

# Die Entwicklung von Substrattopographien im Mikro- und Nanobereich zur Steuerung von Zellfunktionen

Christopher J. Bettinger, Robert Langer\* und Jeffrey T. Borenstein\*

Nanostrukturen · Nanotechnologie ·  
Tissue-Engineering · Zelladhäsion

**D**ie Wechselwirkung von Säugerzellen mit der nanoskaligen Topographie einer Unterlage hat sich als wichtiges Signalelement zur Steuerung der Zellfunktion herausgestellt. Natürliche nanotopographische Strukturen in der extrazellulären Matrix präsentieren den umgebenden Zellen mechanotransduktive Signale, die die lokale Migration, die Zellpolarisation und andere Funktionen beeinflussen. Auch eine synthetische Nanotopographie kann sich auf Zellmorphologie, Ausrichtung, Adhäsion, Migration, Proliferation und Organisation des Cytoskeletts auswirken. Im Folgenden stellen wir dar, wie sich der Kontakt zwischen Zellen und Substraten mit synthetischer Nanotopographie nutzen lässt, um komplexe zelluläre Prozesse wie Stammzelldifferenzierung und Gewebeorganisation *in vitro* zu steuern. Weitere Herausforderungen an der Schnittstelle zwischen Zelle und nanotopographischen Oberflächen werden diskutiert, darunter die Aufklärung von Mechanismen und Anwendungen im Tissue-Engineering.

## 1. Einführung

### 1.1. Native Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen

Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) weisen im Nanometerbereich ausgeprägte Strukturen auf, die wahrscheinlich zur Signalübertragung zwischen Zelle und Matrix beitragen. Die Basalmembranen vieler Gewebe verfügen ebenfalls über Nanotopographien, die direkt mit benachbarten Zellen in Kontakt stehen.<sup>[1,2]</sup> Nanotopographische Strukturen finden sich auch bei einzelnen Molekülen der ECM, etwa in den etwa 300 nm langen und 1.5 nm dicken Kollagenmolekülen.<sup>[3]</sup> Diese können Fibrillen bilden, die

zehn Mikrometer und länger sind und Durchmesser zwischen 260 und 410 nm haben.<sup>[4]</sup>

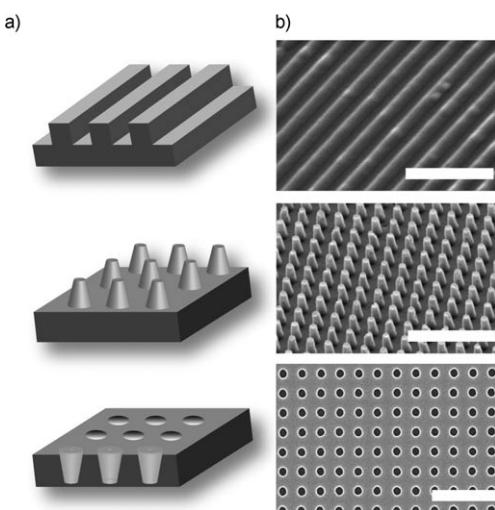
Zellen stehen mit nativen topographischen Strukturen auf vielerlei Art in Verbindung, oft über ein Phänomen, das Kontaktführung (contact guidance) genannt wird. Diese Kontaktführung ist ein herausragendes Beispiel für einen natürlichen Mechanismus, bei dem Zellen auf Strukturen im Mikrometer- oder Submikrometerbereich reagieren. Sie ist wesentlich an der Regulierung der Zellwanderung beteiligt, die durch organisierte ECM-Proteine moduliert wird.<sup>[5]</sup> Diese Zellwanderung kann auch von umgebenden Zellen beeinflusst werden, wie dies bei der Fibroblastenwanderung *in vivo*<sup>[6]</sup> und bei der koordinierten Wanderung von Epithelzellen auf einem Kollagensubstrat *in vitro* geschieht.<sup>[7]</sup> Die T-Zell-Wanderung hängt ebenfalls weitgehend von der Wechselwirkung der Zellen mit nativen ECM-Proteinen ab.<sup>[8]</sup> Die Kontaktführung kann auch eine wichtige Rolle bei der Wanderung von einzelnen Zellen, Zellgruppen oder Geweben spielen.<sup>[9]</sup> Die Migration von Nematocyten in Süßwasserpolypen wird durch eine Fasermatte gelenkt, die durch Vorgänge an den epithelialen Muskeln gebildet wird;<sup>[10]</sup> hierbei kann kein chemotaktischer Gradient nachgewiesen werden. Die Kontaktführung ist auch für die effiziente Bildung von Organellen wichtig, so bei der Führung von Axonen und der Beweglichkeit von Wachstumskegeln.<sup>[11]</sup>

[\*] Dr. C. J. Bettinger, Prof. R. Langer  
Department of Chemical Engineering  
Massachusetts Institute of Technology  
77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (USA)  
E-Mail: rlanger@mit.edu  
Dr. C. J. Bettinger, Dr. J. T. Borenstein  
Biomedical Engineering Center  
Charles Stark Draper Laboratory  
555 Technology Square, Cambridge, MA 02139 (USA)  
E-Mail: jborenstein@draper.com

## 1.2. Zellantworten auf die Nanotopographie synthetischer Substrate

Mit fortgeschrittenen Mikro- und Nanofabrikationsverfahren ist die Herstellung von Substraten möglich, die die Struktur und die Größenbereiche nativer Topographien auf zweidimensionalen Unterlagen wiedergeben. Zellen reagieren auf diese zweidimensionalen Substrate mit topographischen Strukturen mit unterschiedlichsten Antworten, die von Faktoren wie Zelltyp, Größe und geometrische Eigenschaften der Unterlage<sup>[12]</sup> sowie den physikalischen Eigenschaften und der Steifigkeit des Substratmaterials abhängen.<sup>[13]</sup> In diesem Kurzaufsatz legen wir besonderes Augenmerk auf die Effekte synthetischer Substrate mit Fernordnung im Größenbereich zwischen 10 nm und 3 µm. Obwohl dies Abmessungen im Mikro- und Nanometerbereich umfasst, sprechen wir hier der Einfachheit halber nur von Nanotopographie. Dieses Auswahlkriterium schließt viele Ansätze aus, die Systeme ohne Fernordnung untersuchen, darunter Nanofasern,<sup>[14]</sup> elektrochemisch gesponnene Fasermatten und Substrate mit Rauigkeit auf der Nanometerebene.<sup>[15-17]</sup>

Drei grundlegende Nanotopographien werden im Folgenden diskutiert: parallele Nanorillen (nanogratings) sowie Nanoarrays mit Erhebungen (nanopost arrays) und mit Vertiefungen (nanopit arrays; Abbildung 1). Die Nanotopographie beeinflusst die grundlegenden Funktionen fast aller Säugerzellen (Tabellen 1 und 2). Die Wechselwirkung zwischen den Zellen und der Nanotopographie kann verschiedene Effekte in einem Zelltyp auslösen, abhängig von der Kombination aus Nanotopographie und physikochemischen Eigenschaften des Substrats. Diese Wechselwirkung kann sich auch mit dem Zelltyp, der Größe des Strukturelements und seiner Form ändern. Unabhängig davon lassen sich aber einige allgemeine Tendenzen aus der schnell zunehmenden Literatur exzerpieren.



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung (a) und Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (b) nanotopographischer Muster: parallele Nanorillen (45° gedreht, Maßstab 5 µm), Nanoarray mit Erhebungen (15° gedreht, Maßstab 5 µm) und Nanoarray mit Vertiefungen (nicht gedreht, Maßstab 1 µm). Die Schemazeichnungen sind nicht maßstabsgetreu.



Christopher J. Bettinger arbeitet als Postdoktorand über organische Elektronik am Department of Chemical Engineering der Stanford University. Er studierte am Massachusetts Institute of Technology und erhielt 2003 den S.B. in Chemical Engineering, 2004 den M.Eng. in Biomedical Engineering und 2008 einen Ph.D. in Material- und Ingenieurwissenschaften. Er schloss seine Doktorarbeit unter Anleitung von Robert Langer ab, bei dem er an der Entwicklung mikro- und nanoskaliger Biomaterialsysteme für das „Tissue-Engineering“ arbeitete.



Robert Langer ist Institutsprofessor am Massachusetts Institute of Technology im Department of Chemical Engineering. Er ist der meistzitierte Ingenieur der Geschichte mit über 1000 Publikationen und mehr als 600 erteilten oder eingereichten Patenten. Gegenwärtig erforscht er Biomaterialien und Systeme zur Wirkstoff-Freisetzung in Gentherapie, Krebsbehandlung, „Tissue-Engineering“ und regenerativer Medizin. Er erhielt 1970 den B.S. von der Cornell University und 1974 den Sc.D. vom MIT, beide in Chemieingenieurwesen.



