

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,
plastische und ästhetische Operationen
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Rudolf Hagen

**Untersuchung des Wachstumsverhaltens neuronaler Zellen
auf strukturierten Halbleiteroberflächen als Werkstoff
zukünftiger Elektrodenträger auditorischer Implantate**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Fabian Kohm
aus Rheinstetten

Würzburg, Januar 2014

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Robert Mlynski

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2014

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Physiologie des Hörvorganges	7
1.2 Indikationsgebiete auditorischer Implantate	8
1.3 Funktionsprinzip auditorischer Implantate	9
1.4 Der Einsatz von Sprachkodierungsstrategien	10
1.5 Klinische Leistungsfähigkeit und Grenzen von Cochleaimplantaten und Hirnstammimplantaten	11
1.6 Limitationen der Informationsübertragung	12
1.7 Aktuelle Strategien zur Verbesserung der neuronalen Schnittstelle	15
1.8 Ziel der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Oberflächenstrukturierung der Halbleiter	20
2.2 Sterilisation und Beschichtung der strukturierten Siliziumwafer	21
2.3 Präparation und Zellkultur der kortikalen neuronalen Vorläuferzellen der Maus	22
2.4 Entnahme und Differenzierung der kortikalen neuronalen Vorläuferzellen ..	22
2.5 Fixierung und Immunfluoreszenz	23
2.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.....	24
2.6.1 Vorbemerkung zur Rasterelektronenmikroskopie	24
2.6.2 Aufbereitung der Präparate für das Rasterelektronenmikroskop	26
2.7 Echtzeituntersuchungen an lebenden Zellen	26
2.8 Erhebung und Analyse der Daten	27
2.9 Bestimmung der Neuritenorientierung	27
2.10 Validierung der gemessenen Orientierungswinkel	28
2.11 Bestimmung des Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne	30
3 Ergebnisse	32
3.1 Gefurchte Siliziumoberflächen	32
3.1.1 Einfluss der Oberflächenstruktur auf die Orientierung der Neurite	32

3.1.2	Validierung der gemessenen Orientierungswinkel.....	34
3.1.3	Einfluss der Furchentiefe auf die Neuritenlänge	35
3.1.4	Einfluss der Furchentiefe auf die Form des Zellkerns.....	37
3.1.5	Neuronale Brückenbildung auf doppelt gefurchten Oberflächen	41
3.2	Siliziumoberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten	45
3.2.1	Einfluss der Oberflächenstrukturierung auf die Orientierung der Neuriten	45
3.2.2	Einfluss der Zylinderhöhe auf die Neuritenlänge	46
3.2.3	Neuronale Interaktion mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten	48
4	Diskussion	56
4.1	Einfluss gefurchter Oberflächen auf das neuronale Wachstum und deren Einsatz in zukünftigen Halbleiterimplantaten.....	56
4.2	Neuronale Interaktion mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten und deren Einsatz in zukünftigen Implantaten	59
4.3	Neuronale Brückenbildung und deren Einsatz in zukünftigen Implantaten ..	61
4.4	Kritische Betrachtung der Ergebnisse und Ausblick.....	63
5	Zusammenfassung.....	66
6	Literaturverzeichnis	68

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ANOVA	analysis of variance
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
dB	Dezibel
EGF	epidermal growth factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
FGF2	fibroblast growth factor 2
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
Kap.	Kapitel
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
Ncl.	Nucleus
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphate buffered saline
pH	pH-Wert
rpm	rounds per minute
SiO ₂	Siliziumdioxid
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Begrenzung der Anzahl an Spektralkanälen durch die elektrische Feldinterferenz	12
Abbildung 2: Erhöhung der Anzahl an Spektralkanälen durch die Senkung der elektrischen Feldinterferenz	13
Abbildung 3: Der Idealfall der Elektroden-Nerven-Schnittstelle	16
Abbildung 4: Oberflächenstrukturen der Siliziumhalbleiter	21
Abbildung 5: Doppelt gefurchte Siliziumoberflächen	25
Abbildung 6: Messverfahren zur Erfassung der Orientierungswinkel der Neurite... ..	28
Abbildung 7: Diskrepanz zwischen Orientierungswinkel (α) und tatsächlichem Verlauf des Neuriten.....	29
Abbildung 8: Messung des Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne	31
Abbildung 9: Orientierungswinkel der Neurite auf einfach gefurchten Oberflächen	33
Abbildung 10: Quotienten (q) der Neurite auf einfach gefurchten Oberflächen	35
Abbildung 11: Neuritenlängen auf einfach gefurchten Oberflächen	36
Abbildung 12: Einfluss der Furchentiefe auf die Form der Zellkerne.....	38
Abbildung 13: Längen-Breiten-Verhältnis der Zellkerne auf einfach gefurchten Oberflächen.....	39
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der neuronalen Brückenbildung auf doppelt gefurchten Oberflächen.....	41
Abbildung 15: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der neuronalen Brückenbildung auf doppelt gefurchten Siliziumoberflächen	42
Abbildung 16: Phasen der neuronalen Brückenbildung zwischen benachbarten Quaderplateaus.....	43
Abbildung 17: Dynamik der Brückenbildung zwischen benachbarten Quadern	44
Abbildung 18: Orientierungswinkel der Neurite auf Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten.....	46
Abbildung 19: Neuritenlängen auf Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten.....	47
Abbildung 20: Neuronale Interaktion mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten.....	49
Abbildung 21: Dynamik der neuronalen Interaktion mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten.....	50
Abbildung 22: Vertikales Wachstum des Wachstumskegels an der Mantelfläche der Zylinder	51
Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der neuronale Brückenbildung auf Siliziumoberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten.....	52

Abbildung 24: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der neuronalen Brückenbildung auf Siliziumoberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten.....	53
Abbildung 25: Kontakt eines Wachstumskegels mit der Oberseite eines Zylinders .	54
Abbildung 26: Phasen der neuronalen Brückenbildung zwischen benachbarten Zylindern.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medianwerte der Orientierungswinkel auf einfach gefurchten Oberflächen	32
Tabelle 2: Medianwerte der Quotienten (q) auf einfach gefurchten Oberflächen	34
Tabelle 3: Medianwerte der Neuritenlängen auf einfach gefurchten Oberflächen	36
Tabelle 4: Medianwerte des Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne auf einfach gefurchten Oberflächen.....	39
Tabelle 5: Medianwerte der Orientierungswinkel auf Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten	45
Tabelle 6: Medianwerte der Neuritenlängen auf Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten	47

1 Einleitung

1.1 Physiologie des Hörvorganges

Das äußere Ohr nimmt den Schall auf und leitet ihn über das Mittelohr an das Innenohr weiter. Dabei fungieren die Gehörknöchelchen im Mittelohr als Impedanzwandler, da sie die Schallwellen aus einem Medium mit niedrigem Wellenwiderstand (Luft) auf ein Medium mit hohem Wellenwiderstand (Wasser) übertragen. Der Schalldruck wird hierbei etwa um das 22-Fache verstärkt. Durch die Volumenverschiebung der Perilymphe in der Scala tympani entsteht dabei eine Wanderwelle, die sich entlang der Basilarmembran ausbreitet. Dabei nehmen die Fortpflanzungsgeschwindigkeit und die Wellenlänge zum Helikotrema hin ab, während die Amplitude der Wanderwelle zunimmt. Dies beruht auf den unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der Basilarmembran, deren Steifigkeit und Breite in Bereich der Schneckenbasis am größten sind und bis zur Schneckenspitze hin immer geringer werden. Abhängig von der anregenden Frequenz entsteht ein Amplitudenmaximum der sich ausbreitenden Wanderwelle, welches sich an einem bestimmten Ort der Basilarmembran abbildet. Durch die Kontraktion der efferent innervierten äußeren Haarzellen wird das Amplitudenmaximum dabei wesentlich verstärkt (Ashmore et al., 2010). Das an der basolateralen Membran der äußeren Haarzellen nachweisbare Protein Prestin (Zheng et al., 2002) fungiert hierbei als eigentliches Motorprotein (Dallos et al., 2006; Zheng et al., 2000). Wird Prestin nicht exprimiert führt dies zu einem Verlust der Elektromotilität der äußeren Haarzellen mit der Folge, dass die Hörschwelle bei erheblich höheren Schalldruckpegeln liegt (Liberman et al., 2002).

Die eigentlichen Sinneszellen des Innenohres sind die inneren Haarzellen des cortischen Organs. Deren Stereozilien werden in Abhängigkeit des Amplitudenmaximums auf der Basilarmembran abgeschert und lösen dadurch ein Rezeptorpotenzial in den Haarzellen aus. Dieses wird in ein Aktionspotenzial transformiert und über die Spiralganzlienzellen des Hörnervs an den Ncl. cochlearis und das zentrale auditorische System weitergeleitet (Schmidt et al., 2005). Dabei findet sich die strenge tonotope Organisation der Haarzellen des cortischen Organs auch in allen Kerngebieten der Hörbahn bis zur primären auditorischen Rinde wieder.

Für die Abbildung komplexer Höreindrücke, wie z. B. Sprache oder Musik, ist eine ausreichende Anzahl an Sinneszellen und Nervenfasern erforderlich. Nur hierdurch

ist sichergestellt, dass genügend Informationskanäle zur Verfügung stehen um ein Signal hinsichtlich Frequenz und Intensität hinreichend genau zu kodieren. Bei schwerhörigen oder tauben Patienten sind nur noch wenige bzw. keine Informationskanäle vorhanden. In solchen Fällen können auditorische Implantate zum Einsatz kommen, die den Informationsfluss künstlich wieder herstellen.

1.2 Indikationsgebiete auditorischer Implantate

Auditorische Implantate sind bis heute die erfolgreichsten neurobionischen Implantate, die in der Medizin eingesetzt werden. Dabei hat die Leistungsfähigkeit der Implantate stetig zugenommen. Vor allem die Miniaturisierung der elektronischen Bauteile und die zunehmend selektivere Stimulierbarkeit der auditorischen Neurone führten zu dieser erfreulichen Entwicklung (Lenarz et al., 2011). Während die ersten Cochleaimplantate vor 30 Jahren nur imstande waren Hörsensationen auszulösen und ein nützliches Hilfsmittel beim Lippenlesen darstellten, sind Patienten mit heutigen Mehrkanalimplantaten sogar in der Lage zu telefonieren (Adams et al., 2004; Anderson et al., 2006). Das Einsatzgebiet reicht dabei von der Versorgung taub geborener Kleinkinder bis hin zur Versorgung von erst im hohen Erwachsenenalter Ertaubter. Bis heute wurden weltweit mehr als 140 000 Cochleaimplantate implantiert (Lenarz et al., 2009). Etwa die Hälfte davon bei taub geborenen Kindern, die durch die Implantation einen nahezu normalen Spracherwerb und eine regelrechte Sprachentwicklung erfahren haben (Marangos and Laszig, 1998; Zeng et al., 2008).

Das Indikationsgebiet für auditorische Implantate umfasst sowohl die sensorische Schwerhörigkeit als auch die neurale Schwerhörigkeit. Je nach Form der Schwerhörigkeit kommen verschiedene Implantate zum Einsatz. Bei hochgradiger cochleärer Schwerhörigkeit oder Taubheit hat sich das Cochleaimplantat als Mittel der Wahl etabliert. Hierbei sind die Haarzellen des cortischen Organs betroffen. Dabei können sowohl Defekte der inneren wie auch der äußeren Haarzellen für die Taubheit verantwortlich sein (Chen et al., 2008). Die Ursachen für diese Defekte sind vielfältig. So reagieren Haarzellen sehr empfindlich auf unterschiedlichste Umgebungseinflüsse wie etwa Durchblutungsstörungen, Infektionen, Knalltraumen oder Noxen (Aran et al., 1999; Gross et al., 2000; Noorbakhsh et al., 2008; Zahnert, 2011). Daneben spielen aber auch genetische Defekte und vor allem die altersbedingte Degeneration von Haarzellen eine Rolle (Gross et al., 2001; Petit et al., 2001; Zahnert, 2011).

Ein wesentlich seltenerer Grund für eine Schwerhörigkeit ist eine Schädigung von Strukturen der Hörbahn, die den Haarzellen nachgeschaltet sind. Diese Schädigungen betreffen vor allem den Hörnerv und werden dann als neurale Schwerhörigkeit bezeichnet. Bei der Versorgung dieser Form der Schwerhörigkeit können Hirnstammimplantate zum Einsatz kommen. Klinisch relevant sind vor allem Schädigungen des Hörnervs durch Infektionen des Felsenbeins, Schädelbasisfrakturen oder die Kompression des Hörnervs durch intrakranielle Tumore, wobei das Vestibularischwannom im Rahmen der Neurofibromatose Typ 2 (NF2) die häufigste Ursache ist (Schwartz et al., 2008; Zahnert, 2011).

1.3 Funktionsprinzip auditorischer Implantate

Den verschiedenen Ursachen der sensorineuralen Schwerhörigkeit ist gemeinsam, dass der Informationsfluss zwischen dem peripheren Hörapparat und dem zentralen auditorischen System gestört bzw. unterbrochen ist. Das Funktionsprinzip auditorischer Implantate besteht darin, die Unterbrechung des Informationsflusses zu überbrücken (Wilson and Dorman, 2008b). Prinzipiell müssen dafür zwei Voraussetzungen erfüllt sein, damit die Überbrückung gelingen kann. Zum einen müssen zwangsläufig Strukturen der Hörbahn erregt werden, die zentraler als der Defekt auf der Hörbahn liegen, also dem Defekt nachgeschaltet sind. Zum anderen müssen diese Strukturen chirurgisch auch zugänglich sein. Bei Defekten der Haarzellen hat sich die direkte Stimulation der Spiralganglienneurone durch Cochleaimplantate bewährt. Bei Defekten des Hörnervs besteht die Möglichkeit entweder den Ncl. cochlearis im Hirnstamm oder den Colliculus inferior im Mittelhirn durch Hirnstammimplantate (auditory brainstem implant, ABI) bzw. Mittelhirnimplantate (auditory midbrain implant, MDI) zu erregen.

Das Funktionsprinzip auditorischer Implantate ist dabei, unabhängig vom Schädigungsort und von den verwendeten Implantattypen, immer gleich. Durch ein extrakorporales Mikrofon werden akustische Signale aufgenommen und mit einem Sprachprozessor in elektrische Signale umgewandelt. Transkutan werden diese Impulse an die implantierten elektrischen Bauteile übermittelt um über Stimulations Elektroden die Neurone des auditorischen Systems direkt zu erregen. Auf diese Weise werden akustische Informationen in elektrische Impulse umgewandelt, die in den

Neuronen der Hörbahn Aktionspotenziale auslösen (Wilson and Dorman, 2008a; Wilson and Dorman, 2008b).

1.4 Der Einsatz von Sprachkodierungsstrategien

Wie bereits erwähnt, hat die Leistungsfähigkeit von auditorischen Implantaten in den letzten 30 Jahren stetig zugenommen. Im Gegensatz zu den ersten verwendeten Implantaten, die lediglich Hörsensationen auslösen konnten, sind Patienten, die mit modernen Implantaten versorgt wurden, sogar imstande zu telefonieren (Adams et al., 2004; Anderson et al., 2006). Neben der Erhöhung der Anzahl an verwendeten Stimulationselektroden geht dies vor allem auch auf verschiedene Signalverarbeitungsstrategien zurück, die im Lauf der Jahre zunehmend verbessert wurden. Hierbei werden die für die Spracherkennung relevanten Informationen aus dem Eingangssignal herausgefiltert und nur diese in elektrische Signale umgewandelt. Die ursprünglich verwendete analog-simultane Kodierung der Signale wurde in den heute gebräuchlichen mehrkanaligen Implantaten weitestgehend durch pulsatil-sequentielle Kodierungsstrategien ersetzt. Hierbei werden je nach verwendetem Analysealgorithmus Grundfrequenz und Formanten (z. B. Multi Peak (MPEAK)), die Intensität der höchsten spektralen Komponenten (z. B. Spektral Peak (SPEAK) oder Advanced Combination Encoders (ACE)) oder die Intensität aller spektralen Komponenten (z. B. Continuous Interleaved Sampling (CIS)) ermittelt und in elektrische Signale umgewandelt (Somek, 2006; Wilson and Dorman, 2008a; Wilson et al., 1991).

Die heute am weitesten verbreitete Sprachkodierungsstrategie ist die von Wilson entwickelte Continuous-Interleaved-Sampling-Strategie (CIS), die in nahezu allen modernen Sprachprozessoren angeboten wird (Wilson et al., 2003). Das Eingangssignal wird hierbei in verschiedene Frequenzbänder zerlegt, deren Anzahl der Summe der Stimulationselektroden entspricht. Durch Hüllkurvenextraktion kann die Schallenergie jedes einzelnen Frequenzbandes bestimmt und die Stromamplitude dementsprechend für jede Elektrode angepasst werden. Die Stimulationszyklen verlaufen dabei immer von basal nach apikal, wobei zu jedem Zeitpunkt jeweils nur eine Elektrode aktiv ist. Hierdurch wird eine ungewollte Kanalinteraktion zwischen den Stimulationselektroden vermieden.

1.5 Klinische Leistungsfähigkeit und Grenzen von Cochleaimplantaten und Hirnstammimplantaten

Vor allem durch den Einsatz von Mehrkanalimplantaten und von neuen Sprachkodierungsstrategien konnte das Sprachverständnis von Implantatträgern wesentlich verbessert werden. Ohne die Informationsdiskriminierung der heutigen Sprachprozessoren wäre dieser Fortschritt kaum möglich gewesen. Dennoch kann bis heute die tonotopische Organisation der Hörbahn nur unzureichend genau adressiert werden. Obgleich die Anzahl an Stimulationselektroden in den letzten Jahren zugenommen hat und die Sprachkodierungsstrategien stetig verbessert wurden, konnte die Hörqualität von Implantatträgern in der jüngsten Vergangenheit kaum mehr gesteigert werden. Ab einer gewissen Anzahl an Stimulationselektroden stagniert das Sprachverständnis und kann durch den Einsatz von zusätzlichen Stimulationselektroden nicht mehr verbessert werden.

Fishman und Friesen konnten zeigen, dass bei Cochleaimplantaten die Fähigkeit Konsonanten zu erkennen zwar stetig mit zunehmender Elektrodenzahl zunimmt, jedoch bei einer gewissen Anzahl an Elektroden ein Optimum erreicht war. Ein zusätzliches Einbringen von bis zu 22 Elektroden erbrachte keine Verbesserung für die Konsonantenerkennung (Fishman et al., 1997; Friesen et al., 2001). Ähnliche Befunde zeigten sich auch bei Hirnstammimplantaten. Ein Minimum von 3 Elektroden scheint erforderlich zu sein, um ein zufriedenstellendes Sprachverständnis zu erzielen. Der Einsatz von 5 oder mehr Elektroden brachte allerdings auch hier keine Verbesserung der Ergebnisse (Kuchta et al., 2004).

Diese Arbeiten verdeutlichen, dass die meisten Patienten gegenwärtig trotz des Einsatzes von modernen Sprachkodierungsstrategien also nicht von zusätzlich eingebrachten Elektroden auf dem Elektrodenträger profitieren würden. Um dennoch das Sprachverständnis und die Hörqualität von Hörgesunden auch bei Implantatträgern zu erreichen, müssen zunächst die grundlegenden Probleme der Informationsübertragung gelöst werden. Erst wenn diese gelöst sind und die bisherige Anzahl an Elektroden für die Informationsübertragung nicht mehr ausreicht, wäre es sinnvoll die Anzahl an Elektroden zu steigern.

1.6 Limitationen der Informationsübertragung

Eines der zentralen Probleme der Informationsübertragung akustischer Signale entlang der Hörbahn beruht auf der Tatsache, dass die Übertragungskapazität, mit der Informationen übertragen werden können, durch die Anzahl an erzeugbaren Spektralkanälen limitiert wird. Unter einem Spektralkanal versteht man hierbei einen Übertragungsweg, der unabhängig Informationen übermittelt, also Informationen einer einzigen Elektrode (Tang et al., 2011; Zeng, 2004). Mit der schrittweisen Erhöhung der Elektrodenzahl auf dem Elektrodenträger steigt bis zu einem Grenzwert die Anzahl der nutzbaren Spektralkanäle ebenfalls an und entspricht der Anzahl an vorhandenen Elektroden. Ab derjenigen Elektrodenzahl, ab der es zur Überlappung der elektrischen Felder benachbarter Elektroden kommt, wird die selektive Erregbarkeit der auditorischen Neurone allerdings zunehmend eingeschränkt (Bierer, 2010; Stickney et al., 2006; Zeng, 2004). Die Neurone, die von mehr als einer Elektrode erregt werden und somit nicht eindeutig einer einzigen Elektrode zugeordnet werden können, stehen für eine diskriminierte Informationsübertragung nicht mehr zur Verfügung. Die Kanalbreite der einzelnen Spektralkanäle wird hierdurch zunehmend schmaler, bis schließlich eine selektive Informationsübertragung nicht mehr möglich ist (Abbildung 1).

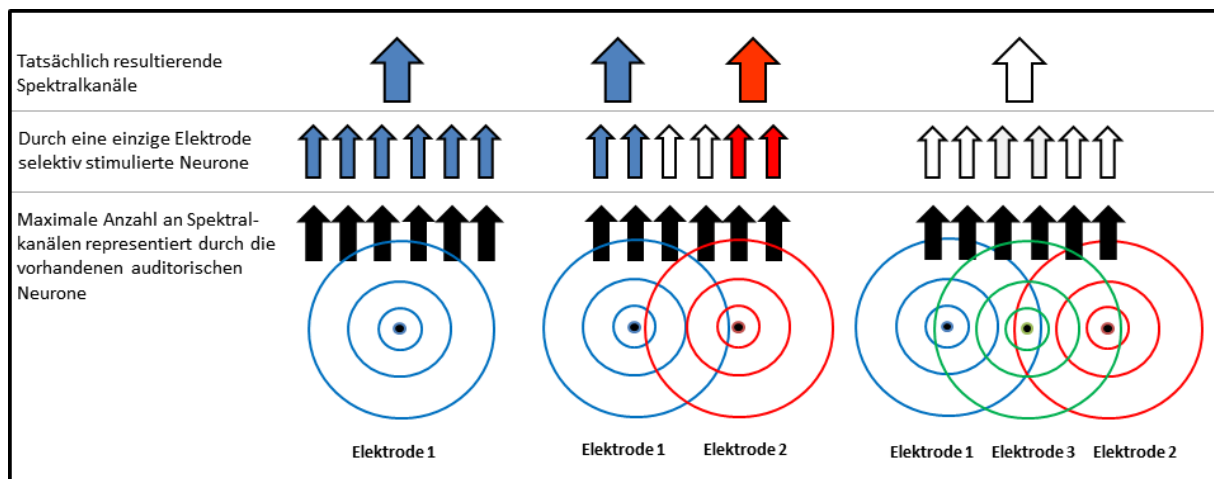


Abbildung 1: Begrenzung der Anzahl an Spektralkanälen durch die elektrische Feldinterferenz

Schematisch dargestellt ist die Übertragung spektraler Informationen. Die schwarzen Punkte mit den umgebenden konzentrischen farbigen Kreisen symbolisieren die Stimulationselektroden und deren elektrische Felder. Die hypothetisch maximale Anzahl an möglichen Spektralkanälen ist durch die schwarzen Pfeile dargestellt. Die farbigen Pfeile darüber zeigen die Neurone, die durch die jeweils zugehörige Elektrode stimuliert werden. Neurone, die unse-

lektiv durch mehrere Elektroden angesprochen werden, sind durch Pfeile mit weißer Füllung gekennzeichnet. Durch die großen Pfeile werden die tatsächlich resultierenden Spektralkanäle dargestellt.

Durch den Einsatz einer einzigen Stimulationselektrode wird die maximale Anzahl an möglichen Kanälen durch diese Elektrode angesprochen. Hierdurch steht tatsächlich jedoch nur ein Spektralkanal zur Informationsübertragung zur Verfügung (links). Wird eine weitere Elektrode zur Stimulation eingesetzt, können zwei Spektralkanäle erzeugt werden. Durch die Überlappung der elektrischen Felder wird die maximal mögliche Kanalbreite allerdings eingeschränkt (Mitte). Werden so viele Elektroden eingesetzt, dass eine überlappungsfreie Erregung der auditorischen Neurone nicht mehr möglich ist, können Informationen nicht mehr selektiv übertragen werden. Es stehen dann keine zusätzlichen Spektralkanäle zur Verfügung (rechts).

Ein möglicher Ansatz die Anzahl an nutzbaren Spektralkanälen zu erhöhen liegt in der räumlichen Annäherung zwischen Stimulationselektrode und Neurit (Bierer, 2010; Wilson et al., 2003). Da das elektrische Feld mit zunehmendem Abstand zur Elektrode immer schwächer wird, müssen relativ starke Erregungsströme eingesetzt werden, um Neurite, die weit von der Elektrode entfernt sind, noch zuverlässig zu erregen (Grill, 1999). Je weiter Elektrode und Neurit aneinander angenähert werden, desto stärker kann die Schwellenstromstärke abgesenkt werden. Die Interferenz der elektrischen Felder benachbarter Elektroden nimmt ab und die Anzahl an nutzbaren Spektralkanälen nimmt zu (Abbildung 2).

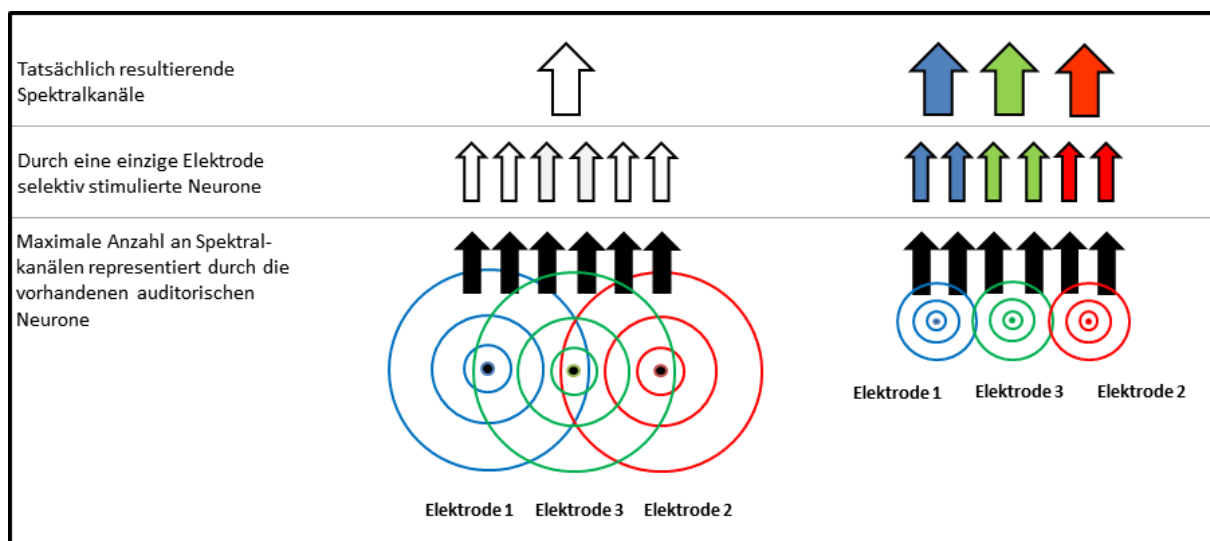


Abbildung 2: Erhöhung der Anzahl an Spektralkanälen durch die Senkung der elektrischen Feldinterferenz

Schematisch dargestellt ist die Übertragung spektraler Informationen. Die schwarzen Punkte mit den umgebenden konzentrischen farbigen Kreisen symbolisieren die Stimulationselekt-

roden und deren elektrische Felder. Die hypothetisch maximale Anzahl an möglichen Spektralkanälen ist durch die schwarzen Pfeile dargestellt. Die farbigen Pfeile darüber zeigen die Neurone, die durch die jeweils zugehörige Elektrode stimuliert werden. Neurone, die unselektiv durch mehrere Elektroden angesprochen werden, sind durch Pfeile mit weißer Füllung gekennzeichnet. Durch die großen Pfeile werden die tatsächlich resultierenden Spektralkanäle dargestellt.

