

Kumulative Habilitationsschrift

**Einfluss von Belastung auf die
Selbstorganisation in biologischen Systemen**

vorgelegt dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

von Herrn Dr. rer. nat. D. C. F. Wieland

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
2	Hierarchische Strukturen in biologischen Systemen	3
2.1	Einfluss molekularer Wechselwirkungen auf die Selbstorganisation von Makromolekülen in synovialen Gelenken	4
2.2	Untersuchung der Selbstorganisation von Makromolekülen in Modellsystemen der synovialen Flüssigkeit	7
2.3	Einfluss externer Stimuli auf die Reorganisation hierarchischer Knochenstrukturen	10
2.4	Untersuchung von Knochenstrukturen mit hochauflösenden Röntgentechniken	12
3	Zusammenfassung ausgewählter Publikationen	14
3.1	Selbstorganisation von Makromolekülen in Modellsystemen der synovialen Flüssigkeit . . .	14
3.1.1	Einfluss der molekularen Wechselwirkungen auf die Selbstorganisation von Makromolekülen in der synovialen Flüssigkeit	15
3.1.2	Untersuchung von Modellsystemen der synovialen Flüssigkeit unter Druck und Scherung	25
3.1.3	Entwicklung von Experimenten für die Untersuchung von Makromolekülen unter Scherung und Druck	29
3.1.4	Diskussion	34
3.2	Untersuchung hierarchisch geordneter Knochenstrukturen	37
3.2.1	Untersuchung des inversen piezoelektrischen Effekts in Knochen	37
3.2.2	Einfluss von biologisch abbaubaren Implantaten auf die hierarchische Knochenstruktur	41
3.2.3	Entwicklung von Methoden zur Untersuchung biologisch abbaubarer Magnesiumimplantate mittels Synchrotrontechniken	48
3.2.4	Diskussion	53
4	Zusammenfassung und Ausblick	56
5	Zitierte Literaturquellen	58
6	Curriculum Vitae	65
7	Vollständige Publikationsliste	67
8	Erklärung	72
9	Danksagung	73

1 Einleitung

In dieser Habilitationsschrift werden meine Studien zum Einfluss von Belastungsfaktoren wie hydrodynamischer Druck auf die Selbstorganisation hierarchischer Strukturen in biologischen Systemen zusammengefasst. Das von mir adressierte Forschungsgebiet untersucht das Zusammenspiel von Scherung und Druck auf molekulare Wechselwirkungen in der Synovialflüssigkeit und den damit verbundenen Einfluss auf die sich selbstorganisierenden Makromoleküle. Dabei stehen insbesondere die selbstorganisierenden Strukturen, die sich zwischen dem Biopolymer Hyaluronan und Lipiden bilden, im Fokus. Ein dazu assoziierter Themenbereich befasst sich mit Untersuchungen an hierarchischen Knochenstrukturen und dem Einfluss von Perturbationen auf die Ultrastruktur. Die Knochenultrastruktur, die aus Hydroxylapatit und Kollagen besteht, unterliegt einer ständigen Reorganisation durch die Knochenzellen und kann durch lokale Veränderungen in der Zusammensetzung oder durch mechanische Reize beeinflusst werden. Dabei ist es entscheidend, die Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat mit hoher Auflösung zu charakterisieren und die strukturellen Veränderungen mit den Perturbationen in Beziehung zu setzen.

Die Untersuchungen der hierarchischen Systeme wurden stets durch die methodische und die apparative Entwicklung innovativer Röntgentechniken und Probenumgebungen begleitet. Durch diese Verbindung war es mir möglich, neue wissenschaftliche Fragen zu beantworten und ein tieferes Verständnis dieser Systeme zu erlangen. Hier bieten Röntgentechniken, die sich der Synchrotronstrahlung bedienen, einzigartige Möglichkeiten, um komplizierte Fragen zu beantworten, die mit Labormethoden nicht zugänglich sind. So macht die hohe Intensität der Röntgenstrahlung an Synchrotron-Strahlungsquellen in-situ-Untersuchungen möglich, die es erlauben, die molekulare Selbstorganisation mittels Röntgenbeugung unter verschiedensten Bedingungen zu studieren. Die mit meiner Beteiligung entwickelten Probenumgebungen erlauben einzigartige Einblicke und ermöglichen zum Beispiel ein besseres Verständnis der Veränderungen der Wechselwirkungen von Makromolekülen unter hohem Druck und Scherraten. Eine zu überwindende Herausforderung ist das Fehlen von Standardprozeduren für die Auswertung und das experimentelle Vorgehen, da alle Versuche auf die jeweilige Fragestellung und die verwendete Messtechnik abgestimmt werden müssen. Die methodische und apparative Entwicklung ist in diesem Zusammenhang von entscheidender Bedeutung und birgt viel Potenzial, um komplizierte Untersuchungen mit hoher Genauigkeit durchzuführen.

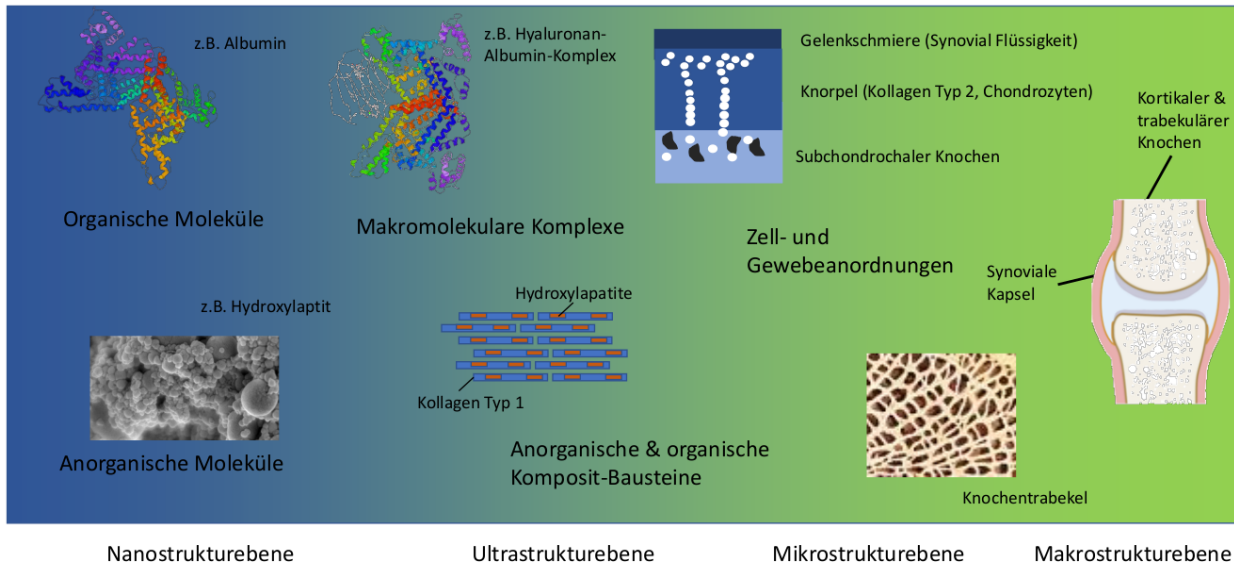


Abbildung 1: Schematische Darstellung der hierarchischen Knochen- und Gelenkstrukturen.

2 Hierarchische Strukturen in biologischen Systemen

Die Evolution hat faszinierende Systeme und Materialien hervorgebracht, die außergewöhnliche Kombinationen von Eigenschaften oder Funktionen aufweisen. Hierzu zählen biologisches Gewebe, Zellen, Haut oder Knochenstrukturen. Um die gewünschten Eigenschaften zu erreichen, bedient sich die Natur hierarchischer und selbstorganisierender Strukturen, um unterschiedliche Eigenschaften in synergetischer Weise zu kombinieren, siehe Abbildung 1. Hierdurch entstehen Materialien bzw. Systeme, die mehr sind als die Summe ihrer Teile. Ein prominentes und alltägliches Beispiel hierfür sind Knochen und synoviale Gelenke des Bewegungsapparats.

Synoviale Gelenke und Knochen weisen eine hohe Strukturierung auf, die auf der Nanometer-Längenskala beginnt und sich bis in den makroskopischen Längenbereich erstreckt. Zusätzlich kommen auf den unterschiedlichen hierarchischen Ebenen verschiedene Prinzipien zum Tragen. So ist auf der Nanometer-Längenskala im Knochen eine Kompositmatrix zu finden, die aufgrund des anorganischen Hydroxylapatits eine hohe Belastbarkeit aufweist, aber zugleich eine hohe Elastizität durch die organische Kollagenmatrix besitzt [1, 2]. Auf einer größeren hierarchischen Ebene im Mikrometerbereich ist der Knochen keinesfalls ein massiver Festkörper, sondern in Trabekeln und kortikalen Strukturen organisiert, die sich entsprechend der Belastungen ausrichten. In diesem Kontext stellt sich die Frage, wie Zellen oder Gewebe reagieren, wenn sie mit externen Stimuli wie einem Implantat in Berührung kommen. Ein Implantat kann die physikalischen und chemischen Bedingungen im Gewebe beeinflussen und damit insbesondere die fortwährende Knochengeweberemodellierung. Dies gilt im besonderen

Maße für biologisch abbaubare Implantate, da sie einen ständigen Stimulus für das Knochengewebe darstellen. Eine weitere Besonderheit biologischer Systeme ist die Fähigkeit, adaptiv auf veränderte Belastungen reagieren zu können. So ist in Gelenken unter verschiedensten Scherraten ein sehr niedriger Reibungskoeffizient zu finden [3, 4].

Diese Eigenschaften sind eine Folge komplexer Wechselwirkungen, die auf den verschiedenen hierarchischen Ebenen ineinandergreifen und die Selbstorganisation beeinflussen. Diese Komplexität ist die größte Herausforderung, um die Wechselwirkungen in hierarchischen Strukturen zu verstehen. Informationen von verschiedenen Längenskalen müssen daher in einem multimodalen Ansatz kombiniert werden, um ein möglichst vollständiges Bild der Zusammenhänge zu erschaffen. Das Verständnis dieser Wechselwirkungen hat viel Potenzial aus wissenschaftlicher und technischer Sicht. Ein tieferer Einblick in die Vorgänge wird es erlauben, neue Therapien, zum Beispiel für die Behandlung von Knochenbrüchen durch biologisch abbaubare Implantate, zu entwickeln. Ebenso bietet die Translation von Konzepten der synovialen Gelenke in technische Anwendungen neue Möglichkeiten, um neuartige Schmiersysteme zu entwickeln oder bestehende Systeme zu optimieren [5, 6].

2.1 Einfluss molekularer Wechselwirkungen auf die Selbstorganisation von Makromolekülen in synovialen Gelenken

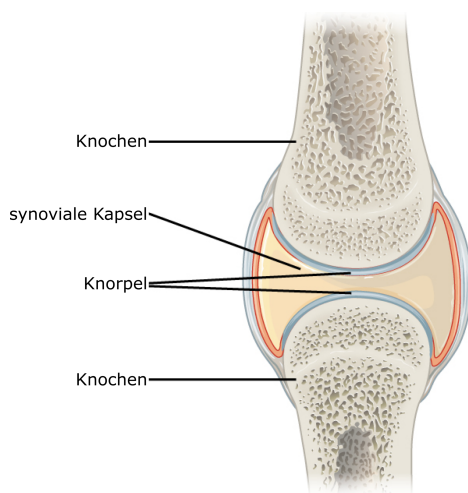


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Gelenks. Adaptiert von „Concepts of Biology - 1st Canadian Edition“ von Charles Molnar and Jane Gair. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 Lizenz.

Im synovialen Gelenk, das schematisch in Abbildung 2 dargestellt ist, bewegen sich Gelenkknorpel annähernd reibungsfrei auf einem Gegenstück, wobei die viskose Synovialflüssigkeit als Schmiermittel dient. Der Reibungskoeffizient, der als Verhältnis von Reibungskraft zu Anpresskraft definiert ist, hat für diese wasserbasierten Schmiersysteme Werte von 0,001 bis 0,01 und ist damit eine der effizientesten Lösungen [3, 4]. Für diese Schmiersysteme spielt es dabei keine Rolle, ob es sich um einen Wechsel zwischen niedrigen und hohen Belastungen oder von einer Ruheposition in eine Bewegung handelt, wo Scherkräfte von 10^6 s^{-1} und Drücke von einigen MPa auftreten können. Ihre Effizienz erreichen die synovialen Gelenke durch ein synergetisches Zusammenspiel von Knorpel mit selbstorganisierenden Strukturen aus Biomakromolekülen [4]. Dieses lässt sich zum Beispiel aus klinischen Beobachtungen schließen, in denen in der Behandlung von Knorpelschäden wesentlich bessere Erfolge beobachtet wurden, wenn

im Vergleich zur Anwendung der einzelnen Bestandteile eine Kombination des Biopolymers Hyaluronan mit Lipiden eingesetzt wurde [7].

Bei Schmierungssystemen werden drei Bereiche unterschieden, in denen sich die reibungsbestimmenden Effekte unterscheiden, siehe Abbildung 3:

- Hydrodynamischer Schmierbereich: Ein Flüssigkeitsfilm bestimmt maßgeblich die Reibung, wobei diese mit sinkendem Abstand der Grenzflächen abnimmt.
- Gemischter Schmierbereich: Oberflächeneffekte und Rauigkeiten gewinnen an Bedeutung und die Reibung steigt mit der Verkleinerung des Flüssigkeitsfilms an.
- Grenzflächenschmierung: Ein Schmierfilm verbleibt zwischen den beiden Grenzflächen und die Reibung ist unabhängig vom Abstand.

Diese Beobachtungen wurden in Systemen gemacht, die auf Öl basieren, bzw. in Luft-Grenzflächen Untersuchungen. Es gibt jedoch viele wissenschaftliche Berichte, dass in wässrigen Systemen die Reibungskoeffizienten im Bereich der Grenzflächenschmierung viel kleiner sind und somit andere Mechanismen greifen, siehe Abbildung 3 [8–10].

Makromoleküle und Lipide sind von der Natur genutzte Elemente, die durch Selbstorganisation hierarchische, supramolekulare Strukturen bilden. Diese Strukturen sind dafür verantwortlich, dass die beschriebenen niedrigen Reibungen in Gelenken vorzufinden sind. Die Schmierung findet in einem Spalt zwischen den Knorpeln statt, der im unbelasteten Zustand eine Breite von 100 μm haben kann. Es wird angenommen, dass die verschiedenen Makromoleküle spezifische Funktionen besitzen und so die hervorragend gute Schmierung erzielt wird [11]. Die Untersuchung dieser Funktionen hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erlangt [12–19]. Es werden insgesamt vier biologische Komponenten der synovialen Flüssigkeit als essenziell angesehen: Albumin, Proteoglykane

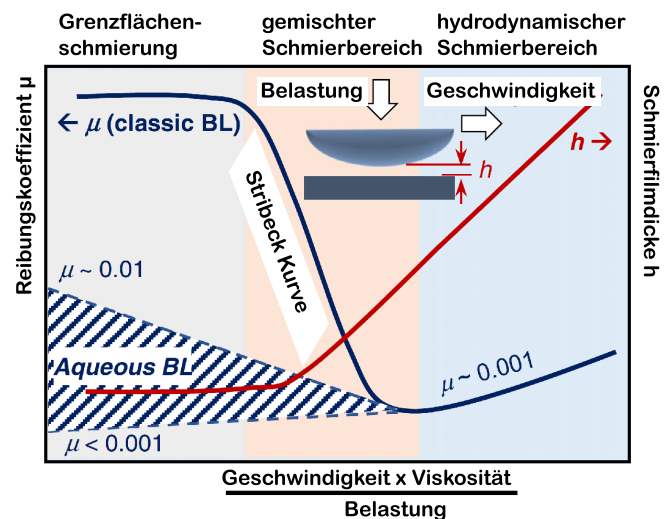


Abbildung 3: Stribeck-Kurve der verschiedenen Regime der Grenzflächenschmierung: Darstellung des Reibungskoeffizienten μ gegen die einheitenlose Größe (Geschwindigkeit \times Viskosität / Belastung) und die korrespondierende Dicke des Schmierfilms. Neue experimentelle Daten deuten an, dass der Reibungskoeffizient im Bereich der Grenzflächenschmierung ähnlich niedrig sein könnte wie im hydrodynamischen Bereich. Daher könnte eine Modifizierung der Stribeck-Kurve für wasserbasierte Systeme nötig sein (schraffierter Bereich). Adaptiert von Wuge et al. [8]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 Lizenz.

(Lubricin und Aggrecan), Hyaluronan und oberflächenaktive Phospholipide [23]. Jedoch sind die spezifischen Funktionen in der synovialen Flüssigkeit nicht vollständig verstanden [4, 23, 24].

Das Protein Albumin, das unter anderem in der synovialen Flüssigkeit zu finden ist, kann Gel-Taschen mit Hyaluronan formen [23, 24]. Die Wechselwirkung kann hierbei sowohl über hydrophobe als auch hydrophile Kräfte stattfinden [25]. Albumin kann unter Scherung Netzwerke mit Hyaluronan bilden, was zu einer Veränderung der rheologischen Eigenschaften der synovialen Flüssigkeit führt [26]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Abnutzung von künstlichen Gelenken oder Knorpeln durch Albumin, das sich an die Oberflächen bindet, reduziert wird [27, 28]. Eine weitere Beobachtung ist der Anstieg der Konzentration von Albumin bei Entzündungsreaktionen [29].

Aggrecan ist ein büstenförmiges Proteoglykan, das ein Netzwerk via Linkerproteine mit Hyaluronan bildet. Eine schematische Darstellung dieses Proteoglykanes ist in Abbildung 4c dargestellt. Es weist eine hohe negative Ladung auf und kann somit zur Reibungsreduktion beitragen [30]. Aggrecan wird hauptsächlich im Knorpel durch Chondrozyten gebildet. Es diffundiert durch den Knorpel bis zu dessen Oberfläche und ist daher nahe der Oberfläche zu finden.

Lubricin, siehe Abbildung 4b, ist ein weiteres Proteoglykan, das an Knorpeloberflächen zu finden ist und Grenzflächenschmierung an polaren und apolaren Grenzflächen erlaubt [4, 17]. Ebenso wird vermutet, dass es die Bindung von Lipiden an die Grenzfläche begünstigt [23, 30].

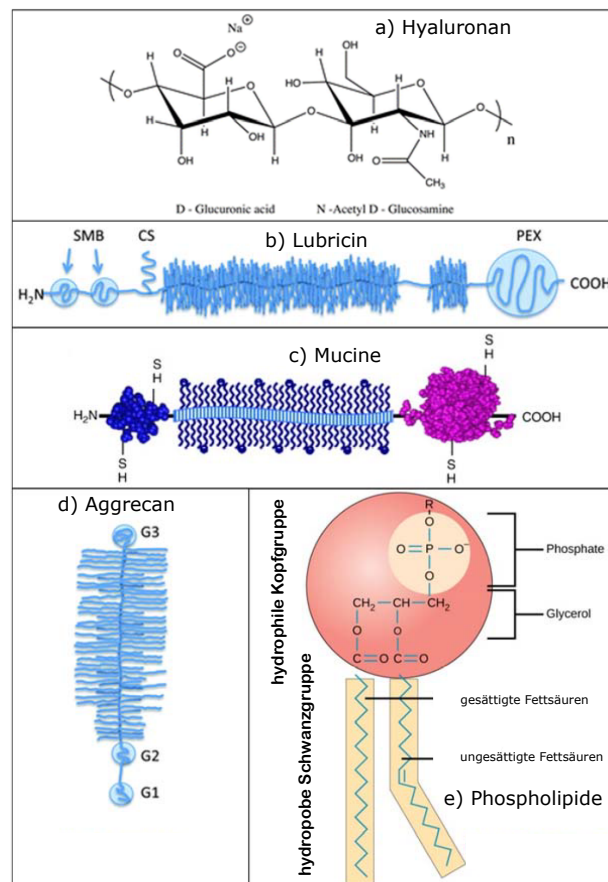


Abbildung 4: (a) Hyaluronan (HA); (b) Lubricin, mit einer zentralen mucinartigen Region, die am N-Terminus von zwei Somatomedin-B-(SMB)-Domänen und am C-Terminus durch eine Hämapexin-(PEX)-Domäne gekennzeichnet ist. CS ist eine kovalent gebundene Chondroitinsulfat-Seitenkette; (c) Mucin mit einer zentralen glykosylierten Domäne, flankiert von globulären Domänen; (d) Aggrecan mit drei G-Domänen, wobei die G1-Domäne an der Bindung an HA beteiligt ist; (e) Phospholipide. [19–22]. Veröffentlicht unter der Creative Commons Attribution 4.0 International Lizenz.

Hyaluronan ist in der synovialen Flüssigkeit mit einer Konzentration von $1 \text{ mg}(\text{mL})^{-1}$ bis $4 \text{ mg}(\text{mL})^{-1}$ zu finden. Dieses Biopolymer besteht aus den sich wiederholenden Glucosederivaten D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin und bildet eine unverzweigte Polymerkette, siehe Abbildung 4b. Es ist in gesunden Gelenken für die hohe Viskosität der synovialen Flüssigkeit verantwortlich [31, 32]. Da Hyaluronan jedoch scherverdünnend ist, nimmt die Viskosität mit der Scherrate ab. Daher wird vermutet, dass bei hohen Scherraten die Viskosität der synovialen Flüssigkeit nicht mehr von Hyaluronan bestimmt wird [19]. Demzufolge müssen andere Mechanismen diese Aufgabe übernehmen. Hyaluronan kann selbst nur begrenzt zur Grenzflächenschmierung beitragen, und es sind zudem keine synergetischen Effekte mit dem oberflächenaktiven Proteoglykan Lubricin bekannt [17].

Darüber hinaus sind diverse Phospholipide in der synovialen Flüssigkeit und an der Knorpeloberfläche zu finden, wo sie geordnete multilamellare Strukturen bilden [33, 34]. Das Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) ist eine der Hauptkomponenten der gesättigten Lipide und hat an diesen etwa einen Anteil von 45%. Die Lipide sind ein wesentlicher Faktor in der Grenzflächenschmierung, was durch Experimente und Simulationen untermauert wird. An Modellsystemen konnten Reibungskoeffizienten beobachtet werden, die den Werten in Gelenken sehr nahekommen [8, 35–38].

Somit wird ersichtlich, dass die makromolekularen Bestandteile durch Selbstorganisation funktionelle Schlüsselstrukturen bilden müssen, da sie einzeln die beobachteten Eigenschaften von synovialen Gelenken nicht erklären. Diese Strukturen werden durch molekulare Wechselwirkungen bestimmt, die sich durch Druck oder Scherkräfte ändern können und so eine Anpassung unter hohen Belastungen ermöglichen [39].

2.2 Untersuchung der Selbstorganisation von Makromolekülen in Modellsystemen der synovialen Flüssigkeit

Die spezifischen makromolekularen Strukturen müssen aufgrund der Komplexität der Synovialflüssigkeit mittels eines multimodalen Ansatzes untersucht werden, siehe Abbildung 5. Ausgehend von den Erkenntnissen in der Literatur, dass Lipide selbst erheblich die Reibung verringern können, ist die Untersuchung der Wechselwirkung und Anordnung von Lipiden eines der zentralen Motive, der hier dargestellten Forschungsarbeiten [12–19]. Dabei habe ich untersucht, wie zum einen die Zusammensetzung der synovialen Flüssigkeit und zum anderen externe Parameter wie Druck die molekularen Wechselwirkungen beeinflussen.

Zur Untersuchung dieser makromolekularen Strukturen und des Phasenverhaltens von Lipiden im Volumen wurden Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. small-angle X-ray scattering, SAXS), dynamische Lichtstreuung (engl. dynamic light scattering, DLS), dynamische Differenzkalorimetrie (engl. scanning differential calorimetry, DSC), Raster-

kraftmikroskopie mit kolloidalen Sonden (engl. colloidal probe atomic force microscopy) sowie Molekulardynamik-Simulationen (MD) eingesetzt. Röntgenkleinwinkelstreuung ermöglicht die Untersuchung der Struktur von Makromolekülen unter beliebigen Lösungsbedingungen. Dabei kann die Struktur von einzelnen Makromolekülen, aber auch von makromolekularen Komplexen in der Form von Elektronendichteverteilung bestimmt werden. Zudem erlaubt die Röntgenkleinwinkelstreuung bei der Benutzung dezidierteter Probenumgebungen die Strukturuntersuchung unter hohen Scherraten oder Drücken. Das Phasenverhalten der Lipide wurde mittels dynamischer Differenzkalorimetrie bestimmt, hierbei wird die benötigte Wärmemenge zur Erhöhung der Temperatur in einem geschlossenen System gemessen. So können mit hoher Genauigkeit die Phasenübergänge der Lipide bestimmt und der Einfluss durch die Adsorption von Makromolekülen untersucht werden. Die dynamische Lichtstreuung verwendet gestreutes Laserlicht, um die Diffusion von Partikeln zu bestimmen. Über die Stokes-Einstein-Beziehung ist man anschließend in der Lage, eine Partikelgröße auszurechnen. Rasterkraftmikroskopie mit kolloidalen Sonden erlaubt es, die Reibungskoeffizienten an Grenzflächen zu messen. Dabei wird an die Spitze eines Rasterkraftmikroskops ein kolloidalles Partikel geklebt, das es ermöglicht, die Wechselwirkungskräfte an Oberflächen zu messen. Detaillierte Einblicke in die molekularen Wechselwirkungen lassen sich mithilfe von Molekulardynamik-Simulationen gewinnen, wo Gleichgewichtszustände auf Grundlage von definierten Wechselwirkungspotenzialen simuliert werden. Durch den Vergleich der Simulationen mit den experimentellen Ergebnissen, können zum einen die Daten validiert werden und zum anderen Wechselwirkungen auf der molekularen Ebene besser verstanden werden.

Neben Strukturen im Volumen ist die Adsorption an Grenzflächen ebenso von Bedeutung. Hier sind oberflächensensitive Techniken wie Röntgenreflektivitäten (engl. x-ray reflectivity, XRR) hilfreich, da sie es erlauben, die Struktur von makromolekularen Fil-

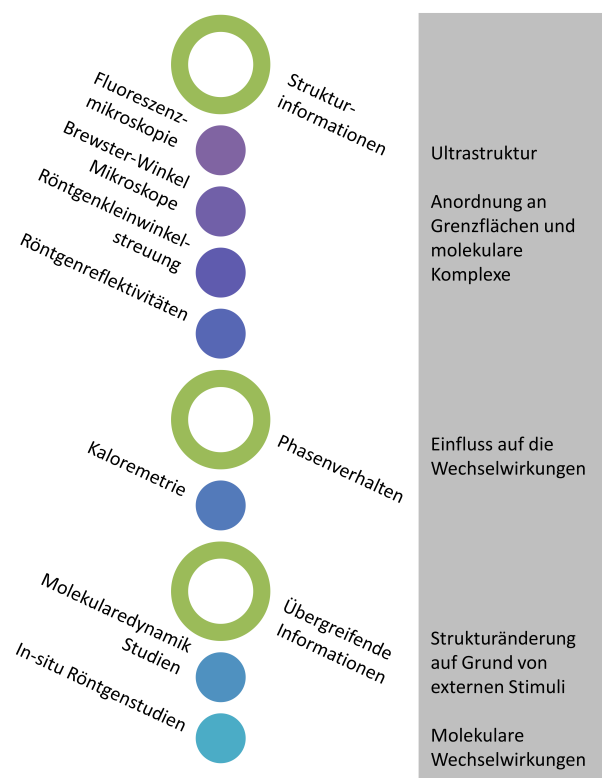


Abbildung 5: Multimodaler Ansatz zur Untersuchung der synovialen Flüssigkeit.

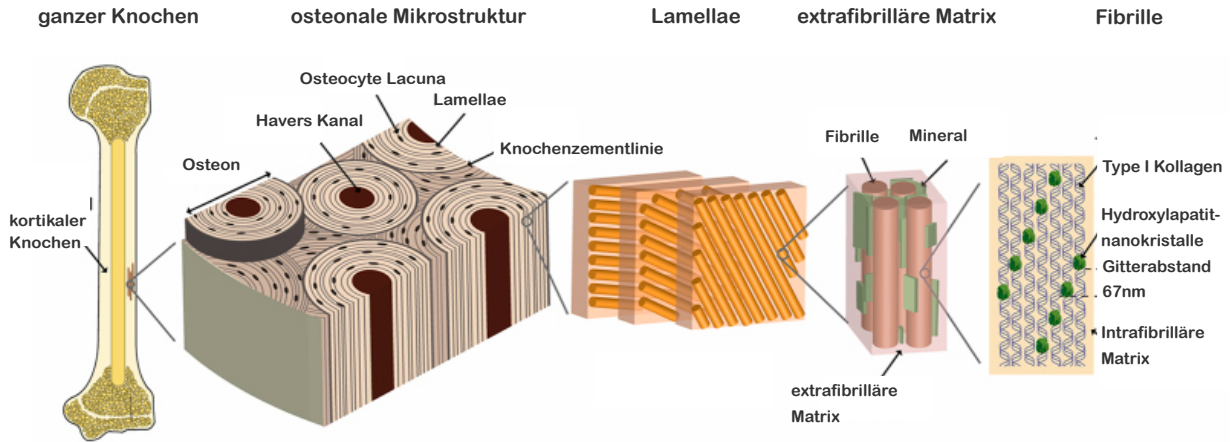


Abbildung 6: Hierarchische Struktur des Knochens. Der kortikale Knochen besteht auf mikrostruktureller Ebene aus grundlegenden Struktureinheiten, den zylindrisch geformten Osteonen. Im Zentrum eines jeden Osteons befindet sich der Haverssche Kanal, der Blutgefäße und Nerven enthält. Er ist konzentrisch von Lamellen umgeben. Die Lamellen bestehen aus angeordneten Kollagenfasern, die aus Kollagenfibrillen zusammengesetzt sind und ihrerseits aus Kollagen und Hydroxylapatit bestehen. Adaptiert von Zimmermann et al. [40]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 Lizenz.

men als Elektronendichteverteilung senkrecht zur Oberfläche mit hoher Auflösung zu bestimmen. Neben der Schichtdicke können die Rauigkeit und die innere Struktur unter Umgebungsbedingungen und *in situ* unter hohen Drücken gemessen werden. Die Struktur von Lipidfilmen parallel zur Oberfläche lässt sich mit Röntgendiffraktion unter streifendem Einfall (engl. grazing incidence diffraction, GID) bestimmen, da Lipide eine zweidimensionale periodische Struktur an Grenzflächen aufweisen. Hier kann neben den Abständen der Lipide auch der Kippwinkel der Alkylketten berechnet werden. Ebenso bietet die Messung von Oberflächen-Isothermen wertvolle Einblicke, bei denen die Oberflächenspannung eines monomolekularen Lipidfilms an der Wasseroberfläche als Funktion der verfügbaren Fläche bestimmt wird. Des Weiteren wurde Brewster-Winkel-Mikroskopie (engl. brewster angle microscopy, BAM) benutzt, die es erlaubt, die verschiedenen Lipidphasen an Oberflächen auf der Mikrometer-Längenskala sichtbar zu machen. Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Makromoleküle mit Fluoreszenzmarkern versehen, und die verschiedenen adsorbierten Makromoleküle können durch gezielte Anregung sichtbar gemacht werden. Diese Methoden wurden benutzt, um die sich bildenden Komplexstrukturen zwischen Proteinen, dem Biopolymer Hyaluronan und geordneten Lipidstrukturen unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen und damit einen Einblick in die molekularen Wechselwirkungen zu erlangen.

