

**Induktion morphologischer und physiologischer  
Reaktionen primärer humaner Hautzellen durch  
bioinspirierte nano- und mikrostrukturierte Substrate**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik  
der Universität Stuttgart zur Erlangung  
der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von  
**Petra Juliane Kluger**  
aus Leonberg

Hauptberichter: Prof. Dr. techn. Herwig Brunner

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Scheurich

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2009

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2009



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Biomaterialien.....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Entwicklungsphasen der Biomaterialien.....	9
2.1.2 Klassische und neue Anwendungsbereiche für Biomaterialien .....	10
2.1.3 Stand der Technik .....	11
<b>2.2 Zellen und ihre Mikroumgebung .....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Stimuli im Gewebe .....	13
2.2.2 Extrazelluläre Matrix (ECM) .....	14
<b>2.3 Aufbau der Haut .....</b>	<b>15</b>
2.3.1 Die Dermis .....	16
2.3.2 Die Basalmembran.....	16
2.3.3 Die Epidermis.....	17
<b>2.4 Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte .....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Zell-Zell Kontakte .....	19
2.4.2 Zell-Matrix Kontakte .....	19
<b>2.5 Zellmigration.....</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Materialien und Geräte.....</b>	<b>23</b>
3.1.1 Geräte .....	23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	24
3.1.3 Chemikalien .....	25
3.1.4 Lösungen .....	26
3.1.5 Zellkulturmedien.....	27
3.1.6 Immunhistochemische Färbungen .....	28
3.1.7 Nano- und Mikropartikel .....	29
3.1.8 Humane Haut.....	29
<b>3.2 Prozess .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Materialwissenschaftliche Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.3.1 Herstellung der globulären Oberflächen.....	30
3.3.2 Herstellung der fibrillären Oberflächen.....	31

3.3.3	Funktionalisierung der globulären Oberflächen.....	31
3.3.4	Funktionalisierung der fibrillären Oberflächen.....	32
3.3.5	Charakterisierung der modifizierten Oberflächen.....	33
3.3.5.1	<i>Rasterelektronenmikroskopie (REM)</i> .....	33
3.3.5.2	<i>Rasterkraftmikroskopie</i> .....	33
3.3.5.3	<i>Null-Ellipsometrie</i> .....	34
3.3.5.4	<i>Kontaktwinkelmessung</i> .....	34
3.3.5.5	<i>Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse</i> .....	35
3.3.5.6	<i>Massenspektrometrie</i> .....	35
<b>3.4</b>	<b>Biologische Methoden</b> .....	<b>36</b>
3.4.1	Isolation und Kultivierung primärer Hautzellen.....	36
3.4.2	Versuchsdurchführung globuläre Oberflächen.....	38
3.4.3	Versuchsdurchführung fibrilläre Oberflächen.....	39
3.4.4	Evaluierung des zellulären Verhaltens.....	40
3.4.4.1	<i>Lichtmikroskopie</i> .....	40
3.4.4.2	<i>WST-1 Proliferationstest</i> .....	40
3.4.4.3	<i>Lactat-Dehydrogenase Test</i> .....	40
3.4.4.4	<i>Immunhistochemische Färbungen</i> .....	41
<b>3.5</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Materialwissenschaftliche Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
4.1.1	Herstellung der globulären Oberflächen.....	43
4.1.1.1	<i>REM-Aufnahmen der globulären Oberflächen</i> .....	43
4.1.1.2	<i>Rauheit der globulären Oberflächen</i> .....	44
4.1.2	Herstellung der fibrillären Oberflächen.....	45
4.1.2.1	<i>Rauheit der fibrillären Oberflächen</i> .....	46
4.1.3	Funktionalisierung der globulären Oberflächen.....	48
4.1.3.1	<i>Evaluierung der Funktionalisierung mit ESCA</i> .....	48
4.1.3.2	<i>Schichtdickenbestimmung mit der Null-Ellipsometrie</i> .....	49
4.1.3.3	<i>Kontaktwinkelmessung zur Ermittlung der Benetzbarkeit</i> .....	51
4.1.4	Funktionalisierung der fibrillären Oberflächen.....	51
4.1.4.1	<i>Evaluierung der Funktionalisierung mit ESCA</i> .....	52
4.1.4.2	<i>Schichtdickenbestimmung mit der Null-Ellipsometrie</i> .....	54
4.1.4.3	<i>Kontaktwinkelmessung zur Ermittlung der Benetzbarkeit</i> .....	55
4.1.4.4	<i>Untersuchung der Proteinadsorption mit MALDI-TOF MS</i> .....	56
<b>4.2</b>	<b>Biologische Ergebnisse</b> .....	<b>59</b>
4.2.1	Zelluläres Verhalten auf globulären Substraten.....	60
4.2.1.1	<i>Morphologie und Zell-Substrat Kontakte primärer Zellen</i> .....	60
4.2.1.2	<i>WST-1 Proliferationstest</i> .....	63
4.2.1.3	<i>Cytotoxizität mit dem LDH-release Assay</i> .....	64
4.2.1.4	<i>Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen</i> .....	66
4.2.1.5	<i>Zell-Zell Kontakte</i> .....	69

4.2.1.6	<i>REM-Aufnahmen</i> .....	70
4.2.2	Zelluläres Verhalten auf fibrillären Substraten.....	72
4.2.2.1	<i>Morphologie und Zell-Substrat Kontakte primärer Zellen</i> .....	72
4.2.2.2	<i>WST-1 Proliferationstest</i> .....	77
4.2.2.3	<i>Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen</i> .....	79
4.2.2.4	<i>Zell-Zell Kontakte</i> .....	82
4.2.2.5	<i>REM-Aufnahmen</i> .....	84
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>88</b>
<b>5.1</b>	<b>Materialwissenschaftliche Ergebnisse</b> .....	<b>89</b>
5.1.1	Herstellung der globulären Substrate.....	90
5.1.2	Herstellung der fibrillären Substrate .....	91
5.1.3	Funktionalisierung der globulärer Substrate.....	91
5.1.4	Funktionalisierung der fibrillären Substrate .....	93
5.1.5	Proteinadsorption mit MALDI-TOF MS.....	94
5.1.6	Fazit der materialwissenschaftlichen Ergebnisse.....	95
<b>5.2</b>	<b>Biologische Ergebnisse</b> .....	<b>96</b>
5.2.1	Zelluläres Verhalten auf globulären Oberflächen .....	96
5.2.1.1	<i>Morphologie und Zell-Substrat Kontakte</i> .....	96
5.2.1.2	<i>WST-1 Proliferationstest und LDH-release Assay</i> .....	98
5.2.1.3	<i>Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen</i> .....	99
5.2.1.4	<i>Zell-Zell Kontakte und REM-Aufnahmen</i> .....	101
5.2.2	Zelluläres Verhalten auf fibrillären Oberflächen .....	102
5.2.2.1	<i>Morphologie und Zell-Substrat Kontakte</i> .....	102
5.2.2.2	<i>WST-1 Proliferationstest</i> .....	104
5.2.2.3	<i>Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen</i> .....	105
5.2.2.4	<i>Zell-Zell Kontakte und REM-Aufnahmen</i> .....	106
5.2.3	Fazit der biologischen Ergebnisse .....	107
<b>5.3</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>111</b>
<b>6.1</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>111</b>
<b>6.2</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>121</b>
<b>6.3</b>	<b>Wissenschaftliche Beiträge</b> .....	<b>122</b>
<b>6.4</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>124</b>
<b>6.5</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>125</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström	µm	Mikrometer
AFM	Rasterkraftmikroskopie	mbar	Millibar
Alexa 546	Alexa Fluor®546- Carbonsäure Succinimidylester	mg	Milligramm
APS	3-Aminopropyltriethoxysilan	min	Minute
BPE	Bovine Pituitary Extract (bovines Epiphysenextrakt)	ml	Milliliter
ca.	circa	MW	Molekulargewicht (molecular weight)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	N	Newton
CST	Carboxyethylsilantriol	Na	Natrium
Da	Dalton	nm	Nanometer
DAPI	DAPI 4', 6-Diamino-2- phenylindol	PBS	phosphatgepufferte Saline
d.h.	das heißt	PDADMAC	Poly(diallyl-dimethyl- ammoniumchlorid)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Petri.	Petrischale
DMEMr	DMEM mit FCS und Antibiotikum	R <sub>ave</sub>	mittlere Rauheit (average)
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)	REM	Rasterelektronenmikroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
ESCA	Elektronenspektroskopie zur chemische Analyse	rhEGF	recombinant human epidermal growth factor
et al.	et alii	rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
FCS	Fötales Kälberserum	s	Sekunde
g	Gramm	sccm	Standard Kubikzentimeter (entspricht ml/min)
GA-1000	Gentamicin Sulfate und Amphotericin-B	SEM	scanning electron microscope
h	Stunden	SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	SPS	Poly(Styren-Sulfonsäure)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser	U	Einheit (unit)
IgG1	Immunglobulin Typ G1	u.a.	unter anderem
IgG2a	Immunglobulin Typ G2a	v/v	Volumenprozent
KBM	Keratinocyte Basal Medium	W	Watt
KBMr	KBM mit Supplementen	XPS	X-ray-photoelectron spectroscopy
l	Liter	z.B.	zum Beispiel
LDH	Lactat-Dehydrogenase	z.T.	zum Teil
M	Molar		
MALDI- TOF MS	Matrix-unterstützte Laser- Desorption/Ionisation Flugzeit-Massenspektro- metrie ( <i>engl. Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation- Time of Flight</i> ) mass <i>spectrometry</i> )		
µg	Mikrogramm		
µl	Mikroliter		

## 1. Zusammenfassung

Im Forschungsgebiet Biomaterialien ist die Entwicklung und Optimierung von Materialien für biologische Anwendungen wie beispielsweise Implantate und Prothesen von zentraler Bedeutung. Gegenwärtig liegt der Fokus auf bioinspirierten und biomimetischen Strategien, wobei die Kenntnis spezifischer Zell-Material-Wechselwirkungen im Mittelpunkt steht. Dieses Wissen ist auch für das Tissue Engineering essentiell, um Zellen funktionell zu kultivieren oder Stammzellnischen nachzuahmen.

In dieser Arbeit wurden bioinspirierte Oberflächen hergestellt, die angelehnt an Proteine der extrazellulären Matrix globulär oder fibrillär strukturiert waren. Die Funktionalisierung der Substrate erfolgte mit Amino- oder Carboxygruppen. Mit Hilfe von REM, AFM, ESCA, Ellipsometrie und Kontaktwinkelmessungen ließen sich die erzeugten, modifizierten Substrate charakterisieren. MALDI-TOF MS diente zur Evaluierung der Proteinadsorption, die einen entscheidenden Einfluss auf zelluläre Reaktionen haben kann. Nach erfolgreicher Herstellung und Charakterisierung der Substrate wurden primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten auf den Oberflächen kultiviert. Es zeigten sich deutliche und unterschiedliche Reaktionen der Zellen in Bezug auf ihre Morphologie und Physiologie. Keratinozyten verfügten auf rauen globulären und fibrillären Substraten über langgestreckte Zellkörper, die charakteristisch für migrierende Zellen sind. Fibroblasten richteten sich bei den rauen fibrillären Substraten parallel zu den Rillen aus. Diese Resultate verdeutlichen den Einfluss von bioinspirierten Geometrien, da mit der erzeugten fibrillären Strukturierung große Kollagen-Fibrillen nachgeahmt wurden, an die sich Fibroblasten *in vivo* anordnen.

Fokalkontakte, die für die feste Verankerung adhärenter Zellen wichtig sind, waren auf allen Oberflächen nachzuweisen. Eine deutlich höhere Viabilität und Proliferation von Keratinozyten auf amino-modifizierten Substraten ergaben die WST-Messungen. Die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten wurde bei keinem Zelltyp durch die Strukturierung und Funktionalisierung beeinträchtigt. Bei der Evaluierung des Differenzierungszustandes primärer Keratinozyten kamen auf allen Oberflächen über 95% früh differenzierte, Cytokeratin 14 exprimierende Zellen vor. Der als epidermaler Stammzellmarker diskutierte Transkriptionsfaktor p63 war in einzelnen Zellen auf allen Substraten nachzuweisen. Tendenziell schienen besonders Keratinozyten auf carboxy-modifizierten Oberflächen und am Rand von Kolonien diesen Marker zu besitzen, wohingegen hoch proliferative Zellen im Zentrum der Kolonien vorlagen. Eine Bestimmung der Funktionalität von Fibroblasten erfolgte über den Nachweis der Kollagen Typ I Produktion. Die Synthese dieses Proteins war auf strukturierten und funktionalisierten Substraten nicht eingeschränkt. Bei REM-Aufnahmen zeigten sich Unterschiede in der Ausbildung von sensorischen Aktin-Ausstülpungen, den Filopodien. Keratinozyten auf rauen Oberflächen bildeten deutlich weniger dieser Strukturen aus.

Diese Arbeit liefert neue Erkenntnisse bezüglich zelltypspezifischer Material-Wechselwirkungen. Neben der Herstellung, Funktionalisierung und Charakterisierung von bioinspirierten Substraten konnten morphologische und physiologische Reaktionen primärer humaner Keratinozyten und Fibroblasten induziert werden.

## Summary

Research in biomaterial sciences focus on the development and optimization of materials for biological applications, e.g. implants and prostheses. Main topics are bioinspired or biomimetic strategies. Knowledge of specific cell-material interaction is crucially important, especially for the cultivation of functional cells and the *in vitro* imitation of stem cell niches in tissue engineering.

Within the scope of this dissertation bio-inspired globular or fibrillar structured substrates were generated, modelled after extracellular matrix proteins. Surfaces were functionalized with amino- or carboxy groups. The produced modified substrates were evaluated by SEM, AFM, XPS, ellipsometry and contact angle measurements. For characterizing the protein adsorption, which is essential for cell adhesion, MALDI-TOF MS was performed. After their successful generation and characterization, primary human keratinocytes and fibroblasts were cultivated on the modified substrates.

Different morphological and physiological reactions of keratinocytes and fibroblasts could be determined. On rough globular or fibrillar substrates the cell shape of keratinocytes was elongated, which is characteristic for migrating cells. Fibroblasts strongly aligned to rough fibrillar structures, which had similar dimensions to collagen fibrils *in vivo*. This result underlines the impact of bio-inspired geometries and dimensions in biomaterial sciences. The formation of focal adhesions, which is necessary for strong attachment to the surface, could be observed for adherent cells on all substrates. Based on WST-measurements a higher viability and proliferation were determined for keratinocytes cultured on amino-modified surfaces.

Functionalization and structuring of the material interfaces did not have any negative effects on the formation of cell-cell contacts. Regarding the differentiation of keratinocytes, more than 95% of the adherent cells on all substrates were very early differentiated keratinocytes, which express cytokeratin 14. P63 is discussed as an epidermal stem cell marker and could be detected in several keratinocytes on all substrates. While more p63 positive cells seemed to be at carboxy-modified substrates and at the edge of the colonies, highly proliferative keratinocytes were located in the centre of the colonies. Functionality of fibroblasts was verified by staining of collagen type I production. Fibroblasts showed no change in the protein syntheses on structured and functionalized surfaces. With SEM differences in the development of sensory actin-structures, so called filopodia were found. Keratinocytes on rough substrates had notably less of these structures than adherent cells on planar surfaces.

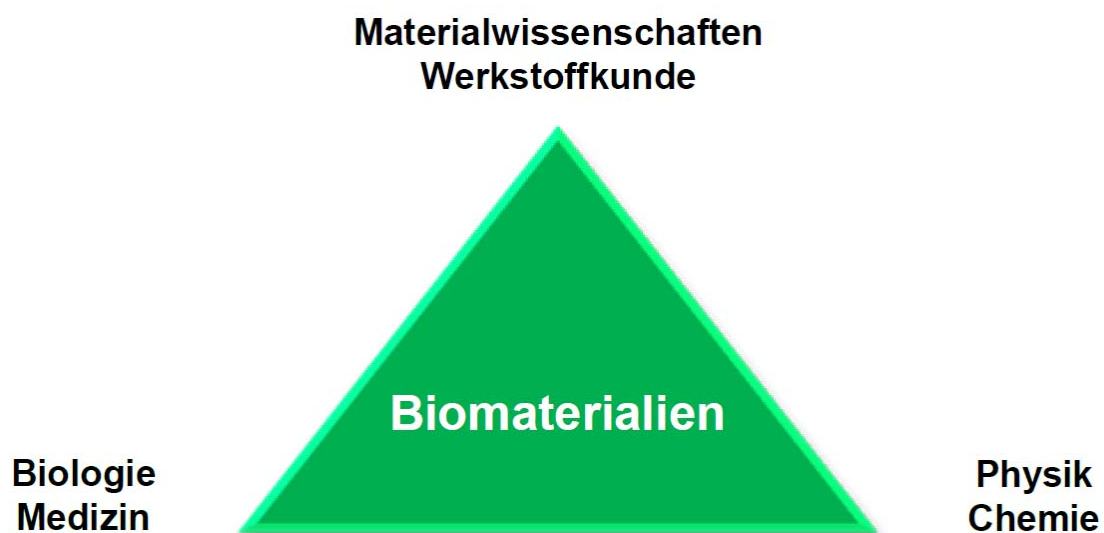
The results give new insights into cell-material interactions of selected primary human skin cells. Bioinspired substrates were generated, functionalized and characterized. With these modified surfaces morphological and physiological reactions of keratinocytes and fibroblasts could be induced.



## 2. Einleitung

### 2.1 Biomaterialien

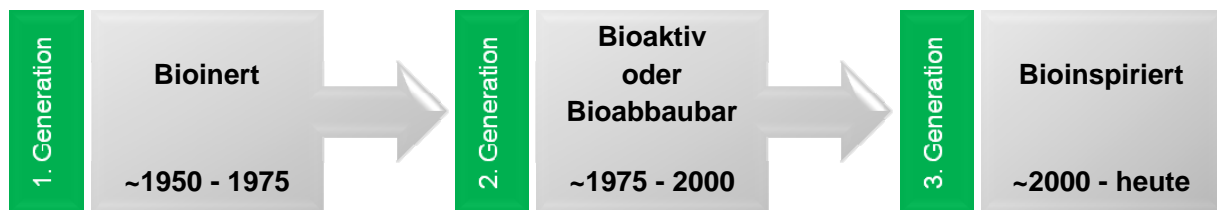
Als Biomaterialien werden Materialien bezeichnet, die mit biologischen Systemen in Kontakt stehen [1]. Im klassischen Sinne gehören zu den Biomaterialien Werkstoffe wie Metalle, Keramiken, Polymere und Komposite, die zur Herstellung von Implantaten oder Prothesen dienen. An der Entwicklung und Optimierung dieser Biomaterialien arbeiten weltweit interdisziplinäre Forschungsgruppen aus den Bereichen Materialwissenschaften und Werkstoffkunde, Physik und Chemie sowie Medizin und Biologie (Abbildung 1). In den vergangenen Jahrzehnten waren verschiedene Entwicklungsphasen zu beobachten, wobei der Einfluss der Materialeigenschaften auf Proteine oder Zellen zunehmend in den Fokus rückt [2, 3].



**Abbildung 1:** Biomaterialien als interdisziplinäres Forschungsgebiet zwischen den Bereichen Physik, Chemie, Materialwissenschaften, Werkstoffkunde sowie Biologie und Medizin.

#### 2.1.1 Entwicklungsphasen der Biomaterialien

Die Verwendung von Biomaterialien beispielsweise als Zahnersatz ist bereits seit über 2000 Jahren bekannt [4]. Während der Industrialisierung bis zum Ende des Zweiten Weltkrieges wurden die eingesetzten Werkstoffe nicht speziell für medizinische Anwendungen entwickelt, sondern stammten aus industriellen oder handwerklichen Bereichen. Dadurch kam es zu zahlreichen Abstoßungsreaktionen und Entzündungen, so dass die meisten dieser Materialien heute nicht mehr in Gebrauch sind. Einzige Ausnahme stellt die Titanlegierung TiA16VA dar, die ursprünglich im Flugzeugbau entwickelt und noch heute bei Implantaten Anwendung findet. Die fortlaufende Optimierung, die seit ungefähr 1950 im Bereich Biomaterialien stattfindet, ist in Abbildung 2 dargestellt und lässt sich in drei Generationen unterteilen [5].



**Abbildung 2:** Generationen von Biomaterialien von 1950 bis heute.

Zwischen 1950 und 1975 lag der Fokus auf inerten Materialien, da sie keine Wechselwirkungen mit dem Körper ausbilden. Diese erste Generation von Biomaterialien ist teilweise noch heute im Einsatz, z.B. in Form von Metallen und Keramiken [6]. In der zweiten Generation sollten Biomaterialien bioaktiv oder bioabbaubar sein. Somit lag in den Jahren 1975 bis 2000 ein Forschungsschwerpunkt auf der Entwicklung von Materialien, die biologische Antworten wie die Verankerung von Implantaten in Geweben verstärken. Ein weiterer Aspekt war die progressive Bioabbaubarkeit von Werkstoffen, während parallel neues Gewebe entsteht. Besonders im Bereich der Knochenregeneration erzielten synthetische Hydroxylapatite große Fortschritte. Diese Kalziumphosphatverbindungen werden bereits seit Mitte der 1980er Jahre in klinischen Anwendungen eingesetzt. Sie sind zurzeit noch die meist verwendeten Materialien bei orthopädischen und dentalen Eingriffen [7, 8].

Die dritte Generation von Biomaterialien soll gezielt zelluläre Antworten auf molekularem Niveau stimulieren. Gegenstand der heutigen Forschung ist z.B. die Nachbildung spezifischer Reize der natürlichen Umgebung der Zellen *in vivo* – der extrazellulären Matrix – um spezifische Zellantworten zu erreichen. Zudem wird die Freisetzung bioaktiver Stoffe sowie der Einfluss mechanischer Stimuli untersucht. Diese im neuen Jahrtausend beginnende dritte Generation spielt auch beim Aufbau von Gerüststrukturen für das Tissue Engineering eine wichtige Rolle [9]. Besonders Biomaterialien, die die Anforderungen der zweiten Generation – bioaktiv oder bioabbaubar – vereinen, sind von großem Interesse. Ziel ist es, durch die Modifizierung von Materialien mit biomimetischen, also der Natur nachgeahmten Stimuli, zelluläres Verhalten wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung zu steuern [10, 11].

### 2.1.2 Klassische und neue Anwendungsbereiche für Biomaterialien

Die klassischen Biomaterialien wie Metalle, Keramiken, Polymere und Komposite werden zum Teil seit über 50 Jahren zur Herstellung von Prothesen und Implantaten eingesetzt, wobei sie unterschiedliche Kriterien erfüllen (Tabelle 1) [12]. Metalle finden hauptsächlich bei Gelenkprothesen, der Fixierung von Brüchen und als Stents Verwendung. Seit 1970 steigt die medizinische Applikation von Keramiken beispielsweise bei dentalen Eingriffen stetig an. Zudem bestehen heute viele beim Gelenkersatz verwendete Prothesen aus einer Kombination von Metallen und Keramik in Form von Hydroxylapatit [13]. Solche Werkstoffverbände sind unter dem Begriff Komposite zusammengefasst. Synthetische Polymere kommen seit Ende der 60er Jahre zum Einsatz. Beispiele sind Gefäßprothesen, Katheter sowie abbaubare Nahtmaterialien, Schrauben und Nägel [14].

**Tabelle 1:** Vor- und Nachteile klassischer Biomaterialien.

Material	Vorteile	Nachteile
<b>Metalle</b>	Hohe Dauer- und Zugfestigkeit	Korrosion, führt z.T. zu Entzündungen
<b>Keramiken</b>	Inert, häufig als Beschichtung	Geringe Dehnbarkeit, z.T. Abrieb, teuer
<b>Polymere</b>	Einstellbare Eigenschaften, billig	Geringe Festigkeit, Sterilisation schwierig

Neben diesen Ausgangswerkstoffen erlangen in der dritten Generation zunehmend maßgeschneiderte, zelltypspezifische Materialgrenzflächen an Bedeutung. Dazu ist eine genaue Kenntnis relevanter Interaktionen zwischen Proteinen oder Zellen und Substraten erforderlich, die sehr komplex und oft nur marginal bekannt sind [15].

Von besonderem Interesse ist die Bestimmung von zelltypspezifischen Materialvorlieben für das Tissue Engineering. Ziel dieses interdisziplinären Bereichs ist der *in vitro* Aufbau von Geweben oder Organen [16, 17]. Dafür sind als erste Schritte die Isolation und Kultivierung primärer Zellen notwendig, doch genau diese Punkte stellen sich als besonders kritisch dar. Isolierten Zellen liegen nie in einer Reinkultur vor, sondern stets in Kokultur mit anderen Zelltypen. Der konventionelle Ansatz gegen diese "Verunreinigung" vorzugehen, ist die Zugabe spezifischer Zellkulturmedien, deren Inhaltsstoffe speziell auf einen Zelltyp angepasst sind. Dies reicht oftmals nicht aus, um eine Kultivierung funktioneller Primärzellen sicherzustellen. Häufig proliferieren die Zellen zwar, bilden aber ihre gewebetypischen Marker und Funktionen nicht mehr aus und degenerieren. Auch durch die Zugabe löslicher Stoffe wie Wachstumsfaktoren lässt sich dieses Problem nur sehr eingeschränkt lösen. Deshalb wurde in den letzten Jahrzehnten zunehmend der Einfluss verschiedener Materialeigenschaften auf das zelluläre Verhalten untersucht [18-20].

Die Entwicklung von Substraten mit zelltypspezifischen Materialeigenschaften in Kombination mit speziellen Kulturmedien bietet ein großes Potential für eine optimierte Isolation und Kultivierung funktioneller primärer Zellen [18]. Zudem ist eine Langzeitkultivierung sensibler Zellen, wie adulter Stammzellen, von besonderem Interesse [21]. *In vivo* ist die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften oder die Differenzierung zu entsprechenden Gewebezellen hauptsächlich von der Mikroumgebung gesteuert. In artifiziellen Stammzellnischen mit maßgeschneiderten Materialeigenschaften könnten Stammzellen in einem undifferenzierten Stadium bleiben und durch gezielte Stimuli die Differenzierung induziert werden [22, 23].

### 2.1.3 Stand der Technik

Das Interesse der Forschung richtet sich in den letzten Jahren verstärkt auf die Charakterisierung definierter Materialeigenschaften zur Untersuchung ihrer Wirkung auf Zellen. Zu diesen Werkstoffparametern zählen die Topografie, die Rauheit, die Festigkeit, die Elastizität, die Benetzbarkeit, die Ladung und die chemische Zusammensetzung der Oberfläche [6].

Bereits 1964 wurde der Einfluss der Oberflächen-Topografie auf Zellen beschrieben. Einhergehend mit der Entwicklung neuer Methoden zur Strukturierung von Oberflächen im Nano- und Mikrometerbereich – wie verschiedene Lithografieprozesse, Stempeltechniken, Inkjet Drucken und Elektrosponning – sind in den folgenden Jahrzehnten eine Vielzahl an Strukturen entstanden (Tabelle 2) [24, 25].

**Tabelle 2:** Überblick über gängige Methoden zur Nano- und Mikro-Strukturierung.

Methoden zur Strukturierung	Auflösung < 100 nm	Stempel Strukturierung	Direkte Strukturierung	Flexible Geometrie
<i>Photo Lithografie</i>	-	x	-	x
<i>Elektronenstrahl Lithografie</i>	x	x	-	x
<i>Röntgen Lithografie</i>	x	x	-	x
<i>Plasma Lithografie</i>	-	-	x	x
<i>Kolloid Lithografie</i>	-	x	-	-
<i>Heißprägen</i>	x	-	x	x
<i>Mikrokontakt Drucken</i>	-	-	x	x
<i>Inkjet Drucken</i>	-	-	x	x
<i>Elektrosponning</i>	-	-	x	-

So beeinflussten Noppen, Rillen, Säulen oder Löcher in verschiedenen Dimensionen und auf Materialien wie Metallen, Keramiken oder Polymere das Verhalten von Zellen [26]. Dabei waren insbesondere Veränderungen der Zelladhäsion, Vitalität, Morphologie, Migration und Proliferation zu verzeichnen [27]. Weitere Erkenntnisse zur Substrat-Topografie zeigten, dass der maximale Abstand zweier Anker-moleküle, bei dem Fibroblasten noch anheften können, bei 58 nm liegt [28, 29]. Auch auf die Rauheit von Substraten, die mit der Topografie korreliert, reagieren Zellen sehr unterschiedlich [30]. Während Osteoblasten raue Oberflächen planaren vorziehen, zeigen Fibroblasten auf weniger rauen Substraten ein gutes Wachstum [31]. Zellen nehmen darüber hinaus auch die Elastizität von Materialien wahr [32]. So beschrieben Engler et al. 2006 beispielsweise, dass die Substrat-elastizität die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beeinflusst [33].

Das Spektrum an Studien zum Einfluss der chemischen Beschaffenheit und der damit verbundenen Ladung von Materialien auf Zellen ist breit. Es reicht von einfachen chemischen Oberflächenfunktionalisierungen mit CH<sub>3</sub>-, SH-, COOH-, OH- und NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Gruppen über, die Verwendung von Aminosäuren und Peptiden, z.B. die Adhäsionssequenz RGD bis hin zur Beschichtung mit ganzen Proteinen wie Kollagen oder Laminin [34-37]. Prinzipiell ist keine generelle Empfehlung für eine dieser Modifikationen gültig, da die Unterschiede und Anforderungen der einzelnen Zelltypen und der vielfältigen Anwendungsbereiche zu groß sind. Zur Kultivierung von Zellen werden meist spezielle plasmabehandelte Polystyrol-Gefäße verwendet, die im Gegensatz zu unbehandeltem Polystyrol eine hydrophile, negativ geladene Oberfläche besitzen [38]. Viele Zelltypen, insbesondere immortalisierte Zelllinien, lassen sich gut auf diesen unspezifisch funktionalisierten Polystyrol-Substraten kultivieren. Primäre Zellen hingegen zeigen deutliche Unterschiede in der Akzeptanz dieser Oberflächen.

Die Gewinnung primärer Zellen erfolgt direkt aus dem Gewebe. *In vivo* sind die Zellen eine auf sie zugeschnittene Mikroumgebung mit zahlreichen Reizen gewohnt, wohingegen sie nach der Isolation lediglich mit Zellkulturmedium in Kunststoffgefäße überführt werden. Diesen Wechsel überleben viele Zellen nicht oder nur unter Verlust ihrer spezifischen Funktion. Deshalb ist die Entwicklung zelltypspezifischer Kultivierungsgefäße zentraler Punkt der Biomaterialforschung [39].

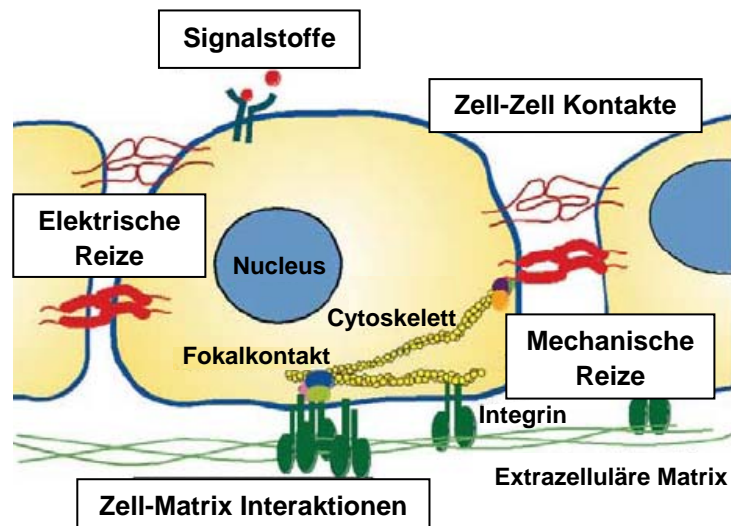
Für *in vivo* Anwendung von beispielsweise funktionalisierten Implantaten ist zu berücksichtigen, dass diese in Kontakt mit Blut kommen. Das bedeutet, dass bereits nach wenigen Sekunden eine Proteinadsorption an den Materialoberflächen stattfindet und die erst wesentlich später adhären den Zellen diese Proteine wahrnehmen [40]. Auch die Modifikation von Implantatgrenzflächen mit meist sehr kostenintensiven Wachstumsfaktoren ist auf Grund ihres schnellen Abbaus durch Enzyme des Körpers nur begrenzt sinnvoll [41]. Eine Alternative stellen die kostengünstigen Funktionalisierungen mit einfachen chemischen Gruppen dar.

Grundsätzlich gilt eine bioinspirierte Vorgehensweise bei der Entwicklung innovativer Materialoberflächen als zielführend, die an die Interaktionen der speziellen Zellen *in vivo* angepasst ist [42, 43].

## 2.2 Zellen und ihre Mikroumgebung

### 2.2.1 Stimuli im Gewebe

Zellen *in vivo* leben in einer komplexen Umgebung und sind einer Vielzahl von Stimuli ausgesetzt (Abbildung 3). Je nach Gewebe kommunizieren sie direkt über Zell-Zell Kontakte mit benachbarten Zellen oder sekretieren lösliche Signale. Beispiele für im Interzellularraum diffundierende Biomoleküle sind Hormone, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter. Auch mechanische Reize haben einen Einfluss u.a. auf Muskel- oder Knorpelzellen. Fehlen mechanische Stimuli beispielsweise bei der Kultivierung *in vitro*, können diese Zellen ihre gewebespezifische Funktion nicht aufrechterhalten und degenerieren. Weiterhin nehmen Zellen elektrische und elektromagnetische Signale wahr. Einen ganz entscheidenden Einfluss auf das zelluläre Verhalten hat die Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Matrix [18, 44].

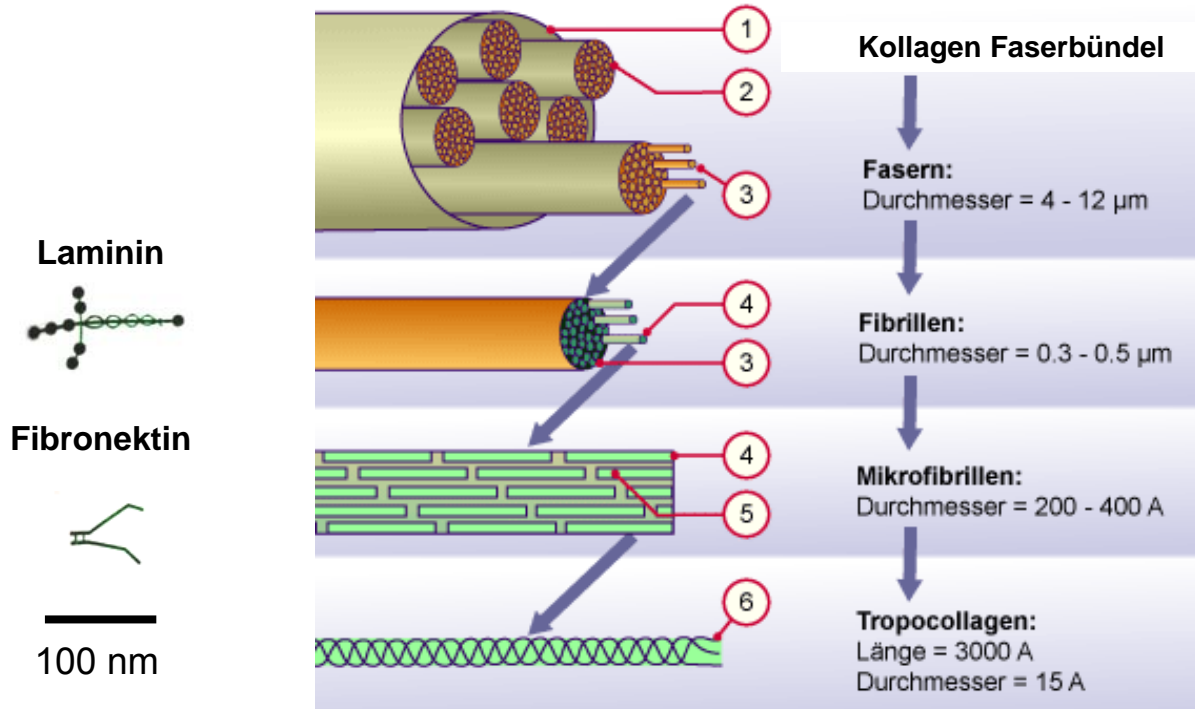


**Abbildung 3:** *In vivo* ist die Zelle von vielen Stimuli umgeben. Dazu gehören elektrische und mechanische Reize, Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte sowie lösliche Signale. (Quelle: verändert nach [18])

## 2.2.2 Extrazelluläre Matrix (ECM)

Während die ECM vor einigen Jahrzehnten lediglich als Gerüst für Zellen gesehen wurde, ist heute bekannt, dass sie neben der Formgebung eine essentielle Rolle bei der Ausbildung zellulärer und gewebespezifischer Funktionen spielt. So steuert die ECM durch diverse Stimuli die Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen [45]. Bei Betrachtung unterschiedlicher Gewebe zeigt sich die Vielfalt des Aufbaus der ECM. So ist die ECM beim Knochen sehr hart und porös, wohingegen die ECM des Hirngewebes einem flexiblen Hydrogel ähnelt. Dementsprechend vielfältig sind die von der ECM ausgehenden Stimuli aufgrund der Topografie mit globulären, porösen, kristallinen oder fibrillären Strukturen, Festigkeit, Elastizität, Rauheit, Benetzbarkeit bzw. Wasserspeicherkapazität, chemische Komposition sowie Liganden. Genau diese diversen Materialeigenschaften und die Zusammensetzung gewährleisten die Aufrechterhaltung der gewebespezifischen Eigenschaften [46, 47].

Aufgebaut ist die ECM aus verschiedenen Makromolekülen und Proteinen. Viele dieser Moleküle bestehen aus langen Fasern und Fibrillen, die zu dem häufig netzwerkartigen Charakter der ECM beitragen. Eine genaue Zusammensetzung ist nicht zu definieren, da gewebespezifische Unterschiede vorliegen und zudem die ECM als Fließgleichgewicht angesehen werden kann. Das bedeutet, dass ständige Auf- und Abbau-Prozesse (*Remodelling*) zu einer stetigen Veränderung der ECM Komposition führen. Bei den Proteinen der ECM lassen sich zwei Grundstrukturen identifizieren – fibrilläre und globuläre Proteine (Abbildung 4) [48, 49].



**Abbildung 4:** Grundstrukturen und Dimensionen ausgewählter ECM Proteine. Links dargestellt sind die globulären Proteine Laminin und Fibronectin, die einen Durchmesser von ungefähr 100 nm aufweisen. Rechts im Bild ist der Aufbau von Kollagen Faserbündeln zu sehen. (Quelle: verändert nach [49])



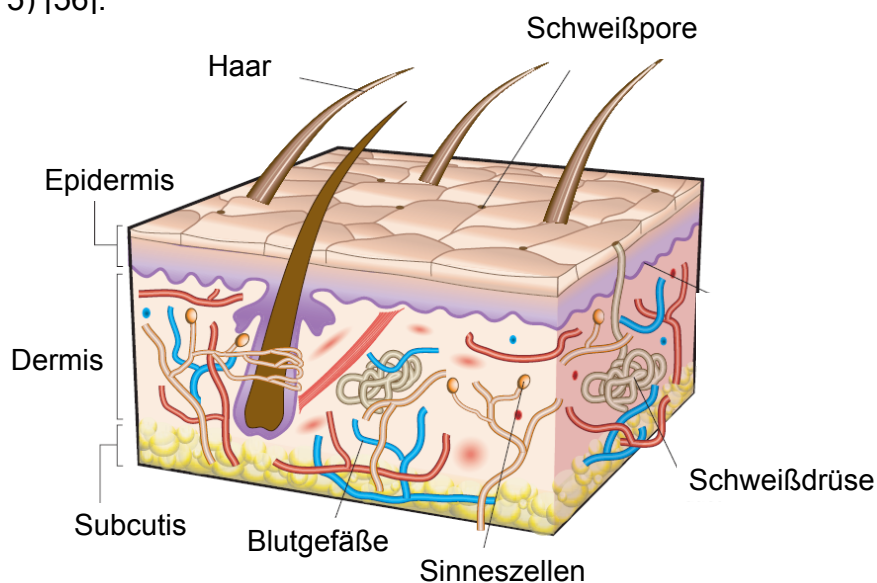
Die Kollagene sind die vorherrschende und in fast allen Geweben vorkommende, strukturgebende Proteinfamilie der ECM. Sie bilden verschiedene, inelastische Faserarten, wobei die 4-12  $\mu\text{m}$  dicken Fasern aus 300-500 nm dicken Fibrillen aufgebaut sind. Elastische Fasern hingegen bestehen aus den Proteinen Fibrillin und Elastin [50].

Neben diesen fibrillären Proteinen gibt es noch die für die Adhäsion wichtigen, meist globulären Proteine wie Laminin oder Fibronectin deren Durchmesser im Bereich von 100 nm liegt [51, 52]. Häufig besitzen diese Proteine spezielle Aminosäuresequenzen für die gezielte Adhäsion von Zellen, wobei die bekannteste Abfolge "Arginin-Glycin-Aspartat" (RGD) ist [53]. Die zweite große Gruppe an Makromolekülen der ECM sind die Glykosaminoglykane. Assoziieren diese langkettigen Polysaccharide mit Proteinen, entstehen große Proteoglykane. Vielfalt und Interaktion von Proteinen, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen sind die Basis für verschiedenartige Eigenschaften der ECM [54].

Eine besondere Form der ECM ist die Basalmembran oder Basallamina, auf der die Epithelien liegen. Die Basalmembran der Haut beispielsweise dient der Abgrenzung von Dermis und Epidermis sowie der Verankerung der epidermalen Zellen.

### 2.3 Aufbau der Haut

Die Haut ist mit einer Fläche von 1,5-2m<sup>2</sup> und ungefähr 16% des Körpergewichts das größte Organ des Menschen. Sie dient als Barriere zwischen Umwelt und Körper, wodurch sie Schutz vor Dehydration, Verletzungen sowie Infektionen bietet [55]. Die innerste Schicht der Haut, die Subcutis, enthält große Blutgefäße und Nerven, Fett, lockeres Bindegewebe und Sinneszellen. An sie grenzt die Dermis, die durch die Basalmembran mit der äußersten Hautschicht, der Epidermis, verbunden ist (Abbildung 5) [56].



**Abbildung 5:** Aufbau der Haut. Die Epidermis bildet die Barriere zur Umgebung, unter ihr liegt die Dermis, gefolgt von der Subcutis. (Quelle: verändert nach [56])

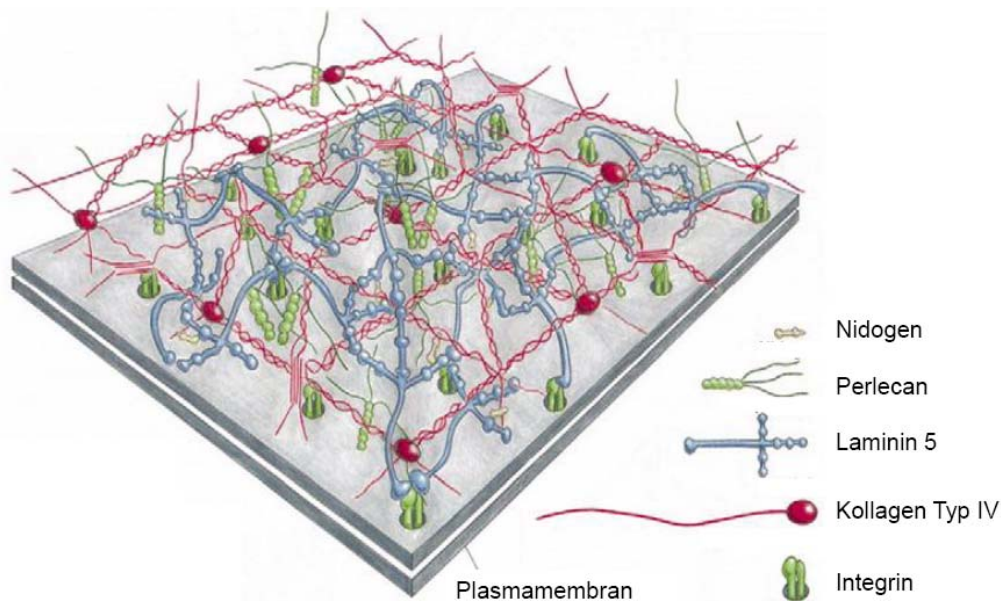
### 2.3.1 Die Dermis

Das *Stratum reticulare* bildet den unteren Teil der Dermis, der kontinuierlich in die tiefer gelegene Subcutis übergeht. Darüber liegt das *Stratum papillare*, das eine klare Grenze zur Epidermis darstellt und durch seine Struktur die Kontaktfläche zur Epidermis vergrößert. Eine optimale Nährstoffversorgung der untersten Epithelschicht der Epidermis wird über die in den Papillarkörpern verlaufenden Blutgefäße sichergestellt [57]. Hauptbestandteil der Dermis sind Bindegewebsfasern in Form von bogenförmigen, elastischen Fasern und wellenförmigen, kaum dehnbaren Kollagenfasern, die eine hohe Elastizität und Zugfestigkeit gewährleisten. Die Eigenspannung der Haut ist durch die Wasserspeicherkapazität von Kollagenfaser-Glycosaminoglycan-Komplexen möglich, die mit zunehmendem Alter abnimmt [58, 59].

Fibroblasten sind die vorherrschenden Zellen des Bindegewebes. Eine wichtige Funktion dieser Zellen ist die Synthese von ECM Proteinen, insbesondere von Kollagen. Während der Produktion von verschiedenen Proteinen besitzen Fibroblasten einen großen Zellkörper mit deutlich sichtbarem Zellkern und Endoplasmatischem Retikulum. Im Ruhezustand ändern die Zellen ihre Morphologie und werden spindelförmig. Zugleich reduzieren sie die Synthese von ECM Proteinen [60].

### 2.3.2 Die Basalmembran

Die Basalmembran liegt als spezielle Form der ECM zwischen Dermis und Epidermis und hat einen Durchmesser von ungefähr 1-2  $\mu\text{m}$ . An ihr ist das darüber liegende Epithel in Form epidermaler Keratinozyten verankert. Strukturebende Bestandteile der Basalmembran sind das Proteoglykan Perlecan und das faserförmige Kollagen Typ IV, diese sind über Nidogen mit dem Adhäsionsmolekül Laminin verbunden. (Abbildung 6) [52, 61, 62].

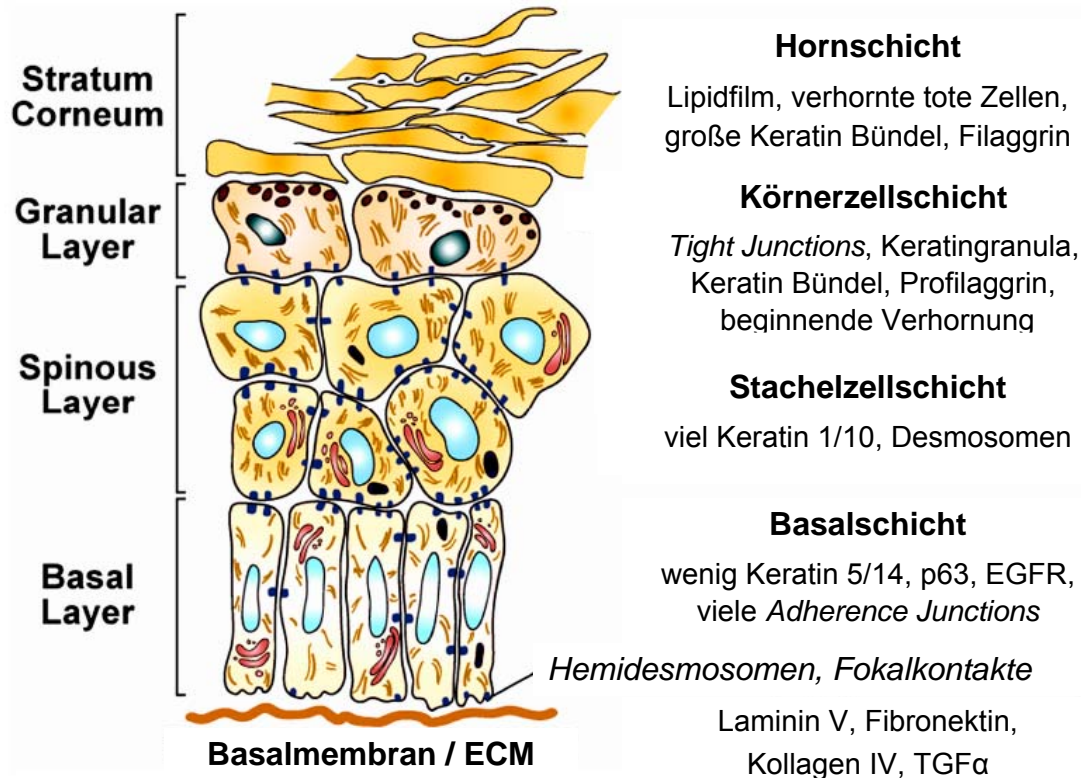


**Abbildung 6:** Modelldarstellung der Basalmembran und ihre Komponenten.  
(Quelle: verändert nach [49])



### 2.3.3 Die Epidermis

Als äußerste Hautschicht bildet die Epidermis die eigentliche Schutzhülle gegenüber der Umwelt. Ihre durchschnittliche Dicke beträgt 0,1 mm. Es lassen sich vier Schichten unterteilen: das *Stratum basale* (Basalschicht) ist an der Basallamina verankert, darüber liegen das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und das *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht). Das *Stratum corneum* (Hornschicht) bildet die äußerste Schicht (Abbildung 7) [63].



**Abbildung 7:** Aufbau der Epidermis. Die Basalschicht mit den Stammzellen und früh differenzierten Keratinozyten ist an der Basalmembran verankert. Im Laufe der Differenzierung der Zellen stratifizieren sie in die höher gelegenen Schichten und bilden zuletzt die Hornschicht als Barriere zur Umwelt aus. (Quelle: verändert nach [81])

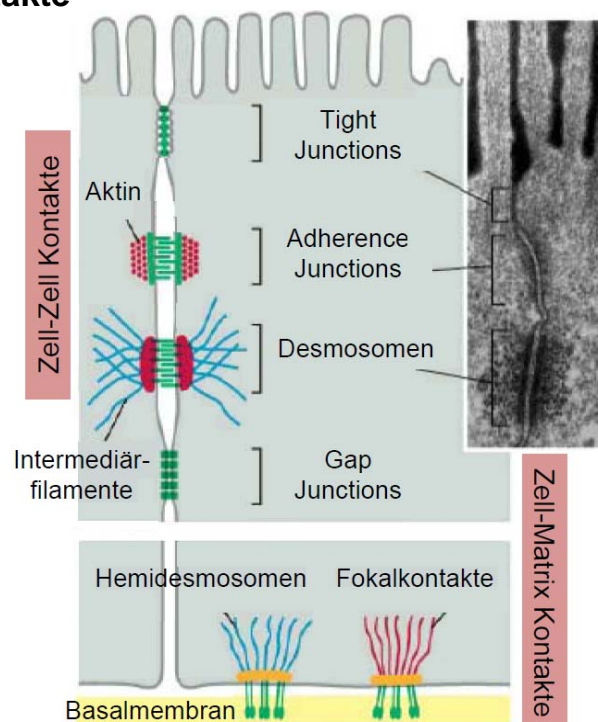
Mit ca. 90% der Zellen bilden die Keratinozyten den Hauptbestandteil der Epidermis, die restlichen 10% der Zellen sind Melanozyten und Langerhans Zellen [64, 65]. Die Schichten der Epidermis stellen unterschiedliche Differenzierungsstadien der Keratinozyten dar, wobei während der Differenzierung der Keratinanteil der Gesamtproteinkonzentration von 10% bei sich teilenden Zellen auf bis zu 85% bei komplett differenzierten Zellen steigt [66]. Auch die Keratin-Expression wandelt sich. Dies führt zu Veränderungen der Morphologie und Biochemie der Keratinozyten und endet mit der Entstehung abgestorbener Zellen ohne Organellen, die sich langsam voneinander lösen und stetig von der Hautoberfläche abfallen. Infolgedessen ist eine kontinuierliche Erneuerung der Epidermis zur Gewebemöostase notwendig, in deren Verlauf sich Keratinozyten in verschiedenen Differenzierungsschritten von der Basalmembran an die Epidermisoberfläche begeben [67, 68]. Diese Selbsterneuerung des Gewebes dauert 2-4 Wochen und wird durch eine kleine Subpopulation aus adulten epidermalen Stammzellen in der Basalschicht gewährleistet [69].

Die kubischen Keratinozyten des *Stratum basale* sind über Hemidesmosomen, mit der Basallamina verankert, wobei der Anteil der Stammzellen in der Basalschicht auf einen kleinen Prozentsatz geschätzt wird [70, 71]. Den größeren Teil machen frühe Vorläuferzellen aus, die in der Literatur häufig als “Transient Amplifying (TA) Cells“ bezeichnet werden. Sie zeichnen sich durch ein hohes Proliferationspotential aus und gehen im Gegensatz zu epidermalen Stammzellen nach vier bis fünf Teilungen in die Differenzierung über [72-74]. Bislang gibt es keine eindeutigen Marker zur Bestimmung epidermaler Stammzellen. Einige Veröffentlichungen beschreiben den Transkriptionsfaktor p63, ein Homologon des Tumorsuppressors p53, als geeigneten Marker, um epidermale Stammzellen von TA Zellen abzugrenzen [75-79].

Keratinozyten in der Basalschicht besitzen Keratin 5 und 14, wobei diese Keratine mit zunehmender Differenzierung weniger exprimiert werden. An ihre Stelle treten neue Marker wie beispielsweise Keratin 10 und 1, die für das *Stratum spinosum* kennzeichnend sind. Die Keratinozyten im oberen Teil dieser Schicht reduzieren ihre Biosyntheseaktivitäten ausschließlich auf die Produktion von Keratinen und teilen sich nicht mehr. Erreichen die Zellen das *Stratum granulosum*, wird die Keratinsynthese eingestellt und die vorhandenen Filamente in dicke Bündel gepackt. Keratingranula dominieren das Zellinnere und führen zu einer zunehmenden Verhornung. Im *Stratum corneum* kommen Keratin 3 und 12 vor [80-82]. Diese Schicht besteht aus vollständig verhornten Keratinozyten ohne Zellkern, sogenannte Kronozyten, die zusammen mit Fetten eine wasserabweisende Schutzschicht bilden. Mit der Zeit lösen sich die Kontakte zwischen den Zellen und sie schuppen ab [83].

## 2.4 Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte

Zellen bilden in Geweben Kontakte zu benachbarten Zellen oder der extrazellulären Matrix aus. Diese Kontakte werden über Adhäsionsmoleküle wie Integrine und Cadherine vermittelt. Meist handelt es sich dabei um Transmembranproteine, die sowohl eine extrazelluläre als auch eine intrazelluläre Domäne besitzen [84, 85]. Dieser cytosolische Teil kann mit Komponenten des Cytoskeletts interagieren. So ist neben der Verankerung der Zellen auch die Signalweiterleitung möglich. Diese findet bilateral also von der Umgebung zur Zelle und von der Zelle zur Umgebung statt [86, 87].



**Abbildung 8:** Übersicht zu Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakten. (Quelle: verändert nach [49])

### 2.4.1 Zell-Zell Kontakte

Zell-Zell Kontakte spielen bei der Bildung von z.T. auch mehrlagigen Geweben eine wichtige Rolle. Sie gewährleisten eine feste Bindung und ermöglichen die Kommunikation der Zellen eines Gewebes. Besonders ausgeprägt sind die Zell-Zell Kontakte in Epithelien, wobei *Tight Junctions*, *Desmosomen* und *Adherence Junctions* sowie *Gap Junctions* voneinander abzugrenzen sind [88].