Durch die Überlappung der elektrischen Felder benachbarter Elektroden wird keiner der möglichen Kanäle durch eine der 3 Stimulationselektroden selektiv angesprochen (links). Eine Distanzverminderung zwischen Elektrode und Neurit ermöglicht die Reduktion der Feldstärke der elektrischen Felder. Hierdurch wird die örtliche Selektion der Stimulation und die Anzahl möglicher Spektralkanäle erhöht (rechts).

Unter Berücksichtigung der anatomischen Gegebenheiten ist bei Cochleaimplantaten die Positionierung des Elektrodenträgers direkt an der Innenwand der Scala tympani ein möglicher Ansatz. Um diese Lage nahe den Somata der Spiralganglienzellen zu erreichen, wurden verschiedene Techniken entwickelt, mit denen der Elektrodenträger nahe am Modiolus positioniert werden konnte (Gstoettner et al., 2001; Stickney et al., 2006; Tykocinski et al., 2001b). Durch die perimodiolar gelegenen Elektroden erhoffte man sich, durch die bereits im Tiermodell erzielten niedrigeren Schwellenstromstärken, auch ein verbessertes Sprachverständnis bei Implantatträgern zu erreichen (Allitt et al., 2012; Shepherd et al., 1993). Die Ergebnisse der klinischen Studien konnten dies jedoch nicht durchweg bestätigen. Obwohl es zumindest teilweise möglich war, die Schwellenstromstärken zu senken, führte dies dennoch nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Performance gegenüber konventionellen intrascalären Implantaten (Cohen et al., 2006; Hughes and Abbas, 2006; Seidman et al., 2005). Sowohl ein Anstieg der Elektrodenimpedanz durch reaktives Fibroblastenwachstum auf dem Elektrodenträger (Hanekom, 2005; Paasche et al., 2009), als auch die elektrische Abschirmung der Ganglienneurite durch den knöchernen Modiolus kommen als Ursache hierfür infrage.

Aufgrund des geringen Erfolges der perimodiolären Implantate wurden im Tiermodell verschiedene penetrierende Elektrodenträger entwickelt, die direkt in Kontakt mit den Nervenfasern treten sollten. Durch diese sollte das isolierende Gewebe zwischen Elektroden und Nervenfasern überwunden und ein möglichst enger Kontakt zwischen beiden gewährleistet werden. Je nach Stimulationsort wurden die Elektroden direkt in den basalen Anteil des Hörnervs (Badi et al., 2007; Middlebrooks and Snyder, 2008; Tykocinski et al., 2001a) bzw. in andere Kerngebiete der Hörbahn wie dem Ncl.

Cochlearis (McCreery, 2008; Otto et al., 2008) oder dem Colliculus inferior implantiert (Anderson, 2008; Lim and Anderson, 2006; Lim et al., 2009).

Klinisch wurden bisher nur penetrierende Hirnstammimplantate bei Patienten mit Neurofibromatose Typ 2 eingesetzt (Otto et al., 2008). Trotz der im Vergleich zu nicht penetrierenden Hirnstammimplantaten niedrigeren Schwellenstromstärken und einer theoretisch selektiveren Stimulierbarkeit von Neuronen, konnte durch die Distanzverkürzung das Sprachverständnis ebenfalls kaum verbessert werden. Die unpräzise Adressierung der komplexen tonotopen Organisation des Ncl. Cochlearis sowie das Überspringen von im Ncl. Cochlearis stattfindenden Verarbeitungsprozessen könnten Ursache hierfür sein (Lenarz et al., 2009; Otto et al., 2008).

1.7 Aktuelle Strategien zur Verbesserung der neuronalen Schnittstelle

Bei der Entwicklung zukünftiger Hörimplantate wird der Optimierung der bionischen Schnittstelle zwischen Elektrode und Neuron entscheidende Bedeutung zukommen. Eine deutliche Steigerung der Anzahl an nutzbaren Spektralkanälen wird nur durch eine Verbesserung der Übertragungselektivität zu erreichen sein. Ideal wäre es, Elektrode und Neuron bis auf wenige Nanometer anzunähern, sodass eine direkte Kopplung zwischen Elektroden und Nervenfasern entstehen könnte, wobei jedes Neuron dann optimaler Weise mit genau einem Elektrodenkontakt verbunden wäre. Durch den engen Kontakt zwischen Neuron und Elektrode wäre eine drastische Senkung der Erregungsströme möglich, was die räumliche Auflösung der Informationsübertragung entscheidend verbessern würde. Durch die Etablierung einer solchen Elektroden-Nervenschnittstelle wäre im Idealfall die Anzahl an Spektralkanälen nur von der Anzahl an vorhandenen Neuronen abhängig (Fromherz, 2002) (Abbildung 3).

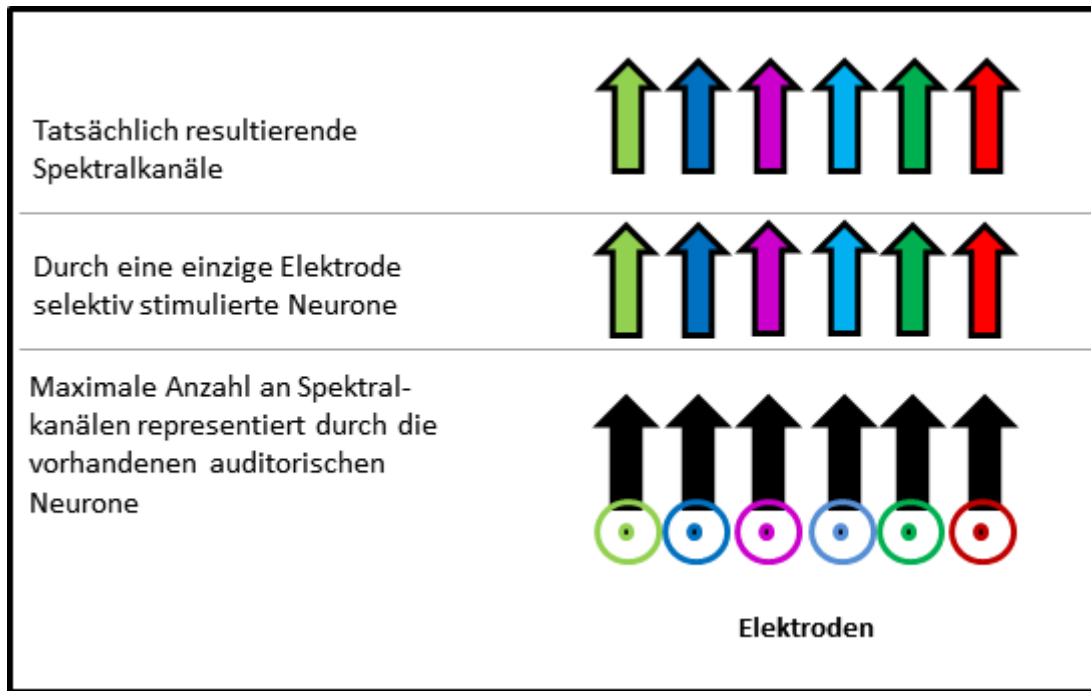


Abbildung 3: Der Idealfall der Elektroden-Nerven-Schnittstelle

Schematisch dargestellt ist die Übertragung spektraler Informationen. Die schwarzen Punkte mit den umgebenden konzentrischen farbigen Kreisen symbolisieren die Stimulationselektroden und deren elektrische Felder. Die hypothetisch maximale Anzahl an möglichen Spektralkanälen ist durch die schwarzen Pfeile dargestellt. Die farbigen Pfeile darüber zeigen die Neurone, die durch die jeweils zugehörige Elektrode stimuliert werden. Die farbigen Pfeile der oberen Reihe stellen die tatsächlich resultierenden Spektralkanäle dar.

Eine direkte Kopplung zwischen Elektroden und Nervenfasern könnte die zur Erregung der Nervenfasern notwendigen Ströme auf ein Minimum reduzieren. Jedes Neuron wäre dann idealerweise mit genau einem Elektrodenkontakt verbunden. Die Anzahl an Spektralkanälen wäre dann nur durch die Anzahl an vorhandenen Neuronen limitiert.

Ein vollständiges Ausschöpfen der maximalen Anzahl an theoretisch möglichen Spektralkanälen wird in der klinischen Praxis wohl kaum erreicht werden können. Dennoch geben die Forschungsergebnisse der letzten Jahre Anlass zur Hoffnung, dass in Zukunft durch eine Annäherung zwischen Elektrode und Neurit eine verbesserte Kanaldiskriminierung möglich sein wird. So konnte beispielsweise durch den Einsatz von neurotrophen Faktoren gezeigt werden, dass nicht nur das Überleben von Spiralganglienzellen verbessert wird, sondern dass auch Länge und vor allem die Wachstumsrichtung der Neurone beeinflusst werden konnten (Aletsee et al., 2002; Glueckert et al., 2008; Mou et al., 1997; Vieira et al., 2007). Auch Fortschritte auf dem Gebiet der Oberflächenstrukturierung zeigen, dass es möglich ist, Neurone

während des Aussprossens in eine bestimmte Richtung zu navigieren (Johansson et al., 2006; Li et al., 2008a; Mahoney et al., 2005; Reich et al., 2012; Yao et al., 2009).

In Zukunft werden somit wahrscheinlich Implantate benötigt werden, die eine höhere Anzahl an Elektrodenkontakten zur Verfügung stellen können als dies auf den heutigen Kabelbündel-Elektroenträgern möglich ist. Mit maximal 22 Elektrodenkontakten sind die Kabelbündel-Elektroenträger an ihrer Leistungsgrenze angelangt. Mit jeder zusätzlichen eingebrachten Elektrode wird der Elektroenträger immer dicker, so dass das Insertionstrauma beim operativen Einbringen ansteigt und letztendlich ein Einbringen unmöglich wird (Iverson et al., 2011). Ein Elektroenträger, auf dem 30 000 bis 35 000 Elektrodenkontakte untergebracht werden müssten, ist in Kabelbündeltechnik schlicht weg unmöglich. So viele Elektrodenkontakte wären allerdings bei unversehrtem Hörnerv und im Idealfall der Elektroden-Nerven-Schnittstelle nötig (Spoendlin and Schrott, 1989).

Eine Alternative zu den herkömmlichen Kabelbündel-Elektroenträgern könnten Halbleiterbauelemente auf Siliziumbasis sein (Iverson et al., 2011; Mlynski et al., 2007; Wang and Wise, 2008; Wang and Wise, 2009; Wise et al., 2008). Diese hätten gegenüber den konventionellen Elektroenträgern den Vorteil, dass die Elektrodenzahl um ein Vielfaches erhöht werden könnte. Eine ausreichend große Anzahl an Elektroden zur Adressierung der auditorischen Neurone wäre somit gewährleistet (Bhandari et al., 2010a; Bhandari et al., 2010b; Iverson et al., 2011). Ein weiterer Vorteil von Halbleiterelektroenträgern liegt in der Möglichkeit der sehr einfachen und präzisen Oberflächenstrukturierung durch lithografische Verfahren (Bratton et al., 2006; Ito and Okazaki, 2000; Lee et al., 2011). In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass insbesondere durch das Einbringen von Furchen auf unterschiedlichen strukturierten Trägermaterialien ein gerichtetes Auswachsen neuronaler Zellen erreicht werden konnte (Johansson et al., 2006; Li et al., 2008a; Mahoney et al., 2005; Reich et al., 2012; Yao et al., 2009). Der Einsatz derartiger Oberflächenstrukturierung könnte dazu beitragen den Abstand zwischen Elektrode und Neurit deutlich zu verringern.

Siliziumelektroenträger hätten somit zwei wesentliche Vorteile gegenüber Kabelbündel-Elektroenträgern: Durch sie wäre eine erhöhte Anzahl an Elektrodenkontakten auf dem Elektroenträger realisierbar und es bestünde die Möglichkeit durch Oberflächenstrukturierung die Kopplung zwischen Elektrode und Neurone deutlich zu

verbessern. Durch die Kombination beider Techniken könnte die tonotopische Organisation der Hörbahn wahrscheinlich wesentlich präziser adressiert werden als dies durch die heutigen Kabelbündel-Elektroden möglich ist.

1.8 Ziel der Arbeit

Ziel der Forschung im Bereich auditorischer Implantate ist es, die Schwerhörigkeit bei Implantatträgern so auszugleichen, dass das Hörvermögen dem von Hörgesunden weitestgehend entspricht. Die Erhöhung der Anzahl an Spektralkanälen ist eine Voraussetzung, um dies zu erreichen. Um die Anzahl an Spektralkanälen zu steigern, müssen allerdings verschiedene Bedingungen erfüllt werden. Zum einen muss der Abstand zwischen Elektrode und Neurit unmittelbar reduziert werden, um eine selektivere Stimulation von Neuronen zu erreichen. Zum anderen muss eine Technologie bereitgestellt werden, die durch eine höhere Anzahl an Stimulationselektroden die große Anzahl an neu gewonnenen möglichen Kanälen auch präzise adressieren kann.

Die Halbleitertechnologie könnte beide Voraussetzungen erfüllen. Zum einen können durch die präzise lithografische Fertigungsweise Halbleiterelektroden mit einer sehr großen Anzahl an Stimulationselektroden hergestellt werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit durch Oberflächenstrukturierung Elektrode und Neurit einander anzunähern, um eine selektive Stimulierbarkeit der auditorischen Neurone zu gewährleisten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb das Wachstumsverhalten neuronaler Zellen auf strukturierten Halbleitern als Material zukünftiger Elektroden zu untersuchen und näher zu charakterisieren. Als Zellen wurden hierfür kortikale neuronale Vorläuferzellen der Maus verwendet. Diese wurden auf Siliziumoberflächen mit unterschiedlicher Oberflächenstrukturierung ausplattiert und ausdifferenziert. Zwei unterschiedliche Oberflächenstrukturen wurden dabei näher untersucht. Zylinder auf der Oberfläche der Halbleiter wurden als Modellstruktur gewählt um eine erhöhte Anzahl an Elektrodenkontakten zu simulieren und die neuronale Interaktion mit diesen zu untersuchen. Daneben wurden Furchen auf Siliziumoberflächen verwendet, um die Wachstumsrichtung der neuronalen Zellen zu beeinflussen. Das Wachstumsverhalten der Neurone auf den untersuchten Oberflächenstrukturen wurde dabei sowohl

fluoreszenzmikroskopisch als auch rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Ergänzend wurden Echtzeitaufnahmen von lebenden Zellen durchgeführt, die die Dynamik des Wachstumsverhaltens dokumentierten.

2 Material und Methoden

2.1 Oberflächenstrukturierung der Halbleiter

Als Ausgangsmaterial für die strukturierten Halbleiteroberflächen wurden polierte p-type Silizium-Rohlinge 100 (Si) (Firma Leica, Jena) verwendet. Die in der Arbeit untersuchten Oberflächenstrukturen wurden durch Elektronenstrahlolithografie (Leica SB 350) und anschließend reaktiven Ionentiefätzen auf den Rohlingen erzeugt. Vor Gebrauch wurden die so erzeugten strukturierten Wafer der Raumluft ausgesetzt, sodass sich eine stabile Oxidschicht (SiO_2) auf den Wafern ausbilden konnte (Albers, 2006). Um den Einfluss der Oberflächenstruktur auf das neuronale Wachstum zu untersuchen, wurden auf diese Weise zwei unterschiedliche Oberflächenstrukturen hergestellt. Als Modellstruktur für Elektrodenkontakte wurde eine Zylinderform gewählt. Daneben wurden Furchen auf der Siliziumoberfläche erzeugt, um die Wachstumsrichtung der neuronalen Zellen zu beeinflussen.

Da zum Zeitpunkt der Untersuchung keine vergleichbaren Arbeiten zur Interaktion von Neuronen mit zylinderförmigen Oberflächenstrukturen vorlagen, wurden für die Auswahl der Zylinderdimensionen Arbeiten berücksichtigt, die die Interaktion anderer Zellentitäten mit Zylindern untersucht hatten (Eberwein et al., 2011; Ghibauda et al., 2009; Mussig et al., 2010). In Anlehnung an diese Arbeiten wurde der Zylinderdurchmesser mit $5\ \mu\text{m}$ halb so groß gewählt wie der Abstand zwischen den Zylindern, der $10\ \mu\text{m}$ betrug. Hierdurch entstanden Areale mit einem Elektrodenbesatz von $4444/\text{mm}^2$. Durch unterschiedliche Ätztiefen wurden Zylinder mit $3\ \mu\text{m}$ und $7\ \mu\text{m}$ Zylinderhöhe erzeugt (Abbildung 4).

Für die Auswahl der Furchendimensionen wurden die zum Zeitpunkt der Arbeit vorhandenen Arbeiten zum Wachstumsverhalten neuronaler Zellen auf gefurchten Siliziumoberflächen berücksichtigt (Foley et al., 2005; Fozdar et al., 2010; Rajnicek et al., 1997). Die Furchen wurden parallel mit einem Abstand von $10\ \mu\text{m}$ in die Siliziumoberfläche geätzt. Die Furchenbreite betrug dabei $4\ \mu\text{m}$. Die Furchentiefe betrug analog zu den Zylinderoberflächen $3\ \mu\text{m}$ und $7\ \mu\text{m}$. Auf diese Weise entstanden auf den Siliziumrohlingen parallel angeordnete Quader, die durch dazwischen liegende Furchen voneinander getrennt waren (Abbildung 4).

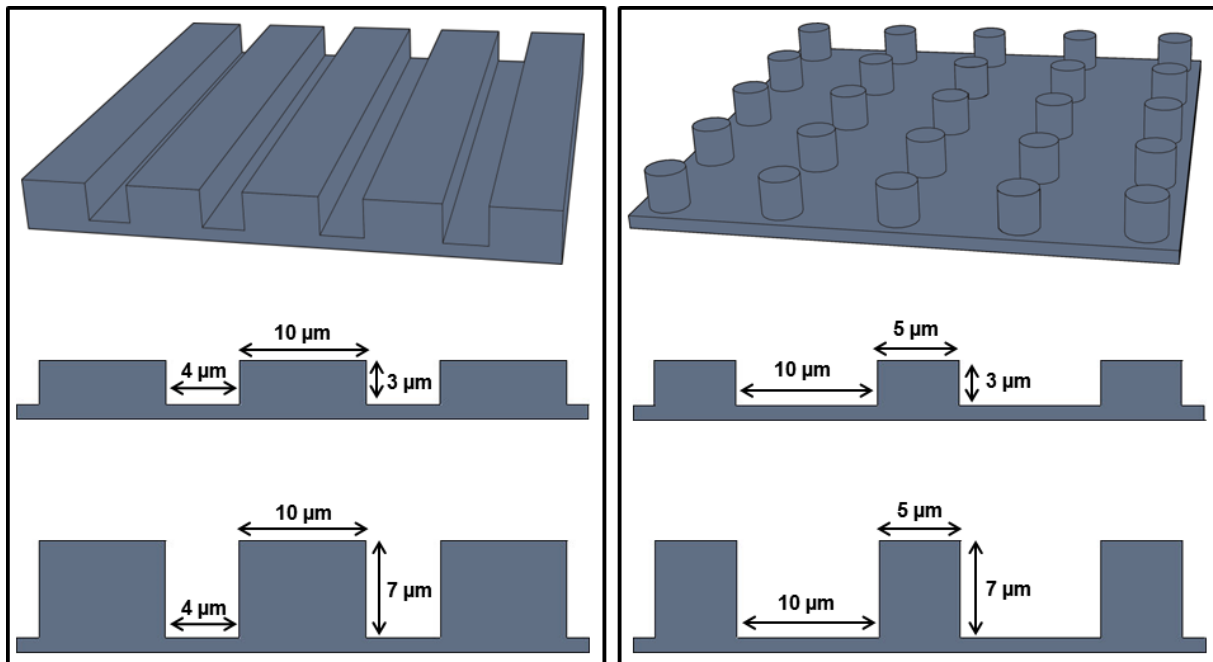


Abbildung 4: Oberflächenstrukturen der Siliziumhalbleiter

Durch Elektronenstrahlolithografie und reaktivem Ionentiefätzen wurden auf den Siliziumrohlingen die dargestellten Oberflächenstrukturen erzeugt. Beide Strukturen wurden durch unterschiedliche Ätztiefen in zwei Ausführungen mit 3 µm und 7 µm tiefen Furchen (links) bzw. 3 µm und 7 µm hohen Zylindern (rechts) hergestellt.

Auf jedem Rohling wurden die beiden Strukturen jeweils auf einer Fläche von 2,5 mm x 2,5 mm erzeugt. Als Kontrolloberflächen dienten unstrukturierte Bereiche, die die strukturierten Areale umgeben.

2.2 Sterilisation und Beschichtung der strukturierten Siliziumwafer

Die Siliziumwafer wurden jeweils für eine Stunde mit 70% und 100% ETOH sterilisiert und anschließend zur vollständigen Keimelimination 2 Stunden in einer Polyesterplatte mit 24 Vertiefungen (Falcon) mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm behandelt (Desaga UVIS). Am Tag vor dem Versuch wurde jeder Wafer über Nacht mit 300 µl Poly-D-Lysin (Serva Electrophoresis) gelöst in PBS in der Konzentration 100 µg/ml bei 4 °C inkubiert. Am Tag des Versuchs wurden die Wafer dreimal mit PBS gewaschen und nochmals für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit jeweils 300 µl Laminin-111 (BD Biosciences) gelöst in PBS in der Konzentration 10 µg/ml inkubiert. Vor der Beschichtung der Wafer mit den Zellen wurden die Wafer noch einmal mit PBS gewaschen, mit Differenzierungsmedium bedeckt und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert.

2.3 Präparation und Zellkultur der kortikalen neuronalen Vorläuferzellen der Maus

Am 12. Tag der Embryonalentwicklung wurde das Muttertier (C57BL/6-Zuchtstamm) nach Äthernarkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Gebärmutter wurde entnommen und die Embryonen von den umgebenden Fruchtblasen befreit. Das Vorderhirn der Embryonen wurde entfernt und in 500 µl HBSS (PAA Laboratories) gegeben. Unter Zugabe von 20 µl Trypsin (Sigma-Aldrich) gelöst in HBSS im Verhältnis 25:1000 erfolgte ein 30-minütiger Verdau bei 37 °C, der durch Zugabe von 20 µl Trypsin Inhibitor (Sigma-Aldrich) gelöst in HBSS im Verhältnis 25:1000 gestoppt wurde. Nach dem Abzentrifugieren der dissoziierten Zellen (1000 rpm, 5 min) wurde das Pellet in 5 ml Stammzellmedium (Neurobasal, GlutaMAX Supplement, B27 Supplement ohne Retinsäure und Penizillin/Streptomycin (alle Komponenten von Gibco)) unter Zugabe von EGF und FGF2 (Peprotech) in den Konzentrationen von jeweils 10 ng/ml resuspendiert. In 75 ml Kulturflaschen (Greiner) wurden die Zellen schließlich bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank als Neurosphären-Assay kultiviert. Jeden vierten Tag wurde das Medium gewechselt.

Für jeden Versuch wurden die kultivierten Neurosphären vollständig verdaut (vgl. 2.4) und die Zellen, die nicht für die Versuche benötigt wurden, neu passagiert. Nach 8 Passagen wurde die Zellkultur schließlich verworfen.

2.4 Entnahme und Differenzierung der kortikalen neuronalen Vorläuferzellen

Für die Versuche wurden die Neurosphären aus der Zellkulturflasche entnommen und in ein 15 ml Röhrchen (Greiner) gegeben. Nach dem Abzentrifugieren (1000 rpm, 5 min) wurde das Kulturmedium im Überstand abgesaugt. Um die Zellen komplett vom Kulturmedium zu befreien, wurde der Vorgang zweimal unter Zugabe von 5 ml PBS (PAA Laboratories) wiederholt. Zur Dissoziation der Zellen wurden diese unter Zugabe von 250 µl Accutase (PAA Laboratories) im Wärmebad bei 37 °C für 30 min. inkubiert und mehrmals trituriert.

Die dissoziierten Zellen wurden schließlich in einer Dichte von 100 Zellen pro Quadratmillimeter auf den vorbeschichteten Siliziumwafern (vgl. 2.2) ausplattiert und für 4 Tage in jeweils 400 µm Differenzierungsmedium (Neurobasal, GlutaMAX Supple-

ment, B27 Supplement mit Retinsäure und Penizillin/Streptomycin (alle Komponenten von Gibco)) im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ ausdifferenziert. Am zweiten Tag wurde das Medium einmalig gewechselt.

2.5 Fixierung und Immunfluoreszens

Die neuronalen Zellen, die nach 4 Tagen auf den Siliziumwafern ausdifferenziert waren, wurden mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 30 min. fixiert. Zur immunhistochemischen Färbung wurden die fixierten Zellen mit TBS-T (200 mM Tris-Base (pH 8), 8% NaCl, 1% Tween-20 (Sigma-Aldrich)) gewaschen und 5 min. mit 100% Aceton zur Permeabilisierung der Zellmembran inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen vor der Färbung zu reduzieren, wurden die Zellen erneut mit TBS-T gewaschen und dann für 30 min. mit 10% BSA (Carl Roth GmbH) gelöst in TBS-T inkubiert. Die so vorbereiteten Zellen wurden schließlich bei 4 °C über Nacht mit den in 1% BSA in TBS-T gelösten Erst-Antikörpern in den Konzentrationen 1:500 inkubiert. Ein muriner monoklonaler Erst-Antikörper gegen β -Tubulin (Sigma-Aldrich) und ein polyklonaler Schaf Erst-Antikörper gegen β III-Tubulin (Abcam) wurden dafür verwendet. Danach wurden die Zellen dreimal mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1% BSA gelöst in TBS-T mit den an die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa 488 und Alexa 555 (Invitrogen) konjugierten Zweitantikörpern (Ziege gegen Hase oder Ziege gegen Maus) in der Konzentration 1:500 inkubiert. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 5 μ g/ml verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Siliziumwafer jeweils in 500 μ l TBS-T in einer Polystyrolplatte mit 24 Vertiefungen gelagert und unter dem Mikroskop (DMI400B Leica) digitale Bilder im Tagged Image File Format (.tif) aufgenommen. Auf ein Eindecken der Siliziumwafer auf Objektträgern wurde dabei bewusst verzichtet. Dies ermöglichte die Siliziumwafer im Anschluss an die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung rasterelektronenmikroskopisch aufzuarbeiten.