2.3 Einfluss externer Stimuli auf die Reorganisation hierarchischer Knochenstrukturen

Knochen ist ein Material, das einer ständigen Reorganisation unterliegt, sei es aufgrund von körperlichen Veränderungen oder äußeren Einflüssen. Im gesunden Zustand wird hierbei eine hierarchische Struktur gebildet, die eine hohe Stabilität und zugleich ein niedriges Gewicht aufweist. Jedoch können Krankheiten wie zum Beispiel avasculare Nekrose des femoralen Hüftknochens oder äußere Einflüsse wie ein Knochentrauma diese Reorganisation beeinflussen. In den erwähnten Beispielen kann durch klinische Maßnahmen versucht werden, die Knochenheilung durch Elektrostimulation bei avasculärer Nekrose des femoralen Hüftknochens oder durch eine Stabilisierung des Traumas durch ein Implantat zu unterstützen. Diese Eingriffe führen aber zu Veränderungen in den Selbstorganisationsprozessen und damit zu einer Beeinflussung der Knochenreorganisation.

Die Elektrostimulation des Knochenwachstums wird teilweise bereits als Therapie eingesetzt, obwohl sie immer noch in klinischen Studien untersucht wird. Eine der bereits angewandten Prozeduren basiert auf einem Paar elektrischer Spulen mit zwei implantierten Elektroden [41]. Eine Spule mit angeschlossenen Elektroden ist in den Knochen implantiert und wird durch ein magnetisches Feld angeregt, das von einer Spule außerhalb des Körpers erzeugt wird. Ein auf diesem Konzept entwickeltes Knochenimplantat wird als BISS-Asnis-III-Series-Schraube (Stryker-Trauma, Kiel, Deutschland) bezeichnet [42]. Nach der Implantation der Empfängerschraube muss der Patient dreimal täglich für 45 Minuten die Sendespule anlegen. Dabei wird ein sinusförmig oszillierendes Magnetfeld erzeugt, das seinerseits durch Induktion im Empfängerimplantat ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden erzeugt. Innerhalb des aktiven Bereichs um das Implantat wird dadurch das Knochenwachstum angeregt [41]. Dieses System konnte somit positive Effekte auf die Knochenregeneration zeigen [43]. Eine Forschungshypothese geht davon aus, dass die elektrischen Felder über den inversen piezoelektrischen Effekt an den Knochen koppeln und eine mechanische Belastung auf die Knochenultrastruktur ausgeübt wird [44].

Im Bereich der Knochentraumabehandlung sind ähnliche Fragen zu beantworten, die jedoch andere Zusammenhänge aufweisen. Für die Knochentraumabehandlung werden heutzutage nicht abbaubare Implantate eingesetzt. Ihr Vorteil ist, dass sie in vorhergesehener Weise mit dem Knochen wechselwirken [45]. Allerdings haben diese Implantate den Nachteil, dass sie zum Teil wieder entfernt werden müssen und keine aktiven wachstumsstimulierenden Funktionen aufweisen. Die Kopplung von aktiven Eigenschaften, die die hierarchischen Prozesse beeinflussen, würde es jedoch erlauben, die Funktionalität dieser Implantate zu erweitern. Hierfür bieten sich biologisch abbaubare Implantate auf Basis von Magnesium an. Zum einen konnten sowohl *in-vivo* als auch

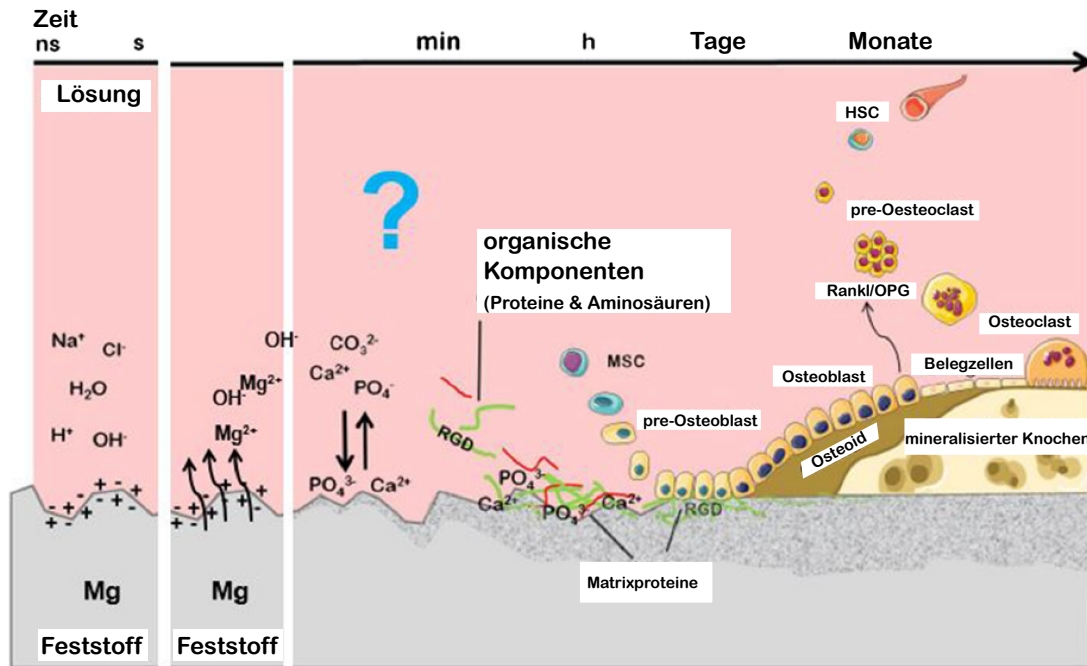


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Prozesse, die nach der Implantation von Mg-basierten Materialien ablaufen. Die Degradationsschicht wird durch die unregelmäßige gräuliche Färbung dargestellt. Adaptiert von Willumeit et al. [49]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 Lizenz.

in-vitro Versuche zeigen, dass das Knochenwachstum in der Gegenwart von magnesiumbasierten Implantaten durch eine erhöhte Expression des Calcitonin Gene-Related Peptides (GCRP) bzw. Osteopontin-Makern erhöht wird [46, 47]. Des Weiteren sind die mechanischen Eigenschaften von Magnesium dem Knochen ähnlich und es degradiert unter physiologischen Bedingungen, was eine zweite Operation zur Entfernung des Implantates überflüssig macht und so das Patientenwohlbefinden erhöht [48].

Die große Herausforderung besteht darin, den Abbau der Implantate so zu kontrollieren, dass die biologische Umgebung nicht negativ beeinträchtigt wird und das Implantat seine Funktion für eine definierte Zeit erfüllen kann. Es finden jedoch komplexe Prozesse statt, da zum einen die Zellreaktionen und zum anderen die Degradation sich gegenseitig beeinflussen können. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 7 gezeigt. Unter optimalen Bedingungen würde der Abbau Hand in Hand mit der Knochenregeneration gehen, sodass der Knochen die tragende Funktion des Implantats wieder übernehmen kann, während das Implantat abgebaut wird. Jedoch würde eine zu schnelle Degradation nicht nur zu einem schnellen Versagen des Implantats führen, sondern auch zu einer Beeinträchtigung des biologischen Gewebes durch eine starke Wasserstoffentwicklung, Ionenfreisetzungen und Veränderungen des pH-Wertes.

Der Aufbau und die Reorganisation der hierarchischen Knochenstrukturen im Heilungsprozess finden in verschiedenen Stufen statt [50, 51]. So wird im Anschluss an

die Kallusbildung zuerst Geflechtknochen gebildet, der im weiteren Verlauf zu lamellarem Knochen reorganisiert wird. Die Ultrastruktur des Geflechtknochens hat eine hohe Mineralisierung von Hydroxylapatit, wobei die plättchenförmigen Kristallite vergleichsweise groß sind und eine geringe Orientierung aufweisen. Bei der Reorganisation zum lamellaren Knochen ist eine Rekristallisation zu beobachten, bei der die Kristallitgröße abnimmt und eine verbesserte Orientierung der plättchenförmigen Kristalle zu beobachten ist. An dieser Stelle gehen die Kollagenmatrix und die Hydroxylapatitkristalle eine Verbindung ein und tragen somit synergetisch zu den mechanischen Eigenschaften von Knochen bei [52].

Diese natürliche Knochenreorganisation und somit die hierarchische Struktur und ihre mechanischen Eigenschaften können durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Da Magnesium im Körper natürlich vorkommt, ist der Abbau und die Wechselwirkung zwischen dem Magnesium und Knochengewebe komplex. Im Kontext der abbaubaren Implantate sind wichtige Faktoren die chemischen Einflüsse, wie die Freisetzung von Ionen, der pH-Wert, zelluläre Prozesse oder die chemische Substitution [45]. Auch Mikrobewegungen eines Implantats durch den Abbauprozess könnten Veränderungen zur Folge haben, die eine Kallusbildung, eine verstärkte Verbindung von Knochenfragmenten oder Angiogenese begünstigen [53].

Bisher liegen keine ausreichenden Daten vor, um den gesamten Einfluss der Magnesiumdegradation auf die hierarchische Knochenstruktur beschreiben zu können [54]. Neben den genauen Prozessen der Magnesiumdegradation auf der Mikroskala müssen die Einflüsse auf die Osseointegration, das heißt, die Knochenbildung um das Implantat, und ebenso auf die Knochenultrastruktur, die durch Parameter auf der Nanoskala definiert wird, untersucht werden [55, 56].

2.4 Untersuchung von Knochenstrukturen mit hochauflösenden Röntgentechniken

Um sowohl ein vollständiges Verständnis der Knochenremodellierung als auch von Degradationsprozessen zu erlangen, bedarf es innovativer Untersuchungsmethoden. Es müssen Erkenntnisse auf der Mikroskala, der Nanoskala und der Knochenultrastruktur gewonnen werden, da die hierarchische Organisation des Knochens auf verschiedenen Ebenen angepasst wird [57, 58]. Wie in Abbildung 8 zusammengefasst, muss hierfür eine Charakterisierung von der Materialmikrostruktur bis hin zu *in-vivo* Experimenten erfolgen. Die Erzeugung eines solchen multimodalen Datensatzes gekoppelt mit einer korrelativen Analyse erlaubt es anschließend, Informationen von verschiedenen hierarchischen Ebenen zu verbinden und damit einen tieferen Einblick zu erlangen.

In diesem Kontext bieten Röntgentechniken, die sich die Synchrotronstrahlung zunutze machen, einzigartige Möglichkeiten. Diese erlauben es, die Strukturen mit hoher Auflösung zu untersuchen und *in-situ* Messungen durchzuführen. Da Knochen



Abbildung 8: Multimodaler Ansatz zur Untersuchung hierarchischer Knochenstrukturen.

kein homogenes Material ist, stellt zum Beispiel die Modellierung der Knochenmechanik eine Herausforderung dar. Jedoch können Experimente weiterhelfen, die hochauflösende Bildgebung mit mechanischen Tests kombinieren. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen einer Kollaboration ein Messaufbau entwickelt, der es erlaubt, hochauflösende Tomographiemessung (μ CT) am Messplatz P05, Petra III, DESY, zu machen, während eine *ex-vivo* Probe einem mechanischen Belastungstest unterzogen wird. Aus den rekonstruierten dreidimensionalen Strukturinformationen kann so die Entstehung von Rissen und das Versagen einer Implantatschraube direkt mit den Kraftmessungen verglichen werden.

Raster-Röntgenkleinwinkelstreuung und Diffraktion (engl. x-ray diffraction, XRD) erlaubt es, die Knochenultrastruktur im Hinblick auf die Organisation der Kollagenmatrix, mechanische Spannungen, die Kristallparameter und Größe des anorganischen Hydroxylapatits zu untersuchen. Da die Hydroxylapatitkristalle zwischen den Kollagenfibrillen mineralisiert werden, sind die Kristalle einige Nanometer große Plättchen, wobei die Längsachse entlang der Kollagenfaser orientiert ist. Daher erzeugen sie ein anisotropes Röntgenkleinwinkelsignal, das eine Aussage über die Orientierung der Kollagenmatrix erlaubt. Ebenso kann aus den Röntgenkleinwinkeldaten die Dicke der Plättchen berechnet werden. Röntgendiffraktion erlaubt es, orts aufgelöst die Kristallparameter zu bestimmen und lässt daher Rückschlüsse auf die Kristallgrößen oder Gitterebenenabstände zu. Mithilfe dieser Techniken wurden im Rahmen der hier zusammengefassten Studien der Einfluss von Elektrostimulation und die Veränderung der Knochenultrastruktur durch biologisch abbaubare Magnesiumimplantate untersucht.

3 Zusammenfassung ausgewählter Publikationen

Die dargestellten Arbeiten gliedern sich in zwei Themenblöcke. Der erste Block behandelt die Untersuchung von Modellsystemen der synovialen Flüssigkeit. Hierbei wurde gezielt die Bildung von Komplexen aus Proteinen, Hyaluronan und geordneten Lipidstrukturen (Vesikel und Lipidschichten) untersucht. Dabei lag der Fokus auf den molekularen Wechselwirkungen und deren Veränderungen durch die Ionenzusammensetzung der Lösung, den Druck und Scherkräften, um die sich bildenden Strukturen verstehen zu können. Der zweite Themenblock fokussiert sich auf den Einfluss des piezoelektrischen Effekts und von biologisch abbaubaren Magnesium-Implantaten auf die Knochenultrastruktur. Die erzielten Erkenntnisse tragen dazu bei, die Knochenremodellierung und den Implantatabbau besser zu verstehen und Möglichkeiten für weitere Optimierungen zu öffnen.

Die experimentellen Arbeiten wurden entweder von mir selbst, in Kooperation mit anderen Wissenschaftlern oder im Rahmen von Doktorarbeiten durchgeführt, an deren Betreuung ich beteiligt war. Die wesentlichen Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Professorin Regine Willumeit-Römer, Institut für metallische Biomaterialien, Helmholtz Zentrum Hereon, Geesthacht, durchgeführt.

3.1 Selbstorganisation von Makromolekülen in Modellsystemen der synovialen Flüssigkeit

Die synoviale Flüssigkeit ist, wie in der Einleitung dargelegt, ein Gemisch aus verschiedenen Makromolekülen, die jeweils spezifische Funktionen haben. Um diese Funktionen und deren Zusammenspiel zu verstehen, ist es notwendig, zunächst vereinfachte und kontrollierbare Modellsysteme zu untersuchen. Da Lipide ein wichtiger Bestandteil der synovialen Flüssigkeit sind, konzentrierten sich Untersuchungen auf deren Eigenschaften zur Reibungsminimierung und Wechselwirkung mit anderen Komponenten wie Hyaluronan. Ziel der Studien war, das Verhalten von Lipidschichten zur Reibungsminimierung unter verschiedenen Bedingungen wie Druck, Temperatur, Einfluss der Ionenkonzentration, der Grenzfläche und des Einflusses durch die Adsorption von Hyaluronan zu untersuchen. Als Modell-Lipid wurde DPPC verwendet, da es ein wesentlicher Bestandteil der synovialen Flüssigkeit ist. Es wurden Lipidvesikel im Volumen und Lipiddoppelschichten sowohl an der Flüssig-Fest- als auch an der Flüssig-Luft-Grenzfläche untersucht. Dadurch war es möglich, ähnlich geordnete Lipidschichten zu erzeugen, wie sie zum Beispiel in der synovialen Flüssigkeit selbst oder an der Knorpeloberfläche zu finden sind, da die Knorpelgrenzfläche auch als eine Flüssig-Fest-Grenzfläche anzusehen ist. Als Substrat wurden glatte Siliziumgrenzflächen verwendet, da andere Systeme nicht mit allen Untersuchungstechniken vereinbar gewesen wären.

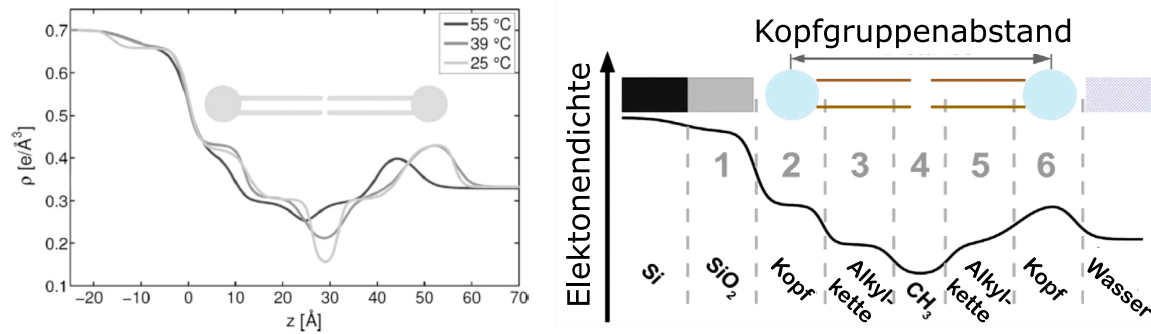


Abbildung 9: Untersuchung der Schichtstruktur von DPPC Doppelschichten an einer Silizium-Wasser-Grenzfläche bei verschiedenen Temperaturen. Die Daten wurden mittels Röntgenreflektivitäten aufgenommen. Links: Elektronendichteverteilung, z gibt den Abstand von der Siliziumgrenzfläche an, die sich bei $z = 0$ befindet. Zur Anpassung der Elektronendichteverteilung wurde ein Modell mit 6 Schichten verwendet. Die Skizze zeigt beispielhaft die Doppelschichtstruktur. Die Grafik wurde aus Wang et al. entnommen [59]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY-4.0-Lizenz. Rechts: Schematisches Elektronendichteprofil für eine DPPC-Doppelschicht an der Flüssig-Fest-Grenzfläche, das das verwendete Modell aus 6 Schichten zeigt. Die Abbildung wurde aus Zander et al. entnommen und adaptiert [60]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY-4.0-Lizenz.

3.1.1 Einfluss der molekularen Wechselwirkungen auf die Selbstorganisation von Makromolekülen in der synovialen Flüssigkeit

Die Eigenschaften von DPPC-Strukturen hängen von der Phase ab, in der sich die Lipide befinden [61, 62]. Bei einem Umgebungsdruck von 1 bar kann DPPC in drei Phasen vorliegen: als sogenannte L_α -, $P_{\beta'}$ - und $L_{\beta'}$ -Phase. Abbildung 10 zeigt das Phasendiagramm inklusive der Strukturschemata.

Lipide können an Grenzflächen adsorbieren und bilden dabei Doppelschichten, bei denen die hydrophilen Teile entweder zum Wasser oder zur Grenzfläche orientiert sind. Die hydrophoben Alkylketten sind zueinander orientiert. Die Gegenwart einer Grenzfläche ändert jedoch das beschriebene Phasenverhalten, da die molekularen Wechselwirkungen durch die Grenzfläche beeinflusst werden. So zeigen temperaturabhängige Untersuchungen mittels Röntgenreflektivitäten und kolloidaler Raster-Kraft-Mikroskopie, dass DPPC-Doppelschichten an der Silizium-Wasser-Grenzfläche lediglich in zwei Phasen vorliegen können und nur ein Übergang von der L_α - zur $L_{\beta'}$ -Phase möglich ist [59]. In Abbildung 9 ist die Elektronendichteverteilung von DPPC-Doppelschichten an der Silizium-Wasser-Grenzfläche dargestellt. Ebenso zeigt die Abbildung das verwendete Modell, mit dem die Elektronendichteverteilung aus den Messdaten berechnet wird. Bei den drei untersuchten Temperaturen ist DPPC im Volumen in verschiedenen Phasen vorzufinden, die durch eine unterschiedliche Struktur gekennzeichnet sind. Die Daten zeigen eindeutig, dass die Doppelschicht bei 25 °C und 39 °C die gleiche Struktur aufweist und damit die $P_{\beta'}$ -Phase unterdrückt ist. Diese Beobachtung wurde ebenso von anderen Autoren mithilfe von DSC-Messungen gemacht [23, 63].

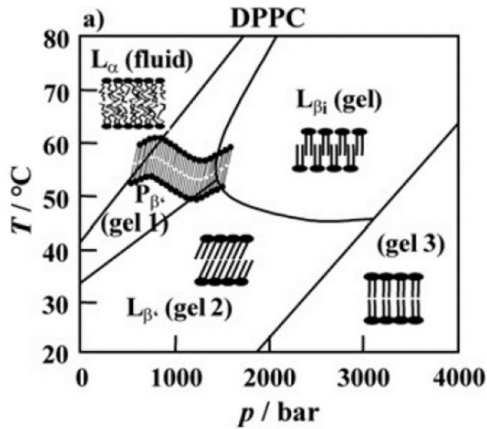


Abbildung 10: Phasendiagramm von DPPC als Funktion des Druckes und der Temperatur [62]. Wiederveröffentlichung mit Genehmigung von der Royal Society of Chemistry, von „Effect of pressure on membranes“, R. Winter und C. Jeworrek, *Soft Matter*, 17, 2005; die Genehmigung wurde durch Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

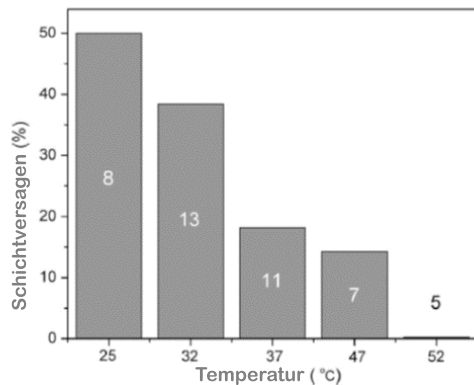


Abbildung 11: Prozentuale Anzahl der Reibungsexperimente bei variierenden Temperaturen, wo die Lipidschicht bis zu einem mechanischen Druck von 20 nN stabil war. Die Zahlen in jedem Balken geben die gesamte Anzahl der jeweiligen Experimente an. Die Grafik wurde aus Wang et al. entnommen [59], veröffentlicht unter der Creative Commons BY-NC-ND 4.0 Lizenz.

Interessanterweise konnten in den AFM- und XRR-Messungen zwei verschiedene Übergangstemperaturen von der L_α - in die $L_{\beta'}$ -Phase von 32 °C bzw. 39 °C beobachtet werden [59]. Es wird angenommen, dass dies an dem Einfluss der AFM-Spitze liegt, die ihrerseits Energie in das System überträgt und dadurch die Übergangstemperatur verringert [64]. Die XRR-Messungen konnten des Weiteren einen Anstieg der Oberflächenrauigkeit der Lipidschicht mit der Temperatur zeigen, was sich ebenso in einer erhöhten Abstoßung durch Protrusion in den AFM-Messungen bemerkbar macht [59]. Die Reibungsmessungen, die mittels kolloidaler Rasterkraft-Mikroskopie durchgeführt wurden, zeigen hingegen einen niedrigen Reibungskoeffizienten, der nahezu temperaturunabhängig ist [59]. Jedoch wurde die Belastbarkeit der Lipidschichten mit der Erhöhung der Temperatur, das heißt, mit einer erhöhten Fluidität der Lipide, besser [59]. Das prozentuale Versagen der Lipidschicht bis zu einem mechanischen Druck von 20 nN und die damit einhergehende Erhöhung des Reibungskoeffizienten wurde deutlich geringer, wie in Abbildung 11 zu sehen ist. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung ist eine verbesserte Selbstheilung der Lipidschichten aufgrund einer verbesserten lateralen Fluidität, da einzelne Lipide infolge des Druckgradienten einfacher in Defekte diffundieren können. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese sind Untersuchungen mit scharfen AFM-Spitzen, wo die Stabilität unabhängig von der Temperatur ist [65]. Unter diesen Bedingungen dringen die AFM-Spitzen einfach zwischen die Lipide und durchdringen die Doppelschichtstruktur.

Ähnlich geringe Reibungskoeffizienten wie für reine DPPC-Schichten sind auch für sequenziell absorbierte DPPC- und Hyaluronanschichten gezeigt worden [21, 66]. Jedoch ist eine solche Struktur in der synovialen Flüssigkeit unwahrscheinlich, da Hyaluronan und DPPC selbstorganisierende Strukturen bilden können, bevor eine Adsorption an Oberflächen stattfindet. Dieses bestätigt sich in Kleinwinkelstreuuntersuchungen an DPPC-Vesikeln in Lösungen mit Hyaluronan [36]. In Abbildung 12 sind die berechneten Elektronendichteverteilungen gezeigt, die durch die Modellierung der Streukurven entstanden sind. Es ist zu erkennen, dass Hyaluronan eine Schicht auf der Oberfläche von DPPC-Vesikeln bildet, wobei die Struktur der DPPC-Vesikel nicht beeinflusst wird. Messungen mit einer Quarzkristall-Mikrowaage, die die Adsorption der Hyaluronan-DPPC-Vesikeln verfolgte, zeigen, dass sich ein dünner Hyaluronan-DPPC-Film an der flüssig-fest Grenzfläche bildet und eine weitere Adsorption nicht stattfindet [36]. Der sich bildende Film ist sehr inhomogen, hat aber Reibungseigenschaften, die vergleichbar mit den reiner DPPC-Doppelschichten sind. Die Reibungsuntersuchungen zeigen zudem, dass die sich bildenden Aggregate durch die Scherkräfte zerstört werden. Daher kann geschlossen werden, dass die Strukturen durch die Scherkräfte in multilamellare Strukturen transformiert werden können und dadurch eine gute Reibung ermöglicht wird [21]. Vermutlich haben diese Schichten aus selbstorganisierenden Hyaluronan-DPPC-Strukturen auch eine bessere Defektheilung, da sich auf der Oberfläche ein Reservoir an Aggregaten befindet, das Leerstellen auffüllen kann [36].

Um die Selbstorganisation von Lipiden und Hyaluronan besser zu verstehen, wurden die Faktoren genauer untersucht, die Einfluss auf die molekularen Wechselwirkungen haben. In der synovialen Flüssigkeit kommen neben Natriumchlorid, das mit einer Konzentration von 155 mM vorliegt, auch andere Ionen wie Calcium mit 4 mM vor [67]. Solche zweiwertigen Ionen können die Selbstorganisation von Lipidstrukturen verändern oder die Ladungsdichte von Hyaluronan beeinflussen, indem sie an die Carboxylgruppe binden [68]. Verschiedene wissenschaftliche Beobachtungen deuten zudem auf einen Einfluss des molekularen Gewichts von Hyaluronan bei den Wechselwirkungen hin [69]. So wurde berichtet, dass bei entzündlichen Gelenkrankheiten die Konzentra-

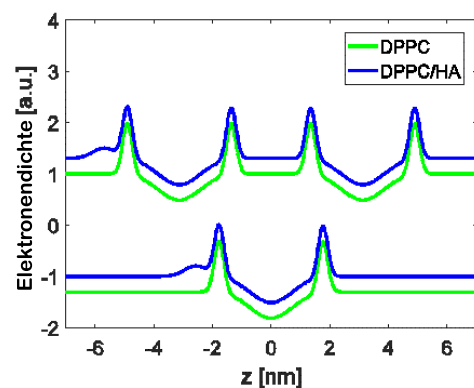


Abbildung 12: Elektronendichteverteilung von unilamellaren (oben) und bilamellaren (unten) Vesikeln ohne (blau) und mit Hyaluronan (grün). Die DPPC-Moleküle, die dem Volumen zugewandt sind, befinden sich auf der linken Seite. Die rechte Seite entspricht dem Vesikelinneren. Die Grafik wurde aus Raj et al. entnommen [36], veröffentlicht unter der Creative Commons BY-NC-ND 4.0 Lizenz.

tion und das molekulare Gewicht von Hyaluronan verändert ist [69–71]. Ebenso konnte in Elektronenmikroskopieuntersuchungen ein Einfluss des molekularen Gewichts von Hyaluronan auf die selbstorganisierenden Strukturen von Lipiden beobachtet werden [72]. Um die bestimmenden Faktoren für diese Beobachtungen besser zu verstehen, wurden monomolekulare Langmuir-Filme aus DPPC an der Wasser-Luft-Grenzfläche untersucht, an die Hyaluronan adsorbieren konnte. In den Experimenten wurden sowohl das molekulare Gewicht von Hyaluronan als auch die Ionenzusammensetzung in der Subphase variiert (155 mM NaCl mit 10 mM Ca vs. 155 mM NaCl).

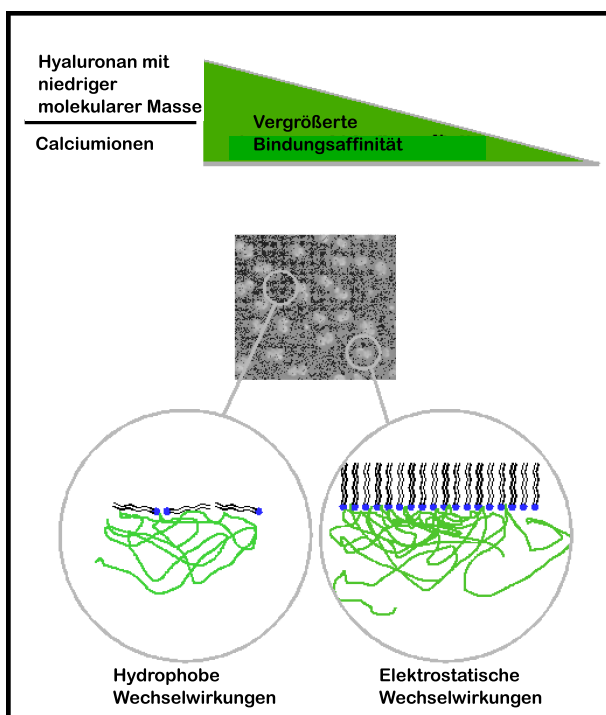


Abbildung 13: Schemazeichnung zur Wechselwirkung von Hyaluronan und DPPC an der Wasser-Luft-Grenzfläche. Die Abbildung wurde aus der Veröffentlichung von Wieland et al. entnommen [73]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY-3.0-Lizenz.

Einblicke in die Dicke der Lipidfilme mit Nanometer-Auflösung und erlauben so, die Adsorption von Molekülen zu beobachten. Die zweidimensionale kristalline Struktur in den Domänen kann mit Oberflächen-Diffraktion untersucht werden. Darüber hinaus erlauben Langmuir-Isothermen, das Phasenverhalten zu untersuchen. Daher wurden diese Techniken kombiniert, um die strukturellen Änderungen in der lateralen und vertikalen Filmstruktur mit den molekularen Wechselwirkungen in Verbindung zu setzen.