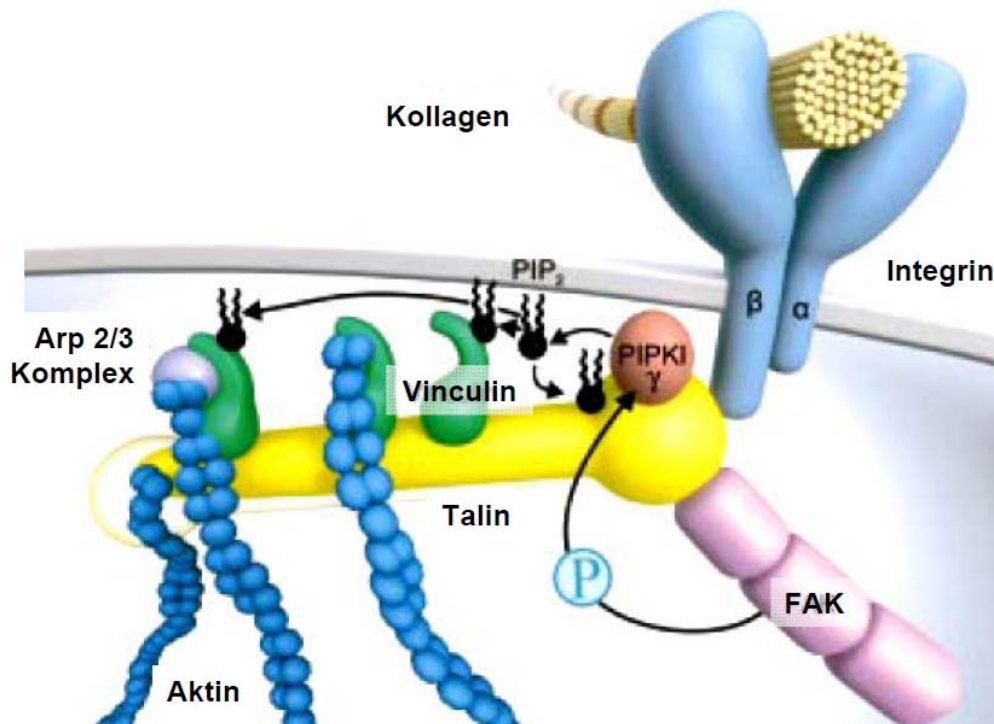
*Tight Junctions* gehören zu den undurchlässigen Verbindungen. Durch sie entstehen sehr enge Bereiche zwischen den Membranen zweier benachbarter Zellen. Somit wird eine Diffusionsbarriere, die den parazellulären Transport von Molekülen über das Epithel verhindert bzw. kontrolliert, aufgebaut. Die wichtigsten Proteine der *Tight Junctions* sind Occludine und Claudine [89]. *Desmosomen* und *Adherence Junctions* zählen zu den haftenden Verbindungen, die besonders häufig in mechanisch belasteten Epithelien vorliegen [90]. Als Adhäsionsmoleküle dienen die Cadherine, von denen 80 für den Menschen bekannt sind [70, 89]. Die intrazelluläre Domäne der *Desmosomen* bindet an Intermediärfilamente wie Keratin, wohingegen bei den *Adherence Junctions* der cytosolische Teil mit dem Aktin-Cytoskelett in Verbindung steht und so die Signaltransduktion gewährleistet [91, 92]. Bei *Gap Junctions* handelt es sich um kanalbildende Proteinkomplexe. Der Zusammenschluss zweier Halbkanäle auf benachbarten Zellen führt zur Ausbildung einer *Gap Junction*, durch kanalaufbauende Proteine, die Connexine. Es werden organische und anorganische Ionen, Nukleotide (z.B. cAMP, ATP), Aminosäuren, Wasser, Glucose mittels Diffusion durch die Kanalporen ausgetauscht [93].

### 2.4.2 Zell-Matrix Kontakte

Die Adhäsion an Substrate ist von essentieller Bedeutung für die Zelle: sie unterstützt ihr Anhaften und die Migration, zudem werden durch die Adhäsion Signale für Wachstum und Differenzierung induziert [94-96]. Integrine sind die bekanntesten Adhäsionsproteine der Zelle [97]. Selbst einfache Metazoa wie Porifera und Cnidaria besitzen schon Integrine, die den typischen heterodimeren Aufbau, bestehend aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit, aufweisen [98]. Diese Transmembranproteine verbinden die extrazelluläre Matrix mit dem Cytoskelett. Typische Liganden der Integrine sind Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), wie Laminin, Kollagene und Fibronectin [99, 100]. Grundsätzlich lassen sich zwei Integrin vermittelte Zell-Matrixverbindungen unterscheiden: *Fokalkontakte* (Fokalen Adhäsions Plaques) und *Hemidesmosomen*.

Binden Liganden an Integrine, kommt es zur Bildung von Integrinclustern in den *Fokalkontakten* [101]. Solche Zelladhäsionskomplexe verstärken die Haftung am Substrat und die Anhäufung von Aktinfilamenten und Signalproteinen im angrenzenden Cytoplasma. Daher sind die Fokalkontakte essentiell für die Ausbildung der Zellpolarität, für gerichtete Zellmigration und die Aufrechterhaltung von Vitalität und Proliferation. Die Anwendung mechanischer Kräfte führt zu einer Größenzunahme dieser Adhäsionskontakte [102].

Ein Proteinkomplex, bestehend aus  $\alpha$ -Aktinin oder Talin, Fokalen Adhäsionskinasen (FAK), Vinculin und Arp 2/3, stellt die Verbindung zwischen der Cytoplasmadomäne der Integrine und den Aktin-Fasern des Cytoskeletts her (Abbildung 9) [103, 104].

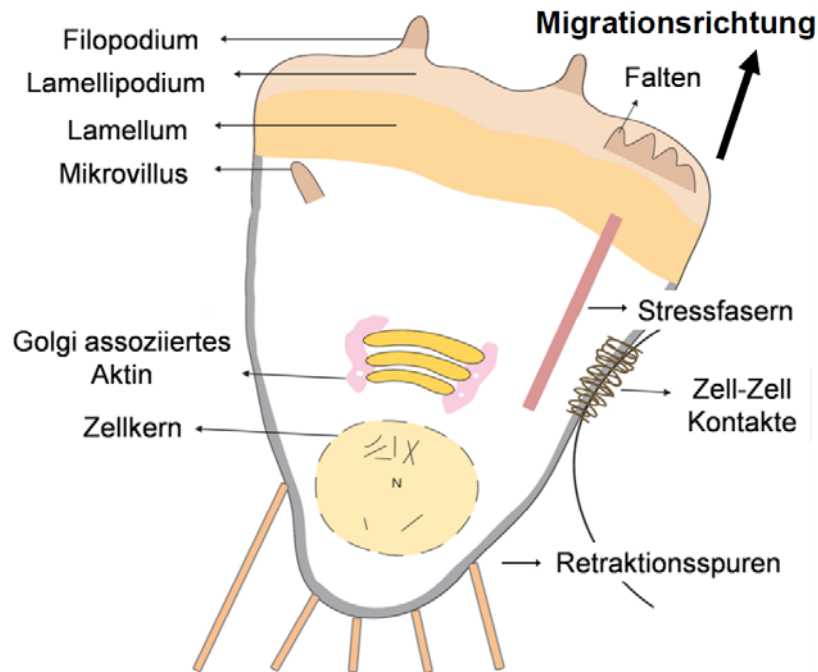


**Abbildung 9:** An der Ausbildung von Fokalkontakten beteiligte Proteine. Extrazellulär bindet Integrin z.B. an Kollagen. Die intrazelluläre Domäne des Integrins wird über einen Proteinkomplex bestehend aus Talin, Vinculin, der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Arp 2/3 an Aktinfasern gebunden. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und die Phosphatidylinositol-Phosphatkinase Typ I $\gamma$  spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion. (Quelle: verändert nach [103])

*Hemidesmosomen* verbinden die Zelle mit der Basalmembran. Ihr Name geht auf die strukturelle Ähnlichkeit zu den Desmosomen zurück. Allerdings sind die extrazellulären Adhäsionsproteine hierbei nicht Cadherine, sondern Integrine, die an Laminine der Basalmembran binden. Intrazellulär sind die Integrine mit Intermediärfilamenten verknüpft [71].

## 2.5 Zellmigration

Die Zellmigration ist ein zentraler Prozess einzelliger und mehrzelliger Lebewesen, z.B. bei der Nahrungssuche, Embryogenese, inflammatorischen Antworten sowie der Wundheilung. Dabei kommt es über aktive Membranprozesse zur Polarisation der Zelle [105-107]. Meist findet Zellmigration gerichtet, also zu Signalen wie Wachstumsfaktoren, statt. Ist die Bewegungsrichtung festgelegt, erfolgt die eigentliche Lokomotion des Zellkörpers über Aktin-Myosin Interaktionen [108, 109]. In Abbildung 10 sind einige Strukturen einer migrierenden Zelle dargestellt. An der Zell-Front, dem *leading edge*, entstehen durch Aktinpolymerisierung Cytoplasmaausstülpungen. Zu unterscheiden sind blattartige Formen wie das Lamellipodium von den fingerartigen Filopodien [110].



**Abbildung 10:** Strukturen einer migrierenden Zelle. In die Migrationsrichtung bilden Zellen saumartige Strukturen aus, dabei geht das Lamellum in das nur noch 100-160 nm dicke Lamellipodium über. Am Lamellipodium beginnend, sind oftmals dünne, fühlereiformige Ausstülpungen, sogenannte Filopodien auszumachen. Zur Oberflächenvergrößerung dienen Mikrovilli, die auf der gesamten Zelle verteilt sein können. In der Zelle sind gelegentlich Stressfasern zu beobachten. Migrierende Zellen hinterlassen häufig Retraktionsspuren. (Quelle: verändert nach [110])

Das blattartige Lamellipodium ist deutlich während der Migration und Anhaftung von Zellen zu sehen [111]. Mit einer Dicke von lediglich 100-160 nm enthält das Lamellipodium keine Organellen und ist nicht fest mit dem Untergrund verbunden. Das Lamellipodium geht in das Lamellum über, das eine Dicke von deutlich über 200 nm und eine verstärkte Adhäsion aufweist [112-114]. Filopodien sind dünne zylindrische Ausstülpungen, die aus dem Lamellipodium hervorgehen. Als "Außenposten" der Zelle erkunden sie die Umgebung und nehmen durch sensorische Fähigkeiten Signale wahr, entsprechend derer sie die Bewegungsrichtung steuern [115, 116]. Die Funktion der Mikrovilli liegt in der Vergrößerung der Zelloberfläche. Relativ kurze Mikrovilli mit 0,5  $\mu\text{m}$  sind auf nahezu allen Zellen zu finden. Spezialisierte Zellen wie z.B. Tracheaepithelzellen besitzen deutlich längere und organisierte Mikrovilli [110]. Stressfasern bestehen aus Bündeln von je 10-30 Aktin-Fibrillen, die über das Protein  $\alpha$ -Aktinin zusammengehalten werden und zudem Myosin und Tropomyosin beinhalten [117]. Dieser Aufbau ähnelt an die Aktomyosin Organisation in glatten Muskelzellen. Ihren Namen erhielten die Stressfasern durch die Theorie, dass sie durch Spannung, die auf die Zelle wirkt, entstehen. Inzwischen zeigte sich, dass Stressfasern selbst kontraktile sind. Ihre Rolle bei der Zellmigration ist noch nicht vollständig geklärt. Vieles deutet darauf hin, dass Stressfasern erst bei adhärennten Zellen ausgebildet werden [118]. Am hinteren Ende der Zelle sind häufig Retraktionsspuren zu erkennen [119, 120]. Bei diesen zurückgelassenen Zellbestandteilen handelt es sich meist um Proteine, die in Form von langen Fasern vorliegen [121].



## 2.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten bioinspirierte Materialoberflächen erzeugt und charakterisiert sowie der Einfluss verschiedener Materialeigenschaften auf primäre Keratinozyten und Fibroblasten untersucht werden. Die hergestellten Biomaterialien unterschieden sich in der Topografie in Form von verschiedener Geometrie und Größe, der Rauheit und der chemische Zusammensetzung und damit Ladung und Benetzbarkeit. Zur Evaluierung der zellulären Reaktionen auf die modifizierten Substrate dienten die Adhäsion, die Morphologie, Viabilität und Proliferation, Ausbildung von Zell-Zell Kontakten sowie die Funktionalität und Differenzierung.

Bei der Herstellung der Oberflächen flossen strukturelle Gegebenheiten der Mikroumgebung von Hautzellen im Gewebe ein. Die Funktionalisierung der Substrate wurde chemisch einfach gewählt, um die zelluläre Reaktion auf die verschiedenen Materialeigenschaften vergleichen zu können. Infolgedessen lag ein Schwerpunkt der Arbeit auf der Charakterisierung der erzeugten Substrate.

Zelltypen reagieren unterschiedlich auf veränderte Umgebungsbedingungen, weshalb in dieser Arbeit zwei Zelltypen betrachtet wurden. Bei den Keratinozyten handelt es sich um "sensible" Zellen, die schnell auf Änderungen in der Kultivierung reagieren, während Fibroblasten als sehr "robuste" und anpassungsfähige Zellen gelten. Morphologische und physiologische Reaktionen der Keratinozyten und Fibroblasten auf den hergestellten, bioinspirierten Oberflächen wurden untersucht. Am Ende der Arbeit lagen Informationen zur Reaktion des jeweiligen Zelltyps auf die erzeugten Materialeigenschaften vor. Zudem sind Gemeinsamkeiten und Gegensätze der zellulären Antwort der untersuchten Hautzellen auf die modifizierten Substrate aufzuführen und mögliche zukünftige Anwendung aus den Ergebnissen abzuleiten.

### 3. Material und Methoden

In den folgenden Abschnitten sind die in dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Geräte (3.1), die Beschreibung des durchgeführten Prozesses (3.2) sowie die materialwissenschaftlichen (3.3) und biologischen Methoden (3.4) beschrieben. Zuletzt wird die statistische Auswertung (3.5) behandelt.

#### 3.1 Materialien und Geräte

Die verwendeten Geräte (Tabelle 3), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 4), Chemikalien (Tabelle 5), Lösungen (Tabelle 6) und Zellkulturmedien (Tabelle 7) sowie die Materialien für immunhistochemische Färbungen (Tabelle 8) und die verwendeten Nano- und Mikropartikel (Tabelle 9) sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet.

##### 3.1.1 Geräte

Eine Liste der eingesetzten Geräte ist in Tabelle 3 zu sehen.

**Tabelle 3:** Geräteliste mit Hersteller

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Absaugvorrichtung	Vacuboy	TecNoMara	Zürich, CH
Analysenfeinwaage	Precisa 40 SM-200A	Oerlikon	Zürich, CH
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	BBD 6220 Nr.51	Heraeus	Hanau, D
Dampfgarer	MultiGourmet	Braun	Kronberg, D
ELISA Reader	Tecan Spectra (450nm)	Tecan	Mainz, D
ESCA	Axis Ultra	Kratos Analytical	New York, US
Eppendorfpipetten	Eppendorf Research	Eppendorf	Hamburg, D
Goniometer für Kontaktwinkel mit Software SCA 20	OCA 40	Dataphysics Instruments GmbH	Filderstadt, D
Heißluftsterilisator	ST-5050	Heraeus	Hanau, D
Laborwaage	Precisa 4000C	Oerlikon	Zürich, CH
Magnetrührer	MR Hei-Tec	Heidolph Instruments	Schwabach, D
Mikroskop 1	Zeiss Axiovert 200M ApoTome, AxioCam Mrc5, AxioCam HRm, Plan Achromat 63x/1,4 Oil DIC, PlanNeonFluor 100x/1,3 Oil	Zeiss	Göttingen, D
Mikroskop 2	Nikon Diaphot, Digital Sight DS-2Mv	Nikon	Düsseldorf, D
Mikroskop 3	Nikon TMS	Nikon	Düsseldorf, D
Multiskop	Ellipsometer	Optrel	Kleinmachnow, D
pH-Meter	pH Monitor 221236	Pharmacia	Freiburg, D
Pipette	Eppendorf Reference	Eppendorf	Hamburg, D
Pipettierhilfe	Pipettboy Acu	Integra	Fernwald, D
Plasmareaktoren	Parallelplattenreaktor	Fraunhofer IGB	Stuttgart, D

Rasterelektronen- mikroskop	Zeiss LEO 1530 VP	Zeiss	Göttingen, D
Rasterkraftmikroskop	Autoprobe CP	Termo Microscopes	Sunnyvale, USA
Muffelofen		Nabertherm	Lilienthal, D
Sterilbank	Herasafe, Kl. II, Typ KS 18	Heraeus	Hanau, D
Ultraschallbad	Sonorex RK 255 H	Bandelin	Berlin, D
Wasserbad	Julabo	Labortechnik	Seelbach, S
Zellzählgerät	Casy-1 Cell Counter Modell TTC	Schärfe-System	Reutlingen, D
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus	Hanau, D

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einfach oder mehrfach verwendbare Verbrauchsmaterialien finden sich in Tabelle 4.

**Tabelle 4:** Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Material	Kennzeichnung	Hersteller	Firmensitz
Casy-Cups		Ratiolab GmbH	Dreieich, D
Deckgläser	24 x 60 mm	Assistent	Nordheim, D
Glas Chamber Slides	Glasslides steril, 8 Well, mit Deckel	Nunc	Langenselbold, D
Eppendorf Tubes	0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; Safe-lock Tubes	Eppendorf,	Hamburg, D
Färbetrog	57 x 57 x 90 mm	Mercateo	München, D
Gene Frames <sup>®</sup>	65 µl; 1,5 x 1,6 cm	Thermo Scientific	Epsom Surrey, UK
Glasflaschen	100 ml, 250 ml, 500 ml, 1l, 2l, 5l	Schott-Glas	Mainz, D
Glasobjektträger 1	76 x 26 x 1 mm,	Labonord	Mönchengladbach, D
Glasobjektträger 2	76 x 26 x 1 mm, gereinigt, gebrauchsfertig	ThermoScientific / Menzel GmbH & Co KG	Braunschweig, D
Glasobjektträger 3 für MALDI Imaging	76 x 26 x 1 mm, auf einer Seite mit leiten- der ITO Beschichtung	Bruker Daltonik	Bremen, D
Glaspipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25ml	Hirschmann	Eberstadt, D
Leit-Tabs	12 mm, Hautaufkleber	PLANO GmbH	Wetzlar, D
Messingstempel	fibrillär strukturiert	temicon GmbH	Dortmund, D
Messzylinder	100 ml, 250ml	Scilabware	Staffordshire, UK
Mikrotiterplatten Cellstar	96 Well, steril, frei von DNase / RNase	Greiner Bio-One	Frickenhausen, D
Pasteurpipetten	long form, 230 nm	Hirschmann	Eberstadt, D
Petrischalen unbehandelt	35 x 10 mm, 60 x 15 mm, 145 x 20 mm	Greiner Bio-One	Frickenhausen, D
Petrischalen plasmaaktiviert	35 x 10 mm, 60 x 15 mm, mit Nocken, Cellstar	Greiner Bio-One	Frickenhausen, D
Pinzetten		Assistent	Sondheim, D



Pipetten, Einweg	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One	Frickenhausen, D
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One	Frickenhausen, D
Polystyrol Plättchen	Am IPT strukturiert	Daams-Kunststoffe	Emmerich, D
Silizium-Wafer	5 x 5 mm	Plano GmbH	Wetzlar, D
Skalpellschlingen	abgerundet	Bayha	Tuttlingen, D
Spritzen, Einweg	2 ml, 5 ml Norm-Ject®, steril	Henke, Sass, Wolf	Tuttlingen, D
Sterilfilter	0,2 µm	Millipore	Dassel, D
Zellkultur Flaschen	25 cm², 75 cm², 175 cm²	Greiner Bio-One	Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, steril	Greiner Bio-One	Frickenhausen, D

### 3.1.3 Chemikalien

In Tabelle 5 ist eine Übersicht der eingesetzten Chemikalien aufgeführt.

**Tabelle 5:** Chemikalien und Hersteller

Substanz	Details	Hersteller	Hersteller
3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy-Zimtsäure		Fluka	Buchs, CH
3-Ammonium-propyltriethoxysilan (APS)	99%, $H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$	Sigma Aldrich	Steinheim, D
α-Cyano-Hydroxy-Zimtsäure		Fluka	Buchs, CH
Ammoniumhydroxid	≥ 25% in Wasser, Mr 17,03 + aq	Fluka	Buchs, CH
Acrylsäure		Sigma Aldrich	Steinheim, D
Ammoniak	Reinheit 3.8	Linde GmbH	Pullach, D
Bovines Serum Albumin	> 96%, Fraktion V	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )		Merck	Darmstadt, D
Casyton		Schärfe Systeme	Reutlingen, D
Carboxyethyl-silantriol (CST)	Natriumsalz, 25% in H <sub>2</sub> O $C_3H_6O_5Na_2Si$ , pH 12-12,5	Fluorochem	Derbyshire, UK
CO <sub>2</sub>		Airliquid	Düsseldorf, D
Cytoskelfix		Cytoskeleton	Denver, USA
Dispase	1,1 U/mg; 2,0 U/ml Dispase in PBS <sup>-</sup>	Invitrogen	Carlsbad, USA
Ethanol absolut G Chromasolv®	99,9%	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Ethanol	96%	Merck	Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	99%	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Fötale Kälber Serum		Invitrogen	Karlsruhe, D
Gentamicinsulfat	10 mg/ml	Invitrogen	Karlsruhe, D
Glutaraldehyd	50% in Wasser	Fluka	Buchs, CH
Hellmanex® II	alkalisches Reinigungskonzentrat	Hellma GmbH & Co.KG	Müllheim, D

Insulin	bovin, MW: 5.743 Da	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Isopropanol	90% in Wasser	Merck	Darmstadt, D
Kaliumchlorid	p.a., 74,56 g/mol	Merck	Darmstadt, D
Kaliumhydrogen- phosphat		Merck	Darmstadt, D
Magnesiumchlorid		Merck	Darmstadt, D
Natriumhydrogen- phosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck	Darmstadt, D
Natriumchlorid	≥ 99,5%, 58,44 g/mol	Roth	Karlsruhe, D
Poly(diallyl-dimethyl- ammoniumchlorid) (PDADMAC)	MW: 70.000 Da	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Poly(Styren- Sulfonsäure) (SPS)	Natriumsalz MW: 100.000 Da	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Triton <sup>®</sup> X100	10% in Wasser	Sigma Aldrich	Steinheim, D
Versene	1x, steril	Invitrogen	Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxid 30%	Mr 34,02, d <sub>4</sub> <sup>20</sup> 1,11	Fluka	Buchs, CH

### 3.1.4 Lösungen

Die verwendeten Lösungen wurden gekauft oder selbst hergestellt (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acetatpuffer pH 4,75; 0,1 M	12,01 g Essigsäure+100 ml 1M NaOH, auf pH 4,75 einstellen mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> auf 2 l
Albumin-Lösung	2,9 mg Albumin+1ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Calciumchlorid-Lösung	7,35 g CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O+50 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Cytoskelfix-Lösung	Cytoskelfix+0,1% TritonX100
Entwässerungslösungen	25%, 50%, 75%, 96% (v/v) Ethanol in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Glutardialdehyd-Lösung	2% (v/v) Glutardialdehyd in REM-Puffer
Gentamicin-Lösung	10,0 mg/ml Gentamicinsulfat
HCCA-Matrix	α-Cyano-Hydroxy-Zimtsäure gesättigte Lösung (20 mg/ml) in 50% (v/v) Acetonitril / 0,1% TFA
Hellmanex-Lösung 2%	2 ml Hellmanex <sup>®</sup> in 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Insulin-Lösung	2,2 μM in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Lösung A	65,3 g Tris HCL 11,8 g Tris Base pH 7,5 einstellen, ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Lösung B	146,1 g NaCl ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
PBS <sup>+</sup>	40 g NaCl 1 g KCl 5,75 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O Lösen in 4 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
	0,5 g MgCl <sub>2</sub> 0,5 g CaCl <sub>2</sub> Lösen in 0,5 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
	pH 7,2 (mit NaOH), auf 5 l auffüllen

PBS <sup>-</sup>	140 mM NaCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2,0 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2	
PBS/EDTA	0,54 mM EDTA in PBS <sup>-</sup>	
Polyelektrolyt-Lösungen	PDADMAC (0,02M) 500ml ddH <sub>2</sub> O + 6,5g Poly(diallyl-dimethyl- ammoniumchlorid)	SPS (0,01M) 500ml ddH <sub>2</sub> O + 1,03g Polystyren- sulfonsäure
	→ sterilfiltrieren (0,2µm)	
Puffer für die Fixierung raster- elektronenmikroskopischer Proben (REM-Puffer)	1,45 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 7,6 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,8 g/l NaCl pH 7,3	
SA-Matrix	3,5-Dimethoxy-4-Hydroxy-Zimtsäure gesättigte Lösung (20 mg/ml) in 50% (v/v) Acetonitril / 0,1% TFA	
Tris-Waschpuffer	200 ml Lösung A 60 ml Lösung B 4 ml Calciumchlorid-Lösung 2 g BSA ad 2 l mit H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	
Trypsin/EDTA	0,5% Trypsin 5,3 mM Na <sub>4</sub> EDTA 145,5 mM NaCl	
Trypsin-Lösung	10 ml Trypsin/EDTA 100 ml Versene	

### 3.1.5 Zellkulturmedien

Eine exakte Zusammenstellung eingesetzter Zellkulturmedien findet sich in Tabelle 7.

**Tabelle 7:** Verwendete Zellkulturmedien, Zusammensetzung und Hersteller

Bezeichnung	Details	Hersteller	Firmensitz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Pulver mit L-Glutamin, 4,5g/l D-Glucose 13,38 g/l DMEM 3,70 g/l NaHCO <sub>3</sub> Lösungsmittel H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Invitrogen	Karlsruhe, D
DMEMr (ready)	10% FCS 1% Gentamycin Lösungsmittel DMEM	selbst hergestellt	
Keratinocyte Basal Medium (KBM)		Lonza	Basel, CH
KBMr (ready)	2,00 ml BPE 0,50 ml rhEGF 0,50 ml GA-1000 0,50 ml Hydrocortison 0,50 ml Bovines Insulin	Lonza	Basel, CH

### 3.1.6 Immunhistochemische Färbungen

Antikörper und sonstige Materialien für immunhistochemische Färbungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Antikörper und Materialien für immunhistochemische Färbungen, sowie deren Hersteller

Bezeichnung	Details	Hersteller	Firmensitz
<b>Antikörper</b>			
Anti-Kollagen Typ I	AF 5610-1, Maus IgG2a, 0,2 mg/ml	Acris GmbH	Herford, D
Anti-Cytokeratin 14 FITC konjugiert	Maus IgG3,	Novus Biologicals	Littleton, USA
Alexa Fluor® 555 Anti-E-Cadherin	Maus IgG2a	BD Bioscience	Heidelberg, D
Anti-Hase IgG	Ziege IgG, 2 mg/ml	AbCam	Cambridge, USA
Anti-Ki-67-FITC konjugiert	0,25 mg/ml	BD Bioscience	Heidelberg, D
Anti-Maus IgG Cy 3 konjugiert	Hase IgG, 1,5 mg/ml	Jackson Immuno Research	Newmarket, UK
Anti-p63	Hase IgG	AbCam	Cambridge, USA
Anti-PAN-Cadherin	Maus	AbCam	Cambridge, USA
Anti-Vinculin-FITC-Konjugat	Klon hVIN-1,mAb Maus IgG1, 200 UL	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Isotypkontrolle IgG1	Klon DAK-G01, 100 mg/l, Monoclonal Maus	Dako	Glostrup, DK
Isotypkontrolle IgG2a	Klon DAK-G05, 100 mg/l, Monoclonal Maus	Dako	Glostrup, DK
Phalloidin Alexa Fluor® 546 konjugiert	MW 1800	Invitrogen	Karlsruhe, D
<b>Sonstiges</b>			
Antikörper-Diluent		Dako	Glostrup, DK
Aquatex	wässriges Eindeckmittel	Merck	Darmstadt, D
Chromogen	Chromogen System	Dako	Glostrup, DK
DakoPen	Fettstift	Dako	Glostrup, DK
Dako Peroxidase Blocking Reagent	Ready-to-Use	Dako	Glostrup, DK
Eindeckmittel mit DAPI	ProLong® Gold mit DAPI	Invitrogen	Karlsruhe, D
EnVision Detection Systems Peroxidase/DAB	Rabbit / Mouse	Dako	Glostrup, DK
Mayer's Hämalaulösung		Merck	Darmstadt, D
Isomount		Labonord	Mönchengladbach, D
Paraffinschnitte	Echthaut, Kreuzband, Knorpel; 3 µm Dicke	selbst hergestellt Fraunhofer IGB	
Pronase	1 mg/ml	Roche	Mannheim, D

### 3.1.7 Nano- und Mikropartikel

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte am Fraunhofer IGB, die Mikropartikel wurden gekauft (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Verwendete Nano- und Mikropartikel

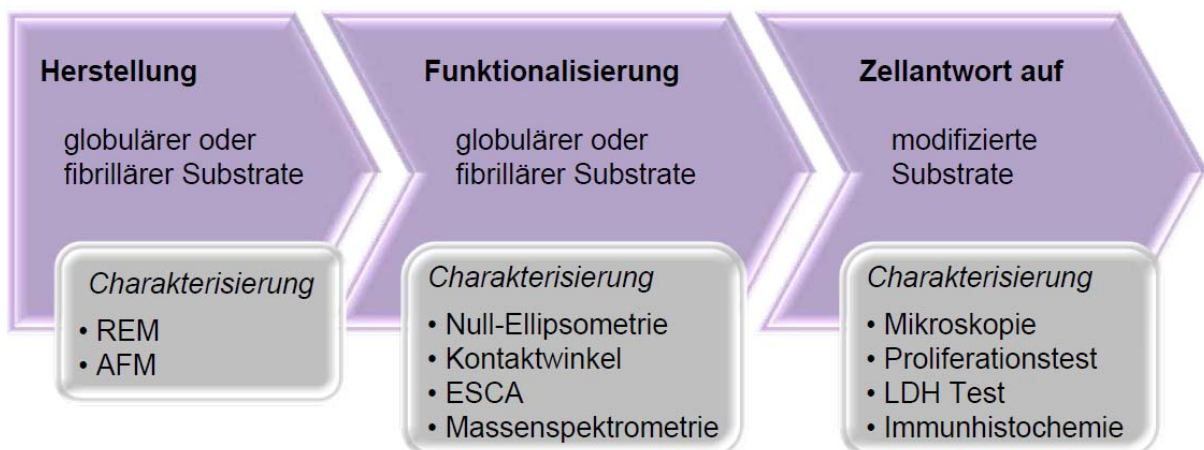
Partikel	Details	Hersteller	Firmensitz
Amino-Mikropartikel	Silica-Partikel amino, Ø1 µm, surface NH <sub>2</sub> , 50 mg/ml	G. Kisker GbR	Steinfurt, D
Amino-Nanopartikel	43,9 mg/ml, Ø100 nm Charge S158 APS	Gruppe BMG, Fraunhofer IGB,	Stuttgart, D

### 3.1.8 Humane Haut

Die Isolation primärer Keratinozyten und Fibroblasten erfolgte aus humaner Haut. Es wurden ausschließlich Vorhäute von Spendern unter 10 Jahren aufgearbeitet. Als Bezugsquellen dienten die Privatpraxis Dr. Yurrtas und das Olgahospital in Stuttgart sowie das Kreiskrankenhaus in Ludwigsburg.

## 3.2 Prozess

Ein Modell des Prozessablaufs zur Herstellung, Funktionalisierung und der Zellkultivierung auf den erzeugten Substraten ist in Abbildung 11 dargestellt. Zu sehen sind die drei Kernbereiche und die dazugehörigen Charakterisierungsschritte.



**Abbildung 11:** Gesamtversuchsschema der vorliegenden Arbeit bestehend aus drei Kernbereichen: Herstellung, Funktionalisierung und Zellantwort sowie der jeweiligen Charakterisierungsmethoden.

## 3.3 Materialwissenschaftliche Methoden

Zu den materialwissenschaftlichen Methoden gehört die Herstellung der globulären und der fibrillären Oberflächen (3.3.1 + 3.3.2), deren anschließende Funktionalisierung mit Amino- oder Carboxygruppen (3.3.3 + 3.3.4) sowie die Charakterisierung der jeweiligen Teilschritte (3.3.5).

### 3.3.1 Herstellung der globulären Oberflächen

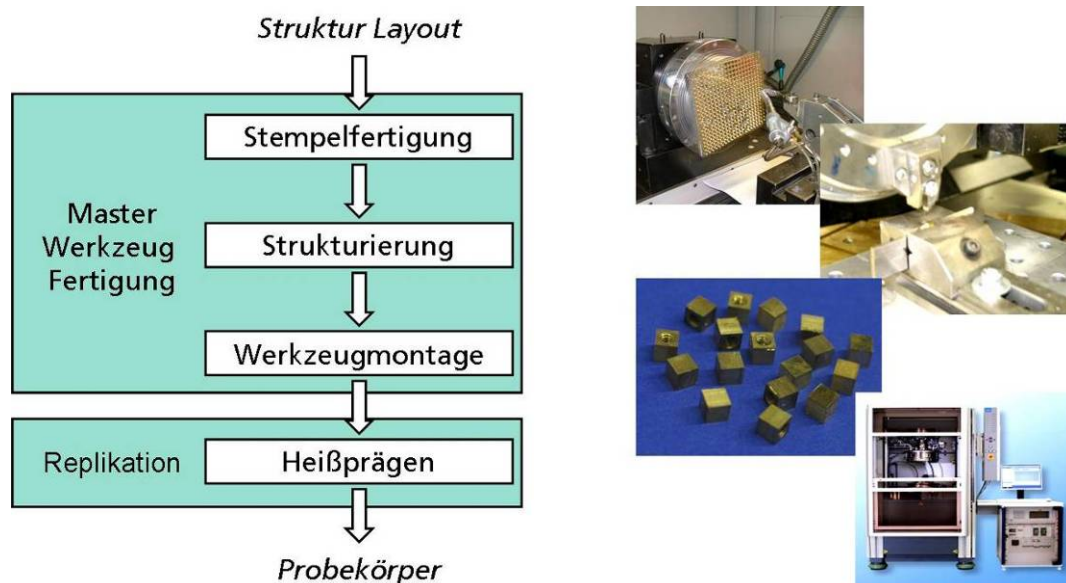
Die globuläre Oberflächen-Topografie basiert auf dem Abscheiden von Amino-Silica-Partikeln auf Glassubstraten, die mit Polyelektrolyten beschichtet sind. Durch die Verwendung von Partikeln mit 100 nm oder 1 µm Durchmesser entstehen nano- oder mikrostrukturierte Substrate. Eine stabile Partikelanbindung entsteht durch Sinterung.

#### Durchführung

- a) Reinigung und Aktivierung (Hydroxylierung) halbiertes Glasobjektträger
  - Reinigung in 2% (v/v) Hellmanexlösung in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 40°C, 60 min, Wasserbad
  - Waschen, dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
  - aktivieren mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(30%) : NH<sub>3</sub>(25%) (1 : 3; v/v), 70°C, 40 min, Wasserbad
  - Waschen, dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
- b) Layer-by-Layer Beschichtung der halbierten Glasobjektträger
  - Inkubation der hydroxylierten Substrate in Polykationenlösung (PDADMAC) für 20 min, RT, schwenkend
  - Waschen, dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
  - Inkubation der beschichteten Glasobjektträger in Polyanionenlösung (SPS) 20 min, RT, schwenkend
  - Waschen, dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, anschließend trocknen mit N<sub>2</sub>
- c) Abscheiden von Amino-Silica-Nanopartikeln
  - Inkubation der Partikel-Stammlösung im Ultraschallbad, 30 min, RT
  - Einstellen des Feststoffgehalts der Partikelsuspensionen auf 10 mg/mL mit Acetat Puffer (pH 4,7)
  - Aufkleben von Gene Frames auf Substrate, Überführung in feuchte Kammer
  - Zugabe 200 µl Partikelsuspension, 5 min, RT, innerhalb des Gene Frames
  - Abnahme der Partikelsuspension
  - Waschen, dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, anschließend trocknen mit N<sub>2</sub>
  - Zweimal wiederholen: ab Zugabe 200 µl Partikelsuspension
- d) Abscheiden von Amino-Silica-Mikropartikeln
  - Inkubation der Partikel-Stammlösung im Ultraschallbad, 30 min, RT
  - Einstellen der Partikelsuspensionen auf 10 mg/mL mit Acetat Puffer (pH 4,7)
  - Aufkleben von Gene Frames auf Substrate, Überführung in feuchte Kammer
  - Zugabe 200 µl Partikelsuspension, 30 min, RT, innerhalb des Gene Frames
  - Abnahme der Partikelsuspension
  - Waschen, dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, anschließend trocknen mit N<sub>2</sub>
  - Zweimal wiederholen: ab Zugabe 200 µl Partikelsuspension
- e) Sintern der Partikelschichten auf Glassubstraten
  - Entfernen Gene Frames, Substrate in Ofen überführen, Aufheizrate 300°C/h
  - Haltetemperatur 560°C für Nanopartikel, 60 min
  - Haltetemperatur 620°C für Mikropartikel, 90 min
  - Abkühlen auf ca. 80°C, über Nacht

### 3.3.2 Herstellung der fibrillären Oberflächen

Die fibrilläre Strukturen entstanden in einem Heißprägeprozess am Fraunhofer IPT (Abbildung 12). Durch Elektronenstrahl-Lithografie erfolgte die Strukturierung des Stempels im Nanometerbereich, wobei Rillen in Photolack "geschrieben" und dieser strukturierte Photolack dann galvanisch abgeformt, d.h. ein Nickelabdruck genommen wurde. Zur Übertragung der Strukturen auf Polystyrolplättchen war die Montage des Stempels in die Heißprägeanlage vom Typ Hex 02 notwendig. Die Prägekraft lag bei 300 N für eine Dauer von 30 s, dabei waren am Werkzeug Temperaturen von 142-144°C und am Polystyrol 125-128°C messbar, es schloss sich eine Kühlzeit an.



**Abbildung 12:** Prozessschema zur Herstellung fibrillärer Oberflächen. Zunächst erfolgt die Fertigung eines Masterwerkzeugs in Form eines Messingstempels. Die Strukturierung im Nanometerbereich wird durch Elektronenstrahl-Lithografie erreicht. Nach der Montage des Stempels ist die Replikation strukturierter Oberflächen in Polystyrol durch Heißprägen möglich. So lassen sich Rillenstrukturen in Polystyrol erzeugen, die im Nanometerbereich liegen.

### 3.3.3 Funktionalisierung der globulären Oberflächen

Durch die Hitzebehandlung beim Sintern verlieren die Partikel ihre organischen Gruppen und können wieder funktionalisiert werden. Dies erfolgt kovalent durch Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan oder Na-Carboxyethylsilantriol.

#### Durchführung

##### a) Aminofunktionalisierung

- Reinigung und Aktivierung der Substrate nach 3.3.1 a), trocknen mit N<sub>2</sub>
- 5% (v/v) APS in 95% Ethanol unter Rühren lösen, im Plastikmesszylinder
- Zugabe zu Glasoberflächen, Inkubation für 60 min, RT
- Substrate einzeln waschen in reinem Ethanol; 20 s, Plastikbecherglas
- Trocknen mit N<sub>2</sub>, anschließend für 60 min bei 100°C

## b) Carboxyfunktionalisierung

- Reinigung und Aktivierung der Substrate nach 3.3.1 a), trocknen mit N<sub>2</sub>
- 0,25% CST in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> unter Rühren lösen, im Plastikmesszylinder
- pH-Wert auf 5,0 einstellen mit 100% Essigsäure
- Zugabe zu Glasoberflächen, Inkubation für 60 min, RT
- Substrate einzeln waschen in reinem Ethanol; 20 s, Plastikbecherglas
- Trocknen mit N<sub>2</sub>, anschließend für 60 min bei 120°C

### 3.3.4 Funktionalisierung der fibrillären Oberflächen

Inerte Polymerwerkstoffe wie Polystyrol lassen sich durch Niederdruck-Plasmaverfahren funktionalisieren. Bei den erzeugten Plasmen handelte es sich ausschließlich um Hochfrequenz-Plasmen bei einer Anregungsfrequenz von 13,56 MHz. Durch verschiedene Plasmabehandlungen wurden auf die strukturierten Platten Amino- und Carboxygruppen aufgebracht. Zudem war die Erzeugung von Referenzoberflächen bei den strukturierten Platten notwendig, die eine ähnliche Oberflächenfunktionalisierung wie kommerzielle Polystyrol-Zellkulturgefäße aufweisen. Dies erfolgte durch ein CO<sub>2</sub>-Plasma. Alle strukturierten Substrate wurden vor der Plasma-Behandlung mit Isopropanol (70%) gereinigt.

#### Durchführung

##### a) Aminofunktionalisierung

- gelbliches Ammoniak-Plasma (Abbildung 13)
- Gasfluss: 25 sccm
- Druck: 0,059 mbar
- Leistung: 40 W
- Behandlungsdauer: 13 s

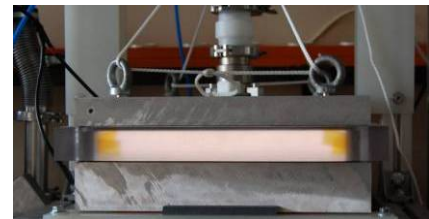


Abbildung 13: Ammoniak-Plasma

##### b) Carboxyfunktionalisierung (Abbildung 14)

- bläuliches Acrylsäure-Plasma
- Gasfluss: 2 sccm
- CO<sub>2</sub>-Druck: 0,08 mbar
- CO<sub>2</sub>+AAc-Druck: 0,204 mbar
- Leistung: 20 W
- Behandlungsdauer: 13 s

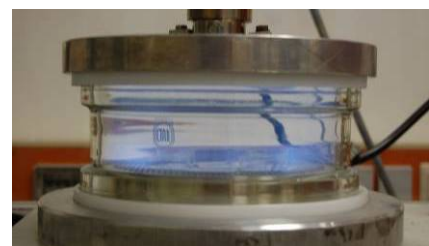


Abbildung 14: Acrylsäure-Plasma

##### c) Behandlung mit CO<sub>2</sub>-Plasma (Abbildung 15)

- bläuliches CO<sub>2</sub>-Plasma
- Gasfluss: 2 sccm
- Druck: 0,110 mbar
- Leistung: 40 W
- Behandlungsdauer: 13 s

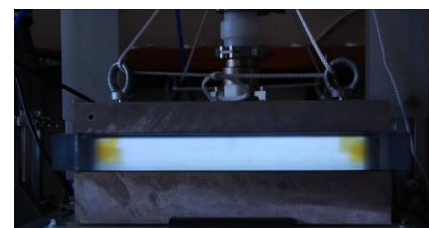


Abbildung 15: CO<sub>2</sub>-Plasma



### 3.3.5 Charakterisierung der modifizierten Oberflächen

Zur Überprüfung der Strukturierung der Oberflächen dienten rasterelektronenmikroskopische (3.3.5.1) und rasterkraftmikroskopische (3.3.5.2) Aufnahmen. Das Aufbringen funktioneller Gruppen wurde mit Null-Ellipsometrie (3.3.5.3), Kontaktwinkelmessungen (3.3.5.4) und Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse (3.3.5.5) überprüft.

#### 3.3.5.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Nano- oder mikrostrukturierte Oberflächen lassen sich rasterelektronenmikroskopisch abbilden. Gesinterte Proben wurden teilweise gebrochen und an den Bruchstellen die Einsinktiefen der Partikel betrachtet. Mit speziellen Fixierungsschritten lassen sich Zellen auf Substraten untersuchen. Dazu ist eine vollständige Entwässerung der Proben notwendig. Zudem sind nichtleitende Proben für REM-Untersuchungen mit einer Schicht leitendem Metall wie z.B. Platin zu überziehen, um Aufladungen zu vermeiden und den Abtransport von Ladungen zu gewährleisten. Die Messungen erfolgten an einem Feldemissionselektronenmikroskop LEO 1530 VP (früher Fa. LEO, heute Zeiss).

#### 3.3.5.2 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy, AFM*) erlaubt eine Darstellung der Topografie von Oberflächen. Diese Methode basiert auf einer scharfen Spitze, die an einem Federarm (*Cantilever*) befestigt ist und die zu untersuchende Oberfläche abrastert. Mit Hilfe eines Steuermechanismus wird die Kraft zwischen Probe und Spitze konstant gehalten, wodurch ein definierter Abstand zur Probenoberfläche resultiert. Wechselwirkungen der Spitze mit der Probe führen zur Auslenkung der Spitze. Bewegungen der Spitze lassen sich durch Reflexion eines Laserstrahls auf der Spitze verfolgen und ermöglichen so die Erstellung des Profils der Oberfläche. Mit Hilfe eines Piezoelements erfolgt die Rasterung der Probe. Messungen können im *Contact-Mode*, im *Non-Contact-Mode* oder im *Intermittent-Contact-Mode* erfolgen. In dieser Arbeit wurde im *Non-Contact-Mode* gemessen; das ist eine berührungsfreie Abrasterung der Oberfläche. Neben der Darstellung der Oberflächen-Topografie lässt sich aus den aufgenommenen Daten die Rauheit von Oberflächen ermitteln. Es erfolgte die Bestimmung der mittleren Rauheit  $R_{ave}$  sowie des Flächenverhältnisses von der gemessenen Oberfläche zur abgerasterten Fläche.  $R_{ave}$  entspricht dem arithmetischen Mittel der Abweichung von der Mittellinie einer vermessenen Oberfläche und wird also größer je rauer die Oberfläche ist (Formel 1).

**Formel 1:** Bestimmung der mittlere Rauheit  $R_{ave}$

$$R_{ave} = \sum_{n=1}^N \frac{|z_n - \bar{z}|}{N} \quad \bar{z} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N z_n \quad \begin{array}{l} \bar{z} = \text{mittlere Höhe} \\ N = \text{Anzahl der gemessenen Datenpunkte} \end{array}$$

### 3.3.5.3 Null-Ellipsometrie

Mit der Null-Ellipsometrie ist die Messung der Schichtdicke transparenter, dünner Schichten möglich. Die Methode basiert auf der Änderung des Polarisationszustandes von elliptisch polarisiertem Licht beim Durchgang. Diese Änderung ist abhängig von Reflexion vom Brechungsindex  $n$ , der Absorptionskonstante  $k$  und der Dicke der Schichten. Als Lichtquelle dient ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 632,8 nm. Das Multiskop besteht aus einem schrittmotorgesteuerten Polarisator, einem Kompensator, einem justierbaren Probenstisch sowie einem Analysator und einem Detektor. Durch Drehung eines Polarisators und des Kompensators lässt sich der Polarisationszustand des zunächst linear polarisierten Laserlichts so einstellen, dass das Licht nach Reflexion an der Probe linear polarisiert ist und durch einen zweiten Polarisator ausgelöscht werden kann. Diese Winkeleinstellungen und ein Schichtmodell ermöglichen die Berechnung der Schichtdicken transparenter dünner Schichten auf einem reflektierenden Substrat mit Hilfe der Software Elli von Optrel. Brechungsindizes und Absorptionskonstanten der Schichten sind aus der Literatur entnommen und in Tabelle 10 aufgelistet [122].

**Tabelle 10:** Schichtmodell für Schichtdicken auf oxidierten Siliziumsubstraten.

Schicht	Brechungsindex $n$	Absorptionskonstante $k$	Schichtdicke [Å]
Luft	1	0	-
Silanschicht	1,5	0	zu ermitteln
SiO <sub>2</sub>	1,465	0	zu ermitteln
Si	3,865	-0,02	-

Glas- und Polystyroloberflächen sind als Substrate für diese Methode schlecht geeignet, da deren Transparenz an der oberen und unteren Grenzfläche zu Mehrfachreflexionen des Laserstrahls führt. Da Oberflächen aus Silizium starke Ähnlichkeiten zu Glas aufweisen, erfolgten die Messungen auf analog zu den erzeugten Oberflächen modifizierten Siliziumwafern. Es wurde an fünf unterschiedlichen Stellen auf jeder Probe gemessen sowie für jede Schicht eine fünffache Bestimmung angefertigt.

#### Durchführung

- Reinigung und Aktivierung nach 3.3.1 a), anschließend trocknen
- Messung der Dicke der Siliziumoxidschicht (SiO<sub>2</sub>)
- Beschichtung des Siliziumwafers nach 3.3.3 oder 3.3.4
- Messung des amino- oder carboxy-funktionalisierten Siliziumwafers
- ggf. Messung der funktionalisierten Siliziumwafer nach Mediuminkubation >1h
- Berechnung der Schichtdickenzunahme

### 3.3.5.4 Kontaktwinkelmessung

Die Benetzbarkeit von Oberflächen lässt sich mit der Kontaktwinkelmessung bestimmen. Ein Tropfen, der auf einer Festkörperoberfläche liegt, bildet am Phasenkontaktpunkt einen für das jeweilige Substrat typischen Kontaktwinkel aus. Je kleiner der gemessene Kontaktwinkel zwischen Substrat und Flüssigkeit ist, desto hydrophiler und damit benetzbarer ist die Oberfläche. Der Tropfen (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) wird durch eine CCD-

Kamera digitalisiert dargestellt und mittels des Programms SCA20 vermessen. Dabei ist die Festlegung der Basislinie bei der Phasengrenze fest/flüssig, die Tropfenkontur und die anschließende Berechnung des Kontaktwinkels durch Anlegen von Tangenten wichtig. Die Messung erfolgte sowohl direkt nach der Funktionalisierung der Substrate als auch nach Inkubation der Oberflächen in den Zellkulturmedien KBMr oder DMEMr für >1 h und einem anschließenden Waschschrift mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

#### Durchführung

- Befüllung und Justierung einer Spritze mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>
- Positionierung der zu vermessenden Probe
- Absetzen eines Tropfens auf der Oberfläche
- PC gestützte Ermittlung des Kontaktwinkels

#### **3.3.5.5 Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse**

Die Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse (ESCA), im Englischen *X-ray photoelectron spectroscopy* (XPS) genannt, diente zur Analyse der chemischen Zusammensetzung der obersten 10 nm eines Materials. Das Prinzip basiert auf dem äußeren Photoeffekt, der entsteht, wenn durch weiche Röntgenstrahlen Photoelektronen aus einem Festkörper gelöst werden. Für die ausgelösten Photoelektronen gilt die in Formel 2 beschriebene Energiebilanz.

**Formel 2:** Energiebilanz für Photoelektronen

$$h\nu = E_B + E_{kin} + e\Phi$$

$h\nu$  = Photoenergie der verwendeten Strahlung  
 $E_B$  = Bindungsenergie der Photoelektronen  
 $E_{kin}$  = kinetische Energie der ausgelösten Photoelektronen  
 $e\Phi$  = Elektronenaustrittsarbeit

Durch die Messung der kinetischen Energie dieser Elektronen lassen sich Informationen über Zusammensetzung und chemische Bindung bzw. den Oxidationszustand der untersuchen anorganischen und organischen Festkörper, außer Wasserstoff und Helium, gewinnen. Mit diesem sehr sensitiven Analyseverfahren mit einer Nachweisgrenze von 0,5 Atomprozent bis 0,02 Atomprozent erfolgte die Evaluierung der funktionalisierten Oberflächen über die Messung von relevanten Bindungsenergien für Stickstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff.

#### **3.3.5.6 Massenspektrometrie**

Mit der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (*engl. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) Massenspektrometrie lassen sich Moleküle in die Gasphase transferieren, ionisieren und so der massenspektrometrischen Analyse zugänglich machen. Dies gelingt auch bei großen Molekülen, Polymeren und Biomolekülen wie z. B. Proteine. Für die Messung ist eine Kokristallisation von Matrix und Analyt notwendig, wobei Analytmoleküle in Kristalle der MALDI Matrix "eingebaut" werden, während sich die Kristalle bilden. Als Matrixsubstanzen dienen kleine organische Moleküle, die bei der verwendeten Laserwellenlänge Energie stark absorbieren. Mit kurzen, hochenergetischen Laserpulsen von 2–5 ns Pulsdauer erfolgt die Anregung, die nach Relaxation im Kristallgitter zu explosionsartigen Teil-

chenablösungen an der Oberfläche des Kristalls führt [123]. Die anschließende massenspektrometrische Analyse beruht auf dem Übergang von Matrix und den darin eingeschlossenen Analytmolekülen in das Vakuum des Massenspektrometers. Das eingesetzte MALDI-Massenspektrometer Ultraflex II TOF/TOF der Firma Bruker arbeitet mit einem Tandem-Flugzeit-Massenanalysator (TOF/TOF, *Time Of Flight*). Dadurch sind eine hohe Empfindlichkeit und die Anwendbarkeit auf große und komplexe Moleküle wie Proteine möglich.

Im Rahmen der Versuche erfolgte die Aufnahme und Auswertung von Massen im Bereich von 5.000-70.000 Da unter Verwendung der FlexControl und FlexAnalysis Software (Bruker). Zu unterscheiden sind die Probenvorbereitung "ohne Waschen", hierbei wird die Analytlösung auf die kommerziellen MALDI MS-Substrate gegeben. Nachdem die Flüssigkeit verdunstet ist, wird die stabilisierende Matrix auf die Analyte (*on top*) gegeben. Dabei eignet sich für Peptide eine HCCA-Matrix und für große Proteine eine SA-Matrix. Bei der Behandlung "mit Waschen" werden die Polystyrol-Proben, nachdem die Analytlösung getrocknet ist, in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen und anschließend wieder getrocknet und mit Matrix versehen.

#### Durchführung

- je 3 Tropfen à 0,5 µl Insulin- oder Albumin-Lösung auf kommerziellen MALDI-TOF MS Objektträger und die Polystyrol-Oberflächen, trocknen lassen, RT
- ohne Waschen: Zugabe von 0,5 µl Matrix auf Analyte, trocknen lassen, RT
- mit Waschen: Polystyrol-Oberflächen für 30 s in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, trocknen lassen, Zugabe von 0,5 µl Matrix auf Analyte, trocknen lassen, RT
- Befestigung der Polystyrol-Substrate mit leitenden Aufklebern auf MALDI-TOF MS-Objektträger

### **3.4 Biologische Methoden**

#### **3.4.1 Isolation und Kultivierung primärer Hautzellen**

Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus Hautbiopsien isoliert. Der Transport der Biopsien erfolgte in DMEM +1% (v/v) Gentamicin. Mögliche Kontaminationen zeigten sich durch die Inkubation von 4 ml des Transportmediums in einer Zellkulturflasche (T25) bei 37°C nach spätestens einer Woche.

