Schlussbericht

Zuwendungsempfänger: **Förderkennzeichen:**

Institut für Polymerforschung Dresden e.V. 03N4014/8

Vorhabensbezeichnung:

Substratinduzierte Veränderungen von Zellen im Kontakt mit Polymermaterialien

Laufzeit:

01.10. 1999- 31.09. 2002

Berichtszeitraum:

01.10. 1999- 31.09. 2002

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Durch das Projekt sollte vor dem Hintergrund aktueller medizintechnischer Entwicklungen eine analytische Strategie zur umfassenden Charakterisierung substratinduzierter Eigenschaftsveränderungen von Zellen im direkten Kontakt mit polymeren Materialien etabliert werden.

Für die detaillierte Untersuchung von Prozessen, die auf zellulärer Ebene durch die Wechselwirkung eines Biosystems mit Werkstoffgrenzflächen hervorgerufen werden, sind einerseits biophysikalische Methoden wie mikromechanische Adhäsionsmessungen und spezielle Mikroskopien geeignet. Mit den in der klinischen Forschung etablierten Verfahren der auf der Durchflusszytometrie beruhenden Zellfunktionsdiagnostik sowie mit der molekularbiologischen Untersuchung der Genexpression sind darüber hinaus inzwischen sehr aussagekräftige Methoden verfügbar, die eine molekulare Differenzierung von zellulären Zuständen gestatten. Diese Methoden fließen jedoch bisher noch nicht im möglichen und erforderlichen Umfang in die Entwicklung von innovativen medizintechnischen Produkten ein.

Die Nutzung des komplementären Charakters biophysikalischer und cytometrischer Methoden durch den kombinierten Einsatz bei der Aufklärung von Schlüsselfragen des *Biosurface Engineering* stand bisher noch weitgehend aus.

Ziel des Vorhabens war es daher, biophysikalische und cytometrische Methoden zur Charakterisierung von Zellen als Instrumente der Materialselektion für spezielle medizintechnische Anwendungen weiter zu erschließen und exemplarisch für die Klärung einer ausgewählten, anwendungsübergreifend bedeutsamen Fragestellung zur Steuerung grenzflächenassoziierter Zellen an mikrostrukturierten Polymersubstraten heranzuziehen.

Dabei sollte insbesondere die Wirkung von an den Polymersubstraten aus Biofluids präadsorbierten Proteinen -und deren Verankerung an der Materialgrenzfläche- auf die Eigenschaften von Zellen berücksichtigt werden.

Das Ziel des Projektes wurde ausdrücklich jenseits der Klärung einer Einzelfrage bei der Etablierung eines umfassenden analytischen Ansatzes zur Bewertung substratinduzierter Veränderungen von Zellen definiert.

Das Projektziel soll erreicht werden indem exemplarisch die systematische Untersuchung einer anwendungs- und zelltypübergreifend wichtigen Fragestellung zum Einfluss polymerer Substrate auf Zellzustandsänderungen thematisiert und durch das zu etablierende Methodenspektrum umgesetzt wird.

Das Projektziel sollte erreicht werden indem die systematische Untersuchung einer anwendungs- und zelltypübergreifend wichtigen Fragestellung zum Einfluss polymerer Substrate auf Zellzustandsänderungen thematisiert und durch das zu etablierende Methodenspektrum umgesetzt wurde. Dazu sollten folgende Teilaufgaben bearbeitet werden:

1. Präparation und umfassende physikalisch-chemische Charakterisierung von adhäsiv/nichtadhäsiv mikrostrukturierten Polymersubstraten als Dünnschichten auf Glasträgern (lokalisierte polymeranaloge Umsetzung von Maleinsäureanhydrid-Copolymeren mit Hilfe der Microcontactprinting-Technik)
2. Inkubation der Polymersubstrate mit kultivierten Zellen (Endothelzellen)
3. Analyse der auf den Polymersubstraten aus dem Medium abgeschiedenen Protein-Adsorptionsschichten
4. Mikromechanische Charakterisierung der Zelladhäsion an funktionalisierten Polymersubstraten durch die Kombination von Rastersondenmikroskop und konfokalem Fluoreszenzmikroskop
5. Zytometrische Charakterisierung von durch den Kontakt zu Polymersubstraten induzierten zellulären Eigenschaftsveränderungen
6. Molekularbiologische Charakterisierung von durch den Kontakt zu Polymersubstraten induzierten zellulären Eigenschaftsveränderungen

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die durch den Antragsteller geleitete Arbeitsgruppe war bereits seit mehreren Jahren auf dem Gebiet der Charakterisierung von biomedizinisch relevanten Grenzflächenphänomenen an Polymerwerkstoffen tätig und beschäftigte sich hier auch intensiv mit der zellulären Ebene der Wechselwirkungen zwischen Materialien und Biosystemen. Zur Präzisierung der präparativen Zielstellungen für hämokompatible Grenzflächen wurden grundlagenorientierte Untersuchungen zu biokompatibilitätsbedingenden Primärprozessen zwischen Blutkomponenten und

Polymergrenzflächen durchgeführt, wobei initiale Prozesse der Blutgerinnung im Mittelpunkt der Forschungen standen. Die Kompetenz des IPF auf dem Gebiet der physikalisch-chemischen Charakterisierung von Grenzflächeneigenschaften und -phänomenen an Polymeren bietet hierfür gute Möglichkeiten. In Ergänzung dieser infrastrukturellen Voraussetzung wurden Speziallabors zur Durchführung von *in vitro* Hämokompatibilitätstests mit humanem Vollblut sowie für die Materialbewertung durch Zellkulturen und biophysikalische bzw. cytometrische Messungen aufgebaut. Bisher verfolgte Strategien zur Grenzschichtgestaltung von biokompatiblen Materialien beruhen insbesondere auf der oberflächenselektiven Biofunktionalisierung von Polymeren, durch die hämokompatible Grenzflächen erhalten werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Es wurden -ergänzend zur grenzflächenanalytischen Ausstattung der bearbeitenden Einrichtung- verschiedene moderne Methoden für die Charakterisierung von Proteinen und Zellen etabliert. Die an einem exemplarischen System erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass durch die physikochemische Modulation biomolekularer Signale an Polymergrenzflächen wertvolle Möglichkeiten für die Steuerung der Eigenschaftsprofile von adhärenten Zellen bestehen.

Es konnte insbesondere verdeutlicht werden, dass die Verankerungsform von an Materialoberflächen immobilisierten Komponenten der extrazellulären Matrix -wie Fibronectin- die Adhäsion von Endothelzellen und deren Ausbildung charakteristischer Zell-Matrix-Strukturen signifikant beeinflussen kann. Die Ergebnisse des Projektes wurden umfassend publiziert (s. Publikationsliste, Anlage) und beruhen im einzelnen auf:

- der Etablierung einer Plattform-Technologie zur Funktionalisierung von Festkörperoberflächen durch Poly(ocatdecen-*alt*-maleinsäureanhydrid)- und Poly(propen-*alt*-maleinsäureanhydrid)-Dünnschichten,
- der Mikrostrukturierung (μ-contact-printing) dieser reaktiven Dünnschichten durch die reaktive Übertragung proteinresistenter Moleküle (aminterminierte PEO),
- der eingehenden Charakterisierung der oberflächenselektiven Modifizierungen der Polymersubstrate durch ein umfassendes Spektrum grenzflächenanalytischer Verfahren (XPS, ATR-FTIR, Ellipsometrie, Zeta-Potential- und Benetzungsmessungen, AFM),

- der quantitativen Charakterisierung proteinbeschichteter Polymeroberflächen, für die chromatographische Verfahren etabliert und routinemäßig herangezogen wurden (Aminosäureanalyse nach saurer Hydrolyse HPLC, Fluoreszenzdetektion zur Quantifizierung von grenzflächengebundenen Proteinen; Massendetektion von Proteinen bzw. Proteinfragmenten mit Hilfe eines Elektrospray-Time-of-Flight-Systems),
- der mikromechanischen Charakterisierung der Adhäsion von Zellen an funktionalisierten Polymersubstraten durch die Kombination von Rastersondenmikroskop und konfokalem Fluoreszenzmikroskop,
- der Etablierung von Immunofärbetechniken zur Charakterisierung von Endothelzellen (Zellskelett, fokale und fibrilläre Adhäsionskontakte, Matrixproteine) durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie,
- der Anwendung von Durchflusszytometrie, Laser Scanning Cytometrie (zur analogen Untersuchung adhärenter Zellen) und cytogenetischer Analysetechniken.

Die aufgrund der begrenzten Personalkapazität hier vorwiegend auf die Etablierung der analytischen Methoden bezogenen Arbeiten konnten in angeschlossenen, z. Zt. laufenden Vorhaben vielfältig weitergeführt und insbesondere in Untersuchungen zur Entwicklung von Kulturträgern für Knochenmark-Stammzellen adulter Spender genutzt werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Polymere Materialien machen einen erheblichen Anteil der in innovativen medizintechnischen Systemen applizierten Werkstoffe aus. Durch die Möglichkeit der weitgehenden Variation von chemischen und physikalischen Eigenschaften bietet diese Materialfamilie das Potential zur Anpassung der Werkstoffe an die Wechselwirkungsmöglichkeiten des biologischen Organismus[1]. Primärprozesse beim Kontakt jedes Medizinprodukts mit dem biologischen Milieu der Anwendung sind Wechselwirkungen von Proteinen, Zellen und Mikroorganismen mit der Materialoberfläche.