Untersuchungen an DPPC-Filmen auf Subphasen mit einer Ionenzusammensetzung

Amphiphile Lipide bilden an flüssigen Oberflächen geordnete Strukturen, bei denen die hydrophile Gruppe (Kopfgruppe) zum Wasser und die hydrophobe Gruppe (Alkylkette) zur Luft orientiert ist. Entlang der Oberfläche bilden die Lipide geordnete Domänen, wobei innerhalb der Domäne eine vom Oberflächendruck abhängige Phase vorliegt, die den Volumenphasen entspricht [61]. Innerhalb dieser Domänen haben die Lipide eine zweidimensionale kristalline Ordnung [74, 75]. Diese monomolekularen Lipidfilme, auch Langmuirfilme genannt, bieten aufgrund ihrer simplen Struktur die Möglichkeit, viele Parameter zu untersuchen, da sich zum einen die Phasen der Lipide einstellen und zum anderen die Bedingungen der wässrigen Subphase verändern lassen. Oberflächensensitive Brewster-Winkel-Mikroskopie-Messungen erlauben es, die Domänenstruktur und Verteilung auf der Mesoskala zu charakterisieren. Röntgenreflektivitäten hingegen geben

von 155 mM NaCl bzw. 10 mM CaCl_2 /155 mM NaCl belegen einen starken Einfluss auf die Organisation der DPPC-Langmuir-Filme durch Calciumionen [73]. So zeigen die Isothermen eine Verschiebung der Phasen hin zu geringen Kopfgruppenflächen und eine erhöhte Kompressionsfähigkeit des Langmuirfilms [73]. Die laterale Struktur innerhalb der DPPC-Domänen, die mittels Oberflächen-Diffraktion untersucht wurde, zeigt bereits bei 10 mNm^{-1} eine geordnete Struktur und damit das Vorhandensein einer gekippten kondensierten Lipidphase. Eine Erklärung liefert hierbei die zwitterionische Struktur von DPPC. Die negativ geladene Sauerstoffgruppe befindet sich seitlich in der Kopfgruppe und eine Ladungsinversion durch die Bindung von Calciumionen könnte zu einer höheren lateralen Ordnung führen [76].

In der Gegenwart von Hyaluronan in einer Subphase mit 155 mM NaCl ist eine Adsorption an die DPPC-Langmuir-Filme zu beobachten [36, 73]. Dabei bindet Hyaluronan zum einen an die Kopfgruppe und zum anderen entstehen oberflächenaktive Aggregate, die sich zwischen den geordneten DPPC-Domänen befinden. Es sind also zwei Mechanismen beteiligt, die die Interaktion von Hyaluronan und DPPC bestimmen. Diese ist in Abbildung 13 schematisch zusammengefasst. Diese Schlussfolgerung konnte aus der Kombination der verwendeten Messmethoden gezogen werden. So zeigen die Brewster-Winkel-Mikroskopie Messungen starke morphologische Veränderungen der lateralen Domänenstruktur und ebenso das auftreten einer Materialphase zwischen den Domänen [73]. Die Röntgenreflektivitäten belegen, dass Hyaluronan an die Kopfgruppen bindet, da sich die Filmdicke erhöht [73]. Dies ist auch im Einklang mit den oberflächensensiblen Diffraktionsmessungen, die einen erhöhten Abstand der Lipide in Gegenwart von Hyaluronan zeigen und somit direkt eine veränderte laterale Packung der Lipide offenbaren [77]. Höchstwahrscheinlich wird durch die elektrostatische Anziehung der Carboxylgruppe von Hyaluronan und der positiv geladenen Kopfgruppe von DPPC eine Akkumulation von Hyaluronan in der Kopfgruppe erzeugt, die die Bedingungen innerhalb des Films verändert und damit die Packungsdichte und Anordnung der DPPC-Moleküle verringert.

Ebenso konnte beobachtet werden, dass das molekulare Gewicht von Hyaluronan einen massiven Einfluss auf die selbstorganisierenden Strukturen hat [73]. So nimmt die Adsorption von Polymeren mit dem molekularen Gewicht zu, da die damit einhergehende Verringerung der translatorischen Entropie geringer ist [78]. Daher war es überraschend, dass Hyaluronan mit dem geringsten molekularen Gewicht von 10 kDa die größte Adsorption aufweist und die lateralen Abstände vergrößert [73]. So zeigt Abbildung 14 den Abstand der Kopfgruppen, der mittels oberflächensensitiver Röntgendiffraktion bestimmt wurde, bei verschiedenen molekularen Gewichten des Hyaluronans bei einem konstanten Oberflächendruck. Ab einem molekularen Gewicht von

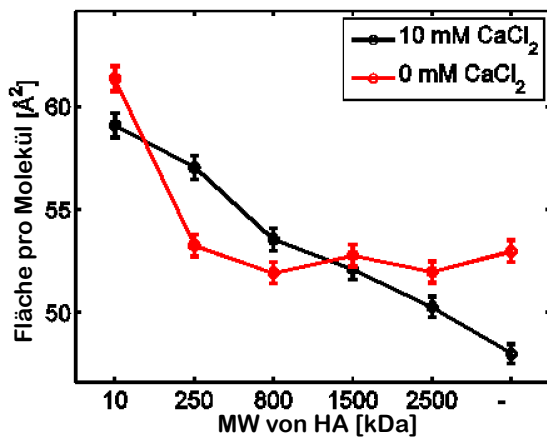


Abbildung 14: Beanspruchte Fläche der DPPC-Kopfgruppen auf verschiedenen wässrigen Subphasen bei einem konstanten Oberflächendruck von 40 mNm^{-1} . Die Abbildung wurde aus der Veröffentlichung von Wieland et al. entnommen [73]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY-3.0-Lizenz.

250 kDa kann ein Anstieg beobachtet werden, der für 10 kDa noch ausgeprägter ist. Eine mögliche Erklärung ist die Struktur von Hyaluronan. In verdünnten Lösungen wird Hyaluronan als starres Knäuel angesehen, das eine Persistenzlänge von 9 nm hat. Hyaluronan mit einem molekularen Gewicht von nur 10 kDa, das lediglich sechs Monomeren entspricht, kann daher als starrer Zylinder angenähert werden [79]. Für ein solches kurzes Polymer wird es jedoch schwierig, Intra-Ketten-Wechselwirkungen durch transiente Wasserstoffbrückenbindungen aufzubauen. Daher ist anzunehmen, dass die sekundäre Struktur des Hyalurons von Bedeutung ist. Intra-Ketten-Wechselwirkungen, die im Falle von langkettigem Hyaluronan im Inneren

des Polymeres verborgen sind, könnten bei kurzketzigem Hyaluronan zur Verfügung stehen und eine Bindung mit den DPPC-Lipiden vermehrt eingehen.

Die Zugabe von Calcium zur Subphase (150 mM NaCl mit 10 mM CaCl₂) verstärkt die Adsorption von Hyaluronan und beeinflusst die sich formenden Strukturen. Auch hier hat das molekulare Gewicht von Hyaluronan eine entscheidende Bedeutung und die Wechselwirkung nimmt mit dem molekularen Gewicht zu. Generell konnten die oberflächensensitiven Diffraktionsexperimente zeigen, dass bei allen untersuchten molekularen Gewichten von Hyaluronan in der Gegenwart von Calciumionen bereits eine geordnete zweidimensionale Struktur bei niedrigen Kompressionen vorliegt und die Moleküle in der gekippten kondensierten Phase sind. Ebenso war ein Einfluss auf die langreichweitige Ordnung in den Brewster-Winkel-Aufnahmen zu beobachten, siehe Abbildung 15. So sind die Domänen von DPPC in der Gegenwart von Calcium sowohl wesentlich kleiner als auch die Form der Domänen unregelmäßiger. Elektrophoretische Mobilitätsmessungen zeigen, dass DPPC eine höhere positive Ladung hat, wenn Calcium präsent ist. Daher kann angenommen werden, dass die beobachteten Effekte auf die erhöhte Adsorption von Hyaluronan durch eine verstärkte elektrostatische Wechselwirkung zurückzuführen sind.

In diesem Kontext sind Untersuchungen der Reibungseigenschaften dieser Systeme interessant, da eine verringerte Belastbarkeit von Multischichten aus DPPC und Hyaluronan an der Silizium-Grenzfläche beobachtet werden konnte [21]. Es wird vermutet,

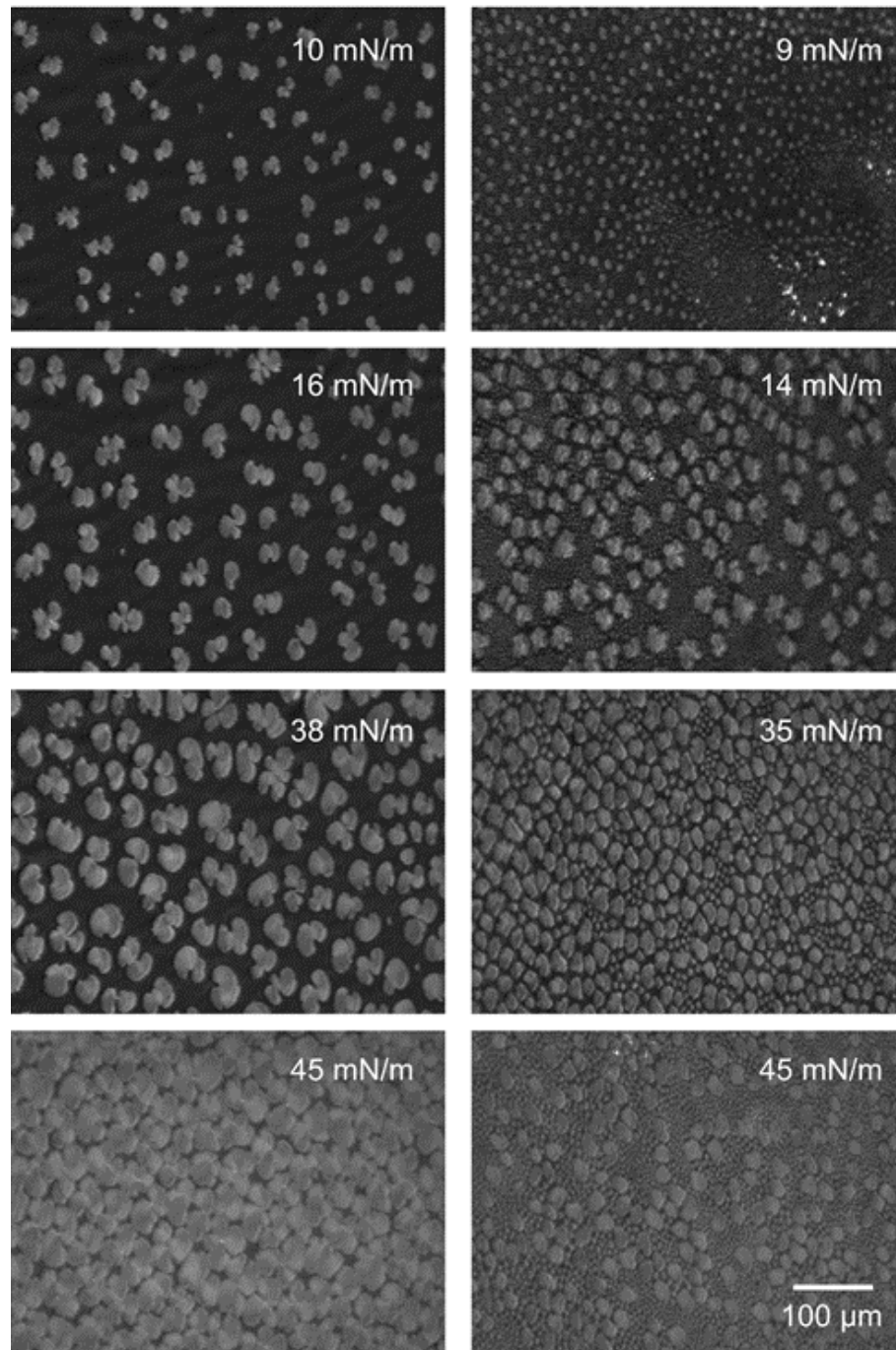


Abbildung 15: Brewster-Winkel-Mikroskopie-Aufnahmen von DPPC-Langmuirfilmen an der Wasser-Luft-Grenzfläche auf einer wässrigen Subphase mit $0.5 \text{ mg}(\text{mL})^{-1}$ Hyaluronan mit einem molekularen Gewicht von 1500 kDa. Links: Natriumchlorid ($[\text{NaCl}] = 155 \text{ mM}$). Rechts: Natriumchlorid ($[\text{NaCl}] = 155 \text{ mM}$) mit Calciumchlorid ($[\text{CaCl}_2] = 10 \text{ mM}$). Die Abbildung wurde aus Wieland et al. entnommen [73]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY-3.0 Lizenz.

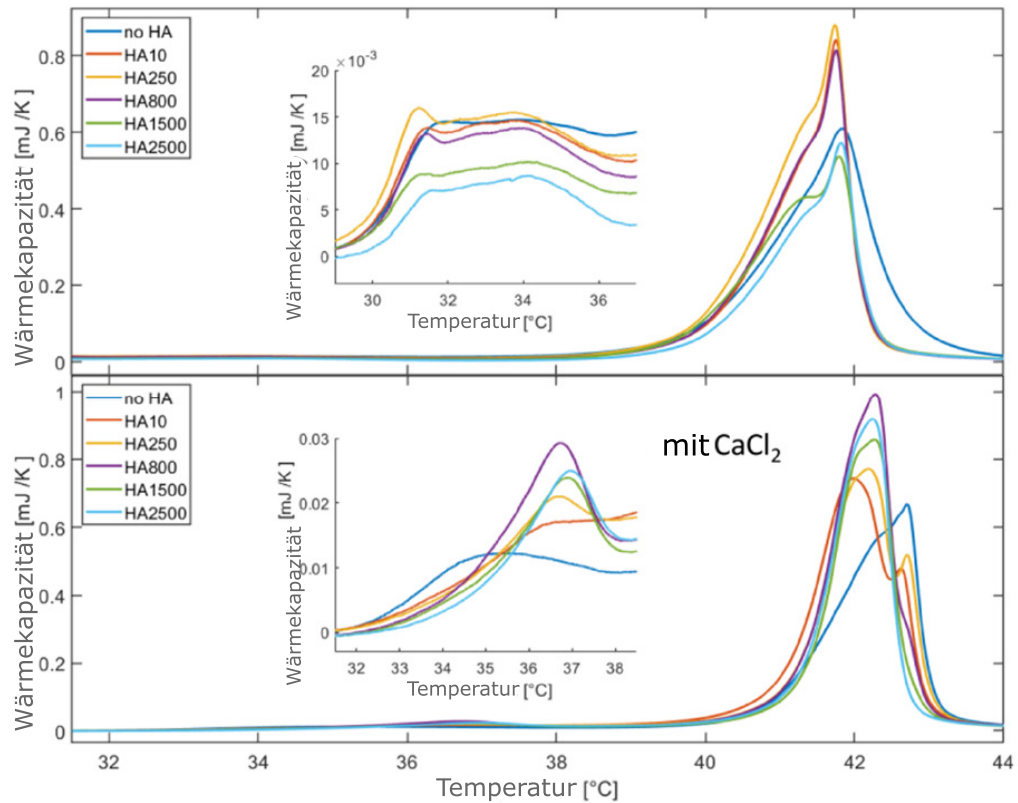


Abbildung 16: Messung der Wärmekapazität von DPPC-Vesikeln mit Hyaluronan mit verschiedenem molekularem Gewicht. Oben: 150 mM Natriumchlorid-Lösung. Die Vergrößerung zeigt die pre-Transition. Unten: 150 mM Natriumchlorid-Lösung mit 10 mM CaCl_2 . Die Vergrößerung zeigt die pre-Transition. Die Abbildung wurde aus der Veröffentlichung von Zander et al. entnommen [80]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY-4.0-Lizenz.

dass dies von der veränderten lateralen Struktur herrührt. Diese Hypothese lässt sich durch die oben beschriebenen Experimente stützen, die zeigen, dass nicht nur die Kopfgruppenanordnung verändert ist, sondern dass Hyaluronan auch in die kondensierten Alkylketten eindringen und dort den Abstand erhöhen kann. Dieser erhöhte Abstand kann zur verringerten Belastbarkeit beitragen.

Um weitere Einblicke in die Wechselwirkungen auf der molekularen Ebene zu erlangen, die durch den Einfluss des molekularen Gewichts von Hyaluronan, die hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen und das Calcium bedingt sind, wurden Studien an DPPC-Vesikeln mit einer Hyaluronan-Schicht durchgeführt, die MD-Simulationen, DSC- und DLS-Messungen kombinierten [80]. Auch diese Messungen zeigen einen deutlichen Einfluss des molekularen Gewichts von Hyaluronan auf die Wechselwirkung. Die DSC-Daten zeigen, dass die Phasenübergangstemperaturen verschoben werden und der Effekt mit der Verringerung des molekularen Gewichts zunimmt, siehe Abbildung 16. Ebenso deuten die DSC-Daten eine Wechselwirkung von Hyaluronan mit dem Glycerol der DPPC-Struktur an, da die pre-Transition beeinflusst wird, siehe die Vergrößerungen

in Abbildung 16. Die DLS-Daten zeigen eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius an, der zum einen vom molekularen Gewicht des Hyaluronans und zum anderen von der Calciumkonzentration abhängt. Dies deutet somit auf eine vermehrte Bindung von Hyaluronan hin und ist in Übereinstimmung mit unseren bisherigen Ergebnissen und weiteren Studien [36, 73, 81].

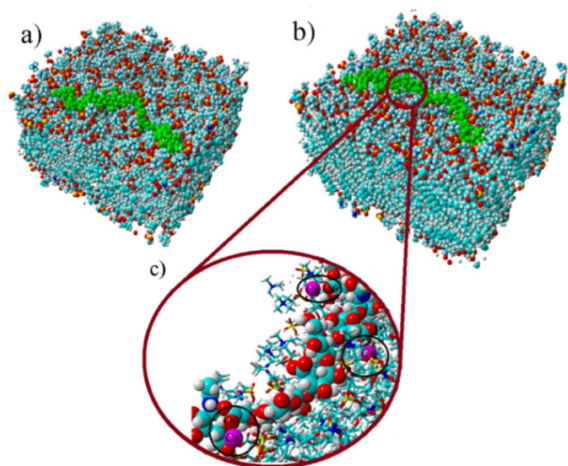


Abbildung 17: Momentaufnahme aus der MD-Simulation: (a) initiale Positionen, (b) finale Struktur. Grün repräsentiert Hyaluronan. DPPC-Lipide sind in der folgenden Art markiert: Wasserstoff (weiß), Kohlenstoff (türkis), Sauerstoff (rot), Stickstoff (blau) und Phosphor (gelb). (c) Vergrößerte Aufnahme des Endzustands der Simulationsbox. Die Phospholipide sind als verbundene Struktur dargestellt, Calcium und Hyaluronan als Kugeln. Diese Darstellung zeigt die Resultate der Simulationen mit Calciumionen bei 37 °C. Die Abbildung wurde aus der Veröffentlichung von Zander et al. entnommen [80]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 Lizenz.

Die MD-Simulationen haben in diesem Kontext hilfreiche Einblicke in die Interaktion von Hyaluronan und DPPC gegeben. Es werden spezifische Bindungen zwischen den Protonendonatoren von Hyaluronan und der DPPC-Phosphatgruppe gebildet [80]. Ebenso konnten starke hydrophobe Wechselwirkungen beobachtet werden, die mit den berichteten Ergebnissen im Einklang stehen. Eine Schlüsselbeobachtung war, dass Calciumionen wesentlich näher an der Carboxylgruppe von Hyaluronan lokalisiert sind und dadurch das Hyaluronan näher an der DPPC-Doppelschicht ist [80]. Infolgedessen wird die Bindung von Wasser an Hyaluronan erschwert und es werden vermehrt Bindungen zum DPPC ausgebildet. Die Analyse der Bindungsverteilung zwischen Hyaluronan und DPPC mit und ohne Calciumionen zeigte keine Veränderung und stützte damit diese These [80]. Die verstärkte Bindung von Hyaluronan und DPPC ist höchstwahrscheinlich auf

eine Erhöhung der Anzahl der Bindungen zwischen DPPC und Hyaluronan zurückzuführen.

Relevante Publikationen

- D.C.F Wieland, P. Degen, M. Paulus, M.A. Schroer, H. Rehage, M. Tolan. pH controlled condensation of polysiloxane networks at the water-air interface. *Colloids Surf. A* **2014**, 455, 44.
- M. Wang, T. Zander, X. Liu, C. Liu, A. Raj, D.C.F Wieland, V. M. Garamus, R. Willumeit-Römer, P. M. Claesson. The Effect of Temperature on Supported Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Bilayers: Structure and Lubrication Performance. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, 445, 84.
- A. Raj, M. Wang, T. Zander, D.C.F Wieland, X. Liu, J. An, V.M. Garamus, R. Willumeit-Römer, M. Fielden, P.M. Claesson, A. Dédinaité. Lubrication Synergy: Mixture of Hyaluronan and Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Vesicles. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 488, 225.
- A. Dédinaité, D.C.F Wieland, P. Bełdowski, P.M. Claesson. Biolubrication synergy: Hyaluronan – Phospholipid interactions at interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, 274, 102050.
- T. Zander, V.M. Garamus, A. Dédinaité, P.M. Claesson, P. Bełdowski, K. Górny, K. Krzysztof, Z. Dendzik, D.C.F Wieland, R. Willumeit-Römer. Influence of the Molecular Weight and the Presence of Calcium Ions on the Molecular Interaction of Hyaluronan and DPPC. *Molecules* **2020**, 25, 3907.

3.1.2 Untersuchung von Modellsystemen der synovialen Flüssigkeit unter Druck und Scherung

Aus den bisher dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass die molekularen Wechselwirkungen maßgeblich für die Selbstorganisation der Makromoleküle in der Synovialflüssigkeit verantwortlich sind. Allerdings wurden die Untersuchungen unter Umgebungsbedingungen durchgeführt. Eine zentrale Frage bei der synovialen Flüssigkeit ist, wie sich diese Strukturen unter Bedingungen verhalten und wie sie in einem belasteten Gelenk auftreten können, das heißt, unter hohen Drücken und Scherraten. Um die Fragestellung des Einflusses von Druck zu untersuchen, wurden Modellsysteme aus Hyaluronan und DPPC an der Flüssig-Fest-Grenzfläche untersucht. Aufbauend auf den bereits beschriebenen Studien wurde eine geordnete DPPC-Doppelschicht an einer Silizium-Oberfläche präpariert und Hyaluronan an diese adsorbiert. Dieses Probensystem erlaubt es, den Einfluss des hydrostatischen Drucks mit speziellen Probenumgebungen zu untersuchen. Im Fokus der Untersuchungen stand das Verhalten der Lipide und der Hyaluronanschicht. Neben dem Druck wurden ebenfalls das molekulare Gewicht von Hyaluronan und die Calciumkonzentration der wässrigen Lösung variiert. Die Messungen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie und Röntgenreflektivitäten durchgeführt. Auch hier wurde das in Kapitel 3.1.1 beschriebene und in Abbildung 9 dargestellte Elektronendichteprofil verwendet.

Wie oben bereits ausgeführt, kann das DPPC-Molekül in einer wässrigen Lösung in drei verschiedenen Phasen vorliegen: L_α , $P_{\beta'}$ und $L_{\beta'}$ [61]. Die Phasenübergänge können entweder durch Temperatur oder durch Druck geschehen, siehe Abbildung 10. Bei einer Temperatur von 55 °C und einer Erhöhung des Drucks konnte wie erwartet der Übergang von der L_α - in die $L_{\beta'}$ -Phase beobachtet werden, da die Schichtdicke um 0,8 nm anstieg [82, 83]. Wie schon von Wang et al. beobachtet, konnte keine $P_{\beta'}$ -Phase nachgewiesen werden, wie es typischerweise für Vesikel oder multilamellare Schichten der Fall ist [59, 60]. Es war jedoch zu beobachten, dass die DPPC-Doppelschichten in Gegenwart einer Grenzfläche bei höheren Drücken destabilisiert werden und nicht reversible strukturelle Änderungen auftreten [60]. Die DPPC-Schichten nehmen eine nicht definierte und irreguläre Struktur an. Dies steht im Gegensatz zu Studien an Vesikeln oder multilamellaren Systemen und zeigt den nicht zu vernachlässigbaren Einfluss der Grenzfläche [61].

Es kann angenommen werden, dass neben der Umgruppierung des DPPC auf molekularer Ebene auch eine Veränderung in der lateralen Schichtstruktur stattfindet. DPPC hat in der L_α -Phase ein größeres Volumen als in der $L_{\beta'}$ -Phase [61]. Als Folge des Phasenübergangs kann es daher zu einer ungleichmäßigen DPPC-Schicht kommen, die von Leerstellen und Rissen durchzogen ist. Die Gegenwart der Grenzfläche verhindert vermutlich die laterale Umgruppierung, um diese Fehlstellen auszugleichen, und führt damit zu einer nicht reversiblen strukturellen Veränderung der Doppelschicht bei einer

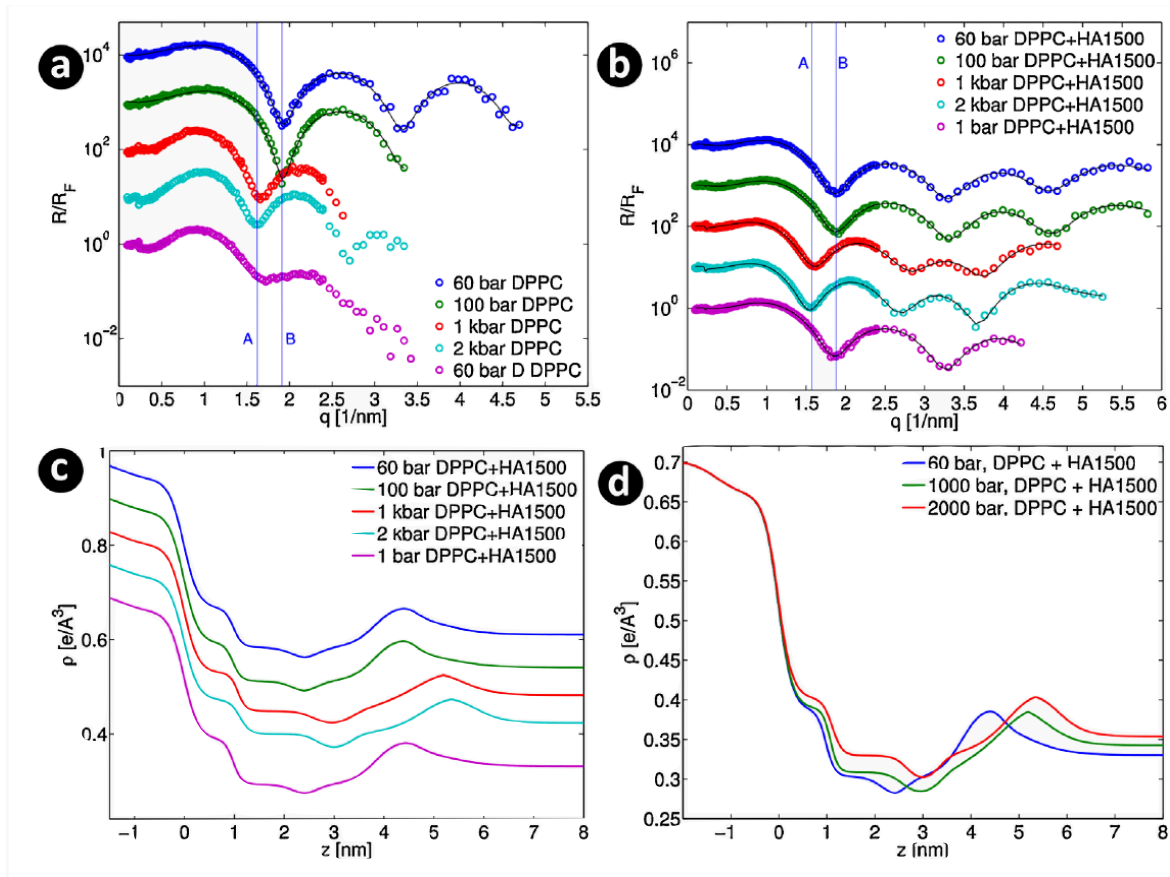


Abbildung 18: (a) Fresnel-normalisierte Reflektivitäten von DPPC bei 55 °C und verschiedenen Drücken. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassungen an die Daten. Die vertikalen Balken markieren die Position des ersten Minimums bei einem Druck von 1 bar. Die Kurven sind vertikal verschoben für eine bessere Darstellung. (b) Fresnel-normalisierte Reflektivitäten für DPPC/HA1500 Kompositschichten bei 39 °C und verschiedenen Drücken. Die durchgezogenen Linien zeigen die Anpassungen an die Daten. Die blauen Balken zeigen die Position des ersten Minimums an. Die Kurven sind vertikal verschoben für eine bessere Darstellung. (c) Elektronendichteprofil für DPPC und Hyaluronan mit einem molekularen Gewicht von 1500 kDa. Die Kurven sind vertikal verschoben für eine bessere Darstellung. (d) Elektronendichteprofil für DPPC und Hyaluronan mit einem molekularen Gewicht von 1500 kDa. Die Abbildung wurde aus der Veröffentlichung von Zander et al. entnommen [60]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 Lizenz.

Druckveränderung. Ein solches Verhalten wäre jedoch für Gelenke nicht vorteilhaft, da dies die Schmierungseigenschaften negativ beeinflussen würde.

Die Adsorption von Hyaluronan ändert die Struktur der DPPC-Doppelschicht lediglich an der DPPC-Kopfgruppe, die der Wasserphase zugewandt ist, wie die Elektronendichteprofile zeigen 18c und d [60]. Die Höhe und Form der Elektronendichte im Bereich $z = 0$ nm, also nahe an der Siliziumgrenzfläche, bleibt konstant. Die Adsorption von Hyaluronan führt insgesamt zu einer erhöhten Rauigkeit der Schichtstrukturen an der DPPC-Wasser-Grenzfläche, was auf eine inhomogene Adsorption von Hyaluronan hindeutet. Neben den erhöhten Rauigkeiten lässt sich dieses auch aus Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen schlussfolgern [60].

Die druckabhängigen Messungen zeigen, dass das DPPC-Hyaluronan-System ein sehr ähnliches Phasenverhalten wie reine DPPC-Systeme aufweist [60]. So zeigen die Messungen bei einer Temperatur von 55 °C lediglich einen Phasenübergang von der L_α -Phase in die $L_{\beta'}$ -Phase bei der Erhöhung des Drucks, siehe 18b. Interessanterweise sind die Phasenübergänge in der Gegenwart von Hyaluronan reversibel und die DPPC-Hyaluronan-Schicht kehrt in die ursprüngliche Form zurück [60]. Dies war im Falle einer reinen DPPC-Schicht – wie oben beschrieben – nicht zu beobachten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Hyaluronan die Widerstandsfähigkeit der DPPC-Schichten gegen Druck erhöht und damit reversible Phasenübergänge erlaubt. Ein Grund hierfür könnte eine höhere Steifigkeit des DPPC-Hyaluronan-Systems sein.

