Universität Ulm

Orthopädische Universitätsklinik mit Querschnittgelähmtenzentrum

am Rehabilitationskrankenhaus Ulm

Ärztlicher Direktor:

Prof. Dr. med. H. Reichel

Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen

Leiter: Prof. Dr. med. R. Brenner

Beeinflussung multipotenter mesenchymaler Stromazellen und Osteoblasten durch nanostrukturierte Oberflächen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Jochen Bartholomä

Schwäbisch Hall

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius

Tag der Promotion: 11.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Gewebeintegration von Biomaterialien 1

1.2 Zell-Oberflächen-Interaktionen an Grenzflächen 2

1.3 Einfluss der Mikrotopographie auf Zell-Substrat-Wechselwirkungen 3

1.4 Nanotopographie an Grenzflächen 3

1.5 Humane mesenchymale Stromazellen auf funktionalisierten Oberflächen 6

1.6 Humane Osteoblasten auf funktionalisierten Oberflächen 6

1.7 Zielsetzung 7

2 Material und Methodik 8

2.1 Material 8

2.1.1 Zellen 8

2.1.2 Nanostrukturierte Oberflächen für die Testung 9

2.1.3 Chemikalien und Antikörper 12

2.1.4 Geräte 14

2.1.5 Zellkultur-Medium und Zusätze 16

2.1.6 Software 16

2.2 Methodik 17

2.2.1 Isolation humaner mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat 17

2.2.2 Zellkultur und Passagierung 19

2.2.3 Immunhistologische Methoden 21

2.2.4 Methodik der Elektronenmikroskopie 23

2.2.5 Statistische Methoden 25

3 Ergebnisse 26

3.1 Humane multipotente Stromazellen und primäre humane Osteoblasten in Zellkultur 26

3.2 Besiedlung von hMSZ und primären hOB auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten 28

3.2.1 Adhäsion und Zellmorphologie von hMSZ auf nanostrukturierten Substraten unter fluoreszenzmikroskopischer Sicht 28

3.2.2 Adhäsion und Zellmorphologie von hMSZ auf nanostrukturierten Substraten unter rasterelektronenmikroskopischer Sicht 36

3.2.3 Proliferation von hMSZ und primären hOB auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten 40

3.2.4 Osteogene Differenzierung von hMSZ auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten 46

4 Diskussion 51

4.1 Besiedlung von hMSZ und hOB auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten 52

4.1.1 Adhäsion und Zellmorphologie von hMSZ auf nanostrukturierten Substraten unter fluoreszenzmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Sicht 52

4.1.2 Proliferation von hMSZ und hOB auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten 54

4.1.3 Osteogene Differenzierung von hMSZ auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten 56

4.2 Toxizität von Nanopartikeln 58

4.3 Ausblick 59

5 Zusammenfassung 60

6 Literaturverzeichnis 62

Danksagung 69

Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
BSP	bone sialoprotein
°C	Grad Celsius
CFU	colony-forming unit
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4`,6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence activated cell sorting
FE-SEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
hMSZ / MSZ	humane mesenchymale Stromazellen
hOB	humane Osteoblasten
JKJ	Jod-Kaliumjodid-Lösung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	molar
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mm^2	Quadratmillimeter
mM	millimolar

ml	Milliliter
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
OC	Osteokalzin
PBS	phosphate buffered saline
RIE	reactive-ion etching
RT	Raumtemperatur
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SEM	Standardfehler
SiO_2	Siliciumdioxid
Tab.	Tabelle
TiO_2	Titandioxid
U	unit(s)
verg.	vergällt

1: Einleitung

1.1 Gewebeintegration von Biomaterialien

Biomaterialien finden heutzutage in medizinischen Bereichen sehr häufig Anwendung. Die synthetischen Biomaterialien umfassen ein breites Spektrum anorganischer Materialien, die mit biologischen Systemen in Wechselwirkung treten (Williams, 1987). Hierzu zählen neben Wundauflagen, Zahnfüllungen und Kontaktlinsen auch Nahtmaterial und Endoprothesen. Die Anforderungen an Biomaterialien sind demnach sehr vielseitig. Sie sollen eine Ersatzfunktion für das natürliche Gewebe übernehmen, dabei dem umliegenden Gewebe keinen Schaden zufügen (Black, 1984) und je nach Funktion und Einsatzort eine bestimmte Haltbarkeit aufweisen.

Speziell die operative Orthopädie bietet einen großen Medizintechnikmarkt für Biomaterialien. Im Bereich der Endoprothetik wünscht man sich bei Dauerimplantaten eine lasttragende Ersatzfunktion mit großer Langzeitwirkung. Diese Langzeitwirkung ist in großem Maße abhängig von den Eigenschaften des Biomaterials. Das eingebrachte Implantat sollte über eine ausreichende Festigkeit und Elastizität verfügen, um eine Stützfunktion zu übernehmen, sowie eine an die mechanische Beanspruchung angepasste äußere Form besitzen. Nach dem Einbau des Implantats ist eine möglichst rasche Ausbildung einer Knochenmatrix wünschenswert (Davies, 1998).

Trotz des großen Erfolges und des Benefiz für die Patienten, den beispielsweise die Entwicklung der Hüft-Totalendoprothesen mit sich brachte, gibt es jährlich immer noch zahlreiche Revisionseingriffe aufgrund verschiedenartigster Ursachen, die zu einer Lockerung des Implantates geführt haben. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die allerersten Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche des eingebrachten Implantatmaterials und dem umliegenden Gewebe. Diese Interaktionen sind entscheidend für die Gewebeintegration der Biomaterialien und tragen wesentlich zu dem klinischen Langzeiterfolg bei (Davies, 2003).

1.2 Zell-Oberflächen-Interaktionen an Grenzflächen:

Die Erstreaktionen bei der Implantation von Fremdmaterial in den Körper laufen schon innerhalb von Sekunden bis Minuten ab. Hierbei werden Proteine aus der Umgebung - in den meisten Fällen Proteine aus dem Blutplasma - von der Materialoberfläche adsorbiert (Lauffenburger & Griffith, 2001). Proteine, die in den extrazellulären Flüssigkeiten eine niedrige Konzentration besitzen, wie beispielsweise die Glykoproteine Laminin oder Fibronektin, haben eine hohe Affinität zu den Biomaterialoberflächen und gehen in einen dynamischen Prozess von Adsorption und Desorption über (Williams, 2003). Die Zelladhäsion wird initiiert durch Wechselwirkungen von Integrin-Rezeptoren in der Zellmembran mit den auf den Oberflächen adsorbierten Proteinen (Saltzman, 2000). Die an das Zytoskelett gebundenen Integrine sind Teil von fokalen Adhäsionen, welche die Zelle an der Materialoberfläche verankern. Die fokalen Adhäsionen besitzen jedoch noch eine weitere entscheidende Fähigkeit zur Signalübertragung. Sie liefern der Zelle Informationen über die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix und nehmen somit Einfluss auf das Verhalten der Zelle (Riveline et al., 2001).

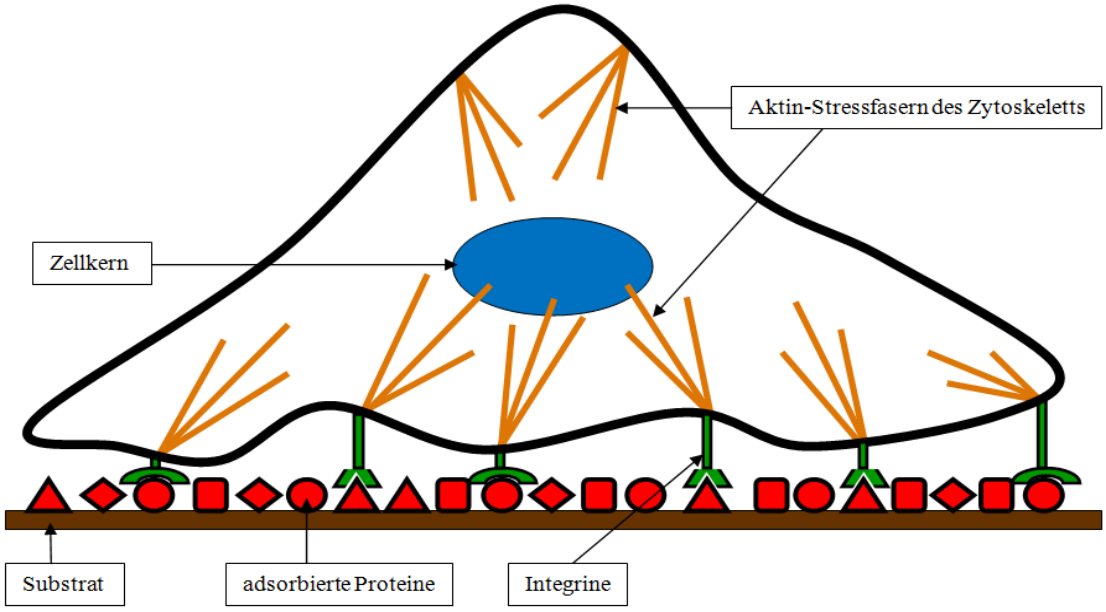


Abb. 1: ***Schematische Darstellung der Zelladhäsion auf einer Biomaterial-Oberfläche***
*Die Verankerung einer gespreiteten Zelle mit den auf der Materialoberfläche (**braun**) adsorbierten Proteinen (**rot**) wird über Integrine (**grün**) hergestellt, die als Teil von fokalen Adhäsionen mit Aktin-Stressfasern des Zytoskeletts (**orange**) verbunden sind. Das Aktin-Zytoskelett ist wiederum mit dem Zellkern (**blau**) verknüpft, sodass eine Signalkaskade entsteht. Abbildung zusammengestellt nach Saltzmann, 2000 und Riveline et al., 2001.*

1.3 Einfluss der Mikrotopographie auf Zell-Substrat-Wechselwirkungen:

Zahlreiche Studien haben bisher die Auswirkungen einer mikrometerskaligen Topographie auf zellbiologisches Verhalten untersucht (Kaiser et al., 2006; Yan et al., 2011). Die Zellen reagieren dabei hochsensitiv auf die mechanische Belastung und geometrische Konstitution ihres Mikroumfeldes (Lee et al., 2009). Durch einen Umbau von Aktinfilamenten und Mikrotubuli schafft es die Zelle, ihr Zytoskelett an die Geometrie der Mikroumgebung anzupassen (Théry et al., 2006). Diese Anpassung wiederum wirkt sich auf Genexpression, Wachstum, Zellmigration und Differenzierung aus (Olivares Navarrete et al., 2010). Die Rauheit von Oberflächen scheint dabei einen besonderen Einfluss auf die Osseointegration der Biomaterialien zu haben. Titanimplantate mit sandgestrahlten oder säuregeätzten Oberflächen, die dadurch eine Rauheit im Mikrobereich aufweisen, besitzen größere Kontaktoberflächen im Vergleich zu glatt geschliffenen Oberflächen und erreichen dadurch eine größere Stabilität sowie ein schnelleres Einwachsen in den Knochen durch Stimulation der Expression von osteoinduktiven Markergenen (Nasatzky et al., 2003; Guo et al., 2007). Seitdem Studien jedoch gezeigt haben, dass bereits Strukturen im Nanometerbereich die Zellantwort beeinflussen können (Webster et al., 2000), rückt neben der Makro- und Mikrotopographie immer mehr die Nanotopographie in den Mittelpunkt aktueller Forschung.

1.4 Nanotopographie an Grenzflächen:

Der Fortschritt in der Nanotechnologie eröffnete viele Möglichkeiten, die nanoskalige Topographie von Oberflächen zu modifizieren (von der Mark et al., 2010). Als nanoskalig werden Biomaterialien bezeichnet, wenn sie strukturierte Einheiten kleiner als 100nm in mindestens eine Richtung besitzen (Rajyalakshmi et al., 2011). Obwohl zahlreiche Erfolge durch die Erforschung mikroskaliger Topographien erzielt wurden, geht man heute davon aus, dass Zell-Oberflächen-Interaktionen durch die nanoskaligen Strukturgegebenheiten bestimmt werden (Mendonça et al., 2008; Khang et al., 2008; Liu & Webster, 2007). In Anbetracht der extrazellulären Matrix, die aus einer Vielzahl organischer und anorganischer Elemente mit nanoskaliger Größenordnung besteht, kann man diese

Erkenntnis plausibel erklären. Daher wurden zahlreich definierte, nanoskalige Oberflächenstrukturen hergestellt und deren direkter Einfluss auf zellbiologische Funktionen getestet (Variola et al., 2009). Dabei stellte sich heraus, dass durch Nanotopographie sowohl die Proteinadsorption, als auch das Zellverhalten kontrolliert werden kann (Koegler et al., 2012; Park et al., 2009).

Eine Möglichkeit zur nanotopographischen Strukturierung von Oberflächen bieten nanolithographische Methoden sowie Trockenätztechniken. In der AG Dr. Plettl am Institut für Festköperphysik der Universität Ulm werden solche Oberflächen hergestellt. Mit Hilfe dieser Methoden können säulenartige Strukturen im Nanobereich auf Oberflächen geschaffen werden. Als Grundlage für die Herstellung der nanostrukturierten Oberflächen dienen SiO_2-Rohlinge. Durch die „dip-coating“-Beschichtungstechnik werden diese Glasoberflächen mit einer Goldmaske beschichtet (siehe Abb. 2). Bei diesem Prozess taucht man die Substrate in eine Lösung mit konstanter Konzentration von Goldpartikeln. Durch vertikales Herausziehen der Glasoberflächen aus der Lösung bleibt ein Film mit Goldpartikeln an den Oberflächen haften.

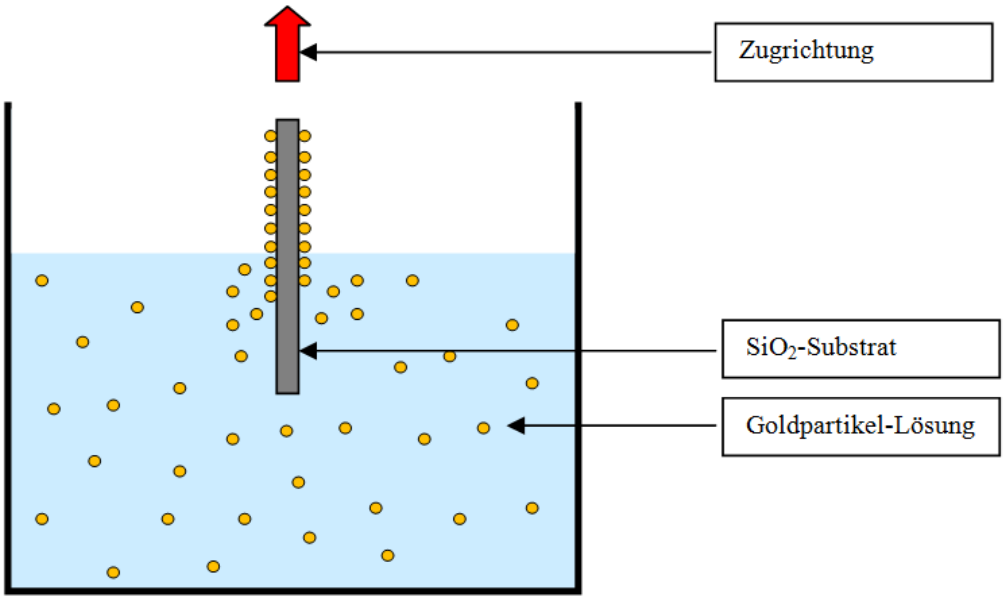


Abb. 2: ***Schematische Darstellung der „dip-coating“-Beschichtungstechnik***
Dargestellt ist ein SiO_2 (Siliciumdioxid) - Substrat (grau), das aus einer Lösung mit Goldpartikeln (gelb) vertikal herausgezogen wird (roter Pfeil gibt Zugrichtung an). Bei diesem Vorgang bleiben Goldpartikel an den Oberflächen haften. Abbildung erstellt nach Scriven, 1988.

Anschließend erzielt man eine Säulenstruktur durch den Prozess des „reactive-ion etching“ (Reaktives Ionentiefenätzen). Jene Stellen, an denen sich Goldpartikel befinden, bleiben vom Ätzvorgang verschont, sodass jeweils nur die Stellen ohne Goldmaske geätzt werden. Durch Aufbringen einer Jod-Kaliumiodid-Lösung löst man die Goldpartikel von den Säulenspitzen.

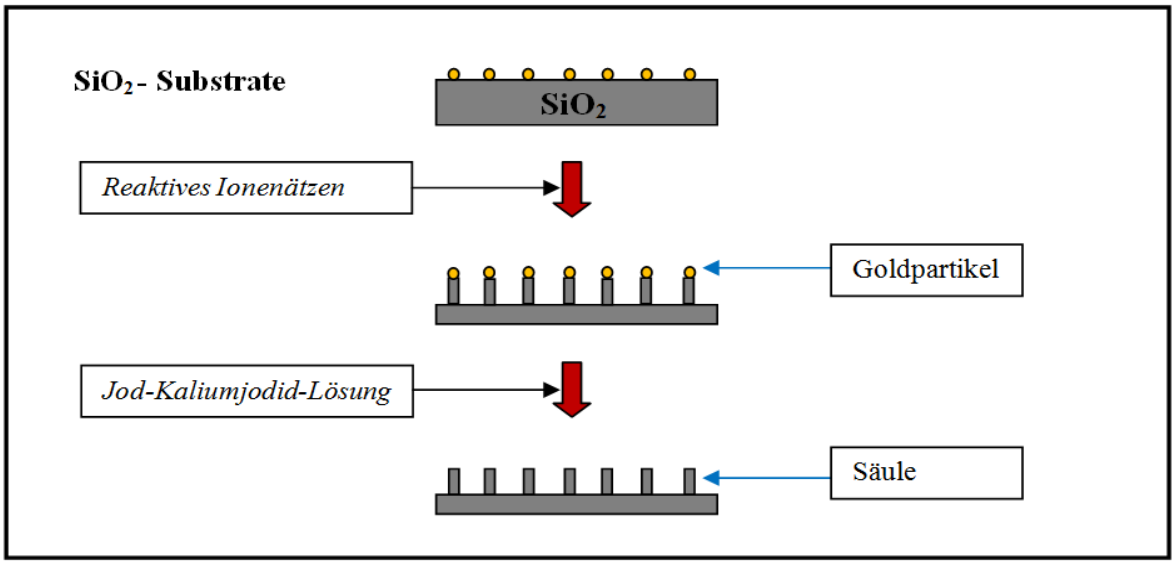


Abb. 3: ***Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der nanoskaligen Säulenstruktur auf SiO_2 (Siliciumdioxid) - Oberflächen***

Durch die „Goldpartikelmaske“ erhält man nach dem Ätzvorgang (RIE = reactive-ion etching) eine Säulenstruktur auf den SiO_2-Substraten. Die Goldpartikel werden anschließend durch eine Jod-Kaliumjodid-Lösung (JKJ) entfernt. Abbildung erstellt nach Jansen et al., 1995.

Eine Variation der Säulenstruktur in Bezug auf den Durchmesser, den Abstand sowie die Höhe der Nanosäulen ermöglicht eine Vielzahl an verschiedenen Konfigurationen. Eine Änderung des Durchmessers der in der Lösung befindlichen Goldpartikel führt zu unterschiedlichen Säulendurchmessern. Die Höhe der Säulen wird durch die Dauer des Ätzprozesses bestimmt. Ein längerer Ätzvorgang führt dementsprechend zu höheren Säulen, beinhaltet jedoch auch die Gefahr, dass durch ein längeres Ätzen die Goldmaske langsam aufgelöst wird. Als Folge ergibt sich bei größeren Säulenhöhen eine zunehmend kegelförmige Gestalt der Säulen. Durch unterschiedliche Geschwindigkeiten beim Herausziehen der Substrate während des „dip-coating“-Verfahrens kann man den Abstand zwischen den Goldpartikeln regulieren. Dies führt zu unterschiedlichen Abständen zwischen den Nanosäulen.

1.5 Humane mesenchymale Stromazellen auf funktionalisierten Oberflächen:

Humane multipotente mesenchymale Stromazellen (hMSZ) können als Vorläuferzellen von Binde- und Stützgewebe fungieren. Sie besitzen die Fähigkeit zur unbeschränkten Selbsterneuerung sowie das Potenzial zur Differenzierung in Knochen-, Knorpel-, Fett-, Sehnen- und Muskelgewebe (Pittenger et al., 1999). Darüber hinaus wurden die Möglichkeit zur Differenzierung in neurale Zellen (Luo et al., 2012) und eine die Hämatopoese unterstützende Wirkung (Pontikoglou et al., 2011) beschrieben. Durch die meist leichte Isolation der hMSZ aus Knochenmark und ihr hohes Proliferationspotenzial eignen sie sich unter anderem hervorragend für *in-vitro*-Zellversuche im Rahmen der Oberflächenmodifikation von Biomaterialien. In einigen Studien wurde der Einfluss von mikro- und nanotopographisch strukturierten Oberflächen auf die Zellmorphologie, Adhäsion und osteogene Differenzierung von hMSZ gezeigt (Watari et al., 2012; Lavenus et al., 2011; Park et al., 2009). Durch eine Modifizerung der Oberflächentopographie ist es somit möglich, hMSZ zur Differenzierung zu stimulieren und eine Knochenmineralisierung ohne zusätzliche osteogene Wachstumsfaktoren zu induzieren.

1.6 Humane Osteoblasten auf Oberflächen:

Humane Osteoblasten (hOB) entstehen durch Differenzierung von hMSZ aus dem Knochenmark oder Periost (Caetano-Lopes et al., 2007) und sind als Knochenbildner zusammen mit ihren Gegenspielern, den Osteoklasten, hauptverantwortlich für die Integration von Biomaterialien in den Knochen. Der natürliche Knochen unterliegt somit einem dynamischen Prozess von Aufbau und Resorption. Dieser ständige Umbauprozess des Knochens wird von einem komplexen Mechanismus bestimmt, der sowohl durch parakrine und autokrine Signalwege gesteuert wird, als auch durch Interaktionen zwischen den Zellen und den Oberflächen der eingebrachten Biomaterialien bzw. der extrazellulären Matrix (Park et al., 2009). Veränderungen der Oberflächentopographien induzieren mechanische Reize, die wiederum die Proliferationsaktivität der Osteoblasten sowie die Expression von osteogenen Markergenen wie Osteopontin oder Osteokalzin beeinflussen können (Guo et al., 2012). Daraus entwickeln sich viele Möglichkeiten zur Optimierung der Integration von Biomaterialien in den Knochen.