#### Durchführung

##### a) Aufarbeitung von Hautbiopsien

- Biopsie in Petrischale überführen und zweimal waschen mit PBS<sup>-</sup>
- Entfernen von Fett, Bindegewebe und entzündeten Bereichen mit Skalpell
- Zerkleinern des Biopsiematerials (3-5 mm große Stücke)
- Enzymatische Verdauung in Dispase-Lösung (2 U/ml in PBS<sup>-</sup>), 16-18h, 4-8°C
- Trennung von Epidermis und Dermis mittels zweier Pinzetten
- Isolation der Keratinozyten aus der Epidermis
- Isolation der Fibroblasten aus der Dermis

#### b) Isolation und Kultivierung primärer Keratinozyten

- Absaugen der Dispase-Lösung, Zerkleinern der Epidermisstücke mit Skalpell
- Überführung des Zellmaterials in 50 ml Röhrchen mit Pinzette
- Zugabe von 10 ml 0,25%-ige Trypsin/EDTA-Lösung, 18 min, Brutschrank
- Vereinzeln der Zellen durch Resuspension mit Einmalpipette (2 min)
- Abstoppen der Trypsinreaktion mit 1 ml FCS
- Zentrifugation der Zellen, 1000 rpm, 5 min, Überstand absaugen
- Pellet in 2 ml KBMr aufnehmen, Aussaat in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche
- Nach 4 h Kultivierung im Brutschrank, Medium in neue 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführen, Zugabe 4 ml KBMr in erste Flasche
- Kultivierung beider Flaschen im Brutschrank, Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Keratinozyten spätestens bei 80% Konfluenz
- Absaugen des Mediums, Zugabe 2 ml PBS/EDTA, 10-30 min, Brutschrank
- Zugabe von 2 ml 0,25%ige Trypsin/EDTA-Lösung, 3 min, Brutschrank
- Überführung der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren, abstoppen mit 1 ml hitzeinaktiviertem FCS
- 100 µl abnehmen für Zellzahlbestimmung
- Zentrifugation der Zellen, 1000 rpm, 5 min
- Konzentration einstellen für Versuche oder Weiterkultivierung

#### c) Isolation und Kultivierung primärer Fibroblasten

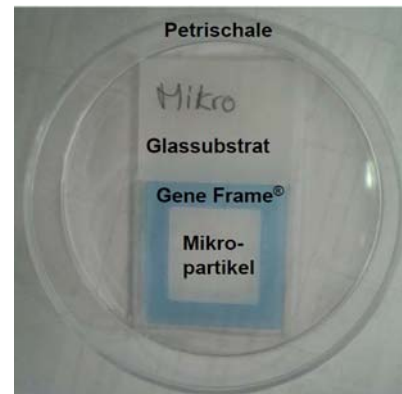
- Absaugen der Dispase-Lösung
- Zerkleinern der Dermisstücke mit Skalpell
- Überführung des Zellmaterials in 50 ml Röhrchen mit Pinzette
- Zugabe von 10 ml Kollagenase-Lösung, 45 min, Brutschrank
- Zugabe von 10 ml DMEMr
- Zentrifugation der Zellen, 1000 rpm, 5 min, Überstand absaugen
- Pellet in 10 ml DMEMr aufnehmen
- Zentrifugation der Zellen, 1000 rpm, 5 min, Überstand absaugen
- Pellet in 2 ml DMEMr aufnehmen, Aussaat in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche
- Nach 24 h Kultivierung im Brutschrank vorsichtige Zugabe von 2 ml DMEMr
- Medienwechsel alle 2-3 Tage
- Passagieren der Fibroblasten spätestens bei 100% Konfluenz
- Absaugen des Mediums, Zugabe 2 ml PBS/EDTA, 5 min, Brutschrank
- Zugabe von 2 ml 0,25%ige Trypsin/EDTA-Lösung, 3 min, Brutschrank
- Überführung der Zellsuspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen
- Resuspendieren, abstoppen mit 1 ml hitzeinaktiviertem FCS
- 100 µl abnehmen für Zellzahlbestimmung
- Zentrifugation der Zellen, 1000 rpm, 5 min
- Konzentration einstellen für Versuche oder Weiterkultivierung

#### d) Zellzahlbestimmung

- 1:100 Verdünnung der 100 µl Zellsuspension mit Casyton
- Spülen mit Casyton, messen der Zellzahl, spülen mit Casyton

### 3.4.2 Versuchsdurchführung globuläre Oberflächen

Die modifizierten Oberflächen und Kontrollsubstrate werden zunächst beschriftet, mit Gene Frames versehen und sterilisiert (Abbildung 16). Anschließend erfolgen die Zugabe der Zellen sowie deren Kultivierung über 72 h. Für immunhistochemische Färbungen oder REM Analysen sind im Anschluss an die Kultivierung unterschiedliche Fixierungsmethoden notwendig, um die Proben zu stabilisieren und Bindestellen für Antikörper zugänglich zu machen. Die Proben für die elektronenmikroskopische Auswertung müssen vollständig entwässert sein.



**Abbildung 16:** Modifiziertes Glassubstrat mit Gene Frame

#### Durchführung

##### a) Versuchsaufbau

- Eingrenzen modifizierter Oberflächen durch Gene Frame
- Aufbringen der Gene Frames auf Kontrolloberflächen
- Überführung modifizierter Oberflächen und Kontrollen in Petrischale (6 mm)
- Mindestens 3 Proben einer modifizierten Oberfläche
- Positiv-Kontrollen: kommerzielle Tissue Culture Petrischalen
- Negativ-Kontrollen: gereinigtes Glas

##### b) Sterilisation der Proben

- Zugabe von 70%igem Ethanol in Petrischalen
- Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur, anschließend absaugen
- Zugabe von PBS<sup>+</sup>, absaugen vor Zugabe der Zellen

##### c) Zugabe der Zellen

- Zugabe von 40.000 Keratinozyten oder 30.000 Fibroblasten pro Gene Frame in 200 µl des entsprechenden Zellkulturmediums
- Inkubation im Brutschrank
- Zugabe von 6 ml Medium bei Fibroblasten nach 1,5 h
- Zugabe von 6 ml Medium bei Keratinozyten nach 3 h
- Lichtmikroskopische Betrachtung nach 24 h, 48 h und 72 h

##### d) Fixierung für immunhistochemische Färbungen

- Proben 2 min mit sterilem PBS<sup>+</sup> waschen, anschließend absaugen
- Zugabe von Cytoskelfix + 0,1% Triton X100
- Inkubation für 5 min bei -20°C, anschließend absaugen der Lösung
- Lagerung der Oberflächen bei -20°C

##### e) Fixierung für rasterelektronenmikroskopische Messung

- Proben 2 min mit sterilem PBS<sup>+</sup> waschen, anschließend absaugen
- Zugabe einer 2%igen Glutaraldehyd-Lösung (Abzug)
- Inkubation 2 h für Keratinozyten

- Inkubation 30-45 min für Fibroblasten,
- Ggf. Gene Frames entfernen
- aufsteigende Alkoholreihe jeweils 4 min (Ethanol: 25%; 50%; 75%; 96%; 96%; Isopropanol)
- Anschließend trocknen über Nacht im Abzug

### 3.4.3 Versuchsdurchführung fibrilläre Oberflächen

Zunächst erfolgt die Beschriftung und Sterilisierung der modifizierten Polystyrol-Substrate sowie der Kontrollen. Nach Zugabe der Zellen wurden diese für 48 h kultiviert. Anschließend war die Fixierung der Zellen für folgende immunhistochemische Färbungen oder REM Analysen erforderlich.

#### Durchführung

##### a) Versuchsaufbau

- Überführung der strukturierten und funktionalisierten Polystyrolplättchen in unbehandelte Petrischalen (6 mm)
- Funktionalisierte Kontrollen: unbehandelte Petrischalen, die mit den gleichen Plasmabehandlungen (Ammoniak, Acrylsäure und CO<sub>2</sub>) wie die fibrillären Substrate modifiziert wurden, aber keine Strukturierung besitzen
- Positiv-Kontrollen: kommerzielle Tissue Culture Petrischalen
- Negativ Kontrollen: kommerzielle unbehandelte Petrischalen

##### b) Sterilisation der Proben

- Zugabe von 70%igem Ethanol in Petrischalen
- Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur, anschließend absaugen
- Zugabe von PBS<sup>+</sup>, absaugen vor Zugabe der Zellen

##### c) Zugabe der Zellen

- Zugabe von 300.000 Keratinozyten oder 150.000 Fibroblasten in 6 ml Zellkulturmedium pro Petrischale, Inkubation im Brutschrank
- Lichtmikroskopische Betrachtung nach 24 h und 48 h

##### d) Fixierung für immunhistochemische Färbungen

- Proben 2 min mit sterilem PBS<sup>+</sup> waschen, anschließend absaugen
- Zugabe von Cytoskelfix + 0,1% Triton X100
- Inkubation für 5 min bei -20°C, anschließend absaugen der Lösung
- Lagerung der Oberflächen bei -20°C

##### e) Fixierung für rasterelektronenmikroskopische Messung

- Proben 2 min mit sterilem PBS<sup>+</sup> waschen, anschließend absaugen
- Zugabe einer 2%igen Glutaraldehyd-Lösung (Abzug)
- Inkubation 2 h für Keratinozyten, 30-45 min für Fibroblasten,
- aufsteigende Alkoholreihe jeweils 4 min (Ethanol: 25%; 50%; 75%; 96%; 96%; Isopropanol), anschließend trocknen über Nacht im Abzug

### **3.4.4 Evaluierung des zellulären Verhaltens**

#### **3.4.4.1 Lichtmikroskopie**

Lichtmikroskopische Betrachtungen nach 24 h, 48 h und ggf. 72 h dienen als Grundlage, um die Adhäsion, Proliferation und Morphologie der primären Zellen auf den verschiedenen Substraten zu evaluieren.

#### **3.4.4.2 WST-1 Proliferationstest**

Mit dem WST-1 Proliferationstest lässt sich die Viabilität und Proliferation von Zellen quantifizieren. Die Methode basiert auf der Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes 4-[3-(4-Jodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat zu violetten Formazankristallen durch ein intrazelluläres Enzym. Diese mitochondriale Dehydrogenase ist nur bei vitalen Zellen aktiv, so dass die Umwandlung als Maß für die Viabilität und damit auch Proliferation der Zellen dient. Die Menge des gebildeten Formazans wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 420-480 nm bestimmt.

##### Durchführung

- 10%ige WST-1 Lösung mit entsprechendem Zellkulturmedium herstellen
- Medium von den Oberflächen absaugen
- 10%ige WST-1 Lösung auf strukturierte Oberflächen pipettieren
- Inkubation Keratinozyten: 60 min (95% Feuchtigkeit, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
- Inkubation Fibroblasten: 45 min (95% Feuchtigkeit, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)
- Inkubation 10%ige WST-1 Lösung (Blindprobe) analog zu Zelltyp in Röhrchen
- 100 µl des Überstandes in 96-well Platte überführen
- dreimal 100 µl Blindprobe in 96-well Platte überführen
- Messung der Absorption bei 450 nm

#### **3.4.4.3 Lactat-Dehydrogenase Test**

Der hier beschriebene LDH Test basiert auf der Tatsache, dass sterbende oder tote Zellen eine defekte Plasmamembran besitzen und somit die Detektion und Quantifizierung cytosolischer Proteine ermöglichen. Als ubiquitäres Enzym eignet sich die Lactat-Dehydrogenase, zudem ist sie resistent gegen Proteasen. In der Zelle katalysiert das Enzym die Oxidation von Lactat zu Pyruvat, was sich wiederum in einer zweiten Enzymreaktion quantifizieren lässt. Diese beginnt mit der Zugabe des Enzyms Diaphorase und des Tetrazoliums Salzes 2-[4-Iodphenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid (INT). Nun katalysiert die Diaphorase die Reduktion von INT zu einem roten Formazansalz unter gleichzeitiger Oxidation von NADH + H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup>. Die Menge des gebildeten Formazans lässt sich bei 492 nm photometrisch quantifizieren und ist proportional zur LDH-Aktivität im Überstand, die wiederum mit der Anzahl toter Zellen korreliert. Es wurden Mediumüberstände von kultivierten Zellen auf den verschiedenen Substraten abgenommen und bei -80°C gelagert.



## Durchführung

- Auftauen der Zellkulturüberstände
- Erstellen einer Standardreihe für die LDH-Konzentration
- Auftragen von je 100 µl Zellkulturüberständen auf 96-well Platte
- Zugabe der Testreagenz (100 µl) zu den Überständen oder dem Standard
- Inkubation für 30 min bei Fibroblasten Zellkulturüberständen
- Inkubation für 45 min bei Keratinozyten Zellkulturüberständen
- Messung der Absorption bei 492 nm

### **3.4.4.4 Immunhistochemische Färbungen**

Immunhistochemische Färbungen geben Aufschluss über Proteine oder Antigene, die Zellen exprimieren. So lassen sich z.B. Differenzierungsstadien, Proliferation, Produktion von ECM-Proteinen sowie Zell-Zell und Zell-Substrat Kontakte der Zellen farblich nachweisen. Für Keratinozyten wurden Antikörper gegen die Differenzierungsmarker Cytokeratin 14 und p63 verwendet. Als Proliferationsmarker diente Ki67. Der Nachweis von Zell-Zell Kontakten erfolgte über E-Cadherin. Die Ausbildung von Fokalkontakten und des Cytoskeletts wurde für beide Zelltypen über Vinculin und Aktin detektiert. Bei Fibroblasten war zusätzlich die Produktion von Kollagen Typ I zu prüfen und die Ausbildung von Zell-Zellkontakten. In Tabelle 11 sind die eingesetzten Antikörper sowie deren Verdünnung und Inkubationszeit auf den Zellen aufgelistet.

**Tabelle 11:** Verwendete Antikörper sowie deren Verdünnung und Inkubationszeit

<b>Verwendete Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubationsdauer</b>
Anti-Kollagen Typ I	1:500	45 min
Anti-Cytokeratin 14 FITC konjugiert	1:100	45 min
Alexa Fluor® 555 Anti-E-Cadherin	1:100	45 min
Anti-Hase IgG Chromeo 546 konjugiert	1:1000	30 min
Anti-Ki-67-FITC konjugiert	1:50-1:100	45 min
Anti-Maus IgG Cy 3 konjugiert	1:1000	30 min
Anti-p63	1:250	45 min
Anti-PAN-Cadherin	1:500	60 min
Anti-Vinculin-FITC-Konjugat	1:100	45 min
Phalloidin Alexa Fluor® 546 konjugiert	1:100	25 min

## Durchführung

- a) Entparaffinieren und Demaskieren der Kontrollen
- Kontrolle waren Schnitte der Haut, des Knorpels und der Sehnen
  - Paraffinschnitte für 15 min bei 60°C erwärmen
  - Absteigende Alkoholreihe (Roticlear I 10 min, Roticlear II 3 min, 2 x EtOH 96% für 2 min, EtOH 70% 2 min, EtOH 50% 2 min)
  - Demaskierung je nach Antikörper Hitzedemaskierung in Retrieval Solution bei pH 9, 45 min im Dampfgerar oder enzymatisch (Pronase, 12 min, RT)
  - Paraffinschnitte mit Pap Pen einkreisen

#### b) Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

- fixierte Proben für 10 min in PBS<sup>+</sup> + 0,1% Triton X100 waschen
- Dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Inkubation 1. Antikörper, RT, ggf. dunkel, feuchte Kammer
- Dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Ggf. Inkubation 2. Antikörper, RT, ggf. dunkel, feuchte Kammer
- Dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Ggf. Inkubation 3. Antikörper, RT, ggf. dunkel, feuchte Kammer
- Dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Eindecken der Proben mit ProLong Gold with DAPI
- Trocknen über Nacht, RT, dunkel, fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

#### c) Immunhistochemische Färbungen

- fixierte Proben für 10 min in PBS<sup>+</sup> + 0,1% Triton X100 waschen
- Dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Blockieren endogener Peroxidasen (Peroxidase Blocking Solution, 5 min)
- Dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Inkubation mit Primärantikörper, 45 min, RT, feuchte Kammer
- Dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Inkubation mit Sekundärantikörper (EnVision Detection Systems Peroxidase/ DAB Rabbit/Mouse) für 30 min, RT, feuchte Kammer
- Dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Inkubation mit DakoCytomation Liquid DAB Substrate Chromogen System,
- Verdünnung 1:50 für 5 min, RT, Abzug
- Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, danach dreimal waschen in Tris-Waschpuffer, je 2 min
- Inkubation mit Hämalaun für 20 s
- Waschen mit VE-Wasser (bis Hämalaun nicht mehr sichtbar ist)
- Bläuen unter fließendem Leitungswasser, mind. 5 min, RT
- aufsteigende Alkoholreihe für Glasoberflächen (kurz 70%, 2 min 96%, 2 min 100%, zweimal 5 min Isopropanol), danach eindecken mit Isomount
- Eindecken der Zellkulturschalen in Aquatex
- Trocknen über Nacht im Abzug, lichtmikroskopische Untersuchung

### 3.5 Statistik

Die zuvor beschriebenen Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Bei Versuchen mit primären Zellen kamen pro Experiment ausschließlich Zellen des gleichen Spenders zum Einsatz. Die Anzahl der Proben mit gleicher Modifizierung war in jedem Experiment  $\geq 3$ . Die ermittelten Daten sind als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung dargestellt. Mit dem t-Test nach Student wurde die statistische Signifikanz für ungepaarte Proben ermittelt. Die statistische Signifikanz war auf  $p < 0.05$  gesetzt.

## 4. Ergebnisse

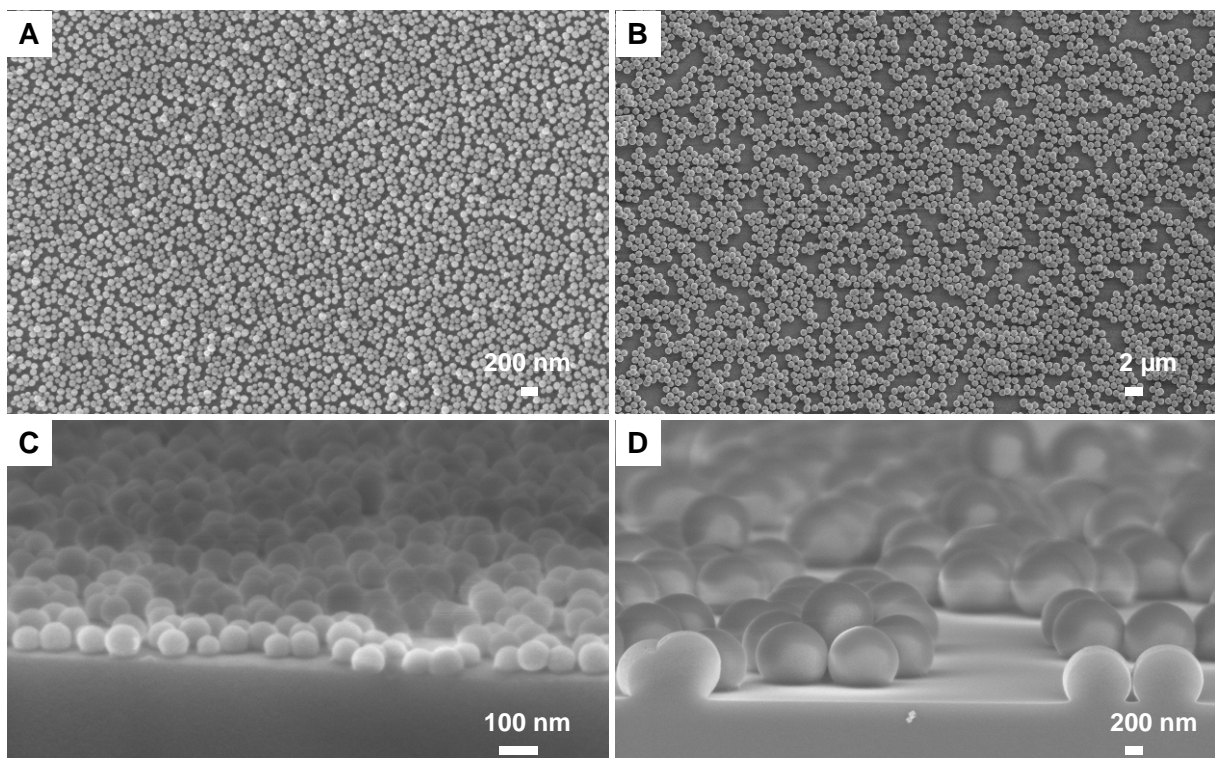
### 4.1 Materialwissenschaftliche Ergebnisse

#### 4.1.1 Herstellung der globulären Oberflächen

Die Nano- oder Mikro-Strukturierung von Glassubstraten erfolgte über die Abscheidung von Silica-Partikeln auf Polyelektrolyt-Schichten. Zur Evaluierung der erzeugten Oberflächen-Topografie wurden REM-Aufnahmen (4.1.1.1) und AFM Messungen (4.1.1.2) herangezogen.

##### 4.1.1.1 REM-Aufnahmen der globulären Oberflächen

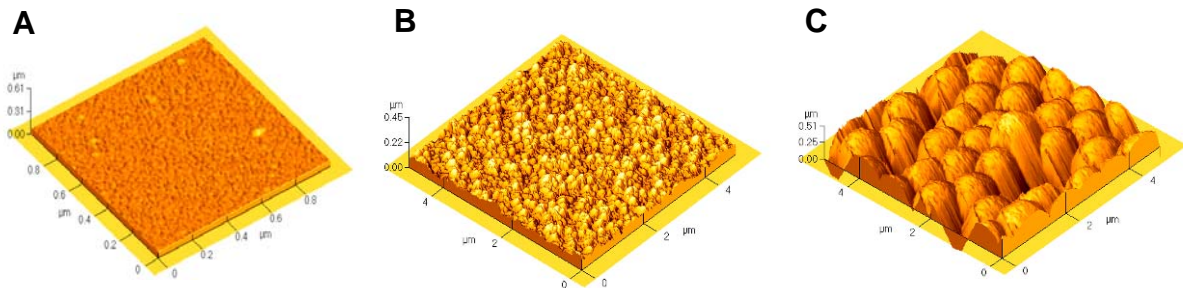
In Abbildung 17 sind die globulären Oberflächen im Nanometerbereich (A+C) und im Mikrometerbereich (B+D) zu sehen. Die Belegungsichte der Partikel lag nach dreifacher Abscheidung von Nanopartikeln bei  $126 \pm 6$  Nanopartikel pro  $\mu\text{m}^2$ . Bei Mikropartikeln wurden  $0,98 \pm 0,22$  Mikropartikel pro  $\mu\text{m}^2$  gezählt. In der Seitenansicht (C+D) sind leicht eingesunkene Partikel erkennbar. Dieser Effekt trat bei Silica-Nanopartikel nach einer 60-minütigen Behandlung bei einer Sintertemperatur von  $560^\circ\text{C}$  und für Silica-Mikropartikel nach 90-minütiger Sinterung bei  $620^\circ\text{C}$  auf. Es ließ sich durch die Sinterung eine feste Anbindung der Partikel an die Substrate erzielen.



**Abbildung 17:** REM-Aufnahmen der globulären nano- oder mikrostrukturierten Oberfläche nach dem Sintern. **A** Aufsicht auf eine nanostrukturierte Oberfläche. Vergrößerung 50.000fach **B** Aufsicht auf eine mikrostrukturierte Oberfläche. Vergrößerung 5.000fach **C** Seitenansicht einer nanostrukturierten Oberfläche. Vergrößerung: 250.000fach **D** Seitenansicht einer mikrostrukturierten Oberfläche. Vergrößerung: 50.000fach

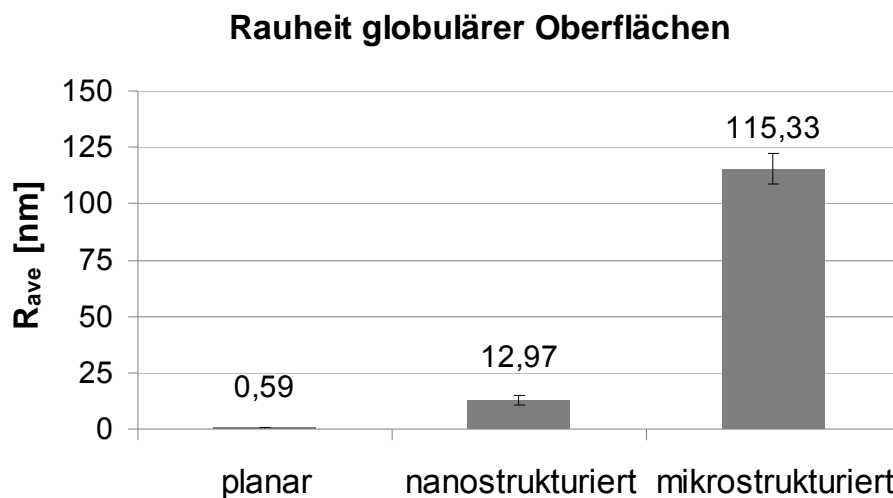
#### 4.1.1.2 Rauheit der globulären Oberflächen

Zur Bestimmung der Rauheit planarer und globulärer Oberflächen wurden Untersuchungen am Rasterkraftmikroskop (AFM) durchgeführt. Die ermittelten Daten für planare, nanostrukturierte und mikrostrukturierte Oberflächen lassen sich dreidimensional darstellen (Abbildung 18). Der mittels AFM bestimmte Durchmesser der Nanopartikel lag bei  $100 \pm 20$  nm und bei Mikropartikeln  $1 \pm 0,1$   $\mu\text{m}$ .



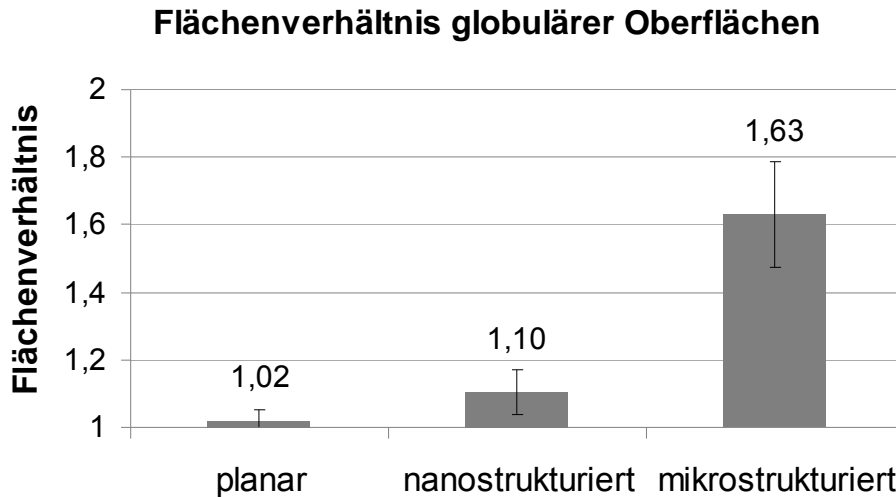
**Abbildung 18:** Dreidimensionale Darstellung der **A** planaren Glasoberfläche mit einer Grundfläche von 1  $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  und **B** der gesinterten, nanostrukturierten Glasoberflächen auf einer Grundfläche von 5  $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  sowie **C** der mikrostrukturierten Glasoberflächen auf einer Grundfläche von 5  $\mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ .

Die mittlere Rauheit  $R_{\text{ave}}$  der Substrate ist in Abbildung 19 dargestellt. Mit zunehmender Strukturierung steigen die Werte für die Rauheit an.



**Abbildung 19:** Mittlere Rauheit der globulären Oberflächen. Es ist eine deutliche Zunahme der Rauheit von planaren Substraten zu nano- und mikrostrukturierten Substraten zu verzeichnen.

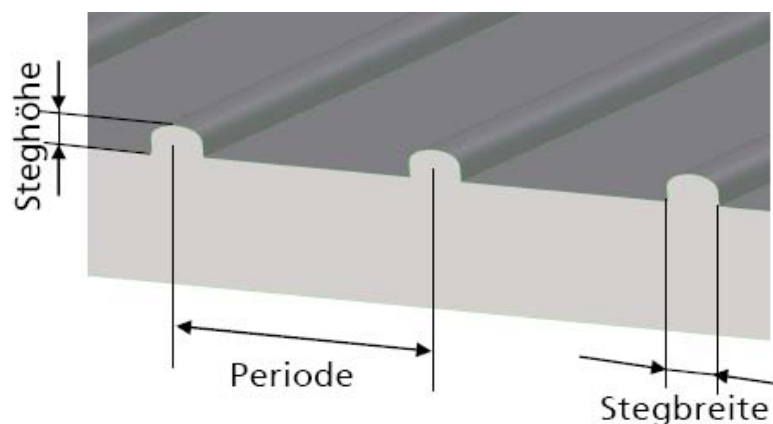
Dem Flächenverhältnis der strukturierten dreidimensionalen Oberflächen zur abgerasterten, zweidimensionalen Grundfläche liegen Werte von AFM Messungen zugrunde (Abbildung 20). Analog zur Rauheit ist eine Zunahme des Flächenverhältnisses von den planaren zu den nano- und mikrostrukturierten Oberflächen festzustellen.



**Abbildung 20:** Flächenverhältnis globulärer Oberflächen. Das Flächenverhältnis von mikrostrukturierten Substraten ist am höchsten und sinkt für nanostrukturierte und planare Substrate.

#### 4.1.2 Herstellung der fibrillären Oberflächen

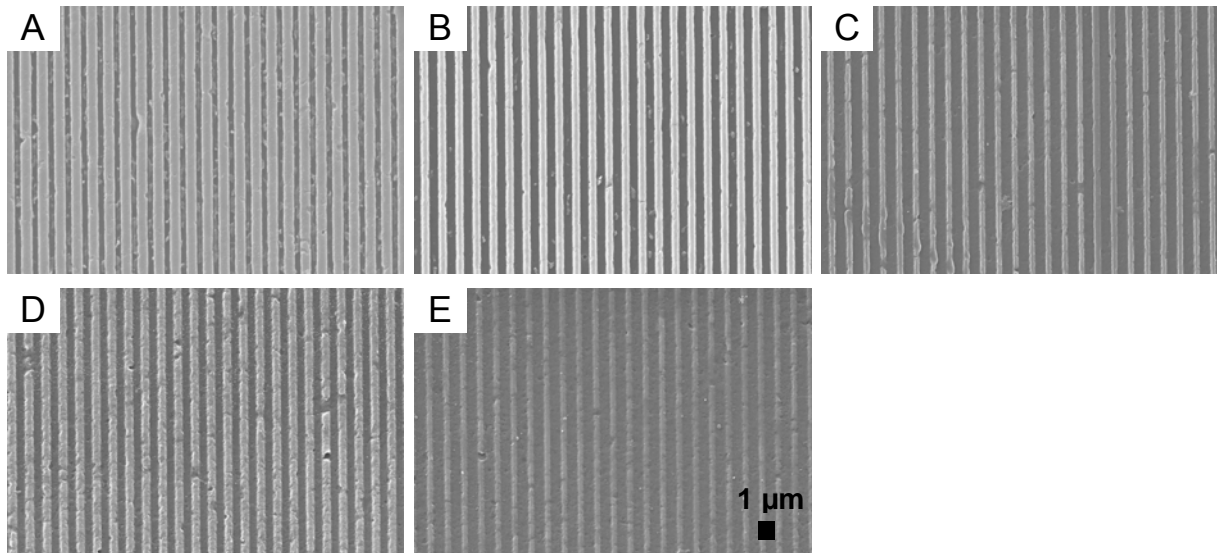
Durch Heißprägen mit einem Messingstempel entstanden fünf verschiedene fibrilläre Strukturierungen auf Polystyrolplättchen. Bei den relevanten topografischen Parametern dieser fibrillären Strukturen handelt es sich um die Periode, die Stegbreite sowie die Steghöhe (Abbildung 21). Durch Variation der Stegbreite und Steghöhe ließen sich unterschiedliche Strukturen herstellen, deren Evaluierung mittels REM-Aufnahmen (4.1.2.1) und AFM Messungen (4.1.2.2) erfolgte.



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der fibrillären Oberflächen mit den relevanten Parametern. Die Steghöhe beschreibt die Höhe der erzeugten Strukturen. Die Periode umfasst den Abstand zwischen zwei Stegmittelpunkten. Die Stegbreite ist als Ausdehnung des Steges definiert.

## REM-Aufnahmen der fibrillären Oberflächen

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der fünf unterschiedlichen, fibrillären Strukturen sind in Abbildung 22 zusammengestellt. Die Modulation der Stegbreite (hellgrau) ist deutlich erkennbar.



**Abbildung 22:** REM-Aufnahmen fibrillärer Strukturen mit unterschiedlichen Stegbreiten. **A** Struktur 1, **B** Struktur 2, **C** Struktur 3, **D** Struktur 4 und **E** Struktur 5. Vergrößerung: 15.000fach

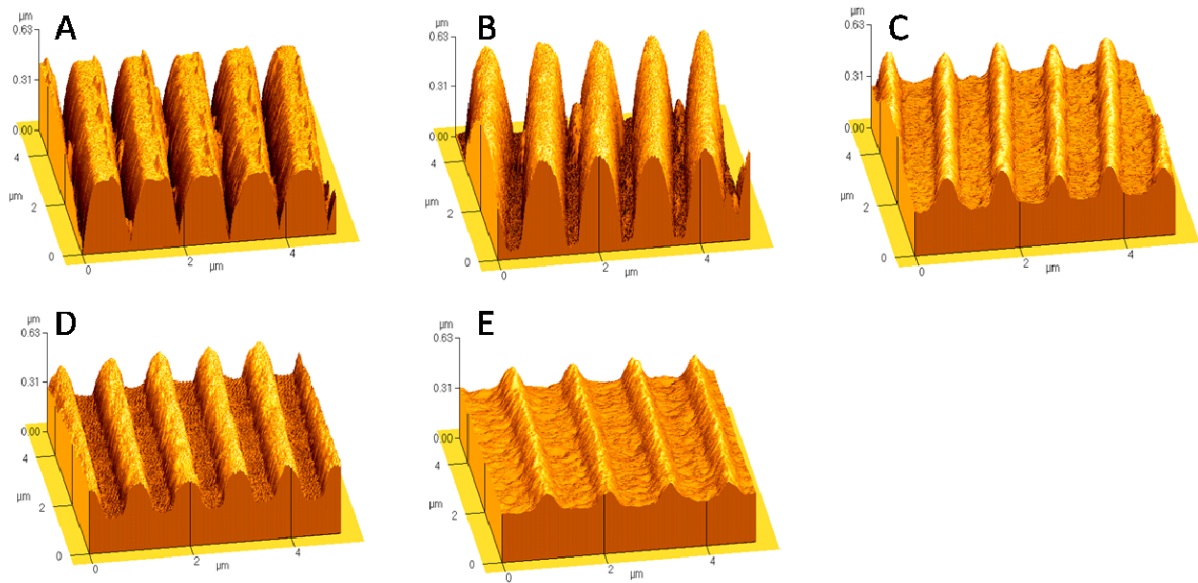
### 4.1.2.1 Rauheit der fibrillären Oberflächen

Die in Tabelle 12 aufgeführten Werte für die Periode, Stegbreite und Steghöhe basieren auf AFM Messungen. Während die Periode für alle untersuchten Strukturen bei ca. 1000 nm liegt, schwankt die Stegbreite von 200 nm bis zu 510 nm und die Höhe bewegt sich zwischen ca. 100 nm und knapp über 500 nm.

**Tabelle 12:** Gemessene Periode, Stegbreite und Steghöhe für die fünf unterschiedlichen Strukturen.

Struktur	Periode [nm]	Stegbreite [nm]	Steghöhe [nm]
1	994,00 ± 10,39	510,67 ± 59,50	317,00 ± 81,50
2	1016,00 ± 42,76	394,33 ± 51,40	519,33 ± 30,92
3	1020,00 ± 17,32	203,33 ± 40,28	180,33 ± 28,54
4	996,67 ± 15,28	327,00 ± 59,57	197,00 ± 20,95
5	1059,67 ± 122,42	197,00 ± 32,91	98,83 ± 26,53

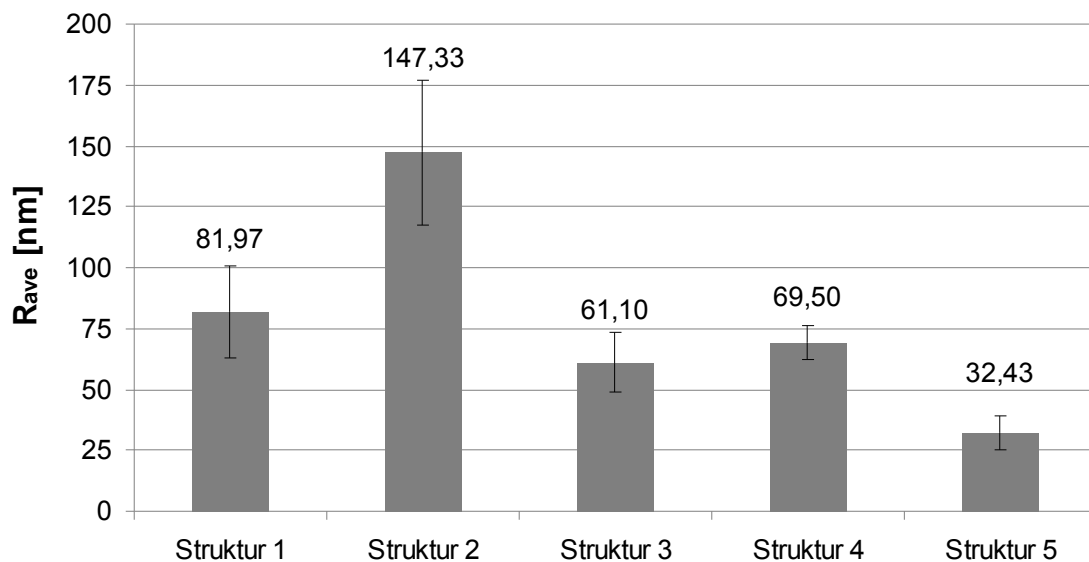
In Abbildung 23 ist eine dreidimensionale Darstellung der AFM Daten, der einzelnen Topografien der fünf Strukturen zu sehen. Dabei sind die verschiedenen Steghöhen und Stegbreiten erkennbar.



**Abbildung 23:** Dreidimensionale Darstellung von AFM Messungen der verschiedenen fibrillären Oberflächen. **A** Struktur 1, **B** Struktur 2, **C** Struktur 3, **D** Struktur 4 und **E** Struktur 5.

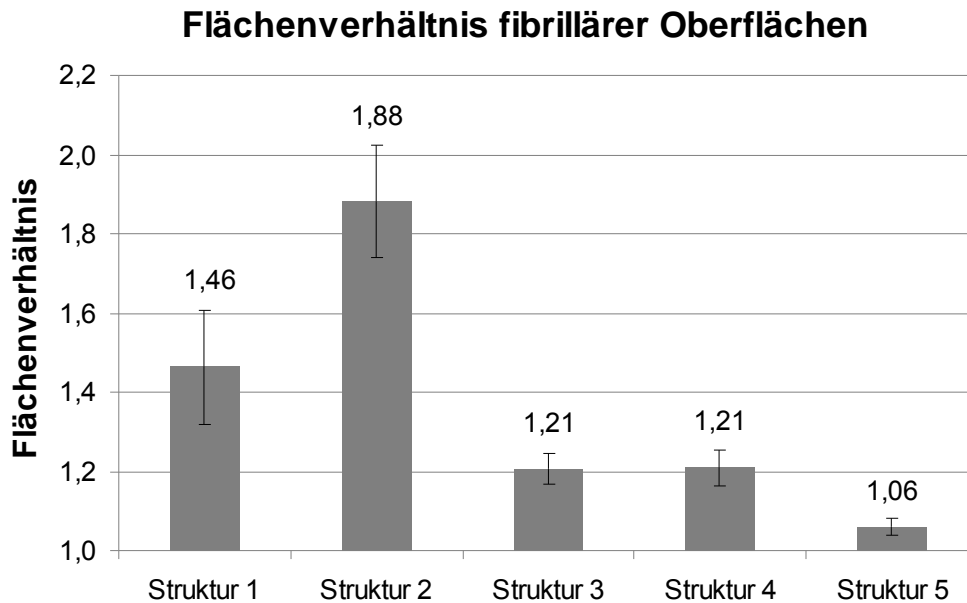
In Abbildung 24 ist die mittlere Rauheit  $R_{ave}$  der fibrillären Substrate aufgetragen. Struktur 2 hat den höchsten  $R_{ave}$ -Wert mit 147,33 nm, gefolgt von Struktur 1. Die Rauheiten von Struktur 3 und 4 sind mit über 60 nm sehr ähnlich, wohingegen Struktur 5 mit 32,43 nm die geringste Rauheit besitzt.

### Rauheit fibrillärer Oberflächen



**Abbildung 24:** Mittlere Rauheit fibrillärer Polystyrolsubstrate. Struktur 2 weist die höchste Rauheit auf, während Struktur 5 die niedrigste Rauheit hat.

Das Flächenverhältnis der fibrillären dreidimensionalen Oberflächen zur abgerasterten zweidimensionalen Grundfläche ist in Abbildung 25 gezeigt. Für Struktur 2 wurde das größte Flächenverhältnis mit 1,88 gemessen. Der kleinste Wert lag bei 1,06 für Struktur 5.



**Abbildung 25:** Flächenverhältnis fibrillärer Strukturen. Das geringste Flächenverhältnis liegt bei Struktur 5, das größte Flächenverhältnis bei Struktur 2 vor.

### 4.1.3 Funktionalisierung der globulären Oberflächen

Die globulären Glassubstrate wurden durch Silanisierungsprozesse mit Carboxy- oder Aminogruppen modifiziert. Durch ESCA war die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung der obersten 10 nm möglich (4.1.3.1). Mit der Null-Ellipsometrie ließ sich die Zunahme der Schichtdicke verfolgen (4.1.3.2), mit der Kontaktwinkelmessung die Benetzbarkeit der Oberflächen (4.1.3.3).

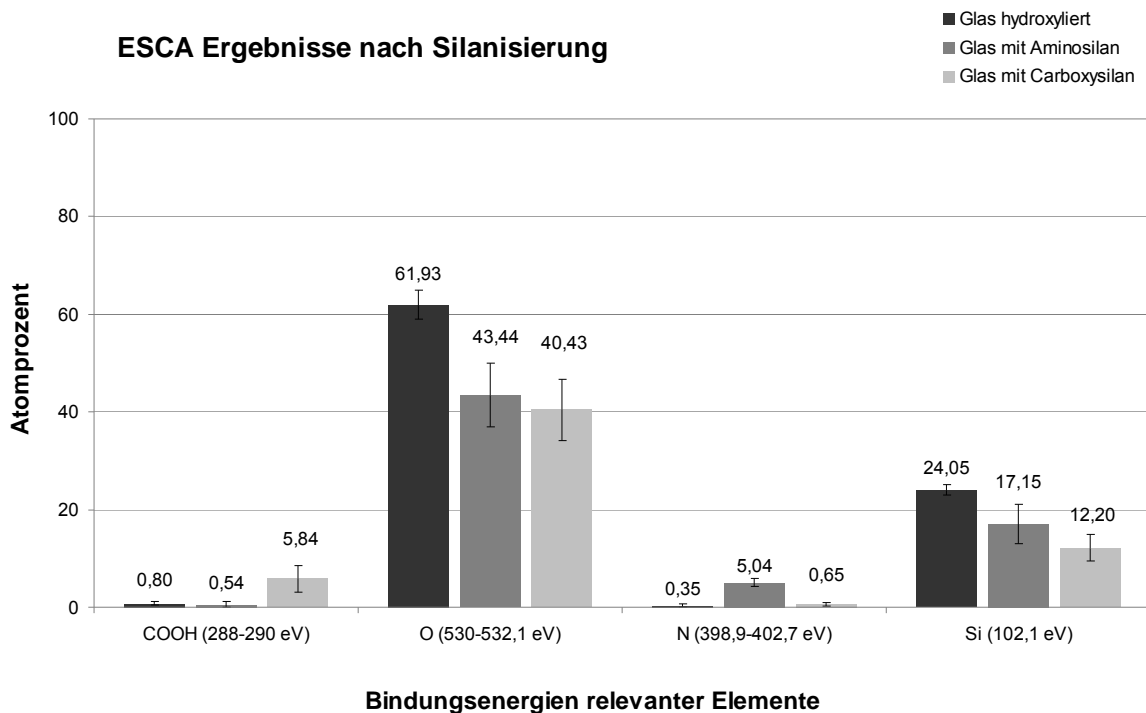
#### 4.1.3.1 Evaluierung der Funktionalisierung mit ESCA

Nach der Reinigung und Aktivierung von Glassubstraten wurden Amino- oder Carboxygruppen auf die Oberflächen gebracht. Dazu fand eine Behandlung der Glassubstrate mit 3-Aminopropyltriethoxysilan oder Carboxyethylsilantriol statt.

Die ESCA Ergebnisse der Silanisierung sind in Abbildung 26 zu sehen. Siliziumoxid ist die Hauptkomponente von Glas. Silizium liegt mit 24 Atomprozent vor. Sauerstoffverbindungen machen über 61% den größten Anteil der Oberflächen von gereinigtem hydroxyliertem Glas aus, wobei auch Spuren von Stickstoffverbindungen und carboxy-spezifischen Kohlenstoffverbindungen zu finden sind. Nach der Funktionalisierung mit Carboxyethylsilantriol sinkt der Sauerstoffanteil auf 42,03 Atomprozent ab. Bei carboxy-spezifischen Bindungsenergien von 288-290 eV ist hingegen eine Zunahme auf knapp 6 Atomprozent zu verzeichnen. Stickstoffverbindungen liegen in Spuren vor.



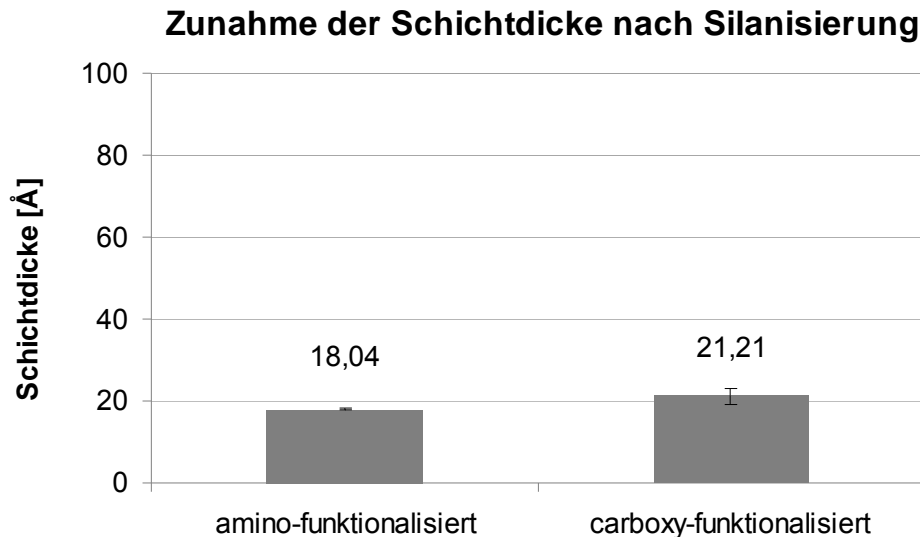
Die Behandlung der Glassubstrate mit 3-Aminopropyltriethoxysilan ergab einen Anstieg der Stickstoff-Spezies auf 5,2 Atomprozent, indessen ging die Zahl der Sauerstoffverbindungen um 18,5% bzw. 21,5% zurück. Es lässt sich zusammenfassen, dass die Glassubstrate erfolgreich sowohl mit Amino- als auch Carboxygruppen modifiziert wurden.



**Abbildung 26:** ESCA Ergebnisse nach der Silanisierung. Gereinigte, hydroxylierte Glassubstrate weisen fast 60 Atomprozent Sauerstoffverbindungen sowie 24 Atomprozent Silizium und Spuren von carboxy-spezifischen Kohlenstoffverbindungen oder Amino-Spezies auf. Nach der Carboxyfunktionalisierung steigt das Signal bei 288-290 eV auf 3,1 Atomprozent an. Bei der Aminofunktionalisierung ist eine Zunahme der Stickstoffverbindungen auf 5 Atomprozent zu messen. Gleichzeitig sinkt nach beiden Modifizierungen der Anteil der Sauerstoffverbindungen um 18,5 bzw. 21,5%.

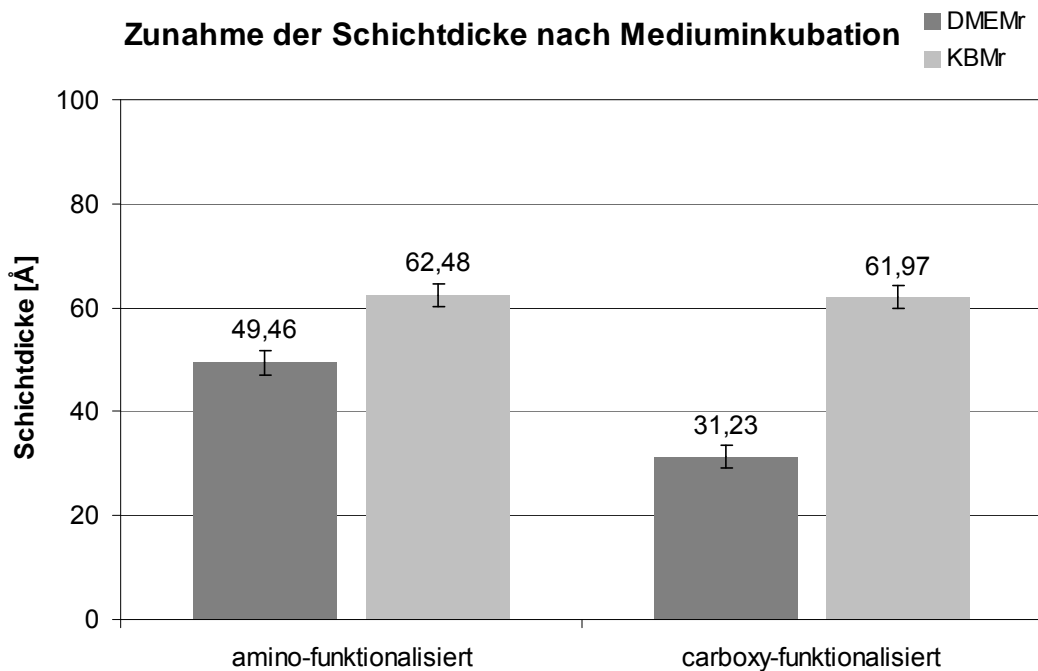
#### 4.1.3.2 Schichtdickenbestimmung mit der Null-Ellipsometrie

Als Substrat dienten Siliziumwafer, deren Oxidschicht bei  $32,65 \pm 5,2 \text{ \AA}$  lag. Nach der Funktionalisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan oder Carboxyethylsilantriol konnte eine Zunahme der Schichtdicke gemessen werden (Abbildung 27). Sie betrug bei amino-funktionalisierten Substraten  $18 \text{ \AA}$ . Carboxy-Silan Schichten hatten eine Schichtdicke von knapp über  $20 \text{ \AA}$ .



**Abbildung 27:** Zunahme der Schichtdicke nach Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan oder Carboxy-ethylsilantriol. Für amino-modifizierte Substrate steigt die Schichtdicke um 18,04 Å, für carboxy-funktionalisierte Oberflächen um 21,21 Å an.

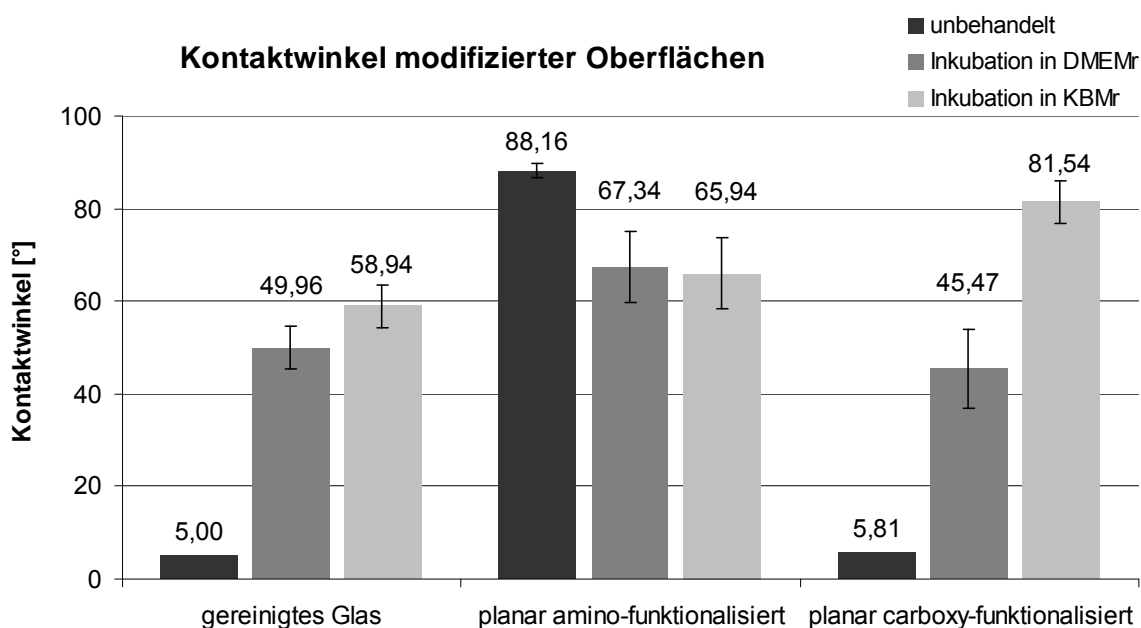
Weiterhin wurde die Zunahme der Schichtdicke nach Inkubation in Zellkulturmedien untersucht. Nachdem die funktionalisierten Siliziumwafer in Keratinozyten Medium KBMr oder Fibroblastenmedium lagen, ist ein Anstieg der Schichtdicke zu messen (Abbildung 28). Dabei liegt die Zunahme der Schichtdicke nach Inkubation in KBMr bei über 60 Å sowohl auf amino-modifizierten als auch auf carboxy-funktionalisierten Substraten. Geringere Schichtdicken mit knapp 50 Å auf carboxy-modifizierten und über 31 Å auf amino-funktionalisierten Siliziumwafern sind nach der Inkubation in DMEMr festzustellen.



**Abbildung 28:** Gemessene Zunahme der Schichtdicke nach Inkubation mit Medium. Es ist eine Zunahme der Schichtdicke für amino-modifizierte Substrate nach Inkubation in DMEMr von 49,46 Å und nach KBMr von 62,48 Å nachzuweisen. Bei carboxy-modifizierten Substraten liegt die Zunahme der Schichtdicke nach Inkubation in DMEM bei 31,23 Å und nach KBMr bei knapp 62 Å.

### 4.1.3.3 Kontaktwinkelmessung zur Ermittlung der Benetzbarkeit

Bei der Messung der Kontaktwinkel zeigten sich deutliche Unterschiede bei den funktionalisierten Oberflächen (Abbildung 29). Gereinigtes Glas und planar carboxy-modifizierte Substrate waren extrem hydrophil mit einem Kontaktwinkel von 5° oder der Tropfen benetzte sofort die ganze Oberfläche. Der Kontaktwinkel von planar amino-funktionalisierten Substraten hingegen lag bei 88,16°. In Kontakt mit Zellkulturmedium, entweder DMEMr oder KBMr, änderten sich die Kontaktwinkel. Dabei nahmen die gemessenen Winkel für gereinigtes Glas und planar carboxy-modifizierte Substrate deutlich zu und lagen zwischen 45,47°- 58,94° und sogar über 81° bei planar carboxy-funktionalisierten Substraten nach KBMr Inkubation. Anders waren die Ergebnisse der planar amino-modifizierten Oberflächen nach Inkubation in Zellkulturmedium. Hier sank der Kontaktwinkel um 20°- 22° auf 65,94° bzw. 67,34 ab.



**Abbildung 29:** Kontaktwinkel modifizierter Oberflächen. Die gemessenen Kontaktwinkel der Substrate direkt nach der Funktionalisierung lagen bei 5°, bzw. komplett benetzend für gereinigtes Glas und planar carboxy-modifizierte Oberflächen. Nach Inkubation in Zellkulturmedium stiegen die gemessenen Winkel auf über 45° an. Für planar amino-funktionalisierte Substrate betrug der Kontaktwinkel 88° und nahm nach Mediuminkubation um knapp über 20° ab.