Jeffrey Borenstein arbeitet am Charles Stark Draper Laboratory in Cambridge, Massachusetts, und ist Programmleiter für Tissue Engineering am Center for Integration of Medicine and Innovative Technology. Er ist promovierter Physiker und hat 25 Jahre Erfahrung mit Mikrosystemen, Nanotechnologie und biomedizinischen Geräten. Seine Forschung konzentriert sich auf die Mikrofertigung für „Tissue-Engineering“ und Wirkstoff-Freisetzung. Er hält 13 erteilte Patente und 20 offengelegte Patentanmeldungen und hat über 80 begutachtete Artikel in Zeitschriften und Konferenzbänden veröffentlicht.

### 1.2.1. Morphologie

Der wahrscheinlich auffälligste Effekt der Nanotopographie ist der Einfluss auf die Zellform. Viele Zellen reagieren typischerweise auf Nanorillen, indem sie sich entlang der Achse ausrichten und strecken (Tabelle 1). Diese Antwort wurde bei verschiedenen Zelltypen beobachtet, darunter Fibroblasten, Endothelzellen, Stammzellen, glatte Muskelzellen, Epithelzellen (Abbildung 2) und Schwann-Zellen.<sup>[44]</sup> Auch Neuriten, die von Neuroblastomzellen (PC12) ausgehen, die auf Nanorillen in Gegenwart von Nervenwachstumsfaktor (NGF) kultiviert wurden, reagierten mit verstärkter Ausrichtung und Streckung. Diese morphologische Reaktion sieht man bereits bei Zellen, die auf Substraten mit Elementen von nur 100 nm Größe und 75 nm Tiefe wachsen.<sup>[45]</sup> Ausgeprägter wurden die Reaktionen bei verringertem Abstand und größerer Tiefe, wobei letztere meist den stärkeren Effekt hervorrief. In anderen Versuchsreihen wurde gezeigt, dass bestimmte Nanorillen-Größen eine Ausrichtung von Zellen parallel oder senkrecht zum Gitter induzierten.<sup>[46]</sup>

**Tabelle 1:** Allgemeine Zellantworten auf eine Nanogitter-Topographie.<sup>[a]</sup>

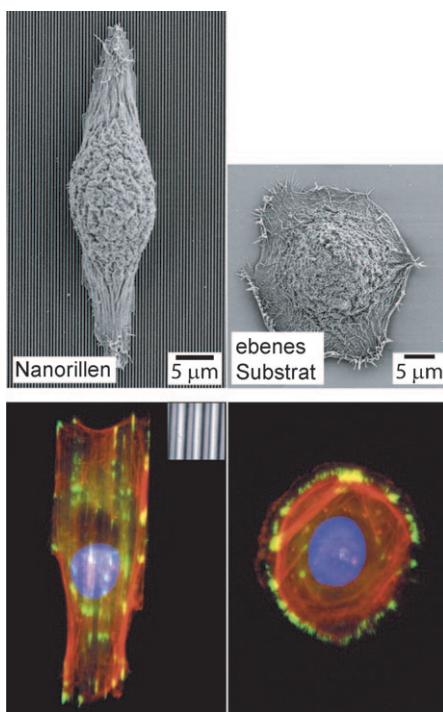
Zelltyp <sup>[b]</sup>	Größe der Strukturen	Substrat-material <sup>[c]</sup>	Verlängerung, Ausrichtung	Zellfläche	Anhaftung, Adhäsion	Proliferation	Gerichtete Wanderung	Andere	Lit.
h Endothelzellen	600 nm	PDMS	++	--		--	++	organisiert in vielzellige Strukturen	[18]
b Endothelzellen	2 $\mu$ m	PGS	++		+				[19]
r Endothelzellen	750 nm–10 $\mu$ m	Ti							[20]
h embryonale Stammzellen	600 nm	PDMS	++		--	--		Cytoskelett-störende Reagentien rufen eine Reaktion hervor	[21]
h mesenchymale Stammzellen	350 nm–10 $\mu$ m	PDMS	++	--		--		Differenzierung in neuronale Zellen	[22]
r C6-Gliomzellen	266 nm	PS	++				++		[23]
h EKCs (HEK-293)	200–430	PS	++			++			[24]
b glatte Muskelzellen	350 nm	PDMS, PMMA	++			--		polarisiertes MTOC <sup>[d]</sup>	[25]
h Fibroblasten	50–600 nm	Si	++	–		–			[26]
h Fibroblasten	3–5 $\mu$ m	Ti	++			0		Anstieg der Fibronectin-mRNA, Einbau	[27]
h Hornhaut-ECs	70–2100 nm	Si	++	--	++			gerichtete Ausdehnung der Lamellipodien	[28, 29]
h Hornhaut-ECs	2–20 $\mu$ m	PS	++	--			++		[30]
h Hornhaut-ECs	1–4 $\mu$ m	Quarz					++	Untersuchung einer Kombination aus Topographie, elektrischem Feld und löslichen Faktoren	[31]
r PC12	70–1900 nm	Si	++					kooperative Neuritenstreckung	[32]

[a] Kein Eintrag: Daten nicht verfügbar; ++: Zunahme unter allen Bedingungen; +: Zunahme unter den meisten Bedingungen; 0: keine nachweisbare Veränderung; -: Abnahme unter den meisten Bedingungen; --: Abnahme unter allen Bedingungen. [b] h: Mensch; b: Rind; r: Ratte. [c] PDMS = Poly(dimethylsiloxan), PS = Polystyrol, PGS = Poly(glycerinsebacat), PMMA = Poly(methylmethacrylat). [d] MTOC = Mikrotubuli-organisierendes Zentrum.

**Tabelle 2:** Allgemeine Zellreaktionen auf eine Nanotopographie mit Erhöhungen und Vertiefungen.<sup>[a]</sup>

Zelltyp	Größe der Strukturen	Substrat-material <sup>[b]</sup>	Ausbreitung	Anhaftung, Adhäsion	Proliferation	Andere	Lit.
h Osteoblasten	300 nm (Vertiefung)	PC		--		verringerte Fläche der Adhäsionskomplexe	[33]
r Cardiomyozyten	150 nm	PEG		++			[34]
m P19EC-Stammzellen	300–500 nm	PEG		++			[35]
h mesenchymale Stammzellen	300 nm (Vertiefung)	PMMA				osteogene Differenzierung	[36]
h Knochenmarkszellen	300 nm (Vertiefung)	PC	--			konstante Bildung von Filopodien	[37]
h Fibroblasten	400–700 nm (Erhöhung)	PLA			++	--	
h Fibroblasten	50–600 (Erhöhung)	Si	–		0		[26]
h Fibroblasten	80 nm (Vertiefung)	Si	--			Genarray-Analyse	[38]
h Fibroblasten	35–120 nm (Vertiefung)	PCL	–			mehr Filopodien	[39]
h Fibroblasten	35–120 nm (Vertiefung)	PCL, PMMA		--		gerichtete Orientierung	[40]
m Fibroblasten	750–1500 nm (Erhöhung)	PDMS mit Fibronectin	0			konstante Zugkräfte über das gesamte Muster	[41]
r Fibroblasten	60–150 nm (Vertiefung, Erhöhung)	PCL		–		verstärkte Adhäsion an zufällige Erhöhungen	[42]
HeLa	160–1000 nm (Erhöhung)	PS	--		0		[43]

[a] Kein Eintrag: Daten nicht verfügbar; ++: Zunahme unter allen Bedingungen; +: Zunahme unter den meisten Bedingungen; 0: keine nachweisbare Veränderung; -: Abnahme unter den meisten Bedingungen; --: Abnahme unter allen Bedingungen. [b] PC = Polycarbonat, PEG = Poly(ethylenglycol), PLA = Poly(L-lactat), PCL = Poly( $\epsilon$ -caprolacton).



**Abbildung 2.** Epithelzellen reagieren auf Nanorillen mit einer Ausrichtung und Streckung entlang der Rillenachse, wie man auf Fluoreszenz- (unten) und Rasterelektronenmikroskop-Photographien (oben) erkennt. Andere Zelltypen weisen ähnliche morphologische Antworten auf, wenn sie auf Substraten mit Nanorillen kultiviert werden (Tabelle 1). Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung der Company of Biologists.

Verschiedene Zelltypen, darunter humane Leukocyten, Keratinocyten und Monocyten, reagieren nicht auf Nanorillen.<sup>[47]</sup> Sogar vielfach beobachtete morphologische Effekte der Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung sind nicht generell bei allen Zelltypen nachweisbar.