1.7 Zielsetzung:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein Modell-System zu etablieren, mit dem es möglich ist, Einflüsse nanostrukturierter Oberflächen auf Zellverhalten zu testen. Zur Anwendung kamen Siliciumdioxid-Träger mit unterschiedlichen Säulenstrukturen, die im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Festkörperphysik der Universität Ulm (Leiter Prof. Ziemann) von der AG Dr. Plettl zur Verfügung gestellt wurden. Der Säulendurchmesser der Strukturen betrug entweder 10 oder 30nm, der Säulenabstand 50, 100 oder 120nm und die Säulenhöhe maß 20, 35 oder 50nm. Als Kontrolle wurden nicht strukturierte, unbehandelte SiO_2-Rohlinge eingesetzt. Dazu mussten die Fragen zur Sterilisierbarkeit der Oberflächen und zur allgemeinen Möglichkeit der Zellbesiedlung geklärt werden. Nach Etablierung der Kultivierungsbedingungen (Zellzahl, Kultivierungsdauer, Zell-Typen) sollten durch fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen Wechselwirkungen zwischen den im Nanobereich modifizierten Oberflächen und humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSZ) bzw. primären humanen Osteoblasten (hOB) analysiert werden.

Folgende Parameter sollten hierbei ermittelt werden:

- zelluläre Adhäsion und Zellmorphologie von hMSZ und primären hOB nach 24h Kultivierungsdauer auf den nanostrukturierten Oberflächen

- Unterschiede bezüglich Zellproliferation von hMSZ und primären hOB durch Modifizierung der nanoskaligen Säulentopographie im Zeitraum zwischen 24h und 7 Tagen Kultivierungsdauer

- Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung von hMSZ durch Optimierung der nanotopographischen Parameter ohne Einsatz von Differenzierungsmedien

2: Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Die verwendeten humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen (hMSZ) wurden aus Knochenmarkaspirat nach Standardprotokoll (Fickert et al., 2004) isoliert. Die Knochenmarkproben wurden im Rahmen von Routineoperationen wie Korrekturosteotomien gewonnen, bei denen eine Eröffnung des Markraumes nötig war. Die Entnahme erfolgte in Übereinstimmung mit der lokalen Ethikkommission der Universität Ulm nach Aufklärung der Patienten durch den behandelnden Stationsarzt.
Weiterhin waren für die Probenentnahme und die Verwendung der Zellen folgende Voraussetzungen erfüllt: Es wurden nur Patienten für eine Probenentnahme ausgesucht, die keine knochenmarksuppressiven Medikamente einnahmen und bei denen keine Stoffwechselerkrankungen oder bekannte genetisch bedingte Bindegewebs- und Skeletterkrankungen vorlagen.
Die primären humanen Osteoblasten (hOB) wurden direkt aus Knochenmaterial bei vorwiegend endoprothetischen Operationen gewonnen. Die Entnahme der primären hOB unterlag den gleichen Voraussetzungen, die oben genannt für die Gewinnung von den hMSZ notwendig waren.
Das Patientenkollektiv für die Probenentnahmen bestand aus 15 weiblichen und 6 männlichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 46 ± 23 Jahren.

2.1.2 Nanostrukturierte Oberflächen für die Testung

Im Rahmen einer fakultätsübergreifenden Kooperation mit dem Institut für Festkörperphysik der Universität Ulm, Leiter Prof. Ziemann, wurden von Frau Burcin Özdemir (AG Dr. Plettl) im Rahmen ihrer Master-Arbeit nanostrukturierte Oberflächen hergestellt. Mit Hilfe von nanolithografischen Methoden sowie Trockenätztechniken wurden Oberflächen mit Säulenstruktur im Nanobereich angefertigt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Als Trägermaterial diente hochreines SiO_2.

Durch die Möglichkeiten, die Oberflächenstruktur in Bezug auf den Durchmesser, den Abstand sowie die Höhe der Nanosäulen zu variieren, ergab sich eine Vielzahl an verschiedenen Kombinationen. In Tabelle 1 ist eine Übersicht dargestellt über alle für meine zellbiologischen Versuche getesteten Oberflächenstrukturen. Als Kontrolle wurde eine glatte, unstrukturierte SiO_2-Oberfläche ausgewählt.

Tab. 1: Übersicht über getestete nanostrukturierte Oberflächen.

<table>
<tr><th></th><th>Säulendurchmesser
ø (nm)</th><th>Säulenabstand
A (nm)</th><th>Säulenhöhe
H (nm)</th></tr>
<tr><td>Kontrolle</td><td>--</td><td>--</td><td>--</td></tr>
<tr><td rowspan="10">Nano-strukturierte Oberfächen</td><td rowspan="3">10</td><td>50</td><td rowspan="5">20</td></tr>
<tr><td>100</td></tr>
<tr><td>120</td></tr>
<tr><td rowspan="2">30</td><td>100</td></tr>
<tr><td>120</td></tr>
<tr><td rowspan="3">10</td><td>100</td><td>35</td></tr>
<tr><td>50</td><td rowspan="3">50</td></tr>
<tr><td>100</td></tr>
<tr><td>120</td></tr>
<tr><td>30</td><td>100</td></tr>
</table>

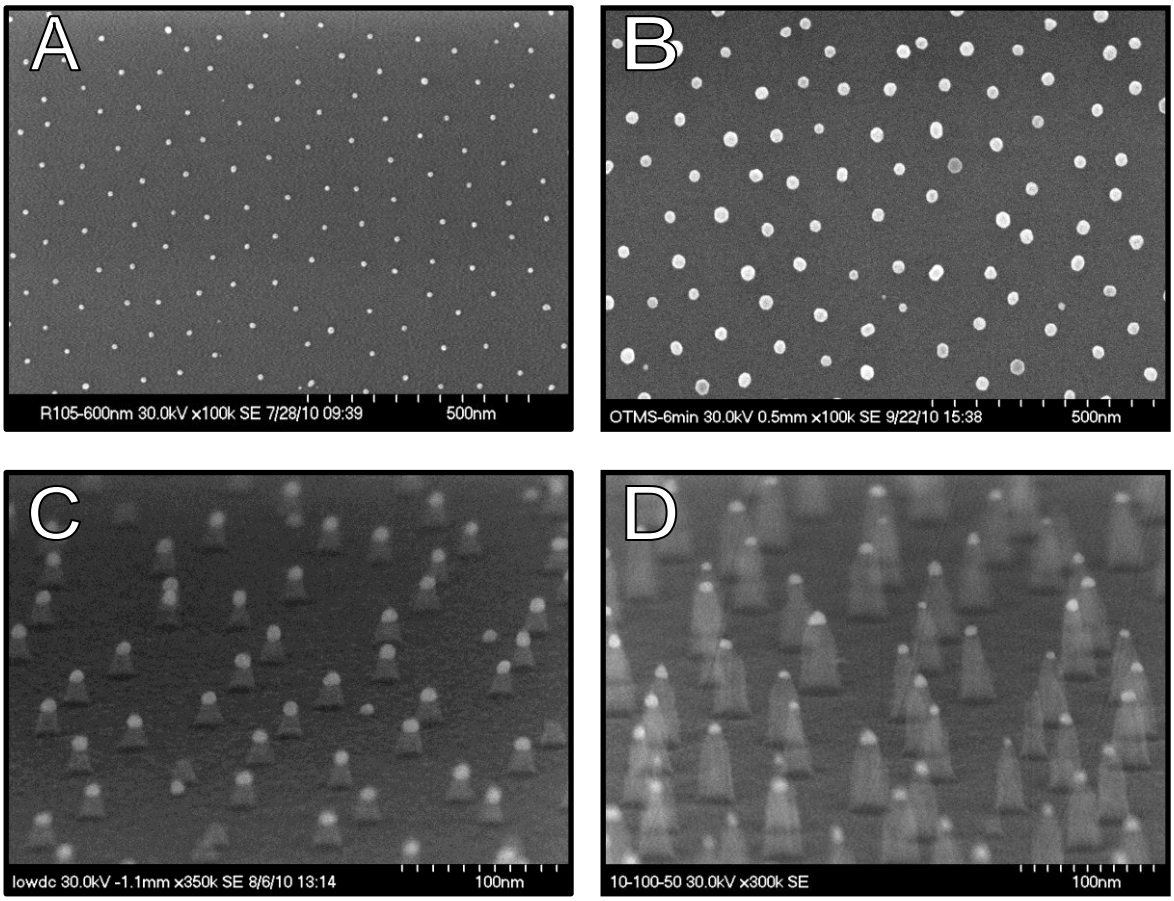


Abb. 4: ***Vergleichsansichten der unterschiedlichen Säulendurchmesser sowie Säulenhöhen:***

A: Nanosäulen in der Aufsicht mit ***ø (Säulendurchmesser) 10nm*** *und A (Säulenabstand) 100nm (100.000-fache Vergrößerung). B: in einer Aufsicht mit* ***ø 30nm*** *und A 100nm (100.000-fache Vergrößerung). C: „Cross-Section"-Aufnahme - Säulen mit ø 10nm, A 100nm und* ***H (Säulenhöhe) 20nm*** *(350.000-fache Vergrößerung). D: „Cross-Section"-Aufnahme - Säulen mit ø 10nm, A 100nm und* ***H 50nm*** *(300.000-fache Vergrößerung). Zur besseren Kontrastierung wurden die Bilder C und D vor Entfernung der Goldpartikel aufgenommen. Aufnahmen von AG Dr. Plettl - Institut für Festkörperphysik der Universität Ulm.*

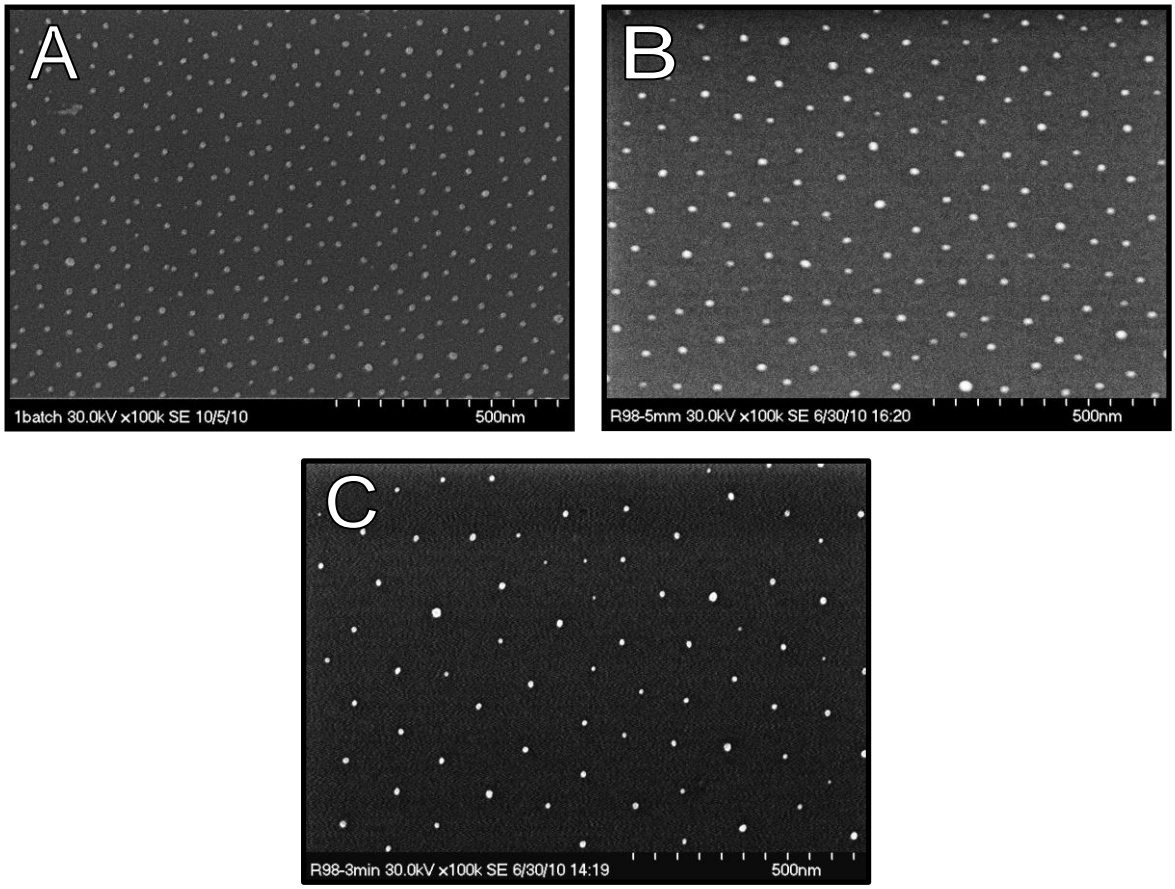


Abb. 5: ***Vergleichsansichten der unterschiedlichen Abstände zwischen den Säulen.***
Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus einer Aufsicht bei 100.000-facher Vergrößerung. A: ø (Säulendurchmesser) 10nm und ***A (Säulenabstand) 50nm****. B: ø 10nm und* ***A 100nm****. C: ø 10nm und* ***A 120nm****. Aufnahmen von AG Dr. Plettl.- Institut für Festkörperphysik der Universität Ulm.*

Die funktionalisierten Oberflächen wurden auf eine Größe von 10mm Länge und 5mm Breite geschnitten. Vor der Durchführung von zellbiologischen Experimenten wurden die Substrate im Autoklaven bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 20 min sterilisiert.

2.1.3 Chemikalien und Antikörper

• Alexa Flour 568 (goat anti mouse)	*Life Technologies GmbH - Molecular Probes®, Darmstadt, Deutschland*
• Anti-β-Actin	*SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*
• Antibody Diluent, Background Reducing	*Dako GmbH, Hamburg, Deutschland*
• Anti-Osteokalzin Antikörper [OCG3] (ab13420), mouse monoclonal	*Abcam plc, Cambridge, UK*
• Anti-Vinkulin, monoklonal	*SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*
• Biocoll separating solution	*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*
• Casy ton Verdünnungslösung	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland*
• DAPI - 4′,6-Diamidin-2-phenylindol	*SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*
• Dimethylsulfoxid Rotipuran®	*Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland*
• DMEM	*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*
• Dulbecco`s PBS-Lösung (1x) ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}	*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*
• Ethanol	*SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*

• Fötales Kälberserum (FKS)	*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*
• Formaldehyd	*Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
• Glutaraldehyd	*Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz*
• Isopropanol	*Ölfabrik Schmidt, Ulm, Deutschland*
• L-Glutamin (200mM)	*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*
• Methanol	*Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
• Osmiumtetroxid	*SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*
• Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml)	*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*
• Phalloidin, Fluorescein Isothiocyanate Labeled	*SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*
• Protein Block, Serum-Free	*Dako GmbH, Hamburg, Deutschland*
• Saccharose	*SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland*
• Triton X-100	*Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland*
• 10 x Trypsin (1:250) / EDTA (0,5%/0,2%)	*Biochrom AG, Berlin, Deutschland*

2.1.4 Geräte

• AxioCam MRc	*Zeiss, Göttingen, Deutschland*
• CO_2-Inkubator BBD 6220	*Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland*
• Falcon ® Zellkulturflasche 75 cm² • Falcon ® Zentrifugenröhrchen 50 ml • Falcon ® Multiwell-Platte (12er) • Falcon ® Petrischalen	*BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*
• HERAcell 240 • HERASafe	*Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland*
• Hitachi S 5200 FE-SEM	*Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld, Deutschland*
• Kritisch-Punkt-Trockner CPD 020	*Balzers Union, Deutschland*
• Megafuge 1.0	*Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland*
• Mikroskop- Axioskop 2 Mot Plus • Mikroskop Axiovert 35	*Zeiss, Göttingen, Deutschland*
• Objektträger	*Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland*
• Pipetten (0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl)	*Eppendorf, Köln, Deutschland*

• Pipettenspitzen	*Brand GmbH, Wertheim, Deutschland*
• Pipette Pipetman 100-1000 µl • Pipette Pipetman 50-200µl • Pipette Pipetman 2-20 µl • Pipette Pipetman 0,5-10 µl	*Gilson International B.V., Bad Camberg, Deutschland*
• Pipetus®-akku	*Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland*
• Präparateträger	*Plano W. Plannet GmbH, Marburg, Deutschland*
• Serologische Pipetten	*Costar®, Corning Incorporated, Deutschland*
• Sputter-Anlage SCD 040	*Balzers Union, Deutschland*
• Tuttnauer Tischautoklav 2540 EL	*Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg, Deutschland*
• Viscous Liquid Transfer Pipettes - Einwegpipetten	*VWR International GmbH, Darmstadt, Deut*
• Vortex Genie 2	*Bender & Hohlbein, Zürich, Schweiz*
• Wasserbad GFL 1083	*Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland*
• Zellzähler Casy 1 TT	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland*
• Zentrifuge Allegra™ 64 R	*Beckman Coulter™, Palo Alto, CA, USA*

2.1.5 Zellkultur-Medium und Zusätze

Vollmedium:

- 440 ml DMEM
- 50 ml FKS (30 min bei 56°C inaktiviert)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin
- 5 ml L-Glutamin

2.1.6 Software

- *AxioVision* - Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Deutschland
- *ImageJ (open source)* - Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012.
- *FluorescenceCounter - Skript* - Alois Fichtl (Universität Ulm, Fakultät für Mathematik und Wirtschaftswissenschaften - Institut für Stochastik, Leitung Prof. Schmidt)
- *RefWorks 2.0* - ProQuest LLC, Bethesda, Maryland, USA

2.2 Methodik:

2.2.1 Isolation humaner mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat

Die Isolation der hMSZ erfolgte mit Hilfe von Dichtegradienten-Zentrifugation und anschließender Selektion über Plastikadhärenz nach Standardmethoden (Deans & Moseley, 2000; Friedenstein et al., 1976). Die hMSZ befanden sich nach der Dichtegradienten-Zentrifugation in der Schicht der kernhaltigen Zellen. Durch die Adährenz der hMSZ am Boden der Zellkulturflaschen konnte man eine Selektion erzielen.

Protokoll „Isolation von humanen mesenchymalen Stromazellen“:

Benötigte Reagenzien:

- Biocoll-Trennlösung (Dichte: 1,077 g/ml) mit einer Temperatur von 4°C
- im Wasserbad auf 37°C erwärmtes Vollmedium und Dulbecco´s PBS-Lösung

Benötigte Materialien / Geräte:

- Sterile Zentrifugenröhrchen
- Petrischale
- Pipettenspitzen
- Zellkulturflaschen 75 cm²
- Pipettierhilfe pipetus-akku
- Heraeus Megafuge 1.0
- Zentrifuge Allegra 64R, Rotor F1010

Durchführung:

- Herstellung eines Biocoll-Dichtegradienten durch Zentrifugation von 8 ml Biocoll-Lösung 30 min bei 4°C und 13.500 g
- Knochenmarkaspirat in eine Petrischale überführen und im Verhältnis 1:1 mit Vollmedium durch mehrfaches Resuspendieren homogenisieren
- 2 ml mit Vollmedium verdünntem Knochenmarkaspirat auf den Biocoll-Dichtegradienten auftragen
- 30 min bei 600 g und 4°C zentrifugieren
- Abnahme der kernhaltigen Zellen und Überführung dieser in eine 75cm²-Zellkulturflasche mit 10 ml Vollmedium
- bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultivieren
- nach 24 h Inkubation das Medium mit den nicht adhärenten Zellen abnehmen, anschließend den Boden der Zellkulturflasche 2-mal mit jeweils 5 ml PBS spülen und verwerfen
- 12 ml Vollmedium in die Zellkulturflasche zugeben und bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultivieren

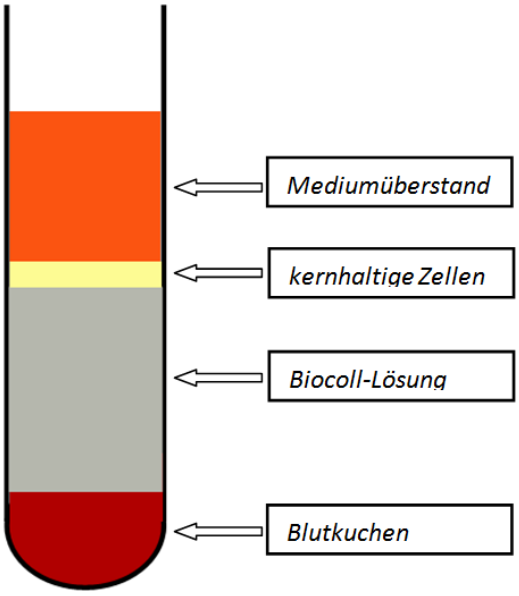


Abb. 6: ***Schematische Darstellung der verschiedenen Schichten nach Dichtegradienten-Zentrifugation***

2.2.2 Zellkultur und Passagierung

Die hMSZ und humanen Osteoblasten wurden bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit mit 12ml Vollmedium pro Zellkulturflasche mit 75 cm^2 Fläche im Brutschrank kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Um eine vorzeitige Differenzierung der hMSZ zu vermeiden, wurde unter mikroskopischer Kontrolle darauf geachtet, dass die Zellen nicht zu dicht wachsen. Bei maximal 75% Konfluenz wurde passagiert:

Protokoll „Zellen trypsinieren“:

Benötigte Reagenzien:

- im Wasserbad auf 37°C erwärmtes Vollmedium und Dulbecco´s PBS-Lösung
- 1-fach konzentriertes Trypsin/EDTA (0,5%/0,2%)

Benötigte Materialien / Geräte:

- Zellkulturflasche 75 cm^2
- Pipettierhilfe pipetus-akku
- 5 ml und 10 ml Costar serologische Pipetten
- 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen
- Heraeus Megafuge 1.0

Durchführung:

- Vollmedium aus der Zellkulturflasche abnehmen und verwerfen
- mit je 10 ml PBS-Lösung 2-mal spülen
- 2 ml Trypsin-Lösung in die Zellkulturflasche zugeben
- 5 min bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubieren

- unter dem Mikroskop kontrollieren, ob sich die Zellen vom Boden gelöst haben; gegebenenfalls durch Beklopfen der Seitenwände der Zellkulturflasche mit der Handfläche nachhelfen
- Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 10 ml Vollmedium
- Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen pipettieren
- bei 1000 U/min 10 min zentrifugieren
- Überstand entfernen und das Zellpellet mit Vollmedium resuspendieren; anschließend gegebenenfalls Durchführung einer Zellzählung
- Zellsuspension zu gleichen Teilen auf zwei 75 cm^2 Zellkulturflaschen aufteilen und Vollmedium zugeben (10 - 12 ml Vollmedium pro 75 cm^2 Zellkulturflasche)
- bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultivieren

Um quantitative Aussagen über die Proliferation von hMSZ oder humanen Osteoblasten zu treffen, war es wichtig, dass die Ausgangszellzahl auf allen zu untersuchenden nanostrukturierten Oberflächen gleich war. Dafür wurde nach dem Trypsinieren der Zellen die Zellzahl der Zellsuspension mit dem Zellzähler „Casy 1 TT“ (Ehem. Schärfe System GmbH, jetzt Roche Diagnostics GmbH) bestimmt.