2.6 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

2.6.1 Vorbemerkung zur Rasterelektronenmikroskopie

Einige Aspekte des neuronalen Wachstums können durch die Fluoreszenzmikroskopie verfahrensbedingt nicht dargestellt werden. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Lichtmikroskopie nur 2-dimensionale Bilder erzeugen kann. Gerade die Interaktion zwischen Wachstumskegel und der Oberflächenstruktur erfordert allerdings die Information über die 3. Raumebene. Aus diesem Grund wurden die Siliziumwafer im Anschluss an die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung rasterelektronenmikroskopisch aufbereitet und untersucht. Die der Rasterelektronenmikroskopie vorausgegangene fluoreszenzmikroskopische Untersuchung hatte dabei zwei entscheidende Vorteile. Auf diese Weise konnte zum einen sichergestellt werden, dass es sich bei den rasterelektronenmikroskopisch untersuchten Zellen auch tatsächlich um neuronale Zellen handelte (als neuronaler Marker wurde β III-Tubulin verwendet). Zum anderen konnten auf diese Weise neuronale Zellen mit einem für die Fragestellung der Arbeit interessantem Wachstumsverhalten fluoreszenzmikroskopisch vorselektiert und nur diese Zellen dann auch rasterelektronenmikroskopisch untersucht werden.

Von besonderem Interesse war bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen die Fragestellung, wie neuronale Zellen auf die unterschiedlichen Oberflächengeometrien der Siliziumstrukturen reagieren. Während für zylinderförmige Oberflächenstrukturen im Vorfeld keine Arbeiten gefunden werden konnten, die den Einfluss dieser Strukturen auf das zelluläre Wachstum untersuchten, ist dies für gefurchte Oberflächen gut beschrieben (Goldner et al., 2006; Li and Folch, 2005). Aus diesen Untersuchungen ist somit bekannt, dass auf gefurchten Oberflächen Neurite bevorzugt parallel zur Oberflächenstruktur auswachsen und somit Niveauwechsel zwischen Furchentälern und Stegplateaus vermieden werden.

Um dennoch das neuronale Wachstumsverhalten während eines Niveauwechsels untersuchen zu können, wurde der vertikale Wachstumsstress auf die Neurone erhöht. Die Anzahl der Furchen wurde verdoppelt, wobei die zusätzlich erzeugten Furchen senkrecht zu den bereits bestehenden Furchen in die Oberfläche eingätzt wurden. Auf diese Weise entstanden auf der Siliziumoberfläche einzeln stehende Quader und das durchgängige Plateau der Stege wurde unterbrochen. Die Breite

und Länge der entstandenen Quader betrug dabei $10\ \mu\text{m}$. Die Furchenbreite entsprach wie bei den einfach gefurchten Oberflächen ebenfalls $4\ \mu\text{m}$. Im Gegensatz zu diesen wurden die doppelt gefurchten Wafer allerdings ausschließlich mit einer Ätztiefe von $7\ \mu\text{m}$ hergestellt (Abbildung 5). Der Anteil an Neuronen, deren Neurite mit Niveauwechseln konfrontiert waren, konnte durch den Einsatz der doppelt gefurchten Siliziumoberflächen wesentlich gesteigert werden.

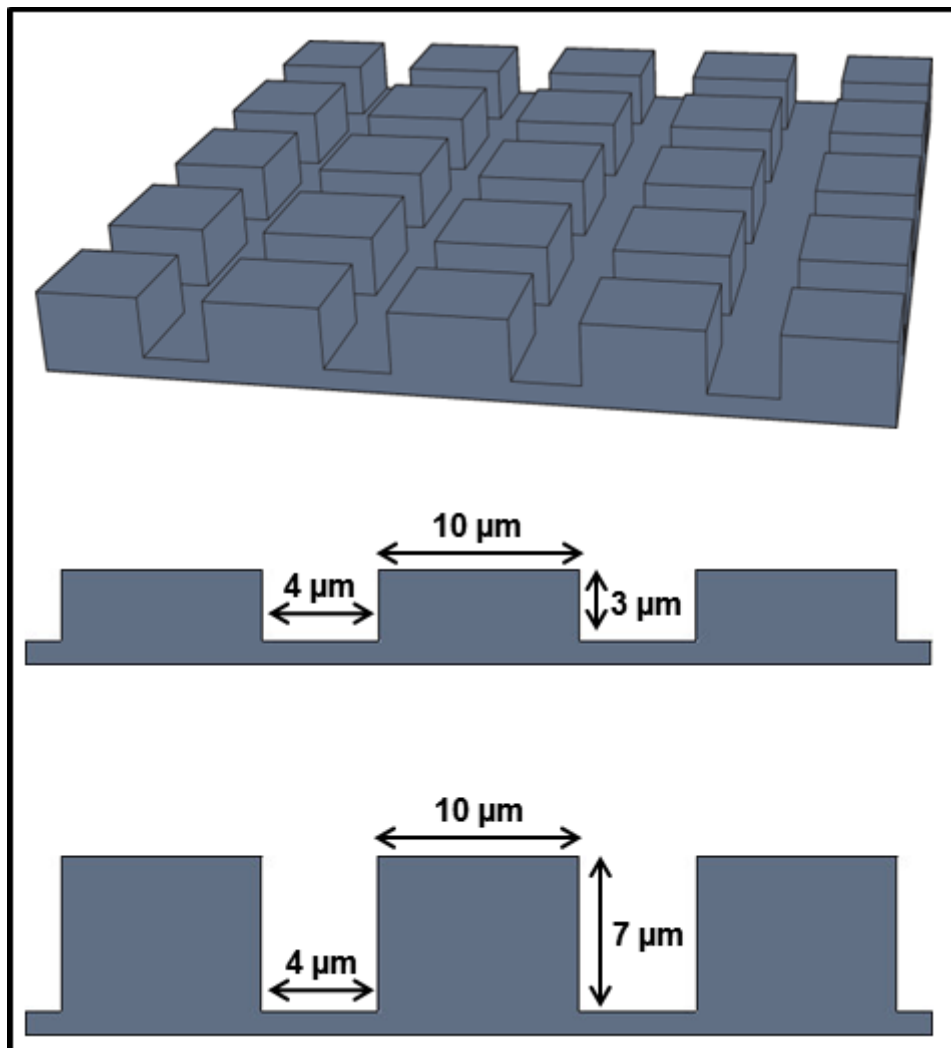


Abbildung 5: Doppelt gefurchte Siliziumoberflächen

Zur Herstellung der doppelt gefurchten Oberflächen wurde die Anzahl der Furchen verdoppelt und senkrecht zu den bereits bestehenden Furchen in die Oberfläche eingeeätzt. Auf diese Weise entstanden auf der Siliziumoberfläche einzeln stehende Quader. Im Gegensatz zu den einfach gefurchten Wafern wurden die doppelt gefurchten Wafer ausschließlich mit einer Ätztiefe von $7\ \mu\text{m}$ hergestellt.

Aufgrund fehlender Vergleichsarbeiten blieb die Oberflächenstruktur der zylinderförmigen Elektrodenkontakte für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen

unverändert. Analog zu den doppelt gefurchten Oberflächen wurden allerdings ebenfalls nur Zylinder mit einer Zylinderhöhe von 7 μm verwendet (Abbildung 4).

2.6.2 Aufbereitung der Präparate für das Rasterelektronenmikroskop

Nach der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die in TBS-T gelagerten Siliziumwafer aus dem Puffer entnommen und bei Raumtemperatur für 30 min. mit 6% Glutaraldehyd nachfixiert. Die Entwässerung der Präparate erfolgte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100%), gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in 100% Aceton. Für die kritische Punkttrocknung wurde das 8CPD 030 (Bal-Tec Inc.) verwendet. Die Beschichtung der Präparate erfolgte durch das SCD 005 (Bal-Tec Inc.) mittels einer Gold-Palladium-Schicht. Die Bilder wurden mit dem Elektronenmikroskop DSM 969 (Carl Zeiss) bei 2000 bis 10000-facher Vergrößerung im Tagged Image File Format (.tif) aufgenommen.

2.7 Echtzeituntersuchungen an lebenden Zellen

Um die Dynamik des zellulären Wachstums auf den strukturierten Halbleiteroberflächen zu untersuchen, wurden Echtzeituntersuchungen von lebenden Zellen durchgeführt. Hierzu wurden ebenfalls kortikale neuronale Vorläuferzellen verwendet, die wie in 2.3 beschrieben, gewonnen, kultiviert und auf den Wafern ausplattiert wurden. Da aufgrund der mangelnden Transparenz der Siliziumwafer eine durchlichtmikroskopische Untersuchung der Wafer nicht möglich war, wurde stattdessen auf eine eGFP exprimierende Zellkultur zurückgegriffen, deren Wachstumsverhalten auflichtmikroskopisch untersucht werden konnte.

Die Zellen wurden ebenfalls in einer Dichte von 100 Zellen pro Quadratmillimeter auf den vorbeschichteten Siliziumwafern (vgl. 2.4) ausplattiert und in einem 60 $\mu\text{-Dish}$ (Ibidi) mit jeweils 4 ml Differenzierungsmedium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 6 Stunden waren die neuronalen Zellen fest mit der Oberfläche verwachsen und besaßen bereits wenige Mikrometer lange axonale Fortsätze. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Wafer alle 10 min. aus dem Brutschrank entnommen und über einen Zeitraum von 2 Stunden das neuronale Wachstum ausgewählter Zellen unter dem Mikroskop (DMI400B Leica) dokumentiert. Nachdem ein Bild (.tif) auf-

genommen wurde, wurden die Wafer wieder in den Brutschrank zurückgestellt und verblieben dort bis zur nächsten Aufnahme.

2.8 Erhebung und Analyse der Daten

Für die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden ausschließlich β III-Tubulin positive Zellen herangezogen. Um die Länge der Neurite und deren Orientierung zu bestimmen, wurde jeweils der längste axonale Zweig der Neurone statistisch erfasst. Die Vermessung der Neurite und der Zellkerne erfolgte mit der Software Image J. Alle Daten wurden statistisch mit der Software Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) ausgewertet.

Da alle erhobenen Daten nicht einer Normalverteilung entsprachen, wurde der Boxplot als Darstellungsform gewählt und die Daten als Median mit 25%- und 75%-Perzentilen dargestellt. Als statistischer Test kam die Varianzanalyse (ANOVA) zum Einsatz. Wenn der in der Varianzanalyse ermittelte Signifikanzwert (p) kleiner 0,05 war, wurde im Anschluss der Post-hoc-Test nach Dunn verwendet, um die einzelnen Gruppen paarweise miteinander zu vergleichen. Das Abweichen eines Medianwertes von einem Erwartungswert wurde durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für eine Stichprobe ermittelt.

Allen Testmethoden wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 in Bezug auf die Nullhypothese zu Grunde gelegt.

2.9 Bestimmung der Neuritenorientierung

Um die Orientierung der Neurite zu untersuchen, wurde eine Gerade (g) durch Axonhügel und Wachstumskegel des Neuriten gelegt. Der Winkel (α) zwischen dieser Geraden und einer Referenzgeraden (r), die der 0-Grad-Achse entsprach, wurde gemessen und als Orientierung des Neuriten angesehen (Mahoney et al., 2005; Rajnicek et al., 1997). In gleicher Weise wurde bei den unstrukturierten Kontrolloberflächen verfahren, wobei als Referenzgerade (r) ebenfalls die 0-Grad-Achse definiert wurde. Alle gemessenen Winkel lagen dabei zwischen 0 und 90 Grad (Abbildung 6).

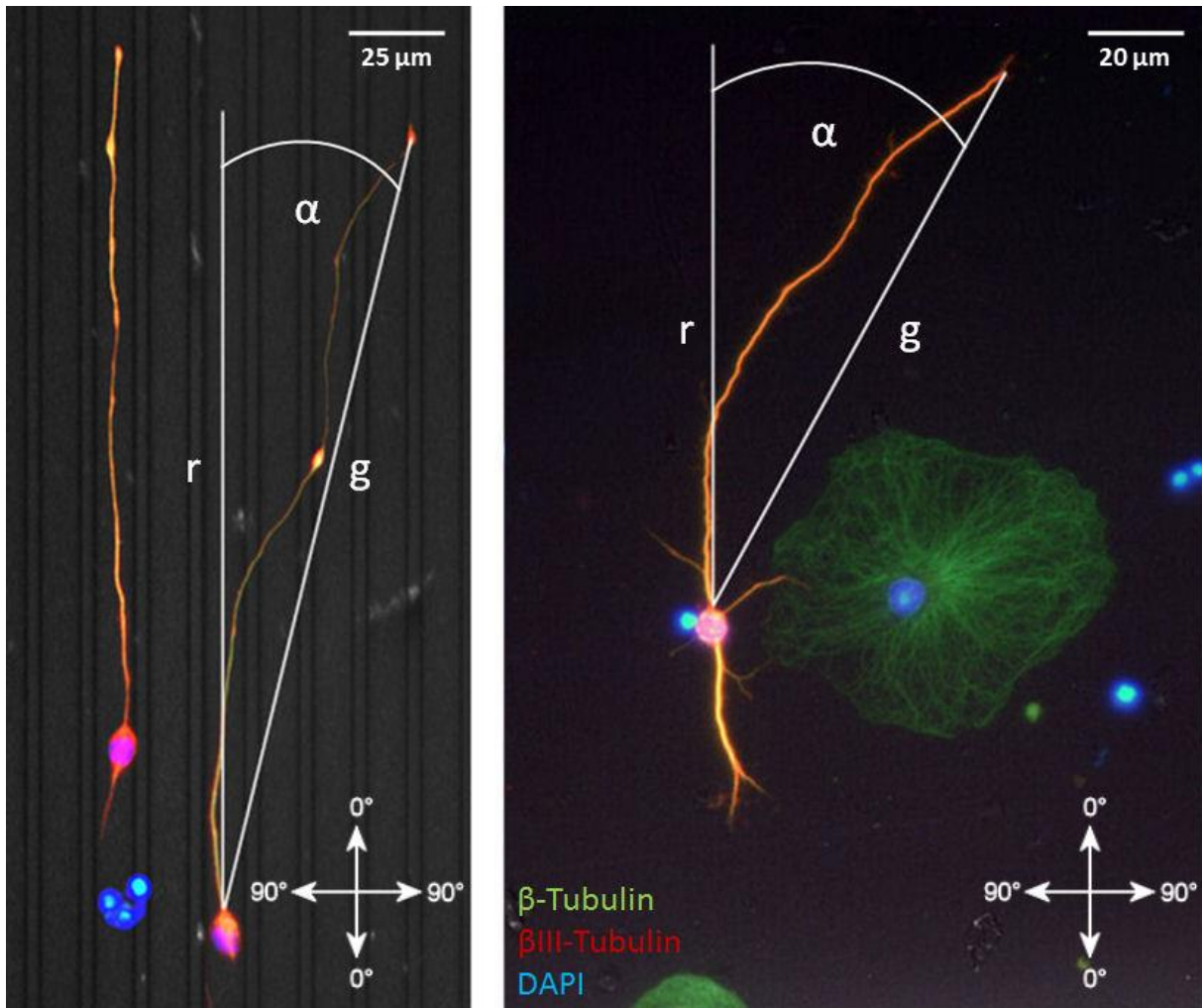


Abbildung 6: Messverfahren zur Erfassung der Orientierungswinkel der Neurite

Dargestellt sind exemplarisch drei Neurone, wie sie auf der gefurchten Oberfläche (links) bzw. der unstrukturierten Kontrolloberfläche (rechts) nach 4 Tagen ausgewachsen waren. Der Winkel (α) zwischen der Geraden (g) (durch Axonhügel und Wachstumskegel) und der Referenzgeraden (r) (parallel zu den Furchen) wurde als Orientierung des Neuriten definiert. Die Orientierung der Furchen und damit der Referenzgerade (r) entsprach dabei immer der 0-Grad-Achse.

2.10 Validierung der gemessenen Orientierungswinkel

Aufgrund des verwendeten Messverfahrens zur Bestimmung des Orientierungswinkels (α) wurde die tatsächliche Orientierung der Neurite bei einem geringen Anteil der Neurone nur unzureichend durch diesen beschrieben. Da zur Erfassung des Orientierungswinkels (α) nur 2 Punkte (Axonhügel und Wachstumskegel, vgl. Abbildung 6) entlang des Neuriten berücksichtigt wurden, blieb zwangsläufig der Verlauf des Neuriten zwischen diesen 2 Messpunkten unberücksichtigt. In den meisten Fällen war jedoch der Verlauf des Neuriten in etwa parallel zur Geraden (g). Somit entsprach

der ermittelte Orientierungswinkel (α) in den meisten Fällen auch der tatsächlichen Orientierung des Neuriten (vgl. Abbildung 6).

Vor allem auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen zeigte ein Teil der Neurone jedoch häufige Richtungswechsel im Verlauf des Neuriten. Der tatsächliche Verlauf solcher Neurone wurde durch den Orientierungswinkel (α) dann nicht korrekt wiedergegeben (Abbildung 7). Obgleich der ermittelte Orientierungswinkel (α) in Abbildung 7 ein nahezu paralleles Wachstum zur Referenzgeraden (r) suggeriert, weicht der tatsächliche Verlauf des Neuriten erheblich von einer parallelen Orientierung zur Referenzgeraden (r) und damit zur 0-Grad-Achse ab.

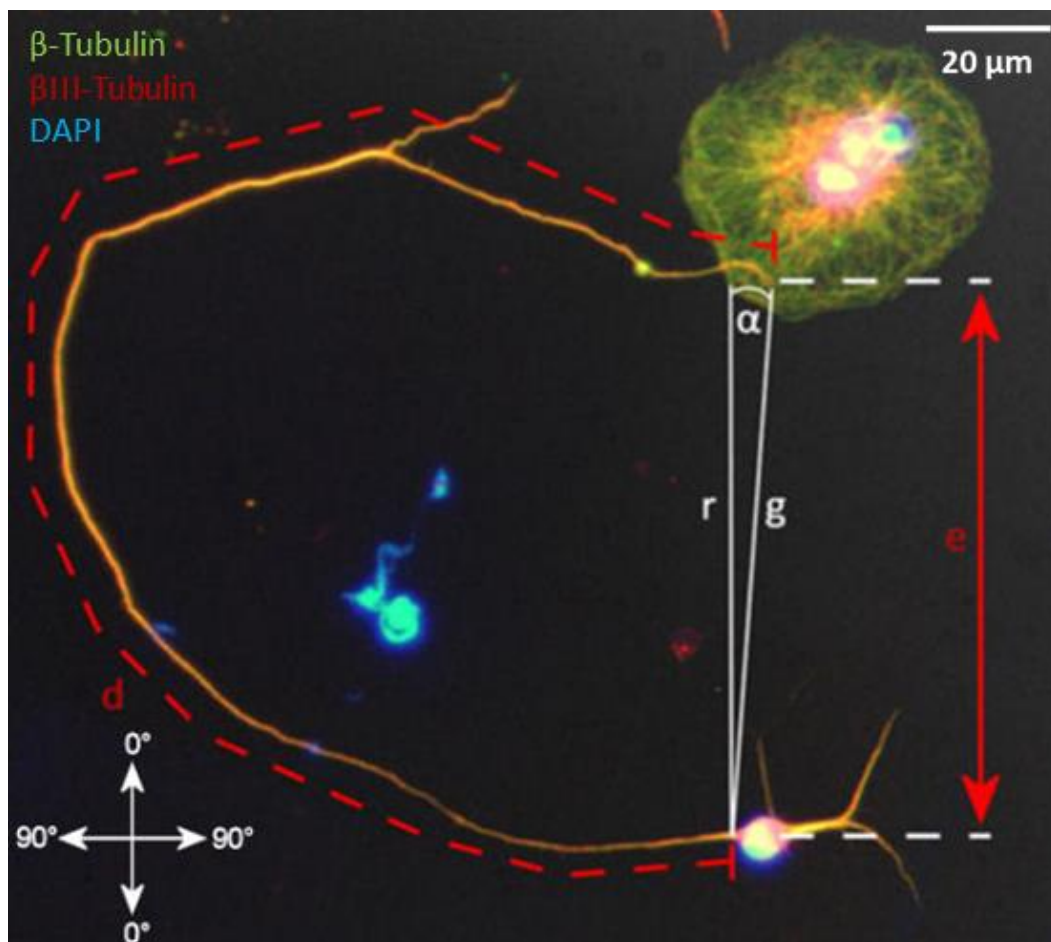


Abbildung 7: Diskrepanz zwischen Orientierungswinkel (α) und tatsächlichem Verlauf des Neuriten

Dargestellt ist ein Neuron auf einer unstrukturierten Kontrolloberfläche. Man erkennt deutlich, dass der Orientierungswinkel (α) den tatsächlichen Verlauf des Neuriten nicht korrekt wiedergibt. Deshalb wurde der Quotient (q) aus der Neuritenlänge (d) und der Strecke (e) bestimmt. Die Strecke (e) wurde ermittelt, indem zwei waagrechte Hilfsgeraden durch Axonhügel und Wachstumskegel gelegt wurden. Die senkrechte Verbindungslinie zwischen beiden Hilfsgeraden entspricht der Strecke (e).

Aufgrund dieser möglichen Diskrepanz zwischen dem ermittelten Orientierungswinkel (α) und dem tatsächlichen Verlauf des Neuriten besitzt der Orientierungswinkel (α) nur eingeschränkte Aussagekraft. Deshalb wurde zusätzlich der Quotient (q) aus der Länge des Neuriten (d) und der Strecke (e) bestimmt. Die Strecke (e) wurde ermittelt, indem zwei waagrechte Hilfsgeraden durch Axonhügel und Wachstumskegel gelegt wurden. Die senkrechte Verbindungslinie zwischen beiden Hilfsgeraden entspricht der Strecke (e) (Clarke et al., 2011) (Abbildung 7). Für Neurite, deren Länge (d) der Strecke (e) entspricht, nimmt der Quotient (q) den Wert eins an. Neurite mit dem Wert $q=1$ weichen in ihrem vollständigen Verlauf nicht von der 0-Grad-Achse und somit von der Orientierung der Furchen ab. Je weiter der Verlauf des Neuriten von dem Verlauf der 0-Grad-Achse abweicht, desto größer wird der Wert des Quotienten (q).

2.11 Bestimmung des Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne

Bei der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder fiel bei einem Teil der Neurone eine Verformung der Zellkerne auf. Dieses Phänomen wurde ausschließlich auf den gefurchten Oberflächen beobachtet und betraf Neurone, deren Somata in einer Furche lagen. Neurone, deren Somata auf den zwischen den Furchen liegenden Stegen lagen oder die auf den Kontrolloberflächen auswuchsen, zeigten eine derartige Verformung der Zellkerne nicht.

Um das Ausmaß der Verformung der Zellkerne zu quantifizieren, wurde das Längen-Breiten-Verhältnis der Zellkerne ermittelt. Der maximale Durchmesser des Zellkerns entsprach dabei immer der Länge des Kernes. Dementsprechend könnte der Wert der Breite nur Werte annehmen, die kleiner als der Längenwert waren oder diesem gleichen. Quotienten kleiner 1 waren somit ausgeschlossen. Bei exakt gleich großen Längen- und Breitenwerten, also einem runden Zellkern, nimmt der Quotient den Wert 1 an. Für Werte größer 1 konnte ein in die Länge gezogener Zellkern angenommen werden (Abbildung 8).

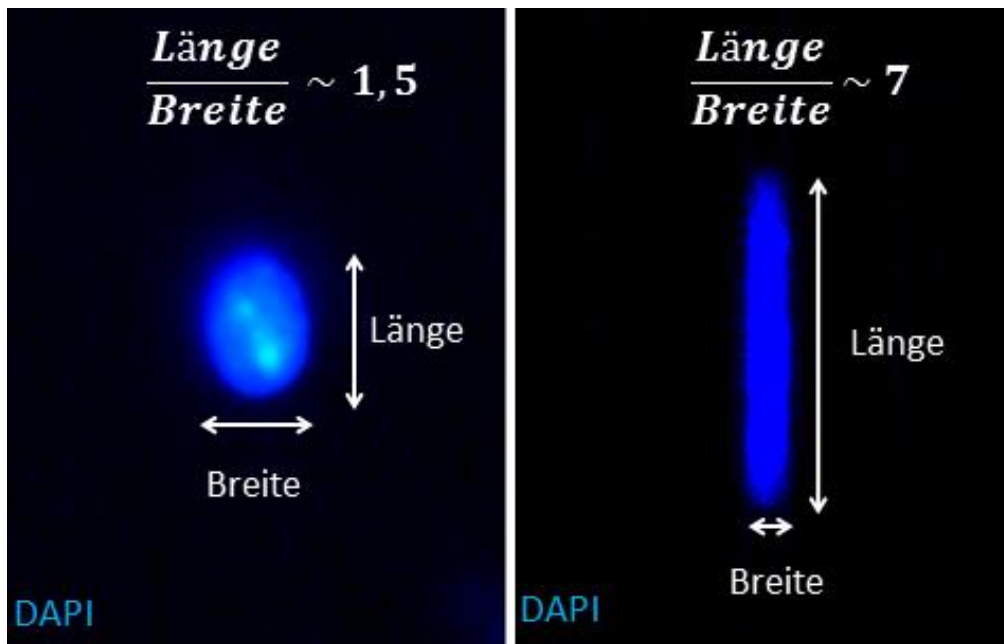


Abbildung 8: Messung des Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne

Dargestellt sind zwei Zellkerne, wie sie auf den gefurchten Oberflächen beobachtet wurden. Zellkerne, deren Quotienten den Wert 1 besaßen, hatten einen runden Zellkern. Für Werte größer 1 konnte ein in die Länge gezogener Zellkern angenommen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Gefurchte Siliziumoberflächen

3.1.1 Einfluss der Oberflächenstruktur auf die Orientierung der Neurite

Um den Einfluss der Oberflächenstrukturierung auf die Orientierung der Neurite zu ermitteln, wurden die Orientierungswinkel der Neurite auf den einfach gefurchten Siliziumoberflächen ermittelt und mit denen der Kontrolloberflächen verglichen.

Auf den unstrukturierten Kontrollen entsprachen die gemessenen Orientierungswinkel erwartungsgemäß einer zufälligen Verteilung. Um dies nachzuweisen, wurden die Medianwerte der gemessenen Winkel mit dem erwarteten Medianwert bei einer zufälligen Verteilung verglichen. Dieser Wert entspricht bei gemessenen Winkeln, die zwischen 0 und 90 Grad liegen konnten und einer angenommenen zufälligen Verteilung, genau 45 Grad. Die Medianwerte auf den unstrukturierten Kontrollen wichen nur geringfügig vom Erwartungswert von 45 Grad ab. Von einer zufälligen Verteilung der gemessenen Orientierungswinkel ist somit auszugehen (Tabelle 1 und Abbildung 9).