Substrate mit Erhebungen und Vertiefungen üben subtile Effekte auf die Zellmorphologie aus. In vielen Versuchen war eine verringerte Ausbreitung auf solchen Unterlagen sichtbar, allerdings ist der Gesamteffekt dieser Strukturen auf die Auflagefläche der Zellen unklar (Tabelle 2). In anderen Untersuchungen ließen sich eine gesteigerte<sup>[39]</sup> oder konstante Filopodienbildung<sup>[37]</sup> und eine verminderte Bildung von Adhäsionskomplexen nachweisen.<sup>[33]</sup>

### 1.2.2. Anhaftung und Adhäsion

Liegt die Größenordnung einer synthetischen Nanotopographie im Bereich von Proteinen der extrazellulären Matrix,<sup>[2]</sup> z. B. Kollagen,<sup>[48]</sup> so kann sie wahrscheinlich die Anhaftung und Adhäsion von Säugerzellen verstärken. Nanorillen scheinen allgemein die Adhäsion von Zellen auf verschiedenen Materialien zu verstärken, während Erhebungen und Vertiefungen die anfängliche Zellanhaltung eher erschweren (Tabelle 1 und 2). In weiteren Experimenten muss noch geklärt werden, worauf die Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von Größe und geometrischen Charakteristika der Oberflächenstrukturen beruhen könnte.

### 1.2.3. Proliferation

Die Nanotopographie hat auch einen Einfluss auf die Proliferationsprofile verschiedener Zelltypen. Im Allgemeinen teilen sich Zellen auf Nanorillen langsamer als auf ebenen Substraten (Tabelle 1). Der Effekt von Erhebungen oder Vertiefungen des Substrats auf die Proliferation ist vielfältiger: manche Kombinationen von Form und Größe der Strukturen, Substratmaterial und Zelltyp begünstigen eine schnellere Proliferation, während andere die Teilung verlangsamen (Tabelle 2). Es zeichnen sich keine offensichtlichen Trends ab, nach denen sich der Einfluss von Erhebungen oder Vertiefungen auf die Teilungsgeschwindigkeit vorhersagen lässt. Außerdem gibt es bislang keine allgemein akzeptierten Hypothesen bezüglich der Mechanismen, nach denen die Nanotopographie auf die Zellteilung einwirkt.

### 1.2.4. Zellwanderung

Der Einfluss der Nanotopographie auf die Zellwanderung lässt sich üblicherweise an Zellen beobachten, die auf Nanorillen kultiviert werden. Viele Zelltypen zeigen eine gerichtete Wanderung entlang der Rillenachse und insgesamt eine gesteigerte Wanderungsgeschwindigkeit. Zu den Zellen mit einem solchen Verhalten gehören Endothel-<sup>[18]</sup> und Epithelzellen,<sup>[30,31,49]</sup> Osteoblasten<sup>[50]</sup> und C6-Gliomzellen<sup>[23]</sup> (Tabelle 1). Durch die Nanotopographie lassen sich auch Markierungen für eine gerichtete Wanderung vorgeben, wie Yim et. al. zeigen konnten.<sup>[25]</sup> Die Mikrotubuli-Organisationszentren (MTOCs) waren als unmittelbare Folge der Nanorillen polarisiert. Diese Polarisierung der MTOCs ersetzte die gerichteten Wanderungssignale bei der Wundheilung.<sup>[25]</sup> Die schnellere Wanderung geht typischerweise mit einer Streckung und Ausrichtung des Zellkörpers entlang der Nanorillenachse einher.<sup>[18,23,50]</sup>

Über die Zellwanderung auf Nanoarrays mit Vertiefungen oder Erhebungen liegen viel weniger Untersuchungen vor als über die Zellwanderung auf Nanorillen. Eine Studie von Tzvetkova-Chevolleau et al. befasst sich mit der Wanderung von normalen (3T3) und bösartigen (SaI/N) Mausfibroblasten auf Poly(dimethylsiloxan)-Substraten (PDMS) mit Nanorillen und Nanoarrays mit Erhebungen.<sup>[51]</sup> Auf Nanorillen wandern 3T3- und SaI/N-Zellen entlang der Gitterachse. Nanoarrays mit Erhebungen in rechtwinkliger Anordnung beeinflussen die Wanderungsrichtung von 3T3-Zellen, nicht aber von SaI/N-Zellen. Es gab zwar keinen erkennbaren Einfluss der Nanotopographie auf die Wanderungsgeschwindigkeit der 3T3-Zellen, wohl aber für die SaI/N-Zellen. SaI/N-Zellen, die auf Substraten mit Erhebungen kultiviert wurden, wiesen einen breiten Bereich von Wanderungsgeschwindigkeiten auf. Ein großer Prozentsatz der Zellen erreichte dabei hohe Geschwindigkeiten. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den Einfluss von Nanoarrays mit Erhebungen und Vertiefungen auf das Migrationsprofil aufzuklären.

## 2. Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen zur Steuerung komplexer Funktionen

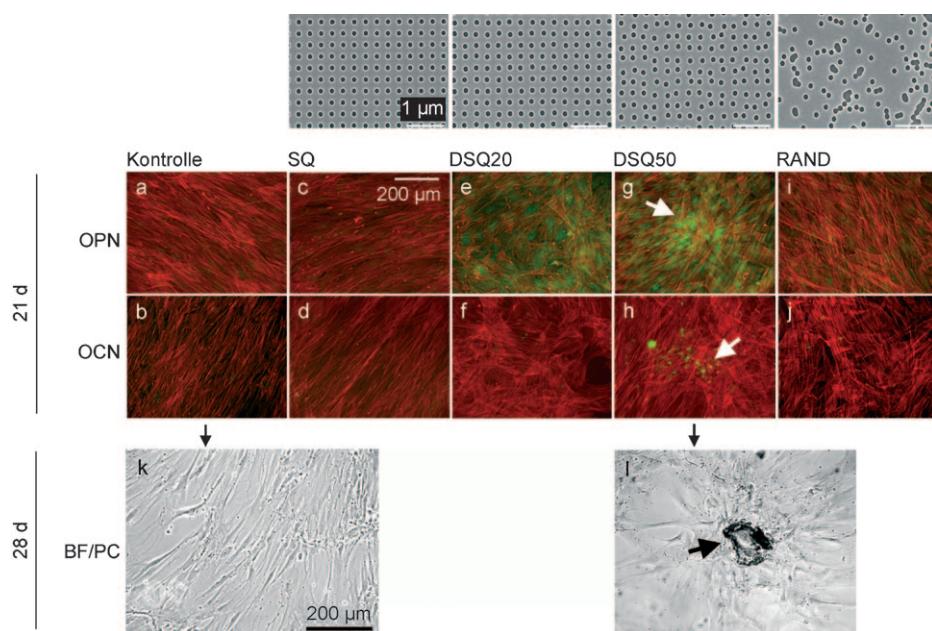
### 2.1. Genotypische Veränderungen

Die Nanotopographie kann die Genexpressionsprofile verschiedener Zelltypen verändern. Diese genetischen Profile wurden zuerst anhand einzelner Gene und anschließend durch umfassende Genanalysen untersucht. Aus einer Studie von Chou et al. lässt sich ableiten, dass Menge und Stabilität von mRNA in menschlichen Fibroblasten durch Nanorillen beeinflusst werden.<sup>[27]</sup> Im Einzelnen exprimierten Fibroblasten auf Titan-Nanorillen mehr Fibronectin-mRNA mit höherer Stabilität. Außerdem induzierten Nanorillen einen vermehrten Fibronectin-Einbau in die Zellmatrixproteine. Mit Genarray-Verfahren konnten in neuerer Zeit die Effekte der Nanotopographie auf die genomweite Expression in Fibroblasten<sup>[52]</sup> und mesenchymalen Stammzellen<sup>[22,36]</sup> untersucht werden. Fibroblasten, die auf Vertiefungen kultiviert werden, weisen umfangreiche Herunterregulierungen vieler Gene auf, darunter solche, die mit der Einleitung der Apoptose, der DNA-Reparatur und der Transkriptionsregulierung zusammenhängen.<sup>[38]</sup> Andere Gene sind unter diesen Bedingungen hochreguliert, darunter TGF- $\beta$ r2 und Gene, die an der Regulierung der G-Protein-Kaskade beteiligt sind.