Protokoll „Zellzählung“:

Benötigte Reagenzien:

- „Casy ton“ Verdünnungslösung

Benötigte Materialien / Geräte:

- 100 µl PCR-Pipettenspitzen mit manueller Mikroliterpipette
- Zellzähler „Casy 1 TT“
- 10 ml Messbecher

Durchführung:

- 10 ml „Casy ton“ Verdünnungslösung in einen Messbecher abfüllen
- 100 µl Aliquot der zu zählenden Zellsuspension zu der „Casy ton“ Verdünnungslösung pipettieren
- Zellzählung mit Zellzähler „Casy 1 TT“: Zählergebnis als Mittelwert von 3 Einzelmessungen (nur Zellen mit Größen zwischen 10 und 50 µm)

2.2.3 Immunhistologische Methoden

Aufgrund der Tatsache, dass die nanostrukturierten SiO_2-Oberflächen nicht lichtdurchlässig sind, war für die Betrachtung und Auswertung der auf diesen Oberflächen kultivierten Zellen eine fluoreszenzbasierte Methode notwendig. Zur Beurteilung der Zellmorphologie sowie als Methode der Proliferationsmessung eignete sich hierfür die Immunfluoreszenzfärbung von Zellstrukturen des Zytoskeletts und der Zellkerne. Durch anschließendes Auszählen der angefärbten Zellkerne in einem Übersichtsfenster (Fläche 2,4mm^2) unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte eine quantitative Analyse erzielt werden.

Protokoll „Immunfluoreszenzfärbung“:

Benötigte Reagenzien / Antikörper:

- Dulbecco`s PBS-Lösung
- 3,7 % Formaldehyd in PBS
- 0,2 % Triton X-100 in PBS
- Dako „Protein Block“
- Dako „Antibody Diluent“
- Dako „Fluorescence Mounting Medium“

- Antikörper:
    - ***Anti-β-Actin*** - 1:200 mit „Antibody Diluent" verdünnt
    - ***Anti-Vinculin*** - 1:400 mit „Antibody Diluent" verdünnt
    - ***Alexafluor 568*** - 1:1000 mit „Antibody Diluent" verdünnt
    - ***Phalloidin-FITC*** - 1:20 mit „Antibody Diluent" verdünnt
    - ***DAPI*** - Stammlösung (5 mg gelöst in 1 ml H_2O) 1:1000 mit Methanol und anschließend 1:10 mit „Antibody Diluent" verdünnt
    - ***Anti-Osteocalcin*** - 1:100 mit „Antibody Diluent" verdünnt

Benötigte Materialien / Geräte:

- Axioskop 2 mot plus
- Einwegpipetten
- Objektträger

Durchführung:

- Kulitiverung von ca. 20.000 hMSZ bzw. hOB je „Well" einer „12-Well-Platte" auf den nanostrukturierten SiO_2-Oberflächen über einen Zeitraum von 24 Stunden bzw. 1 Woche
- zweimaliges Spülen mit 1 ml PBS pro „Well" einer „12-Well-Platte"
- Fixierung der Zellen mit 1 ml pro „Well" 3,7% Formaldehyd-Lösung für 30 Minuten bei RT
- 3-mal spülen mit je 1 ml PBS
- Inkubation mit 0,2 % Triton X-100 für 10 Minuten bei RT
- 1-mal spülen mit je 1 ml PBS
- Überschichtung der Substrate mit dem Dako „Protein Block" und Inkubation für 30 Minuten

Abhängig davon, welche Strukturen und Proteine innerhalb der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar sein sollten, wurden in den folgenden Schritten unterschiedliche Antikörper verwendet. Die Primärantikörper Anti-β-Actin, Anti-Vinculin sowie Anti-Osteocalcin kombinierte man hierfür jeweils mit dem Sekundärantikörper Alexafluor 568:

- Abnahme des Dako „Protein Blocks“ und Inkubation mit einem der Primärantikörper Anti-β-Actin (1:200), Anti-Vinculin (1:400) oder Anti-Osteocalcin (1:100) für 16 Stunden bei 4°C
- einmaliges Spülen mit 1 ml PBS pro „Well“ einer „12-Well-Platte“
- Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexafluor 568 (1:1000) für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur
- drei Spülvorgänge mit je 1ml PBS
- Inkubation mit Phalloidin-FITC (1:20) für 30 Minuten im Dunkeln bei RT
- 2-mal spülen mit 1 ml PBS
- mit DAPI (1:10) für 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubieren
- 2-mal spülen mit 1 ml PBS
- Überschichtung der Substrate mit Dako „Fluorescence Mounting Medium“ für 12 Stunden bei 4°C mit anschließendem Mikroskopieren unter dem Fluoreszenzmikroskop

2.2.4 Methodik der Elektronenmikroskopie

Durch immunhistologische Methoden konnten Aussagen über die Morphologie der hMSZ getroffen werden. Der direkte Zell-Substrat-Kontakt wurde jedoch auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern nicht gezeigt, da die nanoskalige Säulenstruktur der Oberflächen durch diese Methodik nicht darstellbar war.

Mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurden diese Zell-Substrat-Kontakte sichtbar. Durch so genannte „Cross-Section“-Aufnahmen (80° Drehung zur Sichtachse) konnten in den Randbereichen der Substrate Zellen mit ihren Filopodien auf den Nanosäulen dargestellt werden.

Protokoll „Präparation für die Elektronenmikroskopie“:

Benötigte Reagenzien:

- Dulbecco`s PBS-Lösung
- 2,5% Glutaraldehyd +1M Saccharose in PBS
- 2% Osmiumtetroxid in PBS
- Ethanol vergällt in unterschiedlichen Konzentrationen

Benötigte Materialien / Geräte:

- Hitachi S 5200 FE-SEM
- Einwegpipetten
- Kritisch-Punkt-Trockner
- Sputter-Anlage
- Präparateträger

Durchführung:

- Kulitiverung von ca. 20.000 hMSZ je „Well“ einer „12-Well-Platte“ auf den nanostrukturierten SiO_2-Oberflächen über einen Zeitraum von 24 Stunden
- zweimaliges Spülen mit 1 ml PBS pro „Well“
- Fixierung der Zellen mit 1 ml pro „Well“ 2,5% Glutaraldehyd +1M Saccharose in PBS für 1 Stunde bei RT
- 3-mal spülen mit 1 ml PBS
- Inkubation mit 2% Osmiumtetroxid in PBS für 2 Stunden bei RT
- mehrfaches Spülen mit PBS
- Behandlung der Zellen mit 30% Ethanol vergällt für 1min
- 50% Ethanol verg. für 1min
- 70% Ethanol verg. für 1min
- 70% Ethanol verg. für 60 Stunden

- 96% Ethanol verg. für 1min
- 100% Ethanol verg. für 1min
- 100% Ethanol verg. für 15min
- 100% Ethanol verg. für 20min
- Kritisch-Punkt-Trocknung mit CO_2
- Montage auf Präparateträger
- Besputterung mit 5nm Platin bzw. 5nm Gold-Palladium und Mikroskopie am Hitachi S 5200 FE-SEM

2.2.5 Statistische Methoden

Für die Ergebnisse zur Adhäsion/Zellmorphologie und osteogenen Differenzierung wurden fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen der Zellen bei 5-facher Vergrößerung angefertigt. Die Spenderanzahl betrug hierbei n=1. Drei freiwillige Probanden, die eine Einführung in die Thematik erhielten, führten eine Auszählung der Zellen und Einteilung nach bestimmten Kriterien durch. Danach wurden die Mittelwerte der Auszählungen berechnet sowie als Marker für die Zuverlässigkeit der Methodik der Varianzkoeffizient der Auszählungen analysiert.

Zur quantitativen Analyse in Bezug auf die Proliferationsmessungen wurden DAPI-gefärbte Zellkerne von 10 repräsentativen Übersichtsaufnahmen jeweils eines Substrates mit Hilfe der Software „ImageJ“ und des „FluorescenceCounter“ - Skriptes ausgezählt. Anschließend wurde der Median aus den 10 Werten berechnet. Durch die Spenderanzahl von n=5 erhielt man somit für jede getestete Oberfläche nach 24h bzw. 7 Tagen jeweils 5 Werte, die in die statistische Auswertung eingingen. Diese erfolgte durch einen „Two-way ANOVA“ sowie einen „Bonferroni posttest“, wobei nur Werte mit einem $P<0.001$ (***) in die Diagramme eingetragen und als statistisch hoch signifikant gewertet wurden.

3: Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSZ) und primären humanen Osteoblasten (hOB) auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten getestet. Im Mittelpunkt der Arbeiten standen Untersuchungen mit hMSZ zur zellulären Adhäsion und räumlichen Orientierung auf den 3D-Strukturen sowie Proliferationsversuche mit hMSZ und hOB. Des Weiteren wurde der Einfluss der 3D-Topographien auf hMSZ bezüglich Differenzierung untersucht.

Für die Versuche wurden SiO_2-Substrate mit unterschiedlicher Säulenstruktur im Nanobereich verwendet. Der Säulendurchmesser der verschiedenen Substrate differierte zwischen 10nm und 30nm, die Abstände der Säulen zueinander (gemessen vom Mittelpunkt der Säulen) betrugen zwischen 50nm und 120nm, die Säulenhöhen reichten von 20nm bis 50nm. Als Kontrolle dienten glatte SiO_2-Rohlinge ohne Säulenstruktur.
Die Bezeichnungen der unterschiedlichen Topographien werden im anschließenden Teil der Arbeit wie folgt dargestellt: Säulen-Durchmesser in nm (ø) - Abstand in nm (A) - Höhe in nm (H).

3.1 Humane multipotente mesenchymale Stromazellen und primäre humane Osteoblasten in Zellkultur

Aufgrund der Tatsache, dass die Isolierung der hMSZ aus Knochenmarkaspirat sowie die osteogene Differenzierung dieser zu hOB nach Standardmethoden (siehe 2.2.1. / 2.2.3.) erfolgte, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den verwendeten Zellen um humane multipotente Stromazellen sowie primäre humane Osteoblasten handelte.
Des Weiteren wurden laborintern durch Frau Hengartner regelmäßig FACS Analysen mit spezifischen Oberflächenmarkern für hMSZ durchgeführt, um die Identität der Zellpopulationen zu überprüfen.

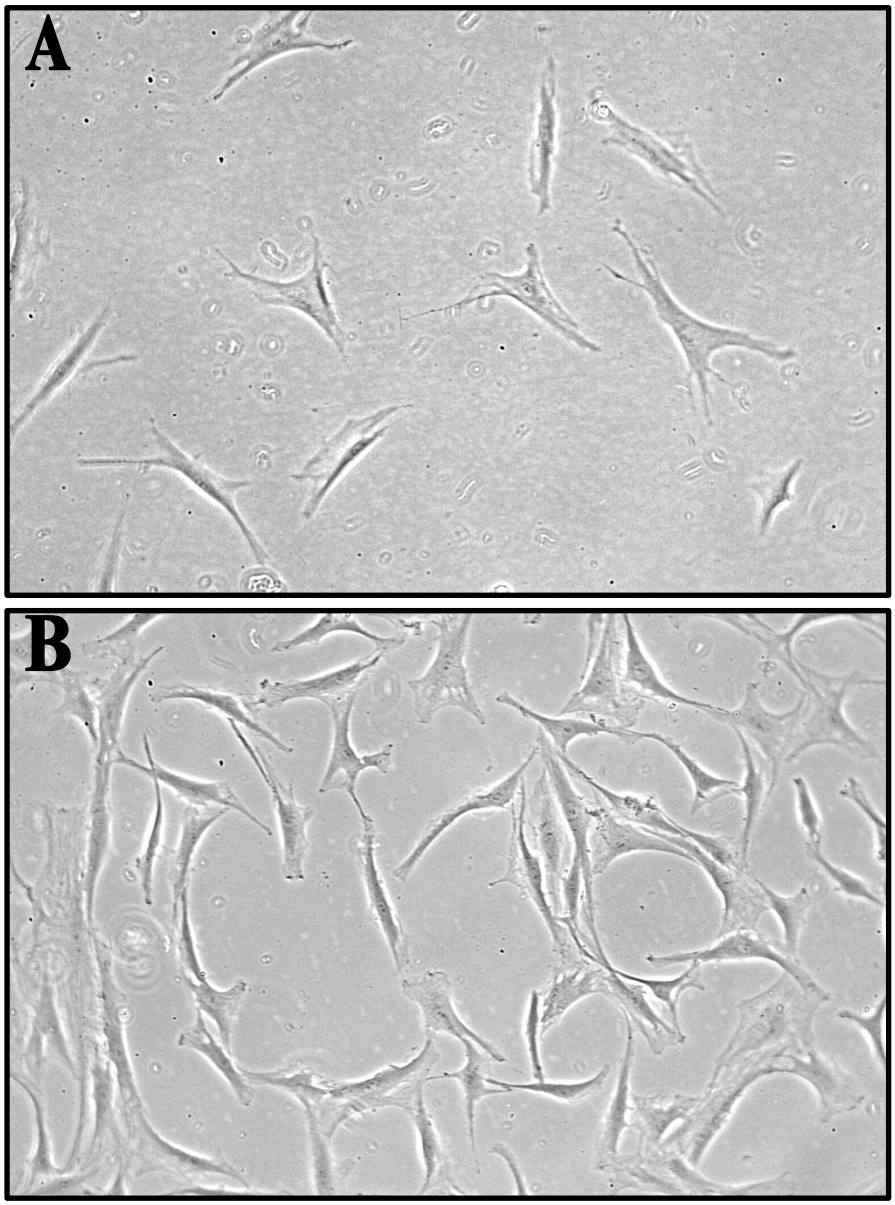


Abb. 7: ***Lichtmikroskopische Aufnahmen von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) und primären hOB (humanen Osteoblasten)***

Charakteristische Zellmorphologie von hMSZ (Bild A mit 20-facher Vergrößerung) und primären hOB (Bild B mit 10-facher Vergrößerung) nach Kultivierung in Zellmedium.

3.2 Besiedlung von hMSZ und pimären hOB auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten

3.2.1 Adhäsion und Zellmorphologie von hMSZ auf nanostrukturierten Substraten unter fluoreszenzmikroskopischer Sicht

Um Aussagen über das Adhärenzverhalten sowie die Zellmorphologie von hMSZ auf den nicht-transparenten, nanostrukturierten Topographien zu treffen, wurde die Fluoreszenzmikroskopie als geeignete Methodik ausgewählt. Hierdurch konnten Zellstrukturen selektiv mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt werden.

Für die Beurteilung der Adhäsion bzw. Zellmorphologie und Zellzählung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt und das Aktin-Zytoskelett mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phalloidin-FITC bzw. anti-beta-Actin angefärbt. Des Weiteren fand bei einigen Substraten eine Färbung der fokalen Adhäsionen mit einem Antikörper gegen Vinkulin statt.
Die Abbildung 8 liefert einen Überblick über die verwendeten Farbkanäle der fluoreszenzmikroskopischen Bilder.

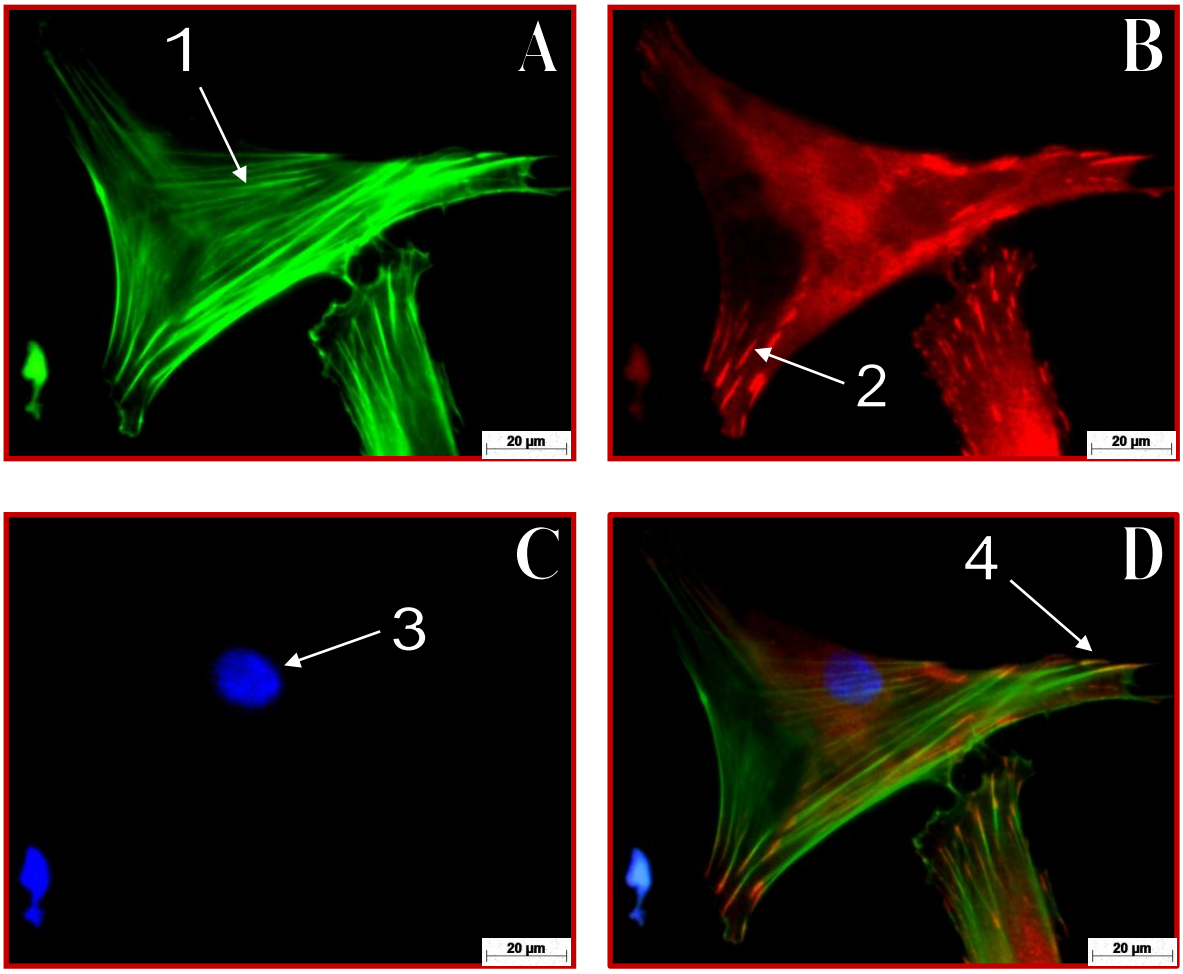


Abb. 8: ***Beispielhafte Darstellung eines mehrfach gefärbten Präparates mit jeweiliger separater Aufnahme der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe***

hMSZ (humane mesenchymale Stromazellen) nach einem Tag in Zellkultur auf der Topographie 10-100-20 (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm) - fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 63-facher Vergrößerung. ***1:*** *mit Phalloidin-FITC grün angefärbte Aktin-Stressfasern des Zytoskeletts;* ***2****: mit Anti-Vinkulin rot angefärbte fokale Adhäsionen; des Weiteren zeigt sich im Zytoplasma der Zelle eingelagertes Vinkulin (Bild B);* ***3****: mit Dapi (4`,6-Diamidin-2-phenylindol) blau gefärbter Zellkern.* ***4:*** *Überlagerungen der grün gefärbten Aktin-Stressfasern und der rot gefärbten fokalen Adhäsionen leuchten gelb. Die Bilder A, B und C zeigen separat die verwendeten Farbkanäle an, Bild D zeigt ein Mischbild aller Farbkanäle. Maßstabsbalken 20µm.*

Nach 24 h in Zellkultur auf den funktionalisierten SiO_2-Oberflächen bzw. auf den blanken SiO_2-Oberflächen zeigte sich, dass hMSZ auf allen getesteten Oberflächen adhärieren konnten.

In Abb. 9 ist exemplarisch eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von hMSZ bei 5-facher Vergrößerung nach einem Tag Kultivierung dargestellt.

