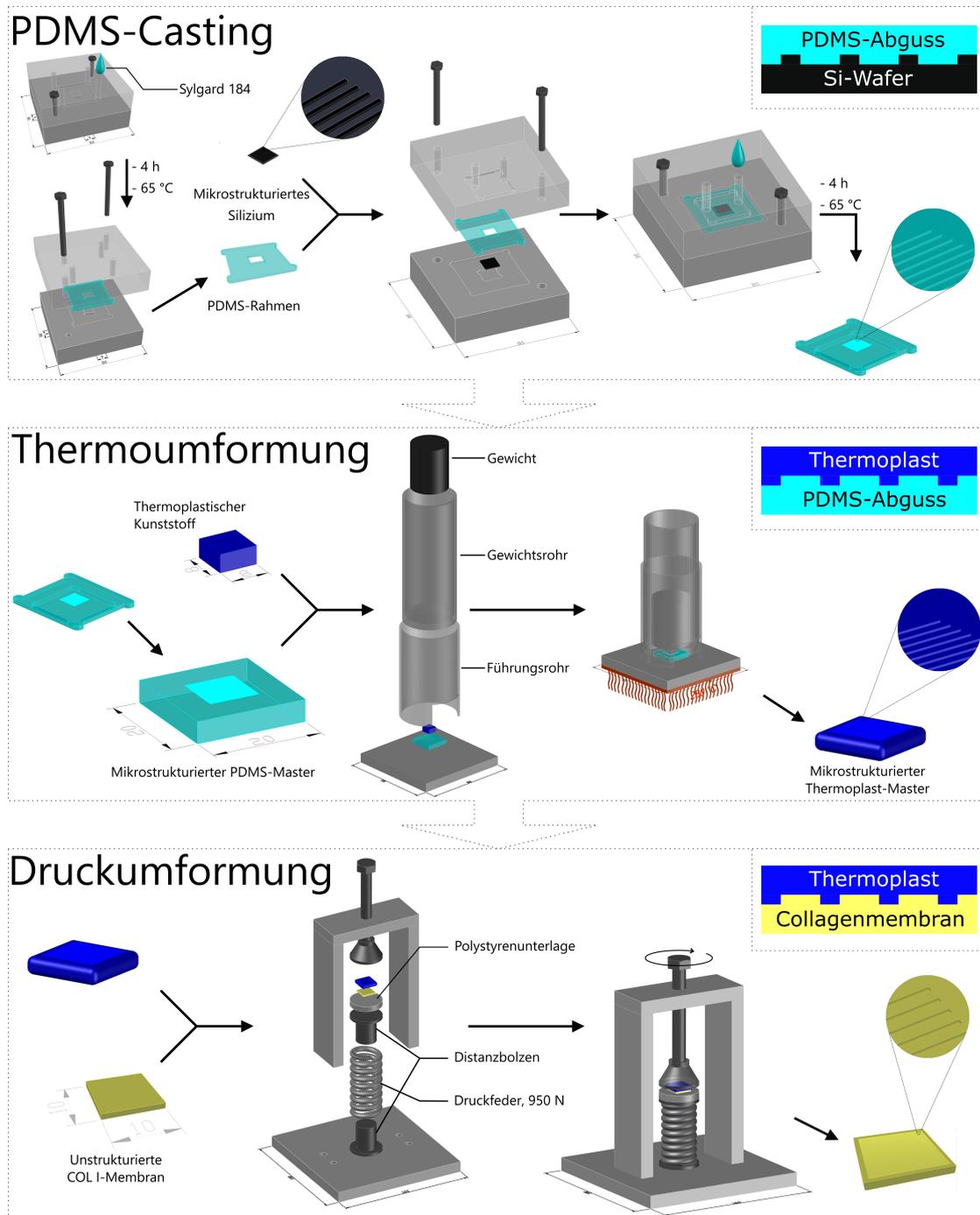


Abbildung A.1.: Übersichtsdarstellung des gesamten 3-stufigen Prozesses zur Mikrostrukturierung auf COL I-Membranen, bestehend aus PDMS-Casting, Thermoumformung und Druckumformung. Mikrostrukturen auf Silizium-Wafern wurden in PDMS-Master übertragen. Durch thermische Umformung konnten die Mikrostrukturen der PDMS-Master in Thermoplast-Master transferiert werden, welche wiederum mit einer Kraft von 950 N und unter gleichzeitiger Einwirkung von EDC, in COL I-Membranen gepresst wurden.