### 2.2. Differenzierung

Der Einfluss der Topographie auf grundlegende Zellfunktionen und die Genexpression in vielen Zelltypen lässt erwarten, dass mithilfe der Nanotopographie eine gezielte Zelldifferenzierung ausgelöst werden kann. Es gab bereits spürbare Fortschritte, obwohl diese Anwendung der Nanotopographie erst in jüngster Zeit gezielt erforscht wurde. Yim et al. haben gezeigt, dass humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) auf Nanorillen bevorzugt zu neuronalen Zellen differenziert werden können, wie sich anhand von Synaptophysin, tuj1 und Nestin-Markern sowie der Hochregulierung von MAP2 zeigen ließ.<sup>[22]</sup>

Die verstärkte Differenzierung von hMSCs wurde auch auf Nanoarrays mit Vertiefungen untersucht. Dalby et al. kultivierten Knochenvorläuferzellen und hMSC über lange Zeit auf PMMA-Nanoarrays mit Vertiefungen in verschiedenen Anordnungen.<sup>[36]</sup> Symmetrie und Anordnung der Vertiefungen hatten einen signifikanten Einfluss auf die Expression von Osteopontin und Osteocalcin, zwei knochen-spezifische ECM-Proteine, in beiden Zelltypen (Abbildung 3). Während hMSCs, die auf vollkommen regelmäßigen oder zufällig angeordneten Vertiefungen kultiviert wurden, die genannten beiden Proteine nicht exprimierten, wurden diese bei Kultur auf einem leicht unregelmäßigen Substrat in



**Abbildung 3.** Gerichtete Differenzierung menschlicher mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten auf Substraten mit Vertiefungen. Oben: Nanoarrays mit Vertiefungen, die mithilfe von Elektronenstrahlolithographie erzeugt wurden (Maßstab jeweils 1  $\mu$ m). Die Vertiefungen haben einen Durchmesser von 120 nm, sind 100 nm tief, und der absolute oder durchschnittliche Abstand zwischen den Mittelpunkten beträgt 300 nm. Die Vertiefungen sind regelmäßig quadratisch (SQ), versetzt quadratisch ( $\pm 20$  nm vom tatsächlichen Mittelpunkt – DSQ20 – oder  $\pm 50$  nm vom tatsächlichen Mittelpunkt entfernt – DSQ50) oder zufällig (RAND) angeordnet. a, b) Menschliche MSCs, kultiviert auf einem ebenen Kontrollsubstrat; zu beachten sind die Form der Fibroblasten und das Fehlen von Osteopontin(OPN)- oder Osteocalcin(OCN)-positiven Zellen; c, d) hMSCs auf dem SQ-Array; zu beachten sind die Form der Fibroblasten und das Fehlen von OPN- oder OCN-positiven Zellen; e, f) hMSCs auf dem DSQ20-Array; hier tauchen OPN-positive Zellen auf; g, h) hMSCs auf dem DSQ50-Array; hier finden sich OPN- und OCN-positive Zellen und Verknöcherungspunkte (Pfeile); i, j) auf dem RAND-Array fällt die Osteoblasten-Morphologie auf, es gibt keine OPN- oder OCN-positiven Zellen. Die Aufnahmen (a)–(j) haben den gleichen Maßstab. k, l) Hiffeld-/Phasenkontrastaufnahmen zeigen, dass hMSC, auf dem Kontrollsubstrat (k) kultiviert, nach 28 d die Morphologie von Fibroblasten hatten, während die hMSCs, die auf DSQ50-Arrays (l) kultiviert wurden, mineralisierte, reife Verknöcherungspunkte aufwiesen. Die Abbildungen (k) und (l) sind im gleichen Maßstab dargestellt. Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.<sup>[36]</sup>

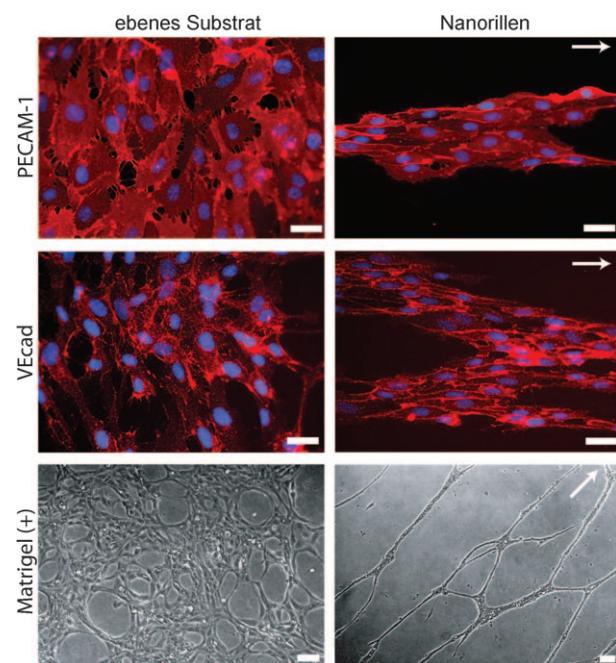
größeren Mengen gebildet. Auch die gesteigerte Bildung von Verknöcherungspunkten war bei hMSCs nur auf diesem Untergrund eindeutig zu erkennen. Die hMSCs wurden außerdem auf drei Substraten kultiviert: 1) auf Nanoarrays mit Vertiefungen, 2) auf ebenen Substraten in Gegenwart von Dexamethason (DEX), einem löslichen Faktor, der die Knochenbildung induzieren kann, als Positivkontrolle und 3) auf ebenen Substraten ohne DEX als Negativkontrolle. Auf Vertiefungen kultivierte hMSCs exprimierten viele osteoblastenspezifische Gene in ähnlichem Umfang wie bei Kultur auf einem ebenen Substrat in Gegenwart von DEX. In hMSC-Kulturen auf Vertiefungen mit DEX waren einige Gene im Vergleich zur Kultur mit DEX alleine spezifisch hochreguliert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen verdeutlichen das Potenzial der Nanotopographie für die Steuerung der Zell-differenzierung. Außerdem deuten die gegensätzlichen Befunde der Kulturversuche auf Nanorillen und geordneten und ungeordneten Vertiefungen auf die Möglichkeit hin, eine selektive Differenzierung einzig über die Nanotopographie des Substrats zu steuern.

### 2.3. Vielzellige Strukturen

Durch Modulation der Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen lässt sich auch die Zell-Zell-Wechselwirkung so beeinflussen, dass komplexe vielzellige Strukturen entstehen. Ein Beispiel dafür ist die Kultur von menschlichen endothelialen Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPCs) auf PDMS-Nanogittern.<sup>[18]</sup> In dieser Untersuchung reagierten EPCs auf Veränderungen der Substrattopologie mit verringerter Proliferation und verstärkter Wanderung. Die Expression endothelialer Markerproteine war bei EPC-Kulturen auf Nanorillen oder ebener Unterlage ähnlich. EPCs auf Nanorillen bildeten jedoch innerhalb von 6 Tagen getrennte Bänder, die etwa 100 µm breit und Hunderte von Mikrometern lang waren (Abbildung 4). Diese Morphologie unterscheidet sich signifikant von den konfluenteren Monoschichten, die sich auf ebenen Substraten bilden. Die EPC-Bänder, die auf Nanorillen gebildet wurden, ordneten sich in einem In-vitro-Matrikeltest zu definierten Kapillarröhren an. In den konfluenteren Schichten aus EPCs, die sich auf ebenen Substraten bildeten, entstanden keine Kapillarröhren.

Für diese bevorzugte Strukturbildung von EPCs in Kultur auf nanotopographisch modifizierten Oberflächen werden verschiedene Gründe vermutet. Erstens beeinflussen Aufreihung, Streckung und gesteigerte Wanderungsgeschwindigkeit die Morphologie und die Zell-Zell-Wechselwirkung. Der gerichtete Kontakt führt zu Bandstrukturen als Vorstufen für die Kapillarröhren. Zweitens verhindert die verringerzte Proliferation der EPCs auf Nanorillen die Bildung konfluenter Monoschichten. Durch diese reduzierte Zeldichte könnte es zur Steigerung der Zellbeweglichkeit während der Induktion der Kapillarröhrenbildung mit Matrikel kommen. Unabhängig vom möglichen Mechanismus belegt diese Untersuchung das Potenzial der Nanotopographie in Hinblick auf die kontrollierte Bildung vielzelliger Strukturen.