	Anzahl	Median	25%- Perzentile	75%- Perzentile	Erwarteter Median bei zufälliger Verteilung	Signifikanz- werte
Furchen 3 µm Äztiefe	277	1	1	4	45	p<0,0001
Kontrolle 3 µm Äztiefe	429	43	18	67	45	p=0,0965
Furchen 7 µm Äztiefe	142	1	1	3	45	p<0,0001
Kontrolle 7 µm Äztiefe	394	44	19	66	45	p=0,0477

Tabelle 1: Medianwerte der Orientierungswinkel auf einfach gefurchten Oberflächen

Dargestellt sind die Medianwerte der gemessenen Orientierungswinkel auf den einfach gefurchten Oberflächen und den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen in Grad. Das Abweichen der ermittelten Medianwerte von dem Erwartungswert von 45 Grad bei zufälliger Verteilung wurde durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für eine Stichprobe ermittelt.

Auf den einfach gefurchten Oberflächen zeigte sich im Gegensatz zu den unstrukturierten Kontrollen keine zufällige Verteilung der Orientierungswinkel. Die Neurite wuchsen gerichtet aus und zeigten eine bevorzugte Orientierung entlang der 0-Grad-Achse parallel zu den eingebrachten Furchen. Die unterschiedlichen Ätztiefen der Furchen beeinflussten die Neuritenorientierung hierbei nur kaum, so dass die Medianwerte der Orientierungswinkel auf den beiden untersuchten gefurchten Oberflächen annähernd gleich waren (Tabelle 1 und Abbildung 9).

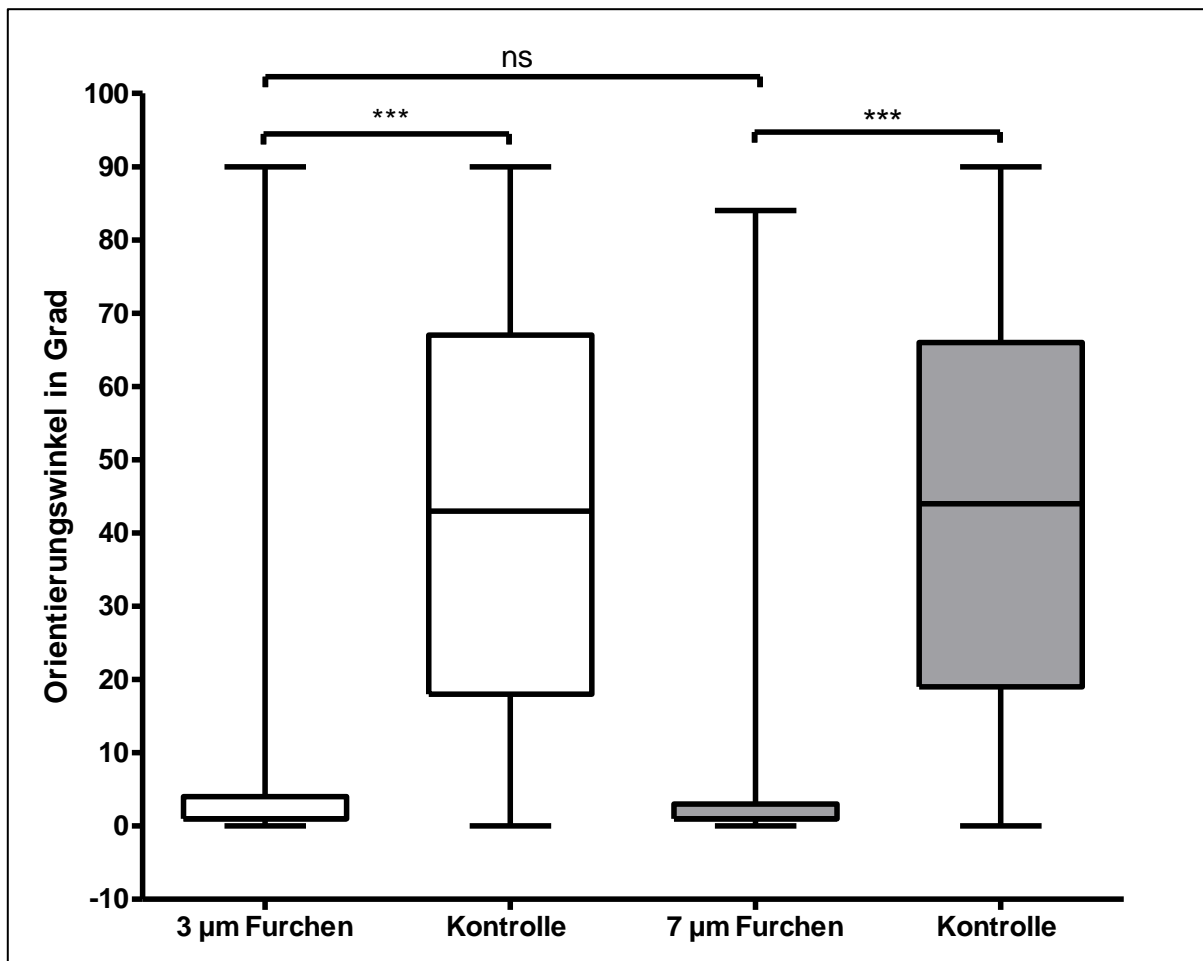


Abbildung 9: Orientierungswinkel der Neurite auf einfach gefurchten Oberflächen

Dargestellt sind die Orientierungswinkel der Neurite auf den einfach gefurchten Oberflächen sowie den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen als Boxplot. Die waagrechten Begrenzungslinien jeder Box markieren die 25%- bzw. 75%-Perzentile. Die waagrechte Linie in jeder Box markiert den Median. Die senkrechten Linien mit kurzer waagrechter Begrenzungslinie stellen Maximal- und Minimalwert dar. Der Unterschied zwischen den Medianwerten der einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-ANOVA). Der paarweise Vergleich der Gruppen erfolgte durch den Post-hoc-Test nach Dunn ($***p < 0,001$).

3.1.2 Validierung der gemessenen Orientierungswinkel

Neurone, deren Neurite häufige Richtungswechsel aufwiesen, wurden durch die Erhebung der Orientierungswinkel nur unzureichend erfasst. Um einen systematischen Fehler durch die Datenerhebung auszuschließen und die Aussagekraft der unter 3.1.1 dargestellten Ergebnisse zu validieren, wurde zusätzlich der Quotient (q) ermittelt (siehe 2.10). Für Quotienten (q) nahe dem Wert 1 kann ein vollständiges paralleles Wachstum entlang der Furchen angenommen werden.

Der Vergleich der Quotienten (q) zwischen den einfach gefurchten Oberflächen und deren zugehörigen Kontrollen bestätigte die Ergebnisse, die durch die Messung der Orientierungswinkel festgestellt wurden. So lagen die Medianwerte der Quotienten, die an Neuriten auf den einfach gefurchten Oberflächen ermittelt wurden, nahe dem Wert 1. Von einem Wachstum parallel zu den eingebrachten Furchen ist somit auszugehen. Die Medianwerte der Quotienten auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen waren dagegen weiter vom Wert 1 entfernt und lagen etwa bei Werten um 1,3 (Tabelle 2 und Abbildung 10).

	Anzahl	Median	25%-Perzentile	75%-Perzentile
Furchen 3 µm Äztiefe	277	1,02	1	1,07
Kontrolle 3 µm Äztiefe	429	1,28	1,11	1,99
Furchen 7 µm Äztiefe	142	1,02	1	1,06
Kontrolle 7 µm Äztiefe	394	1,32	1,12	2,07

Tabelle 2: Medianwerte der Quotienten (q) auf einfach gefurchten Oberflächen

Dargestellt sind die Medianwerte der Quotienten (q) auf den einfach gefurchten Oberflächen und den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen. Der Unterschied zwischen den Medianwerten der einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-ANOVA).

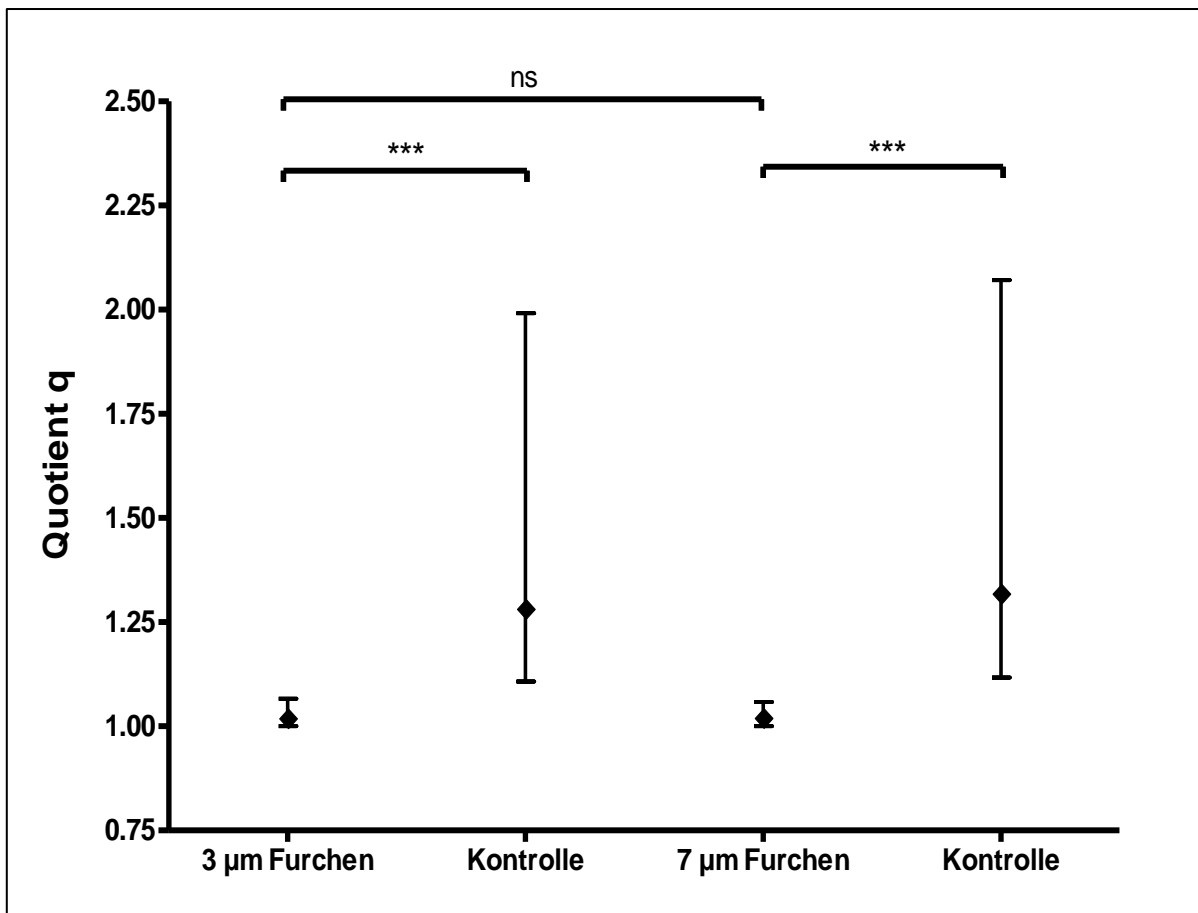


Abbildung 10: Quotienten (q) der Neurite auf einfach gefurchten Oberflächen

Dargestellt sind die Medianwerte (Raute) des Quotienten (q) auf den einfach gefurchten Oberflächen sowie den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen. Die 25%- und 75%-Perzentile werden durch senkrechte Linien mit kurzer waagrechter Begrenzungslinie dargestellt. Der Unterschied zwischen den Medianwerten der einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-ANOVA). Der paarweise Vergleich der Gruppen erfolgte durch den Post-hoc-Test nach Dunn ($***p < 0,001$).

3.1.3 Einfluss der Furchentiefe auf die Neuritenlänge

Um den Einfluss der Furchentiefe auf die Neuritenlänge zu untersuchen, wurden die Neuritenlängen der Neurone auf den einfach gefurchten Oberflächen mit denen auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen verglichen.

Die Neuritenlängen auf den einfach gefurchten Oberflächen waren für beide untersuchten Ätztiefen kürzer als auf den jeweiligen unstrukturierten Kontrolloberflächen. Während für Neurone, die auf den 3 µm tiefen Furchen ausgewachsen waren, im Vergleich zur unstrukturierten Kontrolloberfläche nur geringfügig kürzere Neuriten-

längen festgestellt werden konnten, fielen die Neuritenlängen auf den 7 µm tiefen Furchen wesentlich kürzer aus (Tabelle 3 und Abbildung 11).

	Anzahl	Median	25%-Perzentile	75%-Perzentile
Furchen 3 µm Äztiefe	277	110	67,5	173,5
Kontrolle 3 µm Äztiefe	429	120	76	185
Furchen 7 µm Äztiefe	142	72,5	47	118,5
Kontrolle 7 µm Äztiefe	394	117	71	182,5

Tabelle 3: Medianwerte der Neuritenlängen auf einfach gefurchten Oberflächen

Dargestellt sind die Medianwerte der Neuritenlängen auf den einfach gefurchten Oberflächen und den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen in µm. Der Unterschied zwischen den Medianwerten der einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-ANOVA).

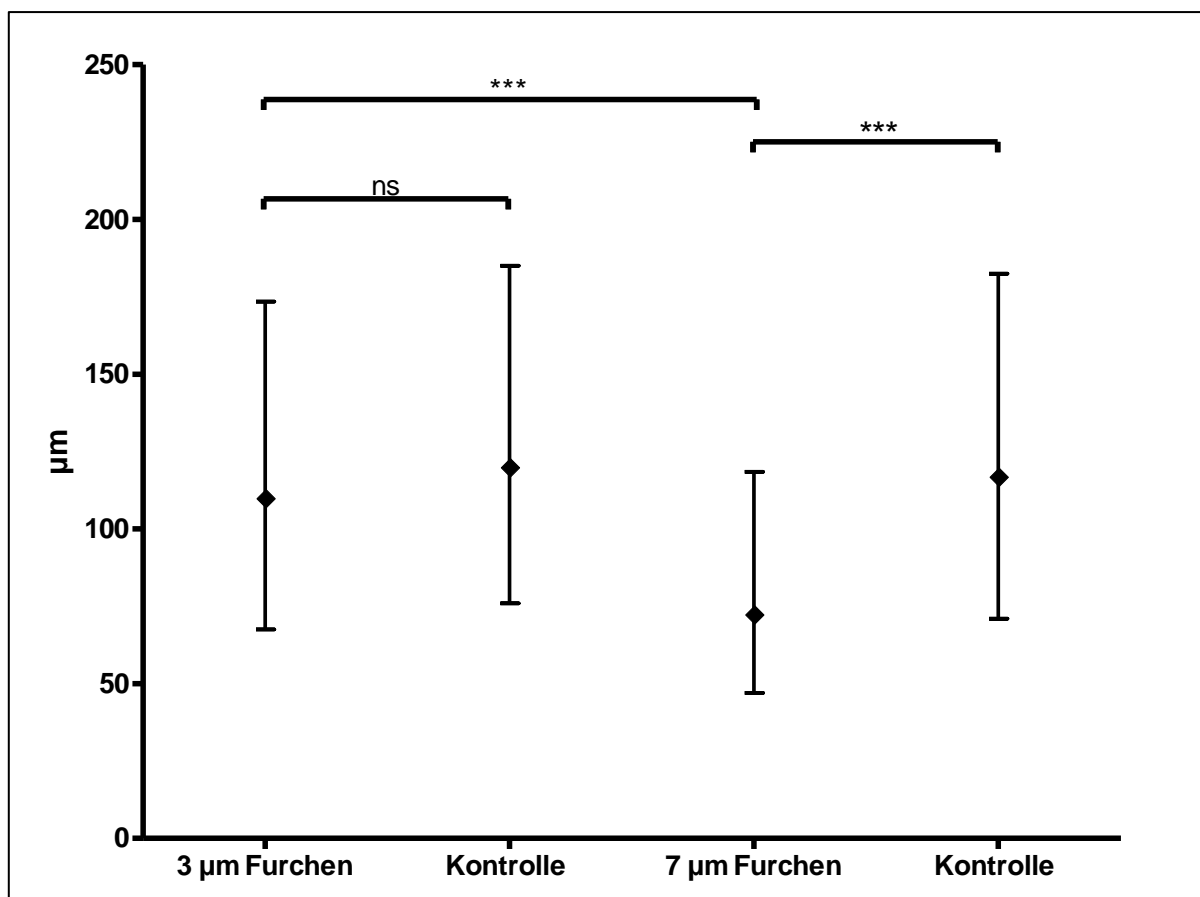


Abbildung 11: Neuritenlängen auf einfach gefurchten Oberflächen

Dargestellt sind die Medianwerte (Raute) der Neuritenlängen auf den einfach gefurchten Oberflächen sowie den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen. Die 25%- und

75%-Perzentile werden durch senkrechte Linien mit kurzer waagrechter Begrenzungslinie dargestellt. Der Unterschied zwischen den Medianwerten der einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-ANOVA). Der paarweise Vergleich der Gruppen erfolgte durch den Post-hoc-Test nach Dunn (** $p < 0,001$).

3.1.4 Einfluss der Furchentiefe auf die Form des Zellkerns

Bei einem Teil der Neurone, die auf den einfach gefurchten Oberflächen auswuchsen, wurde eine Verformung der Zellkerne beobachtet. Dieses Phänomen trat ausschließlich bei Neuronen auf, deren Somata in einer Furche lagen. Neurone, die auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen oder auf den Stegplateaus zwischen den Furchen ausgewachsen waren, zeigten ein derartiges Verhalten nicht und hatten in der Regel einen rund konfigurierten Zellkern. Vor allem auf den einfach gefurchten Oberflächen mit einer Ätztiefe von $7 \mu\text{m}$ zeigte ein Großteil der Neurone einen in die Länge gezogenen, stabförmigen Zellkern. Die Furchen waren so tief, dass die Furchenwände die Somata überragten und somit die Zellen vollständig unterhalb des Niveaus der Stege lagen. Die Breite des Zellkerns wurde durch die begrenzenden Furchenwände limitiert und entsprach damit maximal $4 \mu\text{m}$. Kompensatorisch dehnte sich der Zellkern der Länge nach entlang der Furchen aus und war somit um ein Vielfaches länger als die maximal mögliche Breite zwischen den begrenzenden Furchenwänden (Abbildung 12).

Im Gegensatz dazu wurde eine Verformung der Zellkerne auf den einfach gefurchten Oberflächen mit einer Ätztiefe von $3 \mu\text{m}$ wesentlich seltener beobachtet. Die Furchen waren nicht tief genug um die Somata der Neurone vollständig zu überragen. Oberhalb der Stegplateaus konnten sich die Somata in allen Raumebenen vollständig ausdehnen und nahmen dann ihre physiologische Form ein. Die Somata entgingen somit dem räumlichen Stress durch die begrenzenden Furchenwände und lagen den beiden angrenzenden Stegplateaus in der Regel seitlich auf. Die Form der Zellkerne blieb in den meisten Fällen unbeeinflusst und entsprach annähernd der Form, wie sie auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen beobachtet wurde (Abbildung 12).

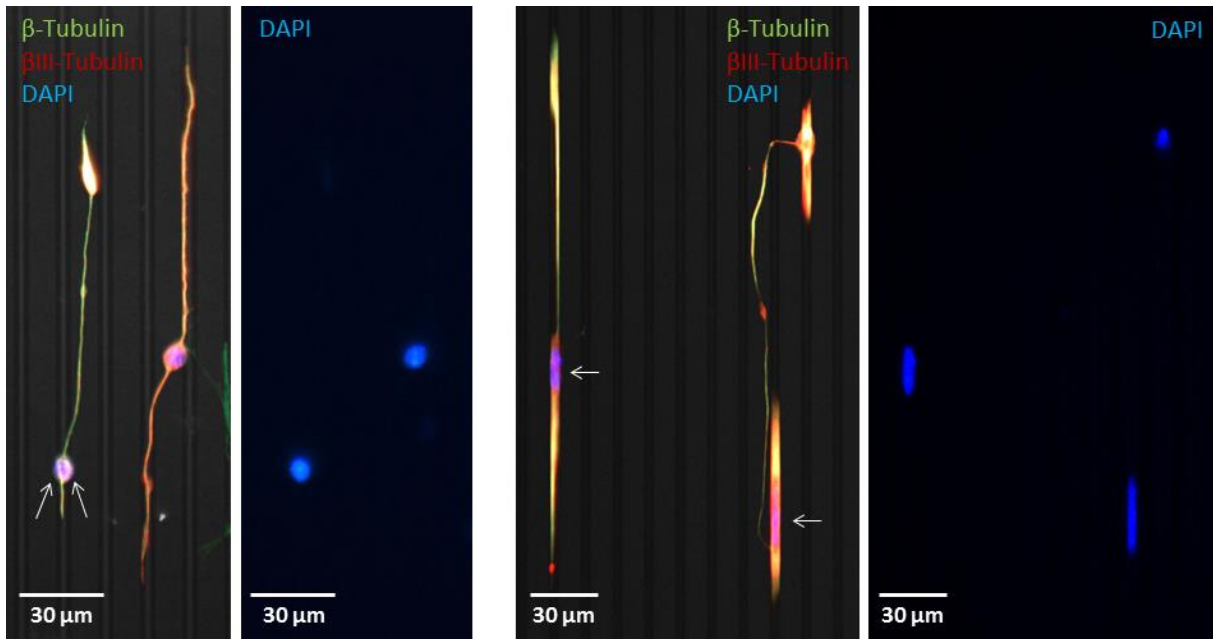


Abbildung 12: Einfluss der Furchentiefe auf die Form der Zellkerne

Dargestellt sind jeweils zwei typische Neurone, wie sie auf einfach gefurchten Oberflächen mit einer Furchentiefe von 3 µm (links) bzw. von 7 µm (rechts) auswuchsen. Die Form der Zellkerne ist jeweils nebenstehend dargestellt.

Neurone, deren Somata in einer 3 µm tiefen Furche lagen (links), konnten sich oberhalb des Stegplateaus in allen Raumebenen ausdehnen und lagen somit den angrenzenden Stegplateaus seitlich auf (weiße Pfeile). Diese Neurone wiesen in der Regel einen rund konfigurierten Zellkern auf, wie er auch auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen oder den Stegplateaus (rechtes Neuron linke Abbildung) beobachtet wurde. Neurone, deren Somata in einer 7 µm tiefen Furche lagen (rechts), zeigten dagegen charakteristischerweise einen stabförmig konfigurierten Zellkern (weiße Pfeile). Die Somata lagen unterhalb des Niveaus der Stege und konnten sich durch die angrenzenden Furchenwände nur der Länge nach ausdehnen.

Um das Ausmaß der Verformung zu quantifizieren, wurde das Längen-Breiten-Verhältnis der Zellkerne ermittelt. Auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen lag der Median der ermittelten Quotienten dem Wert 1 am nächsten. Somit zeigten diese Neurone im Vergleich zu den einfach gefurchten Oberflächen am ehesten einen rund konfigurierten Zellkern. Während der Median der Quotienten, der auf den 3 µm tiefen Furchen ermittelt wurde, sich nur geringfügig vom Median der Kontrolloberfläche unterschied, wich der Median der Quotienten, der auf den 7 µm tiefen Furchen ermittelt wurde, erheblich von der zugehörigen Kontrollgruppe ab. Die Zellkerne der Neurone, die in den 7 µm tiefen Furchen lagen, zeigten somit die stärkste Verformung (Tabelle 4 und Abbildung 13).

	Anzahl	Median	25%-Perzentile	75%-Perzentile
Furchen 3 µm Äztiefe	277	1,5	1,22	1,79
Kontrolle 3 µm Äztiefe	429	1,24	1,1	1,40
Furchen 7 µm Äztiefe	142	3,09	1,45	4,15
Kontrolle 7 µm Äztiefe	394	1,27	1,11	1,49

Tabelle 4: Medianwerte des Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne auf einfach gefurchten Oberflächen

Dargestellt sind die Medianwerte des Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne auf den einfach gefurchten Oberflächen und den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen. Der Unterschied zwischen den Medianwerten der einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-ANOVA).

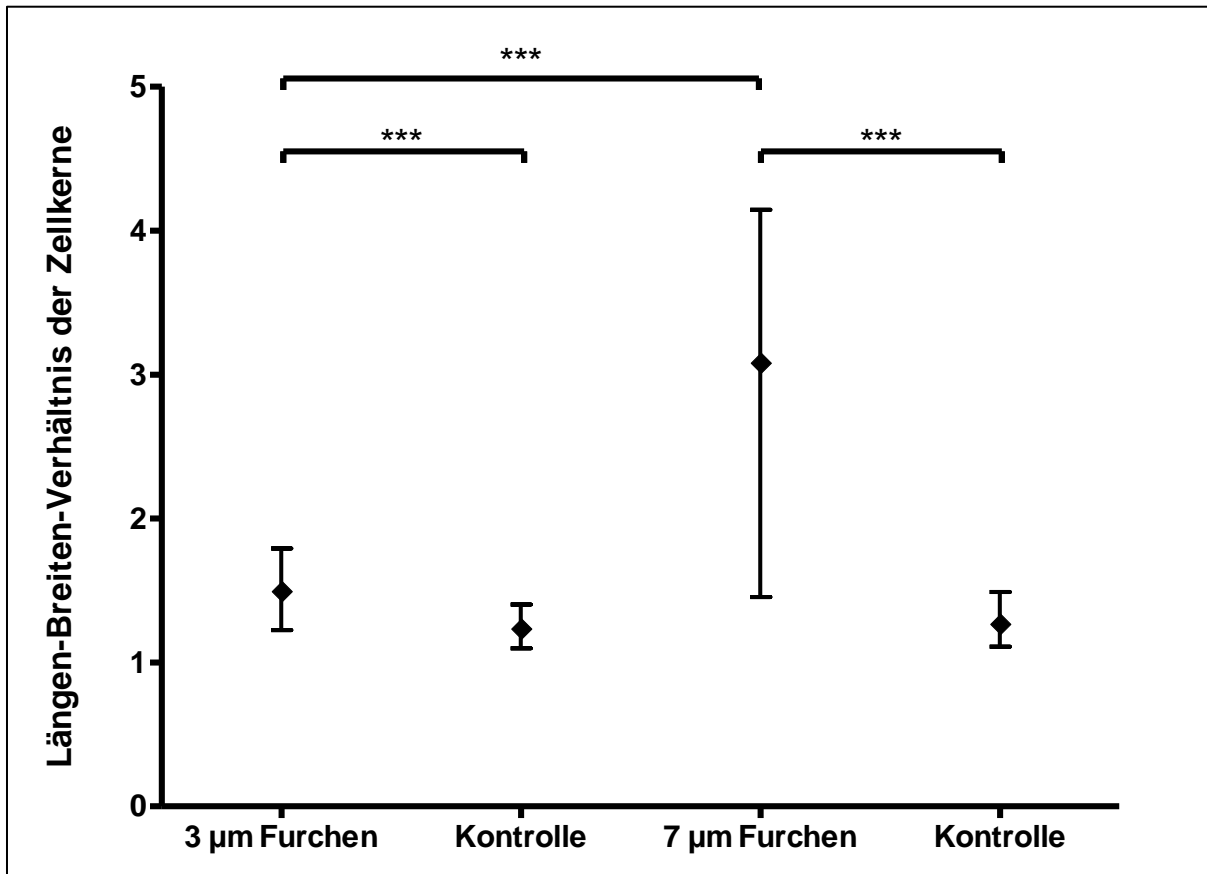


Abbildung 13: Längen-Breiten-Verhältnis der Zellkerne auf einfach gefurchten Oberflächen

Dargestellt sind die Medianwerte (Raute) des Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne auf den einfach gefurchten Oberflächen sowie den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen. Die 25%- und 75%-Perzentile werden durch senkrechte Linien mit kurzer waagrechter Begrenzungslinie dargestellt. Der Unterschied zwischen den Medianwerten der

einzelnen Gruppen ist größer als es durch Zufall zu erwarten wäre ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis-ANOVA). Der paarweise Vergleich der Gruppen erfolgte durch den Post-hoc-Test nach Dunn ($***p < 0,001$).