## A.2.2. Programm zur Steuerung des *Arduino Uno* Mikrokontrollers

Der *Arduino Uno* Mikrokontroller wurde über die Software *Arduino* 1.0.1 gesteuert. Folgender Programmquelltext wurde genutzt, um den Immersionsprozess der COL I-Membran in die jeweilige proteinhaltige Lösung zu realisieren:

```
1  /*
2  13 .. Clock
3  12 .. Enable
4  11 .. Richtung
5  10 .. +5V
6  9 .. GND
7  */
8  void setup() {
9      Serial.begin(9600);
10     // initialize the digital pin as an output.
11     // Pin 13 has an LED connected on most Arduino boards.
12     pinMode(13, OUTPUT);
13     pinMode(12, OUTPUT);
14     pinMode(11, OUTPUT);
15     pinMode(10, OUTPUT);
16     pinMode(9, OUTPUT);
17
18     digitalWrite(12, HIGH);
19     digitalWrite(11, HIGH);
20     digitalWrite(10, HIGH);
21     digitalWrite(9, LOW);
22 }
23
24 // NUR FÜR 500 ng/mL HYAL-LÖSUNG ODER VEGF-LÖSUNGEN
25
26 int schritte = 544;
27     //Benötigte Schrittmotorschritte zum vollständigen Eintauchen
28     //der Membran mit Kompensation des Flüssigkeitpegelanstiegs (
29     //realer Laufweg 7,62 mm)
30 long zeit = 20;
31     //Gesamtzeit der Eintauchphase in min
32 double a = 0.89;
33     //Protein- und konzentrationsabhängige Konstante aus der
34     //Anpassung
35 float b = 0.055;
```

---

```

33         //Protein- und konzentrationsabhängige Konstante aus der
           Anpassung
34     float q = a*(1-exp(-b*zeit));
35         //Maximal erzielbare Oberflächenkonzentration q bei
           festgelegter Gesamtimmersionszeit zeit
36     float y = q/schritte;
37         //gleichmäßige (linear) Aufteilung der maximal erzielbaren OF-
           Konzentration q auf die Schritte/Segmente
38     int incr = 0;
39         //Schrittwert
40     float tvorher = zeit*60000;
41     float time = 0;
42 void loop () {
43     if (incr < schritte)
44     {
45         incr++;
46         Serial.println(incr);
47         //Ausgabe des aktuellen Schritts
48         Serial.println("");
49         //prints another carriage return
50         digitalWrite(13, HIGH);
51         //set the LED on
52         float g = q - incr * y;
53         //Berechnet die Zielkonzentration für das Segment beim
           aktuellen Schritt(incr)
54         float t = -(log(1-g/a)/b) * 60000;
55         //Berechnet die Verweilzeit [ms] des aktuellen
           Segments in Abhängigkeit zum aktuellen Schritt(incr
           )
56         time = tvorher - t;
57         //Berechnung der Pausenzeit durch Abzug der aktuell
           berechneten Verweilzeit von der Verweilzeit des
           vorherigen Schritts/Segments
58         Serial.println(time);
59         //Ausgabe der Pausenzeit zwischen zwei
           Schrittmotorschritten
60         Serial.println("");
61         //prints another carriage return
62         digitalWrite(13,LOW);
63         //set the LED off

```

```

64         delay (time) ;
65             //Anwendung der Wartezeit
66         tvorher = t;
67             //Übergabe der aktuellen Verweilzeit zur vorherigen
68             Verweilzeit
69     }