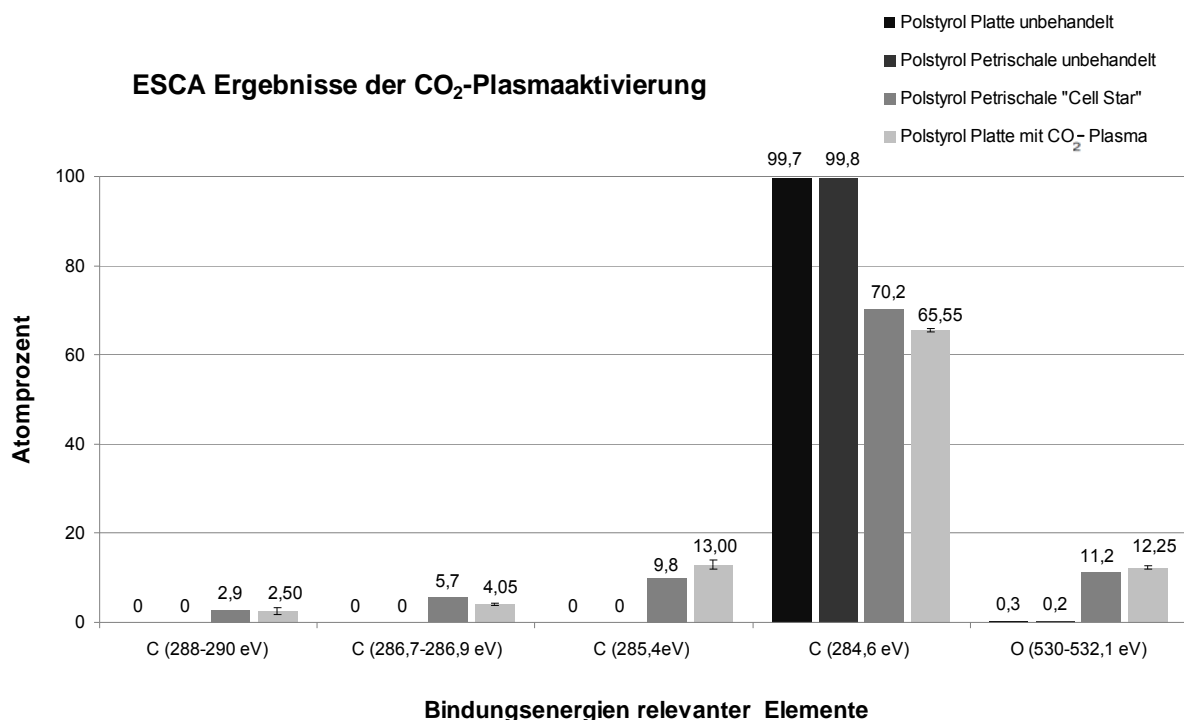
### 4.1.4 Funktionalisierung der fibrillären Oberflächen

Durch spezielle Plasmabehandlungen lassen sich Carboxy- oder Aminogruppen auf die fibrillären Polystyrol-Substrate aufbringen. Zusätzlich war die Entwicklung einer Oberflächenbehandlung, die der auf kommerziellen Zellkultursubstraten entspricht, notwendig, um strukturierte Referenzoberflächen zu erzeugen. Dies gelang über eine CO<sub>2</sub>-Plasmabehandlung. ESCA wurde eingesetzt, um die elementare Zusammensetzung der obersten 10 nm zu untersuchen (4.1.4.3). Als weitere Evaluierungsmethoden kamen die Null-Ellipsometrie zur Überprüfung der Zunahme der Schichtdicke (4.1.4.1) und die Kontaktwinkelmessung (4.1.4.2) zum Einsatz.

#### 4.1.4.1 Evaluierung der Funktionalisierung mit ESCA

Zunächst war die Etablierung einer Plasmaaktivierung, angelehnt an kommerziell erhältliche, plasmaaktivierte Zellkultur Oberflächen, erforderlich, um nano- und mikrostrukturierte Polystyrol-Platten als Positiv-Kontrolle zu erzeugen. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse für Behandlungen von Polystyrol mit CO<sub>2</sub>-Plasma zusammengefasst. Dabei war zunächst zu überprüfen, dass die Polystyrol-Platten, die als Ausgangsmaterial dienen, in der Elementarzusammensetzung mit unbehandelten Petrischalen übereinstimmen.

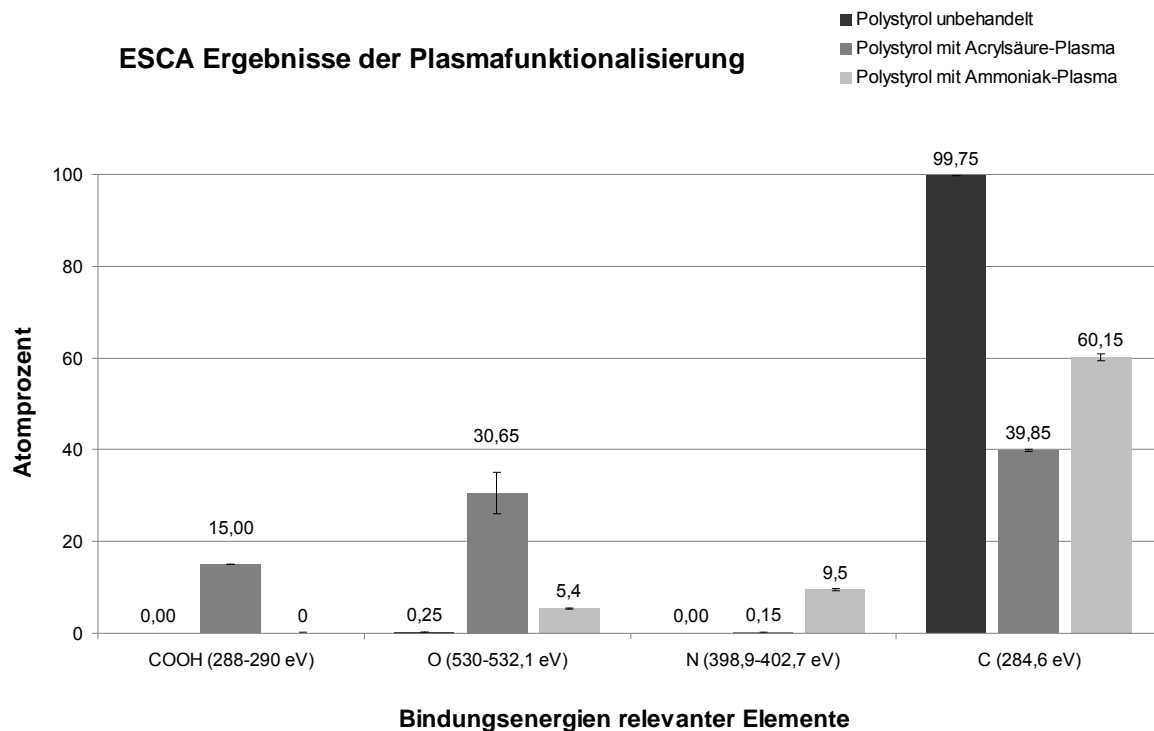
Es ist ersichtlich, dass beide Proben aus demselben Werkstoff bestehen, da beinahe 100 Atomprozent bei einer Bindungsenergie von 284,6 eV liegen. In der Zellkultur finden plasmabehandelte Polystyrolsubstrate Anwendungen. Dadurch sinkt der Anteil der ursprünglichen C=C Bindungen an der Oberfläche auf 70,2 Atomprozent, zudem sind Bindungsenergien für Kohlenstoff-Spezies, die mit Sauerstoff interagieren, detektierbar. Damit einhergehend steigt auch der Sauerstoffanteil deutlich an. Eine ähnliche Zusammensetzung der Oberfläche wie bei kommerziellen Zellkulturgefäßen lässt sich durch eine CO<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung von Polystyrol erzeugen. Der Sauerstoffanteil steigt deutlich an, während bei der Bindungsenergie 284,6 eV lediglich 65,55 Atomprozent vorliegen. Zudem sind für eine Verbindung mit Sauerstoff typische Kohlenstoff-Spezies detektierbar.



**Abbildung 30:** ESCA Ergebnisse der CO<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung. Die unbehandelte Polystyrol-Platte entspricht in ihrer chemischen Zusammensetzung einer unbehandelten Petrischale. Zellkultur ("Cell Star") Petrischalen weisen im Gegensatz dazu eine veränderte Kohlenstoff-Verteilung und besonders einen Anstieg der Sauerstoff-Spezies auf. Eine vergleichbare Kombination der Oberflächenzusammensetzung lässt sich durch eine CO<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung erreichen.

Die nano- und mikrostrukturierten Polystyrol-Platten wurden mit Ammoniak oder Acrylsäure-Pasma behandelt. So lässt sich die Oberfläche mit Amino- oder Carboxygruppen funktionalisieren. Analysen der Modifizierung sind in Abbildung 31 gezeigt. Im unbehandelten Zustand ist beinahe 100% Kohlenstoff bei einer Bindungsenergie von 284,6 eV zu detektieren sowie Spuren von Sauerstoff. Nach der Behandlung mit Ammoniak Plasma sinkt diese Kohlenstoffverbindung um 40%, während der Stickstoffanteil auf 9,5 Atomprozent ansteigt. Zudem ist eine Zunahme der Sauerstoffverbindungen auf 5,4 Atomprozent festzustellen.

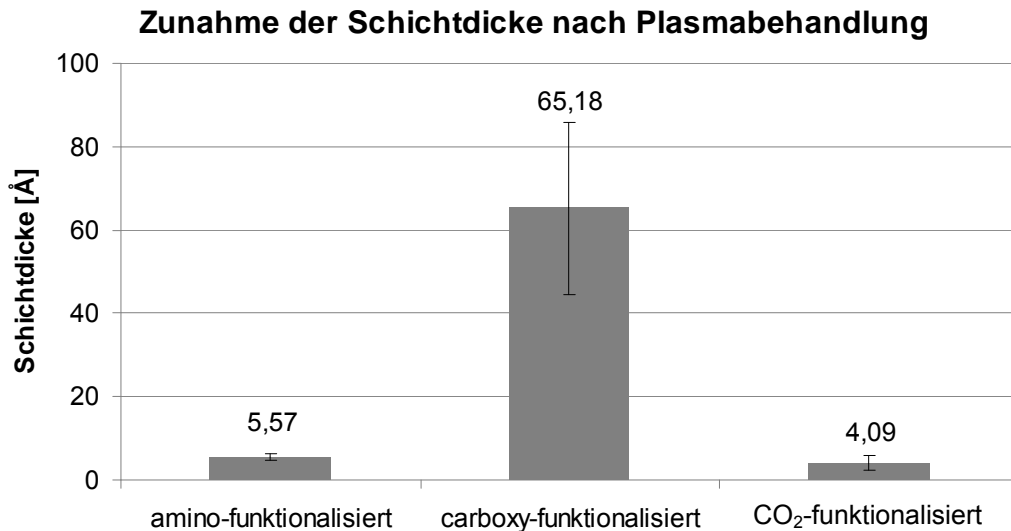
Noch deutlicher verschiebt sich die Verteilung nach der Behandlung mit Acrylsäure Plasma. Hier nimmt der Anteil von Kohlenstoff der Bindungsenergie 284,6 eV um 60% ab. Die gemessenen Werte für Sauerstoff betragen 30,65 Atomprozent und für carboxy-spezifische Bindungsenergien zwischen 288-290 eV sind exakt 15 Atomprozent zu detektieren. Das Verhältnis zwischen Sauerstoff und carboxy-spezifischem Kohlenstoff liegt bei 2:1, was genau dem Aufbau von Carboxygruppen entspricht.



**Abbildung 31:** Ergebnisse der Behandlung mit Ammoniak- oder Acrylsäure-Plasma. Der Hauptbestandteil von unbehandeltem Polystyrol ist Kohlenstoff bei einer Bindungsenergie von 284,6 eV. Sobald diese Substrate mit Plasma funktionalisiert werden, ändert sich ihre Zusammensetzung, wobei nach der Ammoniak-Behandlung ein deutlicher Anstieg der Stickstoffverbindungen und eine Zunahme von Sauerstoff messbar sind. Die Acrylsäure-Behandlung führt für carboxy-spezifische Kohlenstoffverbindungen zu Werten um 15% und die Sauerstoffverbindungen um etwas über 30%. Diese 1:2 Verteilung ist durch die Struktur der Carboxygruppe zu erklären.

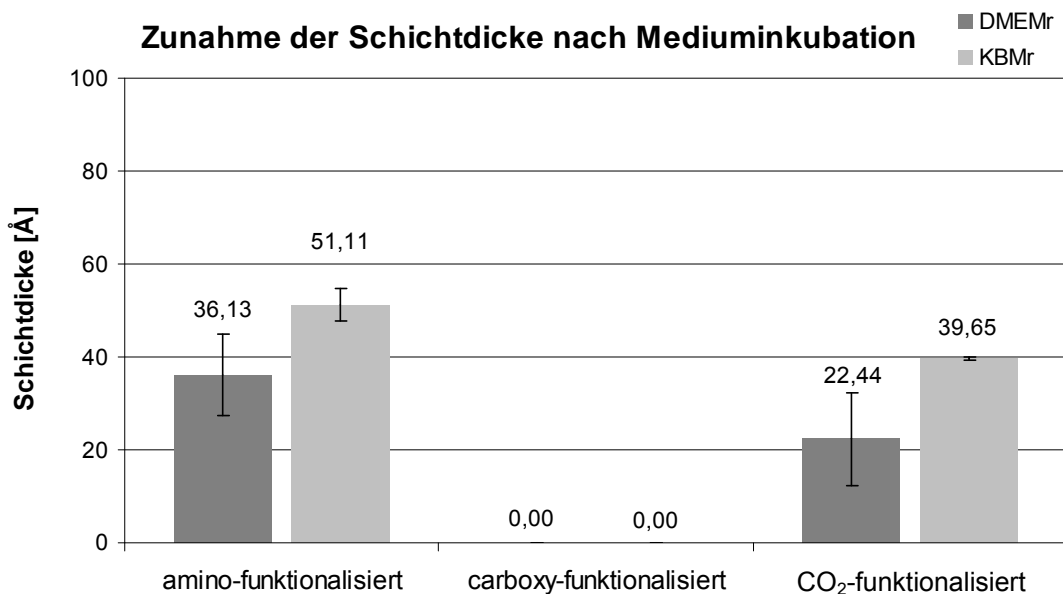
#### 4.1.4.2 Schichtdickenbestimmung mit der Null-Ellipsometrie

Die Schichtdicke für die Ausgangs-Siliziumoxidschicht betrug  $31,13 \pm 0,17 \text{ \AA}$ . Nach den unterschiedlichen Plasmabehandlungen war auf allen modifizierten Substraten eine Zunahme der Schichtdicke messbar (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Zunahme der Schichtdicke nach der Plasmabehandlung. Auf carboxy-modifizierten Substraten stieg die Schichtdicke auf  $65,18 \text{ \AA}$ , geringer war die Zunahme der Schichtdicke für amino- oder CO<sub>2</sub>-funktionalisierte Oberflächen mit  $5,57 \text{ \AA}$  und  $4,09 \text{ \AA}$ .

Weiterhin ließ sich die Proteinadsorption an den Grenzflächen der plasmabehandelten Substrate ermitteln (Abbildung 33). Während sich für amino- oder CO<sub>2</sub>-modifizierten Oberflächen ein Anstieg der Schichtdicke über  $20 \text{ \AA}$  zeigte, war für carboxy-funktionalisierte Substrate keine Zunahme feststellbar.

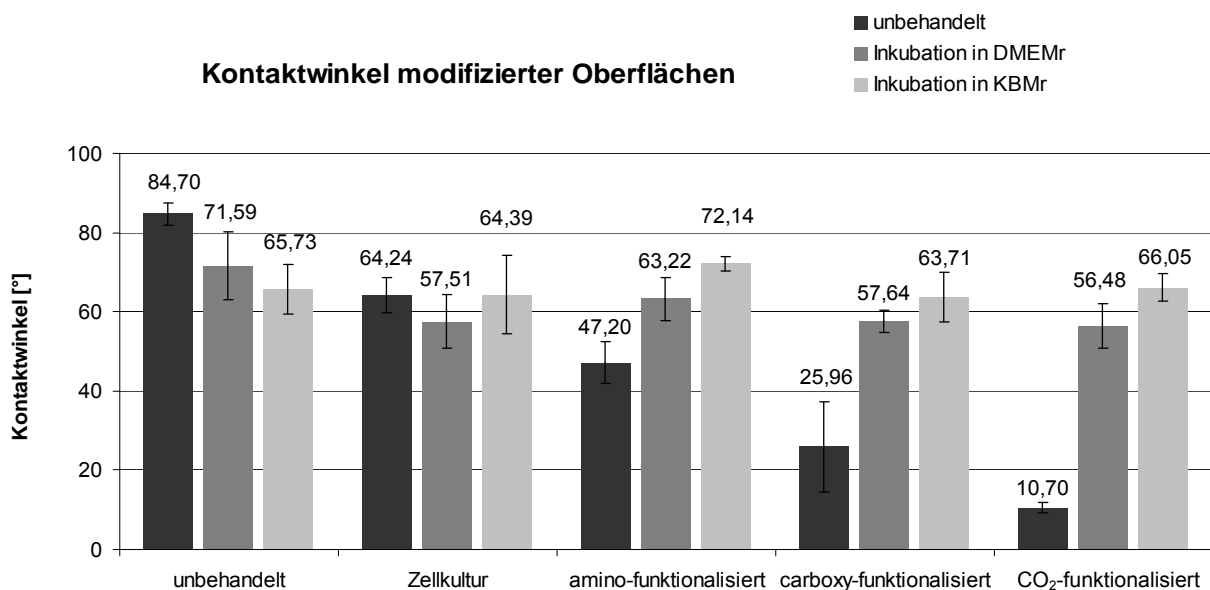


**Abbildung 33:** Gemessene Schichtdicke nach Mediuminkubation. Für amino- oder CO<sub>2</sub>-modifizierten Oberflächen stieg die Schichtdicke um  $36,13 \text{ \AA}$ , bzw.  $22,44 \text{ \AA}$  nach der Inkubation in DMEMr und um über  $51 \text{ \AA}$ , bzw. knapp unter  $40 \text{ \AA}$  für KBMr an. Bei carboxy-funktionalisierten Substraten ließ sich keine Zunahme der Schichtdicke nachweisen.

#### 4.1.4.3 Kontaktwinkelmessung zur Ermittlung der Benetzbarkeit

Deutliche Unterschiede zwischen den funktionalisierten Oberflächen zeigten sich bei der Messung des Kontaktwinkels (Abbildung 34). Während amino-modifiziertes Polystyrol einen Kontaktwinkel über  $47^\circ$  aufwies, lagen die Kontaktwinkel für die teilweise vollständig benetzten carboxy- und  $\text{CO}_2$ -funktionalisierten Proben bei über  $25^\circ$  und  $10^\circ$ . Deutlich hydrophober mit einem Kontaktwinkel von über  $84^\circ$  und über  $64^\circ$  waren die Referenzoberflächen "unbehandeltes Polystyrol" und "Zellkultur Petrischale".

Nach Kontakt mit dem Zellkulturmedium DMEMr änderten sich die Kontaktwinkel, wobei auf den funktionalisierten Proben eine deutliche Zunahme festzustellen war, mit  $63,24^\circ$  für amino-modifiziertes Polystyrol und  $57,64^\circ$  für carboxy- und  $\text{CO}_2$ -funktionalisierte Oberflächen. Bei unbehandeltem Polystyrol und der Zellkultur Petrischale nahmen die Kontaktwinkel ab und betrugen  $71,59^\circ$  und  $57,51^\circ$ . Ähnliche Tendenzen sind nach der Inkubation in KBMr festzustellen. Die Kontaktwinkel der funktionalisierten Substrate stiegen an auf  $72,14^\circ$  für amino- sowie  $63,71^\circ$  und  $66,05^\circ$  für carboxy- und  $\text{CO}_2$ -funktionalisierte Substrate. Auf der Zellkultur Petrischale blieben die Werte bei  $64,39^\circ$  nahezu konstant, während der Kontaktwinkel auf unbehandeltem Polystyrol um knapp  $19^\circ$  auf  $65,73^\circ$  abnahm.



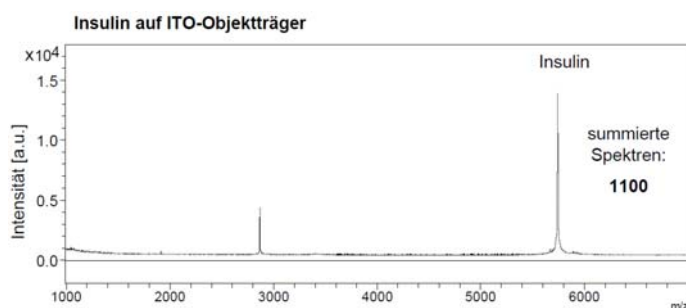
**Abbildung 34:** Kontaktwinkel auf unterschiedlichen Polystyrol-Oberflächen. Die gemessenen Kontaktwinkel der Substrate direkt nach der Funktionalisierung lagen alle unter  $50^\circ$ . Demgegenüber hatte die unbehandelte Petrischale einen Kontaktwinkel von knapp  $85^\circ$ , die Zellkulturpetrischale  $64^\circ$ . Nach der Inkubation in DMEMr stiegen die Kontaktwinkel der funktionalisierten Oberflächen auf  $63,22^\circ$  für amino-modifiziertes Polystyrol und  $57,64^\circ$  für carboxy- und  $\text{CO}_2$ -funktionalisierte Proben. In diesem Bereich sind auch die Werte für Zellkultur Petrischalen, lediglich die unbehandelte Petrischale hatte einen Kontaktwinkel über  $71^\circ$ . Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die Inkubation in KBMr. Die Werte für amino-funktionalisierte Substrate betrugen  $72,14^\circ$ , die für carboxy- und  $\text{CO}_2$ -modifizierte Oberflächen über  $63^\circ$  bzw.  $66^\circ$ . Mit  $64,39^\circ$  auf der Zellkultur Petrischale und über  $65^\circ$  auf unbehandeltem Polystyrol lagen die Kontaktwinkel der Referenzen in einem vergleichbaren Bereich.

#### 4.1.4.4 Untersuchung der Proteinadsorption mit MALDI-TOF MS

In einem vereinfachten Modell wurde die Adsorption von Insulin und Albumin auf unstrukturiertem, unterschiedlich funktionalisiertem Polystyrol untersucht. Insulin befindet sich im Keratinozytenmedium KBMr und macht dort den Hauptanteil der Polypeptide und Proteine aus. Im fötalen Kälberserum, welches als Proteinquelle im Fibroblastenmedium DMEMr dient, ist Albumin das häufigste Protein. Es erfolgten Messungen aufgetragener Insulin-, oder Albuminlösungen ohne Waschschrift und die Detektion von adsorbiertem Insulin oder Albumin nach einem Waschschrift. So ließen sich Rückschlüsse über den Einfluss der verschiedenen Funktionalisierung auf die Adsorption von Insulin oder Albumin gewinnen.

##### a) Insulin

Das Polypeptid Insulin besitzt eine Masse von 5.743 Da, was sich auf kommerziellen, leitenden ITO Glasobjektträgern nachweisen lässt (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Nachweis von Insulin auf ITO-Glasobjektträger. Deutliches Signal bei einer Masse von 5.743 Da. Bei dem zweiten Peak handelt es sich um zweifach geladenes Insulin.

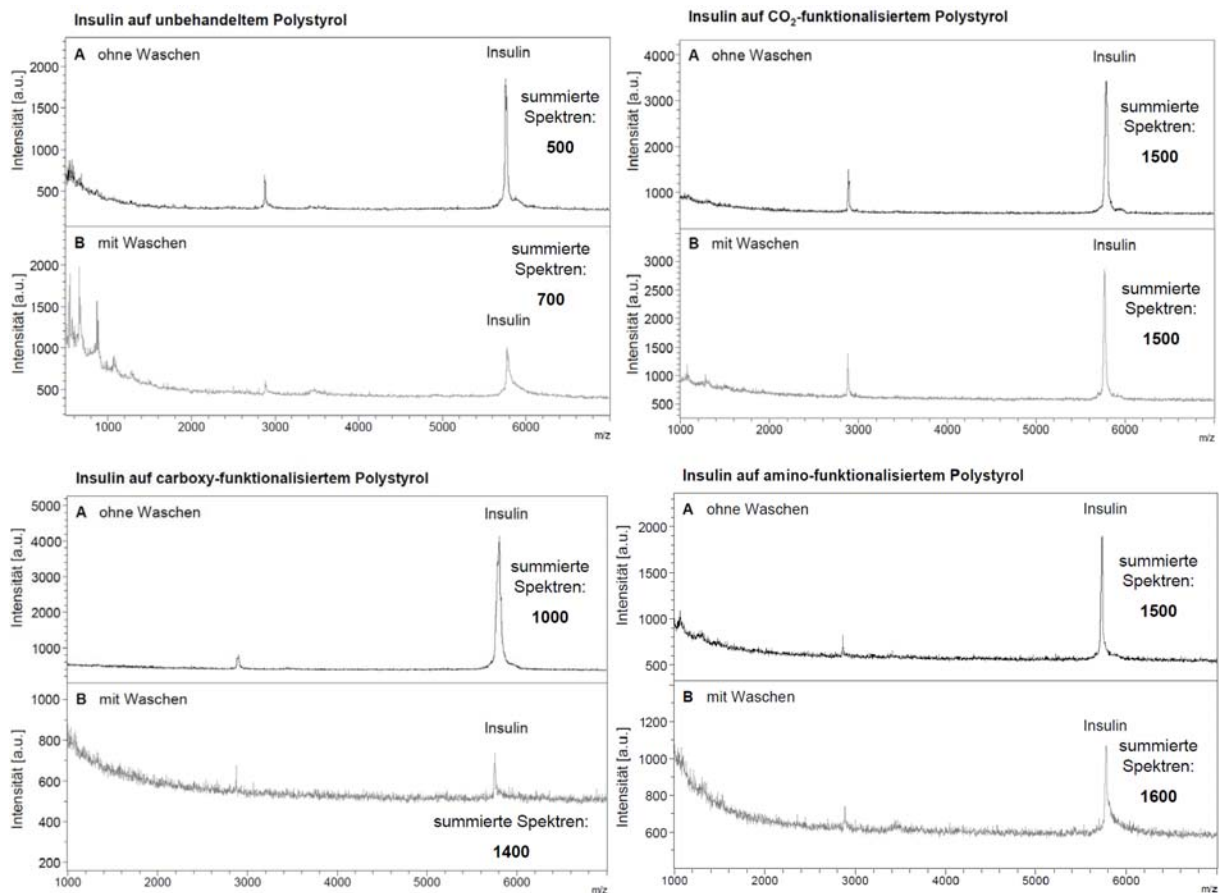
Zur Bestimmung der Adsorption wurde die Intensität des gemessenen Insulins nach einem Waschschrift ermittelt. Dabei ergaben sich Unterschiede in der Insulin-Adsorption auf verschiedenen Polystyrol-Oberflächen, die in Tabelle 13 zusammengefasst sind. Ausgehend von der unbehandelten Polystyrol-Oberfläche zeigte sich eine höhere Intensität von Insulin auf CO<sub>2</sub>- oder amino-funktionalisierten Substraten, während die Insulin-Intensität auf carboxy-modifiziertem Polystyrol abnahm.

**Tabelle 13:** Übersicht MALDI-TOF MS Ergebnisse zur Adsorption von Insulin auf verschiedenen Polystyrol-Oberflächen nach Waschen. Die gemessene Intensität für Insulin auf unbehandeltem Polystyrol wurde auf "0" gesetzt. Für die Adsorption auf modifizierten Substraten ist die jeweilige Relation zu unbehandeltem Polystyrol dargestellt. 0: Ausgangswert Polystyrol, +: höhere Insulin-Intensität als auf unbehandeltem Polystyrol, -: niedrigere Insulin-Intensität als auf unbehandeltem Polystyrol

Polystyrol-Oberfläche	Insulinadsorption nach Waschen
unbehandelt	0
CO <sub>2</sub> -funktionalisiert	+
carboxy-funktionalisiert	-
amino-funktionalisiert	0 bis +



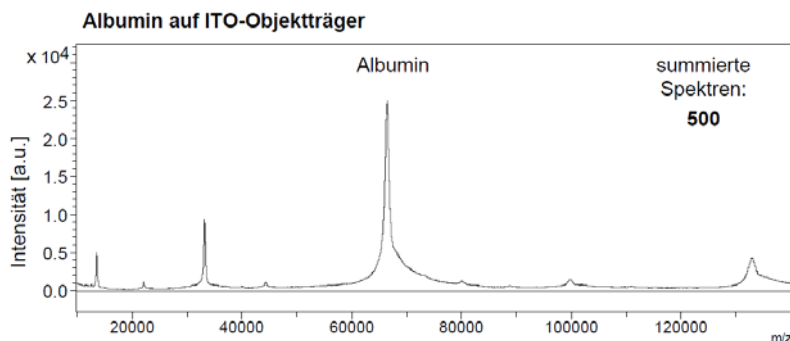
Die gemessenen Spektren der Intensität von Insulin auf verschiedenen modifizierten, unstrukturierten Polystyrol-Oberflächen ist in Abbildung 36 dargestellt.



**Abbildung 36:** Übersicht über die gemessenen Spektren der Insulin-Intensität auf verschiedenen Polystyrol-Oberflächen. Es ist jeweils die pure Insulin-Lösung ohne Waschen und die Adsorption von Insulin nach einem Waschschrift für die unterschiedlichen Substrate zusammengefasst.

### b) Albumin

Die Masse des Proteins Albumin liegt bei 66.000 Da und ergibt bei der Messung mit MALDI-TOF MS ein charakteristisches Spektrum (Abbildung 37).



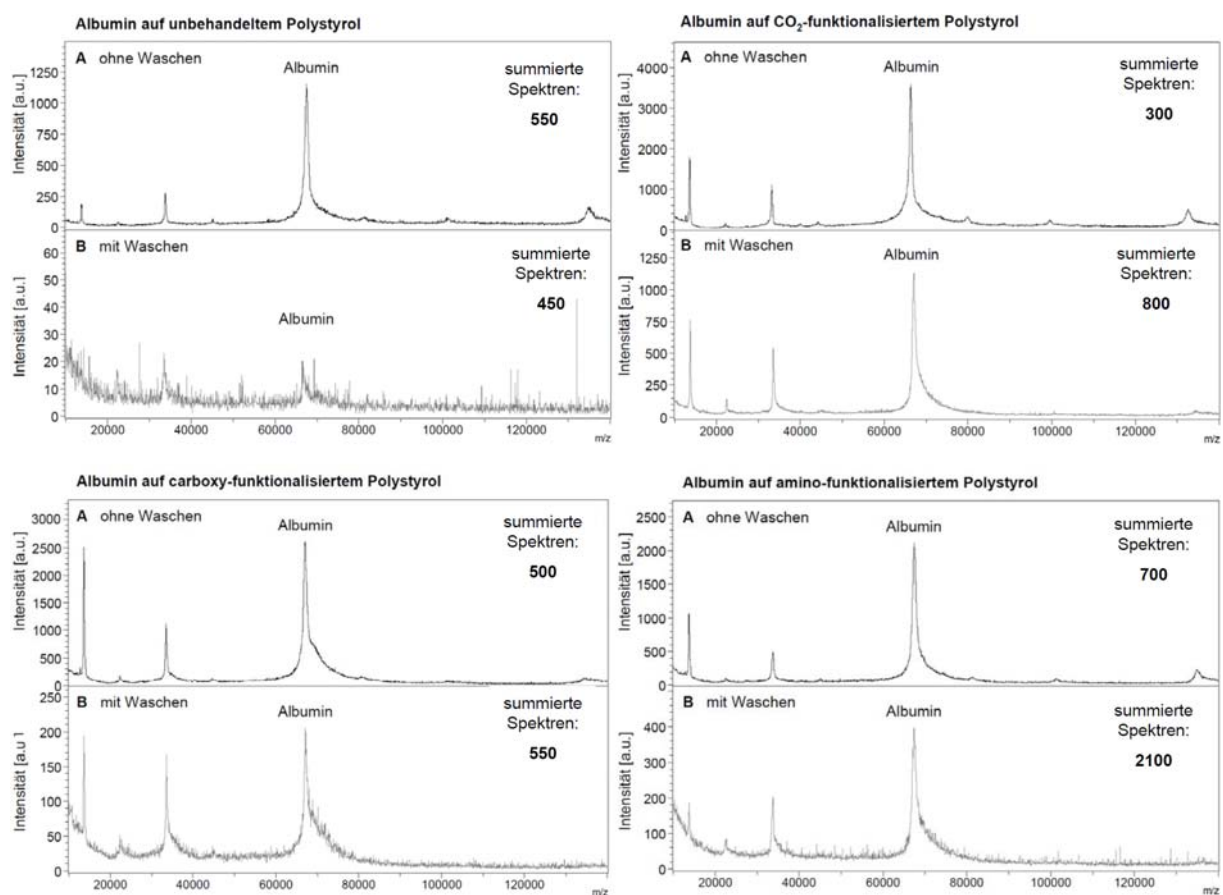
**Abbildung 37:** Spektrum einer Albumin Messung auf einem kommerziellen MALDI Glasobjektträger. Es sind sowohl mehrfach geladene Molekülonen als auch ein Peak bei der doppelten Masse von Albumin (Dimer) erkennbar.

Die Intensität des gemessenen Albumins nach einem Waschschrift erlaubte eine Aussage über die Adsorption des Proteins. In Tabelle 14 zeigen sich Unterschiede in der Adsorption auf verschiedenen Polystyrol-Oberflächen. Auf den funktionalisierten Substraten ist die Adsorption höher als auf unbehandelten Polystyrol-Oberflächen.

**Tabelle 14:** Zusammenfassung der MALDI MS Ergebnisse zur Adsorption von Insulin auf verschiedenen Polystyrol-Oberflächen nach Waschen. Für Insulin auf unbehandeltem Polystyrol wurde die gemessene Intensität auf "0" gesetzt. Die Adsorption auf modifizierten Substraten ist in Relation zu unbehandeltem Polystyrol ermittelt. 0: Ausgangswert Polystyrol, +: höhere Insulin-Intensität als auf unbehandeltem Polystyrol, -: niedrigere Insulin-Intensität als auf unbehandeltem Polystyrol

Polystyrol-Oberfläche	Albuminadsorption nach Waschen
unbehandelt	0
CO <sub>2</sub> -funktionalisiert	+
carboxy-funktionalisiert	+
amino-funktionalisiert	+

Eine Übersicht zu den gemessenen Spektren der Intensität von Albumin auf verschiedenen modifizierten Polystyrol-Substraten ist in Abbildung 38 zu sehen.



**Abbildung 38:** Gemessenen Spektren für die Albumin-Intensität auf verschiedenen Polystyrol-Substraten. Die Spektren der puren Albumin-Lösung ohne Waschen befinden sich jeweils über dem Spektrum zur Adsorption von Albumin nach einem Waschschrift auf den verschiedenen Oberflächen.

## 4.2 Biologische Ergebnisse

Zur Evaluierung des Verhaltens von primären Keratinozyten und primären Fibroblasten auf den modifizierten Oberflächen wurden folgende Kriterien herangezogen: Morphologie und Zell-Substrat Kontakte (4.2.1.1 + 4.2.2.1), Vitalität und Proliferation (4.2.1.2 + 4.2.2.2), Cytotoxizität (4.2.1.3), Differenzierung und Funktionalität (4.2.1.4 + 4.2.2.3), Zell-Zell Kontakte (4.2.1.5 + 4.2.2.4) sowie eine detaillierte Betrachtung der Morphologie (4.2.1.6 + 4.2.2.5).

Eine Zusammenfassung der biologischen Ergebnisse ist in Tabelle 15 gezeigt.

**Tabelle 15:** Übersicht zum Einfluss von Strukturierung und Funktionalisierung auf physiologische und morphologische Antworten primärer humaner Hautzellen. K: Keratinozyten, F: Fibroblasten, X: hatte Einfluss, -: hatte keinen Einfluss, ?: Einfluss unklar, \*): alle Strukturen auf einem Plättchen, keine Einzelbetrachtung

Morphologische / physiologische Zellantworten	Strukturierung		Funktionalisierung	
	globulär	fibrillär	amino	carboxy
<b>Morphologie K</b> (lichtmikroskopisch)	X langgestreckt	X, z.T. langgestreckt	-	-
<b>Morphologie F</b> (lichtmikroskopisch)	-	X Ausrichtung	-	-
<b>Zell-Matrix Kontakte K</b> (Aktin, Vinculin)	-	-	-	-
<b>Zell-Matrix Kontakte F</b> (Aktin, Vinculin)	-	X Aktinausrichtung	-	-
<b>Proliferation K</b> (WST-1 Proliferationstest)	X geringer	X, aber*)	X höher	X geringer
<b>Proliferation F</b> (WST-1 Proliferationstest)	X geringer	X, aber*) kaum	X geringer	X höher
<b>Differenzierung K</b> (Cytokeratin 14, p63)	-	X? weniger	-?	X? mehr
<b>Funktionalität F</b> (Kollagen Typ I)	-	-	-	-
<b>Zell-Zell Kontakte K</b> (E-Cadherin)	X Mikropartikel	-	-	-
<b>Zell-Zell Kontakte F</b> (Cadherine)	-	-	-	-
<b>Morphologie K</b> (REM Aufnahmen)	X	X	X?	X?
<b>Morphologie F</b> (REM Aufnahmen)	-	X	-	-

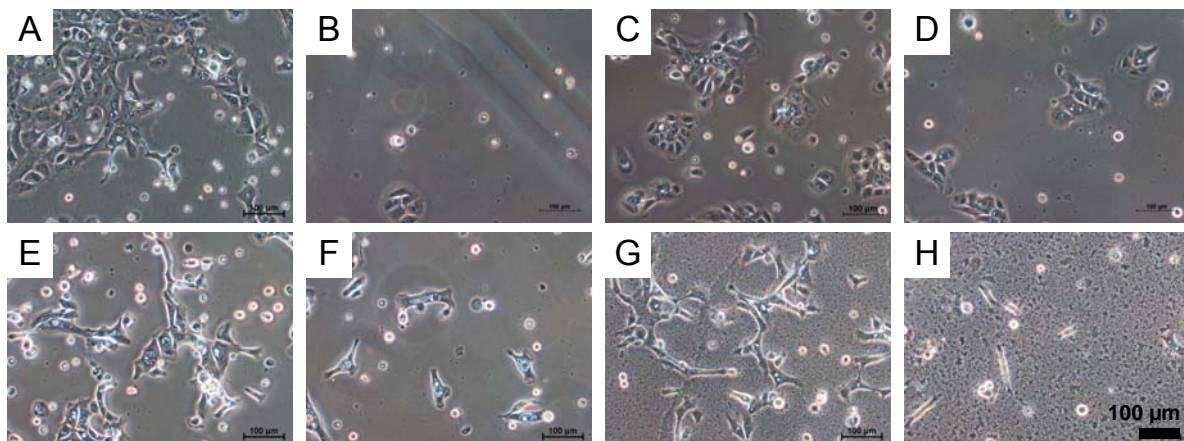
## 4.2.1 Zelluläres Verhalten auf globulären Substraten

### 4.2.1.1 Morphologie und Zell-Substrat Kontakte primärer Zellen

Primäre Keratinozyten und Fibroblasten wurden nach 24 h, 48 h und 72 h lichtmikroskopisch betrachtet. Aufnahmen von Fluoreszenz-Färbungen des Aktin-Cytoskeletts, des bei der Bildung von Fokalkontakten beteiligten Proteins Vinculin und des Nucleus dienten als Basis zur Bewertung von Zell-Substrat Interaktionen.

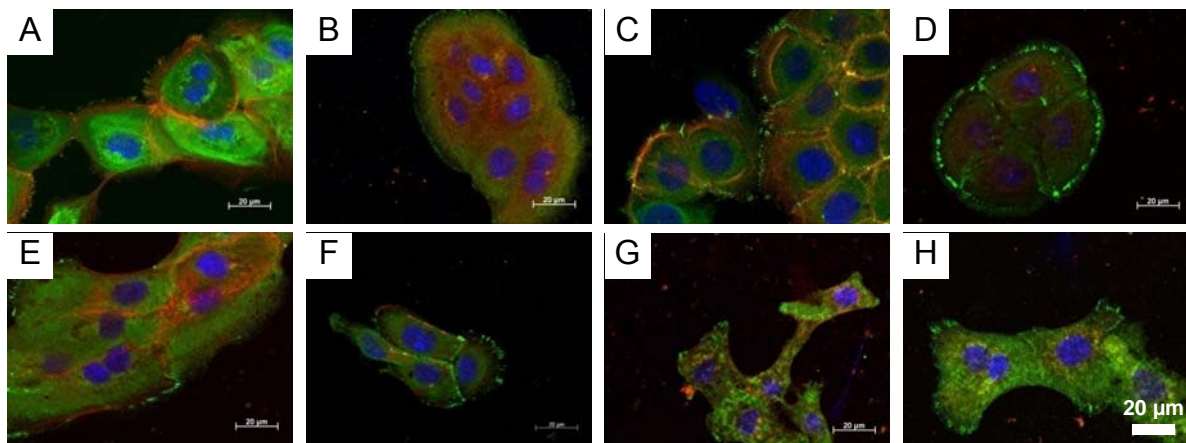
#### a) Keratinozyten

Es zeigten sich Unterschiede in der Morphologie primärer Keratinozyten auf planaren Substraten im Vergleich zu strukturierten Substraten. Die adhärenenten Zellen auf unstrukturierten Substraten besaßen die für früh differenzierte Keratinozyten typische kubische, kompakte Morphologie mit geringem Cytoplasma-Anteil. Es bildeten sich meist konzentrische Zellkolonien (Abbildung 39 A-D). Demgegenüber verfügten Keratinozyten auf nano- oder mikrostrukturierten Oberflächen über langgezogene und wenig kompakte Zellkörper. Die typisch konzentrischen Zellkolonien sind selten zu sehen, meist lagen verzweigte Zellansammlungen vor (Abbildung 39 E-H). Unabhängig von der Strukturierung waren auf amino-modifizierten Substraten mindestens 100% mehr adhärenente Keratinozyten im Vergleich zu carboxy-modifizierten Oberflächen zu sehen.



**Abbildung 39:** Primäre Keratinozyten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach 72 h Kultivierung. Auf planaren Substraten **A-D** besitzen die Zellen die typisch kubische Morphologie mit kompakten Zellkörpern und Kolonien. Keratinozyten auf strukturierten Substraten **E-H** hingegen haben langgestreckte Zellkörper und bilden verzweigte Kolonien. Oberflächen: **A** Zellkulturschale, **B** gereinigtes Glas, **C** planar amino-funktionalisiert, **D** planar carboxy-funktionalisiert, **E** nanostrukturiert amino-funktionalisiert, **F** nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert **G** mikrostrukturiert amino-funktionalisiert **H** mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 100fach

Auf Bildern von Fluoreszenz-Färbungen des Aktin-Cytoskeletts, des Proteins Vinculin, das bei der Formierung von Fokalkontakten mitwirkt, und des Nucleus geht eine deutliche Ausbildung von Aktin-Fasern und Vinculin hervor (Abbildung 40). Dabei besitzen die Zellen ein diffuses Netzwerk an Fokalkontakten, das sich in der Umgebung des Nucleus befindet. Darüber hinaus lassen sich klar abgegrenzte, punkt- oder strichförmige Fokalkontakte im Randbereich der Keratinozyten erkennen. Auf den planaren Substraten weisen die Zellen meist die typisch kompakte, kubische Morphologie auf (Abbildung 40 A-D). Dies ändert sich auf den strukturierten Substraten, wo die Zellkörper deutlich langgestreckt und z.T. verzweigt erscheinen (Abbildung 40 E-H).

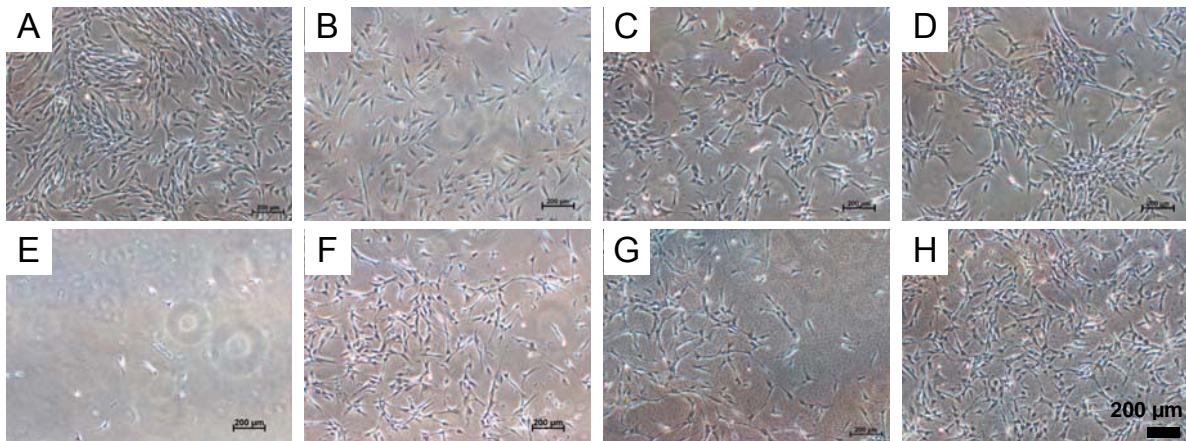


**Abbildung 40:** Zell-Substrat Kontakte und Morphologie primärer Keratinozyten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. Bei Fluoreszenz-Färbungen von Aktin (rot), Vinculin (grün) und dem Nucleus (blau) sind Aktin-Fasern und Fokalkontakte sichtbar. Keratinozyten auf planaren Substraten **A-D** haben meist die typisch kubische Morphologie, wohingegen Zellen auf strukturierten Substraten **E-H** langgestreckt sind und z.T. verzweigte Kolonien vorweisen. Oberflächen: **A** Zellkulturschale, **B** gereinigtes Glas, **C** planar amino-funktionalisiert, **D** planar carboxy-funktionalisiert, **E** nanostrukturiert amino-funktionalisiert, **F** nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert **G** mikrostrukturiert amino-funktionalisiert **H** mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 630fach

#### b) Fibroblasten

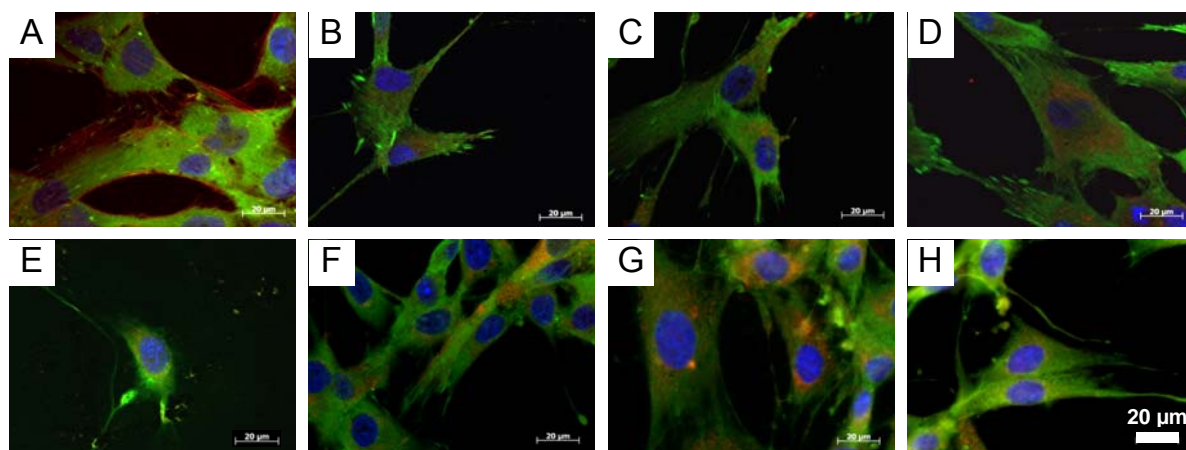
In Abbildung 41 sind Bilder von primären Fibroblasten auf den modifizierten Substraten zusammengefasst. Auf der kommerziellen Zellkultur Oberfläche befinden sich adhärenente Zellen, die größtenteils eine spindelförmige Morphologie aufweisen (Abbildung 41 A). Im Gegensatz dazu besitzen die Fibroblasten auf den restlichen Substraten verzweigte Zellkörper. Bezüglich der Funktionalisierung zeigte sich unabhängig von der vorliegenden Strukturierung eine höhere Anzahl adhärenenter Zellen auf den carboxy-funktionalisierten Substraten im Vergleich zu den amino-modifizierten Oberflächen. Auffällig war, dass auf nanostrukturierten amino-funktionalisierten Substraten lediglich einzelne Fibroblasten adhärerten (Abbildung 41 G).





**Abbildung 41:** Primäre Fibroblasten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. Die Morphologie der Zellen auf Zellkultur Oberflächen (A) ist spindelförmig, wohingegen die Zellkörper auf den modifizierten Substraten verzweigt sind. Oberflächen: A Zellkulturschale, B gereinigtes Glas, C planar amino-funktionalisiert, D planar carboxy-funktionalisiert, E nanostrukturiert amino-funktionalisiert, F nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert G mikrostrukturiert amino-funktionalisiert H mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 100fach

Bei den Aufnahmen in Abbildung 42 handelt es sich um Fluoreszenz-Färbungen des Aktin-Cytoskeletts sowie des für die Bildung von Fokalkontakten wichtigen Proteins Vinculin und des Nucleus. Für Fibroblasten auf Zellkultursubstraten sind Stressfasern erkennbar (Abbildung 42 A). Auf den modifizierten Substraten hingegen liegen die Aktin-Fasern diffus und meist in der Nähe des Nucleus vor. Eine Expression des Proteins Vinculin ist deutlich nachzuweisen, wobei strich- und punktförmige Fokalkontakte meist am Rand der Zelle oder ungeordnet im Zellkörper zu erkennen sind.



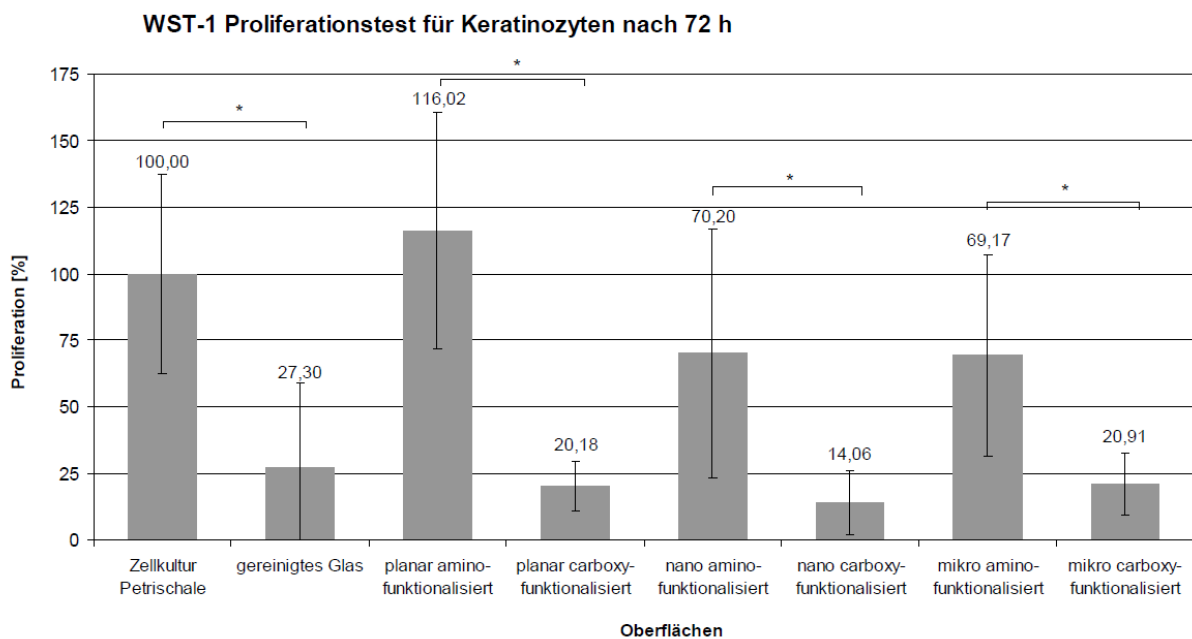
**Abbildung 42:** Zell-Substrat Kontakte und Morphologie primärer Fibroblasten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. In diesen Fluoreszenz-Färbungen von Aktin (rot), Vinculin (grün) und dem Nucleus (blau) sind Aktin-Fasern und Fokalkontakte sichtbar. Auf Zellkultursubstraten sind Stressfasern zu sehen A, wohingegen auf den modifizierten Substraten Aktin diffus angeordnet ist. Oberflächen: A Zellkulturschale, B gereinigtes Glas, C planar amino-funktionalisiert, D planar carboxy-funktionalisiert, E nanostrukturiert amino-funktionalisiert, F nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert G mikrostrukturiert amino-funktionalisiert H mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 630fach

#### 4.2.1.2 WST-1 Proliferationstest

Signifikante Unterschiede im Proliferationsverhalten primärer Keratinozyten und primärer Fibroblasten ergeben sich aus der Zusammenfassung der Ergebnisse des WST-1 Tests aller Versuche. Dabei diente die kommerzielle Zellkultur Oberfläche aus Polystyrol als Positiv-Kontrolle, weshalb die gemessenen Werte auf 100% gesetzt wurden.

##### a) Keratinozyten

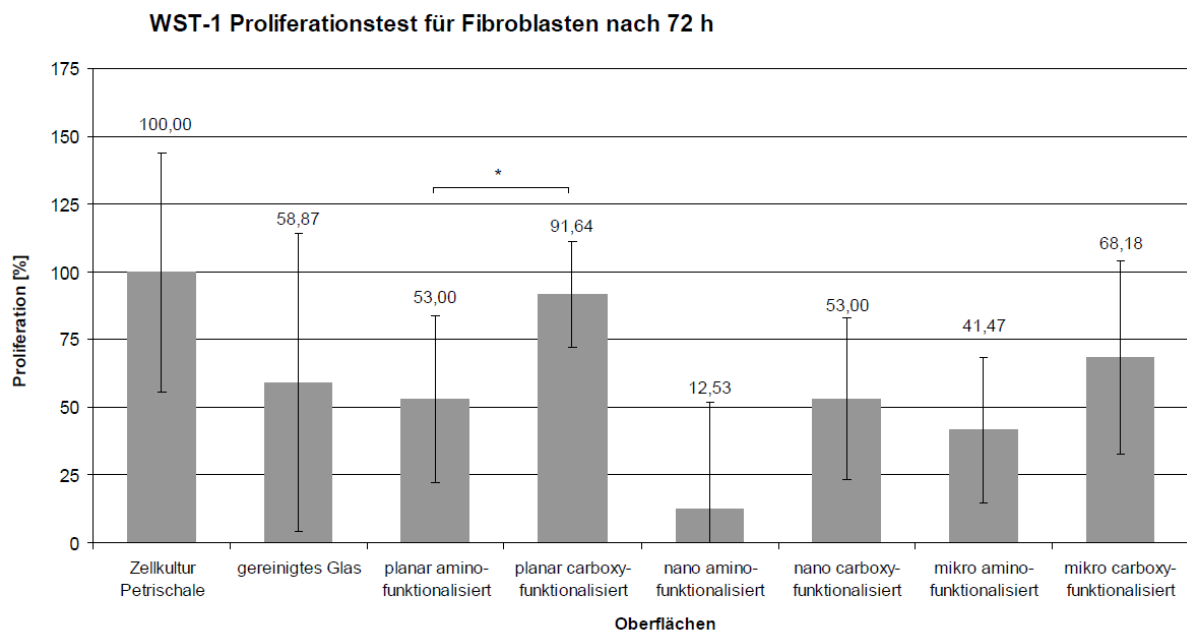
Messwerte für amino-funktionalisierte Oberflächen lagen, unabhängig von der jeweiligen Strukturierung, signifikant höher als bei den entsprechenden carboxy-funktionalisierten Substraten. Während für die carboxy-modifizierten Oberflächen stets Werte unter 25% zu messen waren, wiesen planare amino-funktionalisierte Substrate Werte von über 100% auf. Durch die eingeführte Nano- oder Mikro-Strukturierung sanken diese auf unter 75%. Die ermittelten Daten für die Zellkultursubstrate waren signifikant höher als die der Zellen auf gereinigtem Glas. Im Vergleich zu den als Positiv-Kontrolle verwendeten Zellkultursubstraten wurden für die planaren, amino-funktionalisierten Oberflächen tendenziell höhere Werte gemessen (Abbildung 43).



**Abbildung 43:** WST-1 Proliferationstest nach 72 h Kultivierung von Keratinozyten auf modifizierten Oberflächen. Die gemessenen Werte für Zellkultursubstrate wurden auf 100% gesetzt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den amino- und den carboxy-funktionalisierten Oberflächen. Ein Einfluss der Strukturierung war lediglich bei amino-modifizierten Substraten zu verzeichnen, wobei die ermittelten Werte durch die Nano- oder Mikro-Strukturierung abnahm. Die höchsten Werte waren für planare amino-funktionalisierte Oberflächen zu messen.

## b) Fibroblasten

Bei primären Fibroblasten ergaben die Messungen des WST-1 Proliferationstests für carboxy-funktionalisierte Substrate höhere Werte als für amino-funktionalisierte Oberflächen (Abbildung 44). Signifikante Unterschiede wurden bei planaren, carboxy-modifizierten Oberflächen, mit Werten über 90% im Vergleich zu nanostrukturierten amino-funktionalisierten Substraten festgestellt. Infolge der hohen Standardabweichungen, die in dieser zusammengefassten Darstellung der Experimente mit primären Fibroblasten auftrat, sind keine weiteren signifikanten Unterschiede zu beschreiben. Die gemessenen Werte auf der Mikro-Strukturierung lagen höher als die entsprechende Funktionalisierung auf Nanostrukturen.