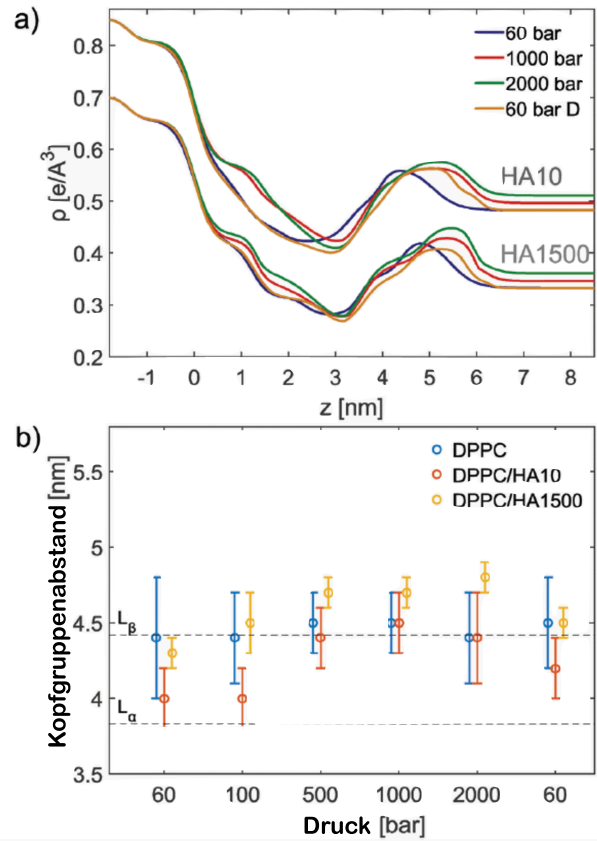


Abbildung 19: (a) Druckabhängige Elektronendichteprofile von DPPC mit adsorbierten Hyaluronan (molekular Gewicht: 10 kDa und 1500 kDa) bei einer Temperatur von 39 °C. Die Daten wurden zur besseren Visualisierung vertikal verschoben. (b) Aus den Elektronendichten berechneter Kopfgruppenabstand der Lipiddoppelschicht als Funktion des Drucks. Die gestrichelten Linien zeigen die Abstände für die $L_{\beta'}$ -Phase ($\approx 4,4$ nm) und die L_α -Phase ($\approx 3,9$ nm). Die wässrige Lösung enthält 150 mM NaCl und 10 mM CaCl_2 [84]. Wiederveröffentlichung mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry, von „Influence of high hydrostatic pressure on solid supported DPPC bilayers with hyaluronan in the presence of Ca^{2+} ions“, Zander et al., Soft Matter, 15, 2016; die Genehmigung wurde durch Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

Dieses wurde schon in anderen Studien beobachtet und auf diese Eigenschaft zurückgeführt [59].

In weiteren Untersuchungen, die den Einfluss von Calcium auf das Phasenverhalten des DPPC-/Hyaluronan-Systems als Ziel hatten, konnte gezeigt werden, dass das Phasendiagramm unter Druck erheblich verändert ist [60]. Es konnte erneut beobachtet werden, dass Calcium die Wechselwirkung zwischen Hyaluronan und DPPC erhöht und den Einfluss des molekularen Gewichtes von Hyaluronan verstärkt [73, 84].

DPPC-Doppelschichten mit adsorbiertem Hyaluronan, das ein Molekulargewicht von 10 kDa hatte, waren bereits bei Umgebungsbedingungen (0 bar, 39 °C) in einer L_α -ähnlichen Phase [84]. Hingegen ist die DPPC-/Hyaluronan-Schicht bei einem Molekulargewicht von 1500 kDa unter diesen Bedingungen in der L'_β -Phase [84] ebenso wie eine reine DPPC-Schicht. Dies ist in den aufgetragenen Kopfgruppenabständen in Abbildung 19 gut zu sehen.

Druckabhängige Experimente bei einer Temperatur von 55 °C konnten zeigen, dass bei der Erhöhung des Drucks eine Entkopplung der unteren und oberen DPPC-Schichten geschieht und sich somit eine asymmetrische Struktur bildet. Das ist untypisch für Lipidsysteme, da sich normalerweise die obere und die untere Schicht symmetrisch verhalten. Die signifikante Erhöhung der Wechselwirkung von Hyaluronan und DPPC im Zusammenspiel mit der einseitigen Adsorption von kurzkettigem Hyaluronan führt höchstwahrscheinlich zu der beobachteten Veränderung des Phasenverhaltens. Es ist anzunehmen, dass die DPPC-Schicht durch die Bindung von Hyaluronan eine Verringerung der lateralen Mobilität erfährt und dadurch inhomogener wird [84]. Dies könnte zu einer starken Veränderung der lateralen Anordnung der DPPC-Moleküle durch die adsorbierten Hyaluronan-Moleküle führen, wie es bereits an der Wasser-Luft-Grenzfläche beobachtet wurde [73, 84]. Dieser Effekt ist für Hyaluronan mit 10 kDa wesentlich ausgeprägter als für Hyaluronan mit einer längeren Polymerkette bzw. höherem molekularem Gewicht, da das kurzkettige Hyaluronan flexibler ist. Dies führt dazu, dass bei Umgebungsbedingungen die DPPC-/Hyaluronan-Schicht mit 10 kDa in der biologisch relevanten L_α -Phase ist, jedoch nicht das langkettige Hyaluronan [84]. Die beobachtete Asymmetrie deutet auf einen starken Einfluss lediglich auf die obere Hälfte der Doppelschicht hin, da das Hyaluronan nicht in die untere Hälfte vordringen kann. In der Folge verhält sich die DPPC-Doppelschicht wie zwei unabhängige Monoschichten, und die untere und obere Schicht weisen unabhängige Phasenübergangstemperaturen auf, was die Entkopplung der Doppelschicht zur Folge hat [84].

3.1.3 Entwicklung von Experimenten für die Untersuchung von Makromolekülen unter Scherung und Druck

Die viskosen und elastischen Eigenschaften von Flüssigkeiten sind durch die Molekularstruktur und intermolekularen Wechselwirkungen ihrer Bestandteile, aber auch durch externe Faktoren wie Temperatur und Druck, bestimmt [86, 87]. Diese Eigenschaften können für Systeme mit nur einer Komponente einfach skaliert werden. Jedoch ist dies in Systemen mit mehreren Komponenten schwierig, wie etwa bei wässrigen Lösungen von Mizellen oder Polymeren, da die verschiedenen Bestandteile wechselwirken und ihre Organisation durch Scherung verändert werden kann. Das kann zu Effekten wie Scherverdünnung oder Scherverdickung führen [87, 88]. Da in Gelenken sehr hohe Scherkräfte auftreten können und die entstehenden Strukturen maßgeblich für die Schmie-reigenschaften verantwortlich sind, wurden Probenumgebungen entwickelt, die es erlauben, mit Röntgenkleinwinkelstreuung *in-situ* Scher- und Druckexperimente durchzuführen, um den Einfluss auf die molekularen Strukturen zu untersuchen.

Um die hohen Scherkräfte, die in einem Gelenk auftreten können, im Experiment nachbilden zu können, wurde ein Mikrofluidik-Aufbau entwickelt, der es erlaubt, Scherkräfte bis in den Bereich von $3 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ zu erzeugen [85]. Das zentrale Element dieses Aufbaus ist ein Mikrofluidik-Chip, der einen sich verengenden Kanal von $100 \mu\text{m}$ auf $10 \mu\text{m}$ besitzt. Eine schematische Darstellung dieses Chips ist in Abbildung 20a gezeigt. Diese Verengung erzeugt eine Geschwindigkeitsverteilung und damit ein Scherfeld. Aufgrund der kleinen Dimensionen ist auch sichergestellt, dass der Fluss stets laminar bleibt. Da das Scherfeld auf eine räumliche Verteilung übertragen wird, erlaubt eine Rastermessung mit fokussierten Röntgenstrah-

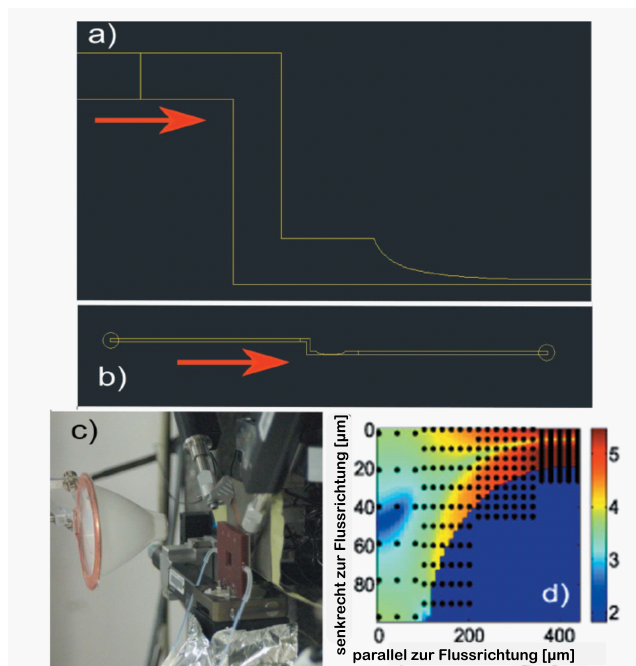


Abbildung 20: Fotografien und Zeichnungen des Mikrofluidik-Aufbaus. a) Vergrößerte CAD-Skizze des Mikrofluidik-Chips, welche die Verengung im Kanal zeigt. Die roten Pfeile zeigen die Flussrichtung. b) CAD-Zeichnung des Mikrofluidik-Chips. c) Eingebauter Chip an der ID13, ESRF, Grenoble. d) Zweidimensionale Karte der berechneten Scherratenverteilung im sich verengenden Kanal des Mikrofluidik-Chips. Der Farbbalken zeigt die Scherraten auf der logarithmischen Skala. Die schwarzen Punkte deuten die Rastermessung an. Die Abbildung wurde aus Wieland et al. entnommen [85]. Nachdruck mit Genehmigung der International Union of Crystallography.

len, die Struktur der Makromoleküle als Funktion der Scherrate mittels Röntgenkleinwinkelstreuung zu untersuchen.

In einem ersten Experiment wurden die Wechselwirkungen in hochkonzentrierten kolloidalen Systemen untersucht. Kolloide dienen häufig als Modell, da ihre Wechselwirkungen gezielt modifiziert werden können. So können zum Beispiel gezielt Modellsysteme mit einer kurzreichweitigen attraktiven und einer langreichweitigen repulsiven Wechselwirkung erzeugt werden. Diese Kombination von Wechselwirkungen ist allgegenwärtig und kann in vielen Systemen wie Proteinen oder Nanopartikeln aus zum Beispiel Poly(Methylmethacrylate) beobachtet werden [89–99].

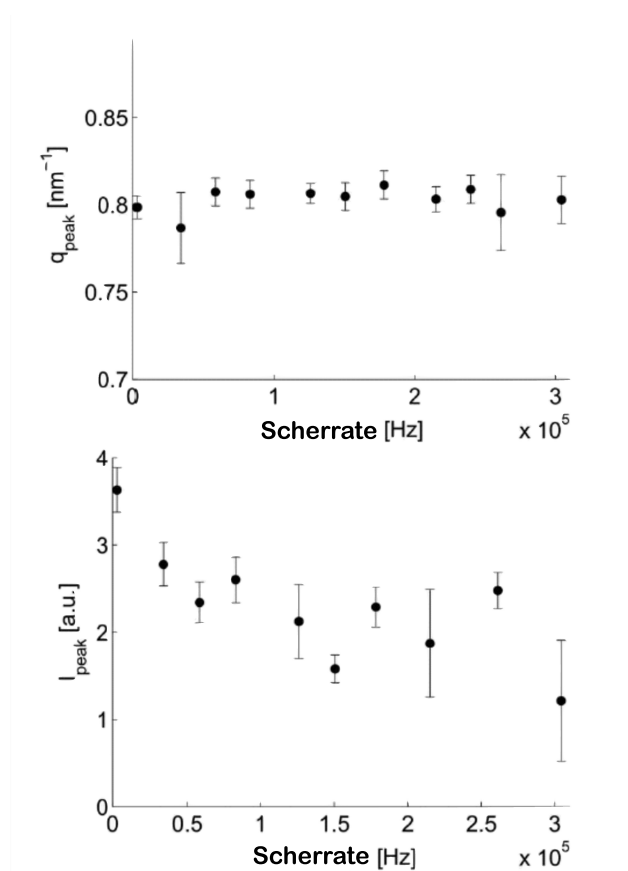


Abbildung 21: Untersuchung hochkonzentrierter Lysozylösungen unter Scherung. Oben: Position I_{peak} des Protein-Strukturfaktors als Funktion der Scherrate. Unten: Intensität I_{peak} des Strukturfaktors als Funktion der Scherrate. Die Abbildung wurde aus Wieland et al. entnommen [85]. Nachdruck mit Genehmigung der International Union of Crystallography.

In Proteinlösungen aus zum Beispiel Cytochrome-C oder Lysozym konnten unter bestimmten Lösungsbedingungen Gleichgewichtscluster beobachtet werden [90, 95, 97, 100, 101]. Die Gleichgewichtsbedingungen der Cluster werden dabei durch äußere Parameter wie Temperatur, Druck oder Scherkräfte bestimmt, aber auch durch Salzkonzentration und Proteinkonzentration. Die durchgeführten Messungen an hochkonzentrierten Lösungen von Lysozym zeigen das Vorhandensein eines Strukturfaktors im Kleinwinkelstreusignal, der auf die Wechselwirkung der Proteine zurückzuführen ist, und das Vorhandensein von Proteinclustern anzeigt [85]. Abbildung 21 zeigt die Position und die Intensität des Strukturfaktors als Funktion der Scherrate. Die Daten zeigen, dass die Intensität dieses Strukturfaktors mit der Zunahme der Scherrate abnimmt. Die Position des Strukturfaktors hingegen bleibt unabhängig von der Scherrate. Hieraus kann geschlossen werden, dass der Abstand der Proteine zueinander nicht von der Scherrate beeinflusst wird. Jedoch nimmt die Anzahl der Streuzentren bzw. deren Masse ab. Folglich verringert sich die Anzahl der Prote-

incluster, da ihr Gleichgewicht durch die hohen Scherkräfte gestört und sie damit zur Auflösung gebracht werden [85].

Ein weiterer wichtiger Faktor für die viskoelastischen Eigenschaften ist hydrostatischer Druck. Dazu wurde eine Probenumgebung entwickelt, die es nicht nur erlaubt, die Scherrate zu kontrollieren, sondern gleichzeitig die Proben einem Druck von 300 bar auszusetzen. Hierzu wurde eine Probenzelle auf der Grundlage eines Malvern Rheometers (HPC 300, Gemini, Malvern) modifiziert, sodass sie zum einen Röntgenstreuexperimente erlaubte und zum anderen an verschiedenen Messplätzen an Synchrotronstrahlungsquellen eingesetzt werden konnte. Zum Zeitpunkt der Entwicklung war kein alternativer Aufbau bekannt, der es erlaubt, gleichzeitig Druck und Scherrate zu kontrollieren. Es waren lediglich Systeme an diversen Messplätzen im Einsatz, die entweder Druck oder Scherung kontrollieren konnten [102–111].

In den ersten Untersuchungen stand hierbei die Wechselwirkung von Hyaluronan im Zentrum. Hyaluronan selbst kann mittels Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen und elektrostatischen Wechselwirkungen mit anderen Makromolekülen interagieren [112, 113]. In Lösungen mit niedriger Ionenstärke weist Hyaluronan ein Maximum (der sog. Polyelektrolyte Peak) in der Kleinwinkelstreu Kurve auf. Dieses Maximum ist jedoch schwer zu erkennen, da es nur sehr schwach ausgeprägt ist und sich meist nur als Schulter in der Streukurve bemerkbar macht. Dieses Maximum hat seinen Ursprung in der elektrostatischen Abstoßung durch die geladenen Anteile der Hyaluronan-Polymerkette [114]. Rheologische *in-situ* Untersuchungen, die mit Kleinwinkelstreuuntersuchungen kombiniert wurden, konnten zeigen, dass dieses Maximum an Intensität zunimmt, wenn die Scherrate erhöht wird [115]. Diese Erhöhung der Intensität ist vermutlich auf eine Verringerung der Fluktuationen durch die Scherkräfte zurückzuführen und damit auf eine bessere Ausrichtung der Polymerketten.

Hyaluronan wurde unter drei verschiedenen Drücken und mehreren Scherraten untersucht, um die Reaktion der Probe auf die veränderten Bedingungen zu charakterisieren [116]. Dabei konnte keine Veränderung der Position des Maximums bei den untersuchten Drücken und Scherraten beobachtet werden, das heißt, eine Veränderung der Abstände zwischen den Polymerketten wird nicht induziert. Unter Umgebungsdruck konnte jedoch beobachtet werden, dass das Maximum mit der Scherrate wie erwartet ansteigt, siehe Abbildung 22 links. Der charakteristische Abstand zwischen den Polymerketten wird besser definiert, da die Scherkräfte die Fluktuationen unterdrücken [115, 116]. Bei hohen Drücken von 300 bar ist dieser Anstieg der Intensität des Maximums als Funktion der Scherrate weniger stark als unter Umgebungsbedingungen, siehe Abbildung 22 rechts [116]. Da die Intensität des Maximums von der Stärke der elektrostatischen Wechselwirkungen abhängt, könnte eine Erklärung für die Vergrößerung der dielektrischen Konstante von Wasser mit Druck sein [117]. Allerdings ändert sich die di-

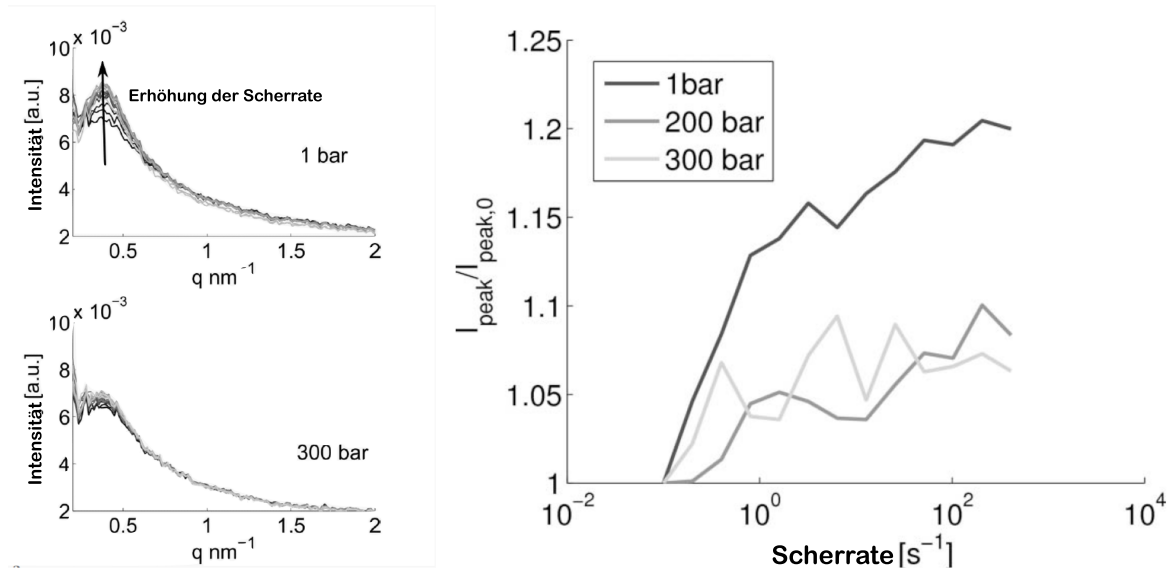


Abbildung 22: Links: Streukurven von Hyaluronan-Lösungen mit einer Konzentration von 8 mg(mL)^{-1} bei verschiedenen Scherraten. Die Farbskala der Streukurven ändert sich mit der Scherrate, wobei Schwarz 0 s^{-1} und Hellgrau 1500 s^{-1} entsprechen. Rechts: Vergleich der Maxima der Streukurven als Funktion der Scherrate für Hyaluronan-Lösungen mit einer Konzentration von 8 mg(mL)^{-1} bei verschiedenen Drücken. Die Kurven bei verschiedenen Drücken wurden anhand der Kurve bei 0 bar normalisiert, um die Kontrastveränderung durch den Druck zu berücksichtigen. Die Abbildung wurde aus Wieland et al. entnommen [116]. Nachdruck mit Genehmigung der International Union of Crystallography.

elektrische Konstante um lediglich 3 % und ist daher zu klein, um diese Beobachtungen erklären zu können. Eine andere Erklärung könnte die Verringerung des freien Volumens sein, was zu einer Verkleinerung der Fluktuationen führt [118]. Dies würde wiederum zu einer Verkleinerung der scherinduzierten Vergrößerung des Maximums führen. Hier sind die bisherigen Daten jedoch nicht eindeutig, um eine abschließende Aussage machen zu können.

Relevante Publikationen

- D.C.F. Wieland, V.M. Garamus, T. Zander, C. Krywka, M. Wang, A. Dedinaite, P. Claesson, R. Willumeit-Römer. Studying solutions at high shear rates: a dedicated microfluidics setup. *J. Synchrotron Radiat.* **2016**, 23, 480.
- T. Zander, D.C.F. Wieland, A. Raj, M. Wang, B. Nowak, C. Krywka, A. Dédinaite, P. M. Claesson, V. M. Garamus, A. Schreyer, R. Willumeit-Römer. The Influence of Hyaluronan on the Structure of a DPPC – Bilayer under High Pressures. *Colloids Surf. B* **2016**, 142, 230.
- D.C.F. Wieland, T. Zander, C. Krywka, P. Claesson, A. Dedinaite, V. Haramus, R. Willumeit-Römer. Complex solutions under shear and pressure: a rheometer setup for X-ray scattering experiments. *J. Synchrotron Radiat.* **2017**, 24, 646.
- T. Zander, D.C.F. Wieland, A. Raj, P. Salmen, S. Dogan, A. Dédinaite, V.M. Garamus, A. Schreyer, P.M. Claesson, R. Willumeit-Römer. Influence of high hydrostatic pressure on solid supported DPPC bi-layers with hyaluronan in the presence of Ca²⁺ ions. *Soft Matter* **2019**, 15, 7295.

3.1.4 Diskussion

Die Untersuchung der synovialen Flüssigkeit ist eine komplexe Aufgabe, da verschiedenste Parameter Einfluss auf die molekularen Wechselwirkungen haben können. Das von der Natur geschaffene wasserbasierte Schmiersystem kann unter verschiedenen Bedingungen niedrige Reibungskoeffizienten realisieren, da durch die Selbstorganisation der Makromoleküle stets eine entsprechende Anpassung erfolgt. Im Rahmen meiner Arbeiten bzw. durch mich betreute studentische Arbeiten zur Selbstorganisation von Makromolekülen in der Synovialflüssigkeit wurden untersucht, wie die molekularen Wechselwirkungen durch Druck, Scherkräfte und die Zusammensetzung beeinflusst werden. Durch einen multimodalen Ansatz, der sowohl statische als auch *in-situ* Messungen beinhaltet, wurden hierbei die Wirkungsprinzipien näher beleuchtet. Die Untersuchungen zeigen interessante Details der molekularen Wechselwirkungen und offenbaren, dass selbst kleine Parameter einen wichtigen Einfluss haben.

Hauptbestandteile der Synovialflüssigkeit sind Lipide und das Polymer Hyaluronan. Lipiden kommen insofern eine Bedeutung zu, da geordnete Lipidschichten alleine schon niedrige Reibungskoeffizienten aufweisen [59]. Hyaluronan auf der anderen Seite ist für die Viskosität der Synovialflüssigkeit verantwortlich und in hohen Konzentrationen vorhanden [113]. Die Erkenntnisse im Bereich der Synovialflüssigkeit zeigen jedoch, dass nicht die Viskosität der Synovialflüssigkeit für die niedrigen Reibungen verantwortlich ist, sondern ein Hauptbeitrag durch die Selbstorganisation der Lipide geleistet wird [8]. Damit ist es für diese Systeme essenziell, dass die Strukturen unter verschiedenen Bedingungen wie Druck und Scherung stabil sind.

Es konnte beobachtet werden, dass Hyaluronan an die Lipide bindet und dabei eine diffuse Adsorptionsschicht bildet. Die dabei entstehenden Kompositschichten weisen jedoch im Vergleich zu reinen Lipiden schlechtere Reibungseigenschaften und eine verringerte Belastbarkeit auf [36, 59]. Diese Unterschiede lassen sich auf die veränderte laterale Anordnung zurückführen, die an Langmuir-Monoschichten beobachtet werden konnte [73].

Eine weitere wichtige Beobachtung ist, dass die Wechselwirkungen und damit die Selbstorganisation von dem molekularen Gewicht des Hyaluronans abhängt. Wesentlich stärkere Änderungen in der lateralen Anordnung und im Phasenverhalten von DPPC sind bei Hyaluronan mit einem geringen molekularen Gewicht aufgetreten [60, 73, 80]. Dieser Effekt konnte damit erklärt werden, dass Hyaluronan mit hohem molekularem Gewicht vermutlich vermehrt intramolekulare Bindungen aufbaut und die potenziellen Bindungsstellen im Polymer abgeschirmt sind, wohingegen sie bei kurzkettigem Hyaluronan zur Verfügung stehen. Dies hat zur Folge, dass die Packungsdichte der DPPC-Moleküle durch die Adsorption von Hyaluronan mit 10 kDa herabgesetzt ist. Eine solche Reduktion der Packungsdichte könnte zu der beobachteten verringerten Tragfähigkeit

führen. Hierzu passt, dass klinische Untersuchungen von Gelenkkrankheiten auch eine Reduktion des molekularen Gewichts in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit entzündlichen Gelenkkrankheiten zeigten [69–71].

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Konzentration von Calciumionen, die die Wechselwirkungen zwischen Hyaluronan und DPPC massiv verstärkt. Eine geringe Konzentration von Calciumionen führt bereits zu einer vermehrten Adsorption von Hyaluronan an die DPPC-Grenzfläche und ebenso zu einer noch stärkeren Beeinflussung der lateralen Packung der DPPC-Moleküle [73, 84]. Die Daten zeigen, dass diese Zunahme auf eine starke elektrostatische Wechselwirkung zurückzuführen ist, da die Ladung der negativen Carboxylgruppe des zwitterionischen DPPC-Moleküls durch die Bindung des zweiwertigen Calciumions invertiert wird [73, 80]. Infolge dessen ist eine vermehrte Bindung von Hyaluronan an DPPC zu beobachten, wobei sich die Anzahl der zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen nicht verändert, wie MD-Simulationen zeigten [80].

Um Erkenntnisse zur Selbstorganisation der Strukturen unter Belastungssituationen zu erlangen, wurde das Phasenverhalten von DPPC-Doppelschichten unter hydrostatischem Druck untersucht. Hier konnten die Experimente zeigen, dass DPPC-Doppelschichten an der Flüssig-fest-Grenzfläche zum einen in nur zwei Phasen vorliegen und zum anderen kein reversibler Phasenübergang stattfindet [60]. Beides kann auf den Einfluss der Grenzfläche zurückgeführt werden, die die Beweglichkeit der Lipide einschränkt. Durch die Adsorption von Hyaluronan an die DPPC-Lipide konnte jedoch eine druckstabilisierende Wirkung beobachtet werden. So waren DPPC-/Hyaluronan-Schichten in der Lage, einen reversiblen Phasenübergang zu durchlaufen. Eine mögliche Erklärung ist in der strukturellen Umgruppierung der DPPC-Moleküle während des Phasenübergangs zu finden. Bei dem Übergang von der $L_{\beta'}$ - in die L_{α} -Phase von DPPC wird durch die Änderung der Konformation der Alkylketten das beanspruchte Volumen herabgesetzt [59]. Dadurch können sich Fehlstellen und Risse in der lateralen Filmstruktur bilden. Hier kann Wasser eindringen und zu einer Störung der Anordnung führen, wenn der DPPC-Film in seinen ursprünglichen Zustand zurückkehrt. Hyaluronan könnte durch die Adsorption diese Risse verdecken und damit Wasser hindern, einzudringen. Somit scheint Hyaluronan einerseits die Reibungseigenschaften der Lipidschichten herabzusetzen, andererseits auch eine druckstabilisierende Wirkung zu haben.

Wie oben bereits diskutiert, führt Calcium zu einer verstärkten Wechselwirkung und Adsorption von Hyaluronan an die DPPC-Lipide. Es war zu beobachten, dass durch die Adsorption von Hyaluronan mit einem molekularen Gewicht von 10 kDa, die DPPC-Filme bei einer Temperatur von 39 °C in einer L_{α} -Phase, also im fluiden Zustand, sind. Diese Phase ist üblicherweise nur bei Temperaturen von über 40 °C zu finden. Dies deutet auf einen starken Einfluss von Hyaluronan auf das Phasenverhalten von DPPC und

damit auf die Wechselwirkungen hin.

Die Erhöhung des hydrostatischen Drucks bei DPPC-/Hyaluronan-Proben mit Calcium zeigt eine Entkopplung der oberen und der unteren Schicht des Lipidsystems. Gerade dieser Effekt war stark abhängig von dem molekularen Gewicht des benutzten Hyaluronans und war bei einem niedrigen molekularen Gewicht besonders ausgeprägt. Unter diesen Bedingungen zeigen die DPPC-/Hyaluronan-Schichten eine asymmetrische Struktur und es ist anzunehmen, dass die obere und untere Hälfte in unterschiedlichen Phasen ist. Durch die Tatsache, dass Hyaluronan nur einseitig an die DPPC-Doppelschicht adsorbiert, wird nur das Phasenverhalten einer DPPC-Schicht modifiziert, was die beobachtete Entkopplung erklären kann. Diese Entkopplung könnte dazu führen, dass die Lipidschichten über eine weitere Gleitebene verfügen. Dies könnte die Reibungseigenschaften unter Druck verbessern oder aufrechterhalten [38].

Neben Druck sind auftretende Scherkräfte eine wichtige Größe, um die Selbstorganisation unter Belastung zu verstehen. Um dieses zu untersuchen, wurde eine Probenumgebung entwickelt, die es erlaubt, Untersuchungen unter Scherraten durchzuführen, die denen in einem Gelenk ähnlich sind. So konnten in den ersten Experimenten Protein-Protein-Wechselwirkungen unter hohen Scherraten studiert und die Destabilisierung von Proteinclustern beobachtet werden. Als weitere wichtige Entwicklung wurde eine Messumgebung in Betrieb genommen, die Druck und Scherung kombiniert. Messungen an Hyaluronan konnten zeigen, dass die scherungsinduzierte Ausrichtung der Polymerketten unter hohen Druck verändert wird, was höchstwahrscheinlich auf eine Verringerung von Fluktuationen durch die Verkleinerung des freien Volumens zurückzuführen ist.

Aufgrund der Vielzahl der Makromoleküle in der synovialen Flüssigkeit sind noch nicht alle Einflüsse verstanden. Meine aktuellen Projekte haben als Ziel, diese Lücke weiter zu schließen, indem die Komplexität der Modellsysteme der synovialen Flüssigkeit weiter erhöht wird. Des Weiteren sollen die Strukturinformationen mit den rheologischen Eigenschaften der Systeme korreliert werden. Das DPPC-/Hyaluronan-Probensystem soll in einem ersten Schritt mit Proteinen wie Albumin und γ -Globulin erweitert werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese beiden Proteine einen wichtigen Einfluss auf die Reibungseigenschaften haben, wobei es hier auf die Kombination der Moleküle ankommt. Neben statischen Messungen, die der Frage nachgehen, ob sich molekulare Komplexe bilden, sollen auch Messungen unter Druck und Scherung durchgeführt werden, um Veränderungen in den molekularen Komplexen zu untersuchen. Durch die Korrelation der Struktur mit den rheologischen Eigenschaften und die Unterstützung weiterer MD-Simulationen wird es möglich sein, einen detaillierten Einfluss zu gewinnen.