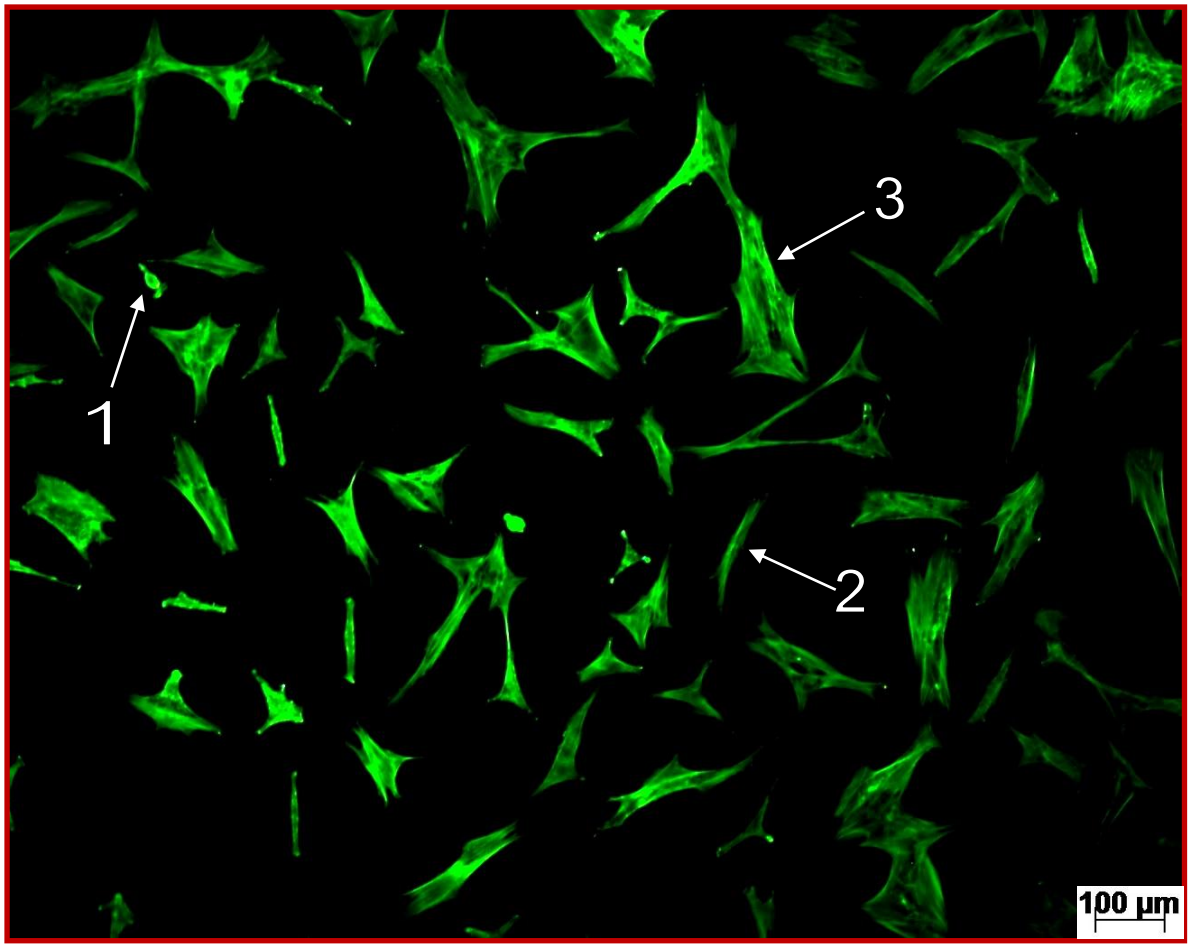


Abb. 9: ***Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) nach einem Tag Kultivierung***

hMSZ auf nanostrukturierter Topographie 10-100-35 (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm) bei 5-facher Vergrößerung mit Färbung des Aktinzytoskeletts (grün). Die Markierungen zeigen adhärente Zellen mit unterschiedlicher Zellmorphologie. ***1****: wenig gespreitete Zelle mit rundlichem Zellkörper;* ***2****: Zelle mit spindelförmigem Erscheinungsbild;* ***3****: Zelle mit weiter Zellspreitung. Maßstabsbalken 100µm.*

Zur genaueren Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von hMSZ wurden von allen getesteten Topographien fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen bei 5-facher Vergrößerung angefertigt (siehe Abb. 9). Die hMSZ von je zwei Übersichtsaufnahmen jedes Substrates wurden für die weitere Beurteilung der Zellmorphologie in drei verschiedene Kategorien eingeteilt (siehe Abb. 10):

A. Zellen mit wenig gespreitetem, rundlichem Erscheinungsbild
B. Zellen mit typisch fibroblastärem, spindelförmigem Stammzellcharakter
C. Zellen mit weit gespreitetem Erscheinungsbild

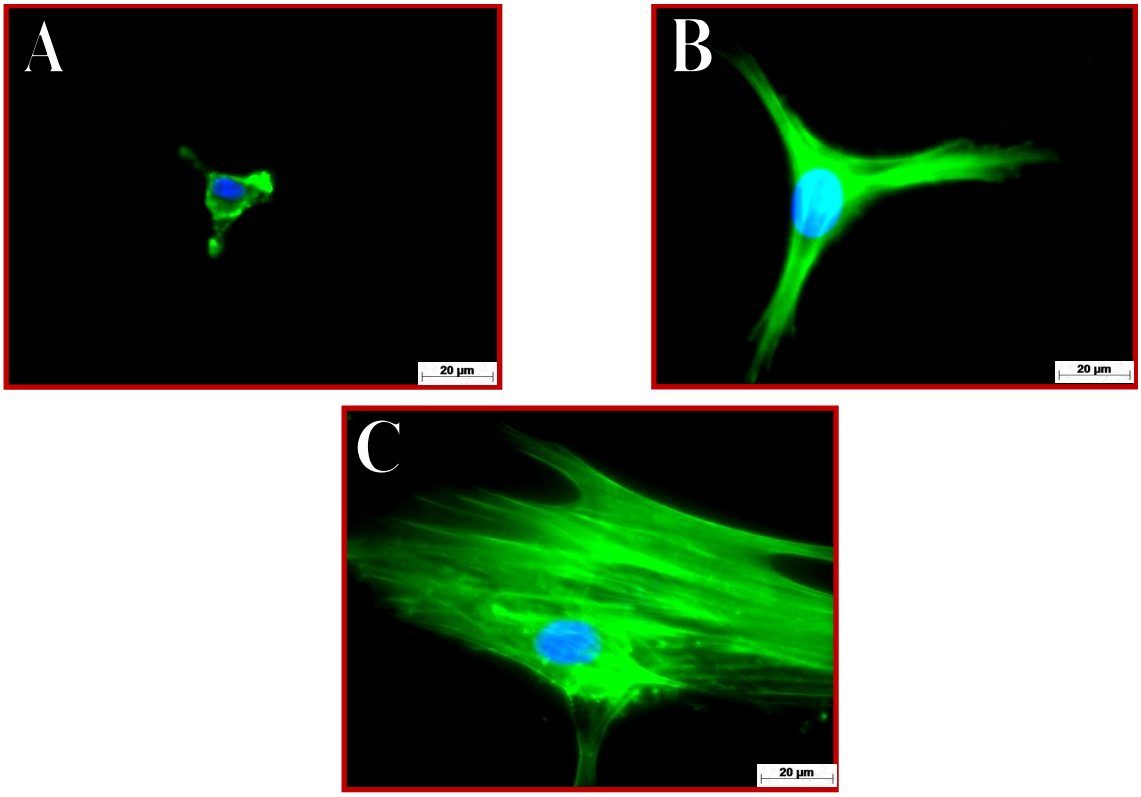


Abb. 10: ***Einteilung der hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) nach zellmorphologischen Kriterien***

hMSZ nach einem Tag Kultivierung auf nanostrukturierten Topographien bei 63-facher Vergrößerung - fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit Anfärbung des Aktinzytoskeletts (grün) und der Zellkerne (blau). A: Zelle mit wenig gespreitetem, rundlichem Erscheinungsbild. B: Zelle mit typisch spindelförmigem Stammzellcharakter. C: Zelle mit weit gespreitetem Erscheinungsbild. Maßstabsbalken 20µm.

Zur Absicherung der Daten und um eine objektive Zellzählung durchzuführen, wurde das Auszählen der Zellen bzw. die anschließende Einteilung von jeweils 3 freiwilligen Probanden übernommen, die zuvor eine Einführung in die Thematik erhalten haben. Die im folgenden Teil genannten Daten beziehen sich auf den Mittelwert aus den 3 unabhängigen Zählungen. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse zur Adhäsion war aufgrund der niedrigen Fallzahl und des limitierten Kontingents an nanostrukturierten Substraten leider nicht möglich. Als Marker für die Zuverlässigkeit der Auszählungen wurde der Mittelwert der Varianzkoeffizienten bestimmt. Dieser betrug 14,73 %.

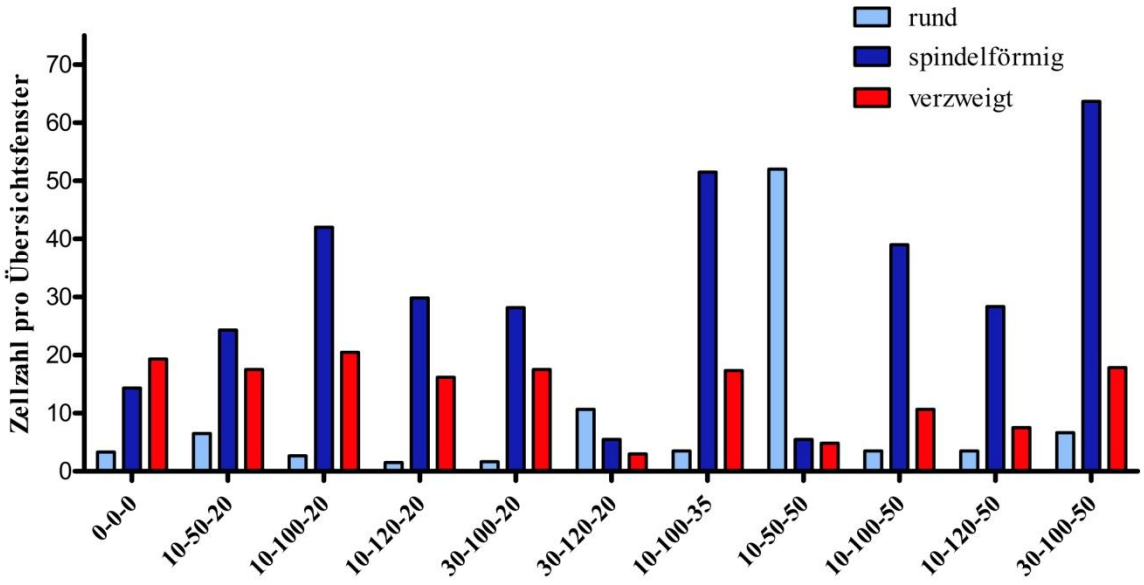


Abb. 11: ***Darstellung der ausgewerteten Zählungen zur Zellmorphologie von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) auf nanostrukturierten Topographien nach einem Tag in Zellkultur***

Die Einteilung der Zellen erfolgte nach zellmorphologischen Kriterien in wenig gespreitete (rund), spindelförmige und weit gespreitete (verzweigt) Zellen. Die Zellzahlen beziehen sich auf ein Übersichtsfenster mit einer Fläche von 2,4mm². Auf der x-Achse sind die verschiedenen getesteten Topographien aufgetragen (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm). 0-0-0 ist eine blanke SiO_2 (Siliciumdioxid) - Oberfläche zur Kontrolle. In diesem Diagramm sind die Mittelwerte der Auszählungen dargestellt. n=1.

Nach 24h Kultivierungsdauer bildeten auf allen getesteten Oberflächen, mit Ausnahme der Substrate 0-0-0, 30-120-20 und 10-50-50, Zellen mit spindelförmigem, fibroblastärem Erscheinungsbild den größten Anteil an der Gesamtzellzahl der jeweiligen Oberfläche. Die Anzahl der Zellen, die nach 24h wenig gespreitet sowie mit rundlichem Zellkörper auf den Oberflächen adhärierten, war auf allen getesteten Oberflächen, mit Ausnahme der Säulenkonfiguration 30-120-20 sowie 10-50-50, jeweils kleiner als 7 Zellen pro Aufnahmefenster (Fläche: 2,4mm²). Die Zellzahlen von 10,7 Zellen pro Aufnahmefenster an rundlichen Zellen auf den Oberflächen 30-120-20 und 52 auf 10-50-50 deuten auf eine erschwerte Adhäsion auf diesen Substraten hin.

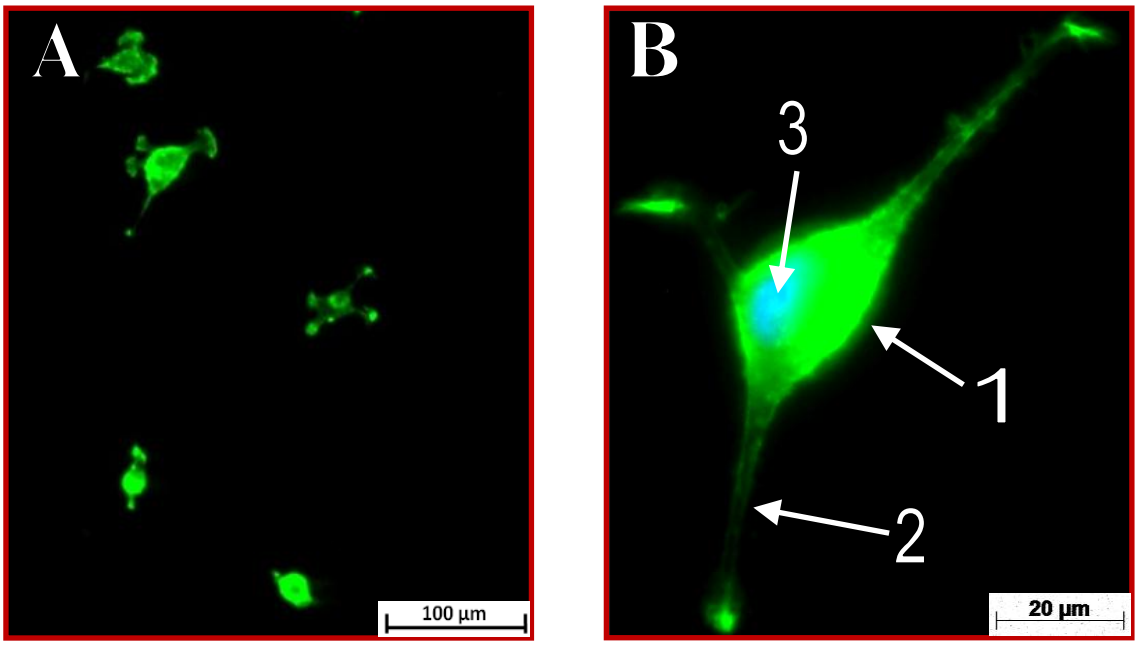


Abb. 12: ***Zellmorphologie von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) auf nanostrukturierter Topographie 10-50-50(ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm) nach einem Tag in Zellkultur - Repräsentative Aufnahmen***
*Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bei 20-facher Vergrößerung (Bild A) bzw. 63-facher Vergrößerung (Bild B). Anfärbung des Aktinzytoskeletts (grün) auf beiden Bildern. (DAPI (4`,6-Diamidin-2-phenylindol)-Zellkernfärbung zusätzlich auf Bild B). MSZ präsentieren sich mit rundlichem Zellkörper (**1**), dünn auslaufenden Pseudopodien (**2**) sowie teilweise pyknotischen Zellkernen (**3**). Maßstabsbalken Bild A: 100µm, Bild B: 20µm.*

Die Abb. 12 zeigt repräsentative Aufnahmen der Zellmorphologie von hMSZ auf 10-50-50. Es stellte sich überwiegend eine Zellmorphologie mit rundlichem Zellkörper und wenigen dünn auslaufenden Pseudopodien dar. Die Zellkerne der hMSZ auf den Oberflächen 10-50-50 sowie 30-120-20 schienen teilweise verdichtet und pyknotisch.

Auf den glatten, unstrukturierten Oberflächen 0-0-0 zeigte sich 24h nach Aussaat eine verzweigte und weit gespreitete Zellmorphologie als dominierende Zellform. 19,3 Zellen pro Fenster stellten auf den unstrukturierten SiO_2-Oberflächen ein verzweigtes Erscheinungsbild dar. Auffällig war hierbei eine Abhängigkeit der Zellmorphologie von der Säulenhöhe: Mit Ausnahme der Oberfläche 10-50-50 verschob sich das Verhältnis „spindelförmige Zellen / verzweigte Zellen“ mit steigender Säulenhöhe immer mehr zu Gunsten der spindelförmigen Zellen. Auf allen getesteten Oberflächen mit einer Säulenhöhe von 20nm (10-50-20, 10-100-20, 10-120-20, 30-100-20, 30-120-20) lag der Quotient „spindelförmig/verzweigt“ zwischen 1,4 und 2,0. Im Gegensatz hierzu ergab sich auf der Oberfläche 10-100-35 ein Quotient „spindelförmig/verzweigt“ von 3,0 und auf den Oberflächen mit 50nm Säulenhöhe (10-100-50, 10-120-50, 30-100-50) zwischen 3,6 und 3,8.

Es lässt sich somit eine gewisse Regelmäßigkeit erkennen. Mit steigender Säulenhöhe nahm auch der relative Anteil an Zellen mit spindelförmiger, fibroblastärer Zellmorphologie zu. Umgekehrt kommt man zu dem Schluss, dass die hMSZ nach 24h auf blanken, glatten Oberflächen (0-0-0) bzw. Oberflächen mit einer Säulenhöhe von nur 20nm gesamt betrachtet ein weiter gespreitetes und verzweigteres Erscheinungsbild aufwiesen als auf Substraten mit Säulenhöhen von 35 oder 50nm (siehe Abb. 13).

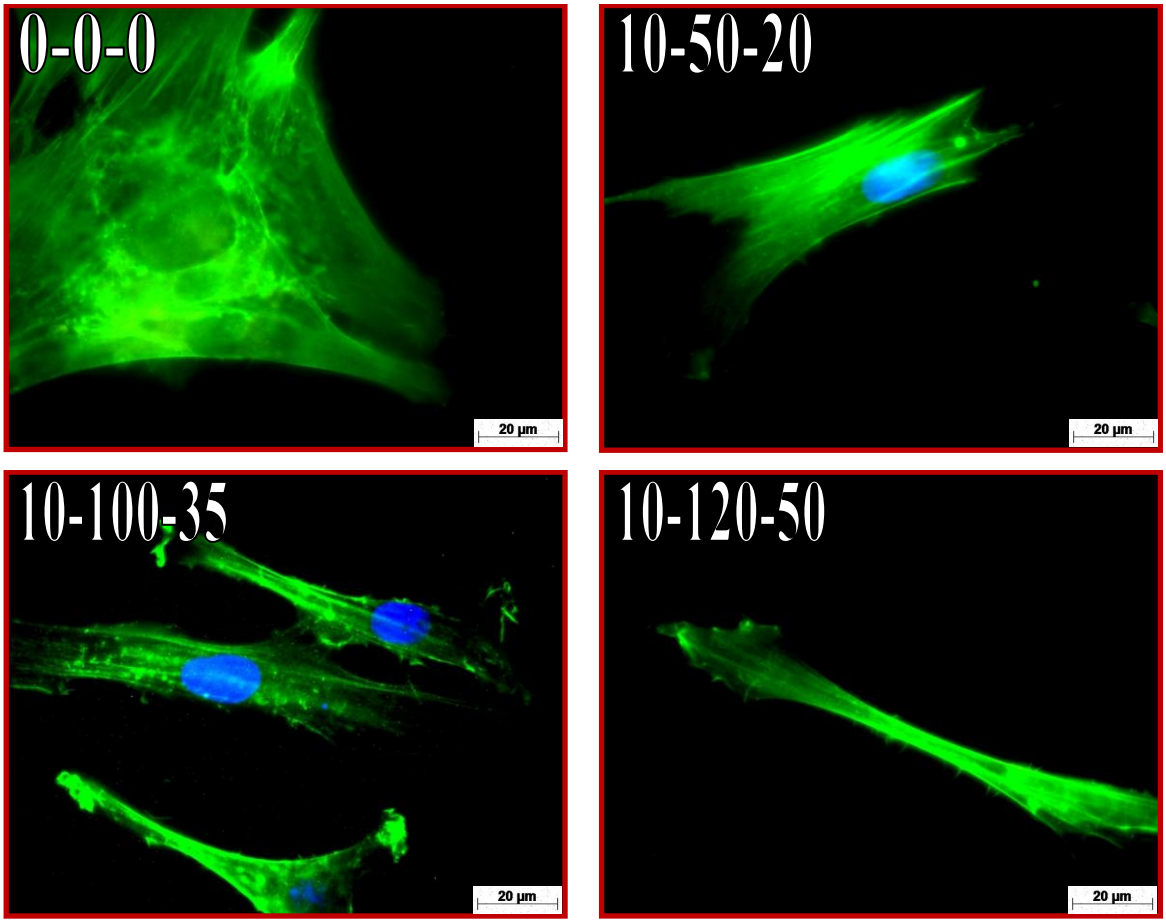


Abb. 13: ***Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der dominierenden Zellformen von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) auf unterschiedlichen Säulenhöhen***

Die Säulenhöhe beeinflusst die Zellmorphologie der hMSZ. Aufnahmen bei 63-facher Vergrößerung - Anfärbung des Aktinzytoskeletts (grün) auf allen Bildern. Zusätzlich DAPI (4`,6-Diamidin-2-phenylindol)-Zellkernfärbung (blau) auf den Bildern 10-50-20 (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm) und 10-100-35. Auf der unstrukturierten Oberfläche 0-0-0 sowie den Topographien mit 20nm Säulenhöhe (10-50-20) sind die Zellen tendenziell weiter gespreitet als auf Topographien mit 35 (10-100-35) und 50nm Säulenhöhe (10-120-50). Maßstabsbalken 20µm.

3.2.2 Adhäsion und Zellmorphologie von hMSZ auf nanostrukturierten Substraten unter rasterelektronenmikroskopischer Sicht

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie war es bisher möglich, die Zellmorphologie der hMSZ auf den lichtundurchlässigen Substraten zu beurteilen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten jedoch keine direkten Einblicke in die Zell-Substrat-Kontakte liefern. Fragestellungen, wie sich hMSZ auf der Säulenstruktur der Oberflächen mit ihren fokalen Adhäsionen verankern bzw. ob die Zellen nur auf den Säulenspitzen adhärieren oder ob sie den direkten Kontakt zum Areal zwischen den Säulen benötigen, blieben hierbei offen.