Der Schlüssel zu biokompatiblen Materialien liegt also in der Gestaltung der Materialoberfläche[2]. Eine präzise Zuordnung der für Kompatibilitätsprobleme wichtigen

---

1 T. Tsuruta, T. Hayashi, K. Kataoka, K. Ishihara, Y. Kimura: Biomedical Applications of Polymeric Materials. CRC Press, Boca Raton, 1993

2 J.L.Brash, P. Wojchieowski (eds.) *Interfacial phenomena and bioproducts*. New-York: Marcel Dekker, 1996;

Grenzflächencharakteristika des Materials gelingt jedoch bisher nur in Ansätzen. Als Einflussfaktoren für Grenzflächen-Wechselwirkungen zwischen Materialien und Zellen wurden elektrische Ladung, Hydrophobizität, Mobilität und Domänenstruktur der Materialgrenzfläche sowie die Adsorption von Proteinen diskutiert. Proteinadsorption und Zelladhäsion sind in der Anwendungssituation von Biomaterialien eng verknüpft: Proteine können, an der Materialoberfläche adsorbiert, die Adhäsion von Zellen, deren Membranen diese Proteine spezifisch bindende Rezeptoren enthalten, stimulieren[3]. Adhärierende Zellen können selbst Proteine freisetzen, die an die Materialoberfläche adsorbiert werden[4]. Die Expression von zellulären Rezeptoren[5], die Proliferation und Differenzierung sowie weitere Formen der Eigenschaftsveränderung von Zellen können durch die von adsorbierten Proteinen initialisierten systemischen Reaktionskaskaden reguliert werden.

Für das exemplarisch zu charakterisierende System ist relevant dass kürzlich anhand von durch die Imprinting-Technik mikrostrukturierten Alkanthiolschichten gezeigt werden konnte, dass Ausdehnung und geometrische Anordnung adhäsiv modifizierter Flächenelemente auf einem anti-adhäsiven Hintergrund signifikant die Überlebensrate kultivierter Endothelzellen beeinflussen[6]. Dabei wurde postuliert, dass die bei Verbrückung über Integrine (Bindung an Collagen I, Fibronectin, Vitronectin) für bestimmte Templatstrukturen gefundene Apoptosetendenz durch die mit dem adhäsiven Templat induzierte Gestaltsänderung der Zelle in eine eher sphärische Form hervorgerufen wird. Die Übersetzung des als veränderte Beanspruchung des Cytoskeletons gegebenen mechanischen Signals[7] in einen intrazellulären biochemischen Reaktionsablauf ist bisher noch nicht verstanden.

Ein großer Teil der Studien zur Bewertung der Wirkung von Materialeigenschaften auf Zellen in einem angrenzenden Biosystem beschränkt sich auf Toxizitätstests und die mikroskopische Inspektion der Grenzfläche hinsichtlich Zahl und Gestalt der adhärierenden Zellen wobei oft eine qualitative Interpretation der Zellgestalt angeschlossen wird.

B.D. Ratner *J. Biomed. Mat. Res.* **27**, 837 (1993); M. Ragaller, C. Werner, J. Bleyl, S. Adam, H.-J. Jacobasch, D.M. Albrecht, *Kidney Intern.* **64** (1998) 84

3 R.P. Lanza, R. Langer, W. L. Chick (Hrsg.): Principles of Tissue Engineering. Academic Press, San Diego, 1997

4 D.F. Mosher (Hrsg.): Fibronectins. Springer, Heidelberg, 1990

5 D.A. Lauffenburger, J.J. Linderman: Receptors: Models for Binding, Trafficking, and Signaling. Oxford University Press, New York, 1993

6 C.S. Chen et al., *Science* **276** (1997), 1428

7 D.E. Ingber, *Annu. Rev. Phys.* **59** (1997), 575; S.M. Frisch et al., *J. Cell Biol.* **134** (1996), 793

Zur weiterführenden biophysikalischen Charakterisierung der Zelladhäsion können die mechanische Beanspruchbarkeit des adhäsiven Kontaktes und die Struktur der Kontaktzone untersucht werden[8]. Neuere Entwicklungen auf der Basis der Mikropipetten-Aspirationstechnik gestatten die mikromechanische Quantifizierung der adhäsiven Wechselwirkung zwischen Zelle und Substrat[9]. Hier liegt ein erhebliches Potential in der erweiterten Nutzung der Rasterkraftmikroskopie[10]. Entsprechende Experimente werden derzeit jedoch noch nahezu ausschließlich im Bereich biophysikalischer Grundlagenuntersuchungen genutzt[11]. In der Praxis der Materialevaluierung werden meist Scherexperimente angewandt[12].

Das Prinzip der Durchfluss[13]- und Laser Scanning Cytometry[14] erlaubt eine sehr gut statistisch abgesicherte Bewertung von Zellzuständen wie Zellzyklus, Proliferation, Apoptose, Rezeptorstatus. Dies wird mit Hilfe von Fluoreszenzfärbungen bzw. Immunofluoreszenz realisiert. Während Durchlusscytometry das Vorliegen suspendierter Zellen erfordert basiert Laser-Scanning- Cytometry auf Mikroskopie-Slides und kann daher an adhärenten Zellen bzw. auch an Gewebsschnitten ausgeführt und mit der mikroskopischen Inspektion ausgewählter Zellen kombiniert werden. Zu den cytometrischen Methoden ist auch die als Image-Cytometry bezeichnete Laser Scanning Mikroskopie zu zählen. Dieses Verfahren vermag in der Regel keine vergleichbar hohe Zahl von Zellen zu untersuchen, ist jedoch für die Aufklärung subzellulärer Strukturen gut geeignet. Während die in der biomedizinischen Forschung relativ verbreiteten Verfahren Laser Scanning Mikroskopie und Durchfluss-Cytometry auch bereits mehrfach für die Bewertung materialinduzierter Eigenschaftsveränderungen von Zellen herangezogen wurden[15,16] ist die Anwendung der Laser Scanning Cytometry für diesen Zweck noch neu.

Auch über die Analyse der Genexpression kann der Zustand von Zellen beschrieben werden. Während molekularbiologische Untersuchungen in der medizinischen Forschung

---

8 A.S.G. Curtis, J.M. Lackie: Measuring Cell Adhesion. Wiley, New-York, 1991

9 C. Werner „Mikromechanische Charakterisierung der Zelladhäsion an Polymergrenzflächen“, Dissertation, TU Dresden 1999

10 *Vorrichtung und Verfahren zur mikromechanischen Untersuchung der Bakterienadhäsion*, Patentanmeldung 05/98, Werner, C.; Kunz, R.; Körber, H.; Weidenhammer, P.; Schmitt, F.-J.

11 D.A. Simson, P. Ziemann, M. Strigl, R. Merkel, *Biophys. J.* **74** (1998), 345

12 P. André, C. Capo, A.M. Benoliel, P. Bongrand, F. Rouge, C. Aubert, *Cell Biophys* **17** (1990), 163

13 H.M. Shapiro: Practical Flow Cytometry, Wiley-Liss 1995

14 F. Amblard, C. Auffray, R. Sékaly, A. Fischer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91** (1994), 3628, L.A. Kametsky, L.D. Kametsky, J.A. Fletcher, A. Kurose, K. Sasaki, *Cytometry* **27 (**1997), 117

15 T.G. van Kooten, C.L. Klein, M. Wagner, C.J. Kirckpatrick, *J. Biomed. Mater. Res.* **46** (1999) 33

16 T. Fabre, F. Belloc, B. Dupuy, M. Schappacher, A. Soum, J.- Bertrand-Barat, C. Baquey, A. Durandeau, *J. Biomed. Mater. Res*. **44** (1999) 429

insgesamt inzwischen sehr häufig Anwendung finden ist die Zahl entsprechender Arbeiten im Zusammenhang mit der Bewertung von Materialeigenschaften noch gering. Es konnte jedoch deutlich gezeigt werden, dass durch die Evaluation der Expression von messenger-RNA wertvolle Information über den Status von Makrophagen (IL-1-beta-mRNA) und anderen immunkompetenten Zellen gewonnen werden können[17]. Dabei wurde bisher immer das Prinzip der RT-PCR (Revers-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion) angewandt. Die mit der cytometrischen Charakterisierung verbundene Anwendung molekularzytogenetischer (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung[18]) wurde zur Untersuchung der materialinduzierten Veränderungen der DNA von immunkompetenten Zellen (inflammatorische Antwortreaktion) oder zur Untersuchung anderer (z.B. mutagener) Einflüssen der Gewebe-Material-Interaktion noch nicht angewandt, stellt jedoch eine aussichtsreiche Option dar.

Eine grundsätzliche Limitation der Mehrzahl der bisher dokumentierten Untersuchungen zu Eigenschaftsveränderungen von mit Materialgrenzflächen assoziierten Zellen ist durch die Beschränkung auf ein analytisches Verfahren gegeben. Bei der Bewertung des Substrateinflusses ist jedoch die Anwendung komplementärer Methoden, die Informationen über die Stärke der adhäsiven Wechselwirkung zwischen Zelle und Substrat, über Zell-Zyklus, Proliferation, Differenzierung und Rezeptorstatus sowie über Veränderungen der Genexpression liefern, als sinnvoll und teilweise unabdingbar für das Verständnis des komplexen Wechselwirkungsmechanismus zwischen Biosystem und Werkstoff anzusehen. Dabei kommt auch der Kenntnis von durch Proteinadsorption an der Materialgrenzfläche hervorgerufenen Effekten hinsichtlich der Aktivierung von systemischen Kaskadenreaktionen und der Stimulation der Adhäsion über fokale Kontakte erhebliche Bedeutung zu[19].