```

### A.2.3. Isolierung, SDS-PAGE und Quantifizierung von COL I und FN

Die kostengünstige Bereitstellung der Proteine COL I und FN in großem Umfang ist wesentliche Grundlage für die in den Abschnitten 4.1, 4.2, 4.3 beschriebenen Untersuchungen. Daher wurde murines COL I aus den Sehnen des Rattenschwanzes durch Extraktion mit 35 mM Essigsäure und FN aus humanem Blutplasma durch Affinitätschromatographie selbst isoliert (s. Anleitungen in Abschnitt 3.1.1 auf Seite 43). Die resultierenden COL I- bzw. FN-Extrakte wurden anschließend qualitativ und quantitativ charakterisiert. Die Reinheit wurde durch SDS-PAGE analysiert. Die Quantifizierung des COL I erfolgte mittels Sirius Red-Assay, die des FN mittels BCA-Assay. Die Ergebnisse sind in Abbildung A.2 dargestellt.

Aus einem Rattenschwanz mit einer typischen Feuchtmasse von 7,3 g konnten im Durchschnitt 1,7 g Sehnenmaterial entnommen werden. Nach der Deassemblierung des COL I der Sehnen in 35 mM Essigsäure konnten etwa 14 % des darin enthaltenen COL I in Lösung überführt werden. Die mit

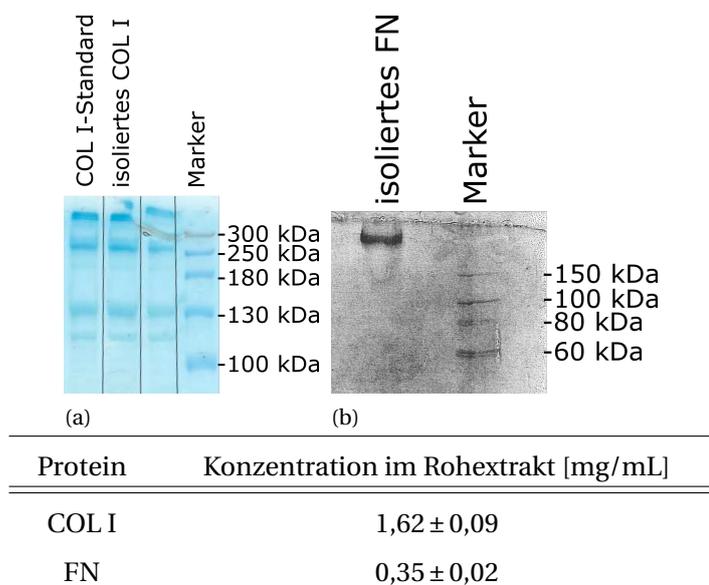


Abbildung A.2.: Qualitative und quantitative Ergebnisse der Isolierung von COL I aus dem Rattenschwanz und FN aus humanem Blutplasma. (a) SDS-PAGE des (a) COL I-Rohextrakts und (b) FN-Rohextrakts. Tabelle: Konzentrationen der Rohextrakte von COL I bzw. FN. COL I wurde mit dem Sirius Red-Assay und FN mit dem BCA-Assay quantifiziert.

---

3,2% ermittelte COL I-Ausbeute aus einem Rattenschwanz ist etwa um den sechsfachen Wert höher als die Ausbeute von 0,5%, die in der Literatur angegeben wird (Chandrakasan u. a. 1976). Die mit der Lösung durchgeführte SDS-PAGE zeigte 5 Banden, die als  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Monomere (94,9 kDa bzw. 93,5 kDa), als  $\alpha 1\alpha 1$ -,  $\alpha 1\alpha 2$ -Dimere (189,8 kDa bzw. 188,4 kDa) und als  $(\alpha 1)_2\alpha 2$ -Trimer (283,3 kDa) des COL I identifiziert werden konnten. Das erzeugte Bandenmuster war beim isolierten COL I und beim COL I-Standard identisch. Die SDS-PAGE zeigte außerdem eine Verschiebung aller ermittelten Banden in Richtung höherer Molekulargewichte. So wurden die Banden für das Monomer  $\alpha 1$  bei 115 kDa und für  $\alpha 2$  bei 130 kDa gefunden. Das wird darauf zurückgeführt, dass COL I ein stäbchenförmiges Skleroprotein ist und im Vergleich zu globulären Proteinen einer verminderten Diffusion durch die Poren des Acrylamidgels unterliegt und dadurch eine Erhöhung der Retention auftritt.