**Abbildung 4.** Substrate mit Nanorillen begünstigen organisierte vielzellige Strukturen und verstärken in vitro die Bildung von Kapillaren. Die Proteinexpression der beiden endothelialen Markerproteine PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1) und VEcad (vascular endothelial cadherin) war gleich, unabhängig davon, ob die Zellen auf einem ebenen Substrat oder auf Nanorillen kultiviert wurden. Während Endothelzellen auf ebenen Substraten konfluente Monoschichten bilden, organisieren sie sich auf Nanorillen in vielzelligen Bändern. Diese aufgereihten Bänder bildeten in einem In-vitro-Matrikeltest (Matrikel (+)) entsprechende Kapillarröhren. Die Richtung der Rillen ist durch weiße Pfeile markiert. Wiedergabe nach Lit. [18]

## 3. Synthetische nanotopographische Substrate für das „Tissue-Engineering“

### 3.1. Herstellungsverfahren

Es gibt verschiedene Herstellungsmethoden für nanotopographische Substrate mit weit- und kurzreichender Ordnung, die im Detail bereits an anderer Stelle beschrieben wurden.<sup>[53]</sup> Der Effekt von Mustern und Symmetrie ist in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen worden.<sup>[36, 40, 42]</sup> Diese Befunde lassen vermuten, dass die Reaktion von Zellen auf rauen Substraten mit Strukturelementen einer bestimmten Größe nicht mit derjenigen gleichgesetzt werden sollte, die diese Zellen auf einer geordneten Nanotopographie vergleichbarer Größenordnung aufweisen. Die Herstellung von Substraten mit Fernordnung und Strukturelementen zahlreicher Größen und Formen wurde mit verschiedenen Methoden verfolgt, z.B. mit Photo-, Elektronenstrahl- und Interferenzlithographie. Diese Verfahren sind zwar zur Erzeugung von Mustern geeignet, doch sie sind teuer und zeitaufwändig und erfordern eine spezielle Ausrüstung. Bei alternativen Ansätzen wurde versucht, Polymersubstrate mit Strukturen in einer Fernordnung herzustellen, darunter mit Diblockcopolymeren<sup>[54]</sup> für Lamellen mit Nanorillen<sup>[55]</sup> und mit Nanokügelchen-Lithographie<sup>[56]</sup> für Vertiefungen.<sup>[57]</sup> Leistungsfähige

Herstellungsverfahren und kompatible Materialien müssen zusammenwirken, um Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen in optimierte Gerüste für das „Tissue-Engineering“ zu integrieren. Es gibt mehrere Verfahren, um dreidimensionalen Strukturen nanotopographische Eigenschaften zu verleihen, darunter die Zweiphotonenpolymerisation<sup>[58,59]</sup> oder das „Molekül-Origami“<sup>[60,61]</sup>. Die Integration nanotopographischer Merkmale in ein dreidimensionales Gerüst bleibt aber eine Herausforderung.

### 3.2. Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen

Über die Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung lässt sich die Stammzelldifferenzierung und die Bildung vielzelliger Strukturen steuern; die Bedeutung dieser beiden Punkte für das „Tissue-Engineering“ ist offensichtlich. Nanotopographien als Mittel, um grundlegende Zellfunktionen zu beeinflussen, lassen sich auch zur Entwicklung entsprechender Gerüste nutzen. So kann man mithilfe von Nanorillen aufgereihte Zellpopulationen bilden, die für die Struktur und Funktion glatter Muskelzellen und Endothelzellen wichtig sind. Gerüste für das „Tissue-Engineering“ von Gefäßen sind von besonderem Interesse hinsichtlich der Anordnung und Ausrichtung vieler Zelltypen in unmittelbarer Nachbarschaft. In aktuellen Arbeiten wurde über die Herstellung eines röhrenförmigen Gerüsts mit verschiedenen Rillenstrukturen berichtet.<sup>[61]</sup> Der Einfluss der Nanotopographie auf die Adhäsion lässt sich auch nutzen, um Zellen in einem bestimmten Muster anzurichten, ohne vorher Proteine im gleichen Muster aufzubringen. Wenn man nanotopographische Markierungen direkt in einem dreidimensionalen Gerüst anbringt, lassen sich damit vielleicht die Einschränkungen von Mikrokontakt-Stempeln<sup>[62–64]</sup> und verwandten Methoden überwinden, die nur zweidimensionale Anordnungen liefern können.<sup>[65,66]</sup> Die beobachtete verstärkte Wanderung von Zellen auf Nanorillen bietet sich für die Entwicklung von Führungsschienen für die Regeneration peripherer Nerven an. So sollten röhrenförmige Leitungen mit Nanorillen die Wanderung von Schwann-Zellen zu einer Verletzungsstelle fördern und damit die Regeneration verbessern.<sup>[67]</sup> Diese Strukturen können möglicherweise auch die schnelle Wanderung von Neuriten über die Nervenlücke fördern.

### 3.3. Material

Es hat große Fortschritte bei der Herstellung von Nanotopographien auf zahlreichen Materialien gegeben. Entsprechende Techniken werden meist für Materialien entwickelt, die aus der Halbleiterfertigung oder verwandten Gebieten stammen. Die Bearbeitung von Grundstoffen und Strategien für die Erzeugung nanotopographischer Oberflächen sind typischerweise auf Silicium, Siliciumoxid, polykristallines Silicium und andere anorganische Materialien wie Titan abgestimmt. Diese Substrate können direkt eingesetzt werden oder als Matrizen für Mikroreplika aus organischen Polymeren dienen: PDMS, Polystyrol (PS), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polycarbonat (PC) oder Polyethylenglycol (PEG)

kommen für In-vitro-Anwendungen in Betracht, während biologisch abbaubare Polymere wie Poly- $\epsilon$ -caprolacton (PCL), Poly-L-lactat (PLA), Polyglycolsäure (PGA) und Poly-L-lactid-co-glycolid (PLGA) möglicherweise in vivo einsetzbar sind. Obwohl diese biologisch abbaubaren Materialien in der Medizin in großem Umfang angewendet werden, haben PLA, PGA und PLGA doch auch ernstzunehmende Schwächen in Bezug auf Beständigkeit und Steifigkeit. Mit den dynamischen Bewegungen eines lebenden Organismus unverträgliche Materialien können lokale Entzündungsreaktionen auslösen.<sup>[68–70]</sup>

Die Entwicklung neuer Materialien ist von entscheidender Bedeutung für Anwendungen im „Tissue-Engineering“, die auf Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen beruhen. Synthetische oder natürliche Materialien müssen nicht nur die gewünschten Wechselwirkungen mit Zellen zeigen, sondern sie müssen auch mit den verfügbaren Nanofabrikationsverfahren kompatibel sein. Natürliche Proteine bieten viele Vorteile, darunter günstige Wechselwirkungen zwischen Zelle und Material. Sie sind jedoch schwer zu bearbeiten, und die Gefahr allergischer Reaktionen<sup>[71,72]</sup> kann einen breiten Einsatz verhindern. Synthetische biologisch abbaubare Elastomere<sup>[68,69,73,74]</sup> lassen sich leichter bearbeiten, sie verfügen über einstellbare physikalische und mechanische Eigenschaften sowie gute Gewebeverträglichkeit und Kinetik des biologischen Abbaus, und sie eignen sich überdies für Nanofabrikationsverfahren.<sup>[19,77,78]</sup>

### 4. Mechanismen für nanotopographische Sensorik und Signalgebung

In Untersuchungen konnte zwar ein starker Einfluss nanotopographischer Strukturen festgestellt werden, doch die genauen Mechanismen der Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung müssen noch aufgeklärt werden. Denn einige Besonderheiten dieses Forschungsgebiets standen der genauen Klärung des Wechselwirkungsmechanismus bislang im Wege. Es gibt eine schier unendliche Zahl möglicher Kombinationen aus Zelltypen, Materialien und der Anordnung der topographischen Merkmale. Die Wechselwirkungen zwischen Zelle und Nanotopographie sind außerdem vorübergehend, was die Ableitung eines Mechanismus für die Reaktion auf die Kontaktführung erschwert.<sup>[52]</sup> Zellen in Langzeitkultur können beispielsweise zusätzliche extrazelluläre Matrixproteine sezernieren, was in einer verzerrten topographischen Signalgebung resultiert.<sup>[79]</sup> Die große Zahl möglicher Versuchsanordnungen und zellspezifischer Ergebnisse führte zu einer vornehmlich phänomenologischen Untersuchung der Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung. Trotz umfangreicher Arbeiten ist nur wenig über den Mechanismus bekannt, nach dem topographische Strukturen die Zellfunktionen beeinflussen. Verschiedene Theorien wurden vorgeschlagen, um die Anordnung und Streckung der Zellen auf Nanorillen zu erklären. Vor kurzem hat man damit begonnen, den Mechanismus der Zell-Topographie-Wechselwirkungen zu erforschen und dabei relevante Signalübertragungswege zu identifizieren und die Rolle von Organellen (und des Cytoskeletts) zu bestimmen. Die Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung

kung bleibt aber weiterhin ein vielversprechendes Forschungsgebiet; ein Ziel könnte es sein, Modelle zu entwickeln, die eine genauere Vorhersage dieser Abläufe ermöglichen.<sup>[80]</sup>

#### 4.1. Aktuelle Theorien

Wir vermuten, dass die morphologische Reaktion als Indikator für relevante Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen dienen kann und gleichzeitig Ausgangspunkt für nachgeordnete Effekte ist. Die Streckung und Ausrichtung des Zellkerns ist wahrscheinlich eine weitere Ursache für die Veränderung des Expressionsprofils, wenn Zellen auf die Nanotopographie des Substrats reagieren.<sup>[52,81]</sup> Allgemein verbreitet ist die Auffassung, dass die morphologische Reaktion durch einen anisotropen Stress auf dem Substrat hervorgerufen wird, dessen genaue Ursache und Rolle aber noch diskutiert werden.