3.2 Untersuchung hierarchisch geordneter Knochenstrukturen

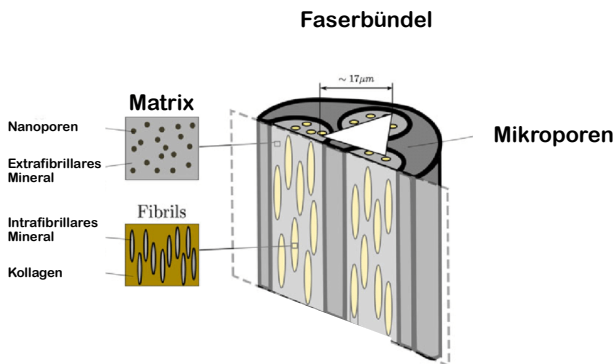


Abbildung 23: Grafische Darstellung des Bündelmodells von Knochen, bestehend aus mineralisierter Kollagenfibrillen sowie mineralisierter extrafibrillärer Matrix und Mikroporen. Die Fibrillen bestehen aus Kollagen und intrafibrillärem Mineral und die Matrix besteht aus extrafibrillärem Mineral und Nanoporen. Die Größenverhältnisse sind erhalten. Das Bild wurde von Spiez et al. entnommen und angepasst [119]. Mit Genehmigung von Springer Nature Kundenservice-Center GmbH: Nature, Calcified Tissue International, Influence of Mineralization and Microporosity on Tissue Elasticity: Experimental and Numerical Investigation on Mineralized Turkey Leg Tendons, Ewa M. Spiesz et al., 2012.

50 nm [121–123], die zwischen dem Kollagen mineralisiert werden. Eine schematische Grafik ist in Abbildung 23 dargestellt. Als Folge dessen haben die Plättchen eine präferierte Ausrichtung mit ihrer langen Achse entlang der Kollagenfaser [124, 125]. Somit kann die Orientierung der Kollagenmatrix aus der Orientierung der Hydroxylapatitkristalle abgeleitet werden.

3.2.1 Untersuchung des inversen piezoelektrischen Effekts in Knochen

Knochendefekte sind kritisch, wenn die Fähigkeit des Knochens zur Regeneration gestört ist. Eine Möglichkeit, die Knochenheilung zu verbessern, ist die elektrische Stimulation. Hier gibt es drei verschiedene Methoden: Gleichstrom, kapazitive Kopplung und induktive Kopplung [126–128]. Eine bereits eingesetzte induktive Methode benutzt zur Stimulation dabei zwei Elektroden, die in den Knochen eines Patienten implantiert werden, und zwei Spulen, wobei sich eine Spule außerhalb des Körpers und eine Spu-

In diesem Kapitel werden meine Untersuchungen an der Knochenultrastruktur auf Synchrotron-basierten Methoden zusammengefasst. Da die makroskopischen Knocheneigenschaften im hohen Maße von den mikroskopischen Strukturen im Knochen abhängen, ist es hier nötig, sowohl einen die Längenskalen übergreifenden Ansatz zu verfolgen, als auch die komplexen Zusammenhänge mittels *in-situ* Messungen besser zu beleuchten.

Zwei Methoden, die Knochenultrastruktur zu untersuchen, sind Röntgenkleinwinkelstreuung und Diffraktion, da diese Techniken es erlauben, die Organisation der Knochenmatrix und die Struktur des Hydroxylapatits zu untersuchen. Knochen sind ein hierarchisches Material, dessen Ultrastruktur durch Fibrillen gebildet wird, die ihrerseits die Osteone bilden [120]. Dabei bestehen die Fibrillen aus Kollagen I und Hydroxylapatitkristallen [120–122]. Die Hydroxylapatitkristalle bilden dabei Plättchen mit einer Größe von $3 \text{ nm} \times 25 \text{ nm} \times$

le innerhalb des Körpers befinden, die mit den Elektroden verbunden sind [41]. Die im Körper befindliche Spule empfängt ein magnetisches Feld, das durch die äußere Spule angeregt wird. Dadurch wird zwischen den beiden Elektroden ein elektrisches Feld erzeugt.

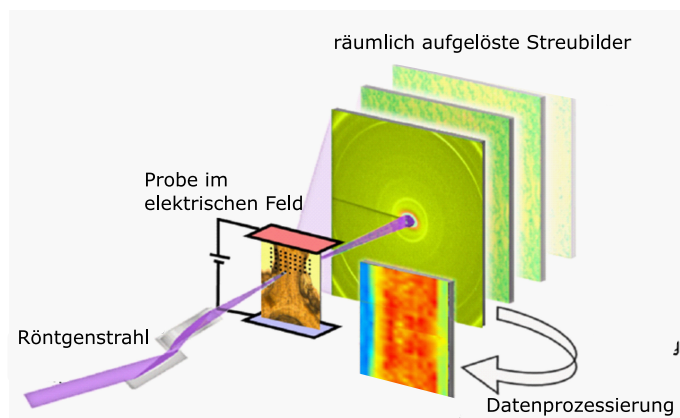


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Raster-Röntgenstreuungs-Untersuchung. Die Probe wurde im Fokus des Röntgenstrahls in einem homogenen elektrischen Feld platziert. Anschließend wurde die Probe abgescannt und Streubilder der Kleinwinkel- und Diffraktionssignale aufgenommen. Die Abbildung wurde aus Wieland et al. entnommen und angepasst [77]. Nachdruck mit Genehmigung von Elsevier.

Im klinischen Alltag zeigt dieses bipolare Induktions-Schrauben-System positive Ergebnisse, wobei eine genaue Positionierung der Elektroden im Knochen wichtig ist, um die Störungen des Magnetfeldes kleinzuhalten [43, 129, 130]. Die im klinischen Alltag eingesetzten Parameter sind jedoch das Resultat empirischer Optimierung, da sowohl Zusammenhänge als auch die genauen Kopplungseigenschaften der elektrischen Stimulation an den Knochen nicht gänzlich verstanden sind. Ein Grund ist, dass die vorliegenden Ergebnisse mit verschiedenen

Methoden gewonnen wurden und daher nur bedingt vergleichbar sind. Eine Hypothese besagt, dass die Stimulation des Knochenwachstums über den inversen piezoelektrischen Effekt des Knochengewebes stattfindet [44, 131]. Dabei wird ein mechanischer Stimulus im Knochen erzeugt, der die Knochenheilung anregt. Jedoch sind Fragen in Bezug auf die Stärke der Kopplung und den Einfluss ungeklärt, da auch andere Mechanismen beteiligt sein könnten.

Daher wurde ein *in-situ* Experiment entwickelt, um den Effekt des elektrischen Feldes auf die Knochenultrastruktur besser zu verstehen. Hierzu wurde ein 150 μm m dicker Schnitt eines femoralen Schweineknöchens mittels Rasterkleinwinkelstreuung und Diffraktion untersucht, während verschieden starke elektrische Felder an die Proben angelegt wurden, siehe Abbildung 24. Die Rasteruntersuchungen wurden an verschiedenen Stellen in den Knochenstrukturen durchgeführt, die jeweils eine andere Orientierung der Kollagenmatrix zum elektrischen Feld hatten.

Die durchgeführten Diffraktionsuntersuchungen zeigen, dass die Struktur des Hydroxylapatits räumlich variiert und der Knochen auf der Mikrometer-Längenskala somit keine homogene Struktur hat [77]. Dies lässt sich jedoch verstehen, da die Knochen-

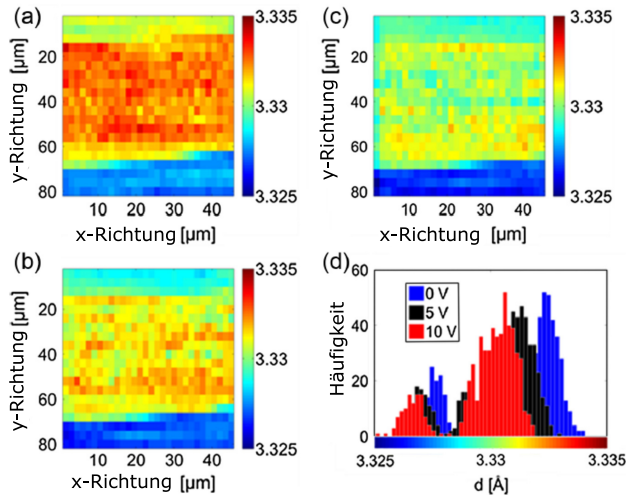


Abbildung 25: Links: Gitterkonstante des (002) Hydroxylapatitreflexes bei einer Orientierung der Kollagenmatrix senkrecht zum elektrischen Feld. Zweidimensionale Verteilung des Reflexes in einem elektrischen Feld von a) 0 V/m, b) 1250 V/m und c) 2500 V/m. d) Histogramm der Gitterkonstanten. Die Abbildung wurde aus Wieland et al. [77] entnommen. Nachdruck mit Genehmigung von Elsevier.

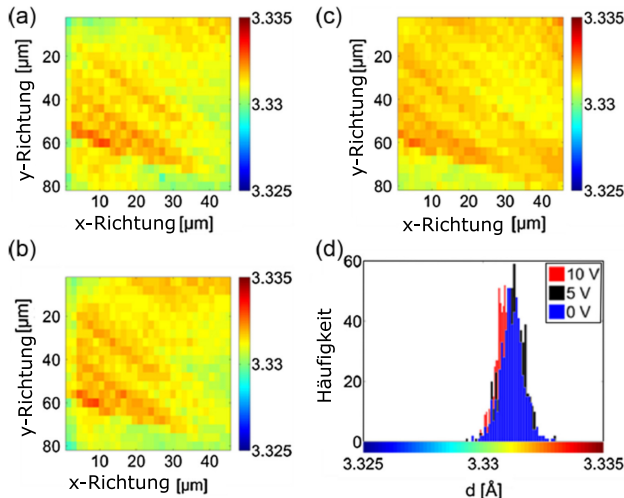


Abbildung 26: Gitterkonstante des (002) Hydroxylapatitreflexes bei einer Orientierung der Kollagenmatrix parallel zum elektrischen Feld. Zweidimensionale Verteilung des Reflexes in einem elektrischen Feld von a) 0 V/m, b) 1250 V/m und c) 2500 V/m. d) Histogramm der Gitterkonstanten. Die Abbildung wurde aus Wieland et al. entnommen [77]. Nachdruck mit Genehmigung von Elsevier.

struktur von verschiedenen Parametern abhängt, wie zum Beispiel Ernährung oder dem Alter [132, 133]. Jedoch erlauben relative Veränderungen in der Kristallreflexposition, Verformungen bzw. Belastungen in der Knochenmatrix zu bestimmen. Abbildungen 25 und 26 zeigen die orts aufgelöste Position des (002)-Hydroxylapatitreflexes in der hexagonalen Kristallstruktur als Funktion der elektrischen Feldstärke an zwei Positionen im Knochen [77]. Die beiden Positionen unterscheiden sich in der Ausrichtung der Ultrastruktur zum elektrischen Feld. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Position des Streureflexes als Funktion der elektrischen Feldstärke nicht verschiebt, wenn die Knochenultrastruktur mit einem Winkel von 45° zum elektrischen Feld orientiert ist, siehe Abbildung 26 [77].

Im Falle einer senkrechten Orientierung der Knochenultrastruktur zum elektrischen Feld ist jedoch eine Verschiebung des Streureflexes zu beobachten, siehe Abbildung 25 [77]. Die beobachtete Verschiebung des Streureflexes beträgt $0,002 \text{ \AA}$ und zeigt damit eine mechanische Belastung in den Hydroxylapatitkristallen. Die Verformung lässt sich zu $\epsilon = 6 \times 10^{-4}$ berechnen. Hydroxylapatit hat eine zentrosymmetrische Einheitszelle und kann daher keine piezoelektrischen Eigenschaften aufweisen [134, 135]. Daher kann der beobachtete piezoelektrische Effekt lediglich auf die Kollagenmatrix des Kno-

chens zurückgeführt werden. Diese Annahme wird von anderen Studien unterstützt, die elektrische Spannung an Kollagenfasern nachweisen konnten, die Scherkräften ausgesetzt waren. Andere Studien konnten zeigen, dass ein längs der Kollagenfaser angelegtes elektrisches Feld eine Scherdeformation auslöst [134]. Dies zeigt die Bedeutung der Orientierung des elektrischen Felds zur Knochenmatrix respektive der Kollagenfasern.

Die Untersuchungen zeigen damit, dass durch den piezoelektrischen Effekt eine signifikante Belastung in der Knochenmatrix erzeugt werden kann, was sich in einer Kompression der Einheitszelle des Hydroxylapatit bemerkbar macht [77]. Jedoch war dieser Effekt nur zu beobachten, wenn die Knochenultrastruktur senkrecht zum elektrischen Feld ausgerichtet ist. In diesem Fall wird eine Polarisierung der Kollagenfasern erzeugt, was zu einer Scherung der Faserbündel führt. Diese Scherbelastung wird auf die Hydroxylapatitkristalle übertragen und sie werden deformiert. Die beobachteten Deformationen liegen dabei in der Größenordnung von $\epsilon = 6 \times 10^{-5}$ für Feldstärken, wie sie in der Klinik benutzt werden [41, 77]. Untersuchungen auf Zellebene konnten nachweisen, dass Osteozyten sensitiv auf mechanische Belastung von $\epsilon = 8 \times 10^{-6}$ sind [132, 133, 136]. Daher kann angenommen werden, dass der piezoelektrische Effekt eine ausreichende mechanische Belastung in der Knochenmatrix erzeugen kann, um das Knochenwachstum zu stimulieren.

Relevante Publikationen

- D.C.F. Wieland, C. Krywka, E. Mick, R. Willumeit-Römer, R. Bader, D. Klues, Investigation of the inverse piezoelectric effect of trabecular bone on a micrometer lengthscale using synchrotron radiation. *Acta Biomater.* **2015**, 25, 339.

3.2.2 Einfluss von biologisch abbaubaren Implantaten auf die hierarchische Knochenstruktur

Implantate sind nicht immer dafür bestimmt, permanent im Körper zu verbleiben und müssen dann in einer Folgeoperation entfernt werden. Daher werden biologisch abbaubare Implantate vermehrt als Alternative zu nicht korrodierenden Implantaten aus zum Beispiel Titan diskutiert, da ein Folgeeingriff überflüssig wäre. Ein potenzielles Material für biologisch abbaubare Implantate ist Magnesium bzw. Legierungen auf Magnesiumbasis, da die mechanischen Eigenschaften von Magnesium sehr ähnlich zu denen des Knochens sind, Magnesium natürlich im Körper vorkommt und die Degradationsgeschwindigkeit über die Zusammensetzung der Legierung beeinflusst werden kann [137].

Während der Degradation von Magnesiumimplantaten wandelt sich das Implantat langsam in Degradationsprodukte um und wird vom Körper abgebaut. Gleichzeitig wird stets neues Knochengewebe um das Implantat gebildet. Als Folge wird keine stabile Grenzfläche zwischen dem Implantat und dem Knochen gebildet, sondern es wird angenommen, dass eine ständige Reorganisation des Knochens stattfindet [49, 138].

Zur Untersuchung der Knochenreorganisation unter solchen Bedingungen wurden Knochen-Magnesiumimplantat-Proben untersucht, die für verschiedene Heilungszeiträume in einer Ratte implantiert waren. Anschließend wurden die Magnesiumimplantate, die die Form einer Schraube hatten, mit dem umgebenden Knochen explantiert und für die Röntgenkleinwinkeluntersuchungen vorbereitet. Die verwendete Magnesiumlegierung Mg_x-Gd war mit Gadolinium in einer Konzentration von $x = 5 \text{ wt\%}$ (Mg-5Gd) bzw. $x = 10 \text{ wt\%}$ (Mg-10Gd) versetzt. Gadolinium wurde als Legierungselement ausgesucht, da es zum einen die mechanischen Eigenschaften von Magnesium verbessert und zum anderen die Degradationsrate verringert [139–141]. Zudem war in Degradationsuntersuchungen an Mg-10Gd-Implantaten bereits ein hoher Knochenimplantatkontakt beobachtet worden, was eine gute Osseointegration andeutet [142]. Als Kontrollproben wurden in unserem Experiment Titan- und PEEK-Implantate benutzt, da diese Materialien in der Klinik angewendet und als Goldstandard angesehen werden.

In den Tierexperimenten wurden Schrauben dieser vier Materialien in die Femur von Ratten implantiert und verblieben dort für Heilungszeiträume von vier, acht und zwölf Wochen. Die Ratten wurden nach definierten Heilungszeiträumen unter Einhaltung der ethischen Regeln eingeschläfert und die Implantate wurden mit dem sie umgebenden Knochen entfernt. Von den verschiedenen Proben wurden 10 μm dicke Schnitte angefertigt, die mittels Raster-Röntgenkleinwinkel- und Diffraktionsmessungen untersucht wurden. Insgesamt wurden 30 Proben für diese Studie erzeugt. Dies erlaubt es, eine quantitative Analyse durchzuführen und die statistische Signifikanz der Beobachtungen zu bestimmen.

Abbildung 27 zeigt einen histologischen Schnitt einer solchen Probe. Die rot kenntlich gemachte Region zeigt eine der untersuchten Regionen und ist ebenso als Vergrö-

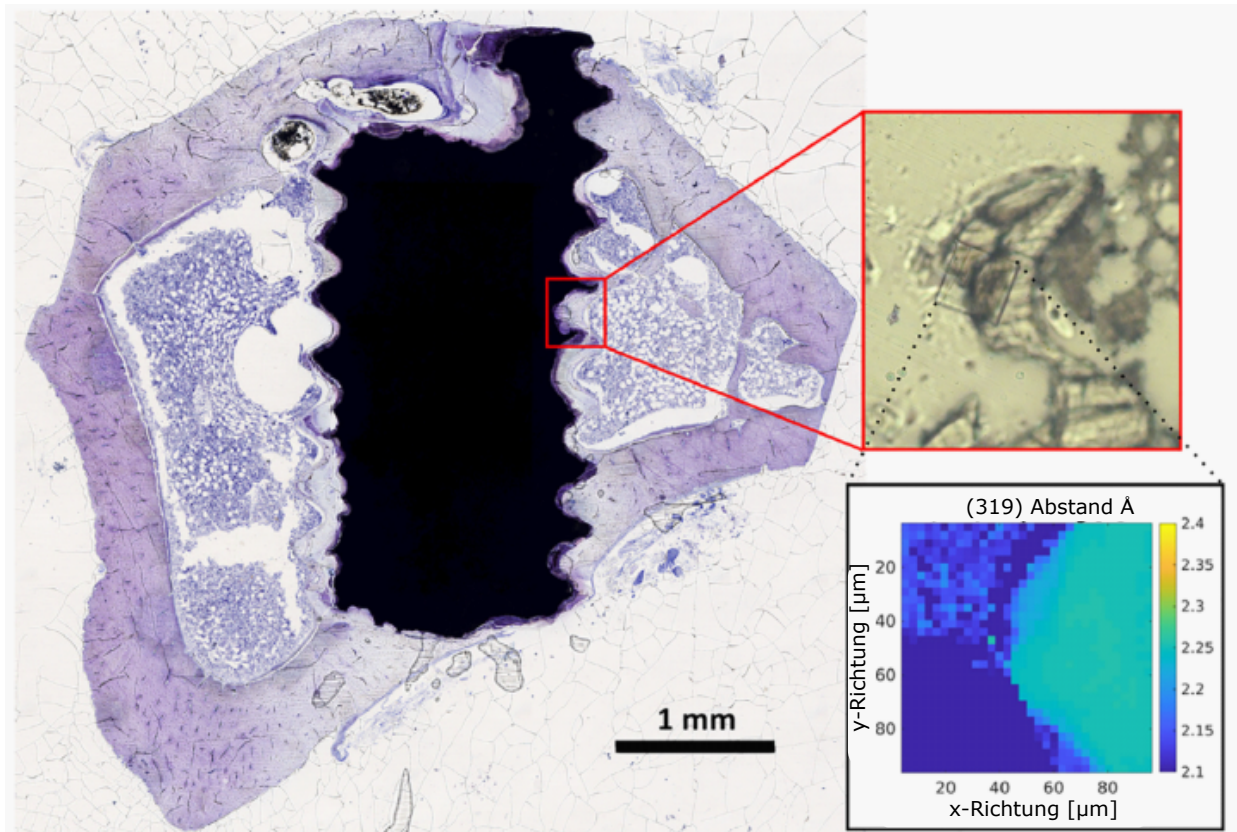


Abbildung 27: Histologischer Schnitt durch eine Mg-5Gd-Probe nach einer Heilungsdauer von zwölf Wochen, die mit Toluidin-Blau gefärbt wurde. Die umrandeten Abbildungen zeigen eine der untersuchten Regionen auf der Probe, die mittels Raster-Diffraktionsuntersuchungen gemessen wurde. Die untersuchte Region ist aufgrund des Strahlenschadens im Kaptonklebeband gut zu sehen. Zudem ist eine beispielhafte Karte der (310)-Gitterkonstanten von Hydroxylapatit in der schwarzen Box gezeigt. Ein Unterschied in der Reflexposition zwischen der Degradationsschicht (links oben) und dem Knochen (rechts) ist gut zu sehen. Die Abbildung wurde aus Zeller-Plumhoff et al. entnommen [143]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 International Lizenz.

ßerung zu sehen. Des Weiteren ist exemplarisch eine zweidimensionale Karte abgebildet, die die räumliche Verteilung des (310)-Gitterebenenabstands von Hydroxylapatit darstellt und aus den Diffraktionsmessungen bestimmt wurde. Diese Messungen erlauben es, orts aufgelöst die Veränderung in der Kristallstruktur, Größe und Orientierung der Hydroxylapatitkristalle entlang der Grenzfläche räumlich zu ermitteln [143].

Die Röntgenkleinwinkelmessungen, die unter anderem Aufschluss über die Orientierung des Hydroxylapatits geben, zeigen, dass an den Grenzflächen zu den Titanimplantaten generell eine niedrigere Orientierung vorzufinden war als in ähnlichen Untersuchungen an intramedullären Nägeln [143, 144]. Die Orientierung um die Magnesiumimplantate war ähnlich niedrig [143]. Allerdings scheint eine Tendenz vorzuliegen, dass die Orientierung an den Titangrenzflächen größer ist als an den Grenzflächen zum Magnesiumimplantat. Jedoch ist aufgrund der hohen Standardabweichung der Resultate keine statistische Signifikanz vorhanden.

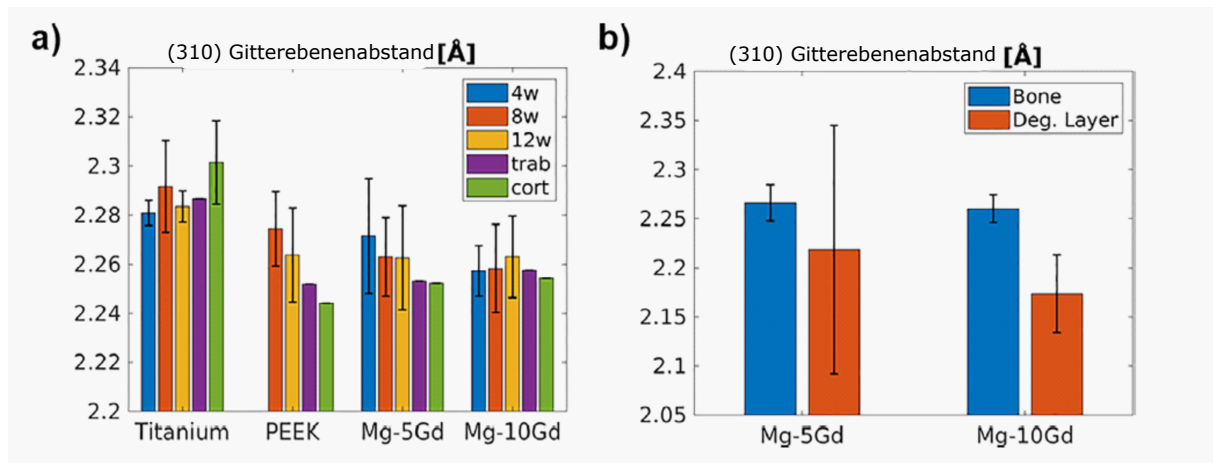


Abbildung 28: (a) Gitterkonstante des (310)-Hydroxylapatitreflexes (hexagonales Kristallgitter) im Knochen, der Titan, Peek, Mg-5Gd und Mg-10Gd umgibt. Der Beobachtungszeiträume sind vier, acht und zwölf Wochen. Ebenso sind Referenzregionen im trabekulären und kortikalen Knochen dargestellt. (b) Vergleich der durchschnittlichen Gitterkonstante des (310)-Reflexes in der Degradationsschicht und im Knochen für alle Zeitpunkte. Die Abbildung wurde aus Zeller-Plumhoff et al. entnommen [143]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 International Lizenz.

Die Dicke der Hydroxylapatit-Plättchen, die aus den Röntgenkleinwinkelstreudaten berechnet werden kann, zeigt, dass die Plättchen an der Titangrenzfläche eine Größe von 32 Å–36 Å haben [143]. Dieser Wert ist jedoch höher als in der Literatur 20 Å–25 Å, aber durch Einflüsse, wie Implantationsort oder einer anderen Tierart erklärbar [144, 145]. Für die untersuchten Magnesiumlegierungen konnte eine wesentlich kleinere Größe von 27 Å–36 Å für Mg-5Gd und 25 Å–32 Å für Mg-10Gd beobachtet werden [143]. Dies ist vergleichbar zu ähnlichen Untersuchungen an anderen Legierungen [146].

Der (310)-Gitterebenenabstand des Hydroxylapatits an der Grenzfläche zeigt jedoch Unterschiede zwischen Titan-, PEEK- und Magnesiumlegierungen, siehe Abbildung 28. So ist der Gitterparameter des Hydroxylapatits an der PEEK- und Magnesium-Grenzfläche ähnlicher zu den Werten in der Literatur als Titan [147–149]. Bei den Magnesiumimplantaten sind die Gitterkonstanten, im Vergleich zu den untersuchten Titanimplantaten zu kleineren Werten verschoben, was eine veränderte Kristallstruktur andeutet. Dies lässt sich besonders im Bereich der Degradationsprodukte sehen, wo die Verschiebung der Gitterkonstanten noch ausgeprägter ist. Die Werte liegen jedoch immer noch nahe an den Positionen für Hydroxylapatit, siehe Abbildung 28. Daher kann man annehmen, dass Hydroxylapatit ähnliche Strukturen an der Grenzfläche durch die Remodellierungsprozesse bildet. Diese scheinen jedoch eine leicht andere Struktur bzw. Zusammensetzung zu haben, da vermehrt Magnesium oder Gadolinium in die Struktur eingebaut wird [150, 151]. Andere Autoren haben ebenso beobachtet, dass durch eine Substitution von Gd bzw. Mg apatitähnliche Strukturen mit veränderten Gitterkonstanten gebildet werden [141, 150].

Der beobachtete Unterschied zwischen den Gitterkonstanten der PEEK- und Mg-xGd-Implantate mag auf die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften, insbesondere des Elastizitätsmoduls, zurückzuführen sein. Das Elastizitätsmodul von Mg-xGd beträgt ungefähr 45 GPa und von PEEK 4 GPa [152, 153]. Somit könnten die Materialtypen zu einem veränderten mechanischen Stimulus für die Osteozyten führen und so die Mineralisation beeinflussen.

Die Größe der Hydroxylapatitkristalle, die mithilfe der Diffraktionsdaten bestimmt wurde, lässt keine direkten Schlüsse für die Knochenstruktur zu. So konnten zwar Unterschiede in der Größe der Kristalle zwischen Titan- und Mg-5Gd-Proben beobachtet werden, jedoch ist ein solcher Unterschied nicht für die PEEK- und Mg-10Gd-Implantate vorhanden. Die hydroxylapatit-ähnlichen Strukturen in der Degradationsschicht der Mg-xGd-Implantate zeigen hingegen eine Verringerung der Kristallgröße, die mit der Konzentration des Gadoliniums korreliert. Dies könnte auf den Einbau von Gadolinium bzw. Magnesium in die Kristallstrukturen hindeuten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede in untersuchten Parametern der Knochenultrastruktur zwischen PEEK-, Titan- und biologisch abbaubaren Implantaten zwischen den untersuchten Zeitpunkten zu beobachten sind. Es konnte kein Einfluss auf die Hydroxylapatitorientierung und Plättchendicke beobachtet werden. Die Struktur und Größe der Hydroxylapatitkristalle sind im Knochengewebe in der Gegenwart von Magnesiumimplantaten beeinflusst, was auf eine Inkorporation von Magnesium oder Gadolinium in die Knochenmatrix hindeutet. Des Weiteren zeigt die Analyse der Degradationsschicht, dass eine Apatitbildung beobachtet werden kann. Jedoch haben die Kristalle andere Netzebenenabstände als Hydroxylapatit, was ebenso durch eine Inkorporation von Gadolinium bzw. Magnesium zu erklären ist.

Neben der späteren Mineralisierung spielt aber auch die frühe Phase der Osseointegration eine entscheidende Rolle, die den Erfolg einer Integration bestimmt. Um dieses genauer zu untersuchen, wurden nadelförmige Magnesiumlegierungen mit der Zusammensetzung Mg-0,45wt%Zn-0,45wt%Ca in den Oberschenkel von Ratten implantiert und nach Heilungszeiträumen von zwei, fünf und zehn Tagen untersucht. Es wurden Computertomographie, histologische, immunhistochemische, histomorphometrische und Röntgenkleinwinkeluntersuchungen verwendet, um die Knochenneubildung, die frühe Makrophagenpolarisation, die Neovaskularisierung und die Knochenqualität an der Implantat-Knochen-Schnittstelle zu untersuchen. Um Veränderungen in der Knochenultrastruktur zu beobachten, sind histologische Untersuchungen, die eine Sirius-Rot-Färbung nutzen, und Röntgenkleinwinkeluntersuchungen interessant.