Aus 100 mL humanem Blutplasma konnten durchschnittlich 35 mg FN isoliert werden. Die Konzentration von FN im humanen Blutplasma wird mit etwa 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  angegeben (Hynes und Rich 1990). Durch die angewendete Affinitätschromatographie mit Gelatine-Agarose konnte dieser Wert nach der Isolierung in etwa erreicht werden. Die SDS-PAGE der isolierten FN-Lösung zeigte, dass neben dem Zielprotein mit einem Molekulargewicht von 259,6 kDa keine weiteren Proteine enthalten waren. Die angewendete Affinitätschromatographie besitzt daher zwei Vorteile: (1) Das gesamte FN konnte aus dem Blutplasma gewonnen werden. (2) Das Isolat enthielt nur FN und keine weiteren, mittels SDS-PAGE messbaren Proteinbestandteile. Im Anschluss wurde das enthaltene FN mit Ammoniumsulfat gefällt und neu gelöst, sodass eine 1 mg/mL FN-Lösung zur Verfügung stand.

#### **A.2.4. Einfluss von FN und HA auf die Dauer der COL I-Fibrillogenese**

Eine weitere Voraussetzung für die Erzeugung stabiler COL I-basierter Membranen ist die Charakterisierung des Einflusses verschiedener HA- oder FN-Konzentrationen auf die Dauer der COL I-Fibrillogenese. Speziell für GAG ist bekannt, dass sie einen maßgeblichen Effekt auf die COL I-Fibrillogenese haben (Salchert u. a. 2004). Diese Informationen sollten im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf den Prozess zur Membranherstellung angewendet werden. Daher wurde die Kinetik der *in vitro* COL I-Reassemblierung in Gegenwart von HA-Konzentrationen im Bereich von 0-1.000  $\mu\text{g}$  HA pro mg COL I sowie mit FN-Konzentrationen im Bereich von 0-50  $\mu\text{g}$  FN pro mg COL I turbidimetrisch bei 400 nm untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung A.3 dargestellt.

Die Anwesenheit von HA und FN während der COL I-Fibrillogenese führte in allen Fällen zu Sigmoidalkurven mit ausgeprägten lag- und Plateau-Phasen. Besonders in Anwesenheit von FN war mit steigender FN-Konzentration eine Verlängerung der lag-Phase und der Gesamtzeit für die COL I-Fibrillogenese zu erkennen. Außerdem nahm die maximal erreichbare Absorption deutlich ab. Als Ursache dafür wird angenommen, dass die im FN-Molekül bekannten spezifischen Bindungsdomänen für COL I (Pankov und Yamada 2002; Erat u. a. 2010) zur sterischen Hinderung der Tropocollagenaggregation während der Fibrillogenese führten. Daher wurde auch die Bildung von Mikrofibrillen in der lag-Phase verzögert und die weitere Aggregationsgeschwindigkeit deutlich gesenkt. In der Summe verlängerte sich die Zeit, bis die Fibrillogenese beendet war.

Dagegen waren in Anwesenheit von HA kaum Änderungen in der Fibrillenbildungskinetik des COL I