Durch die Elektronenmikroskopie und deren hohes Auflösungsvermögen konnten Zellen und Säulenstruktur gleichzeitig dargestellt werden. Indem man die mit Zellen besiedelten Substrate im Elektronenmikroskop relativ zum Strahlengang um 35° bzw. 80° kippte, konnten zudem die Randbereiche der Zellen eingesehen werden und somit die räumliche Orientierung der Zellen auf den 3D-Strukturen besser beurteilt werden.

Die hMSZ wurden für die elektronenmikroskopische Untersuchung ebenfalls 24 Stunden auf den Oberflächen kultiviert, anschließend fixiert und für die Elektronenmikroskopie präpariert.

Abb. 14 zeigt um 35° gekippte, elektronenmikroskopische Aufnahmen von adhärenten hMSZ auf Nanosäulenstruktur.

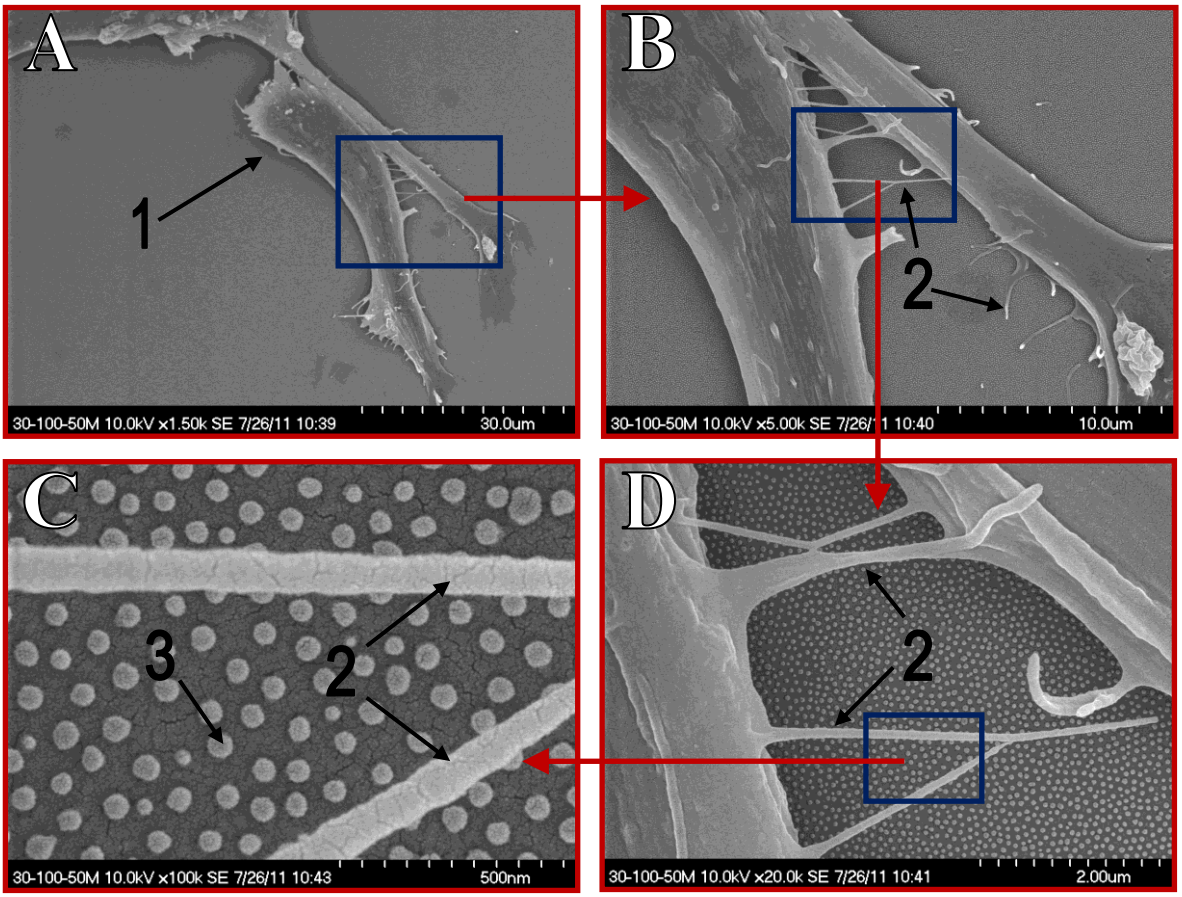


Abb. 14: ***Elektronenmikroskopische Aufnahmen von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) auf nanoskalig strukturierten 3-dimensionalen Topographien***

*Um 35° relativ zum Strahlengang gekippte Aufnahmen bei 1.500-facher (A) bis 100.000-facher (C) Vergrößerung auf der Topographie 30-100-50 (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm). Der jeweilige Ausschnitt des folgenden Bildes ist mit einem blau umrahmten Fenster markiert. Neben der Zellmorphologie (**1**) in A ist die Ausbildung von Filopodien (**2**) in B zu sehen, deren Verlauf in D/C sichtbar ist. Die Säulen erscheinen als runde Kugeln (**3**).*

Bei Aufnahmen mit bis zu 300.000-facher Vergrößerung wurden die Wechselwirkungen zwischen den Zellen und nanotopographischer Säulenstruktur deutlich. Die Zellen nahmen über Filopodien gezielt Kontakt mit den Spitzen der Nanosäulen auf. Dies zeigt, dass hMSZ in der Lage sind, die Nanosäulentopographie wahrzunehmen und im Umkehrschluss, dass die nanoskalige Topographie der Oberflächen Einfluss auf die hMSZ zu nehmen scheint.

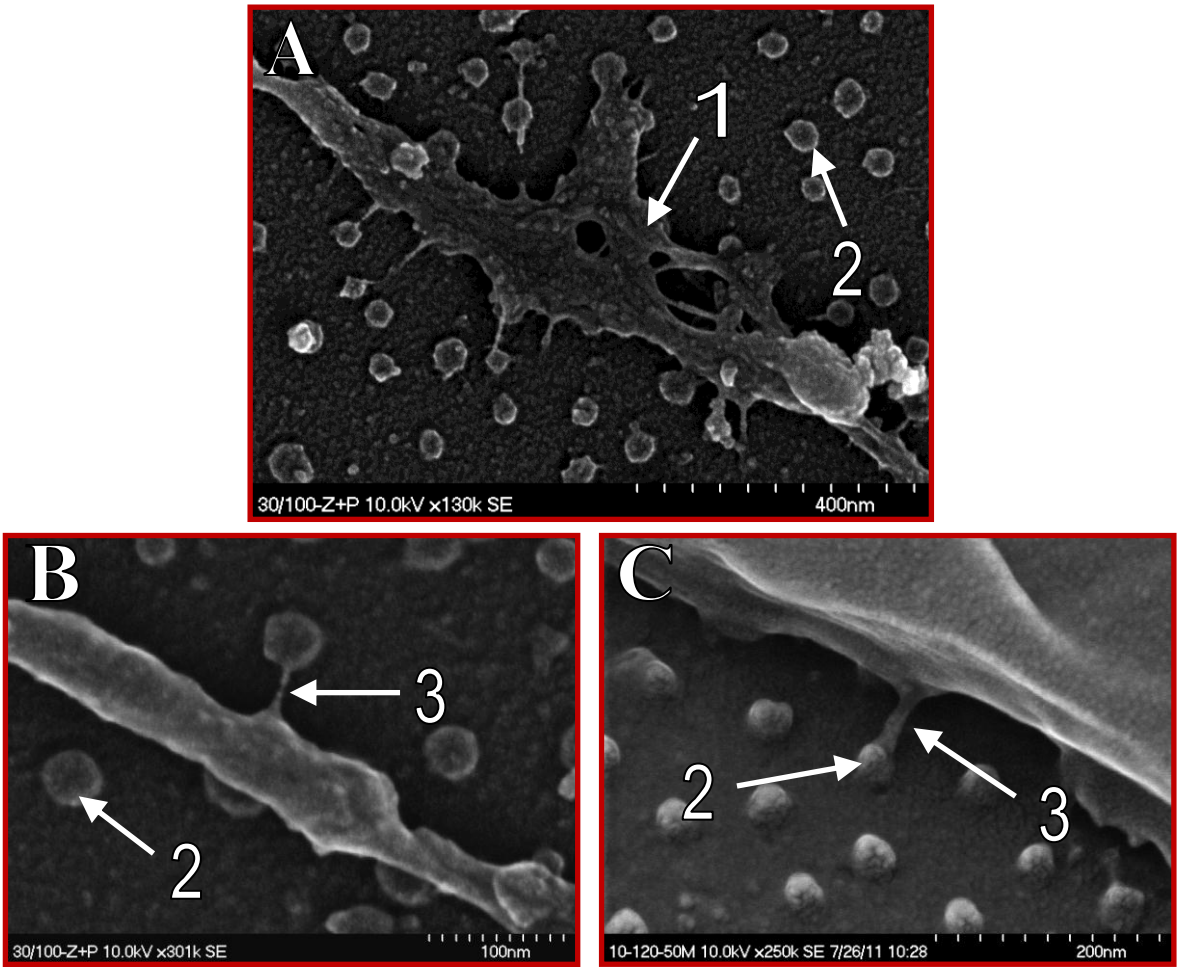


Abb. 15: ***Zell-Substrat-Wechselwirkungen aus elektronenmikroskopischer Sicht***

*Aufnahmen von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) mit 130.000- (A) bis 301.000-facher (B) Vergrößerung aus der Draufsicht auf der Oberfläche 30-100-20 (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm) bzw. mit 250.000-facher (C) Vergrößerung und um 35° gekippt auf der Oberfläche 10-120-50. Bild A zeigt eine adhärente Zelle (**1**) auf 30nm breiten Säulen (**2**). Die Detailaufnahmen B und C zeigen Filopodien (**3**), die gezielt Kontakt mit den Säulen (**2**) aufnehmen.*

Durch Neigung der Substrate um 80° relativ zum Strahlengang konnten so genannte „Cross-Section“-Darstellungen gemacht werden. Diese Aufnahmen ermöglichten es, die Randbereiche der Zellen einzusehen und Aussagen über die räumliche Orientierung der hMSZ auf den 3D-Topographien zu treffen.

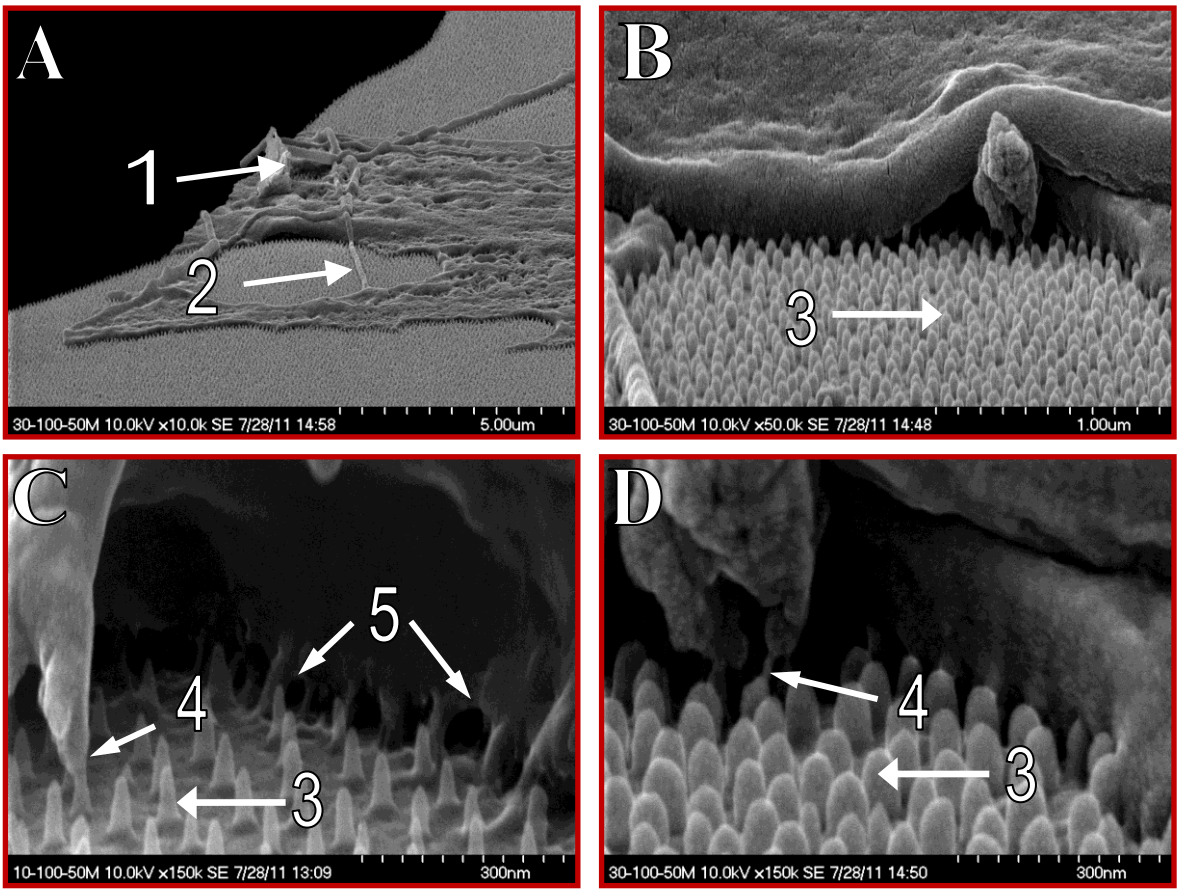


Abb. 16: ***„Cross-Section“-Aufnahmen von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) auf 3D-strukturierten Oberflächen***

*Um 80° gekippte Aufnahmen mit 10.000-facher (A), 50.000-facher (B) bzw. 150.000-facher Vergrößerung (C) auf 30-100-50 (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm). Bild D: Um 80° gekippt mit 150.000-facher Vergrößerung auf 10-100-50. Bild A zeigt eine Übersichtsaufnahme einer Zelle (**1**) und ihrer Filopodien (**2**) auf der Säulenstruktur, die in B, C und D sichtbar wird (**3**). In C/D sind Filopodien (**4**) sichtbar, die gezielt Kontakt mit den Säulenspitzen aufnehmen; die Zelle spannt sich dabei kuppelförmig (**5**) über den Säulen auf.*

In den Abbildungen 15 und 16 ist zu sehen, wie sich die Zellen auf der Nanosäulenstruktur verankerten. Zellausläufer nahmen gezielt Kontakt mit den Säulenspitzen auf, die Bereiche zwischen den Säulen schienen augenscheinlich davon ausgenommen zu sein. Hierbei spannten sich die Zellen teilweise kuppelförmig über den Säulen auf.

3.2.3 Proliferation von hMSZ und primären hOB auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten

In den folgenden Experimenten wurde die Proliferation von hMSZ und hOB auf nanostrukturierten Topographien getestet. Hierbei sollte geklärt werden, inwieweit eine 3-dimensionale, nanoskalig strukturierte Umgebung durch rein mechanische Reize die Vitalität von hMSZ sowie hOB beeinflussen kann.
Für die Versuche wurden wiederum jeweils 20.000 hMSZ bzw. hOB auf den Substraten kultiviert. Anschließend fixierte man die Zellen nach 24h sowie nach 7 Tagen für die Fluoreszenzmikroskopie. Um Angaben über das Proliferationsverhalten zu geben, wurden die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt. Von jedem Substrat wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop 10 Übersichtsaufnahmen bei 5-facher Vergrößerung gemacht. Durch Auszählen der blau angefärbten Zellkerne erhielt man somit pro Substrat 10 verschiedene Zellzahlen pro Aufnahmefenster (Fläche 2,4mm²), aus denen jeweils der Median bestimmt wurde.
In Abbildung 17 ist exemplarisch eine Übersichtsaufnahme der blau gefärbten hMSZ-Zellkerne in 5-facher Vergrößerung nach 24h bzw. 7 Tagen Zellkultivierung auf der Oberfläche 30-100-20 dargestellt.

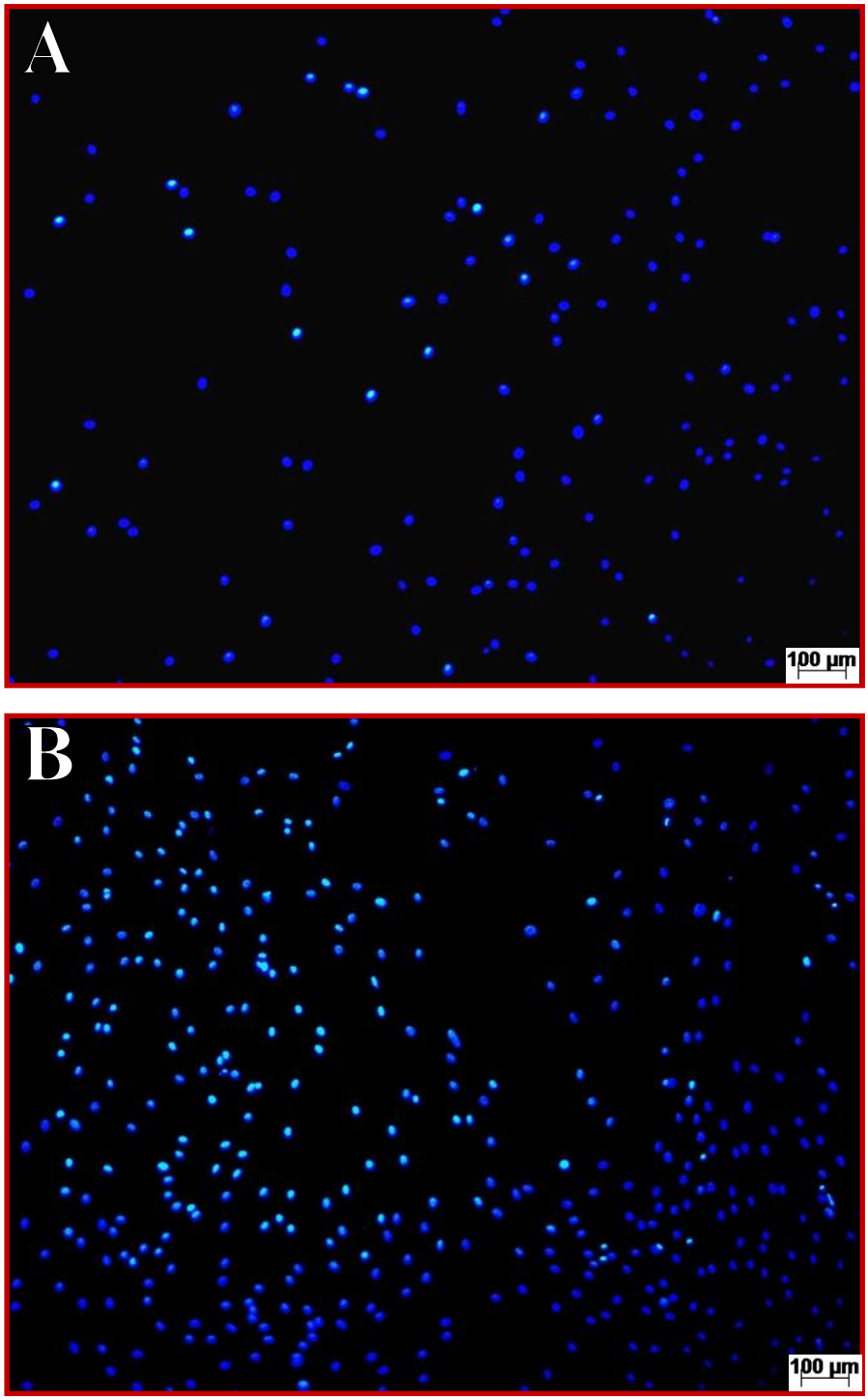


Abb. 17: ***Zellzählung mithilfe von DAPI (4`,6-Diamidin-2-phenylindol) - gefärbten Zellkernen (blau) nach einem Tag (Bild A) sowie einer Woche (Bild B) in Zellkultur***

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) bei 5-facher Vergrößerung auf nanostrukturierten Oberflächen. Maßstabsbalken 100µm.

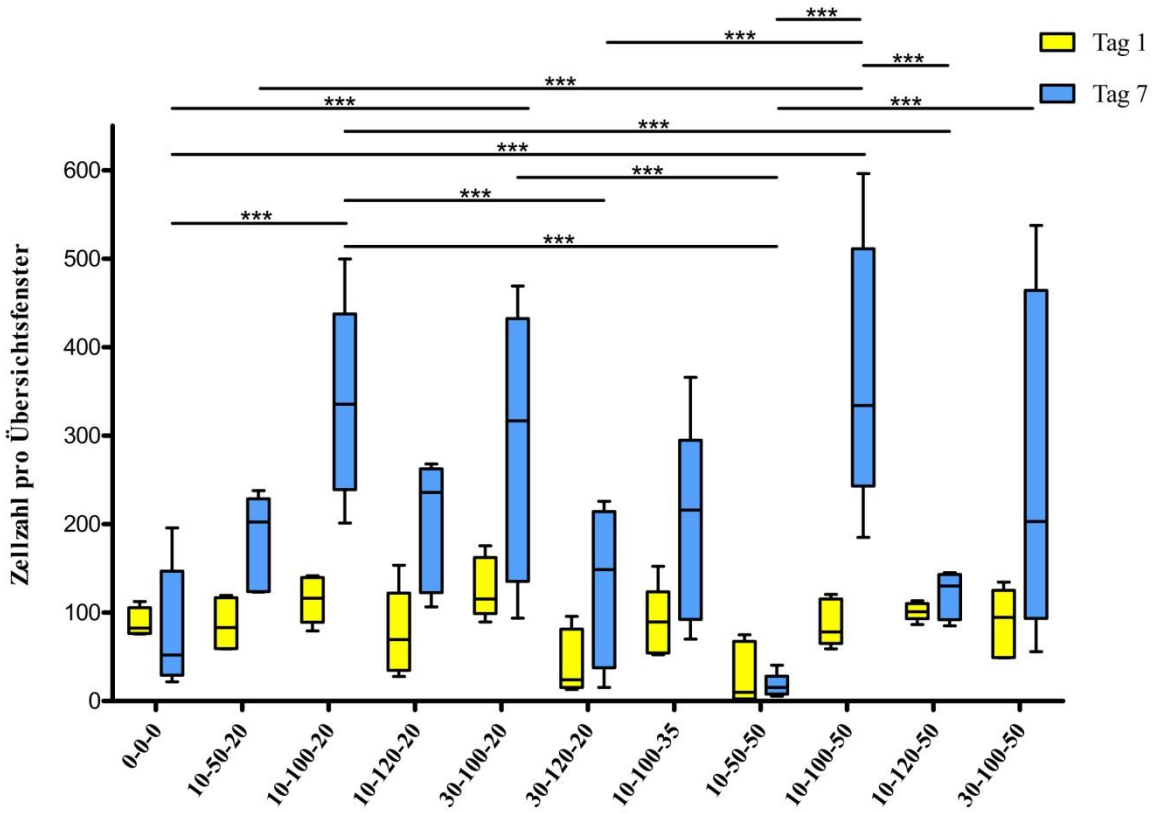


Abb. 18: ***Proliferation von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) auf nanostrukturierten Oberflächen***

Dargestellt sind die Zellzahlen nach einem Tag bzw. einer Woche Kultivierung unter Standardbedingungen. Die Zellzahlen beziehen sich auf ein Übersichtsfenster mit einer Fläche von 2,4mm². Auf der x-Achse sind die verschiedenen getesteten Topographien aufgetragen (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm). 0-0-0 ist eine blanke SiO_2 (Siliciumdioxid) - Oberfläche zur Kontrolle. Im Boxplot dargestellt ist der Median mit Quartilen und den beiden Extremwerten. Die Signifikanz wurde mit einem „Two-way ANOVA" sowie einem „Bonferroni posttest" berechnet, wobei aus Übersichtsgründen nur Signifikanzen mit P<0,001(***) in das Diagramm eingetragen wurden. (n=5)

Alle Angaben zu den Zellzählungen beziehen sich im folgenden Text auf die Mittelwerte ± Standardfehler.