**Abbildung 44:** WST-1 Proliferationstest nach 72 h Kultivierung primärer Fibroblasten auf modifizierten Oberflächen. Die für Zellkultursubstrate gemessenen Werte wurden auf 100% festgelegt. Tendenziell lagen die gemessenen Werte für carboxy-funktionalisierte Substrate höher als die für amino-modifizierte Oberflächen. Dieser Unterschied war bei planaren Substraten signifikant. Zudem ergeben sich für mikrostrukturierte Substrate höhere Werte im Vergleich zu Fibroblasten auf nanostrukturierten Oberflächen.

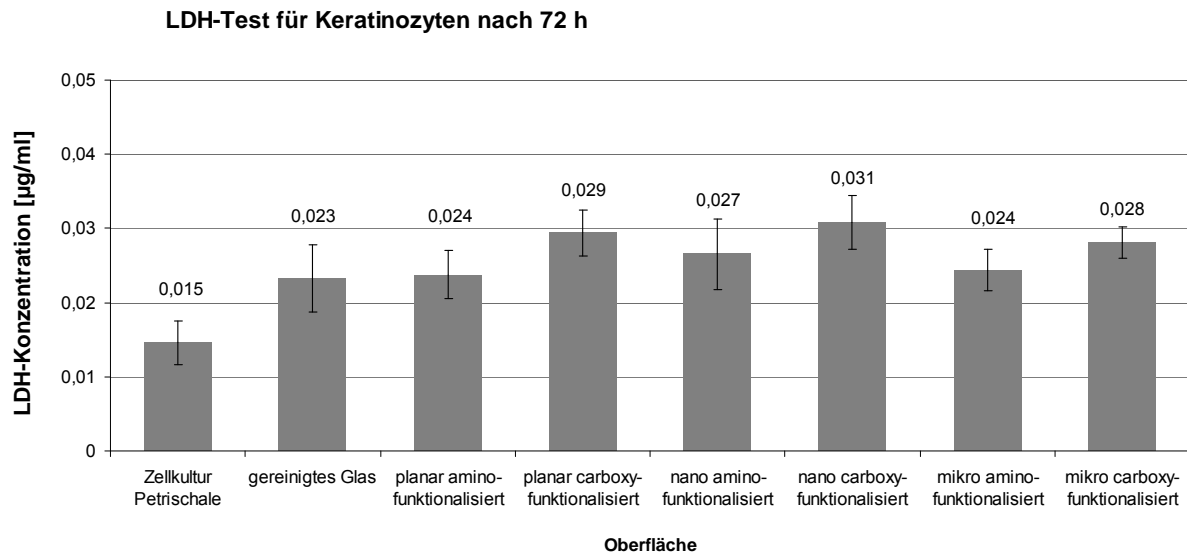
### 4.2.1.3 Cytotoxizität mit dem LDH-release Assay

Die LDH-Konzentration lässt sich mit dem LDH-release Assay aus Zellkulturüberständen ermitteln und gibt Aufschluss über die Anzahl toter Zellen. Tendenziell stimmten die ermittelten Ergebnisse mit dem Proliferationstest überein.

## a) Keratinozyten

In Zellkulturüberständen von primären Keratinozyten, die auf carboxy-modifizierten Substraten kultiviert wurden, war bei gleicher Strukturierung stets eine höhere LDH-Konzentration zu messen als in Überständen von Zellen auf amino-modifizierten Oberflächen. Die niedrigste Konzentration wiesen Proben von Keratinozyten auf Zellkultur Petrischalen auf (Abbildung 45).

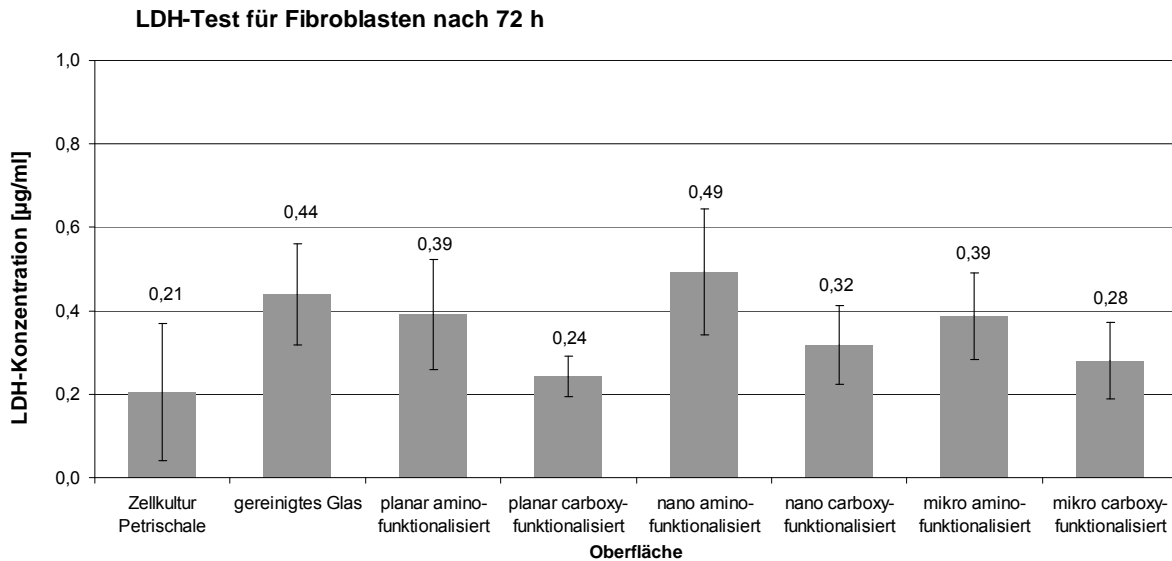




**Abbildung 45:** LDH-release Assay nach 72 h Kultivierung von primären Keratinozyten auf modifizierten Oberflächen. Die gemessenen Werte aus Zellkulturüberständen von Keratinozyten auf carboxy-funktionalisierten Substraten lagen stets tiefer als die Messergebnisse für Überstände von Zellen auf amino-modifizierten Oberflächen mit der jeweils entsprechenden Strukturierung. Am höchsten war die LDH-Konzentration in Überständen von Keratinozyten auf nanostrukturierten amino-funktionalisierten Oberflächen. Die geringste LDH-Konzentration lag in Überständen von Zellen auf Zellkultur Petrischalen vor.

#### b) Fibroblasten

Es ergaben sich deutliche Unterschiede in der Konzentrationen der Lactat-Dehydrogenase in Überständen von primären Fibroblasten auf carboxy-modifizierten Substraten im Vergleich zu Zellkulturüberständen von Fibroblasten, die auf amino-funktionalisierten Oberflächen kultiviert wurden. Dabei lagen die gemessenen Werte der Überstände von Zellen auf carboxy-modifizierten Substraten stets tiefer als die LDH-Konzentration in Überständen von Fibroblasten auf amino-funktionalisierten Oberflächen mit der jeweils entsprechenden Strukturierung. Die höchste LDH-Konzentration war in Überständen von Fibroblasten auf nanostrukturierten amino-modifizierten Substraten zu messen. Auch bei Mediumüberständen von Zellen, die auf gereinigtem Glas kultiviert wurden, war die LDH-Konzentration deutlich höher als die Messwerte bei Überständen von primären Fibroblasten auf Zellkultursubstraten (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** LDH-release Assay nach 72 h Kultivierung primärer Fibroblasten auf modifizierten Oberflächen. Es waren signifikante Unterschiede festzustellen. So lagen die Werte der Überstände von Zellen auf carboxy-funktionalisierte Substrate stets tiefer als die Messergebnisse der Überstände von Zellen auf amino-modifizierten Oberflächen. Dieser Unterschied war bei allen Substraten signifikant. Die LDH-Konzentration der Überstände von Zellen, die auf nanostrukturierte amino-funktionalisierte Oberflächen kultiviert wurden, war am höchsten.

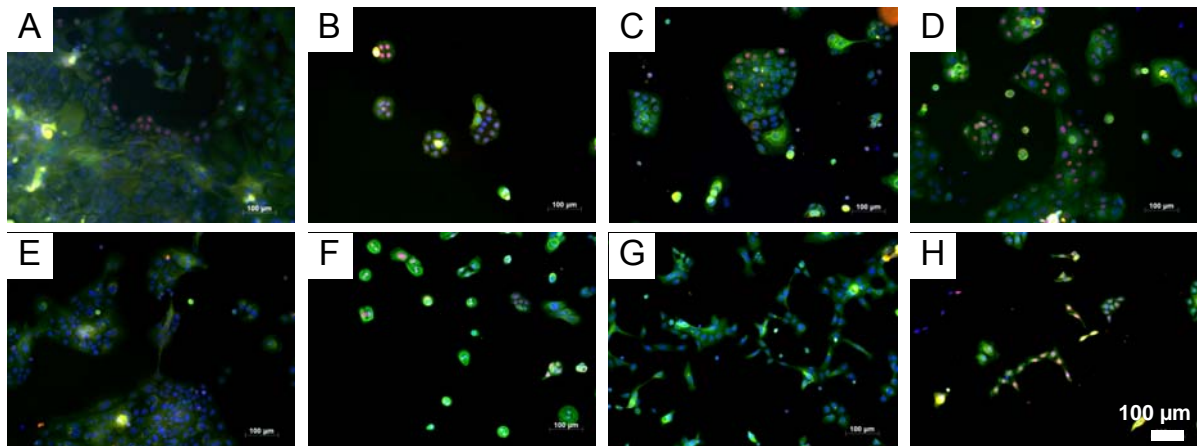
#### 4.2.1.4 Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen

Die Evaluierung der Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen erfolgte über immunhistochemische Färbungen. Für Keratinozyten wurde die Expression des für die Basalschicht typischen Cytokeratins 14 und des von Vorläuferzellen exprimierten Transkriptionsfaktors p63 untersucht. Zudem zeigte sich die parallele Färbung von p63 und des Proliferationsmarkers Ki67 als aufschlussreich. Bei primären Fibroblasten diente die Färbung des extrazellulären Matrixproteins Kollagen Typ I als Nachweis der Funktionalität.

##### a) Keratinozyten

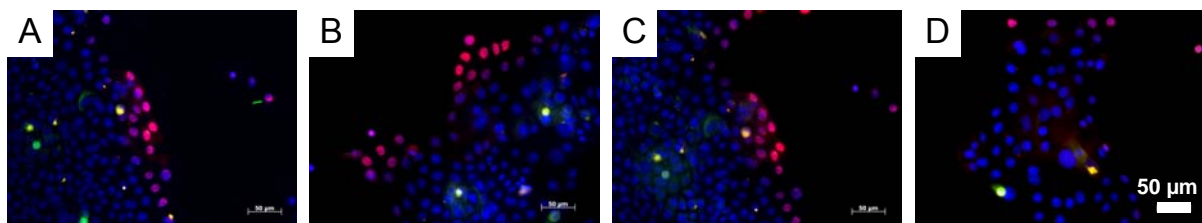
In Abbildung 47 ist eine Übersicht der Färbung von Cytokeratin 14 (grün), p63 (rot) und des Nucleus (blau) primärer Keratinozyten auf verschiedenen modifizierten Substraten zusammengestellt. Daraus ist zu erkennen, dass über 90% der Zellen das für basale Zellen charakteristische Cytokeratin 14 exprimieren. Keratinozyten, die p63 positiv sind, besitzen einen rötlichen Nucleus. Diese Zellen kommen häufig am Rand von Zellkolonien vor und exprimieren immer auch Cytokeratin 14.

Tendenziell waren auf nano- oder mikrostrukturierten und amino-funktionalisierten Substraten weniger p63 positive Zellen zu finden als auf planar carboxy-modifizierten Oberflächen (Abbildung 47 E+G).



**Abbildung 47:** Differenzierung primärer Keratinozyten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. Es sind Fluoreszenz-Färbungen von p63 (rot), Cytokeratin 14 (grün) und dem Nucleus (blau) zu sehen. Auf amino-funktionalisierten nanostrukturierten oder mikrostrukturierten Substraten (E+G) liegen weniger p63 positive Keratinozyten vor. Oberflächen: **A** Zellkulturschale, **B** gereinigtes Glas, **C** planar amino-funktionalisiert, **D** planar carboxy-funktionalisiert, **E** nanostrukturiert amino-funktionalisiert, **F** nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert, **G** mikrostrukturiert amino-funktionalisiert, **H** mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 200fach

Bei gleichzeitiger Färbung von p63 (rot), Ki67 (grün) und dem Nucleus (blau) stellte sich heraus, dass p63 positive Keratinozyten vornehmlich in der äußersten Reihe von Zellkolonien vorkommen (Abbildung 48). Im Gegensatz dazu sind Ki67 positive Zellen eher zentral in der Kolonie zu finden. Zudem fällt die geringe Anzahl dieser hoch proliferativen Keratinozyten auf.

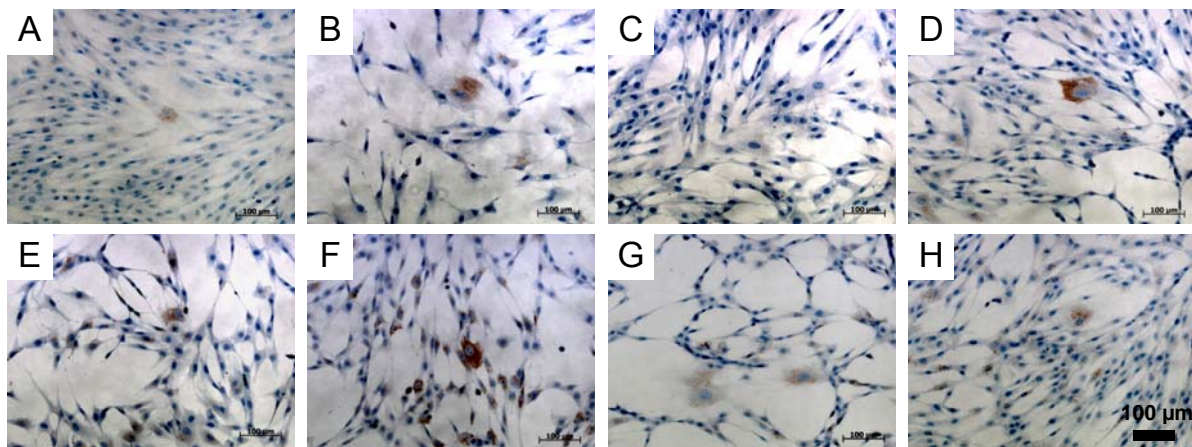


**Abbildung 48:** Färbung von Ki67 und p63 primärer Keratinozyten nach einer Kultivierung von 72 h. Keratinozyten, die p63 (rot) exprimieren, sind häufig am Rand von Zellkolonien zu finden, wohingegen proliferative, Ki67 exprimierende Zellen meist zentral in der Kolonie vorliegen. Oberflächen: **A-C** planare amino-funktionalisierte Substrate, **D** planare carboxy-funktionalisierte Oberflächen. Vergrößerung: 400fach

## b) Fibroblasten

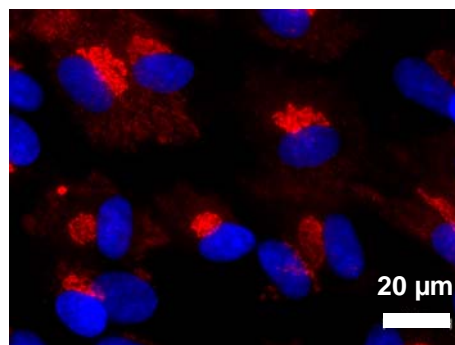
Kollagen Typ I synthetisierende Fibroblasten sind in Abbildung 49 braun angefärbt. Dabei zeigt sich eine deutliche Korrelation zur Zellmorphologie: Kollagen Typ I positive Zellen besitzen einen ausgespreiteten, großen Zellkörper während der Produktion von extrazellulären Matrix Proteinen. Starke Braunfärbungen liegen meist in der Umgebung des Zellkerns vor, wo im Endoplasmatischen Retikulum Kollagen Typ I synthetisiert wird (z.B. Abbildung 49 D).

Fibroblasten, die kein Kollagen produzieren, weisen hingegen eine lange und spindelförmige Morphologie auf. Diese Zellen entstehen, meist bei dichter werdenden Zellkolonien und liegen eng beisammen (z.B. Abbildung 49 A).



**Abbildung 49:** Produktion von Kollagen Typ I primärer Fibroblasten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. Zellen, die Kollagen Typ I produzieren (braun) sind meist groß und ausgespreitet, wohingegen Kollagen Typ I negative Fibroblasten spindelförmige, kleine Zellkörper besitzen. Oberflächen: **A** Zellkulturschale, **B** gereinigtes Glas, **C** planar amino-funktionalisiert, **D** planar carboxy-funktionalisiert, **E** nanostrukturiert amino-funktionalisiert, **F** nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert, **G** mikrostrukturiert amino-funktionalisiert, **H** mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 200fach

Bei genauerer Betrachtung der Synthese von Kollagen Typ I (rot) durch primäre Fibroblasten zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen des Proteins in der Nähe des Zellkerns. Im restlichen Zellkörper konnte Kollagen Typ I in geringeren Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 50).



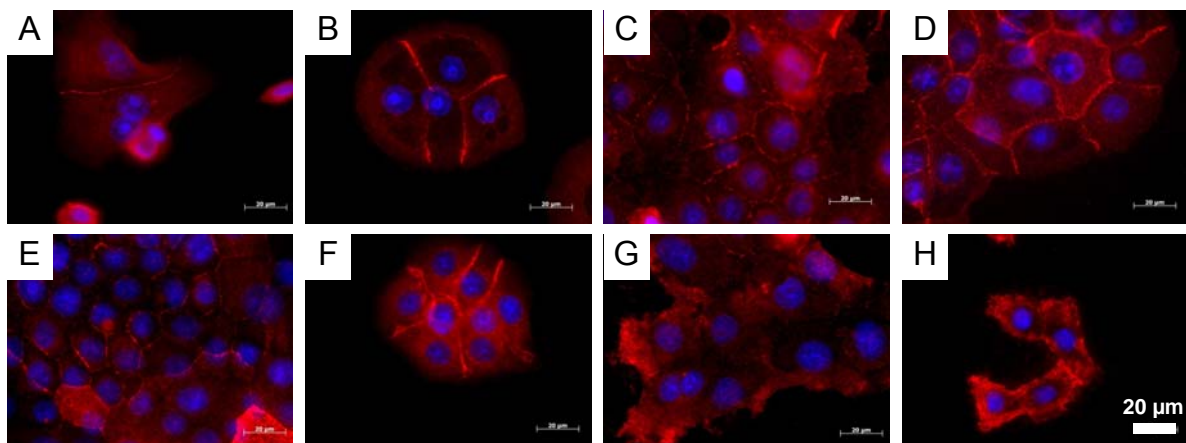
**Abbildung 50:** Kollagen Typ I-Expression primärer Fibroblasten. Es ist eine deutliche Anhäufung von Kollagen Typ I (rot) in der unmittelbaren Umgebung des Nucleus zu sehen. Im Zellkörper lassen sich schwache Rotfärbungen erkennen.

#### 4.2.1.5 Zell-Zell Kontakte

Zell-Zell Kontakte sind zur Kommunikation zwischen den Zellen essentiell. Besonders Epithelzellen wie Keratinozyten besitzen viele dieser Zell-Zell Kontakte. Der Nachweis von Zell-Zell Kontakten für primäre Keratinozyten erfolgte über immunhistochemische Färbungen von E-Cadherin, das Hauptprotein von Adherence Junctions. Auch bei Fibroblasten sind lichtmikroskopisch Kontakte zwischen den Zellen zu beobachten, deshalb wurde eine PAN Cadherin Färbung durchgeführt.

##### a) Keratinozyten

Bei Färbungen der E-Cadherin-Expression (rot) von Keratinozyten waren auf allen unterschiedlich modifizierten Substraten E-Cadherin positive Zellen zu sehen (Abbildung 51). Dabei zeigte sich das deutliche Expression von E-Cadherin an den Kontaktflächen der Zellen, wohingegen Keratinozyten am Kolonierand weniger gefärbt sind (z.B. Abbildung 51 B). Auf mikrostrukturierten Oberflächen lag eine geringe E-Cadherin-Expression an den Kontaktstellen zwischen den Zellen vor (Abbildung 51 G+H). Dagegen ist das Cadherin an den Rändern der Zellkolonien nachweisbar. Diese bilden zudem keine klare Grenze zum Substrat, sondern weisen vielmehr diffuse, unklare Zellränder auf. Auch die Morphologie der Keratinozyten weicht stark von den typisch kubischen Zellkörpern ab.

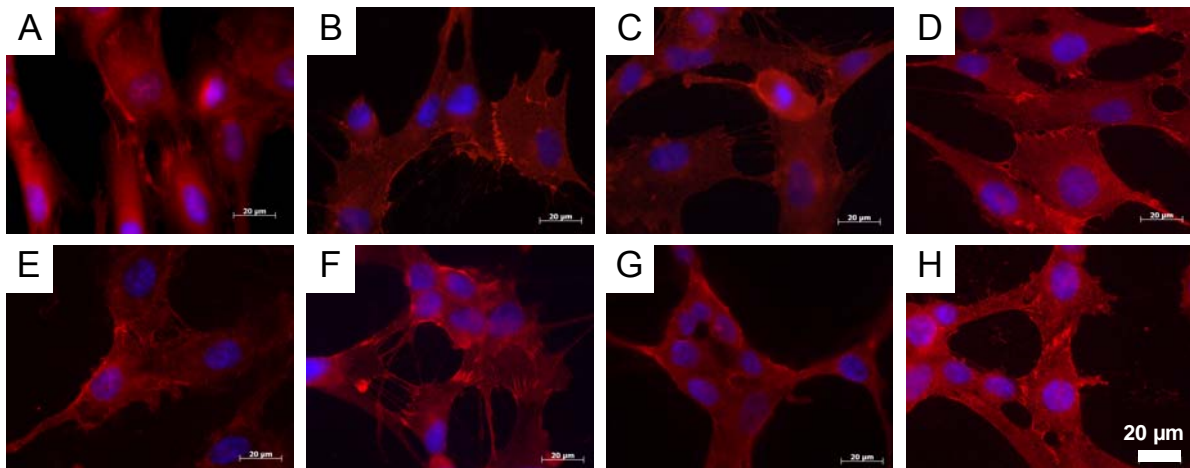


**Abbildung 51:** Zell-Zell Kontakte primärer Keratinozyten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. E-Cadherin ist rot angefärbt, der Nucleus blau. Bei den mikrostrukturierten Substraten (G+H) ist auffällig, dass zwischen den Zellen wenig E-Cadherin nachweisbar ist, während der Rand der äußeren Zellen deutlich E-Cadherin positiv ist. Oberflächen: **A** Zellkulturschale, **B** gereinigtes Glas, **C** planar amino-funktionalisiert, **D** planar carboxy-funktionalisiert, **E** nanostrukturiert amino-funktionalisiert, **F** nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert, **G** mikrostrukturiert amino-funktionalisiert, **H** mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung:630fach



## b) Fibroblasten

Fibroblasten, die mit einem gegen verschiedenen Cadherine gerichteten Antikörper gefärbt wurden (rot), lagen auf allen Substraten vor (Abbildung 52). Die Form der Zell-Zell Kontakte an den Kontaktflächen benachbarter Zellen variierte. So zeigten sich bei Zellen auf gereinigtem Glas (Abbildung 52 B) beispielsweise strichförmige, enge Kontakte. In Abbildung 52 F hingegen bildeten die Zellen über größere Abstände filopodienähnliche Kontakte zu angrenzenden Zellen aus.



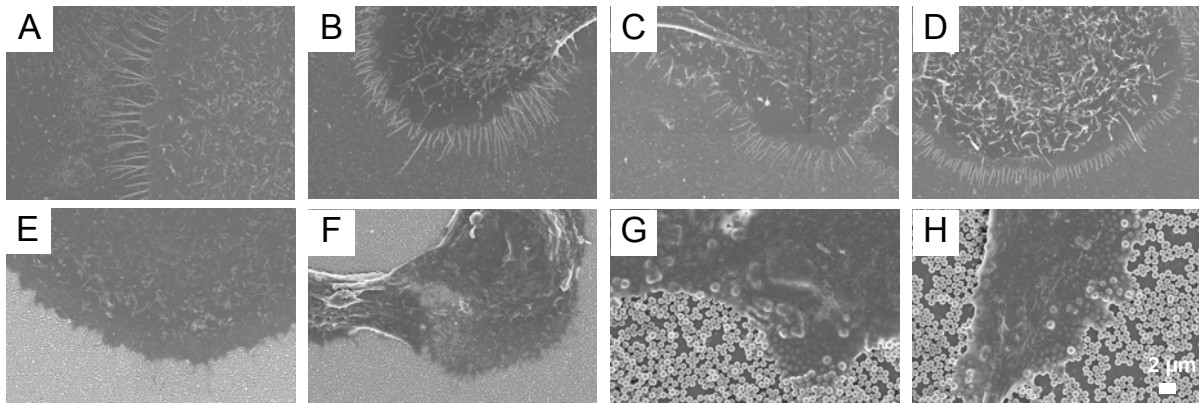
**Abbildung 52:** Zell-Zell Kontakte primärer Fibroblasten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. Eine Expression von Cadherinen (rot), besonders in den Kontaktbereichen zwischen den Zellen ist deutlich zu sehen. Oberflächen: **A** Zellkulturschale, **B** gereinigtes Glas, **C** planar amino-funktionalisiert, **D** planar carboxy-funktionalisiert, **E** nanostrukturiert amino-funktionalisiert, **F** nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert, **G** mikrostrukturiert amino-funktionalisiert, **H** mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 630fach

### 4.2.1.6 REM-Aufnahmen

In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich die Morphologie einzelner Zellen detailliert abbilden. Dabei sind migrierende Zellen von besonderem Interesse, da diverse Cytoplasmaausstülpungen vorkommen können.

#### a) Keratinozyten

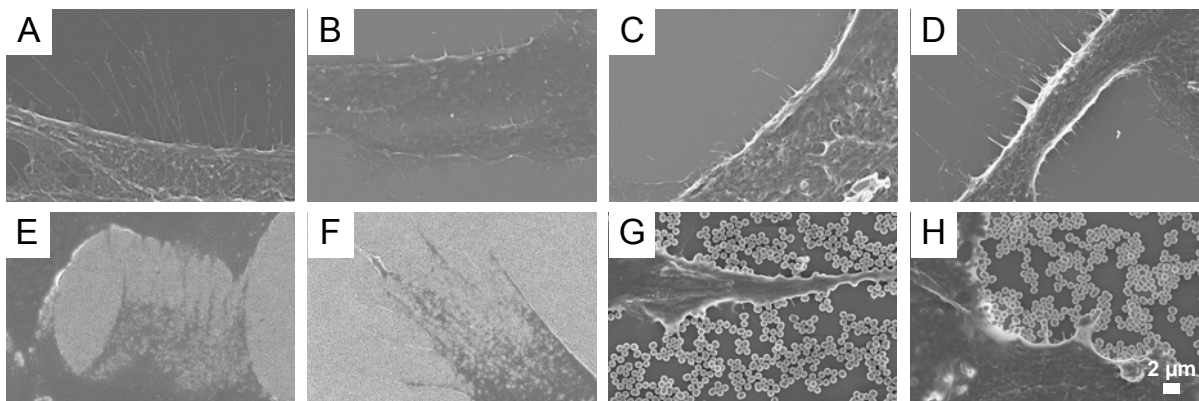
In Abbildung 53 ist die Morphologie einzelner Keratinozyten bzw. Ausschnitte dieser Zellen auf verschiedenen Substraten zusammengestellt. Besonders auffällig geht aus den Bildern die starke Ausbildung der spitzen, fingerförmigen Filopodien auf den nicht strukturierten Substraten hervor (Abbildung 53 A-D). Diese Aktin-Ausstülpungen haben ihren Ursprung im Lamellipodium, einem dünnen organelllosen Saum am Zellrand, und liegen in relativ regelmäßigen Abständen vor. Bei Keratinozyten auf nano- oder mikrostrukturierten Substraten war auch deutlich das Lamellipodium zu sehen, beispielsweise in Abbildung 53 H, wo an der rechten Seite der Zelle deutlich Mikroartikel unter dem Lamellipodium erkennbar sind. Die Ausbildung von Filopodien hingegen war auf den strukturierten Oberflächen nur in geringem Maße festzustellen (Abbildung 53 E-H).



**Abbildung 53:** REM-Aufnahmen primärer Keratinozyten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. Auf planaren Oberflächen sind spitze Aktin-Ausstülpungen, sog. Filopodien, die sich aus dem saumartigen Lamellipodium ausbilden, zu sehen. Während auf den strukturierten Oberflächen nur noch das dünne Lamellipodium, aber nur vereinzelte oder keine Filopodien vorhanden sind. Oberflächen: **A** Zellkulturschale, **B** gereinigtes Glas, **C** planar amino-funktionalisiert, **D** planar carboxy-funktionalisiert, **E** nanostrukturiert amino-funktionalisiert, **F** nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert, **G** mikrostrukturiert amino-funktionalisiert, **H** mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 10.000fach

#### b) Fibroblasten

Bei den REM-Aufnahmen handelt es sich um Ausschnitte primärer Fibroblasten (Abbildung 54). Auf planaren und mikrostrukturierten Substraten sind unterschiedlich lange, faserförmige Strukturen am Rand der Zelle erkennbar (Abbildung 54 A-D, G+H). Im Gegensatz zu Filopodien entstehen sie nicht aus einem Lamellipodium heraus. Fibroblasten auf nanostrukturierten Oberflächen besaßen deutlich seltener diese Strukturen (Abbildung 54 E+F).



**Abbildung 54:** REM-Aufnahmen primärer Fibroblasten auf planaren, nano- oder mikrostrukturierten Substraten nach einer Kultivierung von 72 h. Es sind dünne, faserförmige Strukturen am Rand der Zellen auf planaren und mikrostrukturierten Substraten erkennbar. Oberflächen: **A** Zellkulturschale, **B** gereinigtes Glas, **C** planar amino-funktionalisiert, **D** planar carboxy-funktionalisiert, **E** nanostrukturiert amino-funktionalisiert, **F** nanostrukturiert carboxy-funktionalisiert, **G** mikrostrukturiert amino-funktionalisiert, **H** mikrostrukturiert carboxy-funktionalisiert. Vergrößerung: 10.000fach

## 4.2.2 Zelluläres Verhalten auf fibrillären Substraten

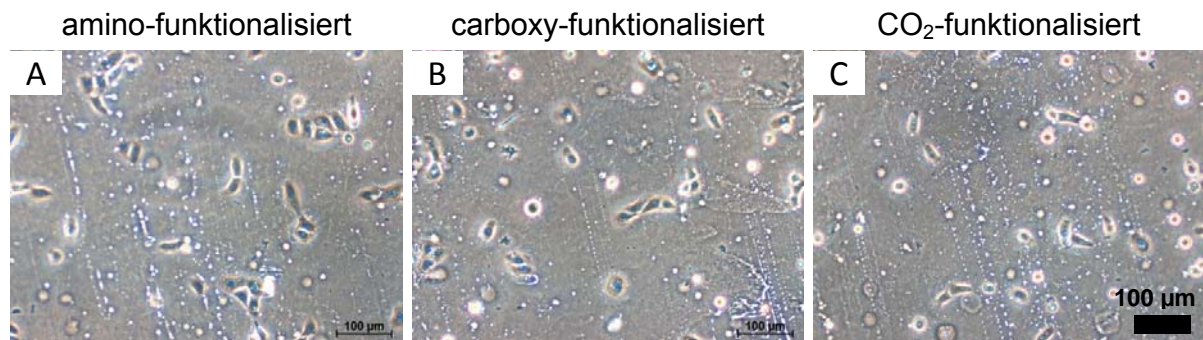
Die nachfolgenden Bilder sind so angeordnet, dass die Strukturen in den Abbildungen vertikal verlaufen.

### 4.2.2.1 Morphologie und Zell-Substrat Kontakte primärer Zellen

Die Evaluierung der Zellmorphologie primärer Keratinozyten und Fibroblasten basiert auf lichtmikroskopischen Untersuchungen nach 24 h sowie 48 h. Zur Bewertung von Zell-Substrat Kontakten dienen Aufnahmen von Fluoreszenz-Färbungen des Aktin-Cytoskeletts, des Proteins Vinculin, das bei der Ausbildung von Fokalkontakten mitwirkt und des Nucleus.

#### a) Keratinozyten

Nach 24 h Kultivierungsdauer entstanden erste Zellklone auf nicht strukturierten Substraten (Abbildung 55). Zwischen den verschiedenen Funktionalisierungen war kein Unterschied in der Anzahl adhärenter Zellen und deren Morphologie erkennbar.

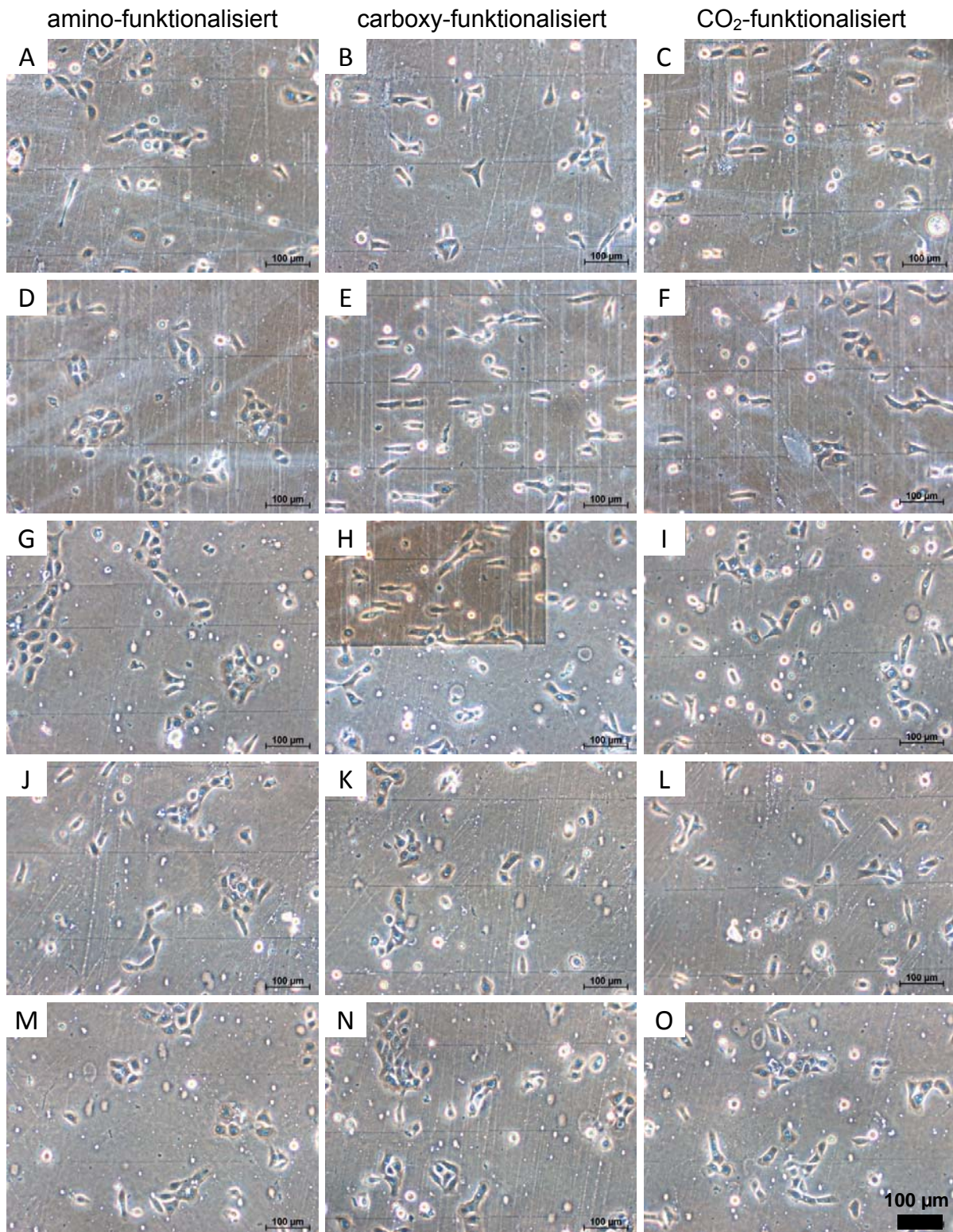


**Abbildung 55:** Keratinozyten auf unstrukturierten Substraten nach 24 h Kultivierung. Es sind erste Koloniebildungen, jedoch keine Ausrichtung zu erkennen. **A** amino-funktionalisiert, **B** carboxy-funktionalisiert sowie **C** CO<sub>2</sub>-funktionalisiert. Vergrößerung: 100fach

Eine Zusammenfassung der primären humanen Keratinozyten auf den fünf fibrillären Strukturen sowie drei verschiedenen Funktionalisierungen ist in Abbildung 56 zu sehen. Während sich auf allen Substraten erste Zellkolonien bildeten, waren deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie erkennbar. So weisen besonders die Keratinozyten in Abbildung 56 E+F senkrecht zu den fibrillären Strukturen langgestreckte Zellkörper auf. Bei derselben Strukturierung, allerdings amino-funktionalisiert sind keine langgestreckten Zellen zu beobachten. Hier besitzen die Keratinozyten ihre typisch kubische, kompakte Gestalt und bilden größere Kolonien aus (Abbildung 56 D). Weitere langgestreckte Zellen befinden sich, bis auf die Funktionalisierung mit Aminogruppen, bei Struktur 1 und weniger ausgeprägt bei Struktur 3.

Bereits nach 24 h entstanden bei Struktur 5 unabhängig von der Funktionalisierung kleine Zellkolonien (Abbildung 56 M-O). Tendenziell lagen 10-20% mehr Zellen auf den amino-funktionalisierten Substraten vor. Diese bildeten bereits Kolonien und wiesen die typisch kubische Zellform auf, wohingegen die Keratinozyten auf der carboxy- und CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung kleinere Zellkolonien und langgestreckte Einzelzellen besaßen.

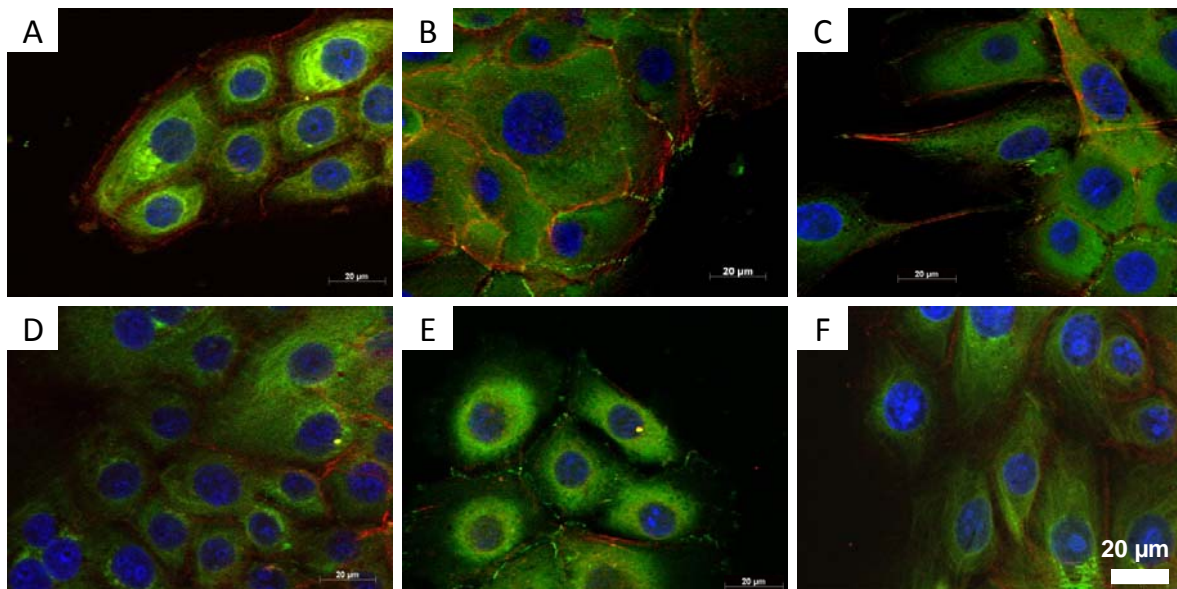




**Abbildung 56:** Primäre Keratinozyten auf fibrillären Strukturen nach 24 h Kultivierung. **A-C** auf Struktur 1 sind erste kleine Zellkolonien, **B+C** teilweise langgestreckte Zellen, senkrecht zu den Strukturen. **D-F** Struktur 2. Keratinozyten auf **D** bilden Kolonien aus kubischen Zellen, auf **E+F** viele langgestreckte Keratinozyten, meist senkrecht zu fibrillären Strukturen ausgerichtet. **G-I** Struktur 3. **G** Keratinozyten haben kubische Morphologie und bilden Kolonien. **H+I** kleine Kolonien sichtbar. Viele langgestreckte Zellen, besonders im strukturierten, braunen Bereich von **H** vgl. zu planaren angrenzenden Bereichen. **J-L** Struktur 4, keine Ausrichtung, erste Koloniebildung erkennbar. **M-O** Struktur 5, keine Anordnung, Keratinozyten bilden Kolonien. Vergrößerung: 100fach

Aktin-Fasern und das bei der Entstehung von Fokalkontakten involvierte Protein Vinculin wurden von Keratinozyten auf unstrukturierten sowie auf strukturierten Bereichen gebildet. In Abbildung 57 ist die Zellmorphologie nach Kultur auf den fünf verschiedenen strukturierten Substraten stellvertretend für alle Funktionalisierungen auf der CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung dargestellt. Neben der für Keratinozyten charakteristischen kubischen Zellform, mit meist geringem Cytoplasma-Anteil, liegen nach 48 h bereits Kolonien vor. Dabei ist Aktin verstärkt im Randbereich der Zellkörper zu beobachten und Vinculin häufig im Bereich um den Nucleus. Über punkt- oder strichförmige Fokalkontakte verfügen Keratinozyten meist am Rand, wie in Abbildung 57 B+C erkennbar.

Besonders auffallend sind die in Abbildung 57 C dargestellten, einzelnen Keratinozyten mit langgestreckter Morphologie. Die deutlich sichtbaren Aktin-Fasern liegen senkrecht zu den fibrillären Strukturen des Substrates.

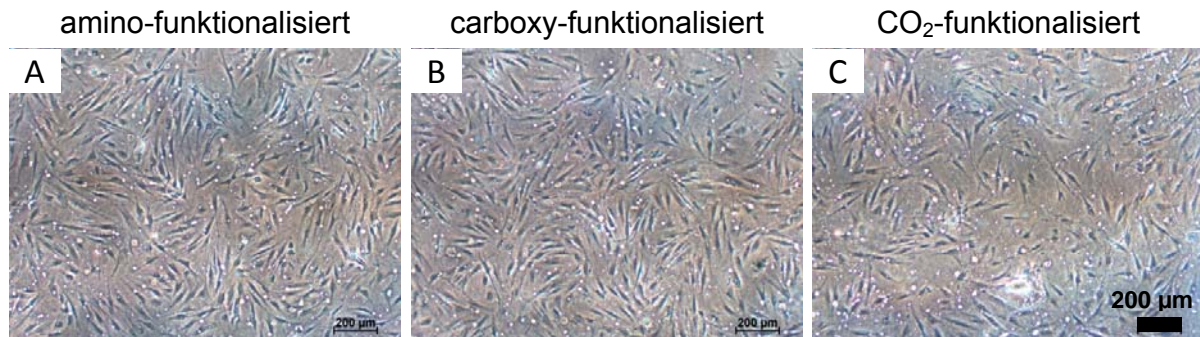


**Abbildung 57:** Morphologie primärer Keratinozyten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach 48 h Kultivierung. Fluoreszenz-Färbungen von Aktin (rot), Vinculin (grün) und dem Nucleus (blau) ermöglichen die Betrachtung des Aktin-Cytoskeletts und der Vinculin Expression. **A** Zellen auf nichtstrukturierten Bereichen, typisch kubische, kompakte Morphologie. **B** Zellkolonie auf Struktur 1, **C** Struktur 2 mit z.T. senkrecht zu den Strukturen langgestreckten Keratinozyten. **D** Zellkolonie auf Struktur 3 und **E** Struktur 4 sowie **F** auf Struktur 5. Vergrößerung: 630fach



## b) Fibroblasten

Primäre Fibroblasten wuchsen nach 24 h Kultivierungsdauer auf amino-, carboxy- sowie CO<sub>2</sub>-funktionalisierten, unstrukturierten Polystyrol-Substraten ohne erkennbare Anordnung (Abbildung 58).

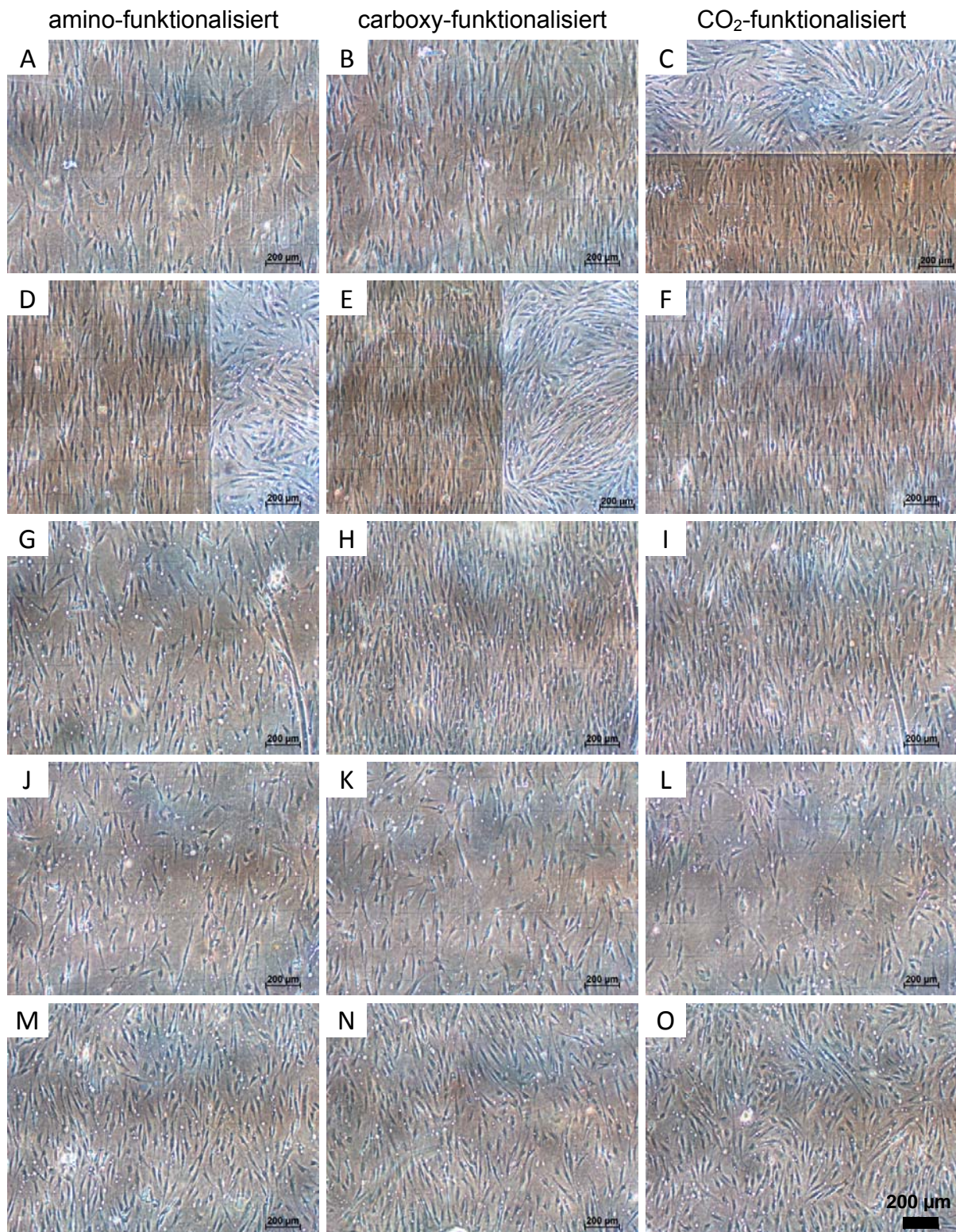


**Abbildung 58:** Primäre Fibroblasten auf unstrukturierten Polystyrol-Substraten nach einer Kultivierung von 24 h. Es ist kein gerichtetes Wachstum der Zellen erkennbar. **A** amino-funktionalisiert, **B** carboxy-funktionalisiert sowie **C** CO<sub>2</sub>-funktionalisiert. Vergrößerung: 40fach

Auf den fibrillären Strukturen war eine deutliche Ausrichtung der Fibroblasten parallel zu den Rillen zu sehen. In Abbildung 59 sind lichtmikroskopische Bilder von Fibroblasten auf den fünf verschiedenen Strukturierungen sowie den drei verschiedenen Funktionalisierungen gezeigt. Die Stärke der Ausrichtung der Zellen schwankt. Auf den ersten drei fibrillären Strukturen wachsen die Fibroblasten deutlich entlang der Rillen (Abbildung 59 A-I). Diese Ausrichtung nimmt bei den letzten zwei Strukturierungen deutlich ab (Abbildung 59 J-O).

Zusätzlich hervorgehoben wird dieses gerichtete Wachstum in Abbildung 59 C-E, indem der braun erscheinende Randbereich strukturierter Felder neben unstrukturierter Bereichen mit nichtgeordnetem Wachstum zu sehen ist. Lediglich eine schwache Ausrichtung zeigen Fibroblasten auf den fibrillären Strukturen 4 und 5, wobei bei Feld 4 zudem die geringe Zellzahl auffällt (Abbildung 59 J-O). Beim Vergleich der verschiedenen Funktionalisierungen ist eine ca. 20% geringere Anzahl an Fibroblasten auf den amino-funktionalisierten Substraten auszumachen.

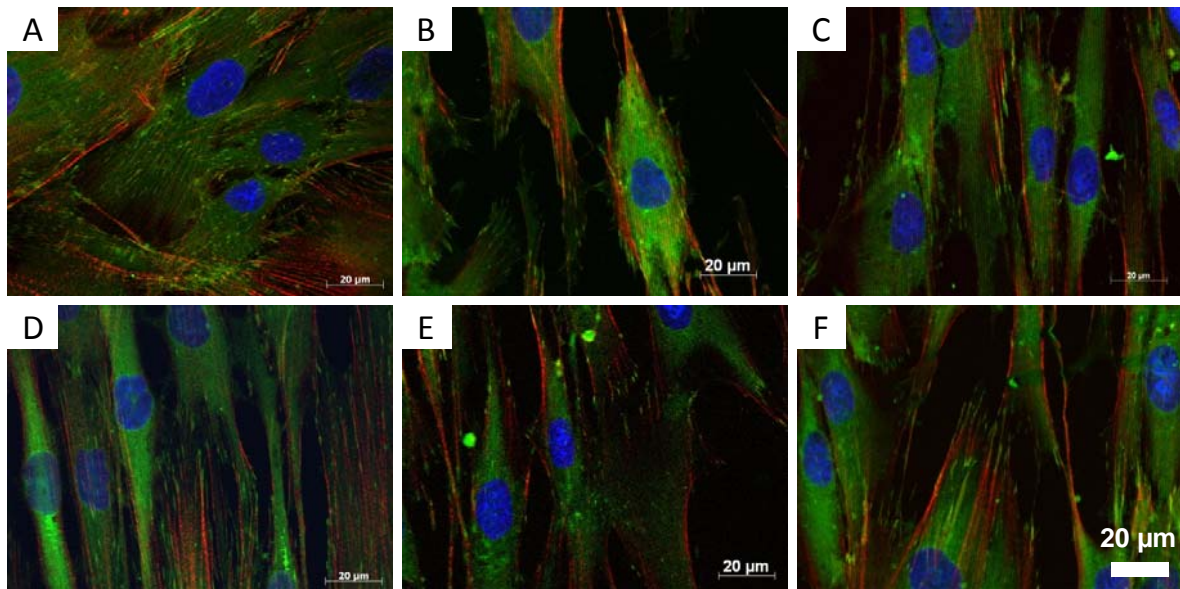




**Abbildung 59:** Fibroblasten auf fibrillären Strukturen nach einer Kultivierung von 24 h. **A-C** Struktur 1, es ist eine deutliche Ausrichtung der Zellen parallel der Rillen zu sehen. Bei **C** ist zudem der Übergang vom strukturierten braunen zum unstrukturierten Bereich gezeigt. **D-F** Struktur 2, die Fibroblasten wachsen gerichtet. In **D+E** sind Randbereiche der strukturierten braunen zu den unstrukturierten Feldern dargestellt. **G-I** Struktur 3, ausgeprägte parallele Anordnung der Zellen, in **G** geringere Zellzahl als auf **H+I**. **J-L** Struktur 4, mäßige Ausrichtung und verhältnismäßig niedrige Zellzahl erkennbar. **M-O** Struktur 5, schwache Anordnung und hohe Anzahl an Fibroblasten zu sehen. Vergrößerung: 40fach



Die Evaluierung der Zell-Substrat Kontakte erfolgte anhand von Fluoreszenz-Färbungen des Aktin-Cytoskeletts, des Proteins Vinculin, das an der Bildung von Fokalkontakten beteiligt ist und des Nucleus. Sowohl auf unstrukturierten als auch auf strukturierten Bereichen zeigte sich eine deutliche Ausbildung von Aktin-Fasern sowie Vinculin. Bis auf leichte Schwankung der Zellzahl ließen sich keine Unterschiede zwischen amino-, carboxy- und CO<sub>2</sub>-funktionalisierten Oberflächen feststellen. In Abbildung 60 ist die Zellmorphologie auf den überprüften Strukturen stellvertretend mit der CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung dargestellt. Bei Abbildung 60 A handelt es sich um einen unstrukturierten Bereich, auf dem die Fibroblasten diffus wachsen. Im Gegensatz dazu ist auf den anderen Bildern (Abbildung 60 B-F) eine teilweise stark ausgeprägte parallele Anordnung der Zellen sichtbar. Hervorzuheben ist auch die gerichtete Struktur der Aktin-Fasern, insbesondere bei den fibrillären Strukturen 1, 2 und 3 analog zu den Zellen. In Abbildung 60 D richten sich sogar die strichförmigen Fokalkontakte zum Teil entlang der Strukturen aus.