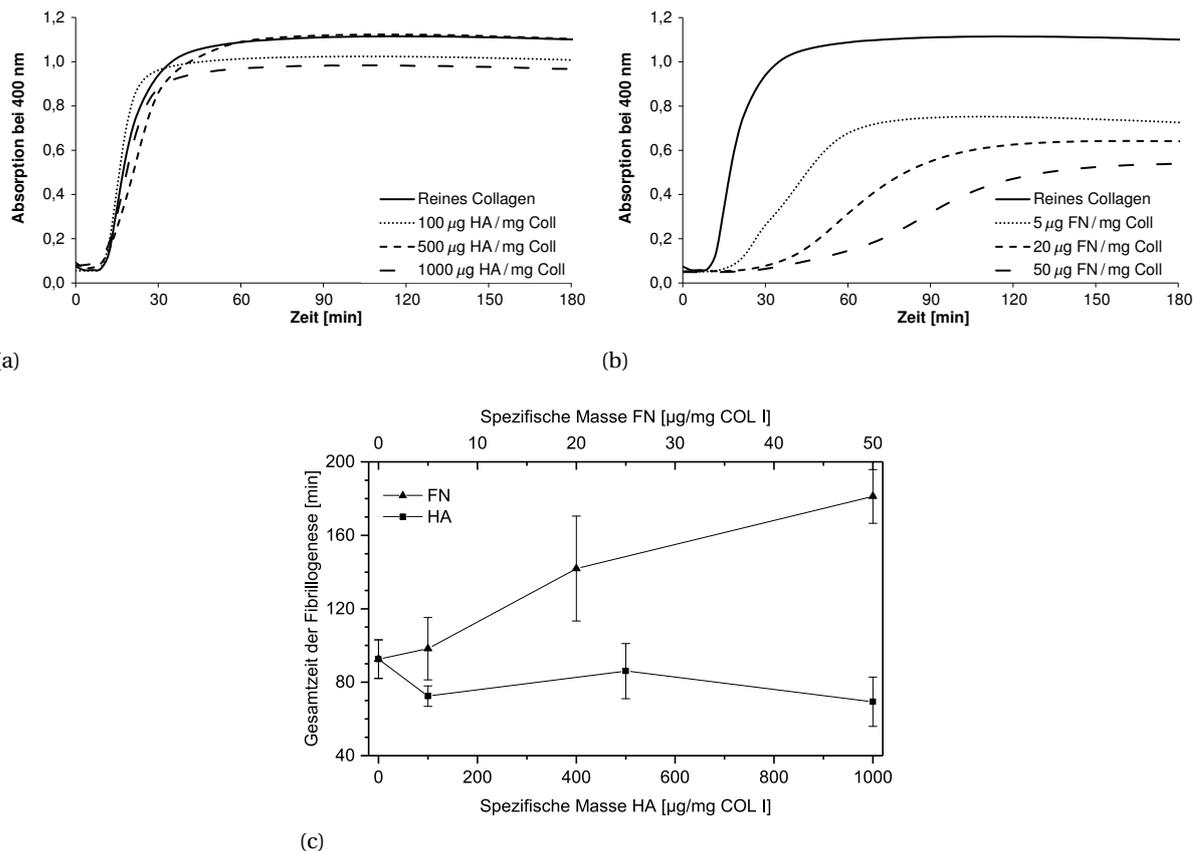


Abbildung A.3.: Turbidimetrische Analyse der Co-Fibrillogenese von 2 mg/mL COL I und (a) HA mit Konzentrationen im Bereich von 0-1.000 µg pro mg COL I und (b) von FN mit Konzentrationen im Bereich von 0-50 µg pro mg COL I. Die Trübungsänderung der Lösungen wurde bei pH = 7,4 und 37 °C spektralphotometrisch bei 400 nm über einen Zeitraum von 3 Stunden verfolgt. n = 8. Darstellung der Mittelwerte ohne Standardabweichung. (c) Gesamtzeit für die Co-Fibrillogenese von COL I mit verschiedenen Konzentrationen von HA bzw. FN. Die Zeiten wurden aus den turbidimetrischen Messungen berechnet.

zu erkennen. Der Einfluss von GAG auf die COL I-Fibrillogenese durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Molekülen ist umfangreich in der Literatur beschrieben (Scott 1988; S. Lilja und H.-J. Barrach 1983; StamoV u. a. 2008). Dabei wird ein höherer Einfluss des sulfatierten Heparins auf die Fibrillenmorphologie und Fibrillogenese kinetik beschrieben als für die unsulfatierte HA (Salchert u. a. 2004). Durch die fehlenden Sulfatgruppen besitzt HA im Vergleich die geringste negative Ladung. Daher ist vermutlich auch die Fähigkeit elektrostatische Wechselwirkungen mit COL I einzugehen deutlich geringer. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Dauer der COL I-Fibrillogenese durch die Anwesenheit von HA nicht beeinflusst wurde.