Bei den Proliferationsmessungen der hMSZ wurde deutlich, dass die Ausgangszellzahl auf allen getesteten Substraten 24h nach Aussaat zwischen 76,6 ± 22,1 (10-120-20) und 127,6 ± 15,4 (30-100-20) Zellen pro Übersichtsaufnahme lag, ausgenommen die Oberflächen 10-50-50 mit 30 ± 15,6 und 30-120-20 mit 43,5 ± 16,2 Zellen pro Aufnahmefenster (2,4 mm²).

Die höchsten Zellzahlen nach 24 h waren auf den Oberflächen 10-100-20 mit 114,8 ± 11,7 sowie auf 30-100-20 mit einer Zellzahl pro Übersichtsfenster von 127,6 ± 15,4.

Nach 7 Tagen war im Mittel auf allen nanostrukturierten Topographien ein Zellwachstum zu verzeichnen, mit Ausnahme der unstrukturierten, glatten Oberfläche sowie des Substrates 10-50-50, auf welchen es zu einem Zelluntergang kam. Die größten Zellzahlen 7 Tage nach Zellaussaat wurden auf den Oberflächen 10-100-20 (337,8 ± 50), 30-100-20 (290,4 ± 69) sowie 10-100-50 (369 ± 68,8) gemessen.

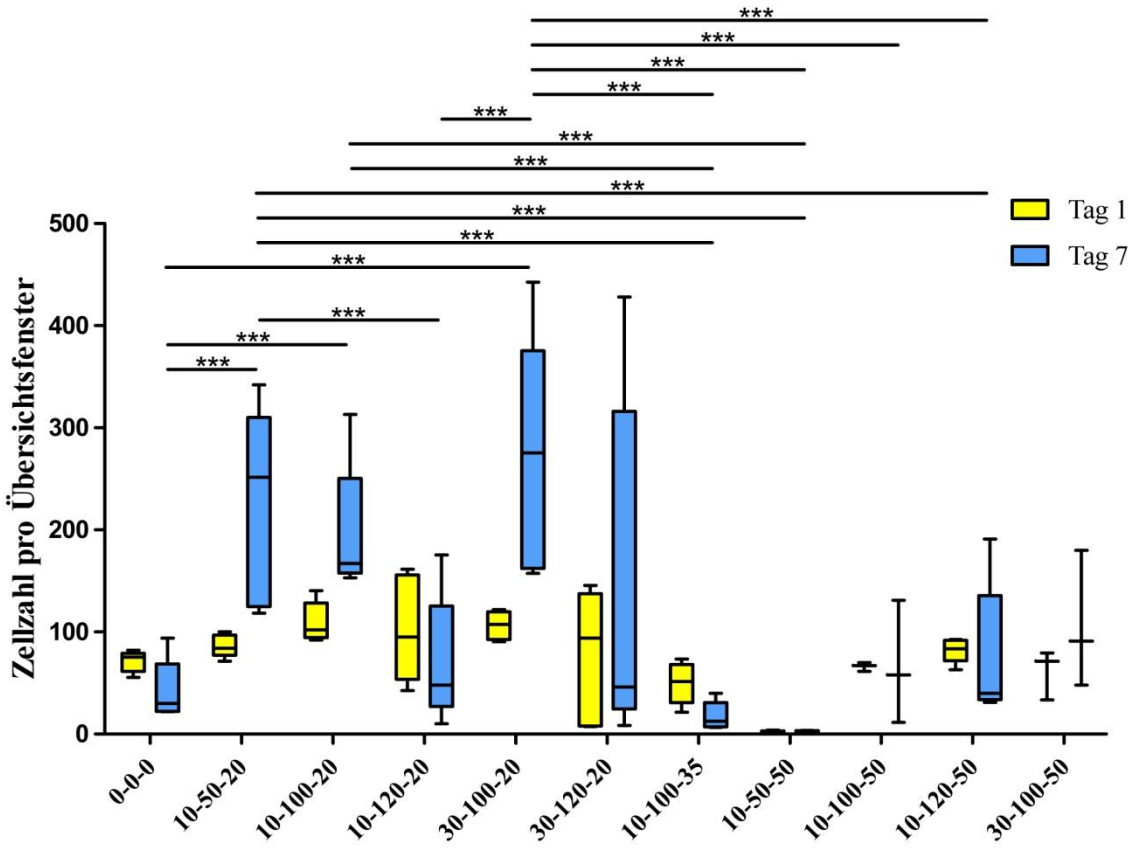


Abb. 19: ***Proliferation von primären hOB (humanen Osteoblasten) auf nanostrukturierten Oberflächen***

Dargestellt sind die Zellzahlen nach einem Tag bzw. einer Woche Kultivierung unter Standardbedingungen. Die Zellzahlen beziehen sich auf ein Übersichtsfenster von 2,4mm². Auf der x-Achse sind die getesteten Topographien aufgetragen (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm). 0-0-0 ist eine blanke SiO_2 (Siliciumdioxid) - Oberfläche zur Kontrolle. Im Boxplot dargestellt ist der Median mit Quartilen und den beiden Extremwerten. Die Signifikanz wurde mit einem „Two-way ANOVA" sowie einem „Bonferroni posttest" berechnet, wobei aus Übersichtsgründen nur Signifikanzen mit P<0,001(***) in das Diagramm eingetragen wurden. (n=5, ausgenommen 10-100-50 und 30-100-50 mit n=3)

Die Zellzahlen der hOB befanden sich nach 24 h im Mittel zwischen 61,5 ± 14,2 und 109,5 ± 8,7 Zellen pro Aufnahmefenster, ausgenommen 10-100-35 mit 49,9 ± 9 sowie 10-50-50 mit 1,6 ± 0,7 Zellen pro Aufnahmefenster (2,4 mm²). Auf der Topographie 10-50-50 ist hierbei, ähnlich den Proliferationsergebnissen der hMSZ, eine nur erschwerte Zelladhäsion möglich.
Die größten Zellzahlen nach 7 Tagen waren auf den Topographien 10-50-20 (224,2 ± 43,2), 10-100-20 (196,7 ± 29,6) und 30-100-20 (270,2 ± 52,2) zu sehen.

Um hMSZ und hOB bezüglich ihrer Proliferation besser vergleichen zu können, wurden die Veränderungen der absoluten Zellzahlen im Zeitraum von Tag 1 bis Tag 7 im Diagramm der Abb. 20 aufgetragen. Hierfür wurden die Mittelwerte der Zellzahlen nach Tag 7 und Tag 1 als Grundlage genommen.

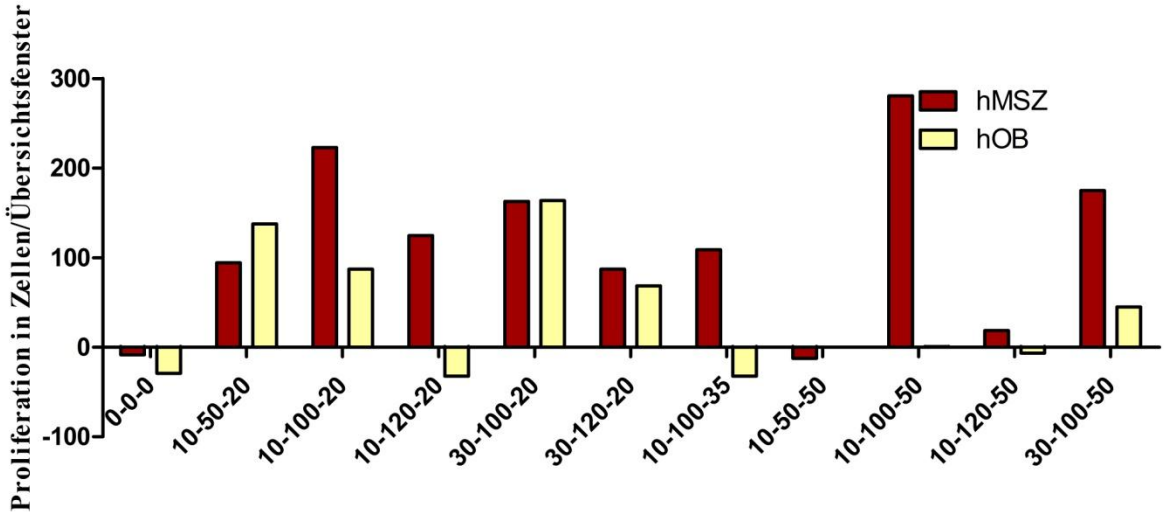


Abb. 20: ***Proliferation von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) und primären hOB (humanen Osteoblasten)***

Dargestellt ist die Proliferation von hMSZ und hOB in absoluten Zellzahlen/Übersichtsfenster im Zeitraum von einem Tag zu einer Woche Zellkultivierung unter Standardbedingungen. Die Zellzahlen beziehen sich auf ein Übersichtsfenster mit einer Fläche von 2,4mm². Auf der x-Achse sind die verschiedenen getesteten Topographien aufgetragen (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm). 0-0-0 ist eine blanke SiO_2 (Siliciumdioxid) - Oberfläche zur Kontrolle.

Zu einem Zellwachstum der hMSZ kam es im untersuchten Zeitraum auf allen getesteten Substraten mit Ausnahme der Oberflächen 0-0-0 und 10-50-50, auf welchen keine Proliferation festzustellen war. Die mesenchymalen Stromazellen auf den Topographien mit 20nm und 35nm Säulenhöhe sowie auf der Oberfläche 30-100-50 proliferierten zwischen 87 und 223 Zellen/Übersichtsfenster. Das größte Zellwachstum mit 281 Zellen/Fenster war auf der Oberfläche 10-100-50 zu verzeichnen.
Bei den hOB zeigte sich gegenüber den hMSZ ein konträres Bild. Auf der Kontrolloberfläche 0-0-0 sowie den Oberflächen 10-120-20, 10-100-35, 10-50-50, 10-100-50 und 10-120-50 war kein Zellwachstum sichtbar. Im Gegensatz hierzu wurde auf allen Substraten mit 30nm Säulendurchmesser sowie den Topographien 10-50-20 und 10-100-20 ein Zellwachstum erreicht. Die größte Proliferation der hOB war auf den Oberflächen 30-100-20 mit 164 Zellen/Fenster und 10-50-20 mit 138 Zellen/Fenster sichtbar.

Als Gemeinsamkeit von hMSZ und hOB wurde deutlich, dass auf allen Topographien mit 20nm Säulenhöhe ein Zellwachstum für beide Zellarten im Zeitraum von Tag 1 bis Tag 7 erreicht wurde, ausgenommen die Oberfläche 10-120-20, auf der lediglich die hMSZ proliferierten (125 Zellen/Fenster). Ebenso gemeinsam war, dass es auf der Kontrolloberfläche 0-0-0 sowie der nanostrukturierten Topographie 10-50-50 zu keinem messbaren Zellwachstum von hMSZ und hOB kam.
Unterschiede wurden auf den Topographien mit 35 bzw. 50nm Säulenhöhe sichtbar: Die hMSZ proliferierten auf den Oberflächen 10-100-35 (109 Zellen/Fenster), 10-100-50 (281 Zellen/Fenster) und 30-100-50 (175 Zellen/Fenster), wohingegen die Zellen der hOB in der Proliferation stagnierten bzw. nur gering proliferierten (30-100-50: 45 Zellen/Fenster).

3.2.4 Osteogene Differenzierung von hMSZ auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten

Nachdem bisher das Adhäsionsverhalten sowie die Proliferation der hMSZ auf den nanostrukturierten Oberflächen untersucht wurde, soll dieses Experiment Aufschlüsse liefern, ob durch eine Veränderung der nanoskaligen Oberflächentopographie eine osteogene Differenzierung der hMSZ ausgelöst werden kann bzw. ob man Unterschiede diesbezüglich auf den einzelnen Topographien feststellen kann.
Als Marker zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde hierfür das Peptidhormon Osteokalzin ausgewählt. 20.000 hMSZ wurden 7 Tage lang auf den Oberflächen kultiviert ohne Anwendung von Differenzierungsmedien. Anschließend fand eine Osteokalzin-Fluoreszenzfärbung statt mit Auswertung unter dem Fluoreszenz-mikroskop.
Zur Quantifizierung der Ergebnisse sind Übersichtsaufnahmen mit 5-facher Vergrößerung angefertigt worden. Zur Verifikation der Daten wurden die Zellen aus jeweils 2 Übersichtsaufnahmen (Fläche 2,4mm²) pro Topographie zusätzlich von 3 unabhängigen Probanden nach vorheriger Unterweisung gezählt. Die Zellen wurden in folgende Gruppen eingeteilt: deutlich sichtbar Osteokalzin exprimierende (positiv) Zellen sowie Zellen, die keinen Anhalt auf Osteokalzinbildung (negativ) liefern. Da in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die Etablierung von nanostrukturierten Oberflächen gelegt wurde und nur ein bestimmtes Kontingent an modifizierten Substraten zur Verfügung stand, war zu den Ergebnissen der osteogenen Differenzierung leider keine statistische Auswertung möglich. Als Marker für die Zuverlässigkeit der Auszählungen wurde der Mittelwert der Varianzkoeffizienten bestimmt. Dieser betrug 21,11 %.

In Abb. 21 sind die hMSZ nach 7 Tagen Kultivierung auf nanostrukturierter Oberfläche dargestellt. Die Pfeile mit einer 1 markieren Zellen, die deutlich sichtbar Osteokalzin bilden; wohingegen die Pfeile mit einer 2 negative Zellen (keine bzw. sehr geringe Osteokalzinbildung) markieren.

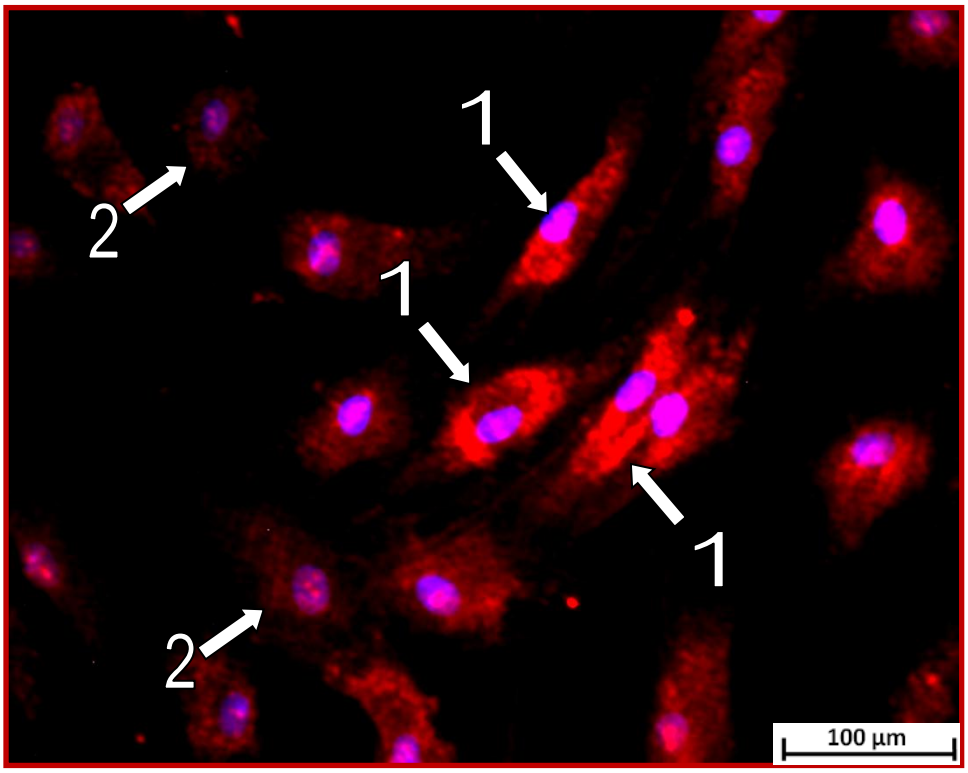


Abb. 21: ***Osteokalzinbildung (rot) von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) nach 7 Tagen Kultivierung auf nanostrukturierten Oberflächen***

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von hMSZ mit 20-facher Vergrößerung auf 10-50-20 (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm). Pfeile mit einer ***1*** *zeigen Zellen mit aktiver Osteokalzinproduktion (positiv). Pfeile mit einer* ***2*** *zeigen Zellen ohne Osteokalzinproduktion (negativ). Maßstabsbalken 100µm.*

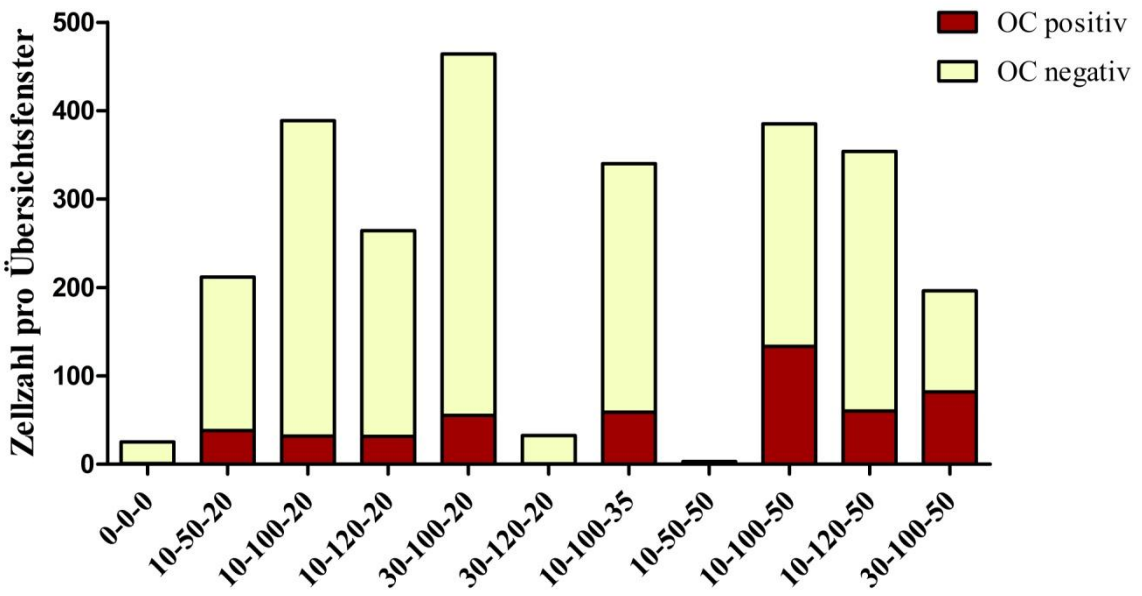


Abb. 22: ***Osteokalzinbildung von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) nach einer Woche Kultivierung auf nanostrukturierten Oberflächen.***

Dargestellt sind die Zellzahlen von Osteokalzin positiven (dunkelrot) bzw. Osteokalzin negativen (beige) Zellen nach einer Woche Kultivierung unter Standardbedingungen. Die Zellzahlen beziehen sich auf ein Übersichtsfenster mit einer Fläche von 2,4mm². Auf der x-Achse sind die verschiedenen getesteten Topographien aufgetragen (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm). 0-0-0 ist eine blanke SiO_2 (Siliciumdioxid) - Oberfläche zur Kontrolle. In diesem Diagramm sind die Mittelwerte der Auszählungen dargestellt. n=1.

Nach 7 Tagen waren auf den Oberflächen 30-120-20, 10-50-50 sowie auf dem glatten, unstrukturierten Substrat 0-0-0 weniger als 32,5 ± 0,5 (MW ± SD) Zellen pro Aufnahmefenster (2,4 mm²) adhärent, von welchen weniger als 0,7 ± 0,6 Osteokalzin bildende Zellen pro Fenster erkennbar waren.

Auf allen weiteren getesteten Substraten lag die Gesamtzellzahl (positive plus negative) nach 7 Tagen bei mindestens 196,2 ± 9,7 Zellen pro Aufnahmefenster (30-100-50).

Bei Nichtbeachtung der 30-120-20 und 10-50-50 wurde ein Gradient deutlich; mit zunehmender Säulenhöhe stieg ebenfalls die Anzahl an Osteokalzin produzierenden Zellen pro Übersichtsfenster: zwischen 32 ± 3 (10-120-20) und 56 ± 4 (30-100-20) Osteokalzin positive Zellen pro Aufnahmefenster für Oberflächen mit einer Säulenhöhe von 20nm, 59 ± 7 für 10-100-35 und zwischen 61 ± 4 (10-120-50) und 134 ± 8 (10-100-50) positive Zellen für Topographien mit 50nm Säulenhöhe.