Die histologischen Untersuchungen an der Kontrollgruppe (Scheinkontrollgruppe) zeigen, dass keine Veränderung der beobachteten Längen und Dicken der Kollagenfa-

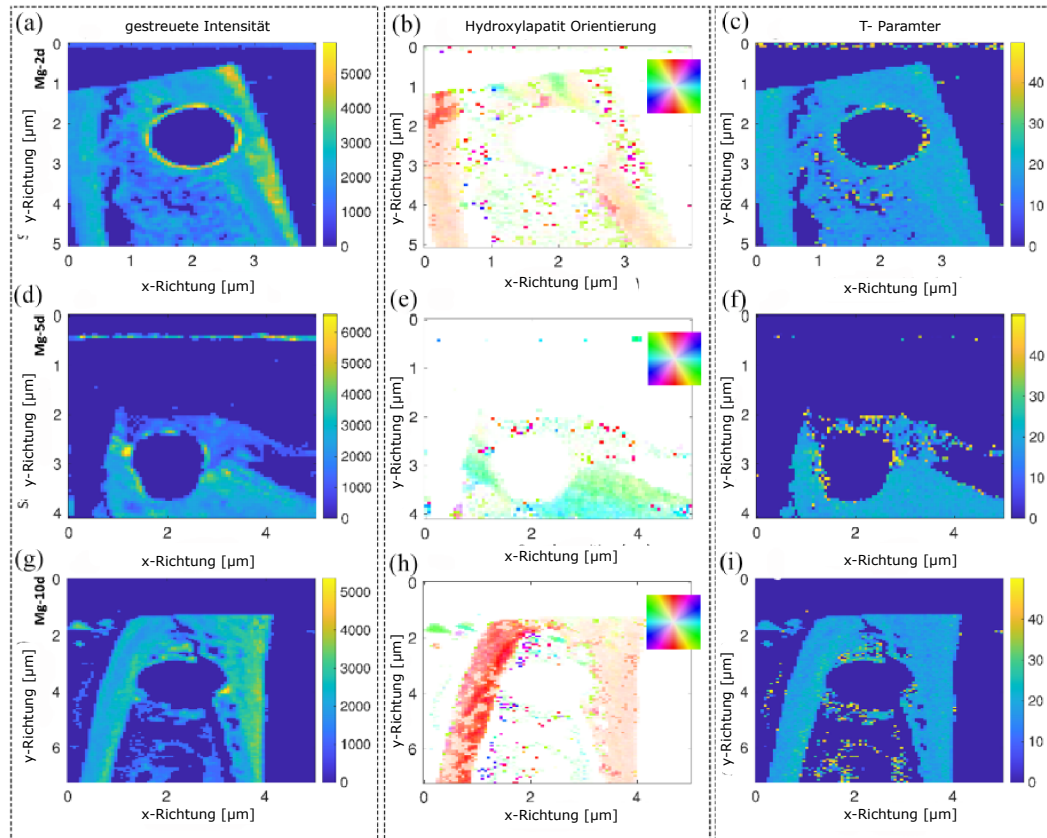


Abbildung 29: Untersuchung der Kollagen/Hydroxylapatit-Orientierung und der Größe der Hydroxylapatitplättchen in der Mg-basierten Legierung (Mg, Zn 0,45 wt%, Ca 0,45 wt%) als Funktion der Heilungszeit basierend auf Röntgenkleinwinkelanalysen. Die Proben werden in einem Bereich von etwa $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ abgetastet, jedes Pixel entspricht einem untersuchten Bereich mit einem Radius von $60 \mu\text{m}$. Zweidimensionale Auftragung der Intensität (a, d, g) sowie der Hydroxylapatit-Orientierung in Grad (b, e, h) und der Plättchengröße in nm (c, f, i). Der Farbcode in der Hydroxylapatit-Orientierungsanalyse (a, d, g) zeigt den Orientierungsgrad an. Der Inset entspricht direkt der Orientierung, er ist zum Beispiel rot entlang der y-Achse des Bildes. Die Abbildung wurde aus Rahmati et al. entnommen [154]. Veröffentlicht unter der Creative Commons CC-BY 4.0 Lizenz.

sern auftritt. Dies ist jedoch bei der Versuchsgruppe mit den Magnesiumnägeln anders und es kann eine Verlängerung der Kollagenfasern und eine Verringerung ihrer Breite beobachtet werden, was einen deutlichen Einfluss auf die Knochengewebebildung bedeutet.

Mittels Röntgenkleinwinkelstreuung wurden die Orientierung des Hydroxylapatits, der Grad der Mineralisierung und die Dicke der Plättchen untersucht, um die Auswirkung von Magnesium auf die Knochenneubildung zu bestimmen. In der Kontrollgruppe wurde beobachtet, dass im erzeugten Defekt eine mineralisierte Region zwei Tage nach dem Eingriff zu sehen ist. Im Verlauf von zehn Tagen ist die Region wieder vollständig mineralisiert und der erzeugte Defekt ist geschlossen. Während dieser Zeit wurden Hydroxylapatitplättchen mit einer Dicke von 2 nm gebildet.

In Abbildung 29 sind die zweidimensionalen Verteilungen entlang der Probe mit den Magnesiumimplantaten gezeigt. Es sind die Plättchendicke des Hydroxylapatits, dessen Orientierung und die integrale Strukturstärke für jeden Punkt dargestellt. Die Region mit dem eingebrachten Implantat ist deutlich zu sehen. Die Region mit der höchsten Hydroxylapatitorientierung ist im kortikalen Knochen zu finden und zeigt eine Orientierung entlang der Achse des Knochens. Obwohl eine niedrige Orientierung nach zwei Tagen um das Implantat zu sehen war, konnte ein starkes Röntgenkleinwinkelsignal beobachtet werden, was auf eine starke und ungeordnete Mineralisierung hindeutet. Nach fünf Tagen war ein leichtes Anwachsen der Hydroxylapatitplättchen an der Grenzfläche zu beobachten, wobei die Orientierung ähnlich niedrig war wie nach zwei Tagen. Eine 120 µm dicke mineralisierte Knochenschicht konnte nach zehn Tagen Heilung beobachtet werden, wobei die Orientierung der Hydroxylapatitplättchen ähnlich niedrig war wie zu den vorherigen Zeitpunkten. Innerhalb der Knochenregion um das Implantat konnte eine Dicke der Hydroxylapatitplättchen von 3,5 nm bis 4 nm beobachtet werden, was eine starke Remodellierung anzeigt.

Die histologischen Untersuchungen des Knochens liefern Informationen über die Auswirkungen der abbaubaren Magnesiumimplantate auf die Knochenstruktur an der Grenzfläche. Die Ergebnisse zeigen eine verbesserte Kollagenorientierung und -ausrichtung im Laufe der Heilungszeit für die Mg-basierte Legierung (erhöhte Faserlänge sowie verringerte Faserbreite und -winkel). Dies deutet auf eine bessere Knochenremodellierung in der Magnesiumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Röntgenkleinwinkeluntersuchungen, da am 10. Tag nach der Implantation die stärkste Ausrichtung des Hydroxylapatits zu beobachten ist. Die Dicke der Hydroxylapatitplättchen stieg hierbei auf 3,5 nm bis 4 nm. Dies deutet auf eine erhöhte Knochenremodellierung nach der Implantation der Mg-Legierung hin.

Relevante Publikationen

- B. Zeller-Plumhoff, C. Malich, D. Krueger, G. Campbell, B. Wiese, S. Galli, A. Wennerberg, R. Willumeit-Römer, D.C.F. Wieland. Analysis of the bone ultrastructure around biodegradable Mg-xGd implants using small angle X-ray scattering and X-ray diffraction, Acta Biomater. **2020**, 101, 637.
- M. Rahmati, S. Stötzel, T. El Khassawna, K. Iskhahova, D.C.F. Wieland, B. Zeller-Plumhoff, H.J. Haugen. Early osteoimmunomodulatory effects of magnesium–calcium–zinc alloys. J. Tissue Eng. **2021**, 12, 1.

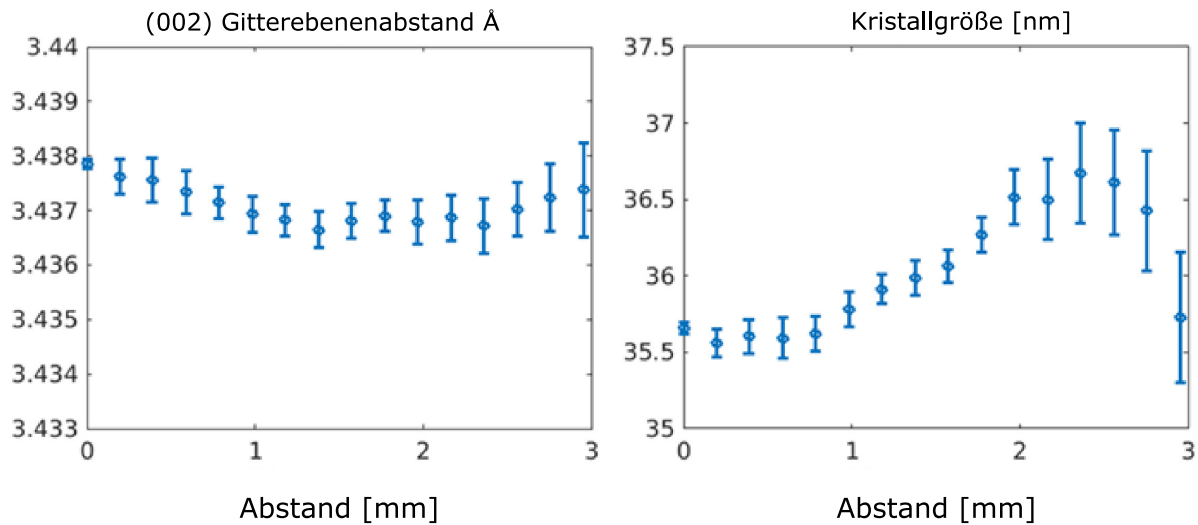


Abbildung 30: (002) Gitterebenenabstand des hexagonalen Hydroxylapatits (links) und die Kristallgröße (rechts) als Funktion des Abstands zur Magnesiumimplantat-Oberfläche. Der d-Abstand zeigt keine signifikante Veränderung mit dem Abstand zum Implantat, während die Kristallgröße bei Annäherung an die Implantat-Oberfläche abnimmt. Das Bild wurde aus Iskhakova et al. entnommen [155]. Nachdruck mit Genehmigung von SPIE Publishing.

3.2.3 Entwicklung von Methoden zur Untersuchung biologisch abbaubarer Magnesiumimplantate mittels Synchrotrontechniken

Für die Untersuchung der Knochenultrastruktur mittels Rasterkleinwinkel- und Diffraktionsuntersuchungen werden typischerweise Knochenschnitte benötigt, die eine Dicke von wenigen Mikrometern haben [143]. Dies hat zur Konsequenz, dass die Informationen nur zweidimensional sind und lediglich einen Ausschnitt aus der Probe zeigen. Hierbei ist ein Problem, dass die Wahl der Schnittebene ggf. einen Einfluss auf die wissenschaftlichen Schlüsse haben kann. Daher sind Methoden, die diese Information dreidimensional liefern, wünschenswert. Ein zusätzlicher Vorteil dreidimensionaler Methoden ist, dass eine aufwendige und destruktive Präparation der Probe überflüssig wird, da die Probe als Ganzes untersucht werden kann. In einem ersten Experiment wurde die Diffraktion-Kontrast-Tomographie genutzt und nötige Rekonstruktionsalgorithmen getestet und optimiert, um Informationen über die Hydroxylapatitkristalle im Volumen zu untersuchen und dabei die Grenzfläche zwischen Implantat und Knochen zu charakterisieren. Die Diffraktion-Kontrast-Tomographie nutzt hierbei tomographische Prinzipien, um das Diffraktionssignal eines jeden Voxels in einer dreidimensionalen Probe zu berechnen. So erlaubt diese Methode nicht nur, die Kristallphasen zu analysieren, sondern auch Parameter wie die Kristallgrößen.

In einem ersten Experiment wurde ein Magnesiumimplantat mit der Zusammensetzung Mg-0,45wt%Zn-0,45wt%Ca untersucht, das in einem Schafknochen implantiert

war. Die Auswertung der aufgenommenen Messdaten erlaubte es, die Gitterebenenabstände des (002)-Reflexes und die Kristallgröße auf Grundlage der Halbwertsbreite des Streureflexes zu bestimmen. In Abbildung 30 sind die Gitterebenenabstände und die Größe der Hydroxylapatitkristalle als Funktion des Abstandes von der Implantat-Oberfläche gezeigt. Der Gitterebenenabstand ändert sich nicht wesentlich als Funktion des Abstands von der Implantat-Oberfläche. Die Kristallgröße hingegen scheint bis zu einem Abstand von 1,5 mm vom Implantat geringer zu sein als im restlichen Knochen.

Es lässt sich somit schlussfolgern, dass der Gitterebenenabstand und damit die Kristallstruktur durch das Implantat nicht beeinflusst werden, während die Kristallgröße in der Nähe des Implantats abnimmt. Der DCT-Ansatz erweist sich als geeignete Methode für *ex-vivo* Studien zum Einfluss des Abbaus eines biologisch abbaubaren Metallimplantats auf die Ultrastruktur des Knochens.

Für Implantate ist eine gute Osseointegration entscheidend, damit eine starke Verbindung zwischen Implantat und Knochen vorhanden ist. Hierfür ist es wichtig, eine gute Kenntnis der Eigenschaften der Knochenimplantat-Grenzfläche zu haben, da diese die mechanische Belastbarkeit und das Versagen bestimmt. Für biologisch abbaubare Implantate gibt es hier aufgrund der komplexen Zusammenhänge offene Fragen und eine exakte Charakterisierung der Knochenimplantat-Grenzfläche unter biomechanischen und morphologischen Gesichtspunkten ist nötig. Biomechanische Belastungstests, die mit *in-situ* Computertomographiemessungen kombiniert werden, können einen entscheidenden Beitrag leisten [138, 156, 157].

Um mechanische Belastungstests an biologisch abbaubaren Implantaten durchführen zu können, ist es essenziell, einen belastbaren Angriffspunkt zu finden. Experimente, die nicht abbaubare Implantate nutzen, verwenden zum Beispiel eine spezielle Implantatgeometrie, die es erlaubt, die Proben auch im eingewachsenen bzw. geheilten Zustand in eine Zugmaschine einzuspannen [158]. Dies ist für abbaubare Implantate nicht möglich, da sich ihre Form verändert bzw. die Angriffspunkte degradieren. Zudem sollten die Implantate entlang der Zug- bzw. Druckrichtung ausgerichtet sein, was aufgrund des umgebenden Knochens schwierig zu beurteilen ist, da die exakte Orientierung nicht erkennbar ist. Nach diversen Versuchen wurde ein Vorgehen etabliert, bei dem die dreidimensionale Struktur der Implantate mit einer schnellen Computertomographie erfasst wurde. Auf Grundlage dieser Daten wurde ein Modell erstellt und ein 3-D-gedruckter Probenhalter angefertigt, der die exakte Ausrichtung der Probe, ihre Zentrierung und die nötige Stabilisierung bot. Die verschiedenen Schritte sind in Abbildung 31 zusammengefasst. Hierdurch war es möglich, *in-situ* Versuche mit der nötigen Präzision vorzunehmen und Belastungstests an der Probe durchzuführen.

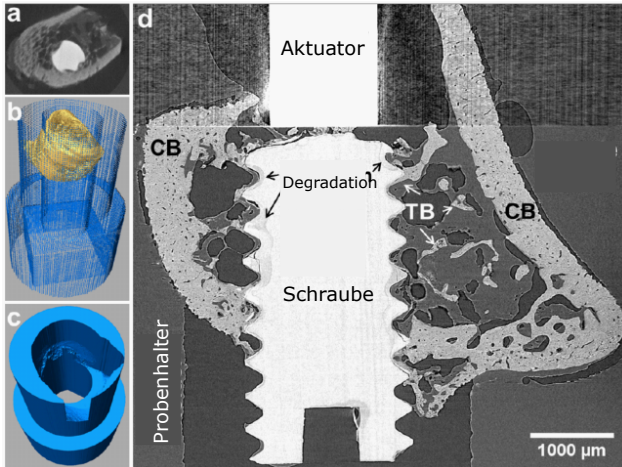


Abbildung 31: Aufbau und Vorgehen zur Probenausrichtung für in-situ-Tomographiemessungen von mechanischen Belastungstests von Knochenimplantat-Proben. a) Original-Tomogramm einer gefrorenen Explantatprobe. b) Rekonstruiertes Volumen, das digital ausgerichtet wurde, sodass die Längsachse der Schraube paraxial mit der vertikalen Achse ausgerichtet und zum Ursprung zentriert wurde. c) Das digital ausgerichtete Volumen wird verwendet, um einen Probenhalter mittels 3D-Drucktechniken anzufertigen. Dabei entspricht der Hohlraum dem inversen Volumen der Probe. d) Vertikaler Schnitt durch ein Tomogramm einer Mg-5Gd Probe nach einer Heilungszeit von vier Wochen. Der Aktuator übt Kraft von oben auf die Probe aus und drückt damit die Schraube aus dem Knochen. Die Abbildung wurde aus Moosmann et al. [156] entnommen. Nachdruck mit Genehmigung von SPIE Publishing.

Tatsache dar, dass Knochen strahlensensitiv sind und sich ihre mechanischen Eigenschaften bei einer zu hohen Dosis verändern. Von Barth et al. wurden menschliche Knochen auf diesen Aspekt hin untersucht [159, 160]. Nach einer Dosis von 35 kGy treten Veränderungen in den makroskopischen Eigenschaften wie Stärke, Duktilität und Bruchfestigkeit auf. Ein Tomogramm mit einer hohen Auflösung kann zu einer Belastung von 1 MGy in der Probe führen. Somit müssen die Datenaufnahmen entsprechend angepasst werden. Für eine genaue Aussage zu den hier untersuchten Proben wurden biomechanische Belastungstests an Knochen gemacht, die einer definierten Dosis ausgesetzt waren [157]. Die beobachteten Resultate an den Rattenknochen entsprechen den Beobachtungen an menschlichen Knochen. Auf Grundlage dieser Daten wurden

In einer ersten Messung wurde eine Probe nach den beschriebenen Schritten präpariert und ein *in-situ* μ CT-Experiment mit kombinierter mechanischer Belastung durchgeführt. Die Schraube aus einer Magnesiumlegierung mit 10 wt% Gadolinium wurde aus einer Ratte mit umgebenden Knochen explantiert und für die Experimente wie oben beschrieben präpariert.

Die Messungen zeigen eine hohe Qualität der Daten in Bezug auf die Auflösung der Dichte und Struktur [156, 157]. Es war möglich, in den Bilddaten den kortikalen Knochen, trabekulären Knochen, die Osteozyten, die Havers-Kanäle und das Knochenmark zu unterscheiden, siehe Abbildung 31d und 32. Die durchgeführten biomechanischen Tests zeigten, dass erste Risse bei einer Kraft von 18 N auftreten, siehe Abbildung 32. Anschließend werden Risse in der gesamten Probe gefunden, jedoch keine vermehrten Risse an der Knochenimplantat-Grenzfläche. Generell zeigte die untersuchte Mg-10Gd-Schraube eine gute Integration in diesen ersten Untersuchungen.

Eine weitere Herausforderung stellt die

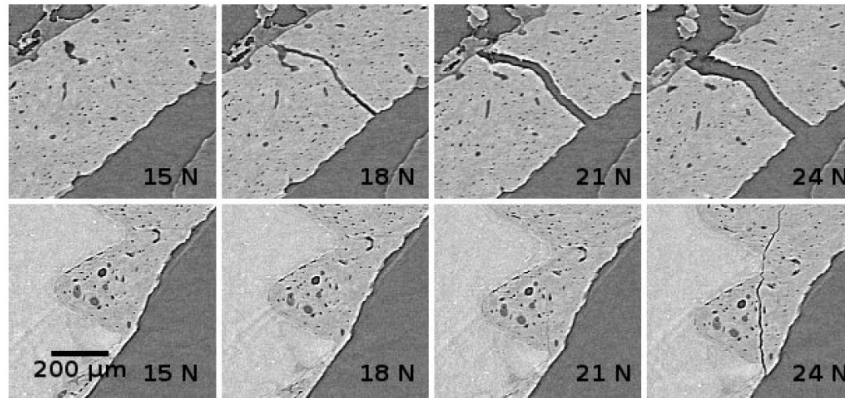


Abbildung 32: Bildsequenz von vertikalen Schnitten durch das rekonstruierte Volumen einer tomographischen Rekonstruktion eines Explantates unter zunehmender Belastung. Das Explanat ist eine Mg-10Gd-Schraube in einer Rattenfemur mit einer Heilungszeit von zwölf Wochen. Die obere Reihe zeigt die Vergrößerung einer kortikalen Region. Die untere Reihe zeigt einen Ausschnitt der Knochenimplantat-Grenzfläche. Bevor die Tomogramme gemessen wurden, war die Kraft auf 15 N, 18 N, 21 N und 24 N eingestellt worden. Jeder Ausschnitt hat eine Größe von 148×140 Pixeln mit einer Pixelgröße von $4,8 \mu\text{m}$. Die Abbildung wurde aus Moosmann et al. [156] entnommen. Nachdruck mit Genehmigung von SPIE Publishing.

Simulationen und Berechnungen erstellt, um die besten Messparameter für verschiedene Photonenenergien zu berechnen, sodass die Dosis pro Tomogramm einen Wert von $3,5 \text{ kGy}$ nicht übersteigt [157]. Somit sollte es möglich sein, zehn Aufnahmen bzw. Belastungsstufen anzufahren, ohne die mechanischen Eigenschaften durch die Strahlung zu verändern.

Für eine Auswertung der Tomogramme ist eine pixelgenaue Segmentierung erforderlich. Dies sollte im optimalen Fall mittels einer automatisierten Routine geschehen, was jedoch aufgrund verschiedener Probleme schwierig ist, zumal automatisierte Routinen nur auf bestimmten Proben anwendbar sind. Eine von uns erprobte Methode für abbaubare Implantate war die Anwendung neuronaler Netzwerke (engl. convolutional neural networks (CNN)) [157]. Die in diesem Projekt entwickelten Netzwerke bestehen aus 64 Schichten. Es wird eine Segmentierung entlang der Raumachsen durchgeführt und im späteren Verlauf überprüft, ob die Segmentierung übereinstimmt. Dieses Vorgehen führte zu einem Qualitätsgewinn und es wurde eine Genauigkeit von 97% erzielt. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Segmentierung besser ist als eine vorher genutzte semiautomatische Segmentierung [157].

Auf Grundlage der Segmentierung erfolgt anschließend eine qualitative und quantitative Analyse, zum Beispiel mittels digitaler Volumen-Korrelation. Hierbei werden sog. „Optical Flow“-Methoden eingesetzt [161, 162]. Das dabei berechnete Versetzungsfeld erlaubt es, die Spannung, Brüche und Risse in der Schraube und im Knochen zu berechnen. In weiteren Schritten kann das berechnete Belastungsfeld als Parameter benutzt werden, um mittels Finite-Elemente-Methoden zum Beispiel das Elastizitätsmodul zu

bestimmen. Somit bietet dieses Experiment eine Vielzahl von möglichen Parametern, die analysiert werden können und somit ein tieferes Verständnis erlauben.

Relevante Publikationen

- J. Moosmann, B. Zeller-Plumhoff, D.C.F. Wieland, S. Galli, D. Krüger, T. Dose, H. Burmester, F. Wilde, M. Bech, N. Peruzzi, B. Wiese, A. Hipp, F. Beckmann, J. Hammel, R. Willumeit-Römer, Biodegradable-magnesium-based implants in bone studied by synchrotron radiation microtomograph. Proc. SPIE 10391, Developments in X-Ray Tomography XI **2017**, 1039100.
- R. Willumeit-Römer, J. Moosmann, B. Zeller-Plumhoff, D.C.F. Wieland, D. Krüger, B. Wiese, A. Wennerberg, N. Peruzzi, S. Galli, F. Beckmann, J.U. Hammel. Visualization of Implant Failure by Synchrotron Tomography, TMS 2018 147th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings **2018**, 214.
- J. Moosmann, D.C.F. Wieland, B. Zeller-Plumhoff, S. Galli, D. Krüger, A. Ershov, S. Lautner, J. Sartori, M. Dean, S. Köhring, H. Burmester, T. Dose, N. Peruzzi, A. Wennerberg, R. Willumeit-Römer, F. Wilde, P. Heuser, J.U. Hammel, F. Beckmann. A load frame for in situ tomography at PETRA III. Developments in X-Ray Tomography XII **2019**, 11113, 252.
- K. Iskhakova, D.C.F. Wieland, B. Zeller-Plumhoff, R. Willumeit-Römer. X-ray diffraction tomography as a tool to study the influence of biodegradable metal implant on the bone in 3D. Proceedings in SPIE, Developments in X-Ray Tomography XIII **2021**, 11840, 98.

3.2.4 Diskussion

Knochen ist ein Kompositmaterial, in dem sich die Kollagenfasern und das Hydroxylapatit in einer hierarchischen Struktur anordnen. Der Knochen ist dabei stets einer Reorganisation unterworfen, um neuen Belastungen gerecht zu werden [120–122]. Dabei ist das Ziel dieser Optimierung, eine möglichst stabile und leichte Struktur zu erzeugen. Ein Schlüssel ist die Organisation auf der Ultrastrukturebene, wo sich der Knochen in lamellaren und trabekulären Knochen einteilen lässt, die aus einer Kollagen- und Hydroxylapatit-Matrix bestehen [1, 2]. Die Reorganisation der Ultrastruktur kann durch verschiedene Einflüsse gestört werden, was zu einer verschlechterten Knochenqualität führen kann.

Knochenkrankheiten wie vasculäre Necrose können die Knochenbildung stören und so zum Beispiel zu einer Instabilität im Bereich des femoralen Kopfes von Hüftgelenken führen, was eine verminderte Traglast und Schmerzen zur Folge haben kann. Eine Verbesserung der Knochenbildung kann jedoch über eine Elektrostimulation erfolgen. Der exakte Einfluss der Elektrostimulation auf das Knochengewebe ist bis heute noch nicht vollständig verstanden, da verschiedene Mechanismen zum Tragen kommen können [126–128]. Eine Hypothese geht davon aus, dass über den piezoelektrischen Effekt, der in Knochen auftritt, eine mechanische Belastung auf den Knochen ausgeübt wird, was wiederum die Osteozyten stimuliert.[44, 131]. Das von mir durchgeführte Experiment zielte darauf ab, zu verstehen, ob und wie der piezoelektrische Effekt eine mechanische Belastung induzieren kann. Eine essenzielle Erkenntnis war, dass eine mechanische Belastung im Knochen durch elektrische Felder bzw. dem piezoelektrischen Effekt erzeugt werden kann, die von Osteozyten wahrgenommen werden kann.[77] Hierfür müssen die Kollagenfasern der Knochenmatrix senkrecht zum elektrischen Feld orientiert sein, um eine Scherdeformation zu erreichen. Damit zeigte sich, dass der piezoelektrische Effekt des Knochens für diese Stimulation verantwortlich sein kann.

Ein weiterer Stimulus auf die Knochenultrastruktur kann auch durch biologisch abbaubare Implantate ausgelöst werden. Diese Implantate, die Potenzial zur Behandlung von Knochentraumata haben, degradieren im Knochengewebe und stellen daher einen chemischen und mechanischen Stimulus für das Knochengewebe dar. Um die Entwicklung dieser Implantate voranzutreiben, muss geklärt werden, was deren Einfluss auf das Knochengewebe ist und wie sie sich von etablierten Implantatmaterialien wie Titan unterscheiden.[49] Hierbei sind gerade sowohl die Osseointegration als auch die Veränderungen auf der Ebene der Knochenultrastruktur von großer Bedeutung. Eine stabile und haltbare Verbindung ist wichtig, um eine erfolgreiche Knochenheilung zu garantieren. Bei biologisch abbaubaren Implantaten gibt es jedoch zwei Punkte zu beachten: Zum einen ist keine stabile Knochenimplantat-Grenzfläche vorhanden, da das Implantat degradiert; zum anderen unterliegt Knochen einer ständigen Reorganisation, die durch

mechanische oder chemische Einflüsse verändert werden kann. Die Struktur und Eigenschaften der Knochenimplantat-Grenzfläche sind daher entscheidend, um das Verhalten solcher Implantate verstehen zu können.

Die Ergebnisse legen dar, dass die Knochenultrastruktur an der Knochenimplantat-Grenzfläche auf der Ebene der Kollagen-Hydroxylapatitmatrix durch Magnesiumimplantate zu bestimmten Heilungszeitpunkten auf bestimmten Längenskalen beeinflusst sein kann [154]. Die Untersuchungen zu sehr frühen Heilungszeiträumen von zehn Tagen wurden an Proben mit einer Größe von $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ mit einer Auflösung von $60\text{ }\mu\text{m}$ durchgeführt. Die Resultate zeigen deutlich einen Einfluss auf die Kollagenstruktur und Hydroxylapatitmineralisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bei längeren Heilungszeiträumen von vier, acht und zwölf Wochen konnte hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Titan-, PEEK- und Magnesiumimplantaten hinsichtlich der Orientierung und Mineralisierung von Hydroxylapatit beobachtet werden [143]. Die untersuchte Region von $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ wurde hierbei mit einem Röntgenstrahl von $1,5\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser abgetastet. Die Orientierung und Plättchendicke der verschiedenen Materialien, die beobachtet wurden, waren ähnlich und zeigten keine statistisch signifikante Veränderung zueinander. Jedoch war auf der Ebene der Kristallstrukturen ein Einfluss der abbaubaren Implantate zu sehen, da das Kristallgitter des Hydroxylapatits verändert war. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche chemische Umgebung an den Implantat-Grenzflächen zurückzuführen, da eine erhöhte Konzentration von Magnesium und Gadolinium vorliegt. Ähnliche Beobachtungen waren in Bereichen zu machen, wo Degradationsprodukte zu finden sind. Es konnte beobachtet werden, dass sich apatitähnliche Strukturen bilden, die sich in ihrer Kristallstruktur von Hydroxylapatit unterscheiden. Auch hier ist vermutlich durch die chemische Umgebung ein vermehrter Einbau von Magnesium und Gadolinium verantwortlich. Die durchgeführten DCT-Messungen deckten hingegen ein größeres Probenvolumen ab, da eine Probe mit 6 mm Durchmesser mit einer Auflösung von $200\text{ }\mu\text{m}$ untersucht wurde. Diese Messungen konnten die Struktur der Degradationsschicht nicht auflösen, da diese zu klein ist. Jedoch konnte ein Einfluss auf die Kristallgrößen in einem Bereich von $1,5\text{ mm}$ um das Implantat beobachtet werden.

Diese Beobachtungen sind auf der Mikrometer- bzw. Nanometer-Längenskala gemacht worden und es lassen sich makroskopische Eigenschaften nur bedingt ableiten. Weitere Erkenntnisse können mit mechanischen Belastungstest und *in-situ* Computertomographie-Experimenten gewonnen werden [138, 156, 157]. Zu diesem Zweck wurde ein Experiment entwickelt, das es erlaubt, die mechanische Belastung einer Knochenimplantat-Probe zu messen und gleichzeitig die dreidimensionale Struktur zu beobachten. Hiermit ist man in der Lage, direkt das Versagen eines Implantates zu beobachten. Erste Messungen zeigen, dass Magnesiumimplantate bis zu einer Kraft von ca. 18 kN sta-

bil im Knochen verankert sind. Bei größeren Kräften traten Risse auf. Diese Risse waren jedoch nicht primär an der Knochenimplantat-Grenzfläche aufgetreten, sondern verteilt über das Probenvolumen. Insgesamt zeigt dies eine sehr gute Integration solcher Materialien.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sind weitere Studien geplant, die weitere Eigenschaften sowohl der Knochenimplantat-Grenzfläche als auch der Degradation untersuchen. So befasst sich ein von mir betreutes PhD-Projekt mit der Untersuchung solcher Implantate für Beobachtungszeiträume von bis zu neun Monaten, um zu untersuchen, wie die Degradationsprodukte abgebaut und der Knochen restrukturiert wird. Hierbei werden neben hochauflösender Computertomographie auch Histologie und Röntgenfluoreszenzanalyse verwendet. Ein weiteres geplantes Projekt will die Grenzfläche mittels Nanoindentation untersuchen und dieses mit weiteren Techniken korrelieren. Hierbei sollen neben der Zellenebene mittels Histologie auch Informationen zur Elementverteilung, Knochendichte und Kollagenstruktur einfließen. Diese verschiedenen Modalitäten sollen anschließend mithilfe von Ansätzen aus den Datenwissenschaften ausgewertet und korreliert werden. Durch diese Kombination der Techniken wird es möglich sein, die Struktur- und Zellebene mit den mechanischen Eigenschaften zu verbinden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der diskutierten wissenschaftlichen Arbeiten habe ich zum einen die Untersuchung der molekularen Wechselwirkung zwischen DPPC-Lipiden und Hyaluronan, die als Modellsystem zur Synovialflüssigkeit konzipiert war, dargestellt und den Einfluss von Druck, Scherung und Lösungszusammensetzung auf diese untersucht. Zum anderen wurde der Einfluss externer Stimuli wie elektrischen Feldern und biologisch abbaubaren Implantaten auf die Knochenultrastruktur und Mikrostruktur untersucht, um Einblicke in die Knochenreorganisation zu erlangen.