Die Ergebnisse der turbidimetrischen Analyse dienen im Folgenden als Grundlage für eine genauere Betrachtung des Endzeitpunkts der Fibrillogenese bei Zugabe verschiedener HA- bzw. FN-Konzentrationen (s. Abbildung A.3c). Als Endpunkt wurde die Zeit definiert, bei der die Änderung des Anstiegs der jeweiligen Sigmoidalkurve nach dem Erreichen der Plateau-Phase Null wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Fibrillogenese durch die Zugabe von HA kaum, jedoch durch FN deutlich beeinflusst wurde. Im Vergleich zu reinem COL I war die vollständige Fibrillogenese durch Zugabe von HA etwas

schneller beendet, jedoch war kein Einfluss variierender HA-Konzentrationen erkennbar. Mit steigender FN-Konzentration erhöhte sich die Gesamtzeit der Fibrillogenese des COL I deutlich, sodass bei der höchsten FN-Konzentration etwa eine Verdopplung der Zeit bestimmt wurde.

Aus diesen Erkenntnissen wurde für die Erzeugung von Membranen aus fibrillärem COL I und HA eine minimale Dauer der Fibrillogenese von 2 h und für COL I-FN-Membranen von 3 h festgelegt.

### A.2.5. Weitere erzeugbare Mikrostrukturen auf COL I-Membranen durch Druckumformung

Mit dem in Abschnitt 4.2 auf Seite 71 entwickelten Druckumformverfahren können eine Vielzahl von Mikrostrukturen auf COL I-Membranen erzeugt werden. Voraussetzung dafür ist die Ausstattung eines Si-Wafers (oder anderes Material) mit den Mikrostrukturen, sodass diese in PS übertragen werden können. Abbildung A.4 zeigt den PS-Master und die finale COL I-Membran mit Keil- bzw. zylindrischen Kavitätenstrukturen, die auf diese Art erzeugt wurden.

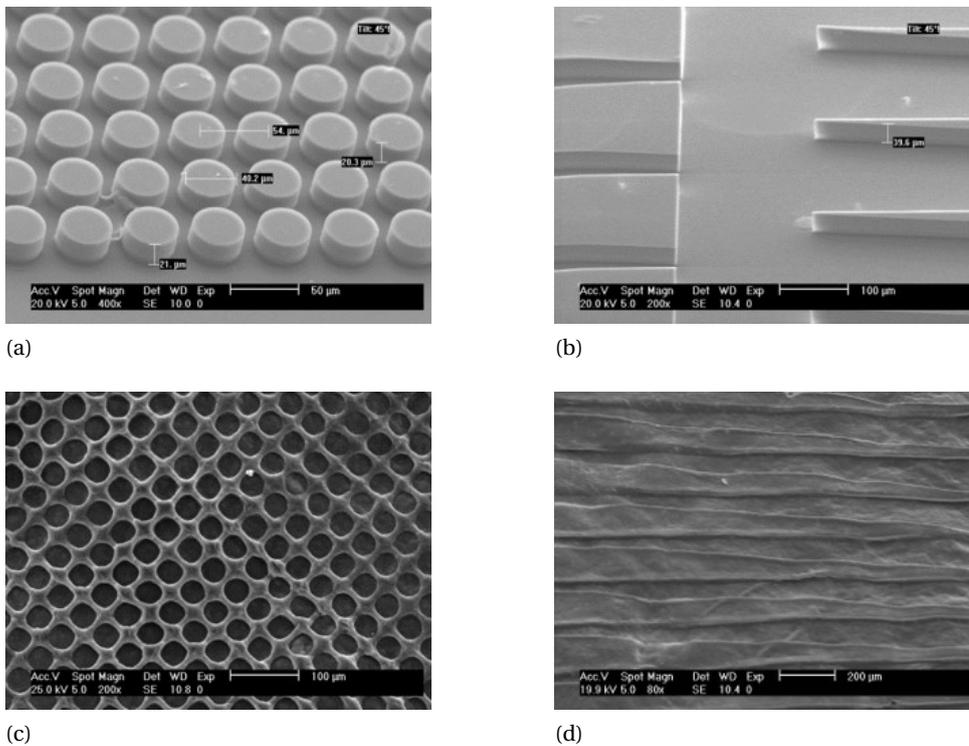


Abbildung A.4.: REM-Darstellung von mikrostrukturierten PS-Mastern und COL I-Membranen mit (a, c) Mikronoppen/-kavitäten und Mikrokeilstrukturen (b, d). Die Mikronoppen im PS-Master besaßen einen Durchmesser von 40 µm, einen Mittelpunktsabstand von 50 µm und eine Strukturhöhe von 40 µm. Mikrokeile besaßen im PS-Master eine Anfangsbreite von 5 µm, eine Endbreite von 160 µm und eine Strukturhöhe von 20 µm.