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Mit dem Projekt konnten neue Möglichkeiten zur gezielten Entwicklung von Zellkulturträgern auf der Basis von oberflächenfunktionalisierten polymeren Materialien geschaffen werden, die laufende Forschungsvorhaben auf dem Gebiet des Tissue Engineering nachhaltig unterstützen werden. Dazu konnte die im Rahmen des Projektes

---

17 A. Kishida, S. Kato, K. Ohmura, A. Sugimura, M. Akashi, *Biomaterials* 17 (1996) 1301; H. Zreiquat, B. Markovic, W.R. Walsh, C.R. Howlett, *J. Biomed. Mater. Res*. 33 (1996) 217

18 R. Ekong, J. Wolfe, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (1998)19

erweiterte Kompetenz der ausführenden Einrichtung in Verbundprojekten mit Partnern an der Technischen Universität Dresden/ Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien Dresden und in Industrieunternehmen (BMBF-Kompetenzzentrum für Biomaterialien im Blut- und Gewebekontakt, InnoRegio-Projekt BiologieMedizinTechnik-BioMeT Dresden u.a.) eingebracht werden.

[19] M. Malmsten, *Biopolymers at Interfaces*, M. Dekker, Inc. (1998)

II. Eingehende Darstellung

1. Erzielte Ergebnisse

Ergebnisse des Projektes werden nachfolgend in der Gliederung des Arbeitsplans zusammengefasst:

1. Präparation und umfassende physikalisch-chemische Charakterisierung von Polymersubstraten als Dünnschichten auf Glasträgern (polymeranaloge Umsetzung von Maleinsäureanhydrid-Copolymeren, zur Erzeugung von adhäsiv-antiadhäsiven Mikrostrukturen auch lokalisiert mit Hilfe der Mikroimprinting-Technik)

Als exemplarische Polymersubstrate wurden ultradünne Filme von alternierenden Maleinäureanhydrid-Copolymeren auf Glas oder Si-Wafer präpariert. Diese Schichten könne durch die hohe Reaktivität der Anhydridgruppe gegenüber Aminen vielseitig funktionalisiert werden. Neben Octadecen-Copolymeren wurden auch Propen-, Styren- und N-Vinylpyrrolidon-Copolymere des Maleinsäureanhydrids für die Untersuchungen herangezogen wodurch vorteilhaft eine Variation der physikochemischen Eigenschaften der Polymerfilme (insbesondere bezüglich Hydrophilie und Funktionalisierungsdichte) zur Funktionalisierung als Zellkulturträger erreicht werden konnte (Abbildung 1).

Die Polymersubstrate wurden umfassend charakterisiert (XPS, ATR-FTIR, Ellipsometrie, Zeta-Potential- und Benetzungsmessungen, AFM). Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1 exemplarisch für Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid), Poly(styren *alt* maleinsäureanhydrid) und Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid) zusammengefasst, in Abbildung 2 werden mit Hilfe einer Kraftfeld-Methode (Universal 1.02/ Accelrys Software) erhaltene Molekülmodelle für die Wiederholeinheiten wiedergegeben, die die unterschiedlichen Verhältnisse der polaren und unpolaren Gruppen verdeutlichen.

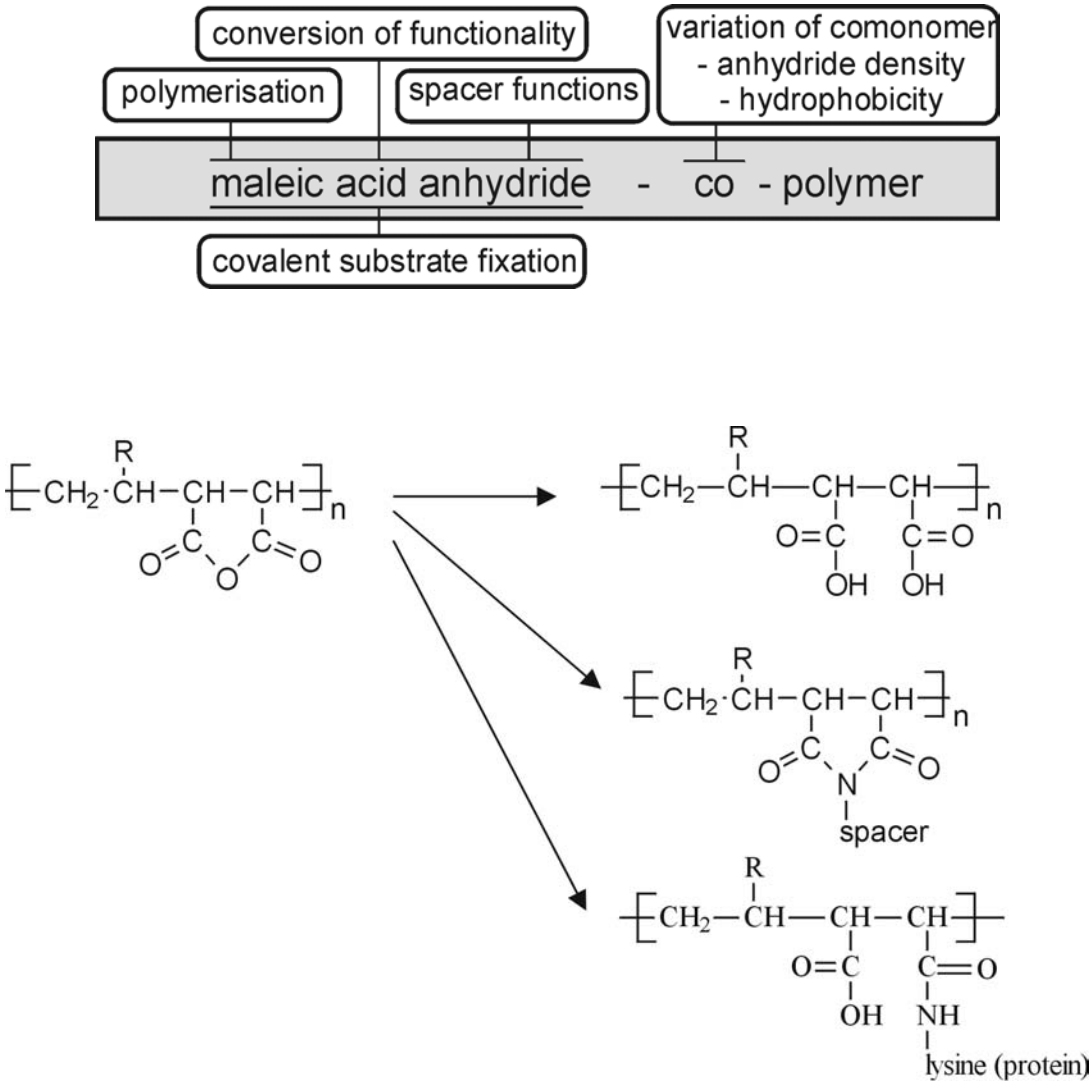


Abbildung 1: Schematische Übersicht zu Eigenschaften und Funktionalisierungs-möglichkeiten der verwendeten Polymersubstrate

Um den Einfluss der Verankerung von Extrazellulärer Matrix an Polymer-Kulturträgern auf die Ausbildung von Zell-Matrix-Adhäsionskontakten von Endothelzellen zu untersuchen wurde an Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid)-, und Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid)-Dünnschichten Fibronectin aus der Lösung immobilisiert. Dabei wurden jeweils Polymerfilme in der Anhydrid- und in der Disäure-Form (nach Hydrolyse) verwendet so dass kovalente (Anhydridform) und adsorptive (Disäureform) Immobilisierung des Proteins verglichen werden konnten. (Ergebnisse der Proteinquantifizierung sind unter 3. zusammengefasst.)

	Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid)	Poly(styren *alt* maleinsäureanhydrid)	Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid)
Schichtdicke (± 0.5 nm) (Ellipsometrie)	3.5 nm	5.8 nm	3.5 nm
RMS Rauhigkeit (AFM)	0.32 nm	0.30 nm	0.34 nm
Anhydrid-Oberflächen-konzentration (XPS)	6 x 10^{13} cm^{-2}	8 x 10^{13} cm^{-2}	1 x 10^{14} cm^{-2}
Wasser-Kontakt-winkel (± 3°)	100°	75°	52°
Isoelektrischer Punkt (pH, in 1mM KClaq)	3.2	2.0	1.9

Tabelle 1: Übersicht zu Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid)-, Poly(styren *alt* maleinsäureanhydrid)- und Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid)-Dünnschichten präpariert aus THF-Lösungen auf Si-Wafern (Schichtdicke 3-5 nm)

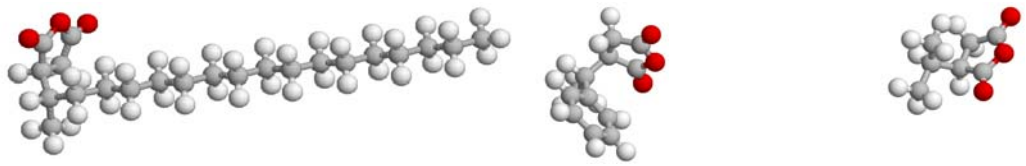


Abbildung 2: Molekülmodelle der Wiederholeinheiten von Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid) (links), Poly(styren *alt* maleinsäureanhydrid) (Mitte) und Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid) (rechts)

Experimente zur lokalisierten polymeranalogen Umsetzung von Maleinsäureanhydrid-Copolymer-Dünnschichten mit Hilfe der Microcontact-printing-Technik dienten der adhäsiv-antiadhäsiven Mikrosegmentierung der Polymerfilme wobei primär Amin-terminierte Poly(ethylenglycole) übertragen und anschließend Adhäsionsproteine auf den nicht umgesetzten Oberflächenbereichen immobilisiert wurden (Abbildung 3).