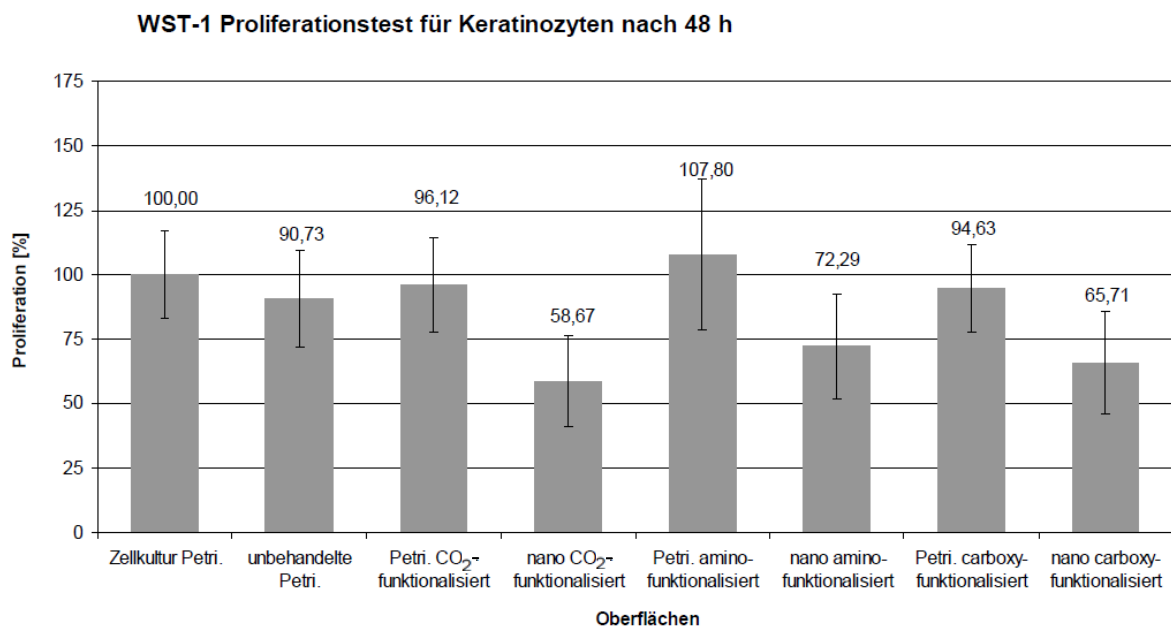
**Abbildung 60:** Morphologie primärer Fibroblasten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach 48 h Kultivierung. Durch Fluoreszenz-Färbungen von Aktin (rot), Vinculin (grün) und dem Nucleus (blau) ist die Ausbildung des Aktin-Cytoskeletts und zahlreicher Fokalkontakte zu sehen. **A** Fibroblasten auf nichtstrukturierten Bereichen, **B** ausgerichtete Zellen auf Struktur 1, **C** Struktur 2 mit parallel wachsenden Fibroblasten, **D** Zellen ordnen sich deutlich entlang der Rillen auf Struktur 3 an, **E** weniger starke Ausrichtung der Fibroblasten auf Struktur 4 und **F** auf Struktur 5. Vergrößerung: 630fach

#### 4.2.2.2 WST-1 Proliferationstest

Bei den Proliferationstests primärer Zellen auf fibrillären Strukturen dienten kommerzielle Zellkultur Petrischalen, unbehandelte Petrischalen und parallel zu den strukturierten Platten funktionalisierte Petrischalen als Referenzen. Die gemessenen WST-Werte der Zellkultur Petrischale wurden auf 100% gesetzt.

### a) Keratinozyten

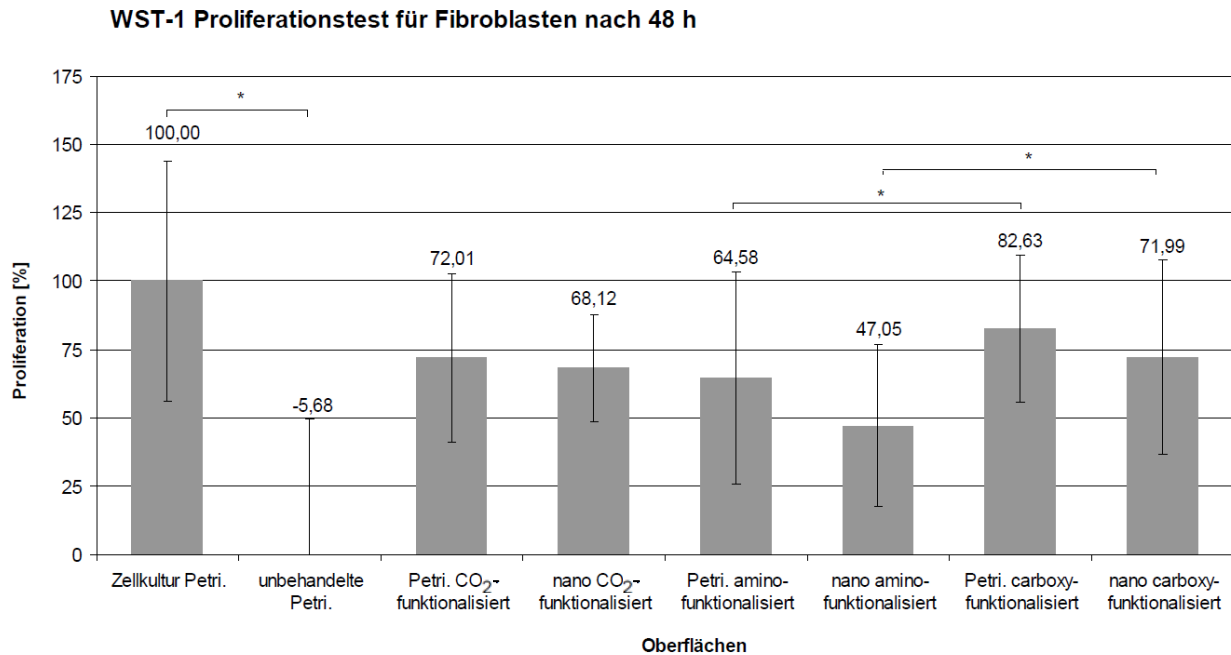
Die in Abbildung 61 zusammengefassten Ergebnisse basieren auf Proliferationstests primärer Keratinozyten auf modifizierten Substraten, wobei die höchsten ermittelten Werte von Zellen auf amino-funktionalisierten Petrischalen stammten. Bei der gleichen Funktionalisierung lagen die Ergebnisse der nanostrukturierten Plättchen stets unter denen der unstrukturierten Petrischalen. Ähnliche Werte ergaben sich für die Proliferation auf CO<sub>2</sub>- und carboxy-funktionalisierten Oberflächen. Im Vergleich zu Werten auf den entsprechenden amino-modifizierten Substraten wiesen Keratinozyten auf carboxy- oder CO<sub>2</sub>-funktionalisierten Oberflächen eine geringere Proliferation auf. Die Proliferation auf unbehandelten Petrischalen lag über 90%.



**Abbildung 61:** WST-1 Proliferationstest von Keratinozyten nach 48 h Kultivierung auf modifizierten Oberflächen. Die Werte für Zellkultursubstrate wurden auf 100% gesetzt. Amino-funktionalisierte Substrate wiesen im Vergleich zu carboxy- oder CO<sub>2</sub>-modifizierten Substraten der gleichen Strukturierung die höchsten Messergebnisse auf. Die Strukturierung führte zu geringeren Werten für die Proliferation als die jeweiligen planaren Substrate.

### b) Fibroblasten

Die Ergebnisse des WST-1 Proliferationstests primärer Fibroblasten sind in Abbildung 62 dargestellt. Dabei wurden die Werte der Zellproliferation auf kommerziellen Zellkultur Petrischalen auf 100% gesetzt. Keine Proliferation war auf unbehandelten Petrischalen zu messen. Für die plasmabehandelten Substrate zeigte sich tendenziell eine Abnahme der Messergebnisse der strukturierten gegenüber den planaren Oberflächen. Die Proliferation primärer Fibroblasten auf carboxy-funktionalisierten Substraten lag über den ermittelten Werten der anderen modifizierten Polystyrol-Oberflächen.



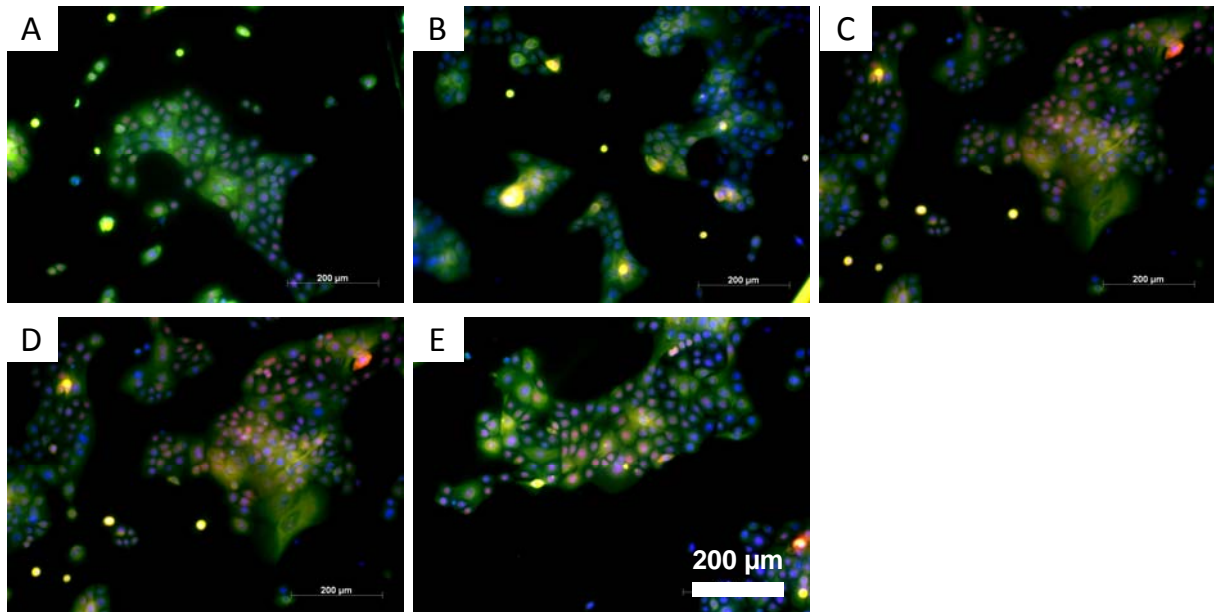
**Abbildung 62:** WST-1 Proliferationstest primärer Fibroblasten nach 48 h Kultivierung auf modifizierten Oberflächen. Die Ergebnisse für Zellkultursubstrate wurden auf 100% gesetzt. Carboxy-funktionalisierte Substrate wiesen im Vergleich zu amino- oder CO<sub>2</sub>-modifizierten Substraten der gleichen Strukturierung die höchsten Messergebnisse auf. Durch die Strukturierung kam es zu einer Abnahme der Proliferation im Vergleich zu den jeweiligen planaren Substraten.

#### 4.2.2.3 Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen

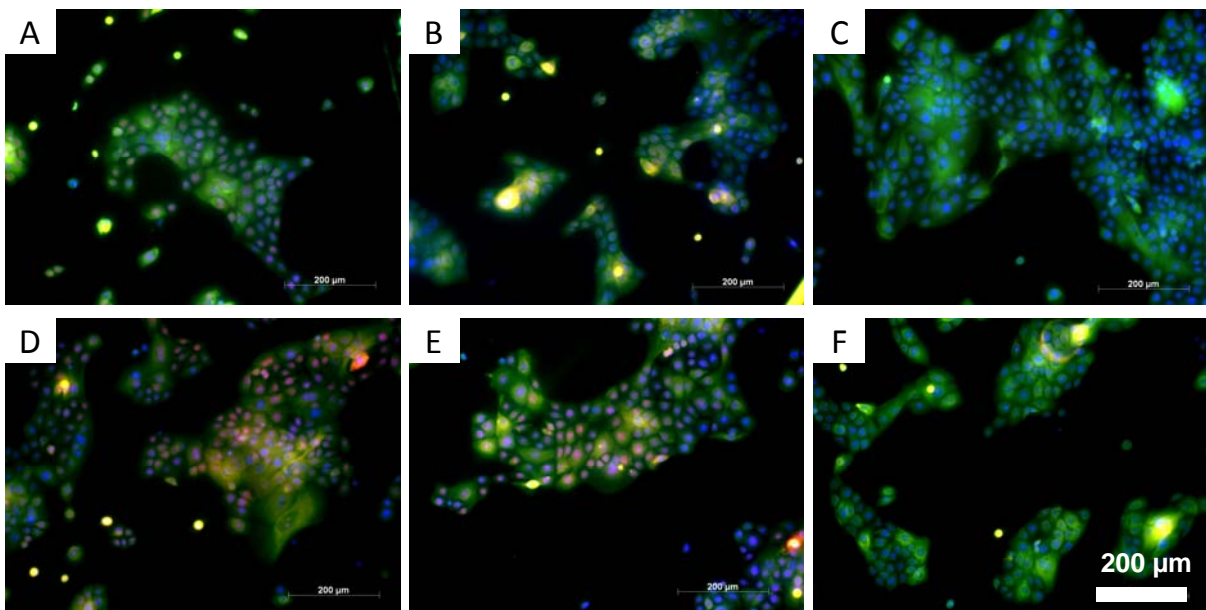
Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen wurden anhand immunhistochemischer Färbungen untersucht. Die Expression des in basalen Keratinozyten vorkommenden Cytokeratin 14 und des Transkriptionsfaktors p63 dienen als Differenzierungsmerkmale. Bei primären Fibroblasten ließ sich über Färbung die Produktion des extrazellulären Matrixproteins Kollagen Typ I nachweisen.

##### a) Keratinozyten

Färbung von Cytokeratin 14 (grün), p63 (rot) und der Zellkerne (blau) primärer Keratinozyten auf verschiedenen funktionalisierten (Abbildung 63) oder fibrillär strukturierten Substraten (Abbildung 64) ergaben keine eindeutigen Unterschiede. Auf den untersuchten Oberflächen waren nahezu alle Zellen als Cytokeratin 14 positiv. Es lag eine unregelmäßige Expression von p63 vor, wobei sich keine erkennbaren Differenzen auf den verschiedenen Funktionalisierungen zeigten (Abbildung 63). Bei Keratinozyten auf den fibrillären Substraten hingegen, erschien die Expression von p63 leicht reduziert (Abbildung 64).



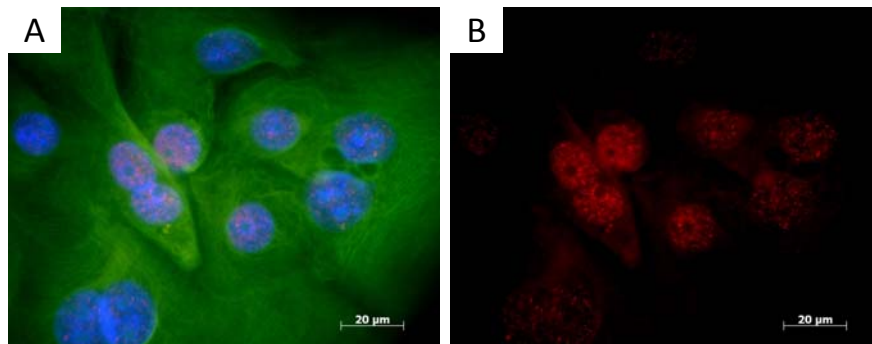
**Abbildung 63:** Differenzierung primärer Keratinozyten auf unstrukturierten, plasmabehandelten Substraten nach einer Kultivierung von 48 h. Es sind Fluoreszenz-Färbungen von p63 (rot), Cytokeratin 14 (grün) und dem Nucleus (blau) gezeigt. Auf allen Substraten exprimieren die Keratinozyten Cytokeratin 14. Es ist kein eindeutiger Unterschied in der Anzahl p63 positiver Zellen auf den verschiedenen Funktionalisierungen zu identifizieren. Oberflächen: **A** Zellkultur Petrischale, **B** unbehandelte Petrischale, **C** CO<sub>2</sub>-funktionalisierte Petrischale, **D** carboxy-modifizierte Petrischale, **E** aminofunktionalisierte Petrischalen. Vergrößerung: 200fach



**Abbildung 64:** Differenzierung primärer Keratinozyten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach einer Kultivierung von 48 h. Es sind Fluoreszenz-Färbungen von p63 (rot), Cytokeratin 14 (grün) und dem Nucleus (blau) gezeigt. Auf allen Substraten exprimieren die Keratinozyten Cytokeratin 14. Es ist kein eindeutiger Unterschied in der Anzahl p63 positiver Zellen auf den verschiedenen Strukturen zu identifizieren. Oberflächen: **A** nichtstrukturiert, **B** Struktur 1, **C** Struktur 2, **D** Struktur 3, **E** Struktur 4 sowie **F** Struktur 5. Vergrößerung: 100fach



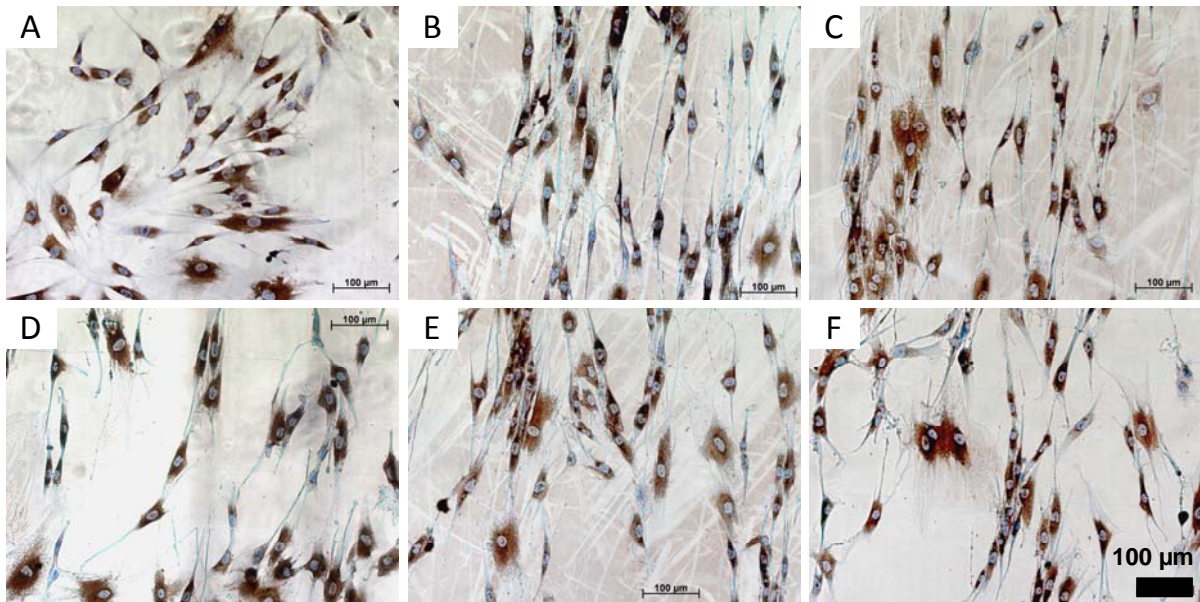
Der Transkriptionsfaktor p63 liegt granulär im Nucleus der Keratinozyten vor, wohingegen Cytokeratin 14, als Intermediärfilament den kompletten Zellkörper ausfüllt (Abbildung 65).



**Abbildung 65:** Detailansicht Cytokeratin 14 und p63 positiver Zellen. **A** Die gezeigten Keratinozyten exprimieren Cytokeratin 14 (grün) und besitzen im Nucleus (blau) p63 (rot). Oberfläche: amino-funktionalisiert, planar **B** Einzelansicht des Rotkanals, p63 ist granulär im Nucleus erkennbar. Vergrößerung: 1000fach

#### b) Fibroblasten

Nahezu alle adhärenenten Zellen, die auf den in Abbildung 66 dargestellten Substraten 48 h kultiviert wurden, produzieren Kollagen Typ I (braun). Die Zellkörper der Fibroblasten auf den fibrillären Strukturen 1, 2 und 3 sind zum Großteil senkrecht ausgerichtet (Abbildung 66 B-D). Auf den Strukturen 4 und 5 hingegen nimmt diese Anordnung deutlich ab (Abbildung 66 E-F). Nur sehr vereinzelt sind Fibroblasten zu erkennen, die kein oder nur sehr wenig Kollagen Typ I produzieren. Meist haben diese Zellen eine dünne, spindelförmige Morphologie. Besonders stark gefärbt sind Fibroblasten, die einen ausgespreiteten, großen Zellkörper mit einigen Fortsätzen besitzen.



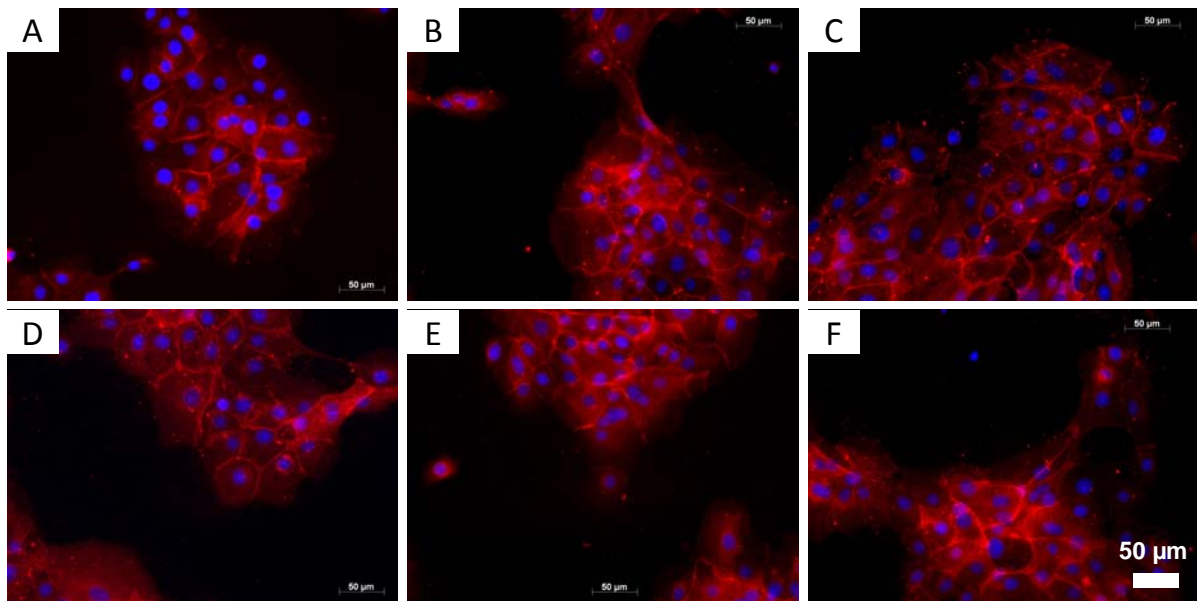
**Abbildung 66:** Produktion von Kollagen Typ I primärer Fibroblasten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach einer Kultivierung von 48 h. Die meisten Zellen produzieren Kollagen Typ I (braun). Vereinzelt sind Fibroblasten zu erkennen, die kein Kollagen produzieren und spindelförmige, kleine Zellkörper besitzen. Oberflächen: **A** nichtstrukturierter Bereich, **B** Struktur 1, **C** Struktur 2, **D** Struktur 3, **E** Struktur 4 sowie **F** Struktur 5. Vergrößerung: 100fach

#### 4.2.2.4 Zell-Zell Kontakte

Zellen kommunizieren über Zell-Zell Kontakte, die besonders ausgeprägt bei Epithelgewebe vorliegen. Für Keratinozyten ist die Expression des Proteins E-Cadherin charakteristisch, das in Adherence Junctions vorkommt. Bei Fibroblasten wurde eine Färbung gegen alle Cadherine durchgeführt.

##### a) Keratinozyten

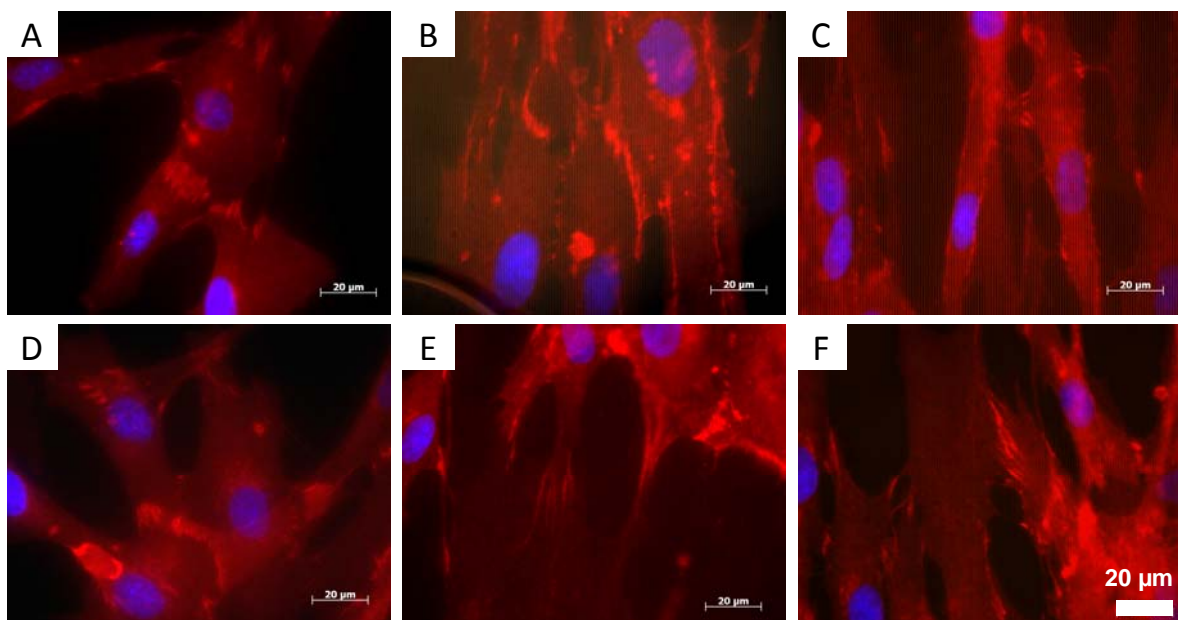
Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen der E-Cadherin-Expression (rot) primärer Keratinozyten auf unterschiedlichen Substraten sind in Abbildung 67 zusammengestellt. Eine deutliche Ausbildung von E-Cadherin zeigte sich für die adhärenten Zellen auf allen Oberflächen. Das Protein kommt verstärkt an den Kontaktflächen zwischen den Zellkörpern vor, wohingegen Keratinozyten am Kolonierand deutlich weniger gefärbt sind. Einflüsse der Strukturierung auf einzelne Zellen oder Zellkolonien waren nicht erkennbar.



**Abbildung 67:** Zell-Zell Kontakte primärer Keratinozyten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach 48 h Kultivierung. E-Cadherin ist rot angefärbt, der Nucleus blau. Auf allen Substraten ist eine deutliche Ausbildung von E-Cadherin, insbesondere zwischen den Zellkörpern zu sehen. Am Rand der Kolonien fällt die E-Cadherin-Expression geringer aus. Oberflächen: **A** nichtstrukturiert, **B** Struktur 1, **C** Struktur 2, **D** Struktur 3, **E** Struktur 4 sowie **F** Struktur 5. Vergrößerung: 200fach

#### b) Fibroblasten

Fibroblasten auf allen Substraten exprimieren Cadherine (Abbildung 68). In Abbildung 68 B+C ist die Ausrichtung der Zellen deutlich zu erkennen.



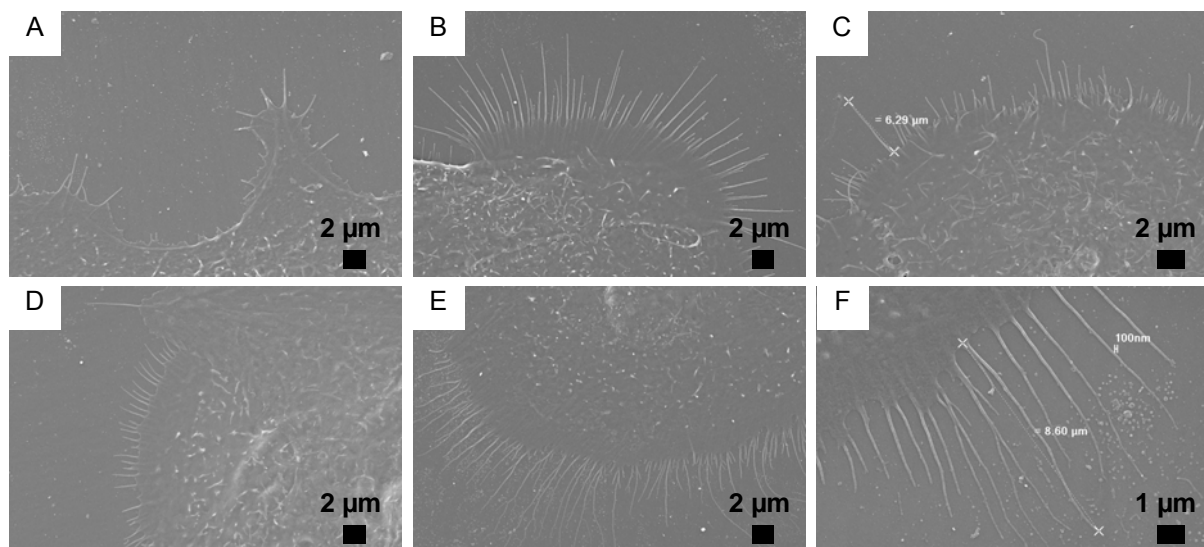
**Abbildung 68:** Zell-Zell Kontakte primärer Fibroblasten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach einer Kultivierung von 48 h. Auf allen Substraten werden Cadherine (rot) gebildet, der Nucleus ist blau angefärbt. Oberflächen: **A** nichtstrukturiert, **B** Struktur 1, **C** Struktur 2, **D** Struktur 3, **E** Struktur 4 sowie **F** Struktur 5. Vergrößerung: 1000fach

#### 4.2.2.5 REM-Aufnahmen

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichen eine genaue Betrachtung von Zell-Substrat-Wechselwirkungen einzelner Zellen. Neben Cytoplasmaausstülpungen, wie Filopodien wurden die Interaktionen des Zellkörpers mit fibrillären Oberflächen betrachtet.

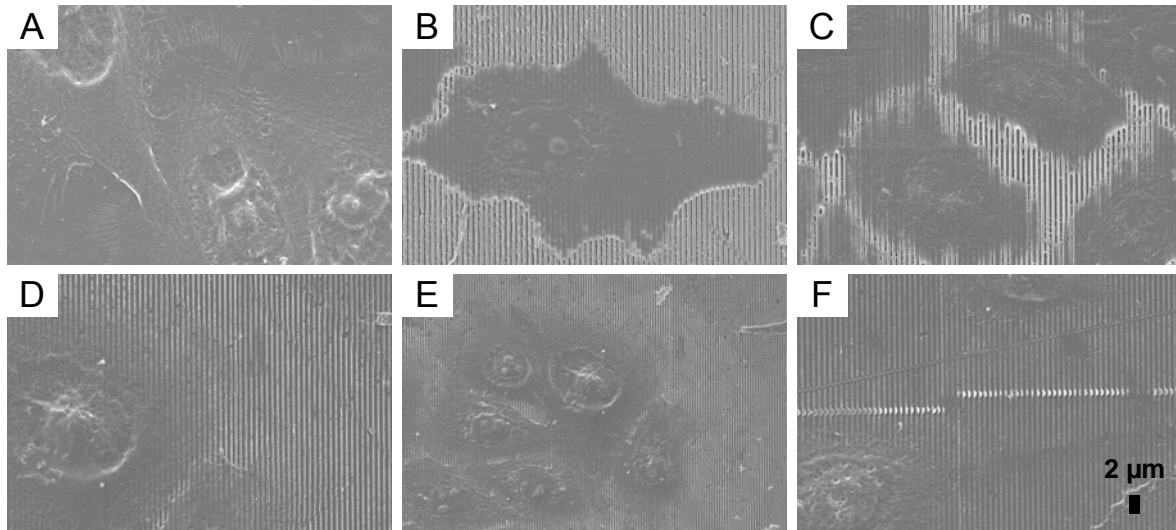
##### a) Keratinozyten

Zur Überprüfung des Einflusses der Funktionalisierung auf die Bildung von Filopodien sind in Abbildung 69 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen primärer Keratinozyten auf verschiedenen modifizierten, unstrukturierten Substraten zu sehen. Dabei fällt besonders die kommerzielle Zellkultur Petrischale auf, da Keratinozyten auf dieser Oberfläche nur einzelne Filopodien aufweisen (Abbildung 69 A). Auf unbehandelten Polystyrol Petrischalen hingegen liegen viele dieser Cytoplasmaausstülpungen am Rand des saumartigen Lamellipodiums in regelmäßiger Anordnung vor (Abbildung 69 B). Bei Keratinozyten auf den CO<sub>2</sub>- und carboxy-modifizierten Polystyrol Petrischalen ist die Ausbildung von Filopodien deutlich erkennbar (Abbildung 69 C+D), allerdings ordnen sie sich auf den CO<sub>2</sub>-funktionalisierten Substraten weniger regelmäßig an. Adhärente Zellen auf amino-modifiziertem Polystyrol besitzen zahlreiche, auffällig lange Filopodien (Abbildung 69 E). Es stellt sich heraus, dass viele dieser Strukturen auf amino-funktionalisierten Oberflächen Verzweigungen haben (Abbildung 69 F).



**Abbildung 69:** REM-Aufnahmen primärer Keratinozyten auf unstrukturierten, verschieden funktionalisierten Substraten nach 48 h Kultivierung. Einzelne Filopodien liegen auf der Zellkultur Petrischale **A** vor, während auf der unbehandelten Petrischale **B** lange und regelmäßig ausgebildete Filopodien zu sehen sind. Zellen auf CO<sub>2</sub>-funktionalisierten Substraten **C** bilden unregelmäßige Filopodien aus. Deutlich regelmäßiger sind die Filopodien auf carboxy- **D** oder amino-modifizierten Oberflächen **E+F**, wobei dort besonders lange und z.T. verzweigte Filopodien vorkommen. Oberflächen: **A** Zellkultur Petrischale, **B** unbehandelte Petrischale, **C** CO<sub>2</sub>-funktionalisierte Petrischale, **D** carboxy-modifizierte Petrischale, **E+F** amino-funktionalisierte Petrischalen. Vergrößerung: **A-E** 10.000fach, **F** 15.000fach

In Abbildung 70 sind Aufnahmen von Keratinozyten auf fibrillären Strukturen dargestellt. Unterschiede zwischen Zellen auf den einzelnen Topografien basieren auf der Ausbildung von Filopodien. Diese Cytoplasmaausstülpungen sind deutlich bei Zellen auf unstrukturierten Bereichen (Abbildung 70 A) und auf den Strukturen 3, 4 und 5 (Abbildung 70 D-F) erkennbar. Keratinozyten auf Struktur 1 hingegen haben wesentlich weniger Filopodien (Abbildung 70 B) und auf Struktur 2 sind sie nur ganz vereinzelt nachweisbar (Abbildung 70 C).

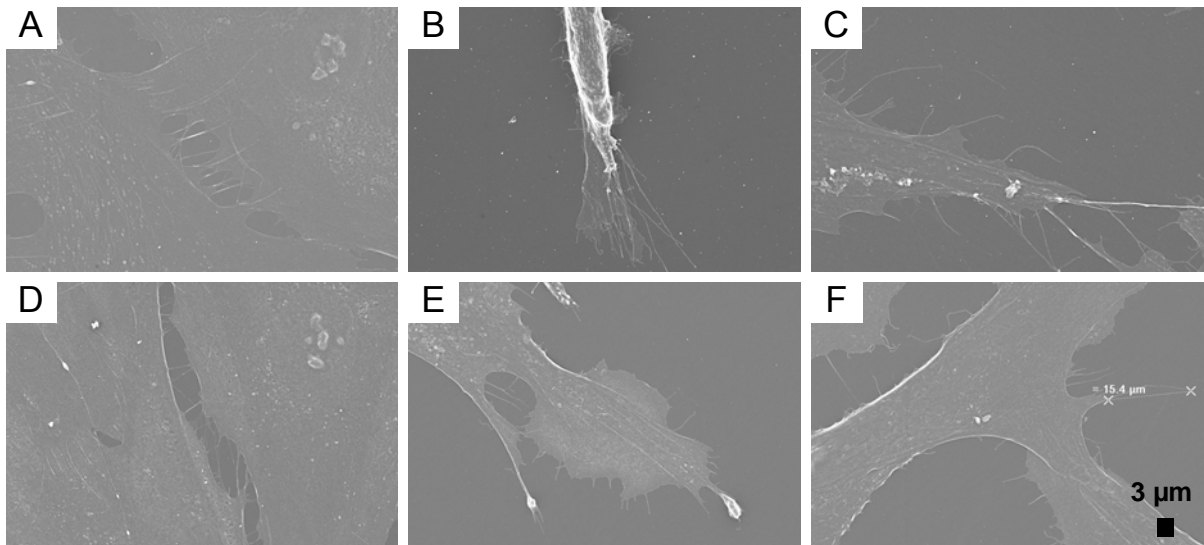


**Abbildung 70:** REM-Aufnahmen primärer Keratinozyten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach einer Kultivierung von 48 h. Auf nichtstrukturierten Bereichen **A** ist die Ausbildung von Filopodien zu sehen. Diese Cytoplasmaausstülpungen liegen zudem auf den Strukturen 3, 4 und 5 vor **D-G**. Adhärenente Keratinozyten auf Struktur 1 **C** verfügen über deutlich weniger Filopodien. Auf Struktur 2 **G** scheinen die Zellen keine oder nur sehr vereinzelt Filopodien auszubilden. Oberflächen: **A** nichtstrukturiert, **B** Struktur 1, **C** Struktur 2, **D** Struktur 3, **E** Struktur 4 sowie **F** Struktur 5. Vergrößerung: 10.000fach

## b) Fibroblasten

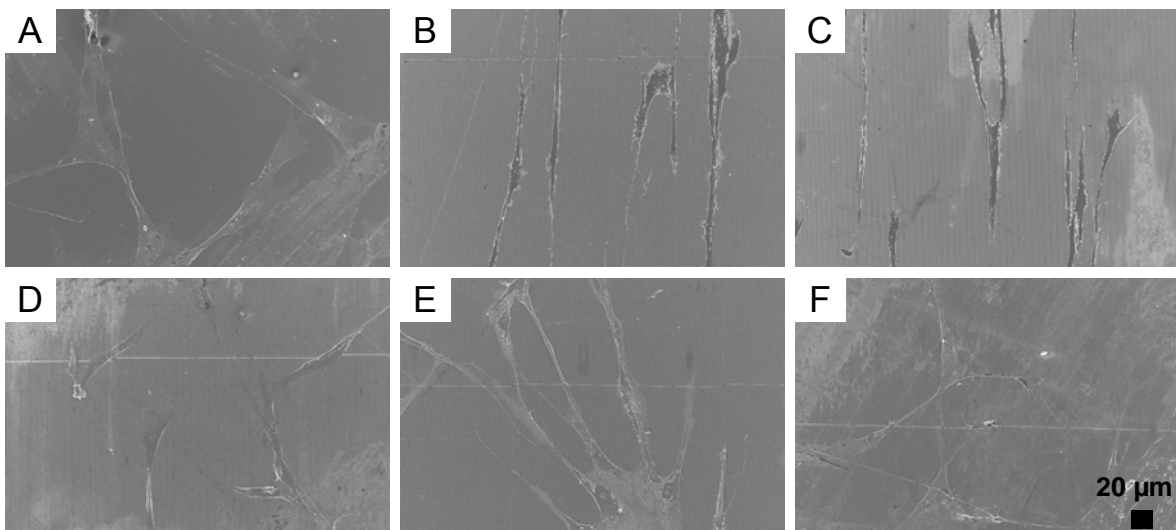
Fibroblasten wurden auf Polystyrol-Petrischalen mit unterschiedlichen Plasma-behandlungen kultiviert und anschließend rasterelektronenmikroskopisch betrachtet (Abbildung 71). Dabei zeigten sich filopodienartige Strukturen auf allen Substraten. Teilweise waren diese Cytoplasmaausstülpungen auch zu benachbarten Zellen gerichtet (Abbildung 71 A+D). Oftmals handelte es sich auch um Retraktionsspuren, die die Zellen bei der Migration hinterlassen (Abbildung 71 B). Für die verschiedenen funktionalisierten Substrate waren keine spezifischen Morphologieunterschiede auszumachen. Nur auf unbehandeltem Polystyrol lagen keine Zellen vor oder nur in abgekugelter Form (Abbildung 71 D).





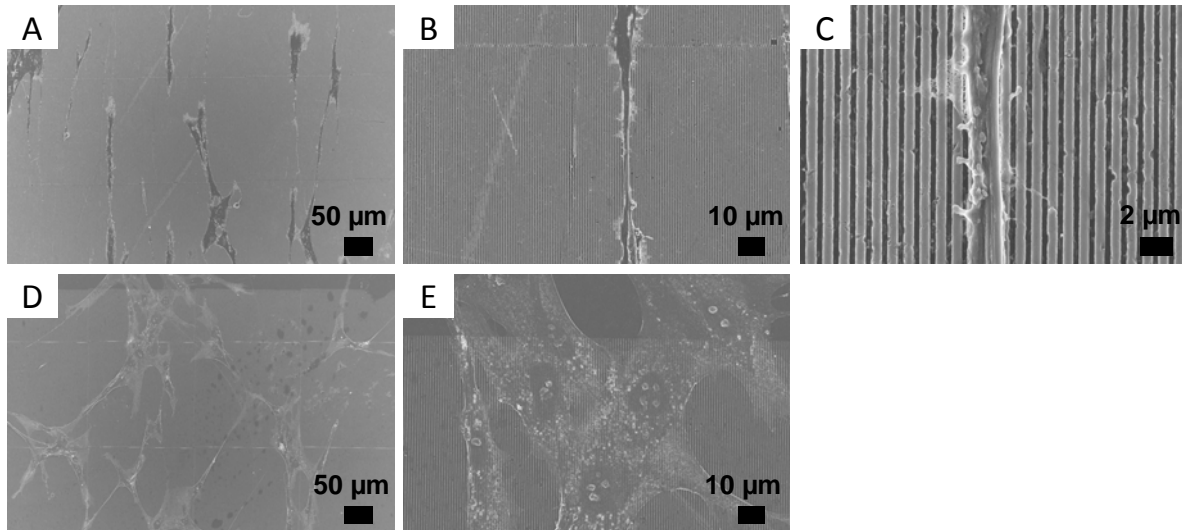
**Abbildung 71:** REM-Aufnahmen primärer Fibroblasten auf unstrukturierten Substraten mit unterschiedlichen Funktionalisierungen nach 48 h Kultivierung. Auf allen Substraten bilden die Zellen z.T. sehr lange filopodienähnliche Strukturen aus, die teilweise auch zu benachbarten Zellen gerichtet sind. Zudem hinterlassen die Fibroblasten Retraktionspuren. Auf unbehandelten Petrischalen **B** wurde lediglich eine Zelle gefunden. Oberflächen: **A** Zellkultur Petrischale, **B** unbehandelte Petrischale, **C** CO<sub>2</sub>-funktionalisierte Petrischale, **D** carboxy-modifizierte Petrischale, **E+F** amino-funktionalisierte Petrischalen. Vergrößerung: 5.000fach

In Abbildung 72 sind REM-Aufnahmen von Fibroblasten auf fibrillären Oberflächen zusammengestellt. Während die Zellen auf Struktur 1, 2 und 3 eine langgestreckte, zum Teil deutlich ausgerichtete Morphologie aufweisen (Abbildung 72 B-D), nimmt diese parallele Anordnung bei Struktur 4 und 5 sichtlich ab (Abbildung 72 F+G).



**Abbildung 72:** REM-Aufnahmen primärer Fibroblasten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach 48 h Kultivierung. Es ist deutlich die Anordnung der Zellen auf den Strukturen 1- 3 **B-D** zu erkennen, dies nimmt auf den Strukturen 4 und 5 **F+G** deutlich ab. **A** nichtstrukturierte Bereiche, **B** Struktur 1, **C** Struktur 2, **D** Struktur 3, **E** Struktur 4 und **F** Struktur 5. Vergrößerung: 1000fach

Zur Veranschaulichung der Ausrichtung primärer Fibroblasten dient die Gegenüberstellung parallel wachsender Zellen sowie nicht angeordneter Zellen (Abbildung 73). Bei genauerer Betrachtung von Fibroblasten auf Struktur 2 zeigt sich die relativ präzise Anordnung der Zelle an der Strukturierung (Abbildung 73 A-C). Zudem besitzen die Fibroblasten eine schmale langgestreckte Morphologie. Die Zellen auf Struktur 5 hingegen orientieren sich kaum an der Oberflächen-Topografie und besitzen großflächige Zellkörper mit deutlich erkennbaren Zellkernen (Abbildung 73 D+E).



**Abbildung 73:** Gegenüberstellung von REM-Aufnahmen ausgerichteter und nicht angeordneter, primärer Fibroblasten auf fibrillären Substraten mit CO<sub>2</sub>-Funktionalisierung nach 48 h Kultivierung. **A-C** Vergrößerung von langgestreckten Zellen auf Struktur 2, die sich deutlich entlang der Nanorillen orientieren. **D+E** Fibroblasten auf Struktur 5 sind ausgespreitet und verzweigt, eine Anordnung ist nicht zu erkennen. Vergrößerung: **A+D** 500fach, **B+E** 2.500fach, **C** 15.000fach

## 5. Diskussion

In der Biomaterialforschung gewinnt die Identifizierung und Charakterisierung von Zell-Material-Wechselwirkungen zunehmend an Bedeutung. Nachdem in den ersten Generationen von Biomaterialien hauptsächlich inerte Werkstoffe verarbeitet wurden, liegt heute der Schwerpunkt auf Materialien, die direkt die Zellantwort *in vivo* stimulieren [5]. Diese Entwicklung geht mit dem Fortschritt und den noch ungelösten Herausforderungen im Bereich Tissue Engineering einher [124]. Oft stellt sich hier die Kultivierung primärer Zellen als problematisch dar. Die Isolation dieser Zellen erfolgt direkt aus dem Gewebe und bedeutet das Herauslösen der Zelle aus ihrer gewohnten Mikroumgebung mit zahlreichen Reizen [125]. Zur Anzucht und Vermehrung werden die vereinzelt primären Zellen anschließend in Nährlösung in Polystyrol-Gefäße gegeben. Bei dieser Kultivierungsart bleibt der Großteil der zelltypspezifischen *in vivo* Stimuli unberücksichtigt [19]. Lediglich die Zusammensetzung des Zellkulturmediums, z.B. mit geweberlevanten Wachstumsfaktoren oder Hormonen, ist an den entsprechenden Zelltyp angepasst. Für einzelne Zelltypen zeigt die Kultivierung mit spezifischem Zellkulturmedium gute Resultate bezüglich der Proliferation und Funktionalität der Zellen. Besonders bei sehr anspruchsvollen primären Zellen wie adulten Stammzellen reicht diese einseitige Stimulierung zur Langzeitkultivierung und gleichzeitiger Aufrechterhaltung zelltypspezifischer Funktionen nicht aus [126, 127]. Aus diesem Grund rücken neben der Zugabe löslicher Faktoren zunehmend weitere Stimuli für die funktionelle Kultivierung primärer Zellen in den Fokus. Dabei stellen sich bioinspirierte und biomimetische Vorgehensweisen, also der intelligente Nachbau natürlicher Konzepte, als besonders vielversprechend heraus [128]. So ist die Kultivierung von Knorpel- oder Muskelzellen unter mechanischer Stimulierung besonders erfolgreich [129]. Bei Endothelzellen zeigte sich eine Kultivierung unter pulsatischen Bedingungen, zur Nachahmung des Blutdrucks, als erfolgreicher Ansatz zur Induktion oder Aufrechterhaltung zelltypspezifischer Funktionen [130].

Neben diesen Optimierungen der Kultivierungsbedingungen steigt auch das Interesse an dem Zellkultursubstrat selbst. Dieses entspricht im Normalfall nicht dem Substrat der Zellen *in vivo*. Im Körper bildet die extrazelluläre Matrix (ECM) vielfältige Gerüstmaterialien und Formen aus, in und auf denen gewebespezifische Zellen adhären [48]. Zur Verdeutlichung des Spektrums an unterschiedlichen ECMs sei hier die harte, poröse Knochenmatrix der elastischen, gelartigen Dermis der Haut gegenübergestellt. Diese Extreme erlauben einen Einblick in das Zusammenspiel zwischen ECM und Zellen sowie die Komplexität der Aufrechterhaltung zelltypspezifischer Eigenschaften *in vivo* [131]. So steuert die ECM mit ihren vielfältigen, gewebeabhängigen Materialeigenschaften wie z.B. Topografie, Rauheit, Elastizität, elektrische Ladung, Benetzbarkeit und chemische Zusammensetzung entscheidende Eigenschaften der Zelle [132]. Die Zelle wiederum kann zu einem gewissen Grad die ECM auf-, ab- und umbauen, es herrscht ein Fließgleichgewicht [133].



Nach dieser Betrachtung des “Substrates *in vivo*“ ist offensichtlich, dass eine Nachbildung der zelltypspezifischen ECM nicht trivial ist [134-136]. Dementsprechend beschäftigen sich aktuelle Forschungsansätze zur Optimierung der Kulturoberfläche meist mit ausgewählten Materialeigenschaften [137]. Ergebnisse der letzten Jahre verdeutlichen, dass auch diese vereinfachten, ECM nachahmenden Materialien die Zellen beeinflussen [138-140]. Discher et al. zeigten 2005 wie verschiedene Elastizitäten des Substrates die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beeinflussen können [32]. Für Osteoblasten sind vielfältige Studien veröffentlicht, die ein bevorzugtes Wachstum des Zelltyps auf rauen Oberflächen beschreiben [31, 141]. Solche Ergebnisse sind sowohl für die Kultivierung dieser Zellen als auch für die Optimierung geeigneter Implantatoberflächen ausgesprochen wichtig.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss ausgewählter Materialeigenschaften der ECM auf primäre humane Hautzellen untersucht. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Herstellung und Evaluierung der Oberflächen-Topografie. Die zwei Grundformen – globulär und fibrillär – waren an die Geometrie extrazellulärer Matrixproteine angelehnt [49]. Zudem erfolgte eine Variation der Strukturgrößen, um verschiedene Dimensionen abzudecken. Mit der Topografie einhergehend, nahm auch die Rauheit der Substrate zu. Neben diesen strukturierten Modifikationen wurden zudem Funktionalisierungen mit einfachen anorganischen Gruppen auf die Oberflächen aufgebracht. Es handelte sich dabei um Amino- oder Carboxygruppen, die sehr häufig im Körper vorliegen. Bedingt durch diese Funktionalisierung änderte sich neben der chemischen Zusammensetzung auch die Ladung und Benetzbarkeit der Substrate. Der Einfluss dieser vielfältigen, bioinspirierten Materialeigenschaften auf primäre humane Keratinozyten und Fibroblasten wurde parallel zum zellulären Verhalten auf kommerziellen Zellkulturgefäßen untersucht. Als Evaluationskriterien dienten die Adhäsion, Morphologie, Proliferation, Ausrichtung, Zell-Matrix Kontakte, Zell-Zell Kontakte, Funktionalität und Differenzierung der Zellen.

## **5.1 Materialwissenschaftliche Ergebnisse**

Die Evaluierung der materialwissenschaftlichen Ergebnisse teilen sich auf in die Herstellung der globulären und fibrillären Substrate sowie die Funktionalisierung der Oberflächen mit Amino- oder Carboxygruppen. Charakterisierungsmethoden für die Herstellung der Substrate sind REM und AFM, die chemische Modifizierung lässt sich mit ESCA, Ellipsometrie und Kontaktwinkelmessungen nachweisen. Neben der Überprüfung der Funktionalisierung dienten die Ellipsometrie und die Kontaktwinkelmessung der Evaluierung der Proteinadsorption [142]. Peptide und Proteine aus dem Blut oder aus Zellkulturmedien haften innerhalb von Sekunden unspezifisch an Materialoberflächen. Dies kann über elektrostatische, hydrophobe sowie van der Waal's-Wechselwirkungen oder durch Wasserstoffbrückenbindung erfolgen [143]. Die Zelladhäsion hingegen findet meist erst nach Minuten bis Stunden statt, so dass deren direkte Anhaftung hauptsächlich spezifisch über die bereits adsorbierten Proteine stattfindet [144]. Je nach Materialeigenschaften kann also die Proteinschicht variieren und damit Auswirkungen auf die Zelladhäsion haben [40].

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Zellkulturmedien verwendet. Das serumfreie Keratinozytenmedium KBMr enthält als Peptid- oder Proteinkomponenten Insulin, bovines Epiphysenextrakt und epidermalen Wachstumsfaktor, wobei Insulin in einer 1000fach höheren Konzentration zu den anderen Bestandteilen vorliegt. Basierend auf der geringen Größe von unter 6.000 Da zählt Insulin zu den Peptiden. Es lagert sich in Lösung meist zu Dimeren oder Tetrameren zusammen und ist hydrophob [145, 146]. Im Fibroblastenmedium DMEMr ist 10% fötales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Die Zusammensetzung von FCS schwankt bei verschiedenen Chargen, allerdings lässt sich Albumin eindeutig als Hauptproteinbestandteil identifizieren [147]. Daneben liegen noch zahlreiche weitere Proteine vor wie u.a. Fibronectin und Vitronectin. Albumin wird auf Grund seiner schnellen und guten Adsorption häufig zur Passivierung von Oberflächen eingesetzt. Dieses hydrophile, globuläre Protein besitzt eine Größe von über 66.000 Da und ist bei neutralem pH negativ geladen [148]. Trotz seiner schnellen Anhaftung an viele Substrate ist diese nicht irreversibel. So wird das Protein teilweise von anderen Proteinen von der Oberfläche verdrängt. Eine ausführliche Evaluierung der Adhäsion der beiden Hauptkomponenten Insulin und Albumin findet sich in der massenspektrometrischen Untersuchung.

### **5.1.1 Herstellung der globulären Substrate**

Die Herstellung von nano- oder mikrostrukturierten Substraten erfolgte durch das Abscheiden von Amino-Silica-Partikeln auf Glas. Dafür war das Aufbringen geladener Polyelektrolytschichten auf die Oberfläche erforderlich, die sich über die bekannte *Layer-by-Layer* Technik erzeugen ließen und eine elektrostatische Anbindung der Partikel an das Substrat vermittelten [149]. Zur festeren Verankerung der Partikel wurden die nano- oder mikrostrukturierten Substrate gesintert. Diese Methode ist bereits für andere partikelmodifizierte Substrate beschrieben [150, 151]. Bei den verwendeten Sintertemperaturen von 560°C für Mikropartikel und 630°C für Nanopartikel beginnt der Transformationsbereich von Kalknatronglas und die Objektträger werden weich, so dass die Partikel einsinken können. Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit anhand von REM-Aufnahmen belegen. Es entstehen nanostrukturierte Oberflächen mit Partikeln, die 100 nm Durchmesser aufweisen, eine Größenordnung, die an eher globuläre Adhäsionsmoleküle der Basalmembran wie Laminin angelehnt ist [49]. Mikrostrukturierte Substrate basieren auf Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 1 µm. Die durch die Partikelabscheidung auf Glas entstehende, chaotische Anordnung ist erwünscht, da *in vivo* die meisten Strukturen ebenfalls ungeordnet vorliegen. Teilweise kam es zur Clusterbildung, was sich durch beim Trocknen entstehende Kapillarkräfte zwischen Partikeln erklären lässt [152, 153]. So bilden sich wiederum freie Adsorptionsstellen, die durch wiederholtes Abscheiden der Partikel und Trocknen der Oberflächen zu einer erhöhten Partikeldichte führt [154]. Eine erwartungsgemäße Zunahme der Rauheit und des Flächenverhältnisses mit dem Aufbringen von Nano- oder Mikropartikeln ergaben AFM-Messungen.

### 5.1.2 Herstellung der fibrillären Substrate

Die Herstellung von fibrillären Strukturen ließ sich durch Heißprägeprozesse realisieren. Es wurden rillenförmige Nanostrukturen durch einen Elektronenstrahl in einen Messingstempel geschrieben und in Polystyrol-Substrate abgeprägt. Dabei war die Strukturgröße an den Durchmesser von großen Kollagen-Fibrillen als Hauptkomponente der extrazellulären Matrix angelehnt. Auswertungen von AFM-Messungen zeigten für Stegbreiten mit maximalem Durchmesser von 510 nm und minimalem unter 200 nm. Zudem lag die Steghöhe bei maximal 520 nm und minimal 100 nm.

Der Durchmesser von großen Kollagen-Fibrillen bewegt sich zwischen 300-500 nm und ist somit im Bereich der erzeugten Strukturen [49, 155]. Im Vergleich zu den hergestellten globulären Strukturierungen sind die fibrillären Strukturen auf Grund des Herstellungsprozesses geordnet, d.h. die Rillen verlaufen parallel. Des Weiteren handelt es sich bei dem geprägten Werkstoff um Polystyrol, welches bei unter 150°C zu prägen ist, wohingegen Glas auf diese Weise nicht zu strukturieren wäre. Zudem werden kommerzielle Zellkulturgefäße größtenteils aus Polystyrol gefertigt. Ein Einfluss der verschiedenen Ausgangsmaterialien und damit verbundener Eigenschaften ist trotz der Strukturierung und anschließenden ähnlichen Funktionalisierung möglich.