Theorien zu den Grundlagen der Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung werden am Beispiel von Nanorillen beschrieben. Die Kinetik der Kontaktführung von Fibroblasten auf Titan-Nanorillen deutet darauf hin, dass sich die Mikrotubuli zunächst innerhalb von 20 Minuten nach der Anheftung ausrichten und dass dies der Ausrichtung der ganzen Zelle vorausgeht.<sup>[82]</sup> Dieser komplexen Reaktion folgen die Anordnung von Mikrofilamentbündeln nach 40–60 Minuten und die Bildung von fokalen Adhäsionen nach 3 Stunden. Die Experimente machen deutlich, dass zahlreiche Organellen an der Reaktion der Zelle auf die Oberflächentopographie beteiligt sind und so grundlegende Zellfunktionen beeinflussen wie die Bildung von Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien. Eine entscheidende Funktion bei der Kontaktführung wird den Filopodien zugeschrieben,<sup>[39]</sup> deren Bildung durch die Aktivierung von Cdc42 moduliert werden kann.<sup>[28]</sup> Dieses Modell kann den Mechanismus der Erkennung und Übertragung von Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen erklären. Darüber hinaus befassen sich einige Theorien mit dem Ursprung dieser Reaktion.

##### 4.1.1. Intrinsische Proteinmuster durch Substratdiskontinuitäten

Diskontinuitäten in den Substratstrukturen können zu einer bevorzugten Adsorption von Proteinen führen, wodurch sich Proteinmuster bildet. Diese topographisch begründeten Muster könnten eine bevorzugte Anordnung von Zellen induzieren, ebenso wie Substrate mit einem Protein-Mikromuster eine bestimmte Lokalisierung von Zellen verursachen.<sup>[83]</sup> Die Anlagerung an Protein-Mikromuster mit unterschiedlichen Abmessungen kann das Zellverhalten im Hinblick auf Morphologie, Proliferation, Differenzierung und Apoptose drastisch verändern.<sup>[84–86]</sup> Neuere Ergebnisse wie die beobachtete Kontaktführung auf gleichmäßig glatten Unterlagen, die viel länger sind als die Proteine, sprechen jedoch gegen diese Theorie.<sup>[19,87]</sup>

##### 4.1.2. Räumliche Ausrichtung der fokalen Adhäsionen

Die Nanotopographie kann die Ausrichtung und Streckung von Zellen induzieren, indem sie zunächst die Ausrichtung der fokalen Adhäsionen anregt. Dieser Einfluss könnte auf unterschiedliche Bildungswahrscheinlichkeiten zurückgehen, die durch die Form der Strukturen auf der Unterlage oder geometrische Einschränkungen der fokalen Adhäsionskomplexe bedingt sind. Der nächste Schritt könnte eine Reaktion der Zellmorphologie sein, die durch die vorher beschriebene enge Kopplung über Signale zwischen den fokalen Adhäsionen und den Cytoskelett-Proteinen vermittelt wird. Diese Theorie kann zwar den Zusammenhang zwischen der Ausrichtung der fokalen Adhäsionen und der Streckung der gesamten Zelle erklären; sie geht aber nicht genügend auf die anfängliche Aufreihung der fokalen Adhäsionen ein.

##### 4.1.3. Bevorzugte Actin-Polymerisation

Die Actin-Polymerisation, die an der Umorganisation des Cytoskeletts beteiligt ist, ist entscheidend für die Zellanhaltung<sup>[88]</sup> und dient als Triebkraft für die gerichtete Wanderung und für morphologische Änderungen.<sup>[89–91]</sup> Filopodien sind sehr bewegliche Organellen, die an vielen zellulären Prozessen wie der Migration<sup>[92]</sup> und dem Registrieren der lokalen Topographie<sup>[93]</sup> beteiligt sind. Sie bilden sich selten senkrecht zu Graten und Furchen, vermutlich, weil dies ungünstigen Stress verursachen würden, häufiger hingegen parallel zu den genannten Strukturen. Durch dieses Verhalten lösen Filopodien eine gezielte Ausbreitung der Zelle, den Umbau des Cytoskeletts und die Polarisierung des Zellkörpers aus, die letztlich zur Aufreihung und Streckung der Zellen führen. Die hochdynamischen Filopodien dienen als topographische Sensoren, die die unmittelbare Umgebung erfassen können. Diese Theorie stimmt am ehesten mit den meisten Arbeiten über dieses Thema überein.<sup>[19]</sup>

#### 4.2. Die mögliche Rolle der kleinen GTPasen

Es ließ sich nachweisen, dass eine Familie der GTPasen, die Rho-Proteine, die Bildung und Organisation der Filamente steuert, aus denen das Cytoskelett besteht.<sup>[94]</sup> Die Aktivierung der Rho-, Rac- und Cdc42-GTPasen steuert eine breite Palette von Zellfunktionen, darunter die Bildung und den Umbau des Cytoskeletts, Änderungen der Genexpression, das Fortschreiten des Zellzyklus, die Zellmorphogenese und die Zellwanderung bei vielen Zelltypen.<sup>[95,96]</sup> Wir gehen also davon aus, dass diese Schaltsysteme eine wichtige Rolle bei der Reaktion von Zellen auf die Nanotopographie des Substrats spielen. Man hat erst vor kurzem begonnen, die Bedeutung dieser Signalwege für die Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen zu erforschen.<sup>[21,97]</sup> Eine Schlüsselfunktion, die nanotopographische Signale direkt mit einer Reaktion der Zelle koppeln könnte, ist die Bildung räumlich gerichteter fokaler Adhäsionskontakte<sup>[98]</sup> durch die Aktivierung von Rho, die schließlich drastische Auswirkungen auf Zellmigration und Signalgebung haben kann.<sup>[99]</sup> Solche fokalen Adhäsionen beeinflussen die Zellmorphogenese,<sup>[80,100]</sup> und sie rea-

gieren empfindlich auf mechanische Kräfte.<sup>[101]</sup> In künftigen Arbeiten muss der Zusammenhang zwischen der nanotopographischen Signalgebung und der Modulation von Zellfunktionen weiter aufgeklärt werden.

### 4.3. Fortgeschrittene biologische Techniken

Der Einfluss der Nanotopographie auf die Genexpression ist eine intuitive Extrapolation des Effekts auf die grundlegenden Zellfunktionen. Quantifizierungen des Einflusses der Nanotopographie auf die Expression des Gesamtgenoms ergeben eine enorme Datenflut, aus der sich bislang noch keine klaren Mechanismen ableiten ließen. Untersuchungen zu einzelnen Signalwegen, die wahrscheinlich in die Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung eingebunden sind, könnten nützlicher sein, um die Ursachen der Zellreaktionen zu verstehen. Bei solchen Studien wird die Zell-Topographie-Wechselwirkung in Gegenwart anderer signalgebender Komponenten betrachtet; dieser Trend macht sich vor allem in neueren Arbeiten bemerkbar, in denen der kombinierte Effekt von löslichen Faktoren und einem nanotopographischen Substrat auf die Zellfunktionen untersucht wird.<sup>[21,31,97]</sup> Zukünftige Experimente sollten viele unterschiedliche Zelltypen und Substrate einbeziehen, um die Allgemeingültigkeit der Befunde zu bestätigen. Gentechnische Veränderungen<sup>[102]</sup> und das Ausschalten von Genen mit siRNA<sup>[103]</sup> sind weitere Verfahren, mit denen man die Funktion bestimmter Organelen und Signalpfade bei den Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen untersuchen kann.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1. Zell-Nanotopographie-Signale