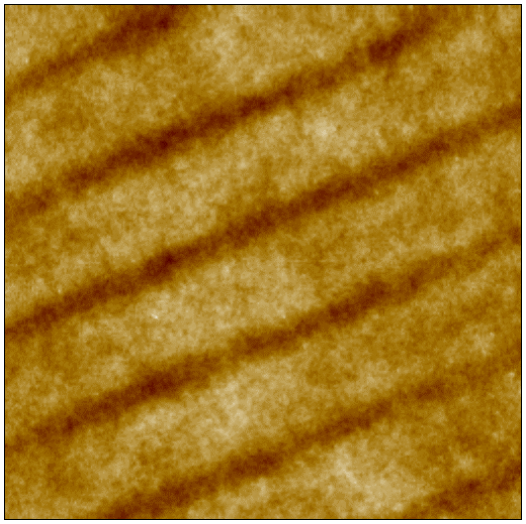


Abbildung 3: AFM-Aufnahme eines mikrosegmentierten Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid)-Films (breitere Streifen- 15µm- umgesetzt mit aminterminiertem PEG)

2. Inkubation der Polymersubstrate mit kultivierten Zellen (Endothelzellen)

Für die Kultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene auf den Polymersubstraten wurde eine Methode der Präparation der entsprechenden Frischzellen am IPF etabliert, die sich an die von Weis et al. [Weis JR; Sun B; Rodgers BM, *Thromb Res* **61** (1991)171] beschriebene Prozedur anlehnt.

Die Adhäsion von Endothelzellen auf in der unter 1. beschriebenen Weise mikrostrukturierten Substraten ergab eine sehr deutlich ausgeprägte Orientierung der Zellen auf den adhäsiven Segmenten der Polymerfilme (Abbildung 4). In time-lapse Experimenten (Kultur unter lichtmikroskopischer Beobachtung) konnte die Migration der Zellen auf mikrosegmentierten Oberflächen verfolgt werden. Dabei ergaben sich Hinweise auf eine von der Segmentdimensionierung abhängigen Mobilität der Zellen.

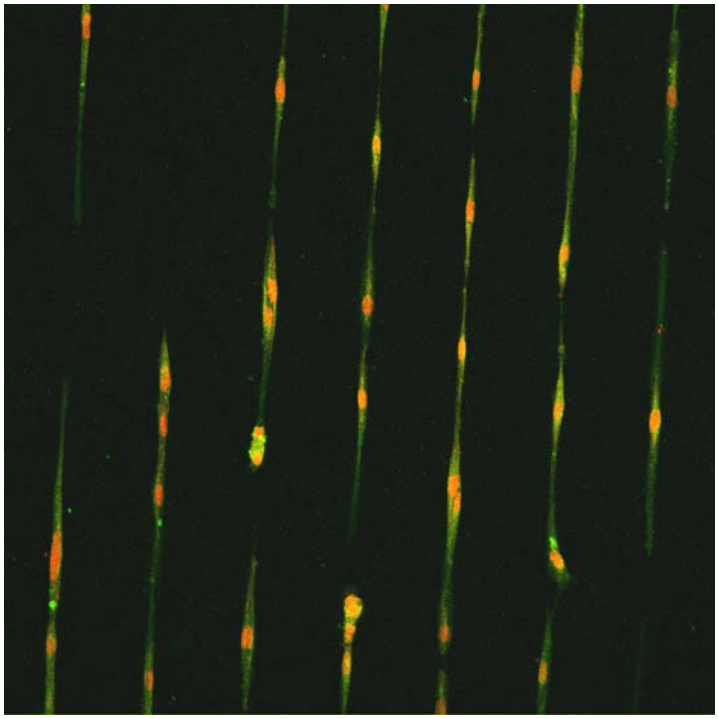
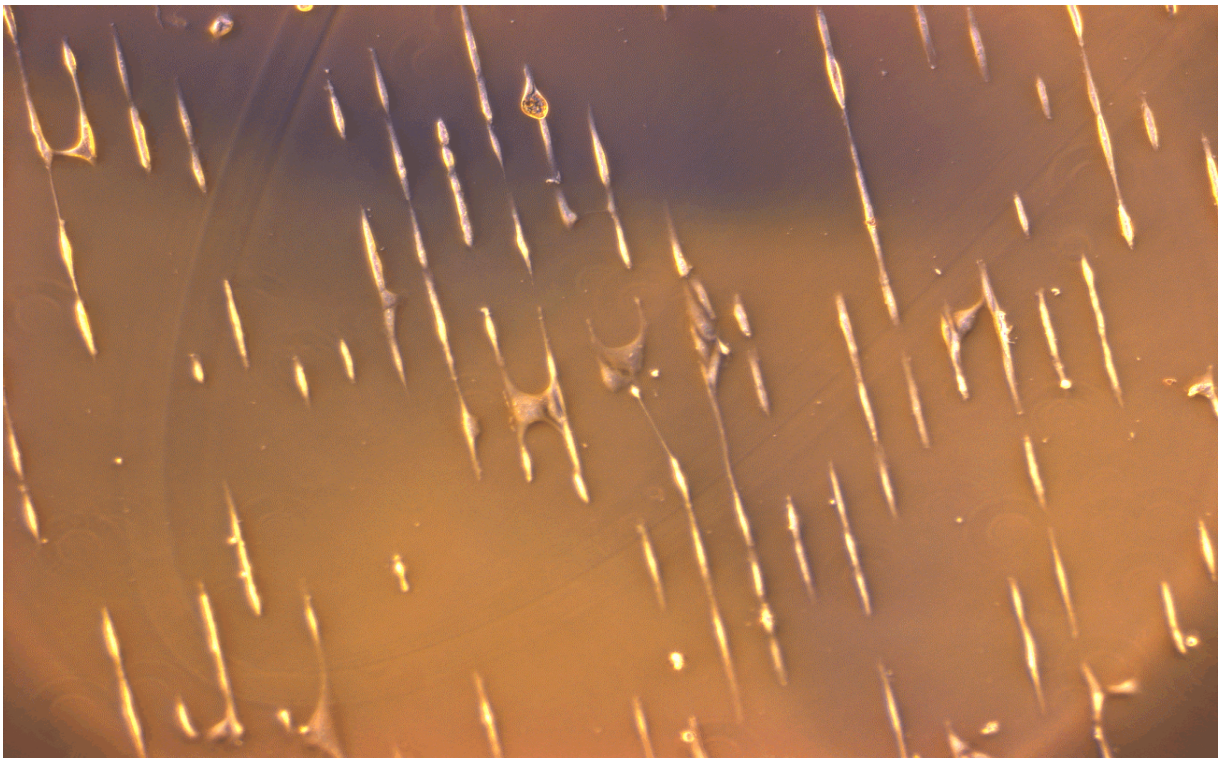


Abbildung 4: Endothelzellen auf adhäsiv-antiadhäsiv mikrosegmentierten Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid)-Filmen (antiadhäsive Streifen- 15µm- umgesetzt mit aminterminiertem PEG, adhäsive Streifen ca. 5µm erzeugt durch Fibronectin-Adsorption)
oben: Konfokale Fluorsezenzmikroskopie (Färbung von Kern –rot und Zytoplasma – grün), unten: lichtmikroskopische Aufnahme (Teil einer Bildsequenz)



3. Analyse der auf den Polymersubstraten abgeschiedenen Protein-Adsorptionsschichten

Das zur quantitativen Charakterisierung der proteinbeschichteten Polymeroberflächen etablierte HPLC-System (Aminosäuretrennung und -nachweis nach saurer Hydrolyse und Fluoreszenzdetektion) wurde anhand der in Zelladhäsionsexperimenten vorzugsweise verwendeten Proteine Serumalbumin, Fibronectin und Collagen I validiert (Abbildung 5 gibt ein Beispiel für die Aminosäureanalyse von HSA nach Adsorption an verschiedenartige Oberflächen). Systematische Fehler in der Proteinbestimmung konnten auf die Hydrolysebedingungen sowie auf die Retentionscharakteristik des chromatographischen Systems zurückgeführt und durch die Optimierung dieser Prozessschritte minimiert werden.