Bei der Untersuchung der molekularen Wechselwirkung der Synovialflüssigkeit wurde der Fokus auf das Phospholipid DPPC und Hyaluronan gelegt. Es wurde untersucht, wie das molekulare Gewicht von Hyaluronan, die Ionenzusammensetzung und externe Parameter wie Druck die Wechselwirkungen und die Schmierungseigenschaften beeinflussen. Lipidschichten zeigen allein schon niedrige Reibungskoeffizienten, die jedoch – ebenso wie die Belastbarkeit – durch die Adsorption von Hyaluronan herabgesetzt werden. Die molekularen Wechselwirkungen werden sowohl durch Calcium als auch durch das molekulare Gewicht von Hyaluronan beeinflusst, wobei die Stärke der Wechselwirkungen für kleine molekulare Gewichte zunimmt. Die Strukturuntersuchungen zeigen, dass durch die Adsorption von Hyaluronan die laterale Struktur der Lipidschichten verändert und die Packungsdichte herabgesetzt wird. Dies könnte die verringerte Belastbarkeit erklären, die in den Reibungsexperimenten beobachtet wurde. Druckabhängige Strukturmessungen an Lipidschichten zeigen, dass Hyaluronan einen stabilisierenden Effekt hat. Dadurch werden reversible Phasenübergänge möglich, was eine Aufrechterhaltung der strukturellen Anordnung der Makromoleküle unter Belastung erlaubt. Die Zugabe von Calcium führt zu einer Entkopplung der Lipiddoppelschichten unter Druck, was auf die einseitige Adsorption von Hyaluronan und die verstärkte Wechselwirkung zwischen Hyaluronan und DPPC durch Calcium zurückzuführen ist. Als Folge haben beide Schichten unterschiedliche Phasendiagramme. Die Erkenntnisse zeigen, dass kleine Veränderungen einen massiven Einfluss auf die Wechselwirkung der Makromoleküle in der Synovialflüssigkeit haben können und damit auf ihre Funktion.

Aufgrund der Komplexität der synovialen Flüssigkeit sind viele Zusammenhänge ungeklärt. Derzeitige wissenschaftliche Fragen zielen darauf ab, den Einfluss von anderen Makromolekülen, wie zum Beispiel γ -Globulin, Lubricin oder Albumin, zu verstehen. Hierzu ist geplant, die Modellsysteme in ihrer Komplexität schrittweise zu erhöhen. Erste Experimente an Proteinlösungen aus Hyaluronan, Albumin, γ -Globulin und DPPC zeigen, dass unter bestimmten Lösungsbedingungen eine Komplexbildung zwischen den Molekülen stattfindet. Interessant hierbei ist, dass Änderungen in den rheologischen Eigenschaften bei niedrigen Scherraten zu beobachten sind. Eine essenzielle

Frage hierbei ist, wie sich diese Komplexe unter hohen Drücken und Scherung verhalten, um die Wechselwirkungen besser zu verstehen.

Die Ultrastruktur des Knochens kann sowohl durch mechanische als auch durch chemische Einflüsse verändert werden. Die Elektrostimulation des Knochenwachstums lässt sich durch den piezoelektrischen Effekt des Knochens erklären. Die elektrischen Felder erzeugen eine mechanische Belastung in der Kollagenmatrix, die von Osteozyten als Auslöser wahrgenommen werden kann. Auf der anderen Seite haben biologisch abbaubare Implantate im Vergleich zu konventionellen Implantaten aus Titan nur teilweise eine signifikante Veränderung der Knochenultrastruktur induziert. So konnte beobachtet werden, dass die Organisation der Kollagenmatrix nicht beeinflusst wird, sich jedoch die Kristallstruktur der Hydroxylapatitkristalle bei biologisch abbaubaren Implantaten verändert. Dies lässt sich auf die veränderte chemische Umgebung zurückführen, da in der Nähe der Implantate ein hoher Gehalt an Magnesium und Gadolinium vorliegt.

Die Untersuchung der Knochenultrastruktur ist ein wichtiges Unterfangen, da es erlaubt, den Knochen in Hinblick auf seine mechanischen Eigenschaften besser zu verstehen und ebenso wertvolle Einblicke in die hierarchische Struktur des Knochens liefert. Aktuelle Methoden zur Untersuchung der Knochenultrastruktur sind destruktiv und lediglich auf eine zweidimensionale Ebene beschränkt. Hier bieten Ansätze wie die diskutierte Diffraktions-Tomographie oder Dunkelfeldtomographie eine Möglichkeit, dreidimensionale Informationen zu erhalten. Eine für biologisch abbaubare Implantate optimierte Dunkelfeldtomographie würde es erlauben, die Orientierung der Ultrastruktur im Volumen zu messen, da diese sich neben der reinen Absorption ebenso das gestreute Signal zunutze macht. Neben reinen strukturellen Informationen müssen dennoch Materialeigenschaften wie zum Beispiel die Härte der Knochenstruktur gemessen und mit anderen Parametern wie Zusammensetzung oder Mineralisierung kombiniert werden. Hierzu wurde ein wissenschaftliches Projekt bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft beantragt, das diese Fragestellung adressiert. Hierzu sollen in dem Projekt verschiedene Techniken wie Nanoindentation mit einer multimodalen Materialcharakterisierung kombiniert und korrelative Analysen durchgeführt werden. Damit wird es möglich sein, skalenübergreifende Zusammenhänge besser verstehen zu können und damit auch die mechanistischen Wechselwirkungen.

5 Zitierte Literaturquellen

Literatur

- (1) Zimmermann, E. A.; Schaible, E.; Bale, H.; Barth, H. D.; Tang, S. Y.; Reichert, P.; Busse, B.; Alliston, T.; Ager, J. W.; Ritchie, R. O. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **2011**, *108*, 14416–14421.
- (2) Milovanovic, P.; Zimmermann, E. A.; Hahn, M.; Djonic, D.; Pueschel, K.; Djuric, M.; Amling, M.; Busse, B. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7542–7551.
- (3) Hills, B. A. *Internal Medicine Journal* **2002**, *32*, 242–251.
- (4) Klein, J. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology* **2006**, *220*, 691–710.
- (5) Ortiz, C.; Boyce, M. C. *Science* **2008**, *319*, 1053–1054.
- (6) Fratzl, P.; Barth, F. G. *Nature* **2009**, *462*, 442–448.
- (7) Forsey, R. W.; Fisher, J.; Thompson, J.; Stone, M. H.; Bell, C.; Ingham, E. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4581–4590.
- (8) Briscoe, W. H. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2017**, *27*, 1–8.
- (9) Jahn, S.; Klein, J. *Macromolecules* **2015**, *48*, 5059–5075.
- (10) Sorkin, R.; Kampf, N.; Dror, Y.; Shimoni, E.; Klein, J. *Biomaterials* **2013**, *34*, 5465–5475.
- (11) Clark, J. M.; Norman, A. G. and Kaab, M. J.; Notzli, H. P. *Journal of Anatomy* **1999**, *195*, 45–56.
- (12) Gale, L. R.; Chen, Y.; Hills, B. A.; Crawford, R. *Acta Orthopædica* **2007**, *78*, 309–314.
- (13) Gale, L. R.; Collier, R.; Hargreaves, D. J.; Hills, B. A.; Crawford, R. *Tribology International* **2007**, *40*, 601–606.
- (14) Schmitt, H.; Booy, R.; Aston, R.; Van Damme, P.; Schumacher, R. F.; Campins, M.; Rodrigo, C.; Heikkinen, T.; Weil-Olivier, C.; Finn, A.; Olcen, P.; Fedson, D.; Peltola, H. *BMC Medicine* **2007**, *5*.
- (15) Ozturk, H.; Stoffel, K.; Jones, C.; Stachowiak, G. *Tribology Letters* **2004**, *16*, 283–289.
- (16) Chang, D. P.; Abu-Lail, N. I.; Guilak, F.; Jay, G. D.; Zauscher, S. *Langmuir* **2008**, *24*, 1183–1193.
- (17) Chang, D. P.; Abu-Lail, N. I.; Coles, J. M.; Guilak, F.; Jay, G. D.; Zauscher, S. *Soft Matter* **2009**, *5*, 3438–3445.
- (18) Zappone, B.; Ruths, M.; Greene, G. W.; Jay, G. D.; Israelachvili, J. N. *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 1693–1708.
- (19) Coles, J. M.; Chang, D. P.; Zauscher, S. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2010**, *15*, 406–416.
- (20) Dedinaite, A. *Soft Matter* **2012**, *8*, 273–284.
- (21) Wang, M.; Liu, C.; Thormann, E.; Dédinaite, A. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4198–4206.
- (22) Seror, J.; Zhu, L.; Goldberg, R.; Day, A. J.; Klein, J. *Nature Communications* **2015**, *6*.
- (23) Trunfio-Sfarghiu, A.; Berthier, Y.; Meurisse, M.; Rieu, J. *Langmuir* **2008**, *24*, 8765–8771.
- (24) Nitzan, D. W.; Nitzan, U.; Dan, P.; Yedgar, S. *Rheumatology* **2001**, *40*, 336–340.

- (25) Scott, J. E.; Cumings, C.; Brass, A.; Chen, Y. *Biochemical Journal* **1991**, 274, 699–705.
- (26) Oates, K. M. N.; Krause, W. E.; Jones, R. L.; Colby, R. H. *Journal of the Royal Society Interface* **2006**, 3, 167–174.
- (27) Sawae, Y.; Murakami, T. *Journal of Biomechanics* **2006**, 39, S476.
- (28) Wimmer, M. A.; Sprecher, C.; Hauert, R.; Tager, G.; Fischer, A. *Wear* **2003**, 255, 1007–1014.
- (29) Hills, B. A.; Crawford, R. W. *Journal of Arthroplasty* **2003**, 18, 499–505.
- (30) Horkay, F.; Basser, P. J.; Hecht, A.-M.; Geissler, E. *Journal of Chemical Physics* **2008**, 128.
- (31) Schurz, J.; Ribitsch, V. *Biorheology* **1987**, 24, 385–399.
- (32) Fam, H.; Bryant, J. T.; Kontopoulou, M. *Biorheology* **2007**, 44, 59–74.
- (33) Hills, B. A. *Journal of Rheumatology* **1989**, 16, 82–91.
- (34) Schwarz, I. M.; Hills, B. A. *British Journal of Rheumatology* **1998**, 37, 21–26.
- (35) Sivan, S.; Schroeder, A.; Verberne, G.; Merkher, Y.; Diminsky, D.; Prie, A.; Maroudas, A.; Halperin, G.; Nitzan, D.; Etsion, I.; Barenholz, Y. *Langmuir* **2010**, 26, 1107–1116.
- (36) Raj, A.; Wang, M.; Zander, T.; Wieland, D. C. E.; Liu, X.; An, J.; Garamus, V. M.; Willumeit-Roemer, R.; Fielden, M.; Claesson, P. M.; Dedinaite, A. *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, 488, 225–233.
- (37) Liu, C.; Wang, M.; An, J.; Thormann, E.; Dedinaite, A. *Soft Matter* **2012**, 8, 10241–10244.
- (38) Boğan, A.; Joly, L.; Fillot, N.; Loison, C. *Langmuir* **2015**, 31, 12197–12202.
- (39) Murakami, T.; Higaki, H.; Sawae, Y.; Ohtsuki, N.; Moriyama, S.; Nakanishi, Y. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine* **1998**, 212, 23–35.
- (40) Zimmermann, E.; Schaible, E.; Gludovatz, B.; Schmidt, F.; Riedel, C.; Krause, M.; Vettorazzi, E.; Acevedo, C.; Hahn, M.; Püschel, K.; Tang, S.; Amling, M.; Ritchie, R.; Busse, B. *Scientific Reports* **2016**, 6, 21072.
- (41) Ziomber, A.; Juszczak, K.; Kaszuba-Zwoinska, J.; Machowska, A.; Zaraska, K.; Gil, K.; Thor, P. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2009**, 60, 71–78.
- (42) Mittelmeier, W.; Lehner, S.; Kraus, W.; Matter, H. P.; Gerdesmeyer, L.; Steinhäuser, E. *Archives of Orthopedic and Trauma Surgery* **2004**, 124, 86–91.
- (43) Su, Y.; Souffrant, R.; Kluess, D.; Ellenrieder, M.; Mittelmeier, W.; van Rienen, U.; Bader, R. *Bioelectromagnetics* **2014**, 35, 547–558.
- (44) Fukada, E.; Yasuda, I. *Journal of the Physical Society of Japan* **1957**, 12, 1158–1162.
- (45) Willumeit-Roemer, R. *JOM* **2019**, 71, 1447–1455.
- (46) Cheng, M.; Wahafu, T.; Jiang, G.; Liu, W.; Qiao, Y.; Peng, X.; Cheng, T.; Zhang, X.; He, G.; Liu, X. *Scientific Reports* **2016**, 6.
- (47) Zhang, Y.; Xu, J.; Ruan, Y. C.; Yu, M. K.; O’Laughlin, M.; Wise, H.; Chen, D.; Tian, L.; Shi, D.; Wang, J.; Chen, S.; Feng, J. Q.; Chow, D. H. K.; Xie, X.; Zheng, L.; Huang, L.; Huang, S.; Leung, K.; Lu, N.; Zhao, L.; Li, H.; Zhao, D.; Guo, X.; Chan, K.; Witte, F.; Chan, H. C.; Zheng, Y.; Qin, L. *Nature Medicine* **2016**, 22, 1160–1169.

- (48) Yang, L.; Ma, L.; Huang, Y.; Feyerabend, F.; Blawert, C.; Hoeche, D.; Willumeit-Roemer, R.; Zhang, E.; Kainer, K. U.; Hort, N. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2017**, *75*, 1351–1358.
- (49) Willumeit-Römer, R. *JOM* **2019**, *71*, 1447–1455.
- (50) Liu, Y.; Manjubala, I.; Roschger, P.; Epari, D. R.; Schell, H.; Lienau, J.; Bail, H. J.; Duda, G. N.; Fratzl, P. *Calcified Tissue international* **2008**, *82*, S69–S70.
- (51) Liu, Y.; Manjubala, I.; Schell, H.; Epari, D. R.; Roschger, P.; Duda, G. N.; Fratzl, P. *Journal of Bone and Mineral Research* **2010**, *25*, 2029–2038.
- (52) Rho, J. Y.; Kuhn-Spearing, L.; Zioupos, P. *Medical Engineering & Physics* **1998**, *20*, 92–102.
- (53) Claes, L.; Eckert-Hubner, K.; Augat, P. *Journal of Orhtopedic Research* **2002**, *20*, 1099–1105.
- (54) Sanchez, A. H. M.; Luthringer, B. J. C.; Feyerabend, F.; Willumeit, R. *Acta Biomaterialia* **2015**, *13*, 16–31.
- (55) Agha, N. A.; Liu, Z.; Feyerabend, F.; Willumeit-Roemer, R.; Gasharova, B.; Heidrich, S.; Mihailova, B. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2018**, *91*, 659–668.
- (56) Cecchinato, F.; Agha, N. A.; Martinez-Sanchez, A. H.; Luthringer, B. J. C.; Feyerabend, F.; Jimbo, R.; Willumeit-Roemer, R.; Wennerberg, A. *PLOS One* **2015**, *10*.
- (57) Hoerth, R. M.; Seidt, B. M.; Shah, M.; Schwarz, C.; Willie, B. M.; Duda, G. N.; Fratzl, P.; Wagermaier, W. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 4009–4019.
- (58) Liu, Y.; Manjubala, I.; Roschger, P.; Epari, D. R.; Schell, H.; Lienau, J.; Bail, H. J.; Duda, G. N.; Fratzl, P. *Bone* **2009**, *44*, S271–S272.
- (59) Wang, M.; Zander, T.; Liu, X.; Liu, C.; Raj, A.; Wieland, D. C. F.; Garamus, V. M.; Willumeit-Roemer, R.; Claesson, P. M.; Dedinaite, A. *Journal of Colloid and Interface Science* **2015**, *445*, 84–92.
- (60) Zander, T.; Wieland, D. C. F.; Raj, A.; Wang, M.; Nowak, B.; Krywka, C.; Dedinaite, A.; Claesson, P. M.; Garamus, V. M.; Schreyer, A.; Willumeit-Romer, R. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2016**, *142*, 230–238.
- (61) Nagle, J.; Tristram-Nagle, S. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* **2000**, *1469*, 159–195.
- (62) Winter, R.; Jeworrek, C. *Soft Matter* **2009**, *5*, 3157–3173.
- (63) Naumann, C.; Brumm, T.; Bayerl, T. M. *Biophysical Journal* **1992**, *63*, 1314–1319.
- (64) Speranza, F.; Pilkington, G. A.; Dane, T. G.; Cresswell, P. T.; Li, P.; Jacobs, R. M. J.; Arnold, T.; Bouche-noire, L.; Thomas, R. K.; Briscoe, W. H. *Soft Matter* **2013**, *9*, 7028–7041.
- (65) Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F. *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 4261–4274.
- (66) Goldberg, R.; Schroeder, A.; Silbert, G.; Turjeman, K.; Barenholz, Y.; Klein, J. *Advanced Materials* **2011**, *23*, 3517+.
- (67) Maroudas, A., *in Adult Articular Cartilage. Pitman Medical*; Freeman, M. A. R., Hrsg.; Kent, UK: 1979, S. 215–290.
- (68) Horkay, F.; Bassar, P. J.; Hecht, A.; Geissler, E. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2013**, *245*.
- (69) Balazs, E. A.; Watson, D.; Duff, I. F.; Roseman, S. *Arthritis & Rheumatism* **1967**, *10*, 357–376.

- (70) Band, P. A.; Heeter, J.; Wisniewski, H.-G.; Liublinska, V.; Pattanayak, C.; Karia, R.; Stabler, T.; Balazs, E.; Kraus, V. *Osteoarthritis and Cartilage* **2015**, *23*, 70–76.
- (71) L., S. *Acta Societatis Medicorum Upsaliensis* **1953**, *58*, 113–238.
- (72) Pasquali-Ronchetti, I.; Quaglino, D.; Mori, G.; Bacchelli, B.; Ghosh, P. *Journal of Structural Biology* **1997**, *120*, 1–10.
- (73) Wieland, D. C. F.; Degen, P.; Zander, T.; Gayer, S.; Raj, A.; An, J.; Dedinaite, A.; Claesson, P.; Willumeit-Roemer, R. *Soft Matter* **2016**, *12*, 729–740.
- (74) Als-Nielsen, J.; Jacquemain, D.; Kjaer, K.; Leveiller, F.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. *Physics Reports* **1994**, *246*, 251–313.
- (75) Kaganer, V. M.; Osipov, M. A.; Peterson, I. R. *Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 3512–3527.
- (76) Altenbach, C.; Seelig, J. *Biochemistry* **1984**, *23*, 3913–3920.
- (77) *Acta Biomaterialia* **2015**, *25*, 339–346.
- (78) Fleer, G.; Cohen Stuart, M. A.; Scheutjens, J.; Cosgrove, T.; Vincent, B., *Polymers at Interfaces*; Chapman und Hall, London: 1993.
- (79) Almond, A.; Brass, A.; Sheehan, J. K. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *284*, 1425–1437.
- (80) Zander, T.; Garamus, V. M.; Dédinaite, A.; Claesson, P. M.; Beldowski, P.; Górny, K.; Dendzik, Z.; Wieland, D. C. F.; Willumeit-Römer, R. *Molecules* **2020**, *25*.
- (81) Kreuzer, M.; Strobl, M.; Reinhardt, M.; Hemmer, M. C.; Hauss, T.; Dahint, R.; Steitz, R. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **2012**, *1818*, 2648–2659.
- (82) Winter, R.; Pilgrim, W. *Berichte der Bunsengesellschaft - Physical Chemistry Chemical Physics* **1989**, *93*, 708–717.
- (83) Braganza, L.; Worcester, D. *Biochemistry* **1986**, *25*, 2591–2596.
- (84) Zander, T.; Wieland, D. C. F.; Raj, A.; Salmen, P.; Dogan, S.; Dedinaite, A.; Garamus, V. M.; Schreyer, A.; Claesson, P. M.; Willumeit-Roemer, R. *Soft Matter* **2019**, *15*, 7295–7304.
- (85) Wieland, D. C. F.; Garamus, V. M.; Zander, T.; Krywka, C.; Wang, M.; Dedinaite, A.; Claesson, P. M.; Willumeit-Römer, R. *Journal of Synchrotron Radiation*, *23*, 480–486.
- (86) Seeton, C. J. *Tribology Letters* **2006**, *22*, 67–78.
- (87) Mezger, T., *The Rheology Handbook*; Vincentz Network, Hannover: 2011.
- (88) Helgeson, M. E.; Reichert, M. D.; Hu, Y. T.; Wagner, N. J. *Soft Matter* **2009**, *5*, 3858–3869.
- (89) Sow-Hsin, C.; Matteo, B.; Yun, L.; Emiliano, F.; Piero, B. *Journal of Applied Crystallography* **2007**, *40*, s321–s326.
- (90) Liu, Y.; Chen, W. R.; Chen, S. H. *Journal of Chemical Physics* **2005**, *122*.
- (91) Groenewold, J.; Kegel, W. K. *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 11702–11709.
- (92) Sciortino, F.; Mossa, S.; Zaccarelli, E.; Tartaglia, P. *Physical Review Letters* **2004**, *93*.
- (93) Sciortino, F.; Tartaglia, P.; Zaccarelli, E. *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 21942–21953.
- (94) Toledano, J. C. F.; Sciortino, F.; Zaccarelli, E. *Soft Matter* **2009**, *5*, 2390–2398.
- (95) Stradner, A.; Cardinaux, F.; Schurtenberger, P. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 21222–21231.

- (96) Stradner, A.; Sedgwick, H.; Cardinaux, F.; Poon, W. C. K.; Egelhaaf, S. U.; Schurtenberger, P. *Nature* **2004**, 432, 492–495.
- (97) Lonetti, B.; Fratini, A.; Casnati, A.; Baglioni, P. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, 248, 135–143.
- (98) Wu, J.; Liu, Y.; Chen, W.; Cao, J.; Chen, S. *Physical Review E* **2004**, 70, 050401.
- (99) Campbell, A. I.; Anderson, V. J.; van Duijneveldt, J. S.; Bartlett, P. *Physical Review Letters* **2005**, 94, 208301.
- (100) Cardinaux, F.; Zaccarelli, E.; Stradner, A.; Bucciarelli, S.; Farago, B.; Egelhaaf, S. U.; Sciortino, F.; Schurtenberger, P. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 115, 7227–7237.
- (101) Broccio, M.; Costa, D.; Liu, Y.; Chen, S. *The Journal of Chemical Physics* **2006**, 124, 084501.
- (102) Pignon, F.; Magnin, A.; Piau, J.; Cabane, B.; Lindner, P.; Diat, O. *Physical Review E*, 56, 3281–3289.
- (103) Jogun, S. M.; Zukoski, C. F. *Journal of Rheology* **1999**, 43, 847–871.
- (104) Panine, P.; Narayanan, T.; Vermant, J.; Mewis, J. *Physical Review E* **2002**, 66, 022401.
- (105) Hoekstra, H.; Mewis, J.; Narayanan, T.; Vermant, J. *Langmuir* **2005**, 21, 11017–11025.
- (106) Wirkert, F. J.; Paulus, M.; Nase, J.; Moeller, J. S.; Kujawski, S.; Sternemann, C.; Tolan, M. *Journal of Synchrotron Radiation* **2014**, 21, 76–81.
- (107) Krywka, C.; Sternemann, C.; Paulus, M.; Tolan, M.; Royer, C.; Winter, R. *ChemPhysChem* **2008**, 9, 2809–2815.
- (108) Kohlbrecher, J.; Bollhalder, A.; Vavrin, R.; Meier, G. *Review of Scientific Instruments* **2007**, 78.
- (109) Castelletto, V.; Newby, G. E.; Hamley, I. W.; Noirez, L.; Baroni, P. *Langmuir* **2008**, 24, 8319–8324.
- (110) Yang, Z.; Gu, Q.; Lam, E.; Tian, F.; Chaieb, S.; Hemar, Y. *Food Hydrocolloids* **2016**, 56, 58–61.
- (111) Versmold, H.; Musa, S.; Dux, C.; Lindner, P.; Urban, V. *Langmuir* **2001**, 17, 6812–6815.
- (112) Scott, J. E.; Heatley, F. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **1999**, 96, 4850–4855.
- (113) Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. *Veterinari Medicina* **2008**, 53, 397–411.
- (114) De Gennes, P.G.; Pincus, P.; Velasco, R.M.; Brochard, F. *Journal Physical France* **1976**, 37, 1461–1473.
- (115) Villetti, M.; Borsali, R.; Diat, O.; Soldi, V.; Fukada, K. *Macromolecules* **2000**, 33, 9418–9422.
- (116) Wieland, D. C. F.; Zander, T.; Garamus, V. M.; Krywka, C.; Dedinaite, A.; Claesson, P.; Willumeit-Römer, R. *Journal of Synchrotron Radiation* **2017**, 24, 646–652.
- (117) Floriano, W. B.; Nascimento, M. A. C. *Brazilian Journal of Physics* **2004**, 34, 38–41.
- (118) Mozhaev, V. V.; Heremans, K.; Frank, J.; Masson, P.; Balny, C. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **1996**, 24, 81–91.
- (119) Spiesz, E. M.; Roschger, P.; Zysset, P. K. *Calcified Tissue International* **2012**, 90, 319–329.
- (120) Weiner, S.; Wagner, H. D. *Annual Review of Materials Science* **1998**, 28, 271–298.
- (121) Bocciarelli, D. S. *Calcified Tissue Research* **1970**, 5, 261–9.
- (122) Robinson, R. *Journal of Bone Joint Surgery A* **1952**, 34-A, 389–435.
- (123) Weiner, S.; Traub, T. *FASEB J* **1992**, 6, 879–85.

- (124) Fratzl, P.; Schreiber, S.; Klaushofer, K. *Connect Tissue Research* **1996**, 34, 247–54.
- (125) Landis, W. J. *Connect Tissue Research* **1996**, 34, 239–46.
- (126) Brighton, C. T.; Black, J.; Friedenberg, Z. B.; Esterhai, J. L.; Day, L. J.; Connolly, J. F. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* **1981**, 63, 2–13.
- (127) Diniz, P.; Shomura, K.; Soejima, K.; Ito, G. *Bioelectromagnetics*, 23, 398–405.
- (128) Goodwin, C. B.; Brighton, C. T.; Guyer, R. D.; Johnson, J. R.; Light, K. I.; Yuan, H. A. *Spline* **1999**, 24, 1349–1357.
- (129) Ellenrieder, M.; Tischer, T.; Kreuz, P. C.; Froehlich, S.; Fritsche, A.; Mittelmeier, W. *Operative Orthopädie und Traumatologie* **2013**, 25, 85–94.
- (130) M., G.; A., B. *Eplasty* **2011**, 11, 1.
- (131) Shasmos, M. H.; Lavine, L. *Nature* **1967**, 213, 267–&.
- (132) Almer, J. D.; Stock, S. R. *Journal of Structural Biology* **2005**, 152, 14–27.
- (133) Handschin, R. G.; Stern, W. B. *Calcified Tissue International* **1992**, 51, 111–120.
- (134) Fratzl, P. *Journal of Applied Crystallography* **2003**, 36, 397–404.
- (135) Paris, O.; Zizak, I.; Lichtenegger, H.; Roschger, P.; Klaushofer, K.; Fratzl, P. *Cellular and Molecular Biology* **2000**, 46, 993–1004.
- (136) Hauk, V., Hrsg.; Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 1997, S. iii.
- (137) Witte, F.; Hort, N.; Vogt, C.; Cohen, S.; Kainer, K. U.; Willumeit, R.; Feyerabend, F. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2008**, 12, 63–72.
- (138) Willumeit-Römer, R.; Moosmann J. und Zeller-Plumhoff, B.; Wieland, D. C. F.; Krüger, D.; Wiese, B.; Wennerberg, A.; Peruzzi, N.; Galli, S.; Beckmann, F.; Hammel, J. U. in *TMS 2018 147th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings*, hrsg. von Materials Society The Minerals, M., Springer international Publishing: Cham, 2018, S. 275–284.
- (139) Hort, N.; Huang, Y.; Fechner, D.; Störmer, M.; Blawert, C.; Witte, F.; Vogt, C.; Drücker, H.; Willumeit, R.; Kainer, K. U.; Feyerabend, F. *Acta Biomaterialia* **2010**, 6, 1714–25.
- (140) Myrissa, A.; Agha, N. A.; Lu, Y.; Martinelli, E.; Eichler, J.; Szakács, G.; Kleinhans, C.; Willumeit-Römer, R.; Schäfer, U.; Weinberg, A. M. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, 61, 865–874.
- (141) Marco, I.; Myrissa, A.; Martinelli, E.; Feyerabend, F.; Willumeit-Römer, R.; Weinberg, A. M.; Van der Biest, O. *Eur Cell Mater* **2017**, 33, 90–104.
- (142) Galli, S. On magnesium-containing implants for bone applications, Faculty of Odontology, Malmö University, 2016.
- (143) Zeller-Plumhoff, B.; Malich, C.; Krueger, D.; Campbell, G.; Wiese, B.; Galli, S.; Wennerberg, A.; Willumeit-Römer, R.; Wieland, D. C. F. *Acta Biomaterialia* **2020**, 101, 637–645.
- (144) Hoerth, R. M.; Katunar, M. R.; Gomez Sanchez, A.; Orellano, J. C.; Ceré, S. M.; Wagermaier, W.; Ballarín, J. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2014**, 25, 411–22.
- (145) Bünger, M. H.; Foss, M.; Erlacher, K.; Li, H.; Zou, X.; Langdahl, B. L.; Bünger, C.; Birkedal, H.; Besenbacher, F.; Pedersen, J. S. *European Cells & Materials* **2006**, 12, 81–91.
- (146) Grünwald, T. A.; Ogier, A.; Akbarzadeh, J.; Meischel, M.; Peterlik, H.; Stan-zl-Tschegg, S.; Löffler, J. F.; Weinberg, A. M.; Lichtenegger, H. C. *Acta Biomaterialia* **2016**, 31, 448–457.