## B. Sonstiges

### B.1. Liste der Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeiten erfolgten folgende Publikationen:

#### *In wissenschaftlichen Journalen*

Berger, Steffen, Jan Kiebist, Elisabeth Pötschke und Katrin Salchert. 2018. „Immersion technique for the preparation of protein gradients on Collagen Type I membranes to control cell migration.“ JCB 4 (1-2): 43–49. doi:10.3233/JCB-180012.

#### *Posterpräsentationen*

Berger, Steffen, Jan Kiebist, Markus Diener, Christin Dittmer, Maik Jugendheimer, Steffen Marschmeyer, Mario Birkholz und Katrin Salchert. 2014. „Patterning of collagen type I for oriented cell growth and guided cell migration.“ Posterpräsentation, 2. Naturwissenschaftstag, BTU Cottbus-Senftenberg, Senftenberg, 20. Juni.

Diener, Markus, Steffen Marschmeyer, Steffen Berger, Katrin Salchert und Mario Birkholz. 2013. „Mikrostrukturierte Siliziumwafer als Masterform zur Erzeugung von Zellkulturträgern zur Ausrichtung adhärenter Zellen.“ Posterpräsentation, IHP TU Berlin Joint Lab Bioelectronics Opening Symposium, Berlin, 20. September.

Salchert, Katrin, Steffen Berger, Jan Kiebist, Markus Diener, Christin Dittmer, Maik Jugendheimer, Steffen Marschmeyer und Mario Birkholz. 2013. „Patterning of collagen type I for oriented cell growth and guided cell migration.“ Posterpräsentation, 9. Thüringer Biomaterial-Kolloquium, INNOVENT e.V., Zeulenroda, 3. September.

Berger, Steffen, Peter Allertz, Viktoria Kukhtina, Daniel Fischbach, Jan Kiebist, Christin Dittmer, Maik Jugendheimer, Henry Lagatz und Katrin Salchert. 2013. „3-Dimensional biomimetic collagen type I scaffolds for cell culture applications.“ Posterpräsentation, 7. Innovationsforum Multiparameteranalytik, Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg, 18. April.

Diener, Markus, Steffen Berger, Steffen Marschmeyer, Mario Birkholz und Katrin Salchert. 2013. „Preparation of new micro-patterned tissue culture substrates based on collagen type I.“ Posterpräsentation, 7. Innovationsforum Multiparameteranalytik, Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg, 18. April.

#### *Vorträge*

Berger, Steffen. 2012. „Entwicklung 3-dimensionaler collagenbasierter Matrices zur Induktion gerichteten Zellwachstums.“ Vortrag, 13. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz Görlitz, 19. April.

---

*Beiträge in Tagungsbänden*

Berger, Steffen, Peter Allertz und Katrin Salchert. 2012. „Entwicklung 3-Dimensionaler Collagenbasierter Matrices Zur Induktion Gerichteten Zellwachstums.“ In Tagungsband / 13. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz mitteldeutscher Fachhochschulen, Hochschule Zittau/Görlitz, in Görlitz am 19. April 2012. Bd. 13, hg. v. Wilfried Honekamp, 107–11. Remscheid: Re Di Roma-Verl.

## **B.2. Erklärungen**

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Entwicklung von Verfahren zur Erzeugung anisotroper Mikrostrukturen und VEGF-Gradienten auf Collagen Typ I-Scaffolds für Zellkulturanwendungen*“ wurde in der Zeit von November 2010 bis März 2021 an der Hochschule Lausitz (FH) in Senftenberg (später BTU Cottbus-Senftenberg) unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Katrin Salchert angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Senftenberg,