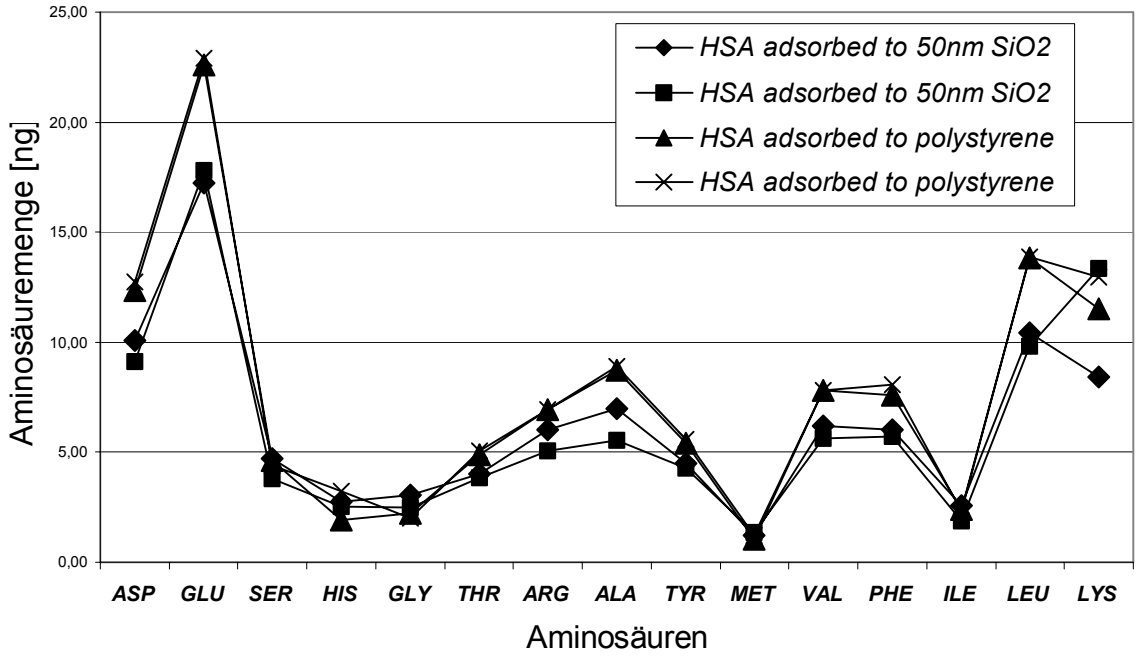


Abbildung 5: Wiederfindung der Aminosäureverteilung von humanem Serumalbumin - adsorbiert an verschiedenen planaren Substraten- nach saurer Hydrolyse und Fluoreszenzderivatisierung

Mit Hilfe einer im Rahmen des Projektes entwickelten Auswertungsroutine für die Aminosäureanalyse konnte die Genauigkeit des Verfahrens der HPLC-basierenden Proteinquantifizierung erhöht und die Anwendung der Methode auch auf Proteingemische eröffnet werden. Diese Auswertung beruht auf einer numerischen Analyse der Aminosäureanteile von Proben aus Proteinen bzw. Proteingemischen mit bekannter Primärstruktur der Proteine und definiert aus dem Vergleich der detektierten relativen

Aminosäuremengen ein Kriterium für die Verwendung der verschiedenen Aminosäuren für die Kalkulation der Proteinmenge. Durch weniger genau bestimmbare Aminosäuren hervorgerufene Fehler werden so weitgehend eliminiert (Abbildung 6).

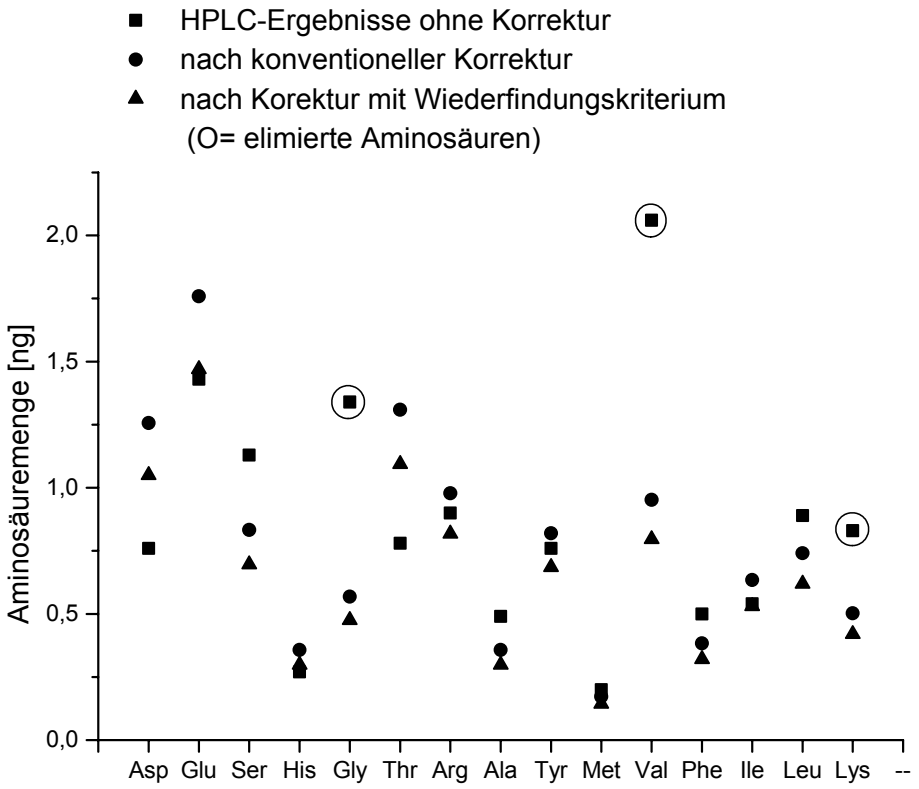


Abbildung 6: Aminosäuremuster nach Hydrolyse/HPLC einer kovalent immobilsierten Fibronectinschicht auf Maleinsäureanhydrid-Copolymerfilm nach Auswertung mit verschiedenen Korrekturverfahren.

Insgesamt erweist sich die HPLC-basierende Methode als sensitiv und sehr vielseitig anwendbar. In Kombination mit dem für die Protein- bzw. Proteinfragment-Trennung konfigurierten HPLC-System konnte auch ein Gerätesystem zur Massendetektion von Proteinen bzw. Proteinfragmenten (ESI-TOF) etabliert werden. Mit dieser Anordnung konnte beispielsweise das Auftreten von Protein-Aggregaten in Lösungen von Wachstumsfaktoren (Steel Factor) untersucht und anhand dessen die Präparation von Lösungen zur Funktionalisierung von Oberflächen optimiert werden.

Ein Kapillarelektrophorese-System zur Trennung und Quantifizierung von gelösten Proteingemischen ergänzt das Spektrum der proteinanalytischen Methoden. Dieses Gerät

konnte vorteilhaft zur Trennung von Proteinen (Beispiel α- Lactalbumin und β-Lactoglobulin), zur Identifizierung von Proteinen sowie zur Quantifizierung von Proteinen (Beispiel Kalibrierkurve für α- Lactalbumin) herangezogen werden (Abbildung 7). Des weiteren laufen zur Zeit Methodenentwicklungen für die Trennung/ Identifizierung von sauren Proteinen (Human Serum Albumin, Insulin, β_2-Microglobulin, Fibrinogen) basischen Proteinen (Lysozym, Cytochrom C, Ribonuklease A, Myoglobin) und Polysacchariden (Heparin, Hyaluronsäure).

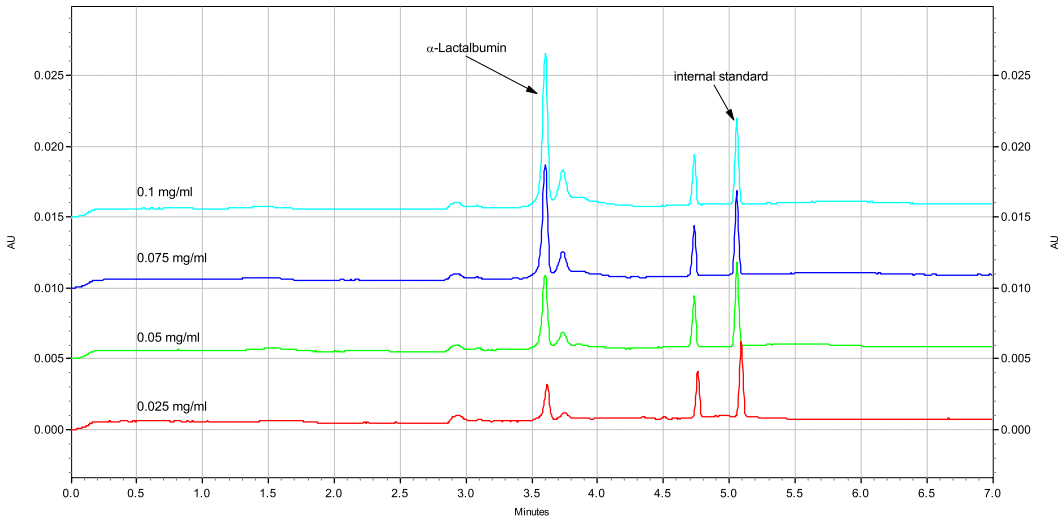


Abbildung 7: Kapillarelektrophorese-Chromatogramme zur Quantifizierung von Lactalbumin

Für die Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Substrateigenschaften auf die Reorganisation von immobilisiertem Fibronectin in Zell-Matrix-Adhäsionen von Endothelzellen wurde eine Fibronectin-Quantifizierung auf verschiedenen Copolymeroberflächen (im hydrolysierten und getemperten Zustand) vorgenommen. Durch die HPLC-basierende Aminosäureanalyse ergaben sich für alle verglichenen Oberflächen sehr ähnliche, etwa einer Monolage entsprechende Oberflächenkonzentrationen des Proteins (ca. 400ng cm^{-2}, siehe Abb. 8). Die Konformationsanalyse des immobilisierten Proteins an den verschiedenen Copolymer-Oberflächen erfolgte mit Hilfe der Bindung von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern, die Zell-Matrix-Adhäsionen relevante Domänen des Proteins erkennen (Detektion mit Hilfe der Konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, siehe Abb. 9). Im Ergebnis

konnte gefunden werden dass die immobilisierten Fibronectinschichten auf den hier verglichenen Oberflächen keine ausgeprägten Konformationsänderungen aufweisen.