### 5.1.3 Funktionalisierung der globulärer Substrate

Mit Silanisierungsprozessen lassen sich Glassubstrate mit funktionelle Gruppen modifizieren [34, 151]. Deshalb fiel die Wahl zur Modifizierung der globulären Oberflächen auf diese Methode. Es wurden Silanisierungsprotokolle für die Modifizierung mit Amino- oder Carboxygruppen etabliert. Zum Nachweis der erfolgreichen Funktionalisierung eignet sich die Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse. Mit dieser Methode ist die Bestimmung der Zusammensetzung der obersten 10 nm der funktionalisierten Substrate möglich [156]. Nach der Behandlung mit Carboxyethylsilantriol konnte eine Zunahme der Kohlenstoffe bei carboxy-spezifischen Bindungsenergien sowie ein Anstieg der Sauerstoffverbindungen mittels ESCA detektiert werden. Auf amino-modifizierten Substraten lagen mit 5 Atomprozent deutlich mehr Stickstoffverbindungen vor als auf unmodifizierten Referenzen. Diese Ergebnisse belegen, dass eine erfolgreiche Funktionalisierung der Oberflächen stattfand.

Die Messung der Zunahme der Schichtdicken bekräftigt diese Aussage. Für beide Silanisierungsprozesse, parallel auf chemisch ähnlichen Siliziumwafern durchgeführt, nahm die Schichtdicke um ca. 20 Å zu. Es handelt sich bei den aufgebauten Schichten also um Multilag, da die Schichtdicke von Monolagen basierend auf der Moleküllänge der Silane bei 4-5 Å liegt. Anschließend wurden die funktionalisierten Substrate für mehrere Stunden in Keratinozytenmedium KBMr oder in Fibroblastenmedium DMEMr gelegt und danach mit  $H_2O_{dd}$  gewaschen, um nicht fest adsorbierte Moleküle zu entfernen. Bei erneuten ellipsometrischen Messungen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Schichtdicke um knapp 50 Å für die DMEMr und über 62 Å für die KBMr behandelten, amino-modifizierten Substrate. Auf carboxy-funktionalisierten Oberflächen stieg die Schichtdicke nach DMEMr Inkubation um über 31 Å und nach KBMr Inkubation um knapp 62 Å an. Bei diesen Schichten handelt es sich

um adsorbierte Proteine und Peptide aus dem Zellkulturmedium, Quellungen der Silanschichten können vernachlässigt werden. Auffällig dabei ist, dass die Schichtdicke nach Inkubation mit KBMr auf den verschiedenen Substraten nahezu identisch bleibt, während sich nach Inkubation in DMEMr insgesamt geringere und unterschiedliche Schichtdicken ergeben. Die Schichtdicke einer Monolage von adsorbierten Albumin-Molekülen beträgt 30 Å, was den Ergebnissen der carboxy-modifizierten Substraten entsprechen würde [157]. Bei amino-funktionalisierten Oberflächen mit knapp 50 Å liegen entweder zwei Lagen Albumin vor oder es handelt sich um Schichten bestehend aus verschiedenen Proteinen. Für die hohe Schichtdicke nach Inkubation in KBMr ist wahrscheinlich die Ausbildung von reinen Insulin-Multilagen oder Mischungen mit andern adsorbierten Proteinen verantwortlich. Offensichtlich beeinflusst die Funktionalisierung die Proteinadsorption, zumindest bei DMEMr. Möglicherweise findet die Adsorption der Serumproteine in höherem Maße über elektrostatische Wechselwirkungen statt als bei den Komponenten im KBMr. So lässt sich auch die größere Schichtdicke nach DMEMr Inkubation auf amino-modifizierten Substraten erklären, da Albumin negativ geladen ist und somit auch über elektrostatische Wechselwirkungen an die Oberfläche gebunden werden kann [148].

Große Unterschiede zwischen den Funktionalisierungen waren bei der Messung der Kontaktwinkel festzustellen. Der Winkel auf carboxy-modifizierten Proben lag wie bei gereinigtem Glas, das als Referenz diente, bei 5°, was einer vollständigen Benetzung der Oberfläche entspricht. Mit über 88° fielen die Kontaktwinkel auf amino-modifiziertem Glas deutlich hydrophober aus. Interessanterweise führt die Inkubation in den Zellkulturmedien zu einer Angleichung der Kontaktwinkel auf den verschiedenen Oberflächen. So waren auf carboxy-modifizierten Substraten Werte über 45° nach DMEMr Inkubation und sogar über 81° nach KBMr Inkubation zu messen. Die Kontaktwinkel auf amino-funktionalisierten Oberflächen hingegen sanken nach der Behandlung mit Zellkulturmedien um über 20° von 88,16° auf 67,43° ab. Für das zu anfangs sehr hydrophile, gereinigte Glas stieg der Kontaktwinkel nach DMEMr auf 49,96° und für KBMr auf über 58,94° an. Eine Erklärung für die starke Zunahme des Kontaktwinkels auf carboxy-funktionalisierten Substraten und gereinigtem Glas beruht auf der Adsorption von Proteinen. Da diese beiden Oberflächen stark hydrophil sind, liegt es nahe, dass sich hydrophile Domänen von Proteinen anhaften, was gleichzeitig zu einer insgesamt hydrophoberen Oberfläche führt. Der geringeren Kontaktwinkeländerung von gereinigtem Glas und den carboxy-modifizierten Substraten nach DMEMr Inkubation könnte die Größe des Proteins zugrunde liegen. Im Gegensatz zu dem unter 6.000 Da Peptid Insulin, der Hauptkomponente in KBMr, können bei der Adsorption des deutlich größeren Albumins proteinfreie Zwischenräume entstehen. Die hydrophoben amino-funktionalisierten Substrate werden durch Inkubation mit Medium hydrophiler. Es waren keine eindeutigen Unterschiede für amino-modifizierte Substrate nach der Inkubation in DMEMr oder KBMr festzustellen. In der Literatur ist eine vermehrte Proteinadsorption an hydrophobe Substrate beschrieben. Proteine und Peptide haften verstärkt durch hydrophobe Wechselwirkungen an den Oberflächen und machen diese insgesamt hydrophiler. Diese hydrophobe Wechselwirkungen entstehen erst bei einem Kontaktwinkel über 62° [158].

Zudem kann es bei hydrophoben Oberflächen häufiger zu Änderungen in der Proteinkonformation kommen [159]. So lässt sich nach der Kontaktwinkelmessung auch die bei der Ellipsometrie ermittelte höhere Schichtdicke im Vergleich zu carboxy-funktionalisierten Substraten erklären.

#### **5.1.4 Funktionalisierung der fibrillären Substrate**

Die Funktionalisierung von Polymeren durch Plasmabehandlungen ist weit verbreitet. Durch die Wahl der entsprechenden Parameter und Reaktionsgase lassen sich vielfältige Oberflächen-Modifikationen herstellen [160]. Aus diesem Grund wurden die zu untersuchenden Polystyrol-Substrate mit verschiedenen Plasmabehandlungen funktionalisiert. Zunächst war die Etablierung einer Funktionalisierung notwendig, die möglichst der kommerziellen Zellkultur Oberflächen entspricht, um eine Referenz-Funktionalisierung bei den fibrillären Substraten herstellen zu können. Bei einer Behandlung mit CO<sub>2</sub>-Plasma zeigten die ESCA Ergebnisse eine sehr ähnliche Verteilung von Kohlenstoff-Spezies. Im Vergleich zu reinem Polystyrol, wie es in unbehandelten Petrischalen oder den für diese Arbeit eingesetzten Platten mit fibrillären Strukturen liegt, weisen die Zellkultur Oberflächen mehr Sauerstoffverbindungen auf und werden so hydrophiler [161]. Diese Verbindungen entstehen auch durch die Behandlung mit CO<sub>2</sub>-Plasma. Amino- oder Carboxy-Gruppen lassen sich durch Ammoniak- oder Acrylsäure-Plasmen auf die Oberfläche bringen, wie durch die ESCA Ergebnisse eindeutig belegt.

Nach den unterschiedlichen Plasmabehandlungen wurde eine Zunahme der Schichtdicken gemessen. Für die amino- und CO<sub>2</sub>-modifizierte Substrate lag sie bei 4-5 Å. Der geringe Anstieg war zu erwarten, da bei diesen Plasmabehandlungen eine Aufrauung der Oberfläche und der Einbau funktioneller Gruppen stattfinden. Bei dem Acrylsäure-Plasma hingegen handelt es sich um ein beschichtendes Plasma, wo während der Behandlung Acrylsäure-Polymere abgeschieden werden. So lässt sich auch die hohe Schichtdicke von 65,18 Å erklären [160]. Alle funktionalisierten Substrate durchliefen anschließend eine Inkubation in DMEMr oder KBMr und einen Waschschriff mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Die erneute Messung der Schichtdicke ergab eine Zunahme auf den amino- und CO<sub>2</sub>-modifizierten Substraten, wohingegen auf carboxy-funktionalisierten Siliziumwafern kein Anstieg der Schichtdicke zu messen war. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei der Abscheidung der Acrylsäure auf Siliziumwafer im Gegensatz zu den Polystyrol-Substraten keine feste Anbindung möglich war und die Schicht sich bei Kontakt mit Flüssigkeit ablöste. Dies trat bei amino- oder CO<sub>2</sub>-modifizierten Substraten nicht auf, da hier keine Schichtabscheidung stattfindet. Dort war ein deutlicher Anstieg der Schichtdicke von 36,13 Å nach DMEMr und 51,11 Å nach KBMr für amino-funktionalisierte Oberflächen sowie 22,44 Å nach DMEMr Inkubation und 39,65 Å nach KBMr auf CO<sub>2</sub>-modifizierten Substraten zu verzeichnen. Auffallend ist, wie schon bei den silanisieren Oberflächen, der geringere Anstieg der Schichtdicke nach Inkubation in DMEMr im Vergleich zu KBMr. Es scheinen mehr Peptide und Proteine, wahrscheinlich hauptsächlich Insulin aus KBMr zu adsorbieren als aus DMEMr. Da in DMEMr das Protein Albumin in sehr hoher Konzentration vorliegt, ist es erstaunlich, dass eine geringere Schichtdicke nach Inkubation in DMEMr vorliegt.

Albumin zeichnet sich durch eine gute Adsorption an Substraten aus, was sich z.B. bei immunhistochemischen Färbungen zum Blockieren unspezifischer Proteinbindungen nutzen lässt. Vermutlich liegt die Antwort in der Ausbildung einer Albumin-Monolage. Der Durchmesser von Albumin beträgt 30 Å, was sehr gut zu der gemessenen Schichtdicke mit 36 Å passt [157]. Bei 22 Å Schichtdicke ist die Monolage wahrscheinlich noch nicht vollständig ausgebildet.

Bei der Bestimmung des Kontaktwinkels lagen die Werte der funktionalisierten Polystyrol-Substrate deutlich unter denen der Referenzen unbehandelter Petrischalen und Zellkultur Petrischalen. Besonders hydrophil waren die carboxy- und CO<sub>2</sub>-modifizierten Oberflächen, während amino-funktionalisiertes Polystyrol einen Winkel von 47,20° besaß. Unbehandelte Petrischalen hatten einen Kontaktwinkel von 84,70°, Zellkultur Petrischalen waren hingegen erwartungsgemäß hydrophiler mit 64,24°. Nach der Inkubation in Zellkulturmedium stellten sich alle Winkel zwischen 56° und 72° ein. Während bei den funktionalisierten Substraten die Oberflächen, besonders bei KBMr Inkubation, hydrophober wurden, nahm der Kontaktwinkel bei den unbehandelten Petrischalen ab. Lediglich die Werte der Zellkultur Petrischale blieben konstant. Eine Betrachtung der Kontaktwinkel aller in dieser Arbeit verwendeten Oberflächen legt den Schluss nahe, dass die Inkubation der Substrate in Medium eine "Regulierung" der Benetzbarkeit hervorruft. Dabei sinkt der Kontaktwinkel von Substraten mit eher hydrophoben Werten über 80° ab, während hydrophile Oberflächen durch Inkubation in Medium hydrophober werden.

### 5.1.5 Proteinadsorption mit MALDI-TOF MS

Adsorptionsvorgänge an Biomaterial-Grenzflächen *in vivo* und *in vitro* sind bislang nur ungenügend charakterisiert und stellen eine große Herausforderung für die bekannten Analysemethoden dar. Häufig liegen nur kleinste Mengen der zu messenden Stoffe auf der Probe vor [162]. Zunehmend erscheinen Studien, die sich mit dem Einsatz der Massenspektrometrie zur Untersuchung von Biomaterial-Oberflächen befassen. Neben der hohen Nachweisgrenze bis in den sub-attomolaren Bereich, macht die Möglichkeit der Identifizierung von Biomolekülen über deren spezifische Massen das hohe Potenzial dieser Methode aus. Ein Hauptproblem bereitet die Messung der Biomaterialien, da für den MALDI-TOF MS Prozess leitende Oberflächen notwendig sind [163]. Diese Anforderung war auch in der vorliegenden Arbeit zu lösen, um mögliche Differenzen in der Proteinadsorption, bedingt durch verschiedenen funktionalisierte Oberflächen, auszumachen. Zunächst wurden kommerzielle, leitende Glasobjektträger silanisiert, um vergleichbare Funktionalisierungen zu erzeugen. Dies war nicht möglich, ohne die leitende Oberfläche des Objektträgers schwerwiegend zu beschädigen. Deshalb fokussierten sich die Experimente auf Polystyrol-Folien. Obwohl diese nur durch metallische Aufkleber mit dem leitenden MALDI-TOF MS Objektträger verbunden waren, lieferten Probemessungen gute Ergebnisse. Die untersuchten Polystyrol-Substrate wiesen folgende Modifikationen auf: unbehandelt, CO<sub>2</sub>-funktionalisiert, carboxy-funktionalisiert oder amino-funktionalisiert. Als Referenz zur Überprüfung der Messmethode wurde die Proteinlösung direkt gemessen, während bei der Evaluierung der Adsorption ein Waschschrift zur Entfernung nicht ge-

bundener Proteine diene. Relativ konstante Ergebnisse zeigten sich bei der Proteinadsorption. Im Vergleich zu unbehandeltem Polystyrol lagen die Messwerte der Intensität von Insulin auf amino- und CO<sub>2</sub>-modifizierten Substraten minimal über den Ergebnissen und für carboxy-funktionalisierte Substrate leicht darunter.

Unter Berücksichtigung möglicher präparativer Unterschiede ist die Insulinadsorption auf den Polystyrol-Substraten als ähnlich anzusehen. Mollmann et al. beschreiben ebenfalls eine starke Adsorption von Insulin, wobei sie für hydrophobe Oberflächen annehmen, dass Insulin teilweise denaturiert vorliegt [145]. Bei der Messung der Albuminadsorption auf den Polystyrol-Oberflächen hingegen wiesen die modifizierten Substrate eine deutlich höhere Adsorption auf. Die Proteinadsorption auf unbehandeltem Polystyrol wird in der Literatur als gering beschrieben [164]. Insofern stimmen die MALDI-TOF MS Ergebnisse für Albumin mit Beobachtungen anderer Forscher überein. Es stellt sich allerdings die Frage, wieso diese verminderte Adsorption nicht bei Insulin auftrat. Möglicherweise spielt die geringe Größe des Peptids eine Rolle, oder aber es kann besser als Albumin an stark hydrophober Oberflächen anbinden.

### **5.1.6 Fazit der materialwissenschaftlichen Ergebnisse**

Zusammenfassend lässt sich für die materialwissenschaftlichen Ergebnisse der Arbeit sagen, dass bioinspirierte nano- und mikrostrukturierte Substrate hergestellt und funktionalisiert wurden. Was die Proteinadsorption betrifft, zeigen sich folgende Resultate: Insulin adsorbiert an allen funktionalisierten Polystyrol-Substraten. Da auch bei den silanisierten Oberflächen die Schichtdicke nach KBMr Inkubation zunimmt, ist diese Aussage mit hoher Sicherheit für die Glassubstrate übertragbar. Die Bestimmung der Schichtdicken auf Polystyrol-Substraten bestätigt diese Beobachtung, auch wenn sich die Plasma-Behandlung nicht optimal auf Siliziumwafer übertragen lässt. Für alle hydrophilen Substrate mit Kontaktwinkeln unter 50° nahm dieser nach KBMr Inkubation zu, wohingegen hydrophobere Substrate mit über 80° nach Behandlung mit KBMr einen geringeren Kontaktwinkel besaßen. Für Albumin ergaben die massenspektrometrischen Untersuchungen eine deutlich schlechtere Adsorption an unbehandeltem Polystyrol im Vergleich zu den funktionalisierten Substraten. Die Bestimmung der Schichtdicke ist auf unbehandeltem Polystyrol mit Ellipsometrie nicht möglich. Bei den behandelten Substraten zeigte sich eine Zunahme der Schichtdicke nach Inkubation in DMEMr, die allerdings unter den Werten der in KBMr inkubierten Substrate lag. Vielmehr ergaben sich Größenordnungen, die für die Ausbildung von Albumin Monolagen charakteristisch sind. Auf den silanisierten Substraten waren die gemessenen Schichtdicken eher im Bereich von einer Doppellage bzw. ist auch eine Mischlage mit mehreren Proteinen des Serums möglich. Auch hier ist die suboptimale Übertragbarkeit der Plasmabehandlung auf die Siliziumwafer zu berücksichtigen. Bei der Kontaktwinkelmessung wurden hydrophile Substrate mit Winkeln unter 50° nach DMEMr Inkubation hydrophober und hydrophobe Oberflächen mit über 80° hydrophiler. Von der Tendenz stimmt diese Beobachtung mit der bei KBMr Inkubation überein. Allerdings war die Veränderung im Vergleich zur KBMr Inkubation stets kleiner, was sich mit der geringeren Schichtdicke an adsorbierten Proteinen erklären lässt.

## 5.2 Biologische Ergebnisse

Nach erfolgreicher Herstellung und Funktionalisierung der nano- oder mikrostrukturierten Substrate wurden diese mit primären Hautzellen besiedelt. Während des Kultivierungszeitraums erfolgte die lichtmikroskopische Evaluierung der Zellen. Vor der Fixierung fand ein Proliferationstest statt, aus den Überständen des Zellkulturmediums ließ sich die LDH-Konzentration ermitteln. Die dazu durchgeführten WST-Tests beruhen auf der Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen bzw. beim LDH-Test auf der Messung der Plasmamembranpermeabilität. Anhand der Ergebnisse wird die Vitalität und Proliferation (WST-Test) sowie die Cytotoxizität und Anzahl toter Zellen (LDH-Test) ermittelt. [165]. Immunhistochemische Färbungen und REM-Aufnahmen gaben Aufschluss über physiologische und morphologische Antworten der Keratinozyten und Fibroblasten. Fokalkontakte, die für eine feste Verankerung der Zelle am Substrat essentiell sind, lassen sich über beteiligte Proteine wie Paxillin, Talin oder Vinculin nachweisen [166-168]. Sobald die Zellen adhären, beginnen sie sich zu teilen und kleine Kolonien zu bilden. Innerhalb dieser Kolonien wird die Kommunikation über Zell-Zell Kontakte in Form von Adherence Junctions, Desmosomen und Gap Junctions gewährleistet [89, 169-171]. Mit zunehmender Kultivierungsdauer differenzieren primäre Zellen und ändern ihre Protein-Expression. Bei Keratinozyten sind viele dieser charakteristischen Proteine bekannt, lediglich die Charakterisierung epidermaler Stammzellen stellt sich als schwierig dar. Basalzellen der Epidermis exprimieren Cytokeratin 14 [63, 172]. Zusätzlich zu diesem frühen Differenzierungsmarker wird in der Literatur zunehmend p63 als Stammzellmarker diskutiert [173-175]. Fibroblasten weisen im Vergleich zu Keratinozyten keine charakteristischen Differenzierungsstadien auf. Ihre funktionelle Kultivierung lässt sich über die Produktion von Kollagen Typ I bewerten [176]. Zellen verfügen über verschiedene Aktin-Ausstülpungen, wobei die fingerförmigen Filopodien mit ihren sensorischen Fähigkeiten die Migration und Adhäsion der Zelle beeinflusst [116, 177]. Diese Strukturen sind auf Grund ihrer geringen Größe vornehmlich elektronenmikroskopisch zu betrachten. Die Ausbildung von Zell-Substrat und Zell-Zell Kontakten, der Differenzierungsgrad primärer Keratinozyten, die Produktion extrazellulärer Matrixproteine bei Fibroblasten sowie die detaillierte Betrachtung der Morphologie der Zellen auf den erzeugten Substraten waren deshalb im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse.

### 5.2.1 Zelluläres Verhalten auf globulären Oberflächen

#### 5.2.1.1 Morphologie und Zell-Substrat Kontakte

Erste Unterschiede bei der Kultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten auf globulären Oberflächen zeigten sich bereits in der lichtmikroskopischen Betrachtung. So befanden sich auf gereinigtem Glas und carboxy-modifizierten Substraten deutlich weniger adhären Keratinozyten. Morphologisch auffällig war die untypisch langgestreckte Form der Zellen auf strukturierten Oberflächen, die ein Zeichen für migrierende Zellen ist. Dabei spielen der Abstand und die Strukturhöhe eine entscheidende



Rolle: Ist der Abstand zu gering oder die Struktur zu hoch, entsteht eine zu große Spannung in der Zellmembran, so dass keine Fokalkontakte mehr ausgebildet werden können. Kunzler et al. stellten die Theorie auf, dass eine Strukturierung die Ausbildung von Fokalkontakten auf dem Substrat behindert und deshalb die Zellen nicht so fest an der Oberfläche adhären können [178]. Auf den planaren Substraten hingegen besaßen die Keratinozyten einen charakteristisch kubischen Zellkörper. Früh differenzierte Zellen weisen zudem einen geringen Cytoplasma-Anteil auf. Diese morphologischen Beobachtungen bestätigen auch Fluoreszenzfärbungen des Aktin-Zytoskeletts, des in die Ausbildung von Fokalkontakten involvierten Proteins Vinculin und des Nucleus. Die Polymerisation von Aktin-Filamenten findet im gesamten Zellkörper statt, z.T. ist ein verstärktes Vorkommen von Aktin an der Zellfront festzustellen. Vinculin liegt in den Keratinozyten sowohl diffus um und unter dem Nucleus vor als auch gesammelt in strich- bzw. punktförmigen Ansammlungen am Zellrand. An der Zellfront findet diese gebündelte Vinculin-Expression meist in Filopodien statt, die so Fokalkontakte zum Substrat bilden [179]. Für die feste Adhäsion der Zelle am Substrat sind hauptsächlich die Fokalkontakte um den Nucleus zuständig, da hier die Zelle fest mit dem Substrat verankert ist. Bis auf die schon erwähnte langgestreckte Zellform der Keratinozyten auf strukturierten Oberflächen, gab die Färbung keinen Aufschluss über Unterschiede der Zell-Substrat Interaktionen. Sowohl auf den planaren als auch auf den globulären Substraten sind Aktin und Vinculin nachzuweisen, wenn die Zellen adhären und sich ausbreiten.

Bei der lichtmikroskopischen Evaluierung von Fibroblasten auf globulären Substraten zeigten sich andere Ergebnisse. So waren bei diesem Zelltyp deutlich mehr Zellen auf amino- als auf carboxy-funktionalisierten Oberflächen zu finden. Auf amino-modifizierten nanostrukturierten Substraten lagen nur sehr vereinzelt Zellen vor, die zudem meist nicht fest adhärten. Die Fibroblasten auf mikrostrukturierten Oberflächen erschienen kompakter und weniger ausgespreitet, was Hinweise auf verstärkte Migration sein könnten. Aus Studien ist bekannt, dass strukturierte Substrate zu einer erhöhten Zellmigration führen können [180]. Mit Färbungen von Zell-Substrat Kontakten wurde eine deutliche Expression von Vinculin sichtbar. Besonders ausgeprägt lag das für Fokalkontakte charakteristische Protein in diffuser Form um den Nucleus vor. In der Literatur ist die deutliche Ausbildung von Aktin-Stressfasern auf Polystyrol-Petrischalen beschrieben, was sich in dieser Arbeit reproduzieren ließ [118]. Interessanterweise besaßen Fibroblasten auf den Glassubstraten keine Aktin-Stressfasern, sondern zeigten lediglich eine netzförmige, diffuse Aktin-Expression in der Nähe des Nucleus. Die Entstehung von Aktin-Stressfasern ist bislang noch nicht vollständig geklärt, es wird vermutet, dass eine gewisse Rauheit des Substrates deren Entstehung hemmt [181]. Diese Theorie lässt sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen bestätigen, da auf den rauen Substraten keine Aktin-Stressfasern vorlagen. Allerdings besaßen Fibroblasten auf planaren Glassubstraten ebenfalls keine Stressfasern. Offensichtlich induzieren bestimmte Materialeigenschaften von Polystyrol, die auf Glassubstraten nicht vorliegen, die Ausbildung dieser Strukturen.

### **5.2.1.2 WST-1 Proliferationstest und LDH-release Assay**

Eine quantitative Verifizierung der mikroskopischen Betrachtung erfolgte über den WST-1 Proliferationstest. Den aufgeführten Ergebnissen liegen Versuche mit verschiedenen Spendern zugrunde, trotz spenderabhängiger Varianzen konnten diese signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Für die Keratinozyten waren bei gleicher Strukturierung jeweils signifikant höhere Werte für amino-modifizierte Substrate zu messen. Die Ergebnisse für carboxy-funktionalisierte Substrate lagen stets bei unter 21% und damit sogar geringer als Werte der Negativ-Kontrolle (gereinigtes Glas). Als Erklärung für diese niedrigen Messergebnisse könnte der Kontaktwinkel der carboxy-modifizierten Oberflächen dienen. Nach Inkubation im Keratinozyten-medium wurden Kontaktwinkel über 80° gemessen, was im Vergleich zu den anderen Substraten relativ hydrophob ist. Zudem besteht die Möglichkeit, dass auf diesen ursprünglich sehr hydrophilen Substraten Proteine nur schwach gebunden waren und somit den Zellen keinen Halt für die Ausbildung einer stabilen Bindung bieten [182]. Zwischen planaren und globulären Oberflächen im Nano- oder Mikrometer Bereich ergaben sich bei dieser Messung keine Unterschiede, daher scheint der Einfluss eindeutig bei der Funktionalisierung mit Carboxygruppen zu liegen. Es bleibt hervorzuheben, dass planar amino-modifizierte Substrate im WST-Test höhere Werte erzielten als kommerzielle Zellkultur-Petrischalen. Von einer erhöhten Adhäsion und Proliferation auf amino-modifizierten Oberflächen berichteten auch schon Eves et al. [183]. Mit zunehmender Strukturierung der amino-funktionalisierten Substrate nahmen die Werte ab. Dies liegt vermutlich an der erschwerten Adhäsion auf den strukturierten Oberflächen [178].

Der WST1-Proliferationstest bestätigte auch bei den Fibroblasten die lichtmikroskopischen Ergebnisse. Messwerte der carboxy-modifizierten Substrate waren stets über denen der amino-funktionalisierten Oberflächen mit der gleichen Strukturierung, dort liegen also deutlich mehr viable und proliferierende Zellen vor. Bei den planaren Substraten war dieser Unterschied sogar signifikant. Zu diskutieren ist die hohe Standardabweichung bei gereinigtem Glas. Diese beruht auf spenderabhängigen Schwankungen der Zellen. So wuchsen die Fibroblasten des einen Spenders auf gereinigtem Glas vergleichbar zu Zellkultur Petrischalen, während Zellen eines anderen Spenders kaum adhärten. Welche Faktoren dafür verantwortlich sind, ist bislang unklar. Eine Möglichkeit stellen geringe präparative Schwankungen dar. Bereits lichtmikroskopisch zeigte sich eine schlechte Adhäsion der Fibroblasten auf den amino-modifizierten nanostrukturierten Oberflächen, was die gemessenen Werte des WST-Tests bestätigten. Tendenziell ergaben sich für Fibroblasten auf globulären Substraten im Mikrometerbereich höhere Werte beim WST-Test. Die Bereiche auf den Substraten, wo keine Partikel vorliegen, sind bei den nanostrukturierten Oberflächen kleiner, so dass eine schlechtere Anhaftung der Fibroblasten direkt auf dem Glasobjektträger wahrscheinlich ist [178]. Mikrostrukturierte Substrate weisen größere dieser freien Flächen auf, was die bessere Adhäsion und Proliferation der Zellen auf diesen Oberflächen erklären könnte [154]. Bislang wird in der Literatur

davon ausgegangen, dass keine signifikanten Unterschiede in der Proteinadsorption zwischen planaren und mit Partikeln modifizierten Substraten vorliegt [184].

Der LDH-release Assay diente in dieser Arbeit der Überprüfung der Anzahl nicht adhärenter Zellen im Überstand. Es ergaben sich für Keratinozyten stets höhere LDH Konzentrationen bei carboxy- im Vergleich zu amino-modifizierten Substraten derselben Strukturierung. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten des WST-Tests. Allerdings ist anzumerken, dass die gemessenen LDH-Konzentrationen sehr nah beieinander liegen. Wesentlich höhere Werte ließen sich bei dem LDH-release Assay von Fibroblasten erzielen. Die hohen Messergebnisse wurden durch das FCS im Medium der Fibroblasten verursacht. Gleichwohl ergibt der Vergleich der ermittelten LDH-Konzentration, dass die Werte für amino-modifizierte Substrate stets höher lagen als für die gleich strukturierten, carboxy-funktionalisierten Oberflächen. Für amino-modifizierte nanostrukturierte Substrate waren die höchste LDH-Konzentration und damit die meisten nicht adhärenten Fibroblasten zu ermitteln. Somit bekräftigte der LDH-release Assay die lichtmikroskopischen Beobachtungen und die Resultate des WST-Tests.

### **5.2.1.3 Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen**

Die Bestimmung des Differenzierungsstadiums primärer Keratinozyten basiert auf Färbungen von Cytokeratin 14 und p63. Basale Keratinozyten der Epidermis, darunter auch die Stammzellen exprimieren Cytokeratin 14 [185]. Bislang ist kein eindeutiger Marker zur Identifikation epidermaler Stammzellen etabliert, allerdings zählt der Transkriptionsfaktor p63 zu den diskutierten Markern, um die Vorläuferzellen zu detektieren [186, 187]. Aus den Färbungen wird deutlich, dass es sich bei nahezu allen Zellen um früh differenzierte Keratinozyten handelt, die Cytokeratin 14 exprimieren. Da kein Zusammenhang mit der Modifikation der Oberflächen festzustellen war, liegt nahe, dass nur diese früh differenzierten Zellen adhären können. Früh differenzierten Keratinozyten verfügen über ein hohes Proliferationspotential, so dass innerhalb weniger Tage Kulturen mit hohen Zellzahlen erreichbar sind, die z.B. bei der Behandlung von chronischen Wunden gebraucht werden [188]. Einer dauerhaften Bereitstellung proliferativer Keratinozyten geht die Entwicklung von *in vitro* Stammzellnischen voraus. Solche Kultivierungsoberflächen sollten notwendige Stimuli für die Kultivierung epidermaler Stammzellen bereitstellen.

Die zur Anhaftung notwendigen Integrine sind besonders stark bei Keratinozyten der basalen Schicht vorhanden [74]. Über sie erfolgt die Verankerung der gesamten Epidermis an die Basalmembran und so an die darunterliegenden Gewebe. Auch besitzen die Keratinozyten der Basalschicht das höchste Proliferationspotential, wohingegen sich die suprabasalen Zellen nur noch wenige Male teilen können [81]. Im Laufe der Kultivierung ändert sich die Cytokeratin-Expression und es tritt nach ungefähr 10-12 Tagen vermehrt Cytokeratin 10 auf [189]. Dies wiederum erklärt bei den vorliegenden Versuchen die deutliche positive Färbung von Cytokeratin 14 bei einer maximalen Kultivierungsdauer von 72 h. Die Coexpression von Cytokeratin 14 und p63 zeichnet epidermale Vorläuferzellen aus [190]. Auf allen Substraten waren

solche epidermalen Vorläuferzellen zu finden, tendenziell lagen allerdings mehr dieser frühen Keratinozyten auf carboxy-modifizierten Oberflächen vor. Eindeutige Belege dafür müssen in Zukunft mit quantitativen molekularbiologischen Methoden bestätigt werden. Da auf carboxy-modifizierten Oberflächen deutlich weniger Keratinozyten vorkamen, ist es zudem möglich, dass diese länger in einem früh differenzierten Zustand verweilen.

Bei Färbungen von p63 und dem Proliferationsmarker Ki67 zeigte sich deutlich, dass sich p63 positive Keratinozyten vornehmlich am Rand von Zellkolonien befinden. Interessanterweise waren Zellen, die Ki67 besaßen, eher im Zentrum der Zellkolonie angesiedelt. Die Vermehrung der Keratinozyten in solch einer Kolonie scheint also vom Inneren heraus zu erfolgen. Zudem kann die Tatsache, dass p63 positive Zellen kein Ki67 exprimieren, als Hinweis angenommen werden, dass es sich tatsächlich um epidermale Vorläuferzellen handelt. Diese befinden sich meist in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus, was bedeutet, dass sie sich im Ruhezustand befinden und sich nur äußerst selten teilen [191, 192]. Zur Diskussion stehen zwei Teilungsmodelle für Stammzellen: die asymmetrische und die symmetrische Teilung [193]. Beide Theorien haben gemeinsam, dass die Zellen der Basalschicht proliferieren, während mit der Stratifizierung in die suprabasalen Lagen die Differenzierung beginnt [194]. Beim symmetrischen Modell entstehen nach der Teilung einer Stammzelle zwei neue Stammzellen, wobei eine dieser Stammzellen in einen Zwischenzustand in Form der "Transient Amplifying" (TA) Zelle übergeht [195, 196]. Diese Zellen sind hoch proliferativ und teilen sich ungefähr fünfmal, bevor die ursprüngliche TA Zelle zu differenzieren beginnt und von der Basalschicht in die Stachelzellschicht wandert [197, 198]. Das asymmetrische Modell beinhaltet keine TA Zellen. Stammzellen teilen sich in eine neue Stammzelle und einen differenzierten Keratinozyt, der nach der Teilung in die Stachelzellschicht migriert [81, 199]. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich das symmetrische Teilungsmodell untermauern. Über 95% der Keratinozyten exprimierten das für die Basalschicht charakteristische Cytokeratin 14. Der potentielle Stammzellmarker p63 kommt allerdings nur in einzelnen Zellen in der Kolonie oder am Rand vor. Somit handelt es sich bei den Keratinozyten, die kein p63 aufweisen, um TA Zellen, die noch das basale Cytokeratin 14 und zum Teil den Proliferationsmarker Ki67 besitzen.

Der Nachweis der Funktionalität primärer Fibroblasten beruhte auf der Expression des extrazellulären Matrix Proteins Kollagen Typ I. Fibroblasten beginnen die Synthese dieses Proteins kurz nach ihrer Adhäsion [189]. Bei Betrachtung der Färbungen fällt auf, dass hauptsächlich Fibroblasten mit großen, ausgespreiteten Zellkörpern das Protein synthetisieren. In Fluoreszenzfärbungen lässt sich die Kollagensynthese innerhalb der Zelle deutlich verfolgen. Während nahe dem Nucleus eine starke Färbung vorkommt, wird diese deutlich schwächer und diffuser im restlichen Zellkörper. Vermutlich handelt es sich bei der deutlich gefärbten Region um das Endoplasmatische Retikulum, in dem die Modifizierung von Prokollagen stattfindet [200]. Ungefärbte Zellen sind meist schlanker und spindelförmig, ein deutliches Zeichen für ruhende Fibroblasten, die keine Proteinsynthese betreiben. Auf allen

Oberflächen waren Fibroblasten zu finden, die Kollagen Typ I synthetisierten, es zeigten sich also keine durch die Modifikation bedingten Einschränkungen in der Funktionalität.

#### **5.2.1.4 Zell-Zell Kontakte und REM-Aufnahmen**

Für die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen ist die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten essentiell [88]. Besonders stark ausgeprägt kommen diese Kontakte in Epithelien vor [169]. Bei E-Cadherin handelt es sich um einen wichtigen Bestandteil der Adherence Junctions, deren Vorkommen auf den modifizierten Oberflächen evaluiert werden sollte. Die stärkste Färbung lag, wie zu erwarten, an der Grenzfläche benachbarter Zellen vor und war auf allen Substraten zu erkennen. Lediglich bei den mikrostrukturierten Oberflächen wurde eine deutliche Färbung der Zellen am Kolonierand festgestellt, während die E-Cadherin-Expression zu benachbarten Keratinozyten zum Teil kaum vorhanden war. Eine nur lose Anhaftung dieser Zellen oder deren Migration erklärt die geringere Ausbildung von Adherence Junctions zwischen den Zellen. Die verstärkte Ansammlung von E-Cadherin am Rand der Keratinozyten ist ungewöhnlich, möglicherweise handelt es sich um strukturbedingte Fehltransporte oder die Zellen versuchen mit den knapp 1 µm hohen Mikropartikel zu interagieren.

Zell-Zell Kontakte bei Fibroblasten sind bei weitem nicht so gut untersucht wie bei Epithelzellen [201]. Doch lichtmikroskopische Beobachtungen liefern immer wieder Hinweise auf die Existenz direkter Kontakte zwischen den Zellen. Färbungen gegen die bekannten Cadherine der Zelle zeigten ausgeprägte Zell-Zell Kontakte auf allen modifizierten Substraten. Dabei waren Unterschiede in der Form der Kontakte zu beobachten, zum Teil handelte es sich um sehr enge, strichförmige Verbindungen, andere waren filopodienähnlich mit dünnen Fasern, die sich auch zu weiter entfernten Zellen erstreckten. Von diesen Strukturen berichteten auch andere Gruppen [116, 202]. Allerdings beobachteten sie die Ausbildung filopodienartiger Zell-Zell Kontakte bei Keratinozyten. In der aufgestellten Theorie verfügten die Strukturen über E-Cadherinen am Ende. Es liegen klare morphologische Parallelen zu den in dieser Arbeit beschriebenen Zell-Zell Kontakten zwischen Fibroblasten vor. Möglicherweise bildet dieser Zelltyp ähnliche Strukturen mit anderen Cadherinen aus. Als mögliche Cadherine, die Fibroblasten exprimieren, wird N-Cadherin diskutiert. Diese kommen in mesenchymalen Geweben vor und ließen sich in Fibroblasten nachweisen [203].

Detaillierte Einblicke in die Morphologie adhärenter Zellen liefert die Rasterelektronenmikroskopie. Es war eine deutliche Ausbildung von Filopodien auf den planaren Oberflächen zu erkennen. Diese fühlertartigen Aktinstrukturen besitzen sensorische Fähigkeiten und können so die Migration von Zellen steuern [45, 204]. Während auf planar carboxy-modifizierten Substraten kurze, nahezu parallel vorliegende Filopodien vorkamen, verfügten Keratinozyten auf den anderen planaren Oberflächen über längere, verzweigte und ungeordnete Filopodien. Das dünne, saumartige Lamellipodium, aus dem die Filopodien hervorgehen, ist auf diesen Aufnahmen deutlich erkennbar, auch die Keratinozyten auf den strukturierten Substraten besitzen diese Struktur. Besonders eindrucksvoll lässt sich dies auf den mikrostruk-

turierten Oberflächen veranschaulichen, wo sogar die Partikel deutlich unter dem Lamellipodium zu erkennen sind. Filopodien hingegen liegen auf den strukturierten Substraten in deutlich verminderter Anzahl vor. Diese Beobachtung stimmt mit bereits veröffentlichten Ergebnissen überein, in denen eine Abnahme der Filopodien mit zunehmender Substrat-Rauheit beschrieben ist [205]. Auf rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Fibroblasten auf den modifizierten Substraten zeigten sich filopodienartige Strukturen. Diese lagen in sehr unterschiedlicher Länge besonders auf den planaren Oberflächen vor. Höchstwahrscheinlich handelt es sich nur bei einem Teil der Strukturen um Filopodien. Einige der Ausstülpungen stammen nicht aus dem Lamellipodium, vielmehr sieht es danach aus, dass die Fibroblasten sich zurückziehen und noch vereinzelte Retraktionsspuren hinterlassen [121, 204]. Auch auf den strukturierten Oberflächen besitzen die Zellen wenige dieser faserförmigen Strukturen. Bei der Fixierung könnte der Zellkörper aber auch so stark entwässert werden, dass die Zelle nur noch an vereinzelten Haftpunkten hängen und so die faserförmigen Strukturen entstehen.

## **5.2.2 Zelluläres Verhalten auf fibrillären Oberflächen**

### **5.2.2.1 Morphologie und Zell-Substrat Kontakte**

Bei lichtmikroskopischen Untersuchungen primärer Keratinozyten und Fibroblasten auf verschiedenen funktionalisierten fibrillären Substraten zeigten sich auffällige zelluläre Reaktionen. Nach 24 h Kultivierung bildeten die Keratinozyten bereits kleine Zellkolonien, wobei kein Unterschied zwischen unstrukturierten amino-, carboxy-, oder CO<sub>2</sub>-funktionalisierten Oberflächen vorlag. Dies änderte sich bei der Kultivierung auf fibrillären Substraten. Während Keratinozyten auf amino-modifizierten Substraten relativ große Kolonien bildeten, war auf carboxy- oder CO<sub>2</sub>-funktionalisiertem Polystyrol teilweise eine Ausrichtung der Zellen zu beobachten. Von den untersuchten fibrillären Strukturierungen (Tabelle 12) war bei Struktur 2 diese horizontale Anordnung besonders ausgeprägt, schwächer bei Struktur 1. Die Keratinozyten ordnen sich also rechtwinklig zu den fibrillären Strukturen der Oberfläche an und weisen eine untypische, langgestreckte Zellform auf. Diese Morphologie deutet auf Migration der Zellen hin, zumal meist nur einzelne Keratinozyten in diesem Zustand zu sehen waren. Bei der Wundheilung spielt die Migration von Keratinozyten zur Wunde hin eine wichtige Rolle. Dabei ändert sich die Protein-Expression, der zuvor adhärennten Zellen. Zur Migration sind ausschließlich Keratinozyten in frühen Differenzierungsstadien befähigt, da diese noch das nötige Proliferationspotential aufweisen, das bei der Wundheilung erforderlich ist [82, 206]. Offensichtlich ist die zuvor beschriebene Migration sowohl von der Oberflächenchemie als auch von der Strukturierung abhängig. So wurde auf den amino-funktionalisierten Substraten unabhängig von der Strukturierung keine Migration beobachtet. Auf CO<sub>2</sub>- oder carboxy-modifizierten Substraten hingegen, bei fibrillären Strukturen, die in Größenordnungen von Kollagen-Fibrillen lagen, migrierten die Keratinozyten. Nach den Beobachtungen stellt sich die Frage, warum die Keratinozyten nur auf diesen Strukturen und nur auf den carboxy- oder CO<sub>2</sub>-funktionalisierten Substraten horizontal wandern.

Besonders ausgeprägt war die Anordnung bei Struktur 2, die mit einer Steghöhe von knapp 520 nm die deutlichsten Höhenunterschiede aufwies. Dies erschwert die Adhäsion der Zellen. Bei der Formierung von Kolonien wird die Zelle zusätzlich über Zell-Zell Kontakte stabilisiert und kann sich so wahrscheinlich auf dieser Struktur niederlassen. Struktur 1 verfügt mit 320 nm ebenfalls über eine deutliche Steghöhe im Vergleich zu den anderen Strukturen. Wenn Keratinozyten anfangen zu migrieren, ändern sie ihre Integrin-Expression. Adhärenz Zellen besitzen besonders viel  $\alpha 6\beta 4$  Integrine, die an Laminin 5 in der ECM binden und so Hemidesmosomen aufbauen. Diese festen Verankerungen sind bei migrierenden Keratinozyten seltener zu finden, während vermehrt andere Integrine wie  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha 3\beta 1$  ausgebildet werden, die an Laminin, Fibronectin und Kollagen binden [207-210]. Möglicherweise induzieren die fibrillären Substrate eine veränderte Integrin-Expression und somit die Migration der Zellen. Neben diesem strukturellen Bezug zur extrazellulären Matrix muss aber noch eine Erklärung für die Oberflächenchemie existieren. Interessant ist, dass sich die Keratinozyten auf amino-modifizierten Substraten auf diesen Strukturen nicht ausrichten, sondern adhären und Kolonien aufbauen. Dies bestätigt die schon zuvor beschriebene höhere Vitalität und Proliferation von Keratinozyten auf amino-modifizierten Substraten. Eine Möglichkeit stellt die unterschiedliche Proteinadsorption an funktionalisierten Substraten dar [211]. Auf amino-modifizierten fibrillären Oberflächen sind eine höhere Schichtdicke und dementsprechend mehr adsorbierte Proteine auszumachen. Vielleicht überdecken diese die fibrillären Stimuli in ausreichendem Maße, so dass die Zellen trotz deutlicher Strukturierung anhaften können. Zudem schwankt die Zusammensetzung der Proteinschicht zwischen den funktionalisierten Substraten. Zwar macht mit großer Wahrscheinlichkeit Insulin den Hauptbestandteil aus, allerdings liegt es vermutlich in unterschiedlichen Orientierungen vor. Bedingt durch die gegensätzliche Ladung und abweichende Benetzbarkeit der amino- zu den  $\text{CO}_2$ - oder carboxy-modifizierten Substraten, ist zudem von der Anhaftung verschiedener anderer Moleküle auszugehen, was einen Einfluss auf die Adhäsion oder Migration der Keratinozyten haben kann. Sobald kleine Kolonien entstanden, nahmen die Zellen wieder ihre charakteristisch kubische Form an.

Färbungen von Aktin und Vinculin belegen eine deutliche Expression dieser Proteine. Vinculin ist an der Bildung von Fokalkontakten beteiligt, die die Zelle in großer Anzahl und unterschiedlicher Größe als Kontakt zum Substrat ausbildet [212]. Es zeigten sich bis auf die erwähnte Ausrichtung der Keratinozyten keine Unterschiede zwischen den Funktionalisierungen, weshalb exemplarisch die  $\text{CO}_2$ -modifizierten Substrate aufgeführt wurden. Bei allen Keratinozyten lag Aktin hauptsächlich am Rand der Zellkörper vor, Vinculin hingegen in der Umgebung des Nucleus.

Kennzeichnend für Fibroblasten ist ein ungeordnetes Wachstum wie es auf den verschiedenen funktionalisierten Oberflächen ohne Strukturierung stattfand. Bei Kultivierung der Zellen auf fibrillären Substraten vollzieht sich eine deutliche Anordnung der Fibroblasten parallel zu den Strukturen. Solche Ausrichtungen an Rillen sind mehrfach in der Literatur beschrieben [26, 213, 214]. Besonders klar zeigte sich dieses gerichtete Wachstum bei den ersten drei Strukturen, wohingegen auf Struktur 4 deut-

lich weniger Zellen vorlagen und auf Struktur 5 beinahe keine Ausrichtung zu erkennen war. Die deutlichste Anordnung wurde auf Struktur 2 beobachtet, auf der die höchste Steghöhe mit knapp 520 nm vorlag. Auch bei Fibroblasten auf Struktur 1 und 3 stellte sich ein paralleles Wachstum ein. Hier betrug die Steghöhen 320 nm und mehr als 180 nm. Allein die Dimension der Steghöhe kann nicht als Erklärung für die Anordnung der Fibroblasten dienen, da Struktur 4 eine mit knapp 200 nm eine ähnliche Steghöhe wie Struktur 3 besitzt, wobei die Zellzahl und die Ausrichtung geringer sind. Offensichtlich ist die Kombination der Stegbreite von 330 nm und die Steghöhe mit knapp 200 nm für Fibroblasten weniger attraktiv. Auf Struktur 5 mit der geringsten Steghöhe von knapp 100 nm und einer Stegbreite von knapp 200 nm wuchsen die Zellen beinahe ungerichtet und in hoher Anzahl. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine parallele Ausrichtung primärer Fibroblasten erst bei einer Steghöhe von 180 nm erreichbar ist, wobei eine 520 nm Tiefe die deutlichste Anordnung an die fibrillären Strukturen induzierte. Auch die Stegbreite spielt dabei eine Rolle. Die bioinspirierten Dimensionen basieren auf den Durchmessern von großen Kollagen-Fibrillen, die zwischen 300-500 nm betragen [49, 155]. Struktur 1, 2 und 4 befinden sich in diesem Bereich und bei Struktur 1 und 2 ergab sich auch eine sehr ausgeprägte parallele Ausrichtung der Fibroblasten.

Dies lässt sich in Fluoreszenzaufnahmen von Aktin und Vinculin bestätigen. Auf unstrukturierten Substraten besaßen die Zellen ungeordnete Aktin-Stressfasern, während auf Struktur 1-3 eine auffällig parallele Anordnung dieser Aktin-Fasern entlang der fibrillären Strukturen zu beobachten war. Weniger parallel ausgerichtet erscheinen die Stressfasern auf Struktur 4 und 5. Vinculin wird sowohl in der Umgebung des Nucleus in diffuser Form als auch strich- oder punktförmig am Ende der Stressfasern exprimiert. Dies stimmt mit Beobachtungen aus der Literatur überein [215]. Aus dieser Färbung geht also hervor, dass sich das Aktin-Cytoskelett an den fibrillären Substraten mehr oder weniger deutlich ausrichtet. Zudem bestätigen die Aufnahmen eine Ausbildung von Stressfasern auf Polystyrol-Oberflächen.

#### **5.2.2.2 WST-1 Proliferationstest**

Der WST-1 Proliferationstest wurde sowohl für unstrukturiertes Polystyrol und fibrillärer Polystyrol-Substrate der gleichen Funktionalisierung durchgeführt. So ließen sich strukturelle von chemischen Effekten trennen. Bei Keratinozyten ergaben sich, wie schon bei den globulären Substraten beobachtet, die höchsten Werte für aminofunktionalisierte Substrate. Diese Vorliebe ist unabhängig von der Methode zur Funktionalisierung reproduzierbar. Ähnliche Ergebnisse beobachteten auch Eves et al. [183]. Vermutlich liegt die Erklärung in der Proteinadsorption auf diesen positiv geladenen Substraten. Zudem zeigte sich im WST-Test, dass die ermittelten Werte stets höher für die nichtstrukturierten Substrate im Vergleich zu fibrillären Oberflächen gleicher Funktionalisierung waren. Dies kann zum einen an der Strukturierung selbst liegen, oder aber am Versuchsaufbau, da die strukturierte Polystyrol-Platte sich in einer Petrischale befindet, ohne fest verankert zu sein. Teilweise bilden sich Luftblasen unter der Platte, so dass es zu geringen Strömungen im Medium kommt und so die Adhäsion der Zellen beeinträchtigt werden kann.



Auch bei den Fibroblasten lagen die gemessenen Werte der strukturierten Substrate unter denen der unstrukturierten Oberflächen mit der gleichen Funktionalisierung. Auffällig hierbei war das signifikant bessere Wachstum der Zellen auf carboxy- im Vergleich zu amino-modifizierten Substraten. Diese Resultate ergänzen die Beobachtungen der globulären Oberflächen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Keratinozyten auf amino-silanisierten Substraten, lagen bei Zellen auf plasma-behandelten Substraten keine Werte über denen von Zellen auf kommerziellen Zellkultur-Petrischalen. Zu erwähnen bleiben zudem die geringeren Messwerte für unbehandelte Petrischalen. Auf ihnen adhärten so gut wie keine Fibroblasten. Eine Erklärung hierfür lässt sich von den Ergebnissen der Massenspektrometrie ableiten. Daraus geht hervor, dass Albumin, als Hauptproteinkomponente von fötalem Kälberserum so gut wie nicht auf unbehandeltem Polystyrol adsorbiert, was wiederum die Zelladhäsion beeinflussen kann. Diese geringe Haftung ist auch für andere Serumproteine bekannt [164]. Es zeigte sich, dass insbesondere die Adhäsion des Proteins Vitronektin aus dem Medium für die Zellanbindung notwendig ist. Vitronektin und Fibronektin verdrängen nach einiger Zeit Albumin von der Oberfläche. Beide Proteine besitzen RGD-Sequenzen, an die Integrine spezifisch anhaften [35, 216]. Da diese Proteine auf unbehandeltem Polystyrol kaum adsorbieren, lassen sich so die geringeren Werte der Fibroblasten erklären. Auf den anderen Substraten findet mit der Zeit der Austausch von Albumin durch andere Proteine statt, wodurch die Zelladhäsion möglich ist. Da das Keratinozytenmedium kein Serum enthält, fallen die Messergebnisse dieses Zelltyps im WST-Test mit über 90% deutlich höher aus.

### **5.2.2.3 Differenzierung und Funktionalität primärer Zellen**

Differenzierungsfärbungen humaner Keratinozyten wiesen auf allen Substraten p63 und Cytokeratin 14 exprimierende Zellen auf. Besonders das für basale Keratinozyten charakteristische Intermediärfilament Cytokeratin 14 lag in 95%-100% der Zellen vor [217]. P63 hingegen wurde seltener exprimiert, wobei sich keine ausgeprägten Unterschiede zwischen den Funktionalisierungen ausmachen ließen, lediglich die Strukturierung schien die Expression von p63 leicht zu beeinträchtigen. Trotzdem existierten p63 positive Vorläuferzellen auf allen Substraten. Zur Quantifizierung dieser epidermalen Vorläuferzellen sind molekularbiologische Methoden erforderlich, wobei diese Arbeit den Beweis vorlegt, dass epidermale Vorläuferzellen auf bioinspirierten Substraten kultivierbar sind. Basierend auf diesen Beobachtungen sollte die Entwicklung von Kultivierungsoberflächen für (epidermale) Stammzellen fortgeführt werden. Die *in vitro* Nachahmung von Stammzellnischen mit ihren komplexen Stimuli stellt eine zentrale Herausforderung in der Biomaterialforschung dar [218]. Der Bedarf an Stammzellen erstreckt sich von der Grundlagenforschung bis hin zur klinischen Anwendung [219]. So ließen sich beispielsweise großflächige Wundauflagen für Brandopfer mit Hilfe von epidermalen Stammzellen aufbauen [220].

Die Kollagen Typ I-Expression von primären Fibroblasten, die auf fibrillären Oberflächen 48 h kultiviert wurden, zeigte keine Beeinträchtigung. Obwohl die Zellen parallel ausgerichtet sind und eine größtenteils längliche Morphologie besitzen, ist die Kollagen Produktion in der Umgebung des Nucleus sichtbar. Einzelne Zellen

weisen einen ausgespreiteten, großen, nahezu komplett braun gefärbten Zellkörper auf. Bei dieser Morphologie handelt es sich um die charakteristische Zellform von Fibroblasten, die Matrix Proteine wie Kollagen produzieren [60]. Mit zunehmender Kultivierungsdauer kommt es zur Kontaktinhibition der Zellen, was sich durch eine Abnahme der Proliferation kennzeichnet [221]. Fibroblasten reduzieren bei Kontaktinhibition zunehmend die Produktion von Kollagen Typ I [189].

#### **5.2.2.4 Zell-Zell Kontakte und REM-Aufnahmen**

Färbungen von Zell-Zell Kontakten gaben Aufschluss über den Einfluss fibrillärer Strukturen auf deren Ausbildung. Keratinozyten bilden Adherence Junctions zu benachbarten Zellen aus, wobei E-Cadherin eine wichtige Komponente dieser Zell-Zell Kontakte ist [90, 222, 223]. Es zeigten sich keine Unterschiede in der E-Cadherin-Expression von Keratinozyten auf den fibrillären Polystyrol-Substraten im Vergleich zu Zellen auf nichtstrukturierten Bereichen. Die Entstehung von Zell-Zell Kontakten scheint durch die fibrillären Strukturen nicht behindert zu sein.

Auch Fibroblasten besitzen Zell-Zell Kontakte. Bei einer Färbung gegen verschiedene Cadherine war diese deutlich zu sehen. Die fibrilläre Strukturierung scheint keinen Einfluss auf die Ausbildung der Zell-Zell Kontakte zu haben. Genau wie auf unstrukturierten Substraten entstehen zwischen benachbarten Zellen strichförmige und teilweise sehr dichte Zell-Zell Kontakte. Diese Strukturen können durch eine Expression von N-Cadherin in Fibroblasten erzeugt werden [201, 203]. Der PAN Cadherin Antikörper beinhaltet auch Antikörper gegen N-Cadherin.