3.1.5 Neuronale Brückenbildung auf doppelt gefurchten Oberflächen

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Interaktion zwischen Wachstumskegel und der Oberflächenstruktur wurden an doppelt gefurchten Siliziumoberflächen mit eingetätzten Quadern durchgeführt. Diese übten einen wesentlich höheren vertikalen Wachstumsstress auf die Neurone aus, als dies bei den einfach gefurchten Oberflächen der Fall war.

Die Neurone waren während des Aussprossens mit etlichen Niveauwechseln zwischen Quaderplateau und Furchental konfrontiert. Bei einem Teil der Neurone konnte hierbei die Ausbildung von neuronalen Brücken beobachtet werden. Der Neurit löste sich von der Oberfläche des Wafers ab und spannte sich zwischen zwei Fixpunkten, die auf der Oberfläche des Wafers verankert waren, auf. Die neuronale Brücke entsprach der kürzesten möglichen Strecke zwischen den zwei Fixpunkten. Die Brücken traten dabei in zwei unterschiedlichen Ausprägungen auf; als schräg verlaufende neuronale Brücke zwischen dem Plateau eines Quaders und dem Boden eines Furchentales und als horizontal verlaufende Brücken zwischen zwei benachbarten Quaderplateaus (Abbildung 14 und Abbildung 15).

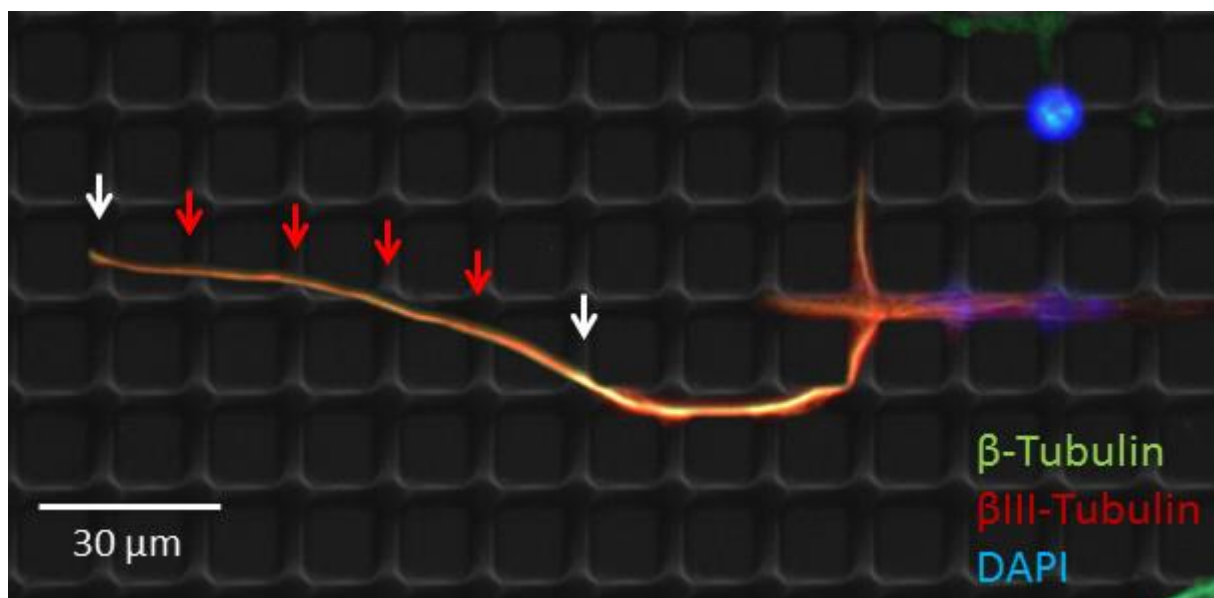


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der neuronalen Brückenbildung auf doppelt gefurchten Oberflächen

Dargestellt ist ein fluoreszenzmikroskopisch vorselektiertes Neuron auf den doppelt gefurchten Oberflächen. Die beobachteten neuronalen Brücken traten in zwei unterschiedlichen Ausprägungen auf; als schräg verlaufende Brücken zwischen Quaderplateau und Furchental

(weiße Pfeile) und als horizontal verlaufende Brücken zwischen zwei benachbarten Quaderplateaus (rote Pfeile).

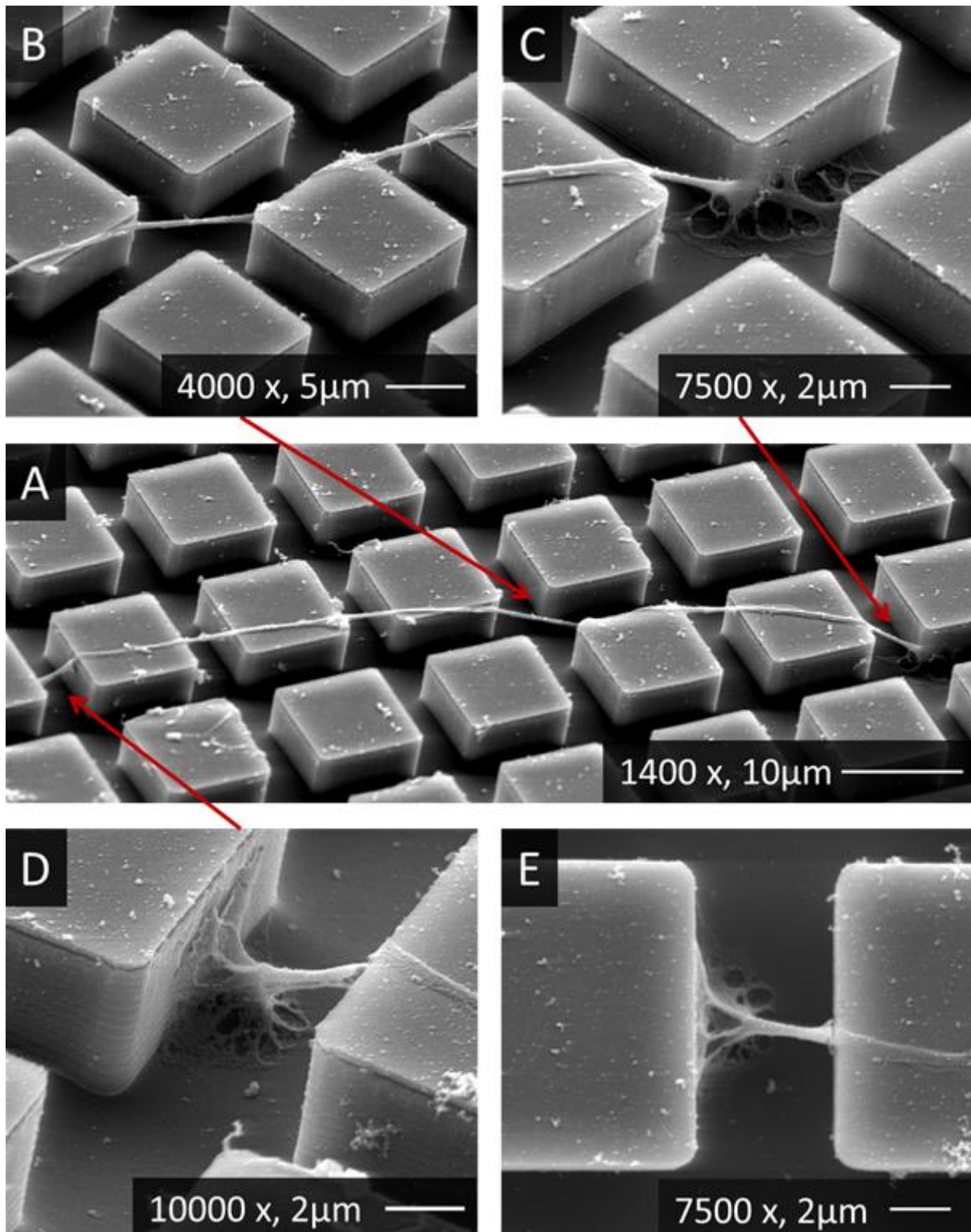


Abbildung 15: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der neuronalen Brückenbildung auf doppelt gefurchten Siliziumoberflächen

Dargestellt ist das vorselektierte Neuron aus Abbildung 14 nach dem Niveauwechsel vom Furchenboden zur Ebene der Quaderplateaus (rechter weißer Pfeil in Abbildung 14). Kom-

pletter Verlauf des Neuriten (Bild A). Horizontale Brücke zwischen zwei benachbarten Quaderplateaus (Bild B). Schräg verlaufende neuronale Brücke zwischen Furchental und Quaderplateau (Bild C). Vorübergehend schräg verlaufende neuronale Brücke zwischen Quaderplateau und Furchental während der Ausbildung einer horizontalen Brücke (Bild D und E).

Die einzelnen Wachstumsphasen, die zur vollständigen Ausbildung einer Brücke durchlaufen werden mussten, konnten durch die rasterelektronenmikroskopisch untersuchten Neurone rekonstruiert werden und sind in Abbildung 16 dargestellt.

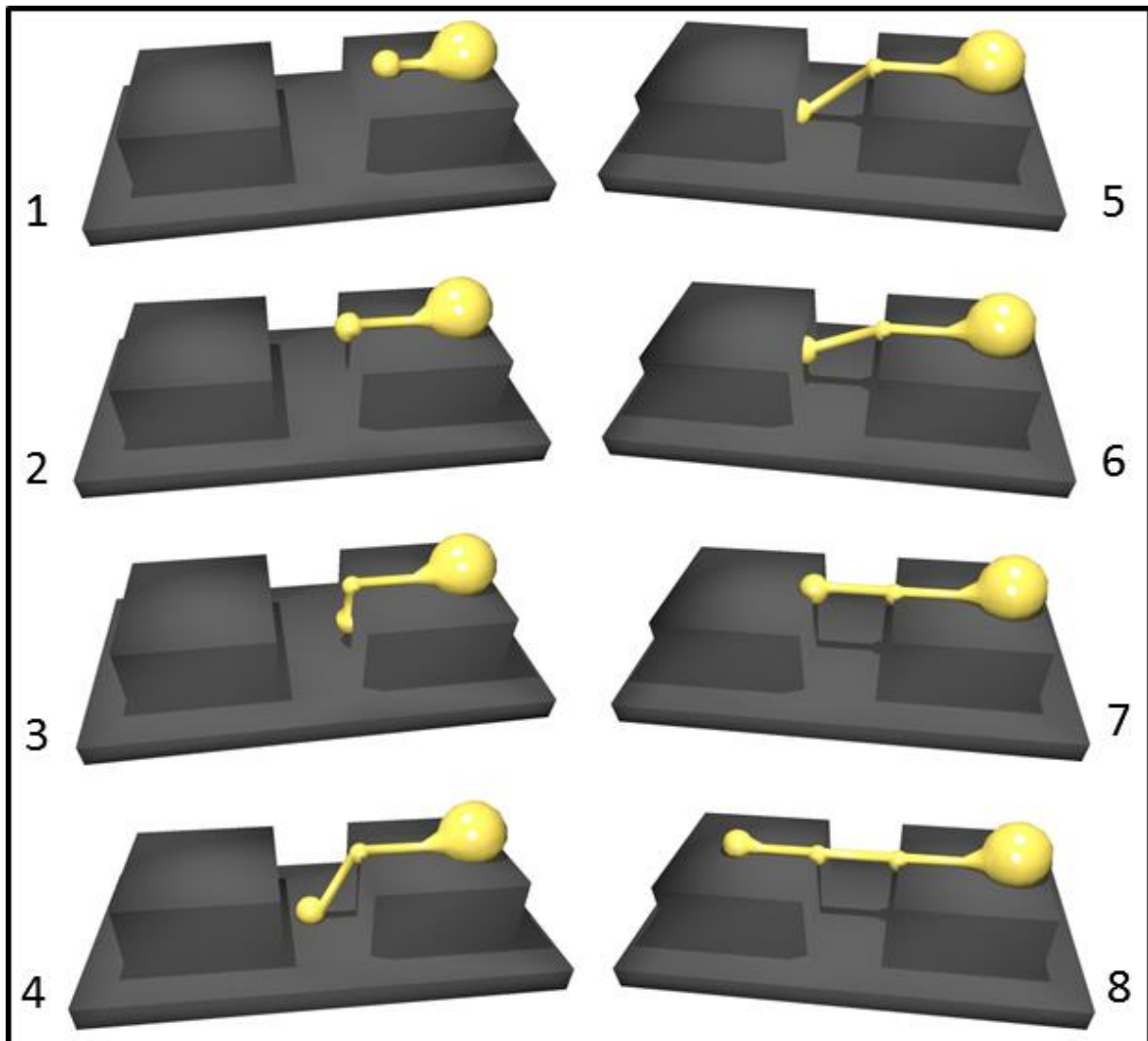


Abbildung 16: Phasen der neuronalen Brückenbildung zwischen benachbarten Quaderplateaus

Dargestellt sind die beobachteten Phasen, die ein Neuron durchlaufen musste, um eine horizontale Brücke zwischen zwei benachbarten Quadern auszubilden.

Um die Dynamik der neuronalen Brückenbildung zu untersuchen, wurden zusätzlich Echtzeitaufnahmen von lebenden Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass Neu-

rone keineswegs dauerhafte Kontakte mit der Waferoberfläche ausbildeten, sondern dass sie ihre Position während des Auswachsens stetig verändern konnten. Einmal ausgebildete Brücken waren somit auch nicht statisch mit der Waferoberfläche verbunden, sondern konnten durch Horizontalbewegungen des Neurons auf der Waferoberfläche dynamisch verlagert werden. Hierbei wurden die Verankerungspunkte des Neurons mit der Waferoberfläche schrittweise verschoben, bis schließlich eine neue Position erreicht war. Auf diese Weise konnten neuronale Brücken miteinander verschmelzen oder bereits bestehende Brücken wieder in mehrere Einzelbrücken aufgeteilt werden (Abbildung 17).

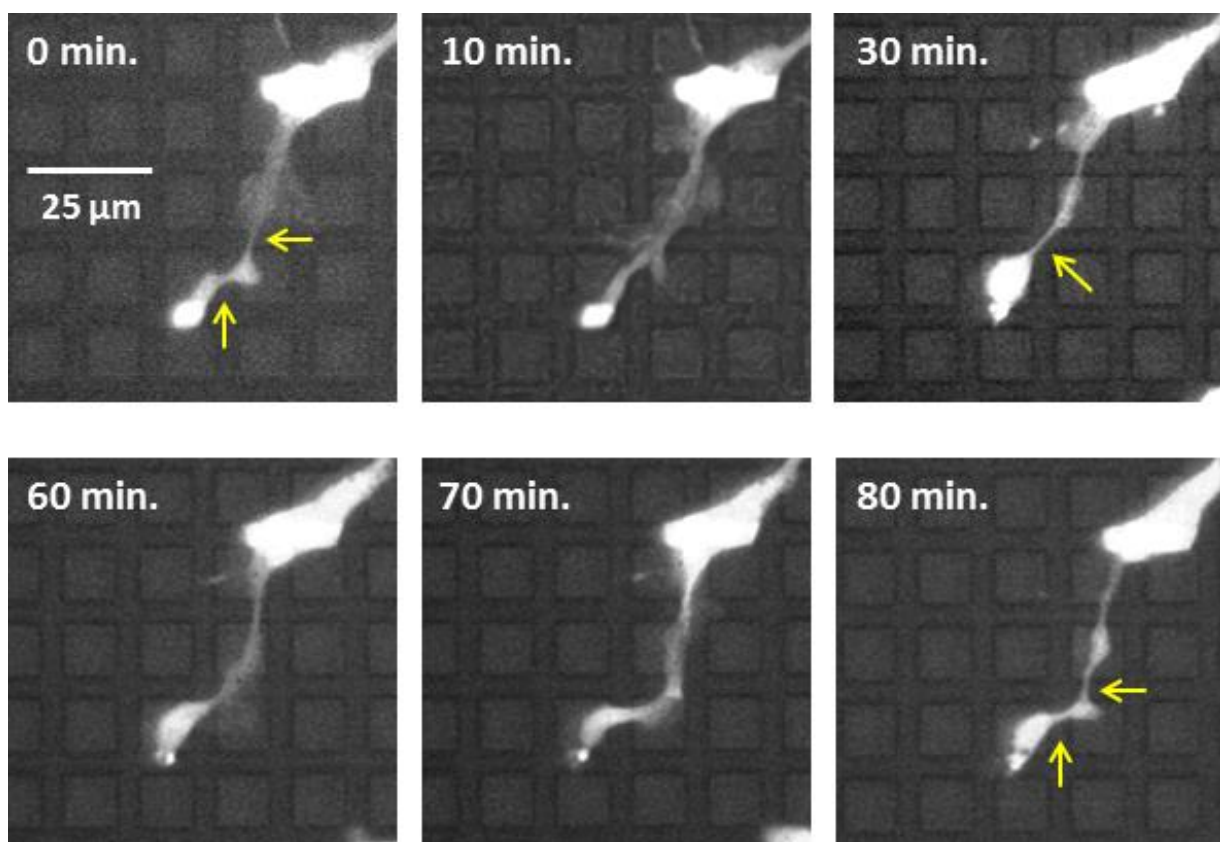


Abbildung 17: Dynamik der Brückenbildung zwischen benachbarten Quadern

Gezeigt ist eine eGFP exprimierende neuronale Vorläuferzelle beim Auswachsen über die Waferoberfläche. Zunächst bestehen zwei neuronale Brücken, die sich zwischen drei Quadern aufspannen (gelbe Pfeile bei 0 min.). Durch die Verlagerung des Wachstumskegels verschmelzen die beiden Brücken schließlich miteinander zu einer gemeinsamen Brücke zwischen zwei sich diagonal gegenüberliegenden Quadern (gelber Pfeil bei 30 min.). Ab Minute 60 vollzieht das Neuron den umgekehrten Vorgang und verlagert den Neuriten wieder in seine Ausgangsposition zurück, sodass die diagonal verlaufende Brücke wieder in zwei einzelne Brücken aufgeteilt wird (gelbe Pfeile bei 70 min.).

3.2 Siliziumoberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

3.2.1 Einfluss der Oberflächenstrukturierung auf die Orientierung der Neuriten

Um die Interaktion zwischen Wachstumskegel und Elektrodenkontakten zu untersuchen, wurden als Modellstruktur Siliziumwafer mit Zylindern auf deren Oberfläche hergestellt. Analog zu den durchgeführten Untersuchungen an Neuronen auf gefurchten Oberflächen wurden zunächst die Orientierungswinkel der Neurite bestimmt, um den Einfluss der Oberflächenstrukturierung auf die Neuritenorientierung zu untersuchen. Dabei wurde genauso verfahren, wie es für die unstrukturierten Kontrollen beschrieben wurde.

Die Medianwerte der Orientierungswinkel wichen sowohl auf den strukturierten Oberflächen als auch auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen nur geringfügig von dem Erwartungswert von 45 Grad bei angenommener zufälliger Verteilung ab. Von einer zufälligen Verteilung der gemessenen Orientierungswinkel aller untersuchten Gruppen ist somit auszugehen (Tabelle 5 und Abbildung 18).

	Anzahl	Median	25%- Perzentile	75%- Perzentile	Erwarteter Median bei zufälliger Verteilung	Signifikanz- werte
Zylinder 3 μm Äztiefe	396	45	20	70	45	$p=0,4522$
Kontrolle 3 μm Äztiefe	429	43	18	67	45	$p=0,0965$
Zylinder 7 μm Äztiefe	244	44	21,5	68	45	$p=0,1682$
Kontrolle 7 μm Äztiefe	394	44	19	66	45	$p=0,0477$

Tabelle 5: Medianwerte der Orientierungswinkel auf Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Dargestellt sind die Medianwerte der gemessenen Orientierungswinkel auf den Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten und den zugehörigen unstrukturierten Kontrollen in Grad. Das Abweichen der ermittelten Medianwerte von dem Erwartungswert von 45 Grad bei zufälliger Verteilung wurde durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für eine Stichprobe ermittelt.

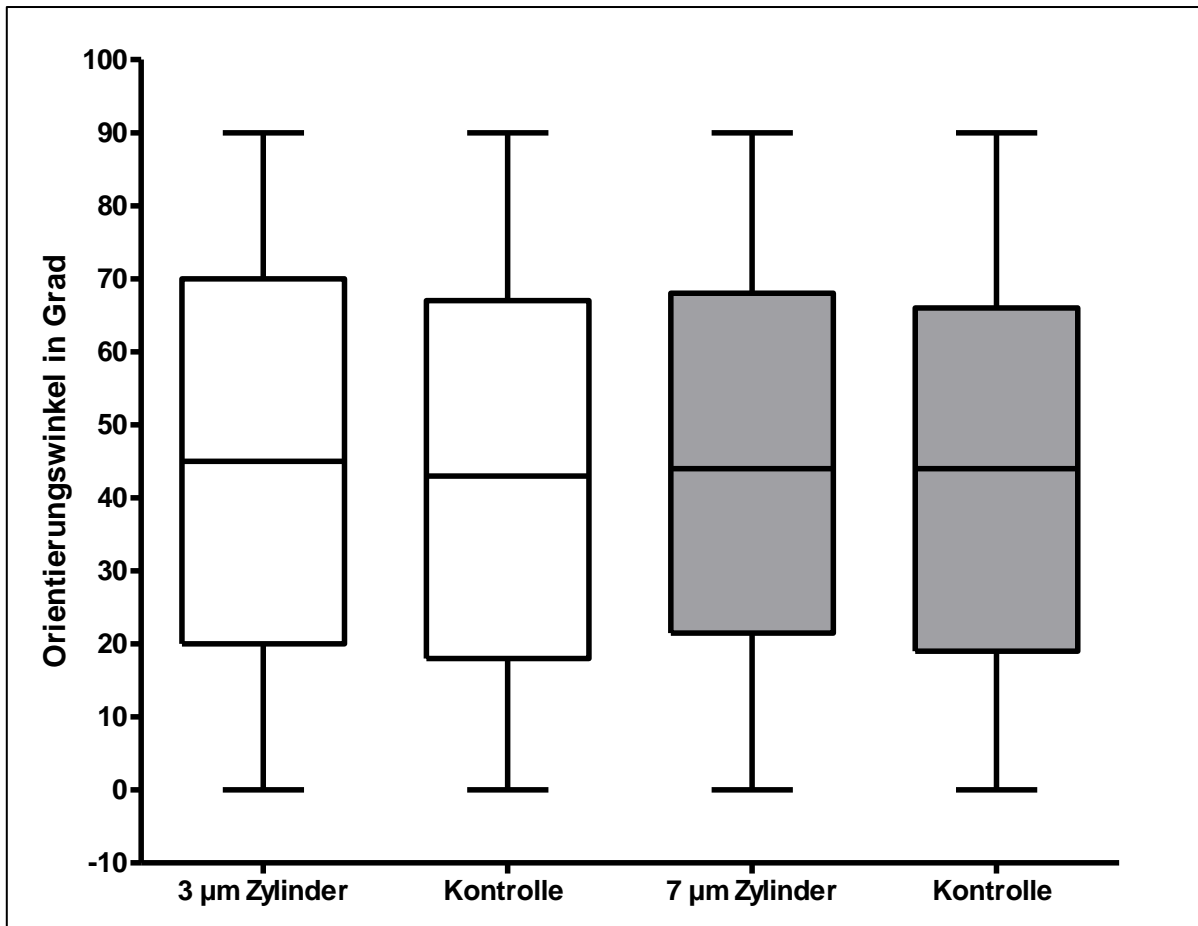


Abbildung 18: Orientierungswinkel der Neurite auf Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Dargestellt sind die Orientierungswinkel der Neurite auf den Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten sowie den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen als Boxplot. Die waagrechten Begrenzungslinien jeder Box markieren die 25%- bzw. 75%-Perzentile. Die waagrechte Linie in jeder Box markiert den Median. Die senkrechten Linien mit kurzer waagrechter Begrenzungslinie stellen Maximal- und Minimalwert dar. Durch Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-ANOVA) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Medianwerten der einzelnen Gruppen ermittelt werden ($p=1,218$).

3.2.2 Einfluss der Zylinderhöhe auf die Neuritenlänge

Um den Einfluss der Zylinderhöhe auf die Neuritenlänge zu untersuchen, wurden die Neuritenlängen der Neurone auf den strukturierten Oberflächen mit denen auf den unstrukturierten Kontrolloberflächen verglichen. Die Medianwerte der einzelnen Gruppen wichen nur geringfügig voneinander ab (Tabelle 6 und Abbildung 19).

	Anzahl	Median	25%-Perzentile	75%-Perzentile
Zylinder 3 μm Äztiefe	396	114	77	166
Kontrolle 3 μm Äztiefe	429	120	76	185
Zylinder 7 μm Äztiefe	244	118	76	158
Kontrolle 7 μm Äztiefe	394	117	71	182,5

Tabelle 6: Medianwerte der Neuritenlängen auf Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Dargestellt sind die Medianwerte der Neuritenlängen auf den Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten und den zugehörigen unstrukturierten Kontrolloberflächen in μm . Durch Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-ANOVA) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Medianwerten der Gruppen ermittelt werden ($p=0,649$).