Die Zell-Nanotopographie-Wechselwirkungen könnten als alternativer Signaltransduktionsweg dienen, um Zellfunktionen präzise zu steuern. Zellen reagieren auf zahlreiche chemische, physikalische, mechanische und elektrische Reize. Die Entwicklung von Substraten für Zellen umfasst verschiedene dieser Faktoren in dem Versuch, die Wechselwirkungen zwischen der Zelle und dem Material zu nutzen, um das Zellschicksal<sup>[104]</sup> und die Zelldifferenzierung<sup>[105]</sup> zu beeinflussen oder eine genetische Veränderung<sup>[106]</sup> hervorzurufen. Nanotopographische Markierungen sind ein Teil der Substratentwicklung, mit dem sich viele Aspekte der Zellreaktion steuern lassen. Sie können relativ einfach auf großen Flächen aufgebracht werden und sind so auch für Zellkulturen in größerem Maßstab einsetzbar. Ein Zusammenwirken von löslichen Faktoren und der Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung könnte außerdem die Spezifität und Effizienz einer Zelllinien-spezifischen Stammzelldifferenzierung deutlich steigern.<sup>[22]</sup> Die Nanotopographie schließt andere Arten der Substratentwicklung nicht aus, denn entsprechende Strukturen können auf viele technische und biomedizinische Materialien aufgebracht werden, ohne die physikochemischen Grundeigenschaften des Materials spürbar zu beeinträchtigen. Daher ließe sich eine Nanotopographie bei-

spielsweise mit durch Mikrokontakt-Stempeln aufgebrachten chemischen Funktionen<sup>[107]</sup> und bestimmten mechanischen Eigenschaften des Substratmaterials kombinieren, um nur zwei weitere Faktoren zu nennen, die sich auf die Zell-Material-Wechselwirkung und somit auf Zellfunktionen auswirken.<sup>[13,104,105]</sup>

### 5.2. Nanotopographie in Grundlagenforschung und Entwicklung

Das Entwickeln von Substraten, um einen gewünschten Phänotyp und Genotyp von Zellen zu induzieren, ist ein potenziell wichtiger Prozess beim Design von Gerüsten für das „Tissue-Engineering“. Die Substratnanotopographie kann auch als Mittel genutzt werden, um komplexe Zellfunktionen wie Adhäsion, Migration, Umorganisation des Cytoskeletts und Zellpolarisation zu studieren. Substrate mit Nanorillen können zur Untersuchung der Kontaktführung und Migration in vitro dienen. Substrate mit Erhebungen oder Vertiefungen sind hilfreich zur Untersuchung der Dynamik der Filopodien, fokaler Adhäsionskomplexe und anderer Cytoskelettfunktionen unter bestimmten Bedingungen. In dem Maß, wie durch Nanotopographie neue Entdeckungen bei grundlegenden Zellfunktionen sichtbar werden, könnten Ingenieure diese wiederum als Grundlage für die Entwicklung synthetischer nanotopographischer Substrate der nächsten Generation nutzen. Mit diesen Fortschritten ließe sich der Einfluss der Zell-Nanotopographie-Wechselwirkung im Gebiet des „Tissue-Engineering“ schrittweise vergrößern.<sup>[108]</sup>

*Wir möchten zunächst die Arbeiten von Forschern anerkennen, die in diesem Kurzaufsatz nicht erwähnt werden konnten. Wir danken Sarah Tao und Joseph Charest für ihre Kommentare und Unterstützung beim Abfassen dieses Manuskripts. C.J.B. und J.T.B. wurden vom Charles Stark Draper Laboratory gefördert (DL-H-550154). C.J.B., R.L. und J.T.B. wurden von den National Institutes of Health gefördert (R01-DE-013023-06, P41 EB002520-01A1 und 1R01L076485-01A2). C.J.B. erhielt eine Charles Stark Draper Fellowship. Der Inhalt dieses Beitrags stimmt nicht notwendigerweise mit dem Standpunkt der US-Regierung überein.*

Eingegangen am 23. Oktober 2008  
Online veröffentlicht am 2. Juni 2009  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] S. L. Goodman, P. A. Sims, R. M. Albrecht, *Biomaterials* **1996**, 17, 2087.
- [2] G. A. Abrams, S. L. Goodman, P. F. Nealey, M. Franco, C. J. Murphy, *Cell Tissue Res.* **2000**, 299, 39.
- [3] E. Pamula, V. De Cupere, Y. F. Dufrene, P. G. Rouxhet, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 271, 80.
- [4] L. Bozec, G. van der Heijden, M. Horton, *Biophys. J.* **2007**, 92, 70.
- [5] K. Wolf, R. Muller, S. Borgmann, E. B. Bröcker, P. Friedl, *Blood* **2003**, 102, 3262.
- [6] J. Sutherland, M. Denyer, S. Britland, *J. Anat.* **2005**, 206, 581.
- [7] H. Haga, C. Irahara, R. Kobayashi, T. Nakagaki, K. Kawabata, *Biophys. J.* **2005**, 88, 2250.
- [8] P. Friedl, E. B. Bröcker, *Dev. Immunol.* **2000**, 7, 249.