Detaillierte Einblicke in die Zellmorphologie erlauben REM-Aufnahmen. Keratinozyten auf plasmabehandelten Polystyrol-Petrischalen zeigen auffällige Unterschiede in der Ausbildung von Filopodien. Diese Strukturen haben sensorische Fähigkeiten und steuern die Zellmigration und Adhäsion, wobei genaue Abläufe bislang ungeklärt sind [224, 225]. Während diese fingerförmigen Cytoplasmaausstülpungen auf der kommerziellen Zellkultur Oberfläche nur vereinzelt, ungeordnet und relativ kurz vorlagen, waren auf unbehandeltem Polystyrol lange, geordnete Filopodien zu sehen. Auf CO<sub>2</sub>-funktionalisierten Substraten ähnelten die aktinbasierenden Strukturen eher der Zellkultur Petrischale, lediglich die Anzahl lag höher. Diese Beobachtungen unterstreichen die chemische Ähnlichkeit der erzeugten CO<sub>2</sub>-modifizierten Oberflächen zu kommerziell erhältlichen Zellkultur Petrischalen. Keratinozyten auf carboxy-funktionalisierten Oberflächen besaßen verhältnismäßig kurze, parallele Filopodien. Für amino-modifizierte Substrate wiesen Keratinozyten lange, teilweise verzweigte, geordnete Filopodien auf. Es scheint also die Oberflächenchemie von Substraten einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung dieser Cytoplasmaausstülpungen zu haben. Dies ist insofern wichtig, da den Filopodien sensorische Fähigkeiten zugeschrieben werden, die primär für die Migration und damit auch das Überleben der Zelle ausschlaggebend sind [217]. Bei der Kultivierung der Zellen auf fibrillären Substraten ließ sich eine Korrelation zwischen Rauheit der Substrate und Ausbildung von Filopodien erkennen. So waren auf den rauen Strukturen 2 und 1 nur vereinzelte Filopodien sichtbar, während deren Anzahl mit abnehmender Rauheit kontinuierlich

anstieg. Diese Ergebnisse sind mit den Beobachtungen auf globulären Oberflächen vergleichbar, wo die Ausbildung der fingerartigen Aktinstrukturen ebenfalls auf den rauen Substraten abnahm. Vermutlich wird durch die zunehmende Strukturierung die Entstehung der Filopodien eingeschränkt.

Fibroblasten auf unterschiedlich funktionalisierten Substraten bildeten filopodien-ähnliche Strukturen zu benachbarten Zellen aus, die vermutlich zur Kommunikation genutzt werden. Auch faserförmige, ca. 15 µm lange Fortsätze waren zu sehen, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Retraktionsspuren handelt. Diese hinterlassen Zellen bei der Migration [121, 226]. Einige dieser Strukturen könnten auch Filopodien sein, allerdings ist bekannt, dass Fibroblasten weniger dieser sensorischen Strukturen ausbilden als Keratinozyten. Einziger Unterschied zwischen den Oberflächen war die schlechtere Adhäsion und Proliferation der Fibroblasten auf unbehandeltem Polystyrol, was sich vermutlich mit einer verminderten oder veränderten Proteinadsorption auf diesem Material erklären lässt. Der bereits lichtmikroskopisch erkennbare Einfluss der fibrillären Strukturierung auf die Anordnung der Fibroblasten bestätigte sich auch in den REM-Aufnahmen. Besonders deutlich ist die Anordnung der Zellen auf Struktur 1 und 2 zu sehen, wohingegen dies auf anderen Strukturen weniger ausgeprägt war. Eine direkte Gegenüberstellung hebt den Einfluss der Strukturierung nochmals hervor. Bei Struktur 1 und 2 vollzieht sich eine Anpassung der Morphologie an die Oberflächen, die Zellen liegen schmal und langgestreckt auf den fibrillären Strukturen. Fibroblasten auf den anderen Strukturierungen sind ausgespreitet und besitzen große Zellkörper mit deutlich sichtbarem Nucleus. Diese Strukturen mit geringerer Rauheit beeinflussen die Zellmorphologie weniger stark, was zum einen an der geringeren Strukturtiefe, eventuell auch am mangelnden biologischen Bezug liegen kann. Fibroblasten sind *in vivo* meist von einer Kollagenmatrix umgeben [227]. An diesen fibrillären Strukturen orientieren sich die Zellen. Struktur 1 und 2 scheinen eine ähnliche Geometrie und Dimension zu den großen Kollagen-Fibrillen aufzuweisen.

### **5.2.3 Fazit der biologischen Ergebnisse**

Die biologischen Ergebnisse lassen sich zu folgenden Beobachtungen zusammenfassen: Sowohl die Strukturierung als auch die Funktionalisierung der Substrate lösten morphologische und physiologische Reaktionen bei primären Hautzellen aus. Keratinozyten besaßen auf globulären oder fibrillären Oberflächen mit hoher Rauheit langgestreckte Zellkörper, eine Morphologie, die für migrierende Zellen charakteristisch ist. Fibroblasten hingegen richteten sich an den fibrillären Substraten aus, besonders wenn diese eine hohe Rauheit besaßen. Diese morphologische Reaktion basiert sehr wahrscheinlich darauf, dass Fibroblasten *in vivo* von einer extrazellulären Matrix aus Kollagen umgeben sind, die durch die fibrillären Substrate nachgeahmt werden sollte. Die Tatsache, dass Keratinozyten vereinzelt ebenfalls auf diese fibrillären Strukturen mit hoher Rauheit reagieren, bestärkt die topografische Ähnlichkeit zu Kollagen. Keratinozyten migrieren besonders bei der Wundheilung [131]. Offensichtlich liefern fibrilläre Substrate mit einer Breite von knapp 400-510 nm und einer Höhe von ca. 320-520 nm in Kombination mit CO<sub>2</sub>- oder carboxy-

funktionalisierten Substraten deutliche Signale zur Migration der Keratinozyten. Alle adhärenen Zellen bildeten Aktin und Vinculin aus. Auffällig war, dass auf den fibrillären Oberflächen mit hoher Rauheit Stressfasern parallel zu der Strukturierung vorlagen. Aktuell wird davon ausgegangen, dass fest adhärenen Zellen diese Aktin-Fasern ausbilden, was wieder auf Parallelen zu der Adhäsion von Fibroblasten *in vivo* an Kollagenfasern und -fibrillen hindeutet.

Der WST-1 Proliferationstest ergab klare Resultate. Für Keratinozyten ließen sich stets auf amino-modifizierten Substraten die höchsten Werte – auch im Vergleich zu kommerziellen Zellkultur Petrischalen – ermitteln. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Funktionalisierung, also bei silanisierten als auch bei plasmabehandelten Oberflächen eindeutig zu reproduzieren. Vermutlich ist die Begründung in der Proteinadsorption zu finden. Bei Fibroblasten zeigte sich lediglich eine leichte Präferenz von carboxy-, gegenüber amino-funktionalisierten Substraten, wobei die höchsten Werte im WST-Test bei Zellkultur Petrischalen erzielt wurden. Entscheidend bei diesen Ergebnissen ist sicherlich die Tatsache, dass sich im Keratinozytenmedium kein Serum befindet, während das Fibroblastenmedium Serum enthält. Dies ist insofern von Bedeutung, da Serumproteine wie Fibronectin oder Vitronectin spezifische Adhäsionsmotive besitzen, die eine feste Anhaftung der Zellen ermöglichen. So lässt sich auch das schnelle Ausbreiten von Fibroblasten innerhalb von Minuten erklären. Keratinozyten hingegen benötigen mehrere Stunden bis sie fest am Substrat verankert sind. Auf den Oberflächen wird vornehmlich Insulin aus dem KBMr anhaften. Während die Zellen mit Insulin interagieren, produzieren sie gleichzeitig ECM Proteine wie Laminine, die spezifische Adhäsionssequenzen aufweisen und somit ein verspätetes Ausbreiten der Keratinozyten ermöglichen [189].

Zunehmende Rauheit von globulären Oberflächen führte zu niedrigeren Werten, was mit einer beeinträchtigten Adhäsion zu erklären ist. Die Messung der LDH-Konzentration bestätigte die Ergebnisse des WST-Tests. Zur Kommunikation wichtige Zell-Zell Kontakte bildeten Zellen auf allen Substraten aus. Ungeklärt ist die abnorme Häufung von Cadherinen in Keratinozyten auf globulären Oberflächen im Mikrometerbereich. Dort vollzog sich mehrfach eine Verlagerung dieser Proteine von den Zell-Zell Grenzflächen an den Rand der Zelle. Der Differenzierungsgrad der Keratinozyten auf den Substraten ist als sehr früh einzustufen. Beinahe alle Zellen exprimierten Cytokeratin 14. P63, als potentieller Stammzellmarker, war vereinzelt auf allen Oberflächen vorhanden. Tendenziell scheinen diese Vorläuferzellen oft am Rand von Kolonien zu liegen und möglicherweise vermehrt auf carboxy-modifizierten Substraten vorzukommen. Ein Einfluss der Strukturierung zeigte sich auf fibrillären Oberflächen mit weniger p63-exprimierende Keratinozyten. Diese Erkenntnisse könnten als Basis für die Erforschung und Entwicklung von epidermalen Stammzell-nischen dienen. Dabei sind besonders materialspezifische Aspekte wie die Strukturierung oder chemische Zusammensetzung mit einzubeziehen [228]. Fibroblasten produzierten auf allen Substraten Kollagen Typ I, sie wurden also weder durch Funktionalisierung noch durch Strukturierung der Oberflächen in ihrer Funktionalität beeinflusst. Die Analyse von REM-Aufnahmen ergab für Keratinozyten eine vermin-

derte Ausbildung von Filopodien auf rauen Substraten. Durch verschiedene Funktionalisierungen erschien die Morphologie dieser Aktin-Ausstülpungen verändert. Möglicherweise liegt auch hier die Erklärung in der unterschiedlichen Proteinadsorption. Da Filopodien sensorische Eigenschaften besitzen, ist eine Morphologieänderung auf Grund ungleicher Umgebungsreize durchaus denkbar. Auch Fibroblasten besitzen Filopodien, zudem bilden sie faserartige Retraktionsspuren. Besonders auffällig bei der detaillierten Betrachtung der Morphologie war die parallele Anordnung an die fibrillären Strukturen. Dabei erstreckten sich die Zellkörper über möglichst wenige Rillen und wiesen eine sehr schmale, langgestreckte Form auf.

### 5.3 Ausblick

Die aktuelle Forschung im Bereich Biomaterialien zeichnet sich insbesondere durch bioinspirierte und biomimetische Ansätze aus [3, 5]. Eine umfassende Kenntnis zu zelltypspezifischen Material-Wechselwirkungen dient als Grundlage zur Entwicklung optimierter Implantate [2, 11]. Essentiell sind solche zelltypspezifischen Informationen im Tissue Engineering, um eine funktionelle Kultivierung primärer Zellen zu gewährleisten [17, 19]. Vor allem der *in vitro* Aufbau von Stammzellnischen bietet ein großes Potential, denn Stammzellen liegen *in vivo* in einer komplexen Mikroumgebung vor, die über zahlreiche Stimuli verfügt [23, 188, 229, 230].

Deshalb ist eine Zunahme von detaillierten Untersuchungen des Einflusses verschiedener Materialeigenschaften auf Zellen zu beobachten. So zeigten sich in zahlreichen Studien direkte zelluläre Reaktionen auf Topografie oder chemische Zusammensetzung der Oberflächen [231-233]. Eine große Bedeutung hat die Proteinadsorption an die erzeugten Materialgrenzflächen, da Zellen *in vivo* und *in vitro* mit dieser Proteinschicht interagieren [234]. Die massenspektrometrische Analyse der adsorbierten Proteine stellt eine vielversprechende, innovative Methode dar, die zunehmend Einzug in die Biomaterialforschung findet [163]. In dieser Arbeit ermöglichten Messungen mit MALDI-TOF MS, anhand stark vereinfachter Modelle, bereits grundlegende Aussagen zur Proteinadsorption. Genauere Untersuchungen komplexerer Adsorptionsvorgänge im sub-attomolaren Bereich, wie sie *in vivo* und *in vitro* vorkommen, sind mit dieser Methode grundsätzlich möglich und tragen in den kommenden Jahren sicher zu aufschlussreichen Einblicken in die Proteinadsorption bei.

Für eine optimierte Kultivierung primärer Keratinozyten lassen sich in Zukunft aminomodifizierte Substrate nutzen. Interessant wäre es herauszufinden, worauf diese Präferenz beruht, wobei wiederum massenspektrometrische Analysen Aufschluss bieten könnten. Auch eine Weiterverfolgung des Migrationsverhaltens auf rauen fibrillären Substraten, die CO<sub>2</sub>- oder carboxy-funktionalisiert sind, ist von Bedeutung. Grutner et al. postulierten im Jahr 2008 in Nature, dass neue Strategien für die Wundheilung erst mit dem genauen Verständnis des Migrationsverhaltens epidermaler Zellen erfolgen können [235]. Die in dieser Arbeit gezeigten Erkenntnisse zur Migration sollten detaillierter betrachtet werden, um den Einfluss der strukturellen oder chemischen Modifikation genauer zu beleuchten. Darauf aufbauend ergeben sich verschiedene Vorgehensweisen, z.B. die detaillierte Betrachtung der Integri-

Expression bei migrierenden und adhärenen Zellen anhand von *Live Cell* Mikroskopie. Zudem wäre eine spezifische Funktionalisierung der Substrate mit Adhäsionssequenzen verschiedener ECM-Proteine aufschlussreich.

Die Identifikation und Kultivierung von epidermalen Stammzellen und ihre nischen-spezifischen Stimuli stellen ein aktuelles Forschungsgebiet mit hoher Relevanz dar [236]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf verschiedenen Substraten epidermale Vorläuferzellen gefunden, wobei deren Anzahl auf carboxy-modifizierten Oberflächen tendenziell am höchsten war. Zur Quantifizierung dieser Theorie sollten molekularbiologische Methoden, wie die Real-Time RT PCR Aufschluss geben.

Im Hinblick auf den Aufbau von Stammzellnischen *in vitro* spielt die Identifikation materialbedingter Stimuli zur Aufrechterhaltung von stammzellspezifischen Eigenschaften sowie deren gezielte Differenzierung eine entscheidende Rolle [237, 238].

Morphologische Unterschiede in der Ausbildung von Filopodien scheinen zunächst nur für die Grundlagenforschung von Interesse zu sein. Da diese Aktin-Ausstülpungen über sensorische Fähigkeiten verfügen und somit die Zelle direkt steuern, ist ihre Erforschung auch für Anwendungen von Biomaterialien wichtig [239]. Mit *Live Cell* Mikroskopie ließe sich deren Entstehung und Bewegung genauer verfolgen und zusätzliche durch molekularbiologische Methoden charakterisieren.

Fibroblasten zeigten eine deutliche Ausrichtung an den strukturierten Substraten. Dieses Phänomen ist auch als *Contact Guidance* bekannt [240]. Auch hier wäre eine Beobachtung der Anordnung der Zellen und der Aktin-Fasern mit *Live Cell* Mikroskopie interessant, zudem könnte diese Methode Aufschluss über das Migrationsverhalten der Zellen geben. Anwendungsrelevante Ergebnisse dieser Arbeit basieren eher auf Oberflächen, die die Adhäsion und Proliferation von Fibroblasten hemmen. Viele Implantate erlangen keine feste Verankerung im Gewebe, da statt der gewebe-spezifischen Zellen Fibroblasten an den Materialoberflächen haften [6]. In dieser Arbeit wurden verschiedene Modifikationen identifiziert, die die Adhäsion oder das Wachstum der Zellen inhibieren. Diese Strukturierungen oder chemischen Oberflächeneigenschaften lassen sich auf relevante Implantatmaterialien übertragen. Daran anschließend sollte eine ausführliche *in vitro* Untersuchung erfolgen, um ein vermindertes Adhären und Proliferieren von Fibroblasten zu dokumentieren. Ist dies erfolgreich, schließt sich eine Implantation der Materialien in Tiermodelle, sowie die Charakterisierung der Verankerung des Implantates an.

Als Fazit dieser Arbeit lässt sich eindeutig belegen, dass die bioinspirierte Strukturierung und Funktionalisierung von Substraten morphologische und physiologische Reaktionen induziert. Dem Aufbau eines umfassenden Wissens bezüglich zelltyp-spezifischer Reaktionen auf Materialeigenschaften liegen zwei grundlegende Vorgehensweisen zugrunde: Das Screening möglichst vieler Zelltypen, auch von Pilzen und Bakterien sowie die Herstellung und Untersuchung zahlreicher bioinspirierter Strukturierungen und Funktionalisierungen. Basierend auf den so schon vorhandenen und stets neu generierten Erkenntnissen sind die Ziele der dritten Generation von Biomaterialien erreichbar.

## 6. Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Williams, D.F., *Tissue-biomaterial interactions*. Journal of Materials Science, 1987. **22**(10): p. 3421-3445.
2. Navarro, M., et al., *Biomaterials in orthopaedics*. J R Soc Interface, 2008. **5**(27): p. 1137-58.
3. Anderson, J.M., *The future of biomedical materials*. J Mater Sci Mater Med, 2006. **17**(11): p. 1025-8.
4. Leeuwenburgh, S.C., et al., *Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress 2008*. Biomaterials, 2008. **29**(21): p. 3047-52.
5. Hench, L.L. and J.M. Polak, *Third-generation biomedical materials*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1014-7.
6. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941-53.
7. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2529-43.
8. Traykova, T., et al., *Bioceramics as nanomaterials*. Nanomedicine, 2006. **1**(1): p. 91-106.
9. Ulijn, R.V., et al., *Bioresponsive hydrogels*. Materials Today, 2007. **10**(4): p. 40-48.
10. Jones, J., *Observing cell response to biomaterials* Materials Today, 2006. **9**(12): p. 34-43.
11. Moroni, L. and J.H. Elisseeff, *Biomaterials engineered for integration*. Materials Today, 2008. **11**(5): p. 44-51.
12. Balasundaram, G. and T.J. Webster, *Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications*. Nanomedicine, 2006. **1**(2): p. 169-176.
13. Ratner, B.D., *Replacing and renewing: synthetic materials, biomimetics, and tissue engineering in implant dentistry*. J Dent Educ, 2001. **65**(12): p. 1340-7.
14. Krsko, P. and M. Libera, *Biointeractive hydrogels*. Materials Today, 2005. **8**(12): p. 36-44.
15. Bao, G. and S. Suresh, *Cell and molecular mechanics of biological materials*. Nat Mater, 2003. **2**(11): p. 715-25.
16. Stock, U.A. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: current state and prospects*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 443-51.
17. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1009-14.
18. Liu, W.F. and C.S. Chen, *Engineering biomaterials to control cell function*. Materials Today, 2005. **8**(12): p. 28-35.
19. Ikada, Y., *Challenges in tissue engineering*. J R Soc Interface, 2006. **3**(10): p. 589-601.
20. Curtis, A. and M. Riehle, *Tissue engineering: the biophysical background*. Phys Med Biol, 2001. **46**(4): p. R47-65.
21. Semino, C.E., *Can We Build Artificial Stem Cell Compartments?* J Biomed Biotechnol, 2003. **2003**(3): p. 164-169.
22. Griffith, L.G. and A.J. Grodzinsky, *Advances in biomedical engineering*. Jama, 2001. **285**(5): p. 556-61.
23. Evans, N.D., E. Gentlemana, and J.M. Polak, *Scaffolds for stem cells* Materials Today, 2006. **9**(12): p. 26-33.
24. Wood, M.A., *Colloidal lithography and current fabrication techniques producing in-plane nanotopography for biological applications*. J R Soc Interface, 2007. **4**(12): p. 1-17.



25. Hasirci, V. and H. Kenar, *Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior*. *Nanomedicine*, 2006. **1**(1): p. 73-90.
26. Flemming, R.G., et al., *Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior*. *Biomaterials*, 1999. **20**(6): p. 573-88.
27. Berry, C.C., et al., *The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility*. *Biomaterials*, 2004. **25**(26): p. 5781-8.
28. Cavalcanti-Adam, E.A., et al., *Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly*. *Eur J Cell Biol*, 2006. **85**(3-4): p. 219-24.
29. Cavalcanti-Adam, E.A., et al., *Geometric organization of the extracellular matrix in the control of integrin-mediated adhesion and cell function in osteoblasts*. *Prog Orthod*, 2005. **6**(2): p. 232-7.
30. Diener, A., et al., *Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics*. *Biomaterials*, 2005. **26**(4): p. 383-92.
31. Kunzler, T.P., et al., *Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients*. *Biomaterials*, 2007. **28**(13): p. 2175-82.
32. Discher, D.E., P. Janmey, and Y.L. Wang, *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate*. *Science*, 2005. **310**(5751): p. 1139-43.
33. Engler, A.J., et al., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 677-89.
34. Curran, J.M., R. Chen, and J.A. Hunt, *Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces*. *Biomaterials*, 2005. **26**(34): p. 7057-67.
35. Faucheux, N., et al., *Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies*. *Biomaterials*, 2004. **25**(14): p. 2721-30.
36. Ito, A., et al., *The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting*. *Biomaterials*, 2005. **26**(31): p. 6185-93.
37. Rho, K.S., et al., *Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing*. *Biomaterials*, 2006. **27**(8): p. 1452-61.
38. Bissell, M.J., *The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture*. *Int Rev Cytol*, 1981. **70**: p. 27-100.
39. Lutolf, M.P. and J.A. Hubbell, *Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(1): p. 47-55.
40. Kasemo, B., *Biological Surface science*. *Surface Science*, 2002. **500**(1-3): p. 656-677.
41. Granjeiro, J.M., et al., *Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use*. *Braz J Med Biol Res*, 2005. **38**(10): p. 1463-73.
42. Naik, R.R. and S. M.O., *Integrating biomimetics*. *Materials Today*, 2005. **8**(9): p. 18-26.
43. Fratzl, P., *Biomimetic materials research: what can we really learn from nature's structural materials?* *J R Soc Interface*, 2007. **4**(15): p. 637-42.
44. Layrolle, P. and G. Daculsi, *Nanostructured biomaterials*. *Nanomedicine*, 2006. **1**(4): p. 493-494
45. Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky, *Environmental sensing through focal adhesions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(1): p. 21-33.
46. Shin, H., *Fabrication methods of an engineered microenvironment for analysis of cell-biomaterial interactions*. *Biomaterials*, 2007. **28**(2): p. 126-33.
47. Isenberg, B. and J. Wong, *Building structure into engineered tissues*. *Materials Today*, 2006. **9**(12): p. 54-60
48. Kreis, T. and R. Vale, *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*. 1999: A Sambrook and Tooze Publication at Oxford University Press.
49. Alberts, B., et al., eds. *Molecular Biology of the Cell*. 5 ed. 2008, Garland Science.

50. Ushiki, T., *Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint.* Arch Histol Cytol, 2002. **65**(2): p. 109-26.
51. Tunggal, P., et al., *Laminins: structure and genetic regulation.* Microsc Res Tech, 2000. **51**(3): p. 214-27.
52. Aumailley, M. and P. Rousselle, *Laminins of the dermo-epidermal junction.* Matrix Biol, 1999. **18**(1): p. 19-28.
53. Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond.* Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4385-415.
54. Timpl, R., *Proteoglycans of basement membranes.* Experientia, 1993. **49**(5): p. 417-28.
55. MacNeil, S., *Biomaterials for tissue engineering of skin.* Materials Today, 2008. **11**(5): p. 26-35.
56. MacNeil, S., *Progress and opportunities for tissue-engineered skin.* Nature, 2007. **445**(7130): p. 874-80.
57. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.* Eur J Dermatol, 2002. **12**(4): p. 390-9; quiz 400-1.
58. Sorrell, J.M. and A.I. Caplan, *Fibroblast heterogeneity: more than skin deep.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 5): p. 667-75.
59. Millar, S.E., *An ideal society? Neighbors of diverse origins interact to create and maintain complex mini-organs in the skin.* PLoS Biol, 2005. **3**(11): p. e372.
60. Abercrombie, M., *Fibroblasts.* J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol), 1978. **12**: p. 1-6.
61. Yurchenco, P.D. and J.C. Schittny, *Molecular architecture of basement membranes.* Faseb J, 1990. **4**(6): p. 1577-90.
62. Briggaman, R.A. and C.E. Wheeler, Jr., *The epidermal-dermal junction.* J Invest Dermatol, 1975. **65**(1): p. 71-84.
63. Fuchs, E., *Epidermal differentiation: the bare essentials.* J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 2): p. 2807-14.
64. Terunuma, A., et al., *Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells.* J Invest Dermatol, 2003. **121**(5): p. 1095-103.
65. Allen, T.D. and C.S. Potten, *Fine-structural identification and organization of the epidermal proliferative unit.* J Cell Sci, 1974. **15**(2): p. 291-319.
66. Fuchs, E., *Keith R. Porter Lecture, 1996. Of mice and men: genetic disorders of the cytoskeleton.* Mol Biol Cell, 1997. **8**(2): p. 189-203.
67. Watt, F.M., *Keratinocyte cultures: an experimental model for studying how proliferation and terminal differentiation are co-ordinated in the epidermis.* J Cell Sci, 1988. **90** ( Pt 4): p. 525-9.
68. Ross, F.P. and A.M. Christiano, *Nothing but skin and bone.* J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1140-9.
69. Dunnwald, M., et al., *Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering.* Exp Dermatol, 2001. **10**(1): p. 45-54.
70. Green, K.J. and J.C. Jones, *Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components.* Faseb J, 1996. **10**(8): p. 871-81.
71. Dowling, J., Q.C. Yu, and E. Fuchs, *Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival.* J Cell Biol, 1996. **134**(2): p. 559-72.
72. Watt, F.M., *Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation.* Embo J, 2002. **21**(15): p. 3919-26.
73. Jones, P.H. and F.M. Watt, *Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression.* Cell, 1993. **73**(4): p. 713-24.
74. Kaur, P. and A. Li, *Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells.* J Invest Dermatol, 2000. **114**(3): p. 413-20.

75. Fuchs, E. and V. Horsley, *More than one way to skin*. Genes Dev, 2008. **22**(8): p. 976-85.
76. Radu, E., et al., *Stem cells (p63(+)) in keratinocyte cultures from human adult skin*. J Cell Mol Med, 2002. **6**(4): p. 593-8.
77. Pellegrini, G., et al., *p63 identifies keratinocyte stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3156-61.
78. Kurata, S., et al., *p51/p63 Controls subunit alpha3 of the major epidermis integrin anchoring the stem cells to the niche*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 50069-77.
79. McKeon, F., *p63 and the epithelial stem cell: more than status quo?* Genes Dev, 2004. **18**(5): p. 465-9.
80. Fuchs, E., *Scratching the surface of skin development*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 834-42.
81. Fuchs, E., *Skin stem cells: rising to the surface*. J Cell Biol, 2008. **180**(2): p. 273-84.
82. Freedberg, I.M., et al., *Keratins and the keratinocyte activation cycle*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(5): p. 633-40.
83. Hardman, M.J., et al., *Patterned acquisition of skin barrier function during development*. Development, 1998. **125**(8): p. 1541-52.
84. Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis*. Cell, 1996. **84**(3): p. 345-57.
85. Gimona, M., C. Grashoff, and P. Kopp, *Oktoberfest for adhesion structures*. EMBO Rep, 2005. **6**(10): p. 922-6.
86. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
87. Berrier, A.L. and K.M. Yamada, *Cell-matrix adhesion*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 565-73.
88. Ebnet, K., *Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(1): p. 1-20.
89. Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2525-32.
90. Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs, *Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions*. Cell, 2003. **112**(4): p. 535-48.
91. Muller, E.J., et al., *Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation?* J Invest Dermatol, 2008. **128**(3): p. 501-16.
92. Defilippi, P. and A.M. Valles, *The winding road from adhesive receptors to the nucleus. Conference on molecular biology of cellular interactions: adhesion receptor signalling and regulation of gene expression*. EMBO Rep, 2002. **3**(4): p. 312-6.
93. Kumar, N.M. and N.B. Gilula, *The gap junction communication channel*. Cell, 1996. **84**(3): p. 381-8.
94. Ruoslahti, E., *Integrins*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 1-5.
95. Schwartz, M.A., *Integrin signaling revisited*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(12): p. 466-70.
96. Wehrle-Haller, B. and B.A. Imhof, *Integrin-dependent pathologies*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 481-7.
97. Yamada, K.M., R. Pankov, and E. Cukierman, *Dimensions and dynamics in integrin function*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(8): p. 959-66.
98. Hynes, R.O. and Q. Zhao, *The evolution of cell adhesion*. J Cell Biol, 2000. **150**(2): p. F89-96.
99. Belkin, A.M. and M.A. Stepp, *Integrins as receptors for laminins*. Microsc Res Tech, 2000. **51**(3): p. 280-301.
100. LaFlamme, S.E. and K.L. Auer, *Integrin signaling*. Semin Cancer Biol, 1996. **7**(3): p. 111-8.
101. Blystone, S.D., *Integrating an integrin: a direct route to actin*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1692**(2-3): p. 47-54.
102. Choquet, D., D.P. Felsenfeld, and M.P. Sheetz, *Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages*. Cell, 1997. **88**(1): p. 39-48.

103. Brakebusch, C. and R. Fassler, *The integrin-actin connection, an eternal love affair*. *Embo J*, 2003. **22**(10): p. 2324-33.
104. Delon, I. and N.H. Brown, *Integrins and the actin cytoskeleton*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(1): p. 43-50.
105. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. *Cell*, 1996. **84**(3): p. 359-69.
106. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
107. Vicente-Manzanares, M., D.J. Webb, and A.R. Horwitz, *Cell migration at a glance*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 21): p. 4917-9.
108. Stossel, T.P., *Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix*. *J Cell Biol*, 1984. **99**(1 Pt 2): p. 15s-21s.
109. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. *Cell*, 2003. **112**(4): p. 453-65.
110. Chhabra, E.S. and H.N. Higgs, *The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(10): p. 1110-21.
111. Giannone, G., et al., *Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation*. *Cell*, 2007. **128**(3): p. 561-75.
112. Verkhovsky, A.B., et al., *Orientational order of the lamellipodial actin network as demonstrated in living motile cells*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(11): p. 4667-75.
113. Giannone, G., et al., *Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves*. *Cell*, 2004. **116**(3): p. 431-43.
114. Mejillano, M.R., et al., *Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end*. *Cell*, 2004. **118**(3): p. 363-73.
115. Partridge, M.A. and E.E. Marcantonio, *Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(10): p. 4237-48.
116. Wood, W. and P. Martin, *Structures in focus--filopodia*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(7): p. 726-30.
117. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. *Cell*, 1995. **81**(1): p. 53-62.
118. Pellegrin, S. and H. Mellor, *Actin stress fibres*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 20): p. 3491-9.
119. Friedl, P. and K. Wolf, *Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process*. *Cancer Metastasis Rev*, 2009.
120. Wolf, K. and P. Friedl, *Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces*. *Clin Exp Metastasis*, 2008.
121. Richter, E., et al., *Trace formation during locomotion of L929 mouse fibroblasts continuously recorded by interference reflection microscopy (IRM)*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2000. **47**(1): p. 38-47.
122. Brunner, H., et al., *Stepwise Growth of Ultrathin SiO<sub>x</sub> Films on Si(100) Surfaces through Sequential Adsorption/Oxidation Cycles of Alkylsiloxane Monolayers*. *Langmuir*, 1996. **12**(20): p. 4614-4617.
123. Li, L., R.W. Garden, and J.V. Sweedler, *Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling*. *Trends Biotechnol*, 2000. **18**(4): p. 151-60.
124. Fuchs, J.R., B.A. Nasser, and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction*. *Ann Thorac Surg*, 2001. **72**(2): p. 577-91.
125. Gelain, F., et al., *Designer self-assembling Peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures*. *PLoS ONE*, 2006. **1**: p. e119.
126. Lovell-Badge, R., *The future for stem cell research*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 88-91.
127. Hipp, J. and A. Atala, *Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy*. *J Exp Clin Assist Reprod*, 2004. **1**(1): p. 3.
128. Stevens, M.M. and J.H. George, *Exploring and engineering the cell surface interface*. *Science*, 2005. **310**(5751): p. 1135-8.

129. Van Vliet, K.J., G. Bao, and S. Suresh, *The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecules*. Acta Materialia, 2003. **51**: p. 5881-5905.
130. Li, Y.S., J.H. Haga, and S. Chien, *Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells*. J Biomech, 2005. **38**(10): p. 1949-71.
131. O'Toole, E.A., *Extracellular matrix and keratinocyte migration*. Clin Exp Dermatol, 2001. **26**(6): p. 525-30.
132. Teti, A., *Regulation of cellular functions by extracellular matrix*. J Am Soc Nephrol, 1992. **2**(10 Suppl): p. S83-7.
133. Abraham, L.C., et al., *Extracellular matrix remodeling--methods to quantify cell-matrix interactions*. Biomaterials, 2007. **28**(2): p. 151-61.
134. Lutolf, M.P., et al., *Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5413-8.
135. Ma, Z., et al., *Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds*. Tissue Eng, 2005. **11**(1-2): p. 101-9.
136. Serban, M.A., Y. Liu, and G.D. Prestwich, *Effects of extracellular matrix analogues on primary human fibroblast behavior*. Acta Biomater, 2008. **4**(1): p. 67-75.
137. Salber, J., et al., *Influence of different ECM mimetic peptide sequences embedded in a nonfouling environment on the specific adhesion of human-skin keratinocytes and fibroblasts on deformable substrates*. Small, 2007. **3**(6): p. 1023-31.
138. Fukuda, J., Y. Sakai, and K. Nakazawa, *Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing*. Biomaterials, 2006. **27**(7): p. 1061-70.
139. Lopez, C.A., et al., *Evaluation of silicon nanoporous membranes and ECM-based microenvironments on neurosecretory cells*. Biomaterials, 2006. **27**(16): p. 3075-83.
140. Schindler, M., et al., *A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture*. Biomaterials, 2005. **26**(28): p. 5624-31.
141. Lim, J.Y., et al., *The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography*. Biomaterials, 2007. **28**(10): p. 1787-97.
142. Elwing, H., *Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research*. Biomaterials, 1998. **19**(4-5): p. 397-406.
143. Tirrell, M., E. Kokkoli, and M. Biesalski, *The role of surface science in bioengineered materials* Surface Science, 2002. **500**(1): p. 61-83.
144. Dee, K.C., D.A. Puleo, and R. Bizios, *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. 2002, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. .
145. Mollmann, S.H., et al., *Interfacial adsorption of insulin conformational changes and reversibility of adsorption*. Eur J Pharm Sci, 2006. **27**(2-3): p. 194-204.
146. Wang, D., et al., *The adsorption of globular proteins onto a fluorinated PDMS surface*. J Colloid Interface Sci, 2009. **331**(1): p. 90-7.
147. Luensmann, D. and L. Jones, *Albumin adsorption to contact lens materials: a review*. Cont Lens Anterior Eye, 2008. **31**(4): p. 179-87.
148. Yampolskaya, G. and D. Platikanov, *Proteins at fluid interfaces: adsorption layers and thin liquid films*. Adv Colloid Interface Sci, 2006. **128-130**: p. 159-83.
149. Decher, G., *Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites*. Science, 1997. **277** (530): p. 1232-1237.
150. Huwiler, C., et al., *Functionalizable Nanomorphology Gradients via Colloidal Self-Assembly*. Langmuir, 2007. **23**(11): p. 5929-35.
151. Lipski, A.M., et al., *Nanoscale Engineering of Biomaterial Surfaces*. 2007. p. 553-557.
152. Maenosono, S., et al., *Growth of a Semiconductor Nanoparticle Ring during the Drying of a Suspension Droplet*. Langmuir, 1999. **15**(4): p. 957-965.
153. Chen, K.M., et al., *Selective Self-Organization of Colloids on Patterned Polyelectrolyte Templates*. Langmuir, 2000. **16**(20): p. 7825-7834.
154. Feder, J., *Random sequential adsorption* Journal of Theoretical Biology, 1980. **87**(2): p. 237-254

155. Kadler, K.E., et al., *Collagen fibril formation*. Biochem J, 1996. **316 ( Pt 1)**: p. 1-11.
156. Ma, Z., Z. Mao, and C. Gao, *Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **60(2)**: p. 137-57.
157. Seitz, R., R. Brings, and R. Geiger, *Protein adsorption on solid-liquid interfaces monitored by laser-ellipsometry* Applied Surface Science, 2005. **252**: p. 154-157.
158. Xu, L.C. and C.A. Siedlecki, *Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces*. Biomaterials, 2007. **28(22)**: p. 3273-83.
159. Thull, R., *Physicochemical principles of tissue material interactions*. Biomol Eng, 2002. **19(2-6)**: p. 43-50.
160. Siow, K.S., et al., *Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review*. Plasma Processes and Polymers, 2006. **3**: p. 392-418.
161. Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Techniques*. 5 ed. 2005, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
162. Duncan, M.W., H. Roder, and S.W. Hunsucker, *Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2008. **7(5)**: p. 355-70.
163. Griesser, H.J., et al., *Surface-MALDI mass spectrometry in biomaterials research*. Biomaterials, 2004. **25(20)**: p. 4861-75.
164. Steele, J.G., et al., *Polystyrene chemistry affects vitronectin activity: an explanation for cell attachment to tissue culture polystyrene but not to unmodified polystyrene*. J Biomed Mater Res, 1993. **27(7)**: p. 927-40.
165. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 1 ed. 2007, München: Elsevier GmbH.
166. Geiger, B. and A. Bershadsky, *Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors*. Cell, 2002. **110(2)**: p. 139-42.
167. Turner, C.E., *Paxillin interactions*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 23**: p. 4139-40.
168. Ziegler, W.H., R.C. Liddington, and D.R. Critchley, *The structure and regulation of vinculin*. Trends Cell Biol, 2006. **16(9)**: p. 453-60.
169. Tinkle, C.L., et al., *New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105(40)**: p. 15405-10.
170. Cerejido, M., L. Shoshani, and R.G. Contreras, *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279(3)**: p. G477-82.
171. Tinkle, C.L., et al., *Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101(2)**: p. 552-7.
172. Blanpain, C., et al., *Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche*. Cell, 2004. **118(5)**: p. 635-48.
173. Blanpain, C. and E. Fuchs, *p63: revving up epithelial stem-cell potential*. Nat Cell Biol, 2007. **9(7)**: p. 731-3.
174. Koster, M.I., S. Kim, and D.R. Roop, *P63 deficiency: a failure of lineage commitment or stem cell maintenance?* J Invest Dermatol Symp Proc, 2005. **10(2)**: p. 118-23.
175. Senoo, M., et al., *p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia*. Cell, 2007. **129(3)**: p. 523-36.
176. Horstmeyer, A., et al., *Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1*. Febs J, 2005. **272(24)**: p. 6297-309.
177. Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small, *Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34(7)**: p. 746-61.
178. Kunzler, T.P., et al., *Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients*. Biomaterials, 2007. **28(33)**: p. 5000-6.
179. Zimerman, B., T. Volberg, and B. Geiger, *Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading*. Cell Motil Cytoskeleton, 2004. **58(3)**: p. 143-59.

180. Kaiser, J.P., A. Reinmann, and A. Bruinink, *The effect of topographic characteristics on cell migration velocity*. *Biomaterials*, 2006. **27**(30): p. 5230-41.
181. Dalby, M.J., *Topographically induced direct cell mechanotransduction*. *Med Eng Phys*, 2005. **27**(9): p. 730-42.
182. Sethuraman, A. and G. Belfort, *Protein structural perturbation and aggregation on homogeneous surfaces*. *Biophys J*, 2005. **88**(2): p. 1322-33.
183. Eves, P.C., et al., *A chemically defined surface for the co-culture of melanocytes and keratinocytes*. *Biomaterials*, 2005. **26**(34): p. 7068-81.
184. Lord, M.S., et al., *The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response*. *Biomaterials*, 2006. **27**(28): p. 4856-62.
185. Yancey, K.B., *Adhesion molecules. II: Interactions of keratinocytes with epidermal basement membrane*. *J Invest Dermatol*, 1995. **104**(6): p. 1008-14.
186. Zhou, J.X., et al., *Enrichment and identification of human 'fetal' epidermal stem cells*. *Hum Reprod*, 2004. **19**(4): p. 968-74.
187. Morasso, M.I. and M. Tomic-Canic, *Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing*. *Biol Cell*, 2005. **97**(3): p. 173-83.
188. Bianco, P. and P.G. Robey, *Stem cells in tissue engineering*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 118-21.
189. Wang, T.W., et al., *Skin basement membrane and extracellular matrix proteins characterization and quantification by real time RT-PCR*. *Biomaterials*, 2006. **27**(29): p. 5059-68.
190. Green, H., K. Easley, and S. Iuchi, *Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(26): p. 15625-30.
191. Blanpain, C., V. Horsley, and E. Fuchs, *Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves*. *Cell*, 2007. **128**(3): p. 445-58.
192. Li, A., P.J. Simmons, and P. Kaur, *Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3902-7.
193. Knoblich, J.A., *Mechanisms of asymmetric stem cell division*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 583-97.
194. Watt, F.M., *Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998. **353**(1370): p. 831-7.
195. Alonso, L. and E. Fuchs, *Stem cells in the skin: waste not, Wnt not*. *Genes Dev*, 2003. **17**(10): p. 1189-200.
196. Bickenbach, J.R. and K.L. Grinnell, *Epidermal stem cells: interactions in developmental environments*. *Differentiation*, 2004. **72**(8): p. 371-80.
197. Alonso, L. and E. Fuchs, *Stem cells of the skin epithelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11830-5.
198. Lavker, R.M. and T.T. Sun, *Epidermal stem cells: properties, markers, and location*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(25): p. 13473-5.
199. Lechler, T. and E. Fuchs, *Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin*. *Nature*, 2005. **437**(7056): p. 275-80.
200. Ghosh, A.K., *Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002. **227**(5): p. 301-14.
201. El Sayegh, T.Y., A. Kapus, and C.A. McCulloch, *Beyond the epithelium: cadherin function in fibrous connective tissues*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(2): p. 167-74.
202. Vasioukhin, V., et al., *Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion*. *Cell*, 2000. **100**(2): p. 209-19.
203. Derycke, L.D. and M.E. Bracke, *N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling + N-Cadherin in Fibroblasten*. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 463-76.
204. Dalby, M.J., et al., *Investigating filopodia sensing using arrays of defined nano-pits down to 35 nm diameter in size*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(10): p. 2005-15.

205. Kim, M.H., et al., *Response of human epithelial cells to culture surfaces with varied roughnesses prepared by immobilizing dendrimers with/without D-glucose display*. J Biosci Bioeng, 2007. **103**(2): p. 192-9.
206. Grinnell, F., *Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation*. J Cell Sci, 1992. **101 ( Pt 1)**: p. 1-5.
207. Goldfinger, L.E., et al., *The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 16)**: p. 2615-29.
208. Steffensen, B., L. Hakkinen, and H. Larjava, *Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules*. Crit Rev Oral Biol Med, 2001. **12**(5): p. 373-98.
209. Hertle, M.D., et al., *Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis*. J Clin Invest, 1992. **89**(6): p. 1892-901.
210. Delwel, G.O., et al., *Distinct and overlapping ligand specificities of the alpha 3A beta 1 and alpha 6A beta 1 integrins: recognition of laminin isoforms*. Mol Biol Cell, 1994. **5**(2): p. 203-15.
211. Kato, K., S. Sano, and Y. Ikada, *Protein adsorption onto ionic surfaces*. Colloids Surf B Biointerfaces 1995. **4**: p. 221-230.
212. Wehrle-Haller, B. and B. Imhof, *The inner lives of focal adhesions*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(8): p. 382-9.
213. Sutherland, J., M. Denyer, and S. Britland, *Contact guidance in human dermal fibroblasts is modulated by population pressure*. J Anat, 2005. **206**(6): p. 581-7.
214. Curtis, A. and C. Wilkinson, *Topographical control of cells*. Biomaterials, 1997. **18**(24): p. 1573-83.
215. Wehrle-Haller, B. and B.A. Imhof, *Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(1): p. 39-50.
216. McFarland, C.D., et al., *Protein adsorption and cell attachment to patterned surfaces*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(2): p. 200-10.
217. Herrmann, H., et al., *Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 562-73.
218. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. Cell, 2008. **132**(4): p. 598-611.
219. Laird, D.J., U.H. von Andrian, and A.J. Wagers, *Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease*. Cell, 2008. **132**(4): p. 612-30.
220. Li, A., et al., *Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny*. J Clin Invest, 2004. **113**(3): p. 390-400.
221. Wieser, R.J., et al., *Growth control in mammalian cells by cell-cell contacts*. Environ Health Perspect, 1990. **88**: p. 251-3.
222. Halbleib, J.M. and W.J. Nelson, *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*. Genes Dev, 2006. **20**(23): p. 3199-214.
223. Perez-Moreno, M. and E. Fuchs, *Catenins: keeping cells from getting their signals crossed*. Dev Cell, 2006. **11**(5): p. 601-12.
224. Schafer, C., et al., *One step ahead: Role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes*. Exp Cell Res, 2008.
225. DeMali, K.A. and K. Burridge, *Coupling membrane protrusion and cell adhesion*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 12): p. 2389-97.
226. Rigort, A., et al., *Release of integrin macroaggregates as a mechanism of rear detachment during keratinocyte migration*. Eur J Cell Biol, 2004. **83**(11-12): p. 725-33.
227. Cukierman, E., et al., *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1708-12.
228. Saha, K., et al., *Designing synthetic materials to control stem cell phenotype*. Curr Opin Chem Biol, 2007. **11**(4): p. 381-7.
229. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 98-104.



230. Fuchs, E., T. Tumber, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. Cell, 2004. **116**(6): p. 769-78.
231. Wong, J.Y., J.B. Leach, and X.Q. Brown, *Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell–biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response*. Surface Science, 2005. **570**: p. 119-133.
232. Arima, Y. and H. Iwata, *Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers*. Biomaterials, 2007. **28**(20): p. 3074-82.
233. Curtis, A.S.G., M. Dalby, and N. Gadegaard, *Cell signaling arising from nanotopography: implications for nanomedical devices*. Nanomedicine, 2006. **1**(1): p. 62-72.
234. Wilson, C.J., et al., *Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review*. Tissue Eng, 2005. **11**(1-2): p. 1-18.
235. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
236. Gullberg, D., *How to keep that stemmy-ness: Stem cells in the spotlight*. Matrix Biology, 2008: p. 161-162.
237. Chai, C. and K.W. Leong, *Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells*. Mol Ther, 2007. **15**(3): p. 467-80.
238. Rando, T.A., *Stem cells, ageing and the quest for immortality*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1080-6.
239. Steketee, M.B. and K.W. Tosney, *Three functionally distinct adhesions in filopodia: shaft adhesions control lamellar extension*. J Neurosci, 2002. **22**(18): p. 8071-83.
240. Oakley, C. and D.M. Brunette, *The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata*. J Cell Sci, 1993. **106 ( Pt 1)**: p. 343-54.

## 6.2 Lebenslauf

### Petra Juliane Kluger (geb.Schweizer)

geboren am 05.01.1981 in Leonberg

#### Promotion und Studium

---

Mai 2006-April 2009	Promotionsstipendium für 3 Jahre von der Petrer und Traudel Engelhorn Stiftung, Durchführung am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB), Abteilung Zellsysteme (Frau Prof. Dr. Heike Mertsching)  <i>Titel:</i> "Induktion morphologischer und physiologischer Reaktionen primärer humaner Hautzellen durch bioinspiriert nano- und mikrostrukturierte Substrate"
WS 2000-SS 2006	Studium der Technischen Biologie (Universität Stuttgart) Abschluss: Dipl.-Biol. (t.o.), Note: "sehr gut"
Diplomarbeit	<i>Titel:</i> "Selektive Kopplung humaner Keratinozyten durch modifizierte Oberflächen" am Fraunhofer IGB, Abteilung Zellsysteme (Frau Prof. Dr. Heike Mertsching)
Auslandsaufenthalte	07.10.04-02.12.04 Studienarbeit in Dahab, Ägypten <i>Titel:</i> "Invertebraten am Korallenriff"  21.07.03-23.08.03 Polarbiologischen Expedition der Universität Stuttgart nach Grönland

#### Schulbildung

---

1991-2000	Albert-Schweitzer-Gymnasium Leonberg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1987-1991	August-Lämmle Grundschule Leonberg

#### Zusätzliche Qualifikationen

---

Nov 2007-Nov 2008	Postgraduierten Fernstudium <i>Nanobiotechnology</i> für Naturwissenschaftler und Ingenieure an der Universität Kaiserslautern <ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Fundamentals of quantum mechanics</i></li><li>• <i>Characterization procedures of nanomaterials</i></li><li>• <i>Physical synthesis of nanoparticles</i></li><li>• <i>Chemical synthesis of nanoparticles</i></li><li>• <i>Processing coatings and their applications</i></li><li>• <i>Processing ceramics and composites and their applications</i></li><li>• <i>Fundamentals of molecular biology, genetics</i></li><li>• <i>Screening methods in biology, chip technologies</i></li><li>• <i>Interaction between biological &amp; non-biological devices</i></li><li>• <i>Nanotechnologically modified biomaterials</i></li><li>• <i>Nanoparticles as therapeutic drug carriers &amp; diagnostics</i></li><li>• <i>Nanodevices in medicine, pharmacy and biology</i></li></ul>
-------------------	--

## 6.3 Wissenschaftliche Beiträge

### Publikationen

- Feb 2009 **Kluger PJ**, Borchers KA, Panas M, Brunner H, Tovar GEM, and Mertsching H *Amino- and carboxy-functionalized nano- and microstructured surfaces for evaluating the impact of non-biological stimuli on adhesion, proliferation and differentiation of primary skin-cells*, akzeptiert bei: Materials Research Society Proceedings
- Feb 2009 Brecher C, Wenzel C, Pretzsch F, Bueth H, **Kluger PJ**: *Development and characterization of high volume producible micro structured surfaces for tissue engineering applications*, akzeptiert bei: International Federation for Medical and Biological Engineering Proceedings
- Jan 2009 Schafer R, Dominici M, Muller I, Horwitz E, Asahara T, Bulte J, Bieback K, Le Blanc K, Buhring H, Capogrossi M, Dazzi F, Gorodetsky R, Henschler R, Handgretinger R, Kajstura J, **Kluger P**, Lange C, von Luetlichau I, Mertsching H, Schrezenmeier H, Sievert K, Strunk D, Verfaillie C, Northoff H: *Basic research and clinical applications of non-hematopoietic stem cells, 4-5 April 2008, Tübingen, Germany, Cytotherapy, 1, p1-11*
- Jan 2009 **Kluger PJ**, Panas M, Borchers K, Brunner H, Tovar GEM, and Mertsching H: *“Functionalised nanostructured and microstructured interfaces for studying cellular response exemplified with primary human keratinocytes”*, eingereicht bei: Tissue Engineering
- Okt 2008 **Kluger PJ** and Mertsching H: *„Regenerative Medizin und Gefäß-Tissue Engineering“*, Seminarunterlagen der DGM Fortbildung Biomaterialien

### Patentanmeldungen

- 2007 Vorrichtung und Verfahren zum Ablösen von Zellen  
PCT/EP2007/007062; Miterfinder
- 2007 3D strukturierte verbesserte extrazelluläre Matrix;  
PCT/EP2008/003130, DE102007020302A1; Miterfinder
- 2006 Verfahren zur Anreicherung von Melanozyten mittels modifizierter Oberflächen; PCT/EP2007/010590, DE10200657742A1; Hauptfinder

### Preise

- Mai 2009 Posterpreis, 3<sup>rd</sup> International Symposium “Interface Biology of Implants”, Rostock

### Vorträge

- Okt 2009 1<sup>st</sup> Sino-German Symposium on Advanced Biomedical Nanostructures, Jena: *“Structural and functional preference of keratinocytes and fibroblasts, detected with a new functionalizable nano- or microstructured biomaterial model-interface”*, akzeptiert
- Sep 2009 22<sup>nd</sup> European Conference on Biomaterials, Lausanne: *“Different structural and functional preference of primary keratinocytes and primary fibroblasts, detected with new functionalizable nano- or microstructured biomaterial model-interfaces”*, akzeptiert

- Nov 2008 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg:  
*"Generation of nano- and microstructured biomaterial-interfaces as model surfaces for studying cell behaviour exemplified with primary human keratinocytes"*
- Sep 2008 1<sup>st</sup> Congress Materials Science and Engineering, Nürnberg, Highlight Vortrag:  
*"Generation of nano-and microstructured biomaterial-interfaces as model surfaces for studying cell behaviour exemplified with primary human keratinocytes"*

Poster

- Juni 2009 **Kluger PJ** et al., ESF-EMBO Symposium Biological Surfaces and Interfaces, Sant Feliu de Guixols. Spanien
- Mai 2009 **Kluger PJ** et al., zweimal, 3<sup>rd</sup> International Symposium "Interface Biology of Implants", Rostock, Abstracts veröffentlicht in BIOMaterialien
- Okt 2008 **Kluger PJ** et al., 3<sup>rd</sup> World Congress for Regenerative Biology & Medicine, 3<sup>rd</sup> World Congress of the German Society of Stem Cell Research, Stuttgart, Abstract veröffentlicht in Tissue Engineering
- Mai 2008 zweimal **Kluger PJ** et al., 8<sup>th</sup> World Congress for Biomaterials, Amsterdam, Abstracts veröffentlicht in Biomaterials
- Okt 2007 **Schweizer PJ** et al., 3<sup>rd</sup> World Congress for Regenerative Medicine, Leipzig
- Sep 2007 **Schweizer PJ** et al., NanoEurope, St. Gallen
- Aug 2007 **Schweizer PJ** et al., Biointerfaces VII, Zürich
- Okt 2006 **Schweizer PJ** et al., 2<sup>nd</sup> International Congress of Regenerative Biology  
 2<sup>nd</sup> International Congress of Bio-Nanointerface, Stuttgart

Mitgliedschaften

- Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien  
 Deutsche Gesellschaft für Materialkunde, Fachausschuss Biomaterialien  
 Mentoring Programm der Uni Stuttgart

## 6.4 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

- **Herrn Prof. Dr. Herwig Brunner** und **Herrn Prof. Dr. Thomas Hirth** für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Fraunhofer IGB durchzuführen. Bei Herrn Prof. Dr. Brunner möchte ich mich herzlich für die Betreuung und die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.
- **Herrn Prof. Dr. Peter Scheurich** für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.
- **Frau Prof. Dr. Heike Mertsching** für ihre Betreuung und ihr Vertrauen in mich.
- **Peter und Traudel Engelhorn Stiftung zur Förderung der Biotechnologie und Gentechnik** für mein dreijähriges Promotionsstipendium.
- **Herrn Frank Pretzsch** vom Fraunhofer Institut für Produktionstechnologie in Aachen sowie allen anderen beteiligten Mitarbeitern für die Herstellung der nanostrukturierten Polystyrolplatten.
- **Frau Dr. Kirsten Borchers** für die vielen Diskussionen und Ratschläge.
- **Herrn Nicolas Zschörper** und **Frau Theresa Huben** für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Plasmabehandlung meiner Proben.
- **Frau Monika Riedl, Herrn Joachim Mayer** und **Herrn Jürgen Schmucker** für die zahlreichen Messungen.
- Den **Mitarbeitern der Abteilung Grenzflächentechnologie und Materialwissenschaft** für ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft während meiner Arbeit.
- **Herrn Marc Panas, Frau Lena Schober, Frau Julia Maierle** und **Frau Eva Hoch** für ihre engagierte Mitarbeit.
- **Frau Martina Hampel, Frau Dr. Michaela Kaufmann** und **Frau Jacqueline Michaelis** sowie **Herrn Jan Hansmann, Frau Dr. Andrea Heymer** und **Frau Dr. Johanna Schanz** für ihre Unterstützung und Ratschläge.
- **Allen Mitarbeitern der Abteilung Zellsysteme** für die gute Zusammenarbeit.
- Der **Peter und Traudl Engelhorn Stiftung** zur Förderung der Gentechnik und Biotechnologie für das Promotionsstipendium.

Mein Dank gilt auch meiner Familie, meinen Freunden und besonders meinem Mann Alexander für die stetige Unterstützung.

## 6.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Petra J. Kluger