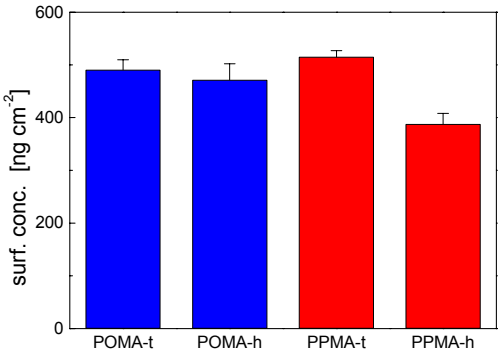


Abbildung 8: Oberflächenkonzentration von Fibronectin an Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid) (POMA) und Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid) (PPMA), jeweils im hydrolysierten (-h) und getemperten (-t) Zustand des Polymerfilmes. Die Adsorption des Proteins erfolgte aus 50µg ml^{-1} Fibronectin-Lösungen entsprechend dem Sättigungsbereich der Adsorptionsisotherme.

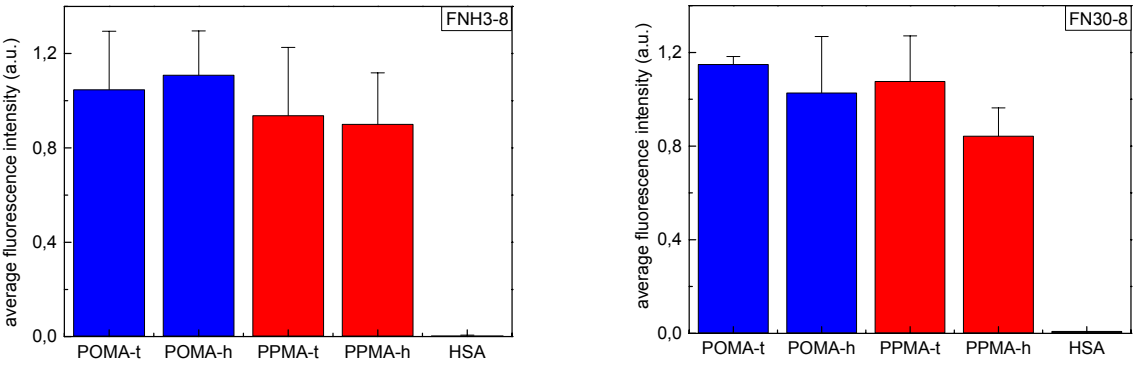


Abbildung 9: Vergleich der Anbindung monklonaler Antikörper der Zellbindungsdomäne von Fibronectin an Fibronectin-Schichten auf Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid) (POMA) und Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid) (PPMA)- Filmen, jeweils im hydrolysierten (-h) und getemperten (-t) Zustand der Polymerfilme.

Die durch die Substrateigenschaften kontrollierte Variation der Verankerungsform der immobilisierten Fibronectinschichten wurde durch Verdrängungs-(Desorptions)experimente in serumhaltigen Kulturmedien nachgewiesen. Dieser Konkurrenzadsorptionstest ist für die zelluläre Reorganisation präadsorbierter Fibronectinschichten relevant da auch dieser Prozess die Anwesenheit von Serumproteinen erfordert. Die Detektion der Proteinverdrängung erfolgte hier mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Proteine und Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (Abbildung 10).

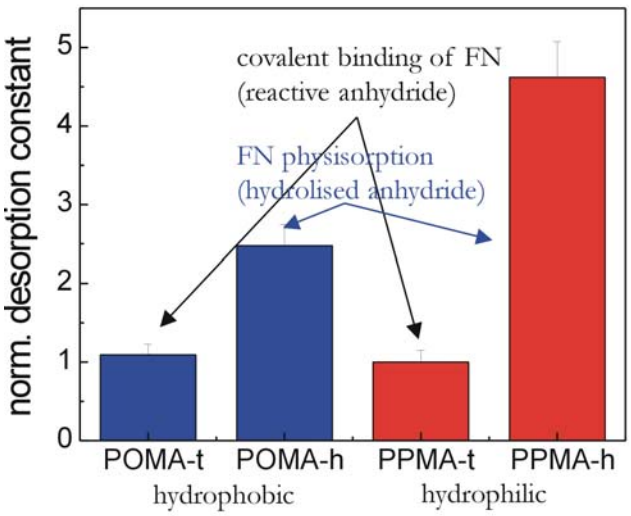


Abbildung 10: Normierte Verdrängungsdynamik von Fibronectin durch serumhaltiges Zelkulturmedium an Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid) (POMA) und Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid) (PPMA)- Filmen, jeweils im hydrolysierten (-h) und getemperten (-t) Zustand der Polymerfilme.

4. Mikromechanische Charakterisierung der Zelladhäsion an funktionalisierten Polymersubstraten durch die Kombination von Rastersondenmikroskop und konfokalem Fluoreszenzmikroskop

Mit Hilfe einer Kombination von Rasterkraft- und LaserScanning-Mikoskop konnten vitale Endothelzellen unter lokalisierter mechanischer Stimulation (durch das Rasterkraftmikroskop) untersucht werden. Dabei wurde eine intrazelluläre Fluoreszenzfärbung der untersuchten Endothelzellen angewandt. Die Experimente wurden weiterführend zur Charakterisierung des dynamischen Verhaltens der zellulären Adhäsionskontakte an unterschiedlich funktionalisierten Polymerfilmen genutzt.

Die entwickelte Methodenkombination wurde außerdem für die Aufklärung von Strukturen der an Polymeroberflächen durch Zellen reorganiserten Matrixproteine (fibriläre Fibronectinstrukturen) herangezogen. Dafür wurde ein Verfahren zur Ablösung der adhärierenden Zelle nach chemischer Fixierung der extrazellulären Matrixstrukturen

angewandt. Abbildung 11 zeigt exemplarisch die daraufhin mögliche Analyse von substratgebundenen Fibronectinfibrillen mit Hilfe der Kombination von Rasterkraftmikroskopie und Konfokaler Fluoreszenzmikroskopie.

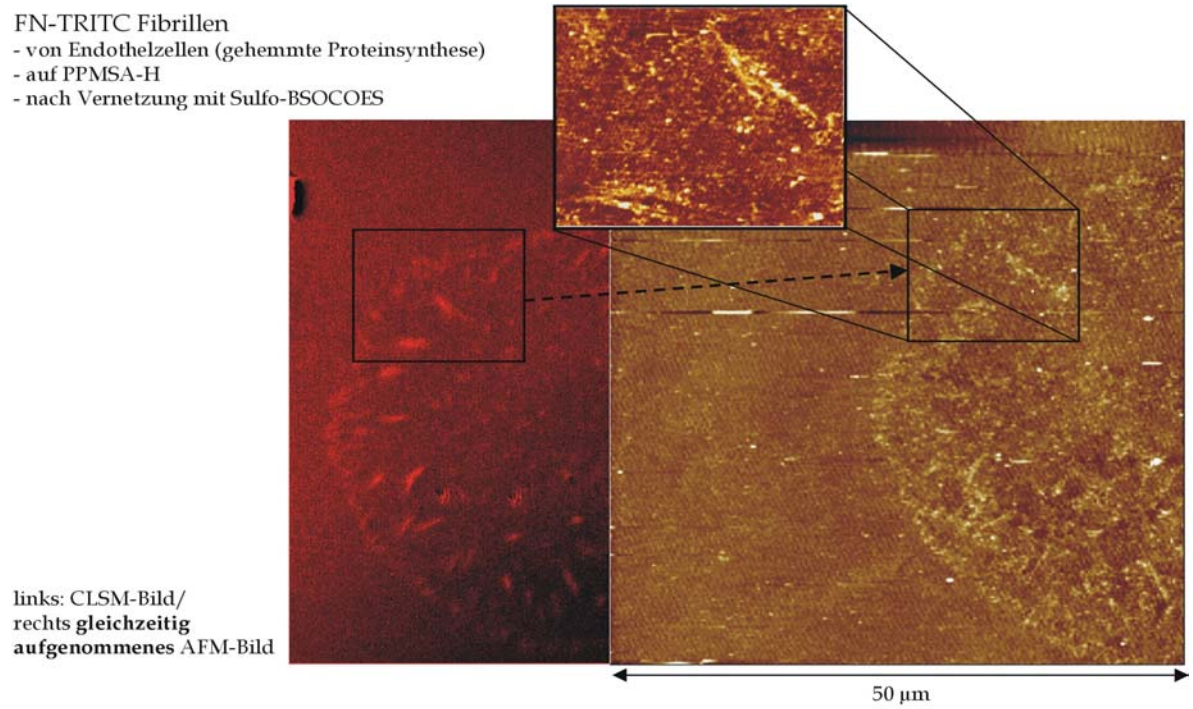


Abbildung 11: Methodenenkombination AFM-CLSM zur Untersuchung von zellulär organisierten Proteinstrukturen- Charakterisierung der durch eine Endothelzelle ausgebildeten Fibronectin-Fibrillen an der Grenzfläche eines Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid) (PPMA)- Filmes.

5. Cytometrische Charakterisierung von durch den Kontakt zu Polymersubstraten induzierten zellulären Eigenschaftsveränderungen

Durch die Fluoreszenzmarkierung des substratgebundenen Proteins und der Immunofluoreszenzmarkierung zellulärer Moleküle konnte gezeigt werden, dass die Verankerungsform von an Maleinsäureanhydrid-Copolymer-Filmen immobilisiertem Fibronectin die Initialphase der Adhäsion von Endothelzellen beeinflusst. Dabei wurde belegt, dass die Reorganisation des Matrixproteins durch die Zelle durch dessen kovalente Anbindung aber auch durch starke hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Substrat erheblich behindert werden kann (Abbildung 12). Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass die adhärenten Endothelzellen unabhängig davon an Fibronectin-vorbeschichteten

Materialien ihre Mikroumgebung durch sezernierte Matrixproteine sehr weitgehend gestalten und so die Bedingungen an verschiedenartige Oberflächen angleichen können.