- (147) Posner, A. S.; Perloff, A.; Diorio, A. F. *Acta Crystallographic* **1958**, *11*, 308–309.
- (148) Wilson, R. M.; Elliott, J. C.; Dowker, S. E. P. *American Mineralogy* **1999**, *1406*.
- (149) Hughes J.M. and Cameron, M.; Crowley, K. D. *American Mineralogy* **1989**, *74*, 870–876.
- (150) Grünewald, T. A.; Rennhofer, H.; Hesse, B.; Burghammer, M.; Stanzl-Tschegg, S. E.; Cotte, M.; Löffler, J. F.; Weinberg, A. M.; Lichtenegger, H. C. *Biomaterials* **2016**, *76*, 250–60.
- (151) Li, Y.; Ooi, C. P.; Philip Hong Ning, C.; Aik Khor, K. *International Journal of Applied Ceramic Technology* **2009**, *6*, 501–512.
- (152) Xu, Y.; Li, J.; Zhong, Z.; Kainer, K.; Hort, N. in Springer International Publishing: 2017; Kap. Effects of gadolinium and neodymium addition on young's modulus of magnesium-based binary alloys.
- (153) Sandler, J.; Werner, P.; Shaffer, M. S. P.; Demchuk, V.; Altstädt, V.; Windle, A. H. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* **2002**, *33*, 1033–1039.
- (154) Rahmati, M.; Stötzel, S.; El Khassawna, T.; Iskhahova, K.; Wieland, D. C. F.; Zeller-Plumhoff, B.; Haugen, H. J. *Journal of Tissue Engineering* **2021**, *12*, 20417314211047100.
- (155) Iskhakova, K.; Wieland, D. C. F.; Zeller-Plumhoff, B.; Willumeit-Römer, R. in *Developments in X-Ray Tomography XIII*, hrsg. von Müller, B.; Wang, G., SPIE: 2021; Bd. 11840, S. 98–103.
- (156) Moosmann, J.; Zeller-Plumhoff, B.; Wieland, D. C. F.; Galli, S.; Krüger, D.; Dose, T.; Burmester, H.; Wilde, F.; Bech, M.; Peruzzi, N.; Wiese, B.; Hipp, A.; Beckmann, F.; Hammel, J.; Willumeit-Römer, R. in *Developments in X-Ray Tomography XI*, hrsg. von Müller, B.; Wang, G., SPIE: 2017; Bd. 10391, S. 91–99.
- (157) Moosmann, J.; Wieland, D. C. F.; Zeller-Plumhoff, B.; Galli, S.; Krüger, D.; Ershov, A.; Lautner, S.; Sartori, J.; Dean, M.; Köhring, S.; Burmester, H.; Dose, T.; Peruzzi, N.; Wennerberg, A.; Willumeit-Römer, R.; Wilde, F.; Heuser, P.; Hammel, J. U.; Beckmann, F. in *Developments in X-Ray Tomography XII*, hrsg. von Müller, B.; Wang, G., SPIE: 2019; Bd. 11113, S. 252–268.
- (158) Le Cann, S.; Tudisco, E.; Tägil, M.; Hall, S. A.; Isaksson, H. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2020**, *8*, 934.
- (159) Barth, H. D.; Launey, M. E.; MacDowell, A. A.; Ager, J. W.; Ritchie, R. O. *Bone* **2010**, *46*, 1475–1485.
- (160) Barth, H. D.; Zimmermann, E. A.; Schaible, E.; Tang, S. Y.; Alliston, T.; Ritchie, R. O. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8892–8904.
- (161) Horn, B. K.; Schunck, B. G. *Artificial Intelligence* **1981**, *17*, 185–203.
- (162) Brox, T.; Bruhn, A.; Papenberg, N.; Weickert, J. in *Computer Vision - ECCV 2004*, hrsg. von Pajdla, T.; Matas, J., Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2004, S. 25–36.

6 Curriculum Vitae

D.C. Florian Wieland

Dr. rer. nat.

Schillighörner Stieg 2
21129 Hamburg Deutschland
+4917647796402
florian.wieland@hzg.de

Persönliche Informationen

Name	Wieland
Vornamen	Dietmar Christian Florian
Geburtsdatum	26.07.1982
Geburtsort	Dortmund
Nationalität	Deutsch
Orchid ID	0000-0002-8594-8292
h-Index	15



Beruflicher Werdegang

08.2016–dato	Helmholtz Zentrum Hereon , 21502 Geesthacht, Deutschland <i>Wissenschaftler (unbefristet)</i>
10.2015–7.2016	Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie , 22761 Hamburg, Deutschland <i>wissenschaftlicher Angestellter (PostDoc)</i>
8.2012–9.2015	Helmholtz Zentrum Hereon , 21502 Geesthacht, Deutschland <i>wissenschaftlicher Angestellter (PostDoc)</i>
2009–2012	TU Dortmund , 44221 Dortmund, Dortmund <i>wissenschaftlicher Angestellter (Promotion)</i>

Forschungsschwerpunkte

makromolekulare Selbstorganisation	Einfluss von Ionen, Scherung und Druck auf die Wechselwirkungen von Proteinen, Lipiden und Polymeren
Untersuchung an hierarchischen Knochenstrukturen	Veränderungen in der multihierarchischen Ordnung des Knochens durch biologisch abbaubare Implantate oder äußere Reize
Methodenentwicklung	Entwicklung von <i>in situ</i> Methoden und Optimierung von Röntgenmethoden unter Verwendung von Synchrotronstrahlung

Drittmittelanträge

DFG	Antragssteller: Prof. Björn Busse (UKE) und Dr. D.C.F. Wieland (Hereon) , Title: <i>Analysis of tissue-material characteristics at the bone-magnesium interface built by biodegradable implants</i> , Status: eingereicht, GEPRIS-Nummer: WI 4706/1-1
BMBF ErUM Pro	Antragssteller: Prof. J. Herzen (Technische Universität München), Dr. E. Schulz-Kornas (TU Leipzig), Prof. Dr. P. Thibault (Universität Triest, Italien), Dr. D.C.F. Wieland (Helmholtz Zentrum Hereon) , Dr. I. Greving (Helmholtz Zentrum Hereon), Dr. F. Beckmann (Helmholtz Zentrum Hereon), Dr. J. Hammel (Helmholtz Zentrum Hereon), Dr. J. Moosmann (Helmholtz Zentrum Hereon), Title: <i>Analysis of tissue-material characteristics at the bone-magnesium interface built by biodegradable implants</i> , Status: Eingereicht.
I2B (internes Förderinstrument des Helmholtz Zentrum Hereon)	Antragssteller: Dr. D.C. F. Wieland (Hereon) und Dr. Domonkos Tolnai (Hereon), Title: Data science based analysis of Mg degradation sensitivity to load induced microstructural changes in biodegradable Mg implants, Fördervolumen 580.000 (2PhD & 1Postdoc)

Promotionsarbeit

Title	<i>Formation of organic and inorganic thin films at the aqueous solution-gas interface</i>
Betreuer	Prof. Dr. M. Tolan (Technische Universität Dortmund), Prof. Dr. H. Rehage (Technische Universität Dortmund)

Diplomarbeit

Title	<i>Charakterisierung und Strukturbestimmung von Metall-Organischen Netzwerken auf Oberflächen</i> (Characterization and structure determination of metal-organic frameworks on surfaces)
Betreuer	Prof. Dr. M. Tolan (Technische Universität Dortmund), Prof. Dr. C. Wöll (Ruhr-Universität Bochum)

Ausbildung

2009–2012	TU Dortmund, <i>Promotionsstudent</i> , Dortmund, 44221, Deutschland
2003–2008	TU Dortmund, Physikstudium, Dortmund, 44221, Deutschland
1993–2002	Reinoldus und Schiller Gymnasium, Dortmund, 44149, Germany

Lehrerfahrung

2014 - dato	Universität Hamburg, Modul CHE 417 (Bachelorstudiengang) & CHE 452 (Masterstudiengang)
-------------	--

7 Vollständige Publikationsliste

1. A.S. Obdrup, D.C.F. Wieland, K. Huss-Hansen, M.M.L. Arras, M.M. Knaapila. Classifying condition of ultra-high-molecular-weight polyethylene ropes with wide-angle X-ray scattering. Polym. Test. **2022** in press.
2. M. Golub, H. Lokstein, D. Soloviov, A. Kuklin, D.C.F. Wieland, J. Pieper. Light-Harvesting Complex II Adopts Different Quaternary Structures in Solution as Observed Using Small-Angle Scattering. J. Phys. Chem. **2022**, 13, 1258.
3. T. Shulha, M. Serdechnova, M.H.Iuzviukb, I. Zobkalob P.Karlova, N.Scharnagl, D.C.F. Wieland, S.V. Lamaka, A.A. Yaremchenko, C. Blawert, M.L. Zheludkevich. In situ formation of LDH-based nanocontainers on the surface of AZ91 magnesium alloy and detailed investigation of their crystal structure. J. Magnes. **2022** in press.
4. M. Rahmati, S. Stötzl, T. El Khassawna, K. Iskhahova, D.C.F. Wieland, B. Zeller-Plumhoff, H.J. Haugen. Early Osteoimmunomodulatory Effects of Magnesium–Calcium–Zinc alloys. J. Tissue Eng. **2021**, 12, 1.
5. D. Krüger, B. Zeller-Plumhoff, B., Wiese, S. Yi, M. Zuber, D.C.F. Wieland, J. Moosmann, R. Willumeit-Römer. Assessing the microstructure and in vitro degradation behavior of Mg-xGd screw implants using μ CT. J. Magnes. Alloy. **2021**, 9, 2207.
6. M. Rahmati, S. Stötzl, T.E. Khassawna, C. Mao, A. Ali, J.C. Vaughan, K. Iskhahova, D.C.F. Wieland, A.G. Cantalapiedra, G. Perale, F. Betge, E.P. Dillon, S.P. Lyngstadaas, H.J. Haugen. Intrinsically disordered peptides enhance regenerative capacities of bone composite xenografts. Materials Today, **2021** in press
7. D. Krüger, S. Galli, B. Zeller-Plumhoff, D.C.F. Wieland, N. Peruzzi, B. Wiese, P. Heuser, J. Moosmann, A. Wennerberg, R. Willumeit-Römer. High-Resolution Ex Vivo Analysis of the Degradation and Osseointegration of Mg-xGd Implant Screws in 3D. Bioact. Mater. **2021**, 13, 37.
8. D.C.F. Wieland, S. Krueger, J. Moosmann, T. Distler, A. Weizel, A.R. Boccaccini, H. Seitz, A. Jonitz-Heincke, R. Bader. Propagation-based phase contrast computed tomography as a suitable tool for the characterization of spatial three-dimensional cell distribution in biomaterials. Adv. Eng. Mater. **2021**, 13, 2001188.
9. D.C.F. Wieland, M.A. Schroer, A.Yu. Gruzinov, C.E. Blanchet, C.M. Jeffries, D.I. Svergun. ASAXS measurements on ferritin and apoferritin at the bioSAXS beamline P12 (PETRA III, DESY). J. Appl. Crystallogr. **2021**, 54, 830.
10. A.C. Bouali, M.H. Iuzviuk, M. Serdechnova, K.A. Yasakau, D. Drozdenko, A. Lutz, K. Fekete, G. Dovzhenko, D.C.F. Wieland, H. Terryn, M.G.S. Ferreira, I.A. Zobkalo, M.L. Zheludkevich. Mechanism of LDH Direct Growth on Aluminum Alloy Surface: A Kinetic and Morphological Approach. J. Phys. Chem. A. **2021**, 21, 11687.
11. K. Iskhakov, D.C.F. Wieland, B. Zeller-Plumhoff, R. Willumeit-Römer. X-ray diffraction tomography as a tool to study the influence of biodegradable metal implant on the bone in 3D. Proceedings in SPIE, Developments in X-Ray Tomography **2021**, 118400, 98.

12. T. Wu, C. Blawert, M. Serdechnova, P. Karlova, G. Dovzhenko, D.C.F. Wieland, S. Stojadinovic, R. Vasilic, K. Mojsilovic, M.L. Zheludkevicha. Formation of plasma electrolytic oxidation coatings on pure niobium in different electrolytes. *Appl. Surf. Sci.* **2021**, 573, 151629.
13. T. Wu, C. Blawert, M. Serdechnova, P. Karlova, G. Dovzhenko, D.C.F. Wieland, M.L. Zheludkevich. Role of polymorph microstructure of Ti6Al4V alloy on PEO coating formation in phosphate electrolyte. *Surf. Coat. Technol.* **2021**, 428, 127890.
14. P. Beldowski, M. Przybylek, P. Raczynski, A. Dedinaite, K. Gorny, D.C.F. Wieland, Z. Dendzik, A. Sionkowska, P.M. Claesson. Albumin-Hyaluronan Interactions: Influence of Ionic Composition Probed by Molecular Dynamics. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 222, 12360.
15. S. Ignjatović, C. Blawert, M. Serdechnova, S. Karpukhenkov, M. Damjanović, P. Karlova, D.C.F. Wieland, M. Starykevich, S. Stojanović, Lj. Damjanović-Vasilić, M.L. Zheludkevich. Formation of multi-functional TiO₂ surfaces on AA2024 alloy using plasma electrolytic oxidation. **544**, *Appl. Surf. Sci.* 2021, 148875.
16. M. Golub, R. Hussein, M. Ibrahim, M. Hecht, D.C.F. Wieland, A. Martel, B. Machado, A. Zouni, J. Pieper. Solution Structure of the Detergent-Photosystem II Core Complex Investigated by Small-Angle Scattering Techniques. *J. Phys. Chem.* **2020**, 39, 8583.
17. T. Zander, V.M. Garamus, A. Dédinaite, P.M. Claesson, P. Beldowski, K. Górny, K. Krzysztof, Z. Dendzik, D.C.F. Wieland, R. Willumeit-Römer. Influence of the Molecular Weight and the Presence of Calcium Ions on the Molecular Interaction of Hyaluronan and DPPC. *Molecules* **2020**, 25, 3907.
18. B. Zeller-Plumhoff, C. Malich, D. Krüger, G. Campbell, B. Wiese, S. Galli, A. Wennerberg, R. Willumeit-Römer, D.C.F. Wieland. Analysis of the bone ultrastructure around biodegradable Mg-xGd implants using small angle X-ray scattering and X-ray diffraction. *Acta Biomater.* **2020**, 101, 637.
19. T. Paulraj, S. Wennmalm, D.C.F. Wieland, A. V. Riazanova, A. Dédinaite, T.G. Pomorski, M. Cárdenas, A.J. Svagan. Primary cell wall inspired micro containers as a step towards a synthetic plant cell. *Nat. Commun.* **2020**, 11, 958.
20. E. Petrova, M. Serdechnova, T. Shulha, S.V. Lamaka, D.C.F. Wieland, P. Karlova, C. Blawert, M. Starykevich, M. L. Zheludkevich. Use of synergistic mixture of chelating agents for in situ LDH growth on the surface of PEO-treated AZ91. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 8645.
21. A.C. Bouali, M.H. Iuzviuk, M. Serdechnova, K.A. Yasakau, D.C.F. Wieland, G. Dovzhenko, H. Maltnava, I.A. Zobjkalo, M.G.S. Ferreira, M.L. Zheludkevich. Zn-Al LDH growth on AA2024 and zinc and their intercalation with chloride: Comparison of crystal structure and kinetics. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, 501, 144027.
22. A.C. Bouali, E.A. Straumal, M. Serdechnova, D.C.F. Wieland, M. Starykevich, C. Blawert, J.U. Hammel, S.A. Lermontov, M.G.S. Ferreira, M.L. Zheludkevich. Layered double hydroxide based active corrosion protective sealing of plasma electrolytic oxidation/sol-gel composite coating on AA2024. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, 494, 829.
23. I. Dobryden, M. Cortes Ruiz, X. Zhang, A. Dédinaite, D.C.F. Wieland, F. Winnik, P.M. Claesson. Thermoresponsive Pentablock Copolymer on Silica: Temperature Effects on Adsorption, Surface Forces, and Friction. *Langmuir* **2019**, 35, 653.

24. J. Moosmann, D.C.F. Wieland, B. Zeller-Plumhoff, S. Galli, D. Krüger, A. Ershov, S. Lautner, J. Sartori, M. Dean, S. Köhring, H. Burmester, T. Dose, N. Peruzzi, A. Wennerberg, R. Willumeit-Römer, F. Wilde, P. Heuser, J.U. Hammel, F. Beckmann. A load frame for in situ tomography at PETRA III. *Developments in X-Ray Tomography XII* **2019**, 11113, 252.
25. A. Dédinaite, D.C.F. Wieland, P. Beldowski, P.M. Claesson. Biolubrication synergy: Hyaluronan Phospholipid interactions at interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, 274, 102050.
26. T. Zander, D.C.F. Wieland, A. Raj, P. Salmen, S. Dogan, A. Dédinaite, V.M. Garamus, A. Schreyer, P.M. Claesson, R. Willumeit-Römer. Influence of high hydrostatic pressure on solid supported DPPC bilayers with hyaluronan in the presence of Ca²⁺ ions. *Soft Matter* **2019**, 15, 7295.
27. K. Sankhala, D.C.F. Wieland, J. Koll, M. Radjabian, C. Abetz, V. Abetz. Self-assembly of block copolymers during hollow fiber spinning: an in situ small-angle X-ray scattering study. *Nanoscale* **2019**, 16, 7634.
28. T.N. Shulha, M. Serdechnova, S.V. Lamaka, D.C.F. Wieland, K.N. Lapko, M.L. Zheludkevich. Chelating agent-assisted in situ LDH growth on the surface of magnesium alloy. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 16409.
29. A. Schneemann, P. Vervoorts, I. Hante, S. Wannapaiboon, C. Sternemann, M. Paulus, D.C.F. Wieland, S. Henke, M. Tu, R.A. Fischer. Different Breathing Mechanisms in Flexible Pillared-Layered Metal-Organic Frameworks: Impact of the Metal Center. *Chem. Mater.* **2018**, 30, 1667.
30. X. Zhang, B. Niebuur, P. Chytil, T. Etrych, S.K. Filippov, A. Kikhney, D.C.F. Wieland, D.I. Svergun, C.M. Papadakis. Macromolecular pHPMA-Based Nanoparticles with Cholesterol for Solid Tumor Targeting: Behavior in HSA Protein Environment. *Biomacromolecules* **2018**, 19, 470.
31. R. Willumeit-Römer, J. Moosmann, B. Zeller-Plumhoff, D.C.F. Wieland, D. Krüger, B. Wiese, A. Wennerberg, N. Peruzzi, S. Galli, F. Beckmann, J.U. Hammel. Visualization of Implant Failure by Synchrotron Tomography. TMS 2018 147th Annual Meeting & Exhibition Supplemental Proceedings **2018**, 214.
32. J. Moosmann, B. Zeller-Plumhoff, D.C.F. Wieland, S. Galli, D. Krüger, T. Dose, H. Burmester, F. Wilde, M. Bech, N. Peruzzi, B. Wiese, A. Hipp, F. Beckmann, J. Hammel, R. Willumeit-Römer, Biodegradable-magnesium-based implants in bone studied by synchrotron radiation microtomograph. *Proc. SPIE* 10391, *Developments in X-Ray Tomography XI* **2017**, 1039100.
33. D.C.F. Wieland, T. Zander, C. Krywka, P. Claesson, A. Dedinaite, V. Haramus, R. Willumeit-Römer. Complex solutions under shear and pressure: a rheometer setup for X-ray scattering experiments. *J. Synchrotron Radiat.* **2017**, 24, 646.
34. M. Golub, S. Combet, D.C.F. Wieland, D. Soloviov, A. Kuklin, H. Lokstein, F. Schmitt, M. Hecht, H. Eckert. Low-resolution structure and excitation energy transfer in phycobiliproteins of *Acaryochloris marina* investigated by small angle scattering. *Biochim Biophys Acta.* **2017**, 1858, 318.
35. M. Golub, M. Hejazi, A. Köksch, H. Lokstein, D.C.F. Wieland, A. Zouni, J. Piper. Solution structure of monomeric and trimeric photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus* investigated by small angle X-ray scattering, *Photosynth. Res.* **2017**, 133, 163.

36. A. Raj, M. Wang, T. Zander, D.C.F. Wieland, X. Liu, J. An, V.M. Garamus, R. Willumeit-Römer, M. Fiel-den, P.M. Claesson, A. Dédinaite. Lubrication Synergy: Mixture of Hyaluronan and Dipalmitoylphos-phatidylcholine (DPPC) Vesicles. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 488, 225.
37. A. Nyrow, C. Sternemann, J. S. Tse, C. J. Sahle, K. Mende, D.C.F. Wieland, R.A. Gordon, T. Regier, M. Wilke, M. Tolan. Bulk sensitive determination of the Fe^{3+}/Fe^{Tot} -ratio in minerals by Fe $L_{2/3}$ -edge X-ray Raman scattering spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, 31, 815.
38. D.C.F. Wieland, P. Degen, T. Thomas, S. Gayer, A. Raj, J. An, A. Dedinaite, P. Claesson, R. Willumeit-Römer. Structure of DPPC-hyaluronan interfacial layers – effects of molecular weight and ion com-position. *Soft Matter* **2016**, 12, 729.
39. T. Zander, D.C.F. Wieland, A. Raj, M. Wang, B. Nowak, C. Krywka, A. Dédinaite, P. M. Claesson, V. M. Garamus, A. Schreyer, R. Willumeit-Römer. The Influence of Hyaluronan on the Structure of a DPPC – Bilayer under High Pressures. *Colloids Surf. B.* **2016**, 142, 230.
40. D.C.F. Wieland, V.M. Garamus, T. Zander, C. Krywka, M. Wang, A. Dedinaite, P. Claesson, R. Willumeit-Römer. Studying solutions at high shear rates: a dedicated microfluidics setup. *J. Synchrotron Radiat.* **2016**, 23, 480.
41. D.C.F. Wieland, P. Degen, T. Zander, S. Gayer, A. Raj, J. An, A. Dedinaite, P. Claesson, R. Willumeit-Römer. Structure of DPPC-hyaluronan interfacial layers - effects of molecular weight and ion com-position. *Soft Matter* **2016**, 12, 729.
42. P. Degen, D.C.F. Wieland, C. Strotges. Mixed Layers of nonionic dendritic amphiphiles and DPPC at the water surface. *Langmuir* **2016**, 31, 11851.
43. D.C.F. Wieland, C. Krywka, E. Mick, R. Willumeit-Römer, R. Bader, D. Kluess, Investigation of the in-verse piezoelectric effect of trabecular bone on a micrometer lengthscale using synchrotron radiati-on. *Acta Biomater* **2015**, 25, 339.
44. M. Wang, T. Zander, X. Liu, C. Liu, A. Raj, D.C.F. Wieland, V.M. Garamus, R. Willumeit-Römer, P. M. Claesson. The Effect of Temperature on Supported Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Bi-layers: Structure and Lubrication Performance. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, 44, 84.
45. D.C.F. Wieland, P. Degen, M. Paulus, M.A. Schroer, H. Rehage, M. Tolan. pH controlled condensation of polysiloxane networks at the water-air interface. *Colloids Surf. A* **2014**, 455, 44.
46. M. Bursy, M. Paulus, P. Degen, S. Wulle, D.C.F. Wieland, H. Rehage, M. Tolan. Silver nanoparticles at charged membranes. *J. Chem. Biol.* **2013**, 1, 138.
47. Ch.J. Sahle, C. Sternemann, H. Sternemann, J.S. Tse, R.A. Gordon, S. Desgreniers, S. Maekawa, S. Yamanaka, F. Lehmkuhler, D.C.F. Wieland, K. Mende, S. Huotari, and M. Tolan. The Ba 4d-4f giant dipole resonance in complex Ba/Si compounds. *J. Phys. B* **2014**, 47, 045102.
48. D.C.F. Wieland, P. Degen, M. Paulus, M.A. Schroer, S. Bieder, Ch.J. Sahle, J. Möller, S. Leick, Z. Chen, B. Struth, H. Rehage, M. Tolan. Formation of iron containing aggregates at the liquid-air interface. *Colloids Surf. B.* **2013**, 109, 74.
49. F.J. Wirkert, M. Paulus, C. Sternemann, J. Nase, M.A. Schroer, D.C.F. Wieland, S. Bieder, P. Degen, H. Rehage, M. Tolan. Study of time and pressure dependent phenomena at the hard x-ray beamline BL9 of DELTA. *JPCS* **2013**, 425, 202006.

50. P. Degen, D.C.F. Wieland, M. Paulus, M.A. Schroer, M. Tolan, H. Rehage. Iron oxide film growth under ultrathin polysiloxane networks. *Colloid Polym. Sci.* **281**, 653 (2013).
51. D.C.F. Wieland, M. Paulus, M.A. Schroer, M. Tolan, P. Degen, H. Rehage. Manipulating thin polymer films by change of pH. *J. Appl. Phys.* **2011**, 110, 102221.
52. P. Degen, D.C.F. Wieland, S. Leick, M. Paulus, H. Rehage, M. Tolan. Effect of magnetic nanoparticles on the surface rheology of surfactant films at the water surface. *Soft Matter* **2011**, 11, 7655.
53. S. Henke, D.C.F. Wieland, M. Meilikhov, M. Paulus, C. Sternemann, K. Yussenko, R.A. Fischer. Multiple phase-transitions upon selective CO₂ adsorption in an alkyl ether functionalized metal-organic framework - An in situ x-ray diffraction study. *Cryst. Eng. Com.*, **2011**, 13, 6399.
54. K. Yussenko, M. Meilikhov, D. Zacher, D.C.F. Wieland, C. Sternemann, X. Stammer, T. Ladnorg, C. Wöll, R.A. Fischer. Step-by-step growth of highly oriented and continuous seeding layers of [Cu₂(ndc)₂(dabco)_n] on bare oxide and nitride substrates. *Cryst. Eng. Com.*, **2011**, 12, 2086.
55. H.K. Arslan, O.I. Shekhah, D.C.F. Wieland, M. Paulus, C. Sternemann, M.A. Schroer, S. Tiemeyer, M. Tolan, R.A. Fischer, C. Wöll. Intercalation in Layered Metal-Organic Frameworks: Reversible Inclusion of an Extended π -System. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8158.
56. M.A. Schroer, Y. Zhai, D.C.F. Wieland, Ch.J. Sahle, J. Nase, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter. Exploring the Piezophilic Behavior of Natural Cosolvent Mixtures. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 11413.
57. M.A. Schroer, J. Markgraf, D.C.F. Wieland, Ch.J. Sahle, J. Möller, M. Paulus, M. Tolan, R. Winter. Non-linear Pressure Dependence of the Interaction Potential of Dense Protein Solutions. *Phys. Rev. Lett.* **2011**, 106, 178102.
58. M.A. Schroer, M. Paulus, C. Jeworrek, C. Krywka, S. Schmacke, Y. Zhai, D.C.F. Wieland, Ch.J. Sahle, M. Chimenti, C.A. Royer, B. Garcia-Moreno, M. Tolan, R. Winter. High-Pressure SAXS Study of Folded and Unfolded Ensembles of Proteins. *Biophys. J.* **2010**, 99, 3430.
59. J. Möller, M. Cebi, M.A. Schroer, M. Paulus, P. Degen, Ch.J. Sahle, D.C.F. Wieland, S. Leick, A. Nyrow, H. Rehage, M. Tolan. Dissolution of iron oxide nanoparticles inside polymer nanocapsules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 20354.
60. A. Steffen, C. Kronholz, M. Paulus, D.C.F. Wieland, S. Bieder, P. Degen, C.J. Sahle, M. Ferreira, R. Wagner, W. Tillmann and M. Tolan. Predicting properties of materials with x-rays: The application of synchrotron radiation in materials science. *1st International Conference on Product Property Prediction*, ISBN 978-3-9808718-6-0, **2011** 203.
61. W. Tillmann, L. Hagen, I. Baumann, M. Tolan, M. Paulus and D.C.F. Wieland. Correlation of the particle behavior, microstructure and phase evolution during the optimization of HVOF sprayed WC-12Co coatings by means of DoE. *DVS-Berichte 276*, ISBN 978-3-87155-268 **2011**

8 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Habilitationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich erkläre, dass die vorliegende Habilitationsschrift noch an keiner anderen Universität der Hochschule zur Begutachtung eingereicht wurde.

Hamburg, den 11.03.2022

Florian Wieland

9 Danksagung

An dieser Stelle kommt eines der wichtigsten Kapitel dieser Habilitationsschrift, da erfolgreiches wissenschaftliches Arbeiten stets von wertvoller Kooperation lebt. Meinen herzlichen Dank richte ich an Frau Professorin Regine Willumeit-Römer für ihr Vertrauen und ihre stetige Unterstützung, die mein selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten überhaupt erst ermöglicht haben. Ebenso schätze ich stets deine offenen Worte, die einen auch zum Nachdenken bringen können. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Betzel für die Unterstützung während der Habilitation bedanken.

Ich bedanke mich bei Professor Andra Dedinaite und Professor Per Claesson für die vertrauensvolle und gute Zusammenarbeit im Bereich der molekularen Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen. Auch bedanke ich mich bei Dr. Vasyl Haramus und Dr. Patrick Degen für die stetige Unterstützung. Ebenso möchte ich Dr. Piotr Beldowski für die Arbeiten im Rahmen des Studiums der Wechselwirkungen mittels MD-Simulationen danken. Ich möchte mich bei Dr. Thomas Zander für eine tolle Zusammenarbeit und für viele Nächte an den Synchrotrons dieser Welt bedanken, die nie langweilig waren. Es gibt auf jeden Fall immer die eine oder andere Geschichte zu erzählen.

Ich möchte meinen Dank an Dr. Jörg Hammel, Dr. Silva Galli, Dr. Christina Krywka und Dr. Anton Davydok aussprechen, die bei verschiedenen Projekten stets engagiert geholfen haben. Mein tiefer Dank gebührt ebenso Dr. Berit Zeller-Plumhoff und Dr. Julian Moosmann für ihre Unterstützung, die vielen Diskussionen und die schöne Zeit. Es ist schade, dass wir mittlerweile kein Büro mehr teilen.

Ebenso möchte ich mich bei Studenten bedanken, die im Rahmen ihrer Promotions- oder Masterarbeiten wesentlich zur Arbeit beigetragen haben. Ich bedanke mich bei Michaela Waßmann, Carina Malich, Diana Krüger und Kamila Iskhakova.

Die diversen Erkundungen von Samarkand wären ohne Dr. M. A. Schroer und Dr. Felix Lehmkuhler sehr hart und anstrengend geworden. Auch euch beiden möchte ich meinen tiefen Dank für eure Unterstützung aussprechen. Ich möchte mich auch bei allen nicht namentlich genannten Personen bedanken, mit denen ich während meiner Zeit an der Universität Dortmund, am Helmholtz Zentrum Geestacht//Hereon und EMBL zusammenarbeiten durfte und durch deren Unterstützung vieles erst möglich wurde.

Ganz besonders möchte ich mich aber bei meiner wundervollen Frau Elisabeth, meinen Kindern Karolina und Thies und meiner Familie für ihre Liebe, Unterstützung und ihr Verständnis bedanken. Neben der Wissenschaft gibt es doch wichtigere Dinge und diese sollte man nie aus den Augen verlieren. Auch danke ich meinen Eltern für ihre Liebe und ihren stetigen Zuspruch und die viele Unterstützung.