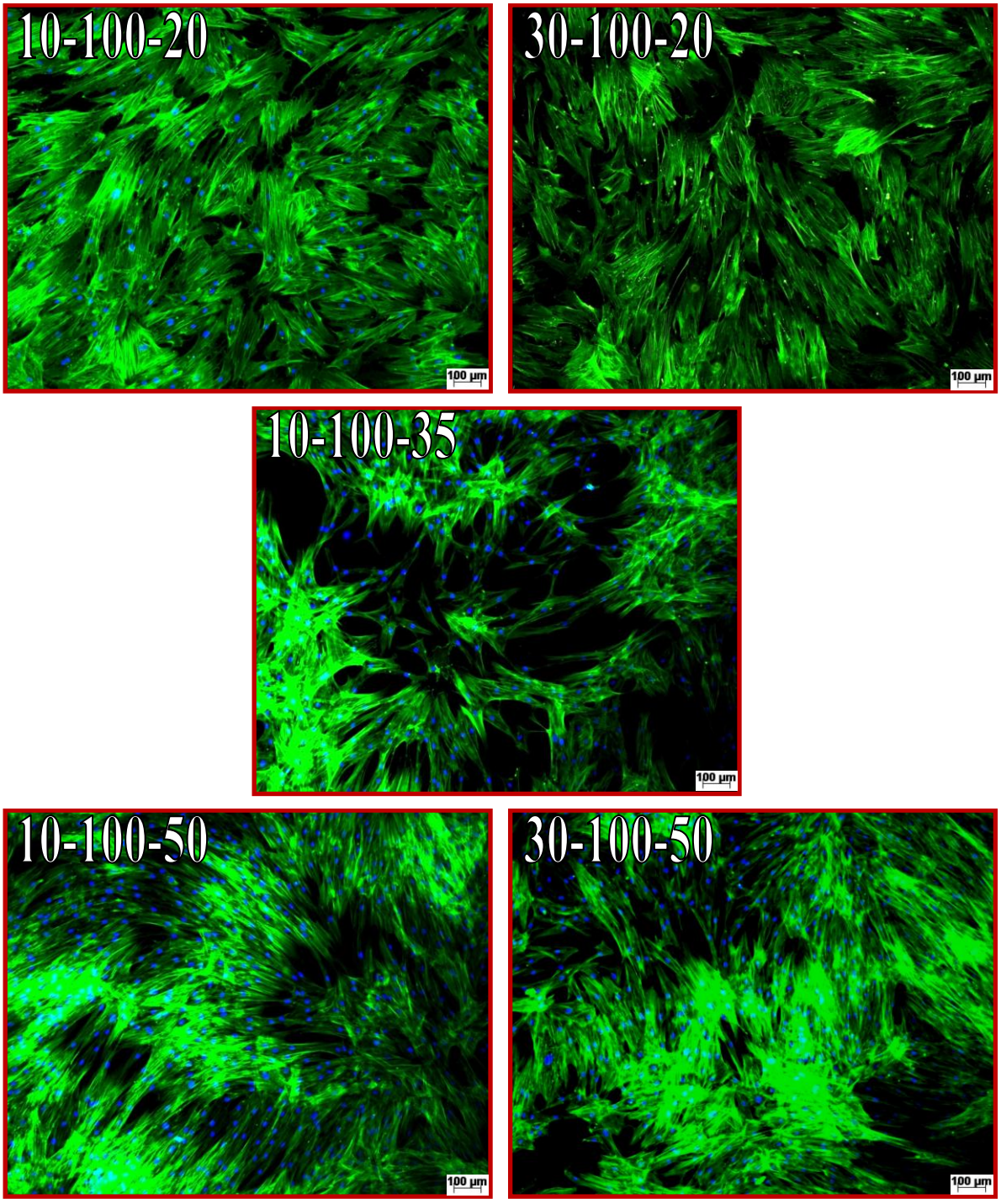


Abb. 23: ***Räumliche Ausrichtung des Aktin-Zytoskeletts von hMSZ (humanen mesenchymalen Stromazellen) nach 7 Tagen in Zellkultur***

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit 5-facher Vergrößerung und Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts (grün) sowie Kernfärbung (ausgenommen Bild 30-100-20 (ø (Säulendurchmesser) - A (Säulenabstand) - H (Säulenhöhe) jeweils in nm)). Maßstabsbalken 100 µm.

Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der hMSZ mit Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts deckte sich weitestgehend mit den Ergebnissen der Osteokalzin-Färbung. In Abb. 23 sind hMSZ dargestellt nach einer Woche in Zellkultur auf unterschiedlichen Topographien. Auffällig war hierbei die Ausrichtung des Aktin-Zytoskeletts: Auf den Topographien 10-100-20 bzw. 30-100-20 zeigte sich ein relativ heterogenes Bild; die Aktin-Fasern der hMSZ richteten sich weitestgehend unabhängig voneinander aus. Im Gegensatz hierzu wurde auf den Oberflächen 10-100-50 bzw. 30-100-50 über weite Strecken eine Parallelität der Aktin-Fasern sichtbar. Ebenfalls auffällig war die Bildung von kleinen Gruppierungen der hMSZ auf den Topographien mit 35 und 50nm Säulenhöhe.

Zusammengefasst wird deutlich, dass die Säulenhöhe der nanostrukturierten Oberflächen den größten Einfluss auf eine osteogene Differenzierung der hMSZ bietet.

4: Diskussion

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einer Vielzahl nanoskaliger Strukturelemente, die mit Zellen in Wechselwirkung treten (Kim et al., 2012). Erst kürzlich haben einige Studien gezeigt, dass Zellverhalten durch die Nanotopographie definierter Oberflächen beeinflussbar ist (Koegler et al., 2012; Park et al., 2009). Darauf basierend sollten im Rahmen der fakultätsübergreifenden Kooperation mit dem Lehrstuhl für Festkörperphysik der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Ziemann innovative Strategien geschaffen werden, um funktionelle Eigenschaften von Implantatoberflächen im nanoskaligen Maßstab zu entwickeln. Durch lithographische Methoden wurden in der AG von Herrn Dr. Plettl Oberflächen mit ausgewählten nanoskaligen Säulenstrukturen auf SiO_2-Plättchen als Trägermaterial hergestellt. Der Säulendurchmesser betrug entweder 10 oder 30nm, der Säulenabstand 50, 100 oder 120nm und die Säulenhöhe maß 20, 35 oder 50nm. Als Kontrolle wurden nicht strukturierte, unbehandelte SiO_2-Rohlinge eingesetzt.

Da an eine spätere Verwendung der Ergebnisse zur Verbesserung einer Osseointegration von Biomaterialen gedacht wurde, sollten für die *in-vitro*-Experimente humane mesenchymale Stromazellen (hMSZ) und humane Osteoblasten (hOB) verwendet werden. Osteoblasten sind als Knochenbildner maßgeblich für einen festen Einbau von Knochenimplantaten verantwortlich (Meyer et al., 2005). Mesenchymale Stromazellen lassen sich leicht aus Knochenmark isolieren und expandieren und können in osteoblastäre Zellen differenziert werden (Friedenstein et al., 1968). Hierzu sollten biologische Interaktionen von humanen mesenchymalen Stromazellen bzw. humanen Osteoblasten im direkten Kontakt mit diesen nanoskalig modifizierten Oberflächen hinsichtlich Zelladhäsion, Proliferation sowie osteogener Differenzierung analysiert werden.

4.1 Besiedlung von hMSZ und hOB auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten

4.1.1 Adhäsion und Zellmorphologie von hMSZ auf nanostrukturierten Substraten unter fluoreszenzmikroskopischer und elektronen-mikroskopischer Sicht

Die Zelladhäsion stellt einen entscheidenden Schritt der Gewebeintegration von Biomaterialien dar (Saltzman, 2000). Eine vorausgehende Proteinadsorption, die innerhalb von Sekunden durch den Kontakt mit Blut oder Gewebeflüssigkeit erfolgt, sowie die zelluläre Adhäsion, die langsamer abläuft und deshalb durch Proteine beeinflussbar ist, werden durch vielerlei Faktoren bestimmt (Williams, 2003). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Nanotopographie der Materialoberflächen ein Faktor sein kann, Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zellen zu nehmen (Koegler et al., 2012). Die Oberflächenstruktur der Biomaterialien kann von den Zellen mit Hilfe von Proteinkomplexen wahrgenommen werden, die hierbei als Mechanosensoren fungieren,. Diese sogenannten Integrine sind unter anderem Teil von fokalen Adhäsionen und leiten die Information über die Strukturgegebenheiten der Umgebung an das Zytoskelett weiter (Wang, N. et al., 1993). Da das Zytoskelett der Zelle ihre Gestalt gibt und damit die Zellmorphologie beeinflusst, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur untersucht, inwieweit die Zellen auf den Oberflächen adhärieren, sondern auch ob die Form der adhärierten Zellen durch die unterschiedlich strukturierten Oberflächen verändert wird. Dass eine Ausbildung der fokalen Adhäsionen bzw. das Strukturmuster durch die nanoskalige Umgebung mitbestimmt wird, wurde von Arnold und Mitarbeitern gezeigt (Arnold et al., 2004). Nachfolgend wird dadurch auch die Vitalität und das Differenzierungsverhalten von hMSZ beeinflusst (Sjöström et al., 2009).

Verschiedenartigste Oberflächentopographien mit nanoskaliger Größenordnung wie Gitter, Rinnen, Röhren oder auch Säulen wurden in *in-vitro*-Versuchen getestet. Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass eine Topographie von TiO_2-Röhren mit einem Durchmesser von 15nm die Zelladhäsion von hMSZ gegenüber glatten Oberflächen stark erleichtert, wohingegen ein Durchmesser von größer als 50nm einen negativen Einfluss auf Adhäsion und Aktivität der Zellen besitzt und somit zu vermehrtem Zelltod führt (Park et al., 2009).

Eine andere Studie kam zu dem Schluss, dass die Höhe der Nanostrukturen einen maßgebenden Faktor für Zelladhäsion und Spreitung darstellt. Hier zeigten hMSZ die beste Zellantwort auf 15nm hohen Ti-Säulen verglichen mit Säulenhöhen von 55nm bzw. 100nm (Sjöström et al., 2009).

Das Stadium der Zelladhäsion lässt sich anhand von Spreitung und Morphologie der Zellen erkennen. Lavenus et al. untersuchten hMSZ auf Ti-Oberflächen mit Nanoporen und verglichen die Zellmorphologie auf den verschiedenen Oberflächen. Auf Oberflächen mit einem Porendurchmesser von 30nm zeigte sich einen Tag nach Zellbesiedlung eine hauptsächlich gespreitete Zellmophologie. Im Gegensatz hierzu stieg der prozentuale Anteil an spindelförmigen Zellen auf Oberflächen mit einem Porendurchmesser von 150nm bzw. 300nm (Lavenus et al., 2011).

Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass bereits nanoskalige Unterschiede der Oberflächentopographie das Zellverhalten bezüglich Adhäsion und Zellmorphologie beeinflussen. Wie schon von Sjöström und Mitarbeitern gezeigt (Sjöström et al., 2009), hatte auch in der vorliegenden Arbeit die Höhe der Nanosäulen in den durchgeführten Experimenten einen Einfluss auf die Zellmorphologie der hMSZ. Mit zunehmender Säulenhöhe wurden die hMSZ eher spindelförmig. Ausnahmen stellten die Oberflächen 30-120-20 sowie 10-50-50 dar. Auf den glatten Kontrolloberflächen bzw. auf den strukturierten Oberflächen mit 20nm Säulenhöhe waren gespreitete Zellen dominierend. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den Ergebnissen von Sjöström und Mitarbeitern (Sjöström et al., 2009), die ebenfalls zeigten, dass hMSZ mit steigender Säulenhöhe eine weniger gespreitete Zellform annahmen.

Da hMSZ ursprünglich eine spindelfömige, bipolare Zellform besitzen, könnte man davon ausgehen, dass der Verlust ihres spindelförmigen Erscheinungsbildes ebenfalls mit einem Verlust ihres Differenzierungspotenzials einhergeht. Auf den Topographien mit 50nm Säulenhöhe war diese Morphologie der hMSZ länger erhalten und damit möglicherweise auch ihr Differenzierungspotenzial. Kilian und Mitarbeiter zeigten in einer Studie, dass die Zellmorphologie von hMSZ einen starken Einfluss auf das Differenzierungspotential hat (Kilian et al., 2010).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch der Abstand zwischen den Säulen für die Zelladhäsion von Relevanz ist. Bei festem Säulendurchmesser und Säulenhöhe waren nach 24h auf den Oberflächen mit 100nm Säulenabstand jeweils mehr Zellen adhärent als auf den Oberflächen mit 50nm und 120nm Abstand. Auf den Oberflächen 10-50-50 sowie 30-

120-20 wurde dieser Effekt auch zellmorphologisch sichtbar. Hierbei dominierten Zellen mit einer hauptsächlich nicht gespreiteten und rundlichen Zellform. Dies deutet entweder auf eine erschwerte Adhäsion hin oder die hMSZ befanden sich schon wieder kurz vor einer Ablösung. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Arbeiten näher untersucht werden, da ein Ablösen der Zellen Hinweis auf Nekrose- oder Apoptosevorgänge sein kann (Messner et al., 2012).

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der hMSZ auf den getesteten Oberflächen konnte zeigen, dass mesenchymale Stromazellen in der Lage sind, nanoskalige Strukturen wahrzunehmen (Guvendik et al., 2011). So adhärierten Zellen mit ihren Filopodien gezielt an den Spitzen der Nanosäulen, ein Kontakt zu Arealen zwischen den Nanosäulen schien davon ausgenommen zu sein. Munir und Mitarbeiter zeigten vergleichbare Ergebnisse bei Untersuchungen mit humanen Osteoblasten auf Säulenstrukturen (Munir et al., 2011). Hierbei adhärierten die Osteoblasten ebenfalls an den Säulenspitzen ohne Kontakt zur Bodenfläche zwischen den Säulen. Durch Modifikation der Säulenstruktur ist man somit in der Lage, die Zellmorphologie zu beeinflussen und damit auch das Zellverhalten zu steuern.

4.1.2 Proliferation von hMSZ und hOB auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten

Die Zellproliferation bzw. Vitalität der Zellen wird maßgeblich durch ihre direkte nanoskalige Umgebung beeinflusst (Kim et al., 2012). Mithilfe der Nanotechnologie ist man in der Lage, 3-dimensionale Gerüst-Strukturen auf Oberflächen zu entwickeln, die der natürlichen extrazellulären Matrix nachempfunden sind (Wang, Z. et al., 2009). Studien zur Zellproliferation auf Nanotopographien zeigten teilweise unterschiedliche Ergebnisse. Einige Studien haben gezeigt, dass die Proliferation von verschiedensten Zelltypen auf nanostrukturierten Oberflächen gegenüber ebenen, unstrukturierten Oberflächen reduziert ist (Yim et al., 2005; Pennisi et al., 2011). Kunzler und Mitarbeiter kamen bei der Testung von Osteoblasten auf Topographien mit Nanopartikelbeschichtung unterschiedlicher Dichte zu ähnlichen Ergebnissen (Kunzler et al., 2007). Auf allen nanostrukturierten Oberflächen kam es hierbei zu einer Hemmung der Spreitung und des Wachstums von Osteoblasten verglichen mit Oberflächen, die diese Nanopartikelbeschichtung nicht hatten. Im Gegensatz dazu berichteten Oh et al. von einem gesteigerten Zellwachstum von

Osteoblasten auf TiO_2-Nanoröhren gegenüber der unstrukturierten, ebenen Kontrolloberfläche (Oh et al., 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind vergleichbar mit der Studie von Oh und Mitarbeitern. Auf den ebenen Kontrolloberflächen kam es zu keiner messbaren Zellproliferation, wohingegen die Osteoblasten auf den meisten getesteten nanostrukturierten Oberflächen proliferierten. Zum einen schien der Säulendurchmesser eine nicht unerhebliche Rolle für die Zellproliferation der hOB zu spielen. Auf allen Oberflächen mit 30nm Säulendurchmesser war ein Zellwachstum der hOB zu erkennen. Zum anderen stellte sich die Säulenhöhe der nanostrukturierten Substrate als ein limitierender Faktor für das Zellwachstum von hOB dar. Mit zunehmender Säulenhöhe zeigte sich ein stark eingeschränktes Wachstum der Osteoblasten. Eine Ausnahme stellten die Ergebnisse des Zellwachstums von hOB auf der Oberfläche 30-100-50 dar. Ähnliche Ergebnisse in der Literatur zeigten Lim et al. in einer Studie mit Versuchen von humanen fetalen Osteoblasten auf Oberflächen mit zufällig verteilten Nano-Inseln unterschiedlicher Höhe (Lim et al., 2005). Die Proliferation und Spreitung der Osteoblasten war auf den Nano-Inseln mit einer Höhe von 11nm signifikant erleichtert gegenüber Inseln mit einer Höhe von 38 und 85nm.

Hinsichtlich des Zellwachstums von humanen mesenchymalen Stromazellen auf nanostrukturierten Oberflächen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit auf den unstrukturierten, glatten SiO_2-Oberflächen kein messbares Zellwachstum der mesenchymalen Stromazellen, auf allen nanostrukturierten Oberflächen kam es jedoch zu einer Zellproliferation. Eine Ausnahme war hierbei die Oberflächenstruktur 10-50-50. Vergleichbare Ergebnisse in der Literatur zeigten ein erleichtertes Zellwachstum auf nanoskaligen TiO_2-Röhren mit Durchmessern von 15nm gegenüber den glatten, unstrukturierten TiO_2-Oberflächen (Park et al., 2007).

4.1.3 Osteogene Differenzierung von hMSZ auf nanostrukturierten SiO_2-Substraten

Mesenchymale Stromazellen verfügen über das Potenzial, sich zu reifen humanen Osteoblasten zu entwickeln. Dieser Differenzierungsvorgang verläuft über verschiedene Zellstadien wie Osteoprogenitorzellen und Prä-Osteoblasten (Aubin, 1998) und wird sowohl durch diverse Wachstumsfaktoren (Wang, J.J. et al., 2009), als auch durch Interaktionen mit den strukturellen Gegebenheiten der direkt angrenzenden extrazellulären Matrix induziert (Huang et al., 2009). Integrine dienen hierbei als Signalvermittler und leiten als Teil von fokalen Adhäsionen die mechanischen Kräfte der EZM, die auf die Zelle wirken, an das Zytoskelett bzw. an den Zellkern weiter (Katsumi et al., 2004). Diese Mechanotransduktion kann innerhalb der Zelle die Gentranskription und damit auch die Proteinsynthese beeinflussen (Nava et al., 2012). Der Prozess der osteogenen Differenzierung kann auf vielerlei Art und Weise gemessen werden. Je nach Differenzierungsstadium werden innerhalb der Zelle unterschiedliche osteogene Marker exprimiert. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Osteokalzin wird von reifen Osteoblasten produziert (Hauschka et al., 1989) und bindet als Teil der EZM an Hydroxylapatit. Die Synthese von Osteokalzin deutet somit auf eine beginnende Mineralisierung hin. Die Stabilität eines in den Knochen eingebrachten Implantates oder einer Prothese ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Die Operationstechnik, die Knochenqualität des Patienten sowie das Implantat- oder Prothesendesign spielen hierbei eine wichtige Rolle. Des Weiteren wurde in Studien der Einfluss der Nanotopographie auf Differenzierungsprozesse von hMSZ getestet (McNamara et al., 2010).

Lavenus et al. untersuchten den Einfluss von Ti-Nanoporen auf die Differenzierung von hMSZ (Lavenus et al., 2011). Dabei kam es nach 21 Tagen auf den 30nm Poren zu der stärksten Genexpression von osteogenen Markern wie RUNX2, BSP oder OC im Vergleich mit 150 und 300nm Poren sowie glatten Ti-Oberflächen als Kontrolle. Es existieren jedoch auch widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur: Während Park et al. die stärkste osteogene Differenzierungsrate von hMSZ auf TiO_2-Röhren mit 15nm Durchmesser nachwiesen (Park et al., 2009), beschreiben Oh et al. eine vermehrte, selektive Zunahme der Differenzierung in osteogener Richtung auf TiO_2-Röhren mit 70 bis 100nm Durchmesser, wohingegen auf Röhren mit kleinerem Durchmesser keine nennenswerte osteogene Differenzierung stattfand (Oh et al., 2009). Aus der Literatur ist

ebenfalls bekannt, dass Nanotopographie und osteogenes Differenzierungsmedium synergistisch auf die osteogene Differenzierung von hMSZ wirken im Vergleich zu ebenen, unstrukturierten Oberflächen und osteogenem Differenzierungsmedium (You et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind vergleichbar mit der Literatur. Die Nanostrukturierung von Oberflächen kann eine osteogene Differenzierung von hMSZ induzieren und beschleunigen im Vergleich zu unstrukturierten, glatten Oberflächen. Die Modifizierung der Struktureinheiten um nur wenige Nanometer scheint hierbei einen deutlichen Einfluss auf das gesamte Zellverhalten und demnach auch auf die osteogene Differenzierung zu haben. Die Höhe der getesteten Nanosäulen scheint eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen. Mit Ausnahme der Oberflächen 30-120-20 sowie 10-50-50 wird deutlich, dass mit zunehmender Säulenhöhe auch die osteogene Differenzierungsrate der hMSZ steigt: Auf den 50nm messenden Säulenhöhen zeigen sich nach 7 Tagen prozentual mehr Osteokalzin bildende Zellen als auf Säulenhöhen von 20 und 35nm. Damit ist die osteogene Differenzierung auf Proteinebene gezeigt. Zur Untersuchung, welche Säulenhöhe optimal für eine osteogene Induktion von hMSZ ist, bedarf es jedoch noch weiteren Versuchen mit größeren Säulenhöhen. Die durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Untersuchung nach 7 Tagen unterstützt diese Ergebnisse. Auf Topographien mit 20nm Säulenhöhe richten sich Aktin-Fasern der hMSZ weitestgehend unabhängig voneinander aus, wohingegen auf Säulenhöhen mit 50nm eine Parallelität der Aktin-Fasern erkennbar ist. Diese gleichmäßige Ausrichtung der Aktin-Fasern kann ein Anzeichen für osteogene Differenzierung sein. Als einen weiteren Hinweis für eine osteogene Differenzierung bilden sich auf den Topographien mit 35 und 50nm Säulenhöhe kleine Gruppierungen von hMSZ, so genannte „Koloniebildende Einheiten“ (CFU - Colony Forming Units) (Fiorentini et al., 2011).