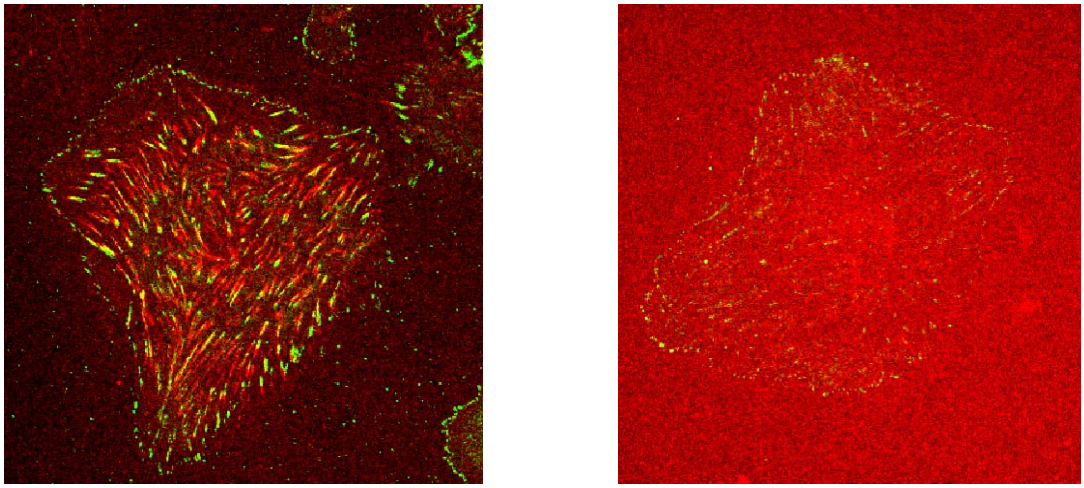


Abbildung 12: Fibronectin-Reorganisation und Ausbildung von Zell-Matrix-Adhäsionen von Endothelzellen auf Fibronectin-Schichten an einem hydrophilen Polymerfilm (Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid)) mit nicht-kovalenter (links) und kovalenter (rechts) Verankerung des Proteins (Fibronectin –rot, fokale Adhäsionskontakte –grün).

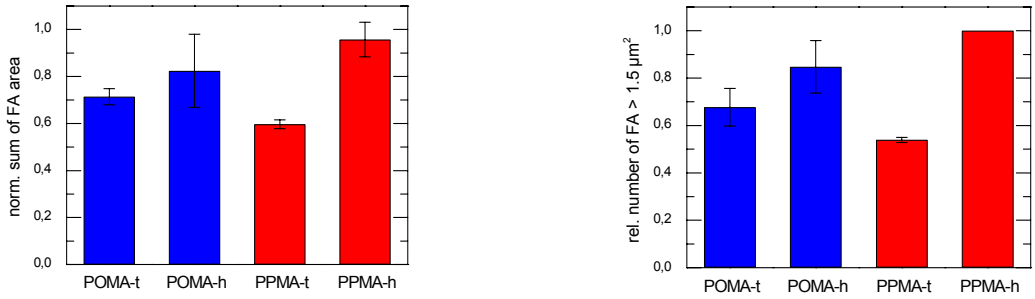


Abbildung 13: Quantifizierung der Ausbildung von Zell-Matrix-Adhäsionen von Endothelzellen auf Fibronectin-Schichten an Poly(octadecen *alt* maleinsäureanhydrid) (POMA) und Poly(propen *alt* maleinsäureanhydrid) (PPMA)- Filmen, jeweils im hydrolysierten (-h) und getemperten (-t) Zustand der Polymerfilme. (links: normierte Summation der Fokalen Adhäsionskontakte, rechts: relativer Anteil größerer Adhäsionskontkate)

Weiterhin wurde zur Charakterisierung adhärenter Blutstammzellen nach Kultur auf mit Collagen I (Tropocollagen und Collagen-Fibrillen) funktionalisierten Polymersubstraten wurde das Verfahren der Laser Scanning Cytometrie im Vergleich mit der konventionellen durchlusszytometrischen Bewertung validiert (Markierung von CD34, CD29 mit verschiedenen fluoreszenzgelabelten Antikörpern) angewandt. Trotz etwas geringerer Sensitivität erweist sich Laser Scanning Cytometry als vorteilhaft da die adhärenten Zellen mit dieser Methode auf dem Substrat lokalisiert werden können. Diese Option erlaubt eine besserer Absicherung der Dateninterpretation.

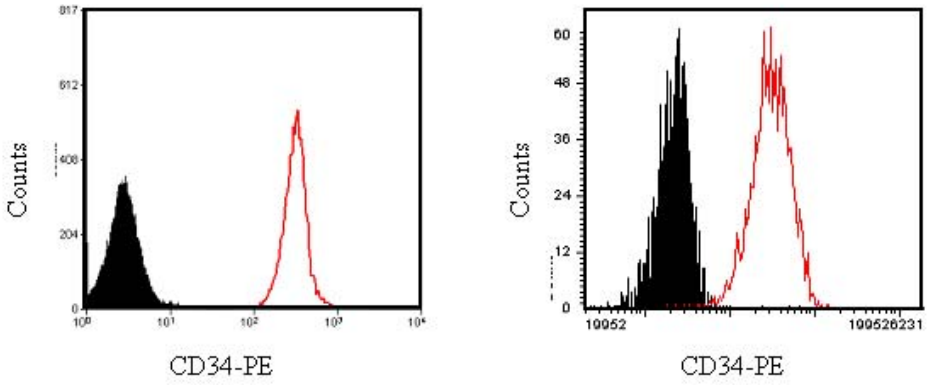


Abbildung 14: Bestimmung des Oberflächenmarkers CD34 auf hämatopoetischen Stammzellen mit Hilfe der konventionellen Durchflusszytometrie (links) und durch Laser-Scanning-Zytometrie (rechts) (CD34-positive Zellen jeweils rot, Isotyp schwarz)

6. Molekularbiologische Charakterisierung von durch den Kontakt zu Polymersubstraten induzierten zellulären Eigenschaftsveränderungen

Die molekularbiologische Charakterisierung von adhärenten Zellen im Kontakt mit Polymersubstraten (RT-PCR) wurde im Rahmen des Projektes etabliert und für verschiedene Fragestellungen herangezogen. Ein wichtiges Beispiel der erfolgreichen Nutzung der damit geschaffenen Möglichkeiten ist der Nachweis endothelspezifischer Genexpression in aus mesenchymalen Stammzellen abgeleiteten Endothelzellen (siehe Abb. 15; die Differenzierungsprotokolle wurden im Rahmen des BMBF-Kompetenzzentrums für Materialien im Blut- und Gewebkontakt entwickelt).

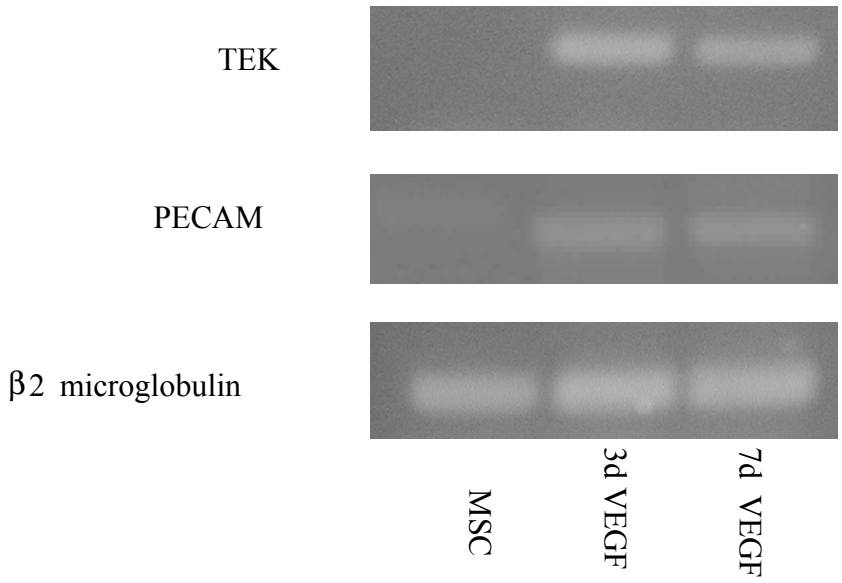


Abbildung 15: PCR- Nachweis von Endothel-spezifischer Genexpression in differenzierten MSC (nach 3 und 7 Tagen Kultivierung in Gegenwart von VEGF)

2. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit hinsichtlich des fortgeschriebenen Verwertungsplanes

Die Medizintechnik - und hier insbesondere der Bereich der medizinischen Biotechnologie - stellt heute eine der hoffnungsvollsten Branchen in Bezug auf Innovation, zukünftiges Wachstum, und insbesondere auch in Bezug auf Existenzgründungen mit Arbeitsmöglichkeiten für hochqualifizierte Arbeitskräfte dar. Dem zu erwartenden großen Nutzen in der Medizin steht allerdings entgegen, dass medizintechnische bzw. biotechnologische Produktentwicklungen risikoreich sind und sich erst langfristig rentieren. Trotz verschiedener Förderprogramme hat Deutschland in vielen Teilbereichen noch Nachholbedarf gegenüber den USA und Japan. Die im Bereich medizinische Biotechnologie durch Zelldiagnostik und Zelltherapien geschaffenen neuartigen Möglichkeiten beziehen sich insbesondere auch auf bisher nicht oder nur schwer behandelbare Erkrankungen und sind damit von erheblichem gesellschaftlichem und gesundheitsökonomischem Interesse.Die für Zelltherapie und Zelldiagnostik genutzten Trägersysteme sind nahezu ausschließlich synthetische Polymere, häufig Polymermembranen. Die adäquate Gestaltung dieser Trägersysteme – einschließlich ihrer Biofunktionalisierung – nimmt eine Schlüsselposition bei der Entwicklung entsprechender Produkte ein. Hierbei kommt der umfassenden Charakterisierung von substratinduzierten Zustands- bzw. Eigenschaftsveränderungen von Zellen besondere Bedeutung zu.