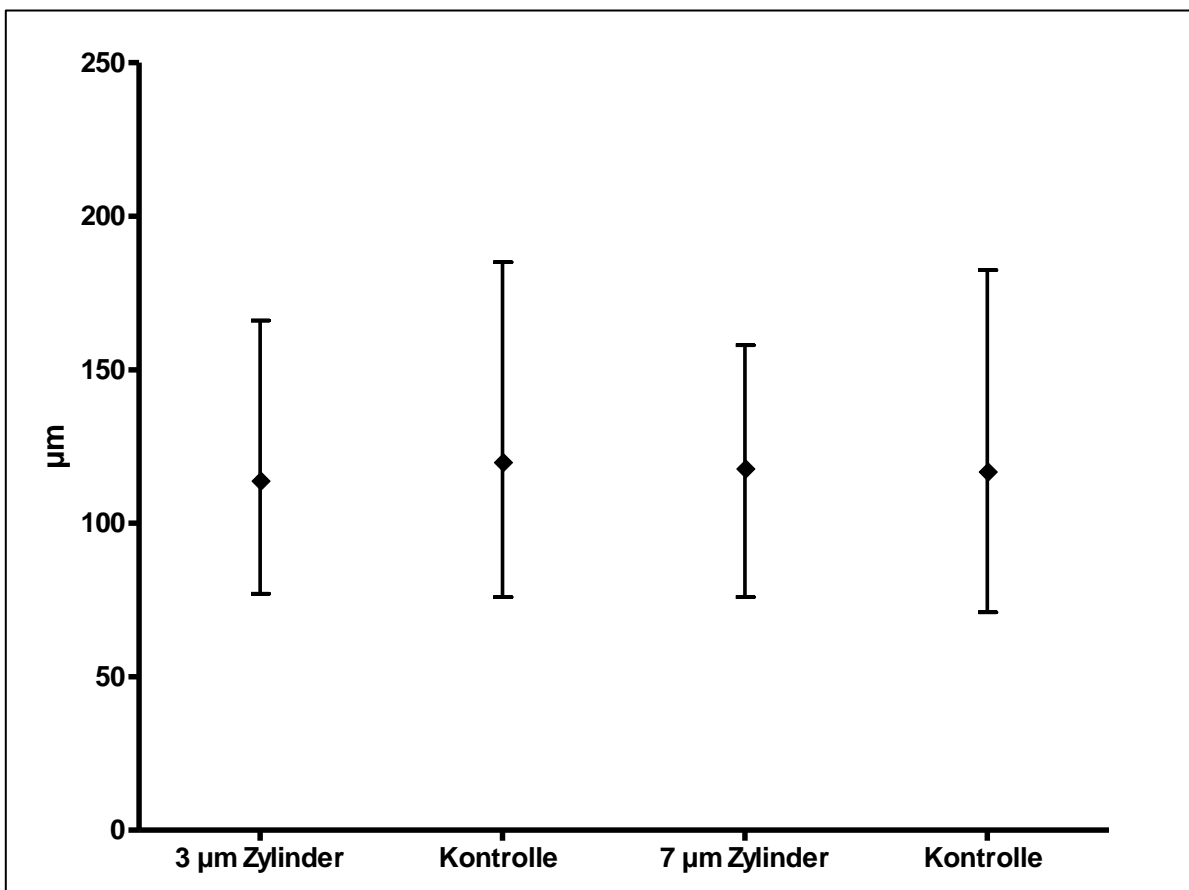


Abbildung 19: Neuritenlängen auf Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Dargestellt sind die Medianwerte (Raute) der Neuritenlängen auf den Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten sowie den zugehörigen unstrukturierten Kontroll-

oberflächen. Die 25%- und 75%-Perzentile werden durch senkrechte Linien mit kurzer waagrechtlicher Begrenzungslinie dargestellt. Durch Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-ANOVA) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Medianwerten der Gruppen ermittelt werden ($p=0,649$).

3.2.3 Neuronale Interaktion mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Analog zu den doppelt gefurchten Oberflächen wurde die Interaktion der Neurite mit den Zylindern ebenfalls sowohl fluoreszenz- als auch rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Ein typisches Wachstumsverhalten, das ausschließlich auf Oberflächen mit eingezätzten Zylindern beobachtet werden konnte, waren plötzliche Richtungswechsel im Verlauf der Neurite. Durch das Anwachsen des Wachstumskegels an die Mantelfläche eines Zylinders konnte dieser kreisförmig dem Verlauf der Mantelfläche folgen. Durch erneutes Ablösen von der Mantelfläche setzte das Neuron häufig sein Wachstum dann in geänderter Richtung auf dem Waferboden fort. Der Verlauf des Neuriten zwischen den als Fixpunkte dienenden Zylindern entsprach dabei häufig der kürzesten möglichen Strecke zwischen diesen. Dies führte zu einem zick-zackförmigen Verlauf des Neuriten (Abbildung 20).

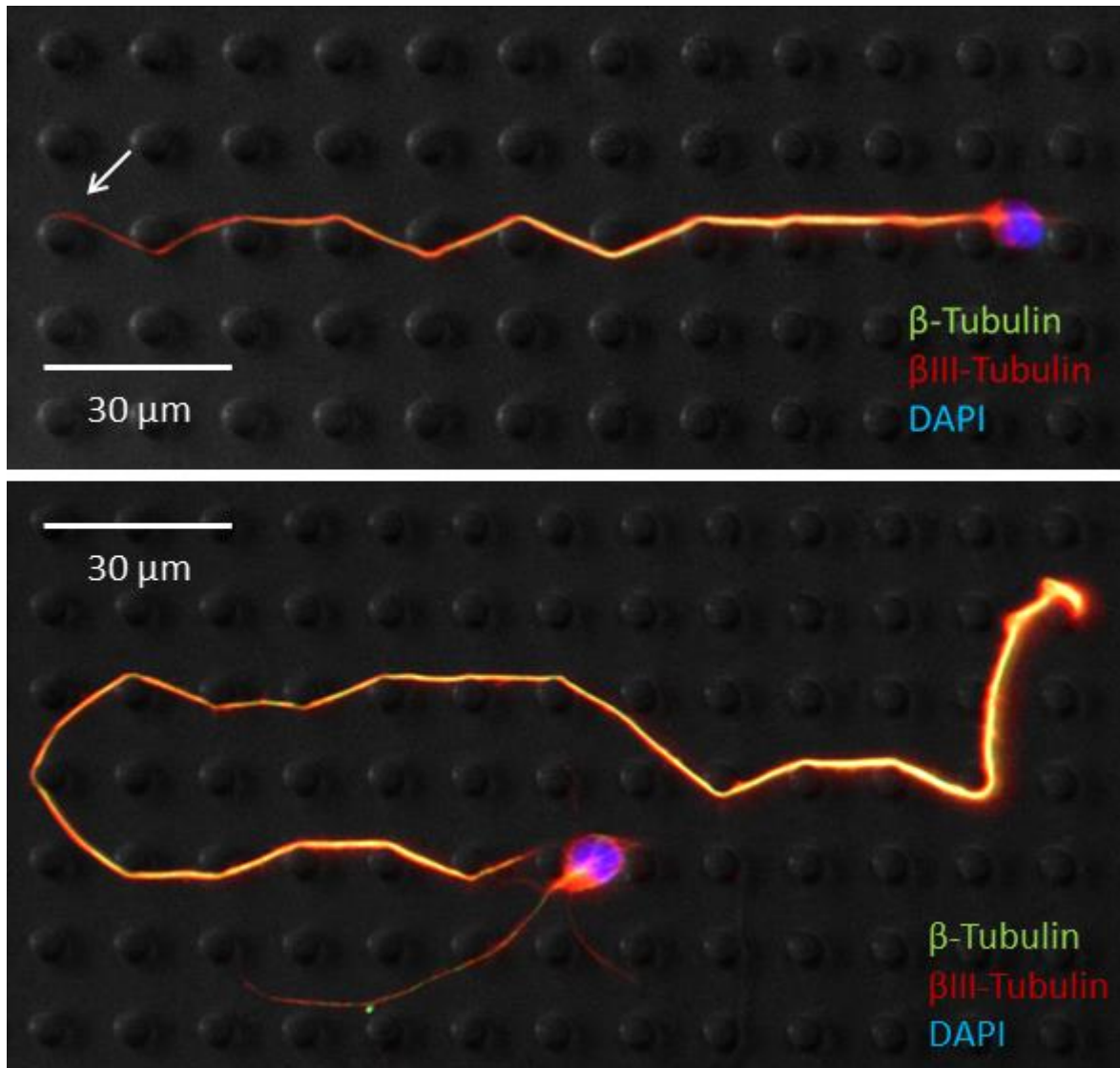


Abbildung 20: Neuronale Interaktion mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Dargestellt sind zwei Neurone, deren Neurite einen zick-zack-förmigen Verlauf aufweisen. Die Richtungswechsel wurden hierbei durch die Zylinder induziert. Durch das Anwachsen des Wachstumskegels an die Mantelfläche der Zylinder konnte dieser kreisförmig dem Verlauf der Mantelfläche folgen (weißer Pfeil). Durch erneutes Ablösen von der Mantelfläche setzte das Neuron häufig sein Wachstum dann in geänderter Richtung fort.

In zusätzlich durchgeführten Echtzeituntersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Interaktion der Neurone mit den Zylindern reversibel war. Das neuronale Wachstum entsprach wie auf den doppelt gefurchten Oberflächen einem dynamischen Prozess, der stetigen Veränderungen unterworfen war (Abbildung 21).

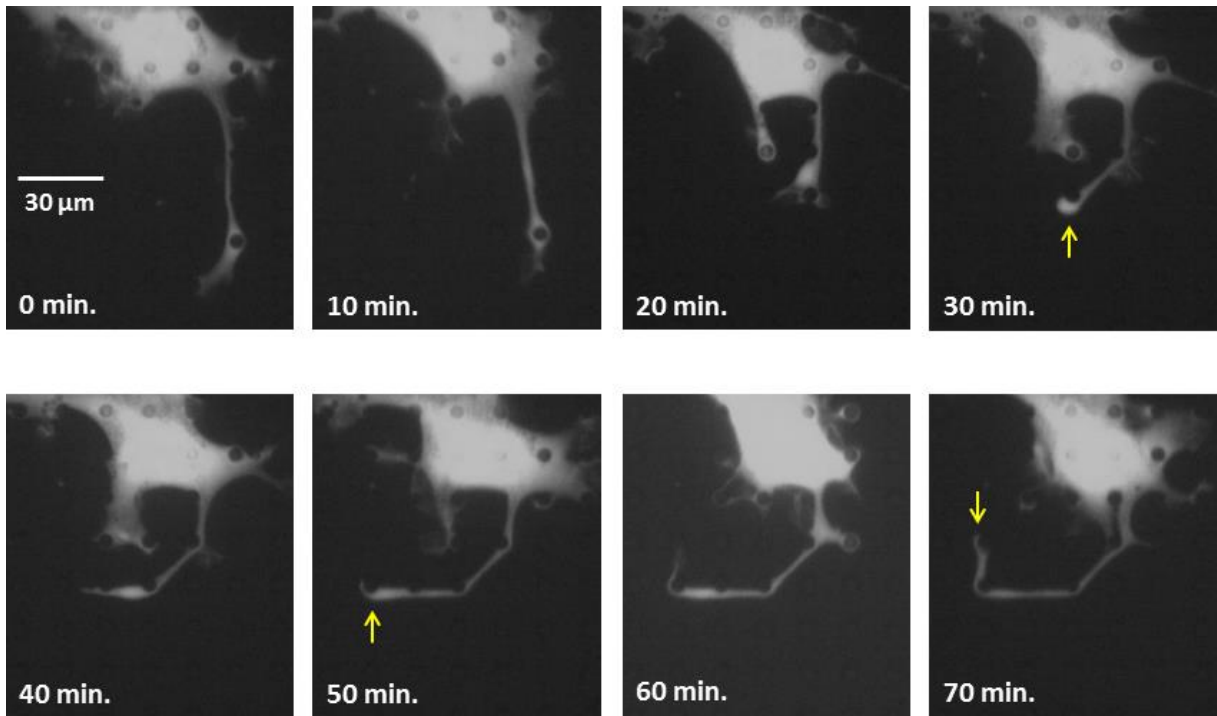


Abbildung 21: Dynamik der neuronalen Interaktion mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Gezeigt ist eine eGFP exprimierende neuronale Vorläuferzelle beim Auswachsen auf der Waferoberfläche. Das bei 0 min. dargestellte Neuron bildet über einen Zeitraum von 20 min. sein Axon schrittweise zurück. Ab Minute 30 sprosst der Wachstumskegel erneut in geänderter Richtung aus und vollzieht einen Richtungswechsel an einem Zylinder (gelber Pfeil). Einen weiteren Richtungswechsel vollzieht der Wachstumskegel in Minute 50 (gelber Pfeil). Der gelbe Pfeil in Minute 70 markiert das entgültige Anwachsen des Wachstumskegels an einem Zylinder.

Rasterelektronenmikroskopisch konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Wachstumskegel an der Mantelfläche auch vertikal emporwachsen konnte, sodass kein Kontakt mehr zum Waferboden bestand (Abbildung 22).

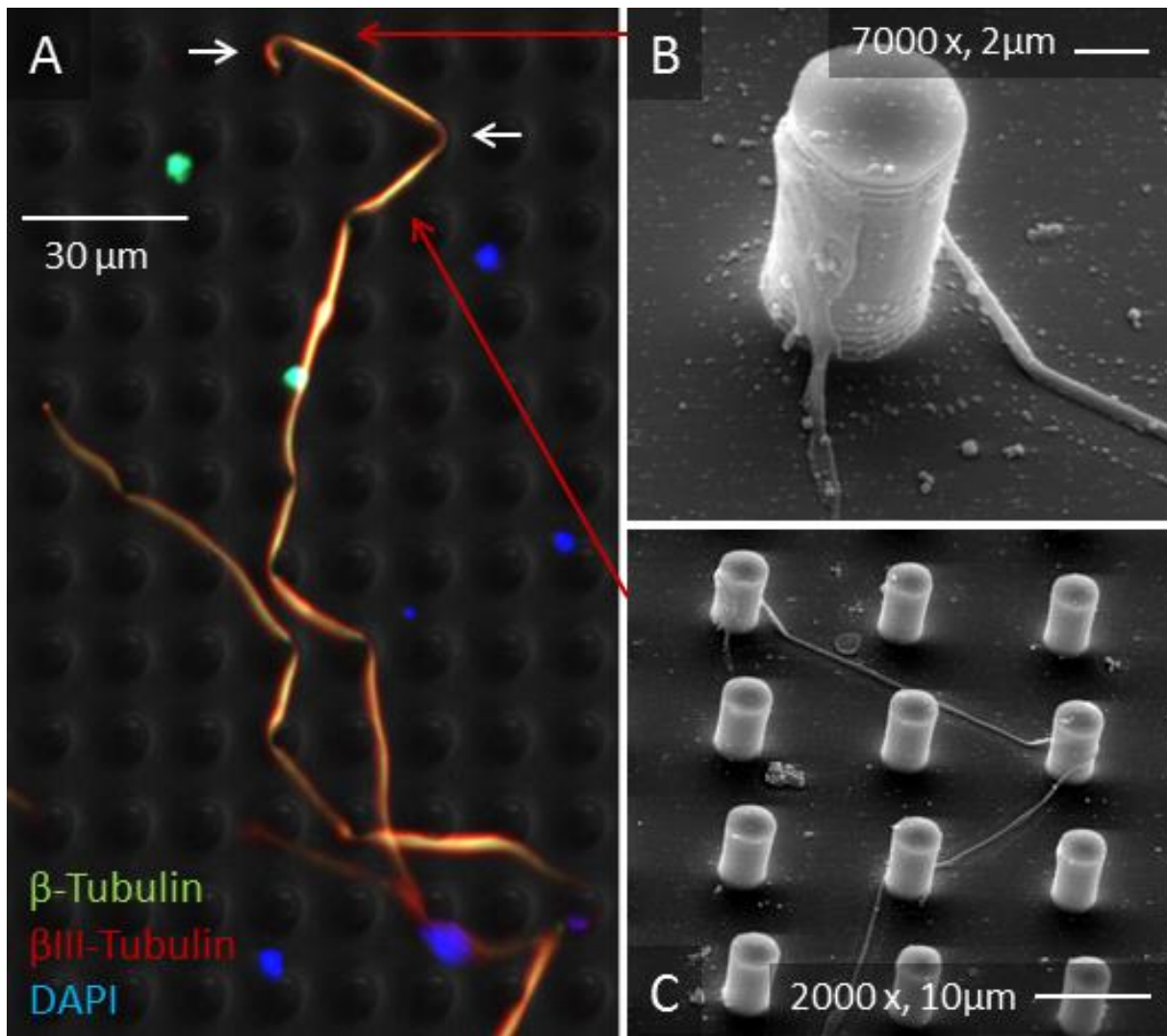


Abbildung 22: Vertikales Wachstum des Wachstumskegels an der Mantelfläche der Zylinder

Dargestellt ist ein fluoreszenzmikroskopisch vorselektiertes Neuron, dessen Neurit an der Mantelfläche zweier Zylinder emporgewachsen ist (weiße Pfeile in Bild A). In Bild B und Bild C ist die Interaktion zwischen Neurit und Zylindermantel zusätzlich rasterelektronenmikroskopisch dargestellt. In Bild B ist gut zu erkennen, dass der Wachstumskegel an der Mantelfläche emporgewachsen und kreisförmig deren Verlauf gefolgt ist. Offenbar nimmt der Wachstumskegel gerade wieder Kontakt zum Waferboden auf um sein Wachstum dort fortzusetzen.

Durch das vertikale Wachstum konnten sich zwischen zwei benachbarten Zylindern ebenfalls neuronale Brücken ausbilden. Dabei traten die Brücken grundsätzlich in denselben Ausprägungen auf, wie sie bereits bei den doppelt gefurchten Oberflächen beobachtet wurden; als schräg verlaufende Brücken zwischen Waferboden und Zylinder sowie als horizontale Brücken zwischen zwei benachbarten Zylindern (Abbildung 23 und Abbildung 24).

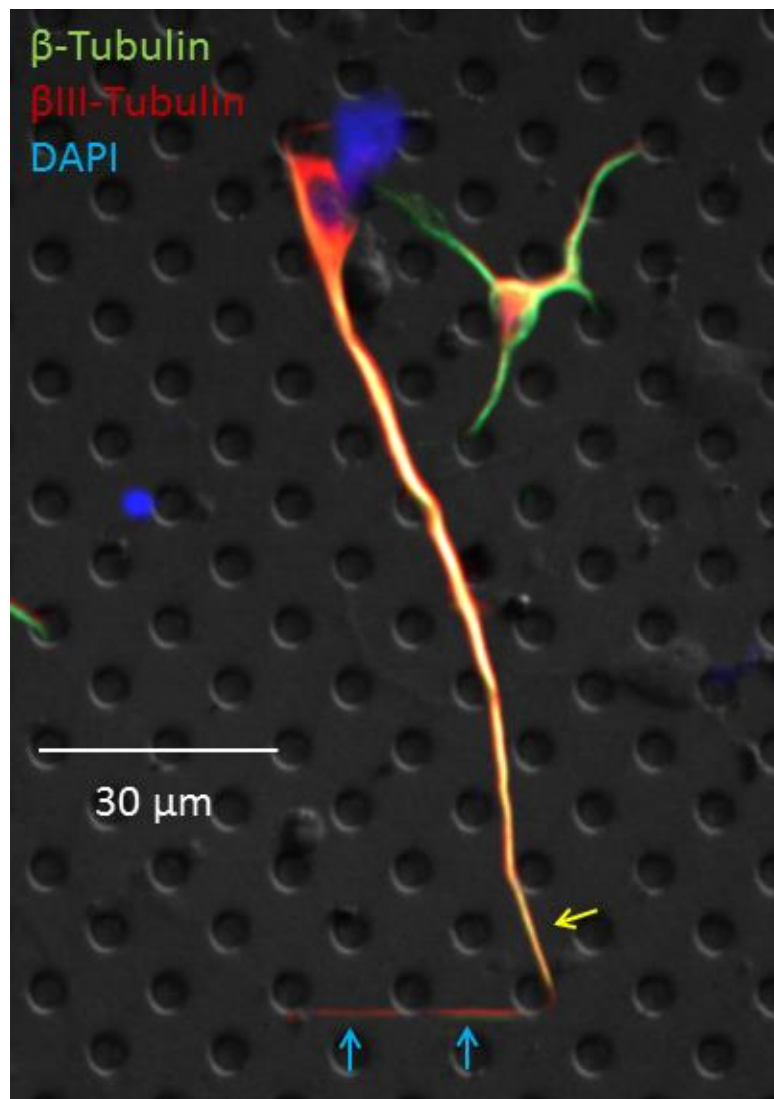


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der neuronale Brückenbildung auf Siliziumoberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Dargestellt ist ein fluoreszenzmikroskopisch vorselektiertes Neuron auf den Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten. Die beobachteten neuronalen Brücken traten wie bei den doppelt gefurchten Oberflächen in zwei unterschiedlichen Ausprägungen auf; als schräg verlaufende Brücke zwischen Waferboden und Zylinder (gelber Pfeil) und als horizontal verlaufende Brücke zwischen benachbarten Zylindern (blaue Pfeile).

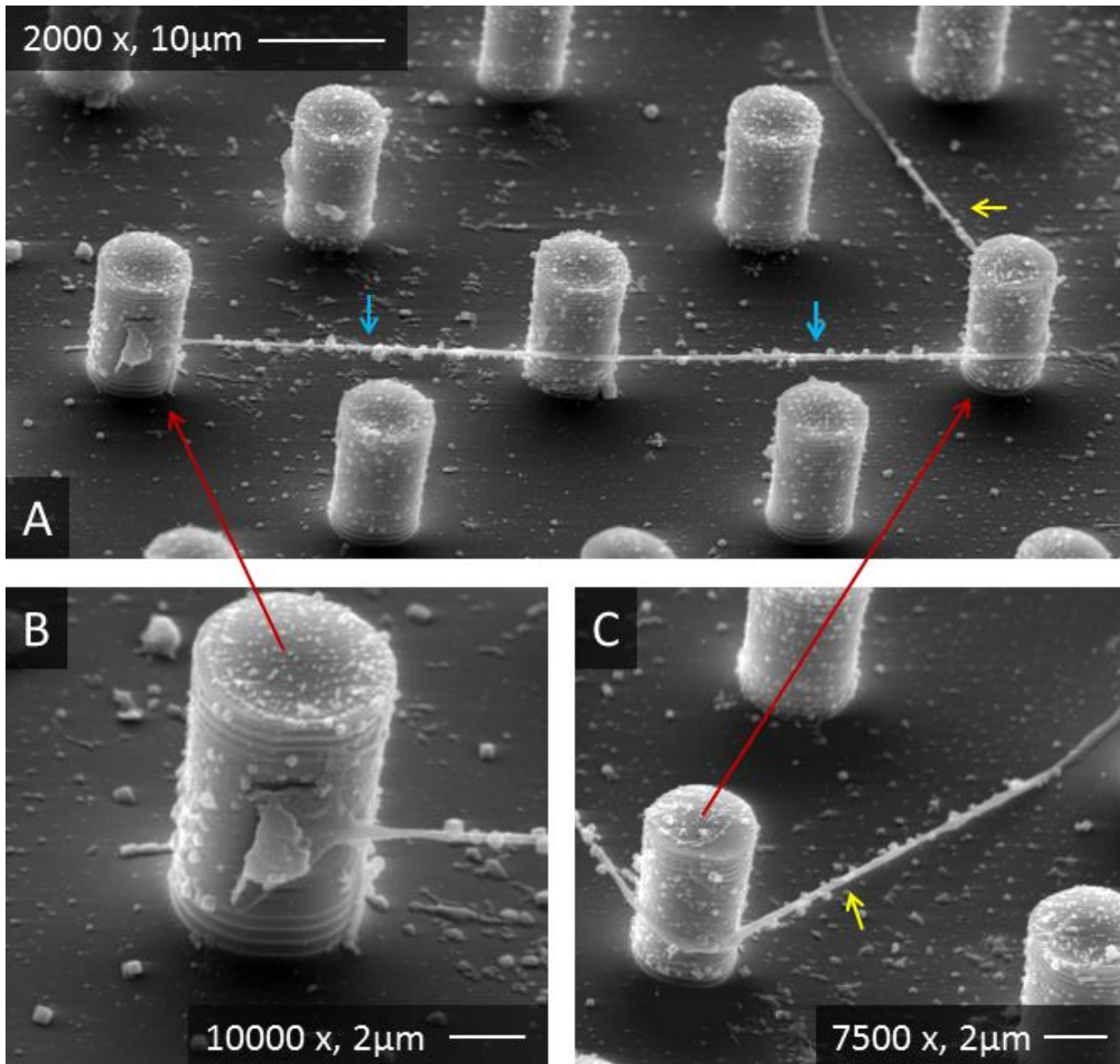


Abbildung 24: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der neuronalen Brückenbildung auf Siliziumoberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten

Dargestellt ist das fluoreszenzmikroskopisch vorselektierte Neuron aus Abbildung 23. Bild A: schräg verlaufende neuronale Brücke zwischen Waferboden und Zylindermantel (gelber Pfeil) und horizontal verlaufende neuronale Brücken zwischen benachbarten Zylindern (blaue Pfeile). Bild B: anhaftender Wachstumskegel an einem Zylindermantel. Bild C: die schräg verlaufende Brücke (gelber Pfeil) aus Bild A aus anderer Perspektive.

Im Unterschied zu den neuronalen Brücken auf den doppelt gefurchten Siliziumoberflächen, bei denen die quadratischen Oberseiten der Quader als Fixpunkte zur Verankerung dienten, waren die Brücken zwischen den Zylindern vor allem an deren Mantelflächen verankert. Ein Kontakt des Wachstumskegels zur Oberseite der Zylinder konnte nur vereinzelt beobachtet werden und stellte ein sehr seltenes Ereignis

dar. Generell vermieden es die Neurone Kontakt mit der Zylinderoberseite aufzunehmen. Die Oberseite der Zylinder war mit einer Oberfläche von $20 \mu\text{m}^2$ nicht nur wesentlich kleiner als die Oberseite der Quader ($100 \mu\text{m}^2$), sondern häufig auch kleiner als die Fläche der Wachstumskegel der beobachteten Neurone (Abbildung 25).

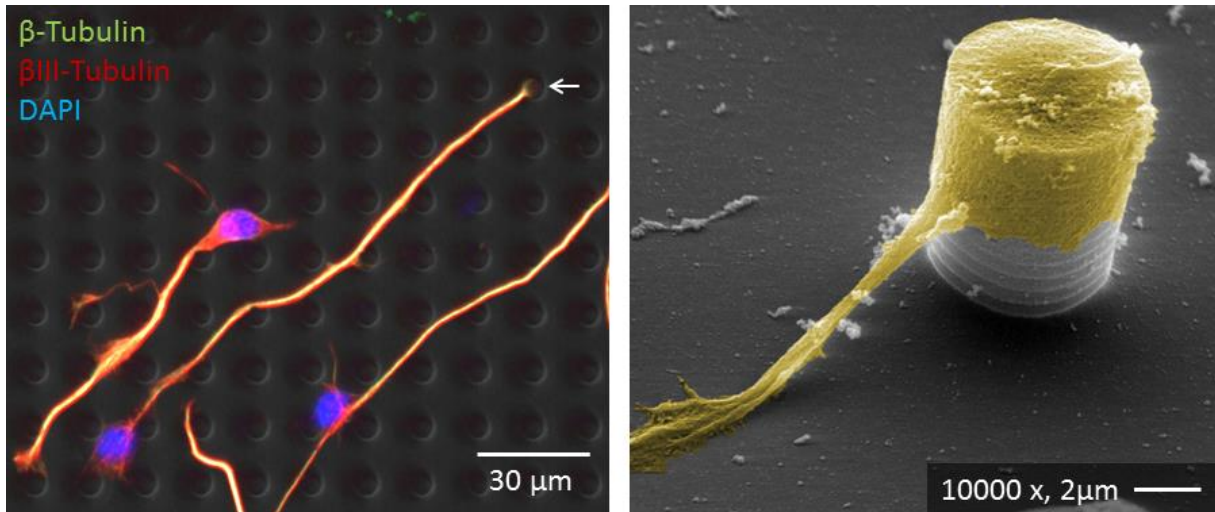


Abbildung 25: Kontakt eines Wachstumskegels mit der Oberseite eines Zylinders

Die Abbildung zeigt eine schräg verlaufende neuronale Brücke zwischen dem Waferboden und einem Zylinder. Neben der Mantelfläche, die typischerweise als Verankerungspunkt für die Ausbildung einer neuronalen Brücke diente, nutzte der Wachstumskegel als Kontaktpunkt ebenfalls die Oberseite des Zylinders. Ein derartiges Anwachsen des Wachstumskegels an der Zylinderoberseite konnte nur sehr selten beobachtet werden.