- [9] P. Friedl, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 14.
- [10] R. D. Campbell, B. A. Marcum, *J. Cell Sci.* **1980**, *41*, 33.
- [11] E. W. Dent, F. B. Gertler, *Neuron* **2003**, *40*, 209.
- [12] R. G. Flemming, C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman, P. F. Nealey, *Biomaterials* **1999**, *20*, 573.
- [13] D. E. Discher, P. Janmey, Y.-l. Wang, *Science* **2005**, *310*, 1139.
- [14] Q. P. Pham, U. Sharma, A. G. Mikos, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1197.
- [15] F. Variola, J.-H. Yi, L. Richert, J. D. Wuest, F. Rosei, A. Nanci, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1285.
- [16] J. Y. Lim, J. C. Hansen, C. A. Siedlecki, R. W. Hengstebek, J. Cheng, N. Winograd, H. J. Donahue, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3319.
- [17] M. J. Dalby, M. O. Riehle, H. Johnstone, S. Affrossman, A. S. G. Curtis, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2945.
- [18] C. J. Bettinger, Z. Zhang, S. Gerecht, J. T. Borenstein, R. Langer, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 99.
- [19] C. J. Bettinger, B. Orrick, A. Misra, R. Langer, J. T. Borenstein, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2558.
- [20] J. Lu, M. P. Rao, N. C. MacDonald, D. Khang, T. J. Webster, *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 192.
- [21] S. Gerecht, C. J. Bettinger, Z. Zhang, J. Borenstein, G. Vunjak-Novakovic, R. Langer, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4068.
- [22] E. K. F. Yim, S. W. Pang, K. W. Leong, *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 1820.
- [23] X. Wang, C. A. Ohlin, Q. Lu, J. Hu, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2049.
- [24] E. Rebollar, I. Frischau, M. Olbrich, T. Peterbauer, S. Hering, J. Preiner, P. Hinterdorfer, C. Romanin, J. Heitz, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1796.
- [25] E. K. F. Yim, R. M. Reano, S. W. Pang, A. F. Yee, C. S. Chen, K. W. Leong, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5405.
- [26] C.-H. Choi, S. H. Hagvall, B. M. Wu, J. C. Y. Dunn, R. E. Beygui, C.-J. Kim, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1672.
- [27] L. Chou, J. D. Firth, V. J. Uitto, D. M. Brunette, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 1563.
- [28] A. I. Teixeira, G. A. Abrams, P. J. Bertics, C. J. Murphy, P. F. Nealey, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1881.
- [29] N. W. Karuri, S. Liliensiek, A. I. Teixeira, G. Abrams, S. Campbell, P. F. Nealey, C. J. Murphy, *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 3153.
- [30] B. A. Dalton, F. Walboomers, M. Dziegielewski, M. D. M. Evans, S. Taylor, J. A. Jansen, J. G. Steele, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *56*, 195.
- [31] A. M. Rajnicek, L. E. Foubister, C. D. McCaig, *Dev. Biol.* **2007**, *312*, 448.
- [32] J. D. Foley, E. W. Grunwald, P. F. Nealey, C. J. Murphy, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3639.
- [33] M. Biggs, R. Richards, N. Gadegaard, C. Wilkinson, M. Dalby, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 399.
- [34] D.-H. Kim, P. Kim, K. Y. Suh, A. Seung Kyu Choi, A. Sang Ho Lee, A. Byungkyu Kim in *IEEE Engineering in Medicine and Biology, 27th Annual Conference*, Shanghai, China, 1.-4. September **2005**, S. 4091-4095.
- [35] P. Kim, D. H. Kim, B. Kim, S. K. Choi, S. H. Lee, A. Khamhosseini, R. Langer, K. Y. Suh, *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2420.
- [36] M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. W. Wilkinson, R. O. C. Oreffo, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 997.
- [37] A. Hart, N. Gadegaard, C. Wilkinson, R. Oreffo, M. Dalby, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 1211.
- [38] M. J. Dalby, N. Gadegaard, C. D. W. Wilkinson, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *84*, 973.
- [39] M. J. Dalby, N. Gadegaard, M. O. Riehle, C. D. W. Wilkinson, A. S. G. Curtis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2005.
- [40] A. S. G. Curtis, N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, C. D. W. Wilkinson, G. A. Aitchison, *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2004**, *3*, 61.
- [41] M. T. Yang, N. J. Sniadecki, C. S. Chen, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 3119.
- [42] A. S. G. Curtis, B. Casey, J. O. Gallagher, D. Pasqui, M. A. Wood, C. D. W. Wilkinson, *Biophys. Chem.* **2001**, *94*, 275.
- [43] S. Nomura, H. Kojima, Y. Ohyabu, K. Kuwabara, A. Miyauchi, T. Uemura, *J. Artif. Organs* **2006**, *9*, 90.
- [44] S.-h. Hsu, C.-Y. Chen, P. S. Lu, C.-S. Lai, C.-J. Chen, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *92*, 579.
- [45] W. A. Loesberg, J. te Riet, F. C. M. J. M. van Delft, P. Schön, C. G. Figidor, S. Speller, J. J. W. A. van Loon, X. F. Walboomers, J. A. Jansen, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3944.
- [46] A. I. Teixeira, G. A. McKie, J. D. Foley, P. J. Bertics, P. F. Nealey, C. J. Murphy, *Biomaterials* **2006**, *27*, 3945.
- [47] J. Meyle, K. Gültig, W. Nisch, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 81.
- [48] L. Bozec, M. Horton, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4223.
- [49] K. A. Diehl, J. D. Foley, P. F. Nealey, C. J. Murphy, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2005**, *75*, 603.
- [50] S. Lenhert, M.-B. Meier, U. Meyer, L. Chi, H. P. Wiesmann, *Biomaterials* **2005**, *26*, 563.
- [51] T. Tzvetkova-Chevolleau, A. Stéphanou, D. Fuard, J. Ohayon, P. Schiavone, P. Tracqui, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1541.
- [52] M. J. Dalby, M. O. Riehle, S. J. Yarwood, C. D. W. Wilkinson, A. S. G. Curtis, *Exp. Cell Res.* **2003**, *284*, 274.
- [53] J. J. Norman, T. A. Desai, *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 89.
- [54] J. Y. Cheng, A. M. Mayes, C. A. Ross, *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 823.
- [55] R. Ruiz, R. L. Sandstrom, C. T. Black, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 587.
- [56] C. L. Haynes, R. P. V. Duyne, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5599.
- [57] A. Kosiorek, W. Kandulski, H. Glaczynska, M. Giersig, *Small* **2005**, *1*, 439.
- [58] C. N. LaFratta, L. Li, J. T. Fourkas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8589.
- [59] A. Pikulin, N. Bityurin, *Phys. Rev. B* **2007**, *75*, 195430.
- [60] H. J. In, S. Kumar, Y. Shao-Horn, G. Barbastathis, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 083104.
- [61] K. Seunarine, D. O. Meredith, M. O. Riehle, C. D. W. Wilkinson, N. Gadegaard, *Microelectron. Eng.* **2008**, *85*, 1350.
- [62] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 568; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 550.
- [63] A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard, E. Delamarche, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1067.
- [64] C. C. Lin, C. C. Co, C. C. Ho, *Biomaterials* **2005**, *26*, 3655.
- [65] E. Kim, Y. Xia, X. M. Zhao, G. M. Whitesides, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 651.
- [66] D. T. Chiu, N. L. Jeon, S. Huang, R. S. Kane, C. J. Wargo, I. S. Choi, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2408.
- [67] K. Torigoe, H.-F. Tanaka, A. Takahashi, A. Awaya, K. Hashimoto, *Exp. Neurol.* **1996**, *137*, 301.
- [68] C. L. E. Nijst, J. P. Bruggeman, J. M. Karp, L. Ferreira, A. Zumbuehl, C. J. Bettinger, R. Langer, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3067.
- [69] C. J. Bettinger, J. P. Bruggeman, J. T. Borenstein, R. S. Langer, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2315.
- [70] J. P. Bruggeman, C. J. Bettinger, C. L. E. Nijst, D. S. Kohane, R. Langer, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1922.
- [71] L. R. Ellingsworth, F. DeLustro, J. E. Brennan, S. Sawamura, J. McPherson, *J. Immunol.* **1986**, *136*, 877.
- [72] M. I. García-Domingo, J. Aljofat-Reig, A. Cisteró-Bahima, F. Tresserra, E. Enrique, *J. Investig Allergol. Clin. Immunol.* **2000**, *10*, 107.
- [73] Y. Wang, G. A. Ameer, B. J. Sheppard, R. Langer, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 602.
- [74] J. P. Bruggeman, B. J. de Bruin, C. J. Bettinger, R. Langer, *Biomaterials* **2008**, *29*, 4726.

- [75] Y. Wang, Y. M. Kim, R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *66*, 192.
- [76] C. J. Bettinger, J. P. Bruggeman, J. T. Borenstein, R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.* **2008**, DOI: 10.1002/jbm.a.32306.
- [77] A. Mahdavi, L. Ferreira, C. Sundback, J. W. Nichol, E. P. Chan, D. J. D. Carter, C. J. Bettinger, S. Patanavanich, L. Chignozha, E. Ben-Joseph, A. Galakatos, H. Pryor, I. Pomerantseva, P. T. Masiakos, W. Faquin, A. Zumbuehl, S. Hong, J. Borenstein, J. Vacanti, R. Langer, J. M. Karp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2307.
- [78] C. J. Bettinger, K. M. Kulig, J. P. Vacanti, R. Langer, J. T. Borenstein, *Tissue Eng.* **2008**, *14*, 1.
- [79] D. Hamilton, K. Wong, D. Brunette, *Calcif. Tissue Int.* **2006**, *78*, 314.
- [80] R. Kemkemer, S. Jungbauer, D. Kaufmann, H. Gruler, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4701.
- [81] M. J. Dalby, M. O. Riehle, D. S. Sutherland, H. Agheli, A. S. G. Curtis, *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83*, 159.
- [82] C. Oakley, D. M. Brunette, *J. Cell Sci.* **1993**, *106*, 343.
- [83] J. L. Tan, W. Liu, C. M. Nelson, S. Raghavan, C. S. Chen, *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 865.
- [84] Y. Ito, *Biomaterials* **1999**, *20*, 2333.
- [85] J. Y. Lim, H. J. Donahue, *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 1879.
- [86] H. K. Song, B. Toste, K. Ahmann, D. Hoffman-Kim, G. T. R. Palmore, *Biomaterials* **2006**, *27*, 473.
- [87] A.-S. Andersson, P. Olsson, U. Lidberg, D. Sutherland, *Exp. Cell Res.* **2003**, *288*, 177.
- [88] A. Pierres, A.-M. Benoliel, D. Touchard, P. Bongrand, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4114.
- [89] B. Wójciak-Stothard, A. S. Curtis, W. Monaghan, M. McGrath, I. Sommer, C. D. Wilkinson, *Cell Motil. Cytoskeleton* **1995**, *31*, 147.
- [90] B. Wójciak-Stothard, A. Curtis, W. Monaghan, M. McGrath, I. Sommer, C. Wilkinson, *Cell Biol. Int.* **1995**, *19*, 1861.
- [91] X. F. Walboomers, W. Monaghan, A. Curtis, J. A. Jansen, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *46*, 212.
- [92] M. Nemethova, S. Auinger, J. V. Small, *J. Cell Biol.* **2008**, *180*, 1233.
- [93] C. G. Galbraith, K. M. Yamada, J. A. Galbraith, *Science* **2007**, *315*, 992.
- [94] A. Hall, *Science* **1998**, *279*, 509.
- [95] A. B. Jaffe, A. Hall, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 247.
- [96] E. Tzima, *Circ. Res.* **2006**, *98*, 176.
- [97] M. J. Dalby, A. Hart, S. J. Yarwood, *Biomaterials* **2008**, *29*, 282.
- [98] P. Uttayarat, G. K. Toworfe, F. Dietrich, P. I. Lelkes, R. J. Composto, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2005**, *75*, 668.
- [99] R. Wang, R. A. F. Clark, D. F. Mosher, X.-D. Ren, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28803.
- [100] S. Jungbauer, H. Gao, J. P. Spatz, R. Kemkemer, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3470.
- [101] A. Bershadsky, M. Kozlov, B. Geiger, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 472.
- [102] D. Putnam, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 439.
- [103] A. Mullard, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 513.
- [104] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, *Science* **1997**, *276*, 1425.
- [105] R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, C. S. Chen, *Dev. Cell* **2004**, *6*, 483.
- [106] H. J. Kong, J. Liu, K. Riddle, T. Matsumoto, K. Leach, D. J. Mooney, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 460.
- [107] J. L. Charest, M. T. Eliason, A. J. Garcia, W. P. King, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2487.
- [108] A. Khademhosseini, C. Bettinger, J. M. Karp, J. Yeh, Y. Ling, J. Borenstein, J. Fukuda, R. Langer, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 1221.