Das Arbeitsprogramm des Projektes erwies sich als geeignet zur Erreichung des Projektzieles, der Etablierung eines umfassenden analytischen Ansatzes zur Bewertung substratinduzierter Veränderungen von Zellen.

Wie beabsichtigt wurde die Anschlussfähigkeit des Vorhabens mit Bezug auf Forschungsarbeiten zur Bereitstellung von Trägermaterialien für Zelltherapie-Systeme durch Kooperation mit Industriepartnern sichergestellt. Da das Ziel des Projektes nicht die Lösung einer Einzelfrage sondern die Etablierung eines umfassenden analytischen Ansatzes zur Bewertung substratinduzierter Veränderungen von Zellen war konnte nicht von einer direkten wirtschaftlichen Nutzung von Arbeitsergebnissen ausgegangen werden. Es erfolgt jedoch eine vielfältige Anwendung des etablierten analytischen Konzeptes im Rahmen von produktorientierten Forschungsvorhaben.

Mit dem Projekt konnten neue Möglichkeiten zur gezielten Entwicklung von Zellkulturträgern auf der Basis von oberflächenfunktionalisierten polymeren Materialien

geschaffen werden, die aktuelle Forschungsvorhaben auf dem Gebiet des Tissue Engineering nachhaltig unterstützen werden. Dazu konnte die im Rahmen des Projektes erweiterte Kompetenz der ausführenden Einrichtung in Verbundprojekten (BMBF-Kompetenzzentrum für Biomaterialien im Blut- und Gewebekontakt, InnoRegio-Projekt BiologieMedizinTechnik-BioMeT Dresden u.a.) eingebracht werden.

3. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die Auswertung der einschlägigen Fachliteratur bestätigte durch die erhebliche Zahl neuer Zelltherapie-Konzepte und der erweiterten Nutzung oberflächenfunktionalisierter Polymersubstrate als Zellkulturträger eindrucksvoll die Notwendigkeit der mit dem Vorhaben realisierten Forschungen, ergab jedoch keine Erkenntnisse, die Änderungen des Arbeits- und Zeitplanes erfordert hätten.

4. Publikationsliste

Fachzeitschriften

Oswald, J.; Salchert, K.; Köhler, T.; Pompe, T.; Bornhäuser, M.; Werner, C.:
Covalent Immobilization of Stem Cell Factor on Polymer Films to support the ex vivo Expansion of Hematopoietic Progenitors, Blood **98** (2001)

Mahltig, B. ; Werner, C. ; Müller, M. ; Jérome, R. ; Stamm, M.:
Protein adsorption on preadsorbed polyampholytic monolayers. -
J. Biomater. Sci. Polymer Edn. **12** (2001), 995-1010

Pompe T, Kobe F, Salchert K, Jørgensen B, Oswald J, Werner C:
Fibronectin Anchorage to Polymer Substrates Controls the Initial Phase of Endothelial Cell Adhesion.
Journal of Biomedical Materials Research (in press 2003)

Oswald J, Jørgensen B, Pompe T, Kobe F, Salchert K, Bornhäuser M, Ehninger G, Werner, C:
Characterization of adherent hematopoietic stem cells on collagen-coated polymer substrates by means of laser scanning cytometry.
Cytometry (submitted 2002)

Salchert K, Pompe T, Sperling C, Werner C:
HPLC-based quantitative analysis of immobilzed proteins and protein mixtures
Journal of Chromatography A (submitted 2002)

Pompe T, Zschoche S, Salchert K, Herold N, Werner C:
Maleic Anhydride Copolymers Provide a Versatile Platform for Molecular Biosurface Engineering
Biomacromolecules (in press 2003)

Oswald J, Werner C, Joergensen B, Salchert K, Streller U, Pompe T, Bornhäuser M:
Polymer-Based Immobilized Fibrillar Collagen I Supports Adhesion and Expansion of CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells. Blood **100** (2002), 4248

Beiträge zu internationalen Konferenzen

Werner, C. ; Pompe, T.; Kobe, F. ; Riemey, C. ; Sjaba, A. ; Hübner, J. ; Schmidt, U. :
Characterization of Human Endothelial Cells on Microstructured Polymer Films by Laser Scanning Cytometry. -
Materials Week, International Congress on Advanced Materials, their Processes and Applications. - München, 25.09.00 - 28.09.00

Werner, C. ; Kobe, F. ; Sjaba, A. ; Riemey, C. ; Schmidt, U. :
Advanced Characterization of Human Endothelial Cells on Polymer Films by Laser Scanning Cytometry. -
6th World Biomaterials Congress. - Kamuela, Hawaii, 15.05.00 - 20.05.00

Salchert, K. ; Oswald, J. ; Pompe, T. ; Jörgensen, B. ; Werner, C. :
Immobilization of Stem Cell Factor onto Polymer Films Supports Expansion of M-07e cells. - 43rd ETCS Meeting of the European Tissue Culture Society. - Granada, 30.09.01 - 03.10.01

Köhler, T. ; Kobe, F. ; Pompe, T. ; Oswald, J. ; Plettig, R. ; Salchert, K. ; Bornhäuser, M. ; Werner, C. :
Analysis of adherent hematopoietic cells on mondified polymer substrates by laser scanning cytometry (LSM). Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO). - Mannheim, 29.09.01 - 03.10.01

Welzel, P. ; Menning, A. ; Werner, C. :
Adsorption and Adsorption-induced Structural Changes of Proteins on Silica. - SILICA 2001, Second International Conference on Silica. - Mulhouse, 01.09.01 - 05.09.01

Pompe T, Kobe F, Salchert K, Jørgensen B, Oswald J, Werner C:
Binding Strength of Fibronectin to Polymer Substrates Controls the Initial Phase of Endothelial Cell Adhesion.
Gordon Research Conference, New London, 23.06.02 - 28.06.02

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Salchert K, Pompe T, Feldmann S, Bornhäuser M, Ehninger G, Werner C:
Expansion and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Biomolecular Functionalization of Tissue Engineering Scaffolds
2nd Symposium on Therapeutic Applications of Human Stem and Precursor Cells, Hannover, 07.11.02 - 08.11.02

Eingeladene Vorträge

Werner, C. :
Quantifizierung der Adhäsion von Zellen mit Hilfe des Membrane Force Transducer Apparatus. -
GKSS Forschungszentrum, Institut für Chemie. - Teltow, 14.07.00

Werner, C. :
Neue Horizonte für Kunststoffe in der Medizin
Gründungsveranstaltung des Kuratoriums der Kunststofferzeugenden Industrie am 27.09. 2000 in Dresden

Werner, C. :
Polymer Templates for Tissue Engineering Strategies. -
Frontier Medical Sciences Research Center. Kyoto University, Japan. - 14.11.00

Werner, C. :
Utilizing the Power of Stem Cells. -
Max Planck Research School „Biopolymers“ - Borkum, 06.04.01
Werner, C. ; Bornhäuser, M. ; Pompe, T. ; Salchert, K. ; Köhler, T. ; Oswald, J. ; Streller, U. ; Gliesche, K. ; Körber, H. ; Lemke, H.-D. ; Ehninger, G. :
Artificial Stem Cell Microenvironments Based on Surface Modified Polymers. -
5th International Conference on Cellular Engineering . - Aachen, 04.07.01 - 06.07.01

Werner, C. ; Bornhäuser, M. ; Pompe, T. ; Salchert, K. ; Köhler, T. ; Oswald, J. ; Streller, U. ; Gliesche, K. ; Körber, H. ; Lmke, H.-D. ; Ehninger, G. :
Carriers for Stem Cell Bioreactors Based on Surface Modified Polymers. -
Science University Tokyo / Dept. of Colloid and Interface Science. - Tokyo, 04.06.01

Werner, C. ; Pompe, T. ; Salchert, K. ; Oswald, J. ; Bornhäuser, M. ; Gliesche, K. ; Köhler, T. ; Streller, U. ; Körber, H. ; Lemke, H.-D. ; Ehninger, G. :
Expansion of Hematopoietic Stem Cells on Polymer Substrates - Towards the Artificial

Bone Marrow. -
International Workshop on Cells on Solid Substrates (Max-Planck-Society). - Ringberg Castle, 27.06.01 - 30.06.01

Werner C:
Bioactive Polymer Matrices Support the Proliferation of Stem Cells in vitro
Jahrestagung der Gesellschaft für Zell- und Gewebezüchtung „Heterologous Cell Interactions & 3-D Cell Systems, Regensburg, 31.05.02-02.06.02

Werner C:
Biomimetic Polymers for Regenerative Medicine
European Graduate School “Polymers in Medicine”, Prag, 03.10.02