Die beobachteten Phasen, die während der Ausbildung einer neuronalen Brücke durchlaufen werden mussten, unterschieden sich somit auch hinsichtlich der neuronalen Verankerungspunkte auf der Waferoberfläche von denen, die auf den doppelt gefurchten Oberflächen beobachtet wurden. Dennoch entsprach der generelle Modus der Brückenbildung dem Modus, der bereits bei den doppelt gefurchten Oberflächen beschrieben wurde (Abbildung 26).

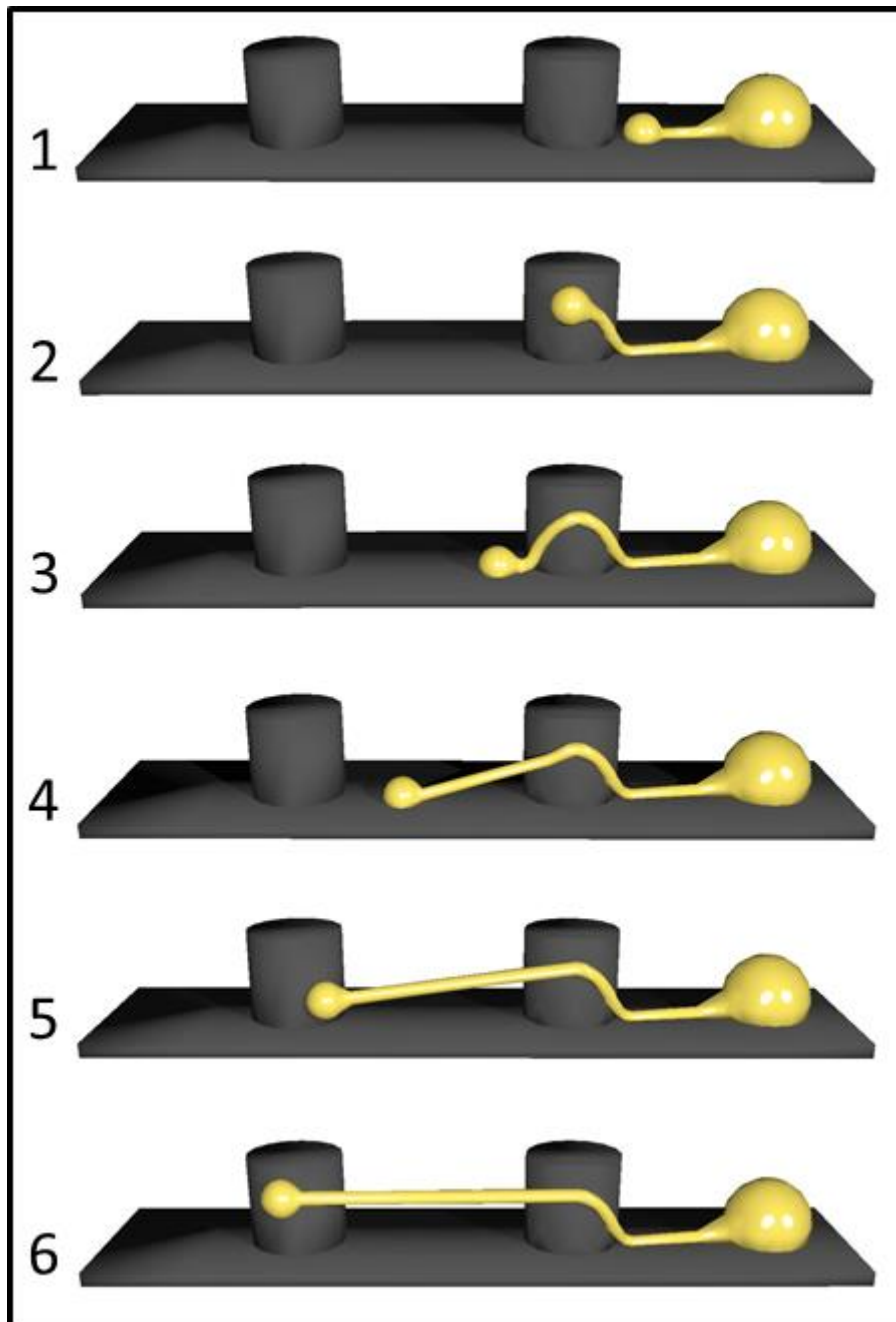


Abbildung 26: Phasen der neuronalen Brückenbildung zwischen benachbarten Zylindern

Dargestellt sind die beobachteten Phasen, die ein Neuron durchlaufen musste, um eine horizontale Brücke zwischen zwei benachbarten Zylindern auszubilden. Im Unterschied zu den Quadern dienten bei den Zylindern in der Regel die Mantelflächen als Verankerungspunkte für eine neuronale Brücke und nicht deren Oberseite.

4 Diskussion

Die durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass strukturierte Halbleiter-elektroenträger in zukünftigen auditorischen Implantaten grundsätzlich eine Alternative zu den Kabelbündel-Elektroenträgern heutiger Implantate sein könnten. Durch den Einsatz der Elektronenstrahlolithografie konnten Siliziumwafer mit präziser Oberflächenstrukturierung hergestellt werden und deren Biokompatibilität durch Kultivierung neuronaler Zellen gezeigt werden. Die Geometrie der eingeätzten Oberflächenstruktur hatte dabei entscheidenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der untersuchten Zellen. Während durch Furchen die Orientierung der Neurone gezielt beeinflusst werden konnte und die Neuritenlängen bei großen Ätztiefen abnahmen, konnten derartige Effekte bei den untersuchten Oberflächen mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten nicht beobachtet werden.

Die durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen gaben Aufschluss über die Interaktion der Neurite mit der Oberflächenstruktur. Unabhängig von der Geometrie der Oberflächenstruktur wurde hierbei das Phänomen der neuronalen Brückenbildung beobachtet. Der Modus der Brückenbildung war bei beiden untersuchten Strukturen grundsätzlich gleich. Unterschiede ergaben sich jedoch in den Verankerungspunkten, die die Neurone auf den Siliziumoberflächen ausbildeten. Darüber hinaus konnte durch Echtzeituntersuchungen an lebenden Zellen gezeigt werden, dass das neuronale Wachstum auf Halbleiteroberflächen ein dynamischer Vorgang ist, bei dem die Neurone ihre Lage stetig verändern konnten. Die Verankerungspunkte, die die Neurone auf den Siliziumoberflächen ausbildeten, waren nicht dauerhaft, sondern konnten wieder aufgelöst und an anderer Stelle neu ausgebildet werden.

4.1 Einfluss gefurchter Oberflächen auf das neuronale Wachstum und deren Einsatz in zukünftigen Halbleiterimplantaten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf gefurchten Siliziumoberflächen Neurone bevorzugt parallel zur Orientierung der Furchen auswachsen. Dieses Phänomen ist bekannt und konnte bereits an unterschiedlichen gefurchten Trägermaterialien, nicht nur an neuronalen Zellen (Johansson et al., 2006; Li et al., 2008a; Mahoney et al., 2005; Reich et al., 2012; Yao et al., 2009) und an Gliazellen

(Miller et al., 2001; Recknor et al., 2004), sondern auch an Zellen nicht neuronaler Herkunft (Teixeira et al., 2003; Walboomers et al., 2000) gezeigt werden.

Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Zellen und unterschiedlichen Ausmaßen der Furchen, die in der Vergangenheit untersucht wurden, ist ein Vergleich dieser Arbeiten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur bedingt möglich. Zudem wird ein Vergleich durch die unterschiedlichen Materialeigenschaften der verwendeten strukturierten Trägermaterialien und eine hierdurch bedingte mögliche Beeinflussung des neuronalen Wachstums zusätzlich erschwert. So konnte etwa für reine Siliziumhalbleiter gezeigt werden, dass bereits deren Nitridierung das Wachstumsverhalten neuronaler Zellen beeinflusst (Mlynski et al., 2007; Rak et al., 2011a). Aus diesem Grund werden, unter Berücksichtigung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit, vor allem die Studien diskutiert, in denen ebenfalls strukturierte Trägermaterialien aus elementarem Silizium oder Siliziumdioxid (SiO_2) untersucht wurden. Eine gemeinsame Betrachtung beider Materialien ist trotz der unterschiedlichen Materialeigenschaften und einer daraus resultierenden möglichen Beeinflussung des neuronalen Wachstums dennoch zulässig. Ursache hierfür ist die Tatsache, dass elementares Silizium durch Sauerstoff zu Siliziumdioxid oxidiert wird. Diese Reaktion wird gezielt bei der thermischen Passivierung von Halbleitern ausgenutzt; sie läuft jedoch bereits bei Raumtemperatur ab, so dass Halbleiter aus reinem Silizium nach Kontakt mit dem Luftsauerstoff ebenfalls mit einer Oxidschicht überzogen sind (Albers, 2006).

Alle berücksichtigten Arbeiten konnten zeigen, dass bei bestimmten Furchendimensionen Neurone auf Siliziumoberflächen bevorzugt parallel zu diesen auswachsen (Foley et al., 2005; Fozdar et al., 2010; Nagata et al., 1993; Rajnicek et al., 1997). Dieser Sachverhalt konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden und bestätigt somit die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Ein wesentlicher Unterschied der vorliegenden Arbeit zu den meisten der verglichenen Arbeiten (Foley et al., 2005; Nagata et al., 1993; Rajnicek et al., 1997) war jedoch der geringe Einfluss der Furchentiefe auf die Orientierung der Neurite. Am deutlichsten wird dies in der Arbeit von Rajnicek (Rajnicek et al., 1997). Rajnicek benutzte für seine Versuche ebenfalls Furchen mit einer Breite von 4 μm , variierte im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit jedoch die Furchentiefe von 14 nm bis 1100 nm. Vor allem an hippocampalen Neuronen der Ratte konnte Rajnicek zeigen, dass bei 4 μm breiten Furchen der Anteil an

Neuronen, die sich parallel zu diesen orientierten, mit zunehmender Furchentiefe wesentlich zunahm (Rajnicek et al., 1997).

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen der Arbeit von Rajnicek und der vorliegenden Arbeit, die eben nur eine geringe Abhängigkeit zwischen der Furchentiefe und der Orientierung der Neurite zeigen konnte, liefert Li (Li and Folch, 2005). Li konnte zeigen, dass die Fähigkeit von Neuronen Niveauwechsel zu vollziehen mit zunehmender Furchentiefe exponentiell abnimmt (sigmoidaler Kurvenverlauf). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Beziehung zwischen Furchentiefe und Neuritenorientierung ebenfalls nicht linear ist, wie es etwa von Rajnicek postuliert wurde (Rajnicek et al., 1997), sondern ebenfalls einer exponentiellen Beziehung folgt (Li and Folch, 2005). Bei konstanter Erhöhung der Furchentiefe steigt somit der Anteil an Neuronen, die parallel zu den Furchen auswachsen, nicht proportional an, sondern nähert sich asymptotisch einem Optimum an, bei dem schließlich alle Neurone parallel zu den eingebrachten Furchen auswachsen. Dieser exponentielle Zusammenhang zwischen Furchentiefe und Neuritenorientierung könnte erklären, weshalb in der vorliegenden Arbeit die Furchentiefe die Neuritenorientierung kaum beeinflussen konnte. Mit 3 μm waren die Furchen in der vorliegenden Arbeit offenbar schon so tief, dass sich der Großteil der Neurone bereits parallel zu den eingebrachten Furchen orientierte. Obwohl die Furchentiefe mit 7 μm auf mehr als das Doppelte vergrößert wurde, wirkte sich dies aufgrund des exponentiellen Zusammenhanges zwischen Furchentiefe und Neuritenorientierung kaum auf den Orientierungswinkel der untersuchten Neurone aus.

Interessant ist, dass Rajnicek neben der bevorzugten parallelen Orientierung der Neurite auf Furchen mit einer Breite von 4 μm auch eine bevorzugte senkrechte Orientierung von Neuronen beschreibt (Rajnicek et al., 1997). Dieses Phänomen trat ebenfalls bei den untersuchten hippocampalen Neuronen, allerdings auf gefurchten Oberflächen mit einer Furchenbreite von 1 μm und 2 μm , auf. Dieses bevorzugte Wachstum orthogonal zur Furchenorientierung wurde neben Rajnicek auch von Nagata beschrieben (Nagata et al., 1993; Rajnicek et al., 1997). Auffällig ist, dass dieses Phänomen bisher ausschließlich auf strukturiertem Siliziumdioxid beobachtet wurde und auf keinem anderen gefurchten Trägermaterial. In der vorliegenden Arbeit konnte ein bevorzugtes orthogonales Wachstumsverhalten dagegen nicht beobachtet werden.

Neben dem Orientierungswinkel wurde auch die Länge der Neurite auf den gefurchten Oberflächen untersucht. Die Neurite, die auf den gefurchten Oberflächen mit einer Furchentiefe von 7 μm auswuchsen, waren kürzer, als die Neurite auf Oberflächen mit nur 3 μm tiefen Furchen. Das Längen-Breiten-Verhältnisses der Zellkerne könnte eine mögliche Erklärung für die kürzeren Neuritenlängen liefern. Das Längen-Breiten-Verhältnis der Zellkerne auf den gefurchten Oberflächen mit einer Furchentiefe von 7 μm war größer als auf den gefurchten Oberflächen mit einer Furchentiefe von nur 3 μm bzw. den zugehörigen Kontrolloberflächen. Die Somata der Neurone auf den gefurchten Oberflächen mit einer Furchentiefe von 7 μm lagen häufig vollständig in einer Furche und wurden von den angrenzenden Furchenwänden überragt. Der Zellkern dehnte sich der Länge nach innerhalb der Furche aus. Durch den Kontakt der Zelle zum Furchenboden und den angrenzenden Furchenwänden stand ein großer Teil der Zelloberfläche nicht zum Stoffaustausch mit dem umgebenden Nährmedium zur Verfügung. Eine schlechtere Substratversorgung und die Akkumulation von zytotoxischen Substanzen wäre hierdurch denkbar und die kürzeren Neuritenlängen hierdurch erklärbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Furchen ein nützliches Hilfsmittel sein könnten, um die Orientierung von neuronalen Zellen auf zukünftigen Implantaten gezielt zu beeinflussen. Ein bevorzugtes paralleles Auswachsen der Neurone konnte auf beiden untersuchten Furchentiefen beobachtet werden. Der Einfluss der Furchentiefe auf die Neuritenorientierung war jedoch nur gering. Dagegen waren die Neuritenlängen auf gefurchten Oberflächen mit einer Furchentiefe von 7 μm jedoch deutlich kürzer als auf Oberflächen mit einer Furchentiefe von 3 μm . Für den Einsatz in zukünftigen Implantaten erscheinen deshalb Furchen mit einer geringeren Tiefe geeigneter zu sein. Ein gerichtetes Auswachsen der Neurite ist auch hier gewährleistet und der ungünstige Einfluss großer Furchentiefen auf die Neuritenlänge wird vermieden.

4.2 Neuronale Interaktion mit zylinderförmigen Elektrodenkontakten und deren Einsatz in zukünftigen Implantaten

Um den Einfluss einer großen Anzahl an Elektrodenkontakten auf das neuronale Wachstum zu untersuchen, wurden als Modellstruktur Zylinder auf der Waferoberfläche erzeugt. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die Zylinder weder einen Ein-

fluss auf die Neuritenlänge noch auf die Orientierung der Neurite hatten. Darüber hinaus konnte durch die Rasterelektronenmikroskopie und die durchgeführten Echtzeituntersuchungen gezeigt werden, dass Neurone mit den Zylindern in Kontakt treten konnten und ein Anwachsen an diese möglich war. Die Interaktion zwischen Neurit und Zylinder war allerdings häufig nicht dauerhaft. Der Wachstumskegel konnte sich von einem Zylinder, zu dem er Kontakt aufgenommen hatte, wieder ablösen und stattdessen beispielsweise Kontakt zu einem benachbarten Zylinder aufnehmen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Erhöhung der Anzahl an Elektrodenkontakten auf zukünftigen Siliziumelektrodoträgern zwar möglich ist, die Attraktivität der Elektrodenkontakte jedoch noch entscheidend verbessert werden muss. Optimal wäre die Ausbildung einer permanenten Verbindung zwischen Elektrodenkontakt und Neurit. Auf diese Weise könnten jeder Nervenfasern eindeutig die zugehörigen Elektrodenkontakte zugeordnet werden. Um dies zu erreichen wäre es optimal das Anwachsen des Neurons an die Zylinderoberfläche zu erleichtern und gleichzeitig den Waferboden für das Neuron unattraktiv zu machen. Der höhere Interaktionsdruck würde die Anzahl an Neuronen, die Kontakt zu den Zylindern aufnehmen würden, vermutlich erhöhen.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte könnten kegelförmige Elektrodenkontakte statt zylinderförmiger Elektrodenkontakte eine Option auf zukünftigen Elektrodoträgern sein. Diese hätten gegenüber den hier untersuchten Zylindern einige Vorteile. Durch den flachen Anstiegswinkel der Mantelfläche könnte das Übertreten des Wachstumskegels vom planen Waferboden auf die Mantelfläche erleichtert werden. So vermutet auch Li, dass Neurone, wenn sie auf ein Hindernis stoßen, immer denjenigen Weg einschlagen, der mit einer möglichst geringen Korrektur ihrer bisherigen Wachstumsrichtung einhergeht (Li and Folch, 2005). Der flachere Anstiegswinkel des Kegelmantels im Vergleich zum 90° Winkel zwischen Zylindermantel und Waferboden könnte eine Interaktion zwischen Wachstumskegel und Elektrodenkontakt somit begünstigen.

Neben einem günstigeren Anstiegswinkel der Mantelfläche zum Waferboden hätten kegelförmige Elektrodenkontakte noch einen weiteren entscheidenden Vorteil gegenüber den hier untersuchten Zylindern. Lithografisch könnte sehr einfach die Oberflächenbeschaffenheit der Mantelfläche verändert werden. Beispielsweise wäre es denkbar, die Oberfläche von Siliziumwafern mit Arealen unterschiedlicher Rauigkeit

zu versehen. Schon lange ist bekannt, dass das Adhäsionsverhalten neuronaler Zellen von der Rauigkeit der Oberfläche abhängig ist, wobei raue Areale gegenüber glatten bevorzugt werden (Bayliss et al., 1999; Sapelkin et al., 2006). Fan konnte zeigen, dass für neuronale Zellen bei einer bestimmten Rauigkeit auf Siliziumwafern ein Adhäsionsoptimum besteht (Fan et al., 2002). Neurone wanderten dabei von Arealen mit ungünstiger Rauigkeit hin zu Arealen, deren Rauigkeit dem Adhäsionsoptimum entspricht. Durch lithografische Oberflächenoptimierung könnte der in der vorliegenden Arbeit noch bevorzugte Boden der Wafer für Neurone unattraktiv gemacht werden und gleichzeitig die Mantelflächen kegelförmiger Elektrodenkontakte mit der Rauigkeit des Adhäsionsoptimums versehen werden.

Eine Kombination beider beschriebener Modifikationen, d. h. ein kegelförmiges Elektrodendesign sowie die Erzeugung unterschiedlich rauer Areale auf der Waferoberfläche, könnte die Kopplung zwischen Neurit und Elektrode verbessern. In weiteren Arbeiten sollte deshalb die Wirksamkeit der vorgeschlagenen Modifikationen untersucht werden.

4.3 Neuronale Brückenbildung und deren Einsatz in zukünftigen Implantaten

Ein typisches Wachstumsverhalten, das unabhängig von der Oberflächengeometrie sowohl auf den doppelt gefurchten Oberflächen als auch bei den Zylindern beobachtet wurde, war die Ausbildung von neuronalen Brücken. Diese stellen offenbar das neuronale Anpassungsverhalten an den vertikalen Wachstumsstress der Oberflächenstruktur dar und traten deshalb bei beiden untersuchten Strukturen auf. Unterschiede ergaben sich allerdings bei der Analyse der axonalen Verankerungspunkte auf der Waferoberfläche, zwischen denen sich neuronale Brücken aufspannten. Bei den Quadern befanden sich die Fixpunkte vor allem auf deren Oberseiten, während bei den Zylindern vor allem die Mantelflächen als Verankerungspunkte dienten. Neurone vermieden es generell Kontakt zur Oberseite der Zylinder aufzunehmen, sodass diese auch nicht als Ausgangspunkt für neuronale Brücken infrage kamen.

Das Phänomen der neuronalen Brückenbildung ist bekannt und wurde sowohl an einfach wie auch an doppelt gefurchten Oberflächen bereits beschrieben (Dowell-Mesfin et al., 2004; Goldner et al., 2006). Ein analoges Wachstumsverhalten von neuronalen Zellen auf Oberflächenstrukturen anderer Geometrie ist dagegen neu

und konnte in der vorliegenden Arbeit an Zylindern gezeigt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Phasen der Brückenbildung auf einfach gefurchten Oberflächen wurde zwischenzeitlich von Goldner vorgeschlagen (Goldner et al., 2006). Goldner untersuchte hierfür das Wachstumsverhalten von neonatalen Neuronen aus den Spinalganglien der Ratte auf einfach gefurchten Silikonoberflächen. Goldner geht davon aus, dass das initiale Ereignis der neuronalen Brückenbildung in dem Bestreben des Neurons liegt, sein Soma aus einem Furchental auf ein Stegplateau zu verlagern. Das im Furchental liegende Neuron zieht sich dabei mit seinen an den beiden angrenzenden Furchenwänden fixierten Neuriten schrittweise empor. Auf dem Niveau der Stegplateaus wird das Soma schließlich horizontal auf eines der angrenzenden Stegplateaus verschoben. Der am gegenüberliegenden Stegplateau verankerte Neurit wird dabei nicht abgelöst und verbleibt in situ, so dass es zur Ausbildung einer neuronalen Brücke kommt.

Die von Goldner beschriebenen Phasen, die während der Ausbildung einer neuronalen Brücke durchlaufen werden mussten, konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden (Goldner et al., 2006). Zwei Beobachtungen der vorliegenden Arbeit sprechen sogar gegen Goldners Konzept der Brückenbildung. Zum einen wurden brückenbildende Neurone beobachtet, deren Somata in einem Furchental lagen. Diese Beobachtung widerspricht Goldners Konzept der Brückenbildung fundamental, da nach seinem Konzept brückenbildende Neurone, deren Somata in einem Furchental liegen, ausgeschlossen sind. Zum anderen wurden in der vorliegenden Arbeit und übrigens auch in der Arbeit von Dowell-Mesfin (Dowell-Mesfin et al., 2004) Neurone beobachtet, die neuronale Brücken über mehrere nebeneinander liegende Furchen hinweg ausbildeten. Goldner liefert auch hier keinen plausiblen Erklärungsansatz. Neurone, die mehr als eine Brücke ausbilden, können durch das von Goldner vorgeschlagene Konzept der Brückenbildung nicht erklärt werden.

Es muss allerdings angemerkt werden, dass sich die vorliegende Arbeit und die Arbeit von Goldner gleich in mehreren Aspekten des Versuchsaufbaus unterscheiden. Goldner verwendete für seine Versuche neonatale Neurone aus den Spinalganglien der Ratte und untersuchte den Modus der neuronalen Brückenbildung auf einfach gefurchten Silikonoberflächen mit anderen Furchendimensionen als in der vorliegenden Arbeit. Denkbar wäre, dass unterschiedliche Zellentitäten auch unterschiedliche Modi der neuronalen Brückenbildung besitzen. In Hinblick auf eine Verbesserung

zukünftiger auditorischer Implantate sollte in weiteren Untersuchungen deshalb das Wachstumsverhalten und die Fähigkeit auditorischer Neurone zur Bildung von neuronalen Brücken untersucht werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es jedoch fraglich, ob das Phänomen der neuronalen Brückenbildung auf zukünftigen Elektrodenträgern genutzt werden kann, um die Interaktion zwischen Elektrode und Neuron zu verbessern. Die in der Arbeit beobachteten neuronalen Brücken schienen ohne vorhersagbares Muster eher zufällig aufzutreten. Ein gezielter Einsatz neuronaler Brücken auf zukünftigen Elektrodenträgern ist somit nur schwer vorstellbar.

4.4 Kritische Betrachtung der Ergebnisse und Ausblick

Die durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass Siliziumelektrodenträger eine mögliche Alternative zu den herkömmlichen Kabelbündel-Elektrodenträgern sein könnten. Die Möglichkeit der gezielten Beeinflussung des Neuronenwachstums durch Furchen in der Umgebung von Elektroden sowie eine erhöhte Anzahl an Elektroden auf dem Elektrodenträger könnte die Leistungsfähigkeit von heutigen Implantaten wesentlich verbessern. Allerdings muss hierbei kritisch angemerkt werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an kortikalen neuronalen Vorläuferzellen der Maus gewonnen wurden. Eine Übertragung der Ergebnisse auf Neurone des auditorischen Systems ist nicht ohne weiteres möglich. Rajnicek konnte zeigen, dass sich neuronale Zellen unterschiedlicher Herkunft auf gefurchtem Siliziumdioxid völlig andersartig verhalten können (Rajnicek et al., 1997). Allerdings gibt es Hinweise, dass sich zumindest Spiralganglienzellen auf strukturierten Siliziumhalbleitern ähnlich verhalten wie die in dieser Arbeit verwendeten neuronalen Vorläuferzellen. So kommen Untersuchungen an Spiralganglienneuronen der Ratte auch zu dem Ergebnis, dass sich Spiralganglienzellen ebenfalls parallel zu eingebrachten Furchen orientieren (Clarke et al., 2011; Reich et al., 2012). Diese Ergebnisse wurden allerdings nicht an gefurchten Siliziumoberflächen gewonnen, sondern es wurden andere gefurchte Materialien verwendet. Ein gleichartiges Verhalten müsste daher in weiteren Untersuchungen für Siliziumoberflächen gezeigt werden.

Zum Wachstumsverhalten anderer neuronaler Zellentitäten des auditorischen Systems auf strukturierten Oberflächen liegen bisher noch keine Arbeiten vor. Vor allem Kenntnisse über das Wachstumsverhalten neuronaler Zellen des Ncl. Cochlearis wären für die Verbesserung von Elektrodenträgern von Hirnstammimplantaten eine

notwendige Voraussetzung. Allerdings konnten bisherige Untersuchungen an unstrukturierten Siliziumoberflächen schon zeigen, dass Siliziumnitrit (Si_3N_4) als Material für Elektrodenträger gegenüber elementarem Silizium zu bevorzugen wäre. Siliziumnitrit hatte einen positiven Effekt auf Neuritenlängen und das Überleben auditorischer Neurone aus dem Ncl. Cochlearis der Ratte (Mlynski et al., 2007; Rak et al., 2011a).