4.2 Toxizität von Nanopartikeln

Die Nanotechnologie gilt in der Forschung als die Schlüsseltechnologie der Zukunft und findet heutzutage in vielen Bereichen Anwendung (Staggers et al., 2008). Im Alltag stößt man nicht selten auf diese Forschung rund um Strukturen und Partikel mit einer Größenordnung im Bereich von 1nm bis 100nm, wie beispielsweise Nanopartikel in bestimmten Farben oder auch in Sonnencremes, Tabletten und Lebensmittel, die dadurch haltbarer gemacht werden. Der Grund für das besondere Interesse an der Nanotechnologie liegt an den speziellen Oberflächeneigenschaften der Strukturen und Partikel. Mit abnehmender Partikelgröße bzw. Partikelvolumen steigt der Anteil an reaktionsfreudigen Oberflächenatomen, so dass Nanopartikel als physikalisch und chemisch hochaktiv gelten. Genau diese Eigenschaft eröffnet eine Vielzahl von Möglichkeiten und Chancen, birgt jedoch auf der anderen Seite auch einige Gefahren und Risiken (Priestly et al., 2007; Oberdörster et al., 2005). Die Expositionsquellen und Aufnahmewege von Nanopartikeln in den menschlichen Körper sind sehr vielseitig, so dass die damit verbundenen Auswirkungen bzw. Toxizität der Nanopartikel sehr unterschiedlich ausfallen können (siehe Abb. 24).

Im Bereich Biomaterialien für die regenerative Medizin wird diese Problematik ebenfalls deutlich. In der vorliegenden Arbeit wurde bisher das Potenzial der Nanotechnologie bei der Oberflächenstrukturierung von Biomaterialien für die Gewebeintegration aufgezeigt (Variola et al., 2011). Dabei kann es jedoch durch Verschleiß und Abrieb von implantiertem Biomaterial zur Bildung von Nanopartikeln kommen (Buzea et al., 2007). Das Ausmaß des Abriebs sowie die Beschaffenheit und Größe der Partikel kann hierbei stark variieren und ist abhängig von dem verwendeten Biomaterial sowie am Beispiel der Endoprothetik von den verschiedenen Gleitpaarbildungen. Dabei zeigten Gleitpaarungen von Metall-Metall einen deutlich stärkeren Abrieb als Gleitpaarungen von Metall-Polyethylen (Golish & Anderson, 2012). Dieser Nanopartikelabrieb kann sowohl lokal zur Ausbildung entzündlicher Prozesse und in der Folge zu Nekrosen sowie periprothetischer Lockerung (Jäger et al., 2007; Milosev et al., 2006), als auch zu systemischen Auswirkungen führen. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Gewebebiopsien der Leber und Niere entdeckten Gatti und Rivasi im Jahr 2002 Nanopartikel mit der gleichen chemischen Zusammensetzung wie die eingebauten Implantate oder Endoprothesen der Patienten (Gatti & Rivasi, 2002). Metallische

Nanopartikel, die beim Abrieb von orthopädischen Implantaten in den Blutkreislauf gelangen, können auf diese Weise zu einer signifikanten Erhöhung der Inzidenz von Autoimmunerkrankungen, Dermatitis, Urtikaria und Vaskulitis führen (Sánchez Olivas et al., 2010).

4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden nanoskalige, 3-dimensional strukturierte Oberflächen mit primären humanen Osteoblasten und multipotenten mesenchymalen Stromazellen besiedelt und hinsichtlich Adhäsion, Proliferation sowie osteogener Differenzierung getestet.

Es gilt nun in weiteren zellbiologischen Experimenten die Vitalität der getesteten Zelltypen hinsichtich Apoptose- oder Nekroseprozessen zu untersuchen. Zur Beurteilung der Funktionalität und Biokompatibilität müssen diese Oberflächen zudem in *in-vivo*- und Langzeitversuchen getestet werden. Da in der vorliegenden Arbeit vorrangig der Einfluss der Oberflächenstruktur analysiert wurde, sollte man außerdem die Übertragbarkeit der Oberflächen- und Strukturkompatibilität von dem verwendeten nichtmetallischen Siliciumdioxid auf ein metallisches Material untersuchen.

Durch den Fortschritt der Nanotechnologie könnten somit langfristig Implantate mit nanoskalig modifizierter Oberflächenstruktur entwickelt werden, welche die Grenzflächen-interaktionen optimieren und dadurch eine rasche Osseointegration und Heilung gewährleisten.

5: Zusammenfassung

Biomaterialien für den Bewegungsapparat müssen zahlreichen Anforderungen gerecht werden. Je nach Funktion und Einsatzgebiet werden sie unterteilt in Dauerimplantate (z.B. Endoprothesen) und temporäre Implantate (z.B. Osteosynthesematerial). Knochenersatzmaterialien sollten hierbei über eine ausreichende Festigkeit und Elastizität im Knochen verfügen sowie möglichst abriebfest und korrosionsbeständig sein, um eine Langzeithaltbarkeit zu erreichen. Für einen schnellen und komplikationsfreien Heilungsprozess wird eine rasche Gewebeintegration des Implantates angestrebt. Neben den Materialeigenschaften und der Form des Implantates ist die Oberflächenstruktur ein wichtiger Faktor. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten nanostrukturierten Siliciumdioxid-Oberflächen sollen einen neuen Ansatz bieten, durch nanoskalige Strukturparameter die Grenzflächeninteraktionen zwischen Oberfläche und Gewebe zu optimieren und so gezielt auf das Zellverhalten Einfluss zu nehmen. Getestet wurden Oberflächen mit einer Säulenstruktur, die im Säulendurchmesser (10 und 30nm), im Abstand zwischen den Säulen (50, 100 und 120nm) und in der Säulenhöhe (20, 35 und 50) differierten. Im Mittelpunkt der Arbeit standen Untersuchungen zur Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen (hMSZ) und primären humanen Osteoblasten (hOB).

Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Adhäsion von hMSZ auf den nanostrukturierten Substraten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Zellmorphologie von der Säulenkonfiguration der nanoskaligen Substrate abhängig ist. Mit steigender Säulenhöhe (35 und 50nm) waren die mesenchymalen Stromazellen vermehrt spindelförmig gegenüber Säulenhöhen von 20nm oder den glatten Oberflächen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass hMSZ die nanoskalige Säulenstruktur wahrnehmen und mit Filopodien gezielt Kontakt zu den Säulenspitzen aufnehmen. Die Ergebnisse zur Zell-Vitalität verdeutlichten, dass schon geringste Unterschiede in der Säulenkonfiguration einen starken Einfluss auf das Zellwachstum ausüben. Mesenchymale Stromazellen proliferierten auf allen getesteten nanostrukturierten Oberflächen mit Ausnahme der Oberfläche 10-50-50 (Säulendurchmesser - Säulenabstand - Säulenhöhe jeweils in nm). Im Gegensatz hierzu wurden die Osteoblasten in ihrem Zellwachstum durch Säulenhöhen von 35 bzw. 50nm gehemmt. Eine mögliche Induktion einer

osteogenen Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen nach einer Woche Kultivierung wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit Anfärbung von Osteokalzin überprüft. Die Anzahl der Osteokalzin bildenden Zellen stieg mit zunehmender Säulenhöhe, die Oberfläche 10-50-50 bildete jedoch eine Ausnahme.

Zusammengefasst bietet von den getesteten Säulenkonfigurationen die Säulenhöhe der Nanostruktur den größten Einfluss auf das Zellverhalten von mesenchymalen Stromazellen und primären Osteoblasten.

6: Literaturverzeichnis

1. **Arnold M, Cavalcanti-Adam E A, Glass R, Blummel J, Eck W, Kantlehner M, Kessler H, Spatz J P**: Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. Chemphyschem, 5: 383-388 (2004)
2. **Aubin J E**: Advances in the osteoblast lineage. Biochem.Cell Biol., 76: 899-910 (1998)
3. **Black J**: Systemic effects of biomaterials. Biomaterials, 5: 11-18 (1984)
4. **Buzea C, Pacheco I I, Robbie K: Nanomaterials and nanoparticles**: sources and toxicity. Biointerphases, 2: MR17-71 (2007)
5. **Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca J E**: Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatol Port., 32: 103-110 (2007)
6. **Davies J E**: Mechanisms of endosseous integration. Int.J.Prosthodont., 11: 391-401 (1998)
7. **Davies J E**: Understanding peri-implant endosseous healing. J.Dent.Educ., 67: 932-949 (2003)
8. **Deans R J, Moseley A B**: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp.Hematol., 28: 875-884 (2000)
9. **Fickert S, Fiedler J, Brenner R E**: Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. Arthritis Res.Ther., 6: R422-32 (2004)
10. **Fiorentini E, Granchi D, Leonardi E, Baldini N, Ciapetti G**: Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells. Int.J.Artif.Organs, 34: 998-1011 (2011)
11. **Friedenstein A J, Petrakova K V, Kurolesova A I, Frolova G P**: Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation, 6: 230-247 (1968)
12. **Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N**: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp.Hematol., 4: 267-274 (1976)

13. **Gatti A M, Rivasi F**: Biocompatibility of micro- and nanoparticles. Part I: in liver and kidney. Biomaterials, 23: 2381-2387 (2002)
14. **Golish S R, Anderson P A**: Bearing surfaces for total disc arthroplasty: metal-on-metal versus metal-on-polyethylene and other biomaterials. Spine J., 12: 693-701 (2012)
15. **Guo J, Padilla R J, Ambrose W, De Kok I J, Cooper L F**: The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO2 grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. Biomaterials, 28: 5418-5425 (2007)
16. **Guo Y, Zhang C Q, Zeng Q C, Li R X, Liu L, Hao Q X, Shi C H, Zhang X Z, Yan Y X**: Mechanical strain promotes osteoblast ECM formation and improves its osteoinductive potential. Biomed.Eng.Online, 11: 80-925X-11-80 (2012)
17. **Guvendik S, Trabzon L, Ramazanoglu M**: The effect of Si nano-columns in 2-D and 3-D on cellular behaviour: nanotopography-induced CaP deposition from differentiating mesenchymal stem cells. J.Nanosci Nanotechnol, 11: 8896-8902 (2011)
18. **Hauschka P V, Lian J B, Cole D E, Gundberg C M**: Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. Physiol.Rev., 69: 990-1047 (1989)
19. **Huang C H, Chen M H, Young T H, Jeng J H, Chen Y J**: Interactive effects of mechanical stretching and extracellular matrix proteins on initiating osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J.Cell.Biochem., 108: 1263-1273 (2009)
20. **Jäger M, Zilkens C, Zanger K, Krauspe R**: Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants. J.Biomed.Biotechnol., 2007: 69036 (2007)
21. **Jansen H, Gardeniers H, Boer M, Elwenspoek M, Fluitman J**: A survey on the reactive ion etching of silicon in microtechnology. J Micromech Microeng, 6:14–28 (1995)
22. **Kaiser J P, Reinmann A, Bruinink A**: The effect of topographic characteristics on cell migration velocity. Biomaterials, 27: 5230-5241 (2006)
23. **Katsumi A, Orr A W, Tzima E, Schwartz M A**: Integrins in mechanotransduction. J.Biol.Chem., 279: 12001-12004 (2004)

24. **Khang D, Lu J, Yao C, Haberstroh K M, Webster T J**: The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. Biomaterials, 29: 970-983 (2008)

25. **Kilian K A, Bugarija B, Lahn B T, Mrksich M**: Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 107: 4872-4877 (2010)

26. **Kim D H, Provenzano P P, Smith C L, Levchenko A**: Matrix nanotopography as a regulator of cell function. J.Cell Biol., 197: 351-360 (2012)

27. **Koegler P, Clayton A, Thissen H, Santos G N, Kingshott P**: The influence of nanostructured materials on biointerfacial interactions. Adv.Drug Deliv.Rev., (2012)

28. **Kunzler T P, Huwiler C, Drobek T, Voros J, Spencer N D**: Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients. Biomaterials, 28: 5000-5006 (2007)

29. **Lauffenburger D A, Griffith L G**: Who's got pull around here? Cell organization in development and tissue engineering. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 98: 4282-4284 (2001)

30. **Lavenus S, Berreur M, Trichet V, Pilet P, Louarn G, Layrolle P**: Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. Eur.Cell.Mater., 22: 84-96; discussion 96 (2011)

31. **Lee I C, Lee Y T, Yu B Y, Lai J Y, Young T H**: The behavior of mesenchymal stem cells on micropatterned PLLA membranes. J.Biomed.Mater.Res.A., 91: 929-938 (2009)

32. **Lim J Y, Hansen J C, Siedlecki C A, Runt J, Donahue H J**: Human foetal osteoblastic cell response to polymer-demixed nanotopographic interfaces. J.R.Soc.Interface, 2: 97-108 (2005)

33. **Liu H, Webster T J**: Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. Biomaterials, 28: 354-369 (2007)

34. **Luo F, Zhou D, He L, Wu J H, Ding Q F, Zhang J, Li Y, Zhou M K**: Effect of hyaluronic acid on promoting bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into neural cells in vitro. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 43: 352-7, 433 (2012)

35. **McNamara L E, McMurray R J, Biggs M J, Kantawong F, Oreffo R O, Dalby M J**: Nanotopographical control of stem cell differentiation. J.Tissue Eng., 2010: 120623 (2010)

36. **Mendonca G, Mendonca D B, Aragao F J, Cooper L F**: Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. Biomaterials, 29: 3822-3835 (2008)

37. **Messner B, Frotschnig S, Steinacher-Nigisch A, Winter B, Eichmair E, Gebetsberger J, Schwaiger S, Ploner C, Laufer G, Bernhard D**: Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death. Cell.Death Dis., 3: e424 (2012)

38. **Meyer U, Buchter A, Wiesmann H P, Joos U, Jones D B**: Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. Eur.Cell.Mater., 9: 39-49 (2005)

39. **Milosev I, Trebse R, Kovac S, Cor A, Pisot V**: Survivorship and retrieval analysis of Sikomet metal-on-metal total hip replacements at a mean of seven years. J.Bone Joint Surg.Am., 88: 1173-1182 (2006)

40. **Munir G, Koller G, Di Silvio L, Edirisinghe M J, Bonfield W, Huang J**: The pathway to intelligent implants: osteoblast response to nano silicon-doped hydroxyapatite patterning. J.R.Soc.Interface, 8: 678-688 (2011)

41. **Nasatzky E, Gultchin J, Schwartz Z**: The role of surface roughness in promoting osteointegration. Refuat Hapeh Vehashinayim, 20: 8-19, 98 (2003)

42. **Nava M M, Raimondi M T, Pietrabissa R**: Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues. J.Biomed.Biotechnol., 2012: 797410 (2012)

43. **Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H, ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group**: Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part Fibre Toxicol., 2: 8 (2005)

44. **Oh S, Daraio C, Chen L H, Pisanic T R, Finones R R, Jin S**: Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO2 nanotubes. J.Biomed.Mater.Res.A., 78: 97-103 (2006)

45. **Oh S, Brammer K S, Li Y S, Teng D, Engler A J, Chien S, Jin S**: Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 106: 2130-2135 (2009)

46. **Olivares-Navarrete R, Hyzy S L, Hutton D L, Erdman C P, Wieland M, Boyan B D, Schwartz Z**: Direct and indirect effects of microstructured titanium substrates on the induction of mesenchymal stem cell differentiation towards the osteoblast lineage. Biomaterials, 31: 2728-2735 (2010)

47. **Park J, Bauer S, von der Mark K, Schmuki P**: Nanosize and vitality: TiO2 nanotube diameter directs cell fate. Nano Lett., 7: 1686-1691 (2007)

48. **Park J, Bauer S, Schlegel K A, Neukam F W, von der Mark K, Schmuki P**: TiO2 nanotube surfaces: 15 nm--an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation. Small, 5: 666-671 (2009)

49. **Pennisi C P, Dolatshahi-Pirouz A, Foss M, Chevallier J, Fink T, Zachar V, Besenbacher F, Yoshida K**: Nanoscale topography reduces fibroblast growth, focal adhesion size and migration-related gene expression on platinum surfaces. Colloids Surf.B Biointerfaces, 85: 189-197 (2011)

50. **Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, Moorman M A, Simonetti D W, Craig S, Marshak D R**: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284: 143-147 (1999)

51. **Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebe L, Papadaki H A**: Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. Stem Cell.Rev., 7: 569-589 (2011)

52. **Priestly B G, Harford A J, Sim M R**: Nanotechnology: a promising new technology--but how safe? Med.J.Aust., 186: 187-188 (2007)

53. **Rajyalakshmi A, Ercan B, Balasubramanian K, Webster T J**: Reduced adhesion of macrophages on anodized titanium with select nanotube surface features. Int.J.Nanomedicine, 6: 1765-1771 (2011)

54. **Riveline D, Zamir E, Balaban N Q, Schwarz U S, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky A D**: Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. J.Cell Biol., 153: 1175-1186 (2001)

55. **Saltzman W M**: Cell interactions with polymers. In: Lanza R P, Langer R S, Vacanti J and ScienceDirect (Hrsg) Principles of tissue engineering, 2, eds. Academic Press, New York, S. 221-235 (2000)

56. **Sanchez Olivas M A, Valencia Zavala M P, Sanchez Olivas J A, Sepulveda Velazquez G**: Hypersensitivity to metals in patients with orthopedic implants. Rev.Alerg.Mex., 57: 127-130 (2010)

57. **Scriven, L E**: Physics and applications of dip coating and spin coating. Better ceramics through chemistry III., S. 717–729 (1988)

58. **Sjöström T, Dalby M J, Hart A, Tare R, Oreffo R O, Su B**: Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells. Acta Biomater., 5: 1433-1441 (2009)

59. **Staggers N, McCasky T, Brazelton N, Kennedy R**: Nanotechnology: the coming revolution and its implications for consumers, clinicians, and informatics. Nurs.Outlook, 56: 268-274 (2008)

60. **Thery M, Pepin A, Dressaire E, Chen Y, Bornens M**: Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. Cell Motil.Cytoskeleton, 63: 341-355 (2006)

61. **Variola F, Vetrone F, Richert L, Jedrzejowski P, Yi J H, Zalzal S, Clair S, Sarkissian A, Perepichka D F, Wuest J D, Rosei F, Nanci A**: Improving biocompatibility of implantable metals by nanoscale modification of surfaces: an overview of strategies, fabrication methods, and challenges. Small, 5: 996-1006 (2009)

62. **Variola F, Brunski J B, Orsini G, Tambasco de Oliveira P, Wazen R, Nanci A**: Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. Nanoscale, 3: 335-353 (2011)

63. **von der Mark K, Park J, Bauer S, Schmuki P**: Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. Cell Tissue Res., 339: 131-153 (2010)

64. **Wang J J, Ye F, Cheng L J, Shi Y J, Bao J, Sun H Q, Wang W, Zhang P, Bu H**: Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells promoted by overexpression of connective tissue growth factor. J.Zhejiang Univ.Sci.B., 10: 355-367 (2009)

65. **Wang N, Butler J P, Ingber D E**: Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. Science, 260: 1124-1127 (1993)

66. **Wang Z, Ruan J, Cui D**: Advances and prospect of nanotechnology in stem cells. Nanoscale Res.Lett., 4: 593-605 (2009)

67. **Watari S, Hayashi K, Wood J A, Russell P, Nealey P F, Murphy C J, Genetos D C**: Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. Biomaterials, 33: 128-136 (2012)

68. **Webster T J, Ergun C, Doremus R H, Siegel R W, Bizios R**: Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. Biomaterials, 21: 1803-1810 (2000)

69. **Williams D F**, European Society for Biomaterials: Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, Engl., March 3 - 5, 1986. Elsevier, Amsterdam u.a., (1987)

70. **Williams D F**: Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery. Sadhana Vol. 28, Parts 3 & 4, 536-574 (2003)

71. **Yan C, Sun J, Ding J**: Critical areas of cell adhesion on micropatterned surfaces. Biomaterials, 32: 3931-3938 (2011)

72. **Yim E K, Reano R M, Pang S W, Yee A F, Chen C S, Leong K W**: Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. Biomaterials, 26: 5405-5413 (2005)

73. **You M H, Kwak M K, Kim D H, Kim K, Levchenko A, Kim D Y, Suh K Y**: Synergistically enhanced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by culture on nanostructured surfaces with induction media. Biomacromolecules, 11: 1856-1862 (2010)

Danksagung

Ich danke…

- Herrn Prof. Dr. med. Rolf Brenner, Leiter der Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen, für die Überlassung des interessanten Themas sowie die stetige Unterstützung bei der Verwirklichung der Dissertation.

- Herrn Dr. rer. nat. Jörg Fiedler für die hervorragende Betreuung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zu jedem Zeitpunkt vorhandene Hilfsbereitschaft.

- Herrn Prof. Dr. Paul Ziemann, Herrn Dr. Alfred Plettl sowie Frau Burcin Özdemir für die Bereitstellung der Oberflächen, den regen Informationsaustausch und die tolle Zusammenarbeit mit dem Institut für Festkörperphysik an der Universität Ulm.

- den wissenschaftlichen Mitarbeitern Frau Dr. biol. hum. Helga Joos, Frau Nina Hengartner, Frau Anja Wildner und Frau Cathrin Hogrefe sowie dem medizinisch-technischen Personal, insbesondere Frau Christiane Schulz, Frau Gabriele Mettenleiter und Herrn Giovanni Ravalli für die Einarbeitung und die tatkräftige Unterstützung im Laborbereich.

- meinen Eltern, meinem Bruder Stephan und meiner Freundin Silvia, die mich immer unterstützen und für mich da sind.