Darüber hinaus sollten weitere Möglichkeiten der gezielten Beeinflussung der Neuritenorientierung untersucht werden. Die Oberflächenstrukturierung stellt dabei nur eine Strategie dar, mit deren Hilfe dies erreicht werden kann. In den letzten Jahren konnten ähnliche Effekte auch für andere Verfahren gezeigt werden. So wäre neben dem Einsatz neurotropher Faktoren (Glueckert et al., 2008; Mai et al., 2009; Wittig et al., 2005) auch die Anwendung von elektrischen Strömen denkbar, durch die die Wachstumsrichtung von Neuriten beeinflusst werden kann (Li et al., 2008b; McCaig et al., 2000). Auch eine selektive Oberflächenfunktionalisierung durch Adhäsionsproteine, wie das auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Laminin, wäre auf Waferoberflächen denkbar (Miller et al., 2002). Durch derartige Oberflächenmodifikationen könnten gezielt nur die Oberflächen der Furchentäler oder der Elektrodenkontakte funktionalisiert und damit für Neurone attraktiv gemacht werden.

Durch die Kombination der genannten Ansätze könnte wahrscheinlich eine effektivere Annäherung zwischen Elektrode und Neurit erreicht werden als durch eine Oberflächenstrukturierung alleine. Dennoch gibt es noch weitestgehend ungelöste Probleme, die einer tatsächlichen Ankopplung von Nervenfasern an die Elektroden des Elektrodenträgers entgegenstehen. So ist es zwar heute *in vitro* schon möglich nicht-invasive Schaltkreise zwischen Siliziumwafern und Nervenzellen zu etablieren (Fromherz, 2002; Zeck and Fromherz, 2001) und sogar künstliche bionische Synapsen zu erzeugen (Kaul et al., 2004; Lichtenberger and Fromherz, 2007). *In vivo* werden die Elektrodenträger jedoch schon nach kurzer Zeit von Fibroblasten ummantelt und hierdurch von ihrer Umgebung isoliert (Hanekom 2005; Paasche, Tasche et al. 2009), sodass keine direkte Kopplung zwischen Neuronen und Elektrodenträger möglich ist. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es *in vitro* grundsätzlich möglich ist, neuronale Zellen auf Siliziumhalbleitern zu kultivieren. Durch eine *in vitro*-Kultivierung neuronaler Zellen auf Halbleiterelektrodenträgern, noch vor deren Implantation, könnte eine feste Verbindung zwischen Elektrode und

Neurit leichter geschaffen werden, als dies in vivo möglich ist. Nach der Implantation könnten die bereits mit den Elektrodenkontakten verbundenen Neurone, beispielsweise durch den Einsatz neurotropher Faktoren, mit den noch vorhanden auditorischen Neuronen vernetzt werden. Der kürzlich gelungene Nachweis neuronaler Stammzellen im Ncl. Cochlearis neonataler Ratten (Rak et al., 2011b) sowie in menschlichen Spiralganglien (Rask-Andersen et al., 2005) geben Anlass zur Hoffnung, dass eine in vitro-Kultivierung auditorischer Neurone prinzipiell möglich ist und in Zukunft zum Einsatz kommen könnte.

5 Zusammenfassung

Die Therapie von Patienten mit fortgeschrittener sensorineuraler Schwerhörigkeit oder Taubheit mit auditorischen Implantaten ist heute Standard in der medizinischen Versorgung. Durch direkte elektrische Stimulation der noch vorhandenen auditorischen Neurone wird versucht, die physiologische Informationsübertragung entlang der Hörbahn künstlich nachzubilden. Strukturierte Halbleiterelektroden-träger aus Silizium stellen dabei eine mögliche Alternative zu den herkömmlichen Kabelbündel-Elektroden-trägern heutiger Implantate dar. Durch die Möglichkeit der Abstandsverringerng zwischen Stimulationselektroden und Nervenfasern sowie durch die Möglichkeit der Erhöhung der Anzahl an Stimulationselektroden könnte die Leistungsfähigkeit heutiger Implantate verbessert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Wachstumsverhalten corticaler neuronaler Vorläuferzellen der Maus auf strukturierten Siliziumhalbleitern zu untersuchen und das Wachstumsverhalten näher zu charakterisieren. Zwei unterschiedliche Oberflächenstrukturen wurden durch den Einsatz der Elektronenstrahlolithografie auf Siliziumwafern erzeugt. Zylinder auf der Oberfläche der Halbleiter wurden als Modellstruktur gewählt, um eine erhöhte Anzahl an Elektrodenkontakten zu simulieren und die neuronale Interaktion mit diesen zu untersuchen. Daneben wurden Furchen auf Siliziumoberflächen verwendet, um die Wachstumsrichtung der neuronalen Zellen zu beeinflussen.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass strukturierte Halbleiterelektroden-träger in zukünftigen auditorischen Implantaten grundsätzlich eine Alternative zu den Kabelbündel-Elektroden-trägern heutiger Implantate sein könnten. Durch den Einsatz der Elektronenstrahlolithografie konnten Siliziumwafer mit präziser Oberflächenstrukturierung hergestellt werden und deren Biokompatibilität durch Kultivierung neuronaler Zellen gezeigt werden. Die Geometrie der eingeätzten Oberflächenstruktur hatte dabei entscheidenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Während durch Furchen die Orientierung der Neurone gezielt beeinflusst werden konnte und die Neuritenlängen mit zunehmender Ätztiefe abnahmen, konnten derartige Effekte bei den untersuchten Zylindern nicht beobachtet werden.

Die durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen gaben Aufschluss über die Interaktion der Neurite mit der Oberflächenstruktur. Auf vertikalen

Wachstumsstress reagierten die kortikalen neuronalen Vorläuferzellen unabhängig von der Oberflächenstruktur mit der Ausbildung von neuronalen Brücken. Der Modus der Brückenbildung war bei beiden Strukturen dabei gleich, jedoch wurden unterschiedliche Verankerungspunkte an der Siliziumoberfläche beobachtet. Darüber hinaus konnte durch Echtzeituntersuchungen an lebenden Zellen gezeigt werden, dass diese während des Wachstums ihre Lage verändern konnten und somit nicht dauerhaft mit der Oberfläche verbunden waren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden untersuchten Oberflächenstrukturen grundsätzlich für den Einsatz auf zukünftigen Halbleiterelektrodensträgern geeignet sind, jedoch noch weiterführende Untersuchungen nötig sind, um diese weiter zu optimieren.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, J.S., M.S. Hasenstab, G.W. Pippin, and A. Sismanis. 2004. Telephone use and understanding in patients with cochlear implants. *Ear Nose Throat J.* 83:96, 99-100, 102-103.
- Albers, J. 2006. Grundlagen integrierter Schaltungen: Bauelemente und Mikrostrukturierung. *Carl Hanser Verlag*:236.
- Aletsee, C., D. Brors, R. Mlynski, A.F. Ryan, and S. Dazert. 2002. [Wortmannin, a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase influences neurotrophin-induced spiral ganglion neurite growth]. *Laryngo- rhino- otologie.* 81:189-195.
- Allitt, B.J., S.J. Morgan, S. Bell, D.A. Nayagam, B. Arhatari, G.M. Clark, and A.G. Paolini. 2012. Midbrain responses to micro-stimulation of the cochlea using high density thin-film arrays. *Hear Res.* 287:30-42.
- Anderson, D.J. 2008. Penetrating multichannel stimulation and recording electrodes in auditory prosthesis research. *Hear Res.* 242:31-41.
- Anderson, I., W.D. Baumgartner, K. Boheim, A. Nahler, C. Arnoldner, and P. D'Haese. 2006. Telephone use: what benefit do cochlear implant users receive? *Int J Audiol.* 45:446-453.
- Aran, J.M., J.P. Erre, D. Lima da Costa, I. Debbarh, and D. Dulon. 1999. Acute and chronic effects of aminoglycosides on cochlear hair cells. *Ann N Y Acad Sci.* 884:60-68.
- Ashmore, J., P. Avan, W.E. Brownell, P. Dallos, K. Dierkes, R. Fettiplace, K. Grosh, C.M. Hackney, A.J. Hudspeth, F. Julicher, B. Lindner, P. Martin, J. Meaud, C. Petit, J. Santos-Sacchi, and B. Canlon. 2010. The remarkable cochlear amplifier. *Hear Res.* 266:1-17.
- Badi, A.N., A.O. Owa, C. Shelton, and R.A. Normann. 2007. Electrode independence in intraneural cochlear nerve stimulation. *Otol Neurotol.* 28:16-24.
- Bayliss, S.C., L.D. Buckberry, I. Fletcher, and M.J. Tobin. 1999. The culture of neurons on silicon. *Sensors and Actuators a-Physical.* 74:139-142.
- Bhandari, R., S. Negi, L. Rieth, and F. Solzbacher. 2010a. A wafer-scale etching technique for high aspect ratio implantable MEMS structures. *Sensors and Actuators a-Physical.* 162:130-136.
- Bhandari, R., S. Negi, and F. Solzbacher. 2010b. Wafer-scale fabrication of penetrating neural microelectrode arrays. *Biomed Microdevices.* 12:797-807.
- Bierer, J.A. 2010. Probing the electrode-neuron interface with focused cochlear implant stimulation. *Trends Amplif.* 14:84-95.
- Bratton, D., D. Yang, J.Y. Dai, and C.K. Ober. 2006. Recent progress in high resolution lithography. *Polymers for Advanced Technologies.* 17:94-103.
- Chen, G.D., C. Tanaka, and D. Henderson. 2008. Relation between outer hair cell loss and hearing loss in rats exposed to styrene. *Hear Res.* 243:28-34.
- Clarke, J.C., B.W. Tuft, J.D. Clinger, R. Levine, L.S. Figueroa, C.A. Guymon, and M.R. Hansen. 2011. Micropatterned methacrylate polymers direct spiral ganglion neurite and Schwann cell growth. *Hear Res.* 278:96-105.
- Cohen, L.T., E. Saunders, M.R. Knight, and R.S. Cowan. 2006. Psychophysical measures in patients fitted with Contour and straight Nucleus electrode arrays. *Hear Res.* 212:160-175.
- Dallos, P., J. Zheng, and M.A. Cheatham. 2006. Prestin and the cochlear amplifier. *J Physiol.* 576:37-42.
- Dowell-Mesfin, N.M., M.A. Abdul-Karim, A.M. Turner, S. Schanz, H.G. Craighead, B. Roysam, J.N. Turner, and W. Shain. 2004. Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons. *J Neural Eng.* 1:78-90.
- Eberwein, P., T. Steinberg, S. Schulz, D. Zimmermann, R. Accardi, D. Beck, T. Reinhard, and P. Tomakidi. 2011. Expression of keratinocyte biomarkers is governed by environmental biomechanics. *European Journal of Cell Biology.* 90:1029-1040.
- Fan, Y.W., F.Z. Cui, S.P. Hou, Q.Y. Xu, L.N. Chen, and I.S. Lee. 2002. Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *J Neurosci Methods.* 120:17-23.

- Fishman, K.E., R.V. Shannon, and W.H. Slattery. 1997. Speech recognition as a function of the number of electrodes used in the SPEAK cochlear implant speech processor. *J Speech Lang Hear Res.* 40:1201-1215.
- Foley, J.D., E.W. Grunwald, P.F. Nealey, and C.J. Murphy. 2005. Cooperative modulation of neuriteogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor. *Biomaterials.* 26:3639-3644.
- Fozdar, D.Y., J.Y. Lee, C.E. Schmidt, and S. Chen. 2010. Hippocampal neurons respond uniquely to topographies of various sizes and shapes. *Biofabrication.* 2:035005.
- Friesen, L.M., R.V. Shannon, D. Baskent, and X. Wang. 2001. Speech recognition in noise as a function of the number of spectral channels: comparison of acoustic hearing and cochlear implants. *J Acoust Soc Am.* 110:1150-1163.
- Fromherz, P. 2002. Electrical interfacing of nerve cells and semiconductor chips. *Chemphyschem.* 3:276-284.
- Ghibardo, M., L. Trichet, J. Le Digabel, A. Richert, P. Hersen, and B. Ladoux. 2009. Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration. *Biophys J.* 97:357-368.
- Glueckert, R., M. Bitsche, J.M. Miller, Y. Zhu, D.M. Prieskorn, R.A. Altschuler, and A. Schrott-Fischer. 2008. Deafferentation-associated changes in afferent and efferent processes in the guinea pig cochlea and afferent regeneration with chronic intrascalar brain-derived neurotrophic factor and acidic fibroblast growth factor. *J Comp Neurol.* 507:1602-1621.
- Goldner, J.S., J.M. Bruder, G. Li, D. Gazzola, and D. Hoffman-Kim. 2006. Neurite bridging across micropatterned grooves. *Biomaterials.* 27:460-472.
- Grill, W.M., Jr. 1999. Modeling the effects of electric fields on nerve fibers: influence of tissue electrical properties. *IEEE Trans Biomed Eng.* 46:918-928.
- Gross, M., U. Finckh-Kramer, and M. Spormann-Lagodzinski. 2000. [Congenital hearing disorders in children. 1: Acquired hearing disorders]. *HNO.* 48:879-886.
- Gross, M., K. Lange, and M. Spormann-Lagodzinski. 2001. [Congenital hearing loss in children. 2: Genetic hearing loss]. *HNO.* 49:602-617.
- Gstoettner, W.K., O. Adunka, P. Franz, J. Hamzavi, Jr., H. Plenk, Jr., M. Susani, W. Baumgartner, and J. Kiefer. 2001. Perimodiolar electrodes in cochlear implant surgery. *Acta Otolaryngol.* 121:216-219.
- Hanekom, T. 2005. Modelling encapsulation tissue around cochlear implant electrodes. *Med Biol Eng Comput.* 43:47-55.
- Hughes, M.L., and P.J. Abbas. 2006. Electrophysiologic channel interaction, electrode pitch ranking, and behavioral threshold in straight versus perimodiolar cochlear implant electrode arrays. *J Acoust Soc Am.* 119:1538-1547.
- Ito, T., and S. Okazaki. 2000. Pushing the limits of lithography. *Nature.* 406:1027-1031.
- Iverson, K.C., P.T. Bhatti, J. Falcone, R. Figueroa, and B.J. McKinnon. 2011. Cochlear implantation using thin-film array electrodes. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 144:934-939.
- Johansson, F., P. Carlberg, N. Danielsen, L. Montelius, and M. Kanje. 2006. Axonal outgrowth on nano-imprinted patterns. *Biomaterials.* 27:1251-1258.
- Kaul, R.A., N.I. Syed, and P. Fromherz. 2004. Neuron-semiconductor chip with chemical synapse between identified neurons. *Phys Rev Lett.* 92:038102.
- Kuchta, J., S.R. Otto, R.V. Shannon, W.E. Hitselberger, and D.E. Brackmann. 2004. The multichannel auditory brainstem implant: how many electrodes make sense? *J Neurosurg.* 100:16-23.
- Lee, J.P., B.M. Bang, S. Choi, T. Kim, and S. Park. 2011. Patterning of various silicon structures via polymer lithography and catalytic chemical etching. *Nanotechnology.* 22:275305.
- Lenarz, M., G. Joseph, H. Sonmez, A. Buchner, and T. Lenarz. 2011. Effect of technological advances on cochlear implant performance in adults. *Laryngoscope.* 121:2634-2640.
- Lenarz, T., H. Lim, G. Joseph, G. Reuter, and M. Lenarz. 2009. [Central auditory prosthesis]. *HNO.* 57:551-562.

- Li, J., H. McNally, and R. Shi. 2008a. Enhanced neurite alignment on micro-patterned poly-L-lactic acid films. *J Biomed Mater Res A*. 87:392-404.
- Li, L., Y.H. El-Hayek, B. Liu, Y. Chen, E. Gomez, X. Wu, K. Ning, L. Li, N. Chang, L. Zhang, Z. Wang, X. Hu, and Q. Wan. 2008b. Direct-current electrical field guides neuronal stem/progenitor cell migration. *Stem Cells*. 26:2193-2200.
- Li, N., and A. Folch. 2005. Integration of topographical and biochemical cues by axons during growth on microfabricated 3-D substrates. *Exp Cell Res*. 311:307-316.
- Liberman, M.C., J. Gao, D.Z. He, X. Wu, S. Jia, and J. Zuo. 2002. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature*. 419:300-304.
- Lichtenberger, J., and P. Fromherz. 2007. A cell-semiconductor synapse: transistor recording of vesicle release in chromaffin cells. *Biophys J*. 92:2262-2268.
- Lim, H.H., and D.J. Anderson. 2006. Auditory cortical responses to electrical stimulation of the inferior colliculus: implications for an auditory midbrain implant. *J Neurophysiol*. 96:975-988.
- Lim, H.H., M. Lenarz, and T. Lenarz. 2009. Auditory midbrain implant: a review. *Trends Amplif*. 13:149-180.
- Mahoney, M.J., R.R. Chen, J. Tan, and W.M. Saltzman. 2005. The influence of microchannels on neurite growth and architecture. *Biomaterials*. 26:771-778.
- Mai, J., L. Fok, H. Gao, X. Zhang, and M.M. Poo. 2009. Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients. *J Neurosci*. 29:7450-7458.
- Marangos, N., and R. Laszig. 1998. [Cochlear implants. Prosthetic management of deafness at the turn of the century]. *HNO*. 46:12-26.
- McCaig, C.D., L. Sangster, and R. Stewart. 2000. Neurotrophins enhance electric field-directed growth cone guidance and directed nerve branching. *Dev Dyn*. 217:299-308.
- McCreery, D.B. 2008. Cochlear nucleus auditory prostheses. *Hear Res*. 242:64-73.
- Middlebrooks, J.C., and R.L. Snyder. 2008. Intraneural stimulation for auditory prosthesis: modiolar trunk and intracranial stimulation sites. *Hear Res*. 242:52-63.
- Miller, C., S. Jeftinija, and S. Mallapragada. 2002. Synergistic effects of physical and chemical guidance cues on neurite alignment and outgrowth on biodegradable polymer substrates. *Tissue Eng*. 8:367-378.
- Miller, C., H. Shanks, A. Witt, G. Rutkowski, and S. Mallapragada. 2001. Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrates. *Biomaterials*. 22:1263-1269.
- Mlynski, R., S. Volkenstein, S. Hansen, D. Brors, J. Ebmeyer, and S. Dazert. 2007. Interaction of cochlear nucleus explants with semiconductor materials. *The Laryngoscope*. 117:1216-1222.
- Mou, K., C.L. Hunsberger, J.M. Cleary, and R.L. Davis. 1997. Synergistic effects of BDNF and NT-3 on postnatal spiral ganglion neurons. *J Comp Neurol*. 386:529-539.
- Mussig, E., S. Schulz, J.P. Spatz, N. Ziegler, P. Tomakidi, and T. Steinberg. 2010. Soft micropillar interfaces of distinct biomechanics govern behaviour of periodontal cells. *European Journal of Cell Biology*. 89:315-325.
- Nagata, I., A. Kawana, and N. Nakatsuji. 1993. Perpendicular contact guidance of CNS neuroblasts on artificial microstructures. *Development*. 117:401-408.
- Noorbakhsh, S., M. Farhadi, A. Tabatabaei, S. Mohamadi, and E. Jomeh. 2008. Infection in childhood sensory hearing loss. *Saudi Med J*. 29:1470-1474.
- Otto, S.R., R.V. Shannon, E.P. Wilkinson, W.E. Hitselberger, D.B. McCreery, J.K. Moore, and D.E. Brackmann. 2008. Audiologic outcomes with the penetrating electrode auditory brainstem implant. *Otol Neurotol*. 29:1147-1154.
- Paasche, G., C. Tasche, T. Stover, A. Lesinski-Schiedat, and T. Lenarz. 2009. The long-term effects of modified electrode surfaces and intracochlear corticosteroids on postoperative impedances in cochlear implant patients. *Otol Neurotol*. 30:592-598.
- Petit, C., J. LeVilliers, and J.P. Hardelin. 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet*. 35:589-646.
- Rajnicek, A., S. Britland, and C. McCaig. 1997. Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimensions, neuronal age and cell type. *J Cell Sci*. 110 (Pt 23):2905-2913.

- Rak, K., N. Wasielewski, A. Radeloff, A. Scherzed, S. Jablonka, R. Hagen, and R. Mlynski. 2011a. Growth behavior of cochlear nucleus neuronal cells on semiconductor substrates. *J Biomed Mater Res A*. 97:158-166.
- Rak, K., N.V. Wasielewski, A. Radeloff, J. Volkers, A. Scherzed, S. Jablonka, R. Hagen, and R. Mlynski. 2011b. Isolation and characterization of neural stem cells from the neonatal rat cochlear nucleus. *Cell Tissue Res*. 343:499-508.
- Rask-Andersen, H., M. Bostrom, B. Gerdin, A. Kinnefors, G. Nyberg, T. Engstrand, J.M. Miller, and D. Lindholm. 2005. Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in video demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. *Hear Res*. 203:180-191.
- Recknor, J.B., J.C. Recknor, D.S. Sakaguchi, and S.K. Mallapragada. 2004. Oriented astroglial cell growth on micropatterned polystyrene substrates. *Biomaterials*. 25:2753-2767.
- Reich, U., E. Fadeeva, A. Warnecke, G. Paasche, P. Muller, B. Chichkov, T. Stover, T. Lenarz, and G. Reuter. 2012. Directing neuronal cell growth on implant material surfaces by microstructuring. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 100:940-947.
- Sapelkin, A.V., S.C. Bayliss, B. Unal, and A. Charalambou. 2006. Interaction of B50 rat hippocampal cells with stain-etched porous silicon. *Biomaterials*. 27:842-846.
- Schmidt, R.F., F. Lang, and G. Thews. 2005. Physiologie des Menschen. *Springer Medizin Verlag Heidelberg*. 29. Auflage.
- Schwartz, M.S., S.R. Otto, R.V. Shannon, W.E. Hitzelberger, and D.E. Brackmann. 2008. Auditory brainstem implants. *Neurotherapeutics*. 5:128-136.
- Seidman, M.D., P. Vivek, and W. Dickinson. 2005. Neural response telemetry results with the nucleus 24 contour in a perimodiolar position. *Otol Neurotol*. 26:620-623.
- Shepherd, R.K., S. Hatsushika, and G.M. Clark. 1993. Electrical stimulation of the auditory nerve: the effect of electrode position on neural excitation. *Hear Res*. 66:108-120.
- Somek, B.F., S.; Dembitz, A.; Ivkovic, M.; Ostojic, J. 2006. Coding Strategies for Cochlear Implants. *AUTOMATIKA*. 47:69-74.
- Spoendlin, H., and A. Schrott. 1989. Analysis of the human auditory nerve. *Hear Res*. 43:25-38.
- Stickney, G.S., P.C. Loizou, L.N. Mishra, P.F. Assmann, R.V. Shannon, and J.M. Opie. 2006. Effects of electrode design and configuration on channel interactions. *Hear Res*. 211:33-45.
- Tang, Q., R. Benitez, and F.G. Zeng. 2011. Spatial channel interactions in cochlear implants. *J Neural Eng*. 8:046029.
- Teixeira, A.I., G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.J. Murphy, and P.F. Nealey. 2003. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J Cell Sci*. 116:1881-1892.
- Tykocinski, M., Y. Duan, B. Tabor, and R.S. Cowan. 2001a. Chronic electrical stimulation of the auditory nerve using high surface area (HiQ) platinum electrodes. *Hear Res*. 159:53-68.
- Tykocinski, M., E. Saunders, L.T. Cohen, C. Treaba, R.J. Briggs, P. Gibson, G.M. Clark, and R.S. Cowan. 2001b. The contour electrode array: safety study and initial patient trials of a new perimodiolar design. *Otol Neurotol*. 22:33-41.
- Vieira, M., B.L. Christensen, B.C. Wheeler, A.S. Feng, and R. Kollmar. 2007. Survival and stimulation of neurite outgrowth in a serum-free culture of spiral ganglion neurons from adult mice. *Hear Res*. 230:17-23.
- Walboomers, X.F., L.A. Ginsel, and J.A. Jansen. 2000. Early spreading events of fibroblasts on microgrooved substrates. *J Biomed Mater Res*. 51:529-534.
- Wang, J.B., and K.D. Wise. 2008. A Hybrid Electrode Array With Built-In Position Sensors for an Implantable MEMS-Based Cochlear Prosthesis. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 17:1187-1194.
- Wang, J.B., and K.D. Wise. 2009. A Thin-Film Cochlear Electrode Array With Integrated Position Sensing. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 18:385-395.
- Wilson, B.S., and M.F. Dorman. 2008a. Cochlear implants: a remarkable past and a brilliant future. *Hear Res*. 242:3-21.
- Wilson, B.S., and M.F. Dorman. 2008b. Cochlear implants: current designs and future possibilities. *J Rehabil Res Dev*. 45:695-730.

- Wilson, B.S., C.C. Finley, D.T. Lawson, R.D. Wolford, D.K. Eddington, and W.M. Rabinowitz. 1991. Better speech recognition with cochlear implants. *Nature*. 352:236-238.
- Wilson, B.S., D.T. Lawson, J.M. Muller, R.S. Tyler, and J. Kiefer. 2003. Cochlear implants: some likely next steps. *Annu Rev Biomed Eng*. 5:207-249.
- Wise, K.D., P.T. Bhatti, J. Wang, and C.R. Friedrich. 2008. High-density cochlear implants with position sensing and control. *Hear Res*. 242:22-30.
- Wittig, J.H., Jr., A.F. Ryan, and P.M. Asbeck. 2005. A reusable microfluidic plate with alternate-choice architecture for assessing growth preference in tissue culture. *J Neurosci Methods*. 144:79-89.
- Yao, L., S. Wang, W. Cui, R. Sherlock, C. O'Connell, G. Damodaran, A. Gorman, A. Windebank, and A. Pandit. 2009. Effect of functionalized micropatterned PLGA on guided neurite growth. *Acta Biomater*. 5:580-588.
- Zahnert, T. 2011. The differential diagnosis of hearing loss. *Dtsch Arztebl Int*. 108:433-443; quiz 444.
- Zeck, G., and P. Fromherz. 2001. Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:10457-10462.
- Zeng, F.G. 2004. Trends in cochlear implants. *Trends Amplif*. 8:1-34.
- Zeng, F.G., S. Rebscher, W. Harrison, X. Sun, and H. Feng. 2008. Cochlear implants: system design, integration, and evaluation. *IEEE Rev Biomed Eng*. 1:115-142.
- Zheng, J., L.D. Madison, D. Oliver, B. Fakler, and P. Dallos. 2002. Prestin, the motor protein of outer hair cells. *Audiol Neurootol*. 7:9-12.
- Zheng, J., W.X. Shen, D.Z.Z. He, B.L. Kevin, L.D. Madison, and P. Dallos. 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*. 405:149-155.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. Robert Mlynski für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für die wegweisende Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die ich an entscheidenden Abschnitten der Dissertation bekommen habe.

Danken möchte ich auch Dr. med. Kristen Rak für die Betreuung während der Arbeit und die vielen hilfreichen Anregungen und Ideen mit denen er mir bis zum Schluss der Arbeit zur Seite stand.

Gleichfalls danke ich meinem guten Freund Johannes Völker mit dem ich viele Stunden im Labor verbrachte und ohne dessen unermüdlichen Einsatz die Echtzeituntersuchungen an lebenden Zellen nicht möglich gewesen wären.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Petra Joa und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken, die stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium erst ermöglichen und mich immer unterstützten.