

**Analyse initialer Adhäsionsmechanismen von humanen
Osteoblasten in Abhängigkeit physiko-chemischer
Oberflächencharakteristika definiert mikrostrukturierter
Titanoberflächen**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2012



vorgelegt von:

Claudia Matschegewski

aus Rostock

geboren am 27.04.1981 in Teterow

Gutachter:

1. Gutachter:
Prof. Dr. agr. habil. Vet.-Ing Barbara J. Nebe
Arbeitsbereich Zellbiologie
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Eberhard Burkel
Institut für Physik
Universität Rostock

3. Gutachter:
Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Datum der Einreichung: 27.09.2012

Datum der Verteidigung: 31.05.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	- 3 -
Abkürzungsverzeichnis	- 6 -
1 Einleitung	- 8 -
1.1 Motivation	- 8 -
1.2 Anatomie und Funktion des menschlichen Knochens.....	- 8 -
1.2.1 Knochenzellen	- 10 -
1.2.2 Der Prozess des Knochenumbaus.....	- 11 -
1.3 Biomaterialien	- 12 -
1.3.1 Definition.....	- 12 -
1.3.2 Anforderungen an Biomaterialien	- 13 -
1.3.3 Klassifizierung.....	- 14 -
1.3.4 Funktionalisierung von Biomaterialoberflächen	- 15 -
1.3.4.1 Chemische Oberflächenfunktionalisierung	- 16 -
1.3.4.2 Topographische Oberflächenfunktionalisierung	- 17 -
1.4 Zelluläre Mechanismen in der Zell-Biomaterial-Interaktion.....	- 19 -
1.4.1 Extrazelluläre Matrixproteine.....	- 20 -
1.4.2 Adhäsionsrezeptoren und Fokaler Adhäsionskomplex	- 21 -
1.4.3 Intrazelluläre Strukturen - Aktinzytoskelett	- 22 -
1.5 Ziel der experimentellen Arbeit.....	- 24 -
2 Materialien	- 26 -
2.1 Chemikalien / Reagenzien	- 26 -
2.2 Kits und Assays	- 27 -
2.3 Antikörper.....	- 28 -
2.4 Medien, Lösungen, Puffer	- 29 -
2.5 Verbrauchsmaterialien.....	- 31 -
2.6 Geräte.....	- 32 -
2.7 Titanoberflächen.....	- 32 -
2.7.1 Herstellung der Pfostenstrukturen	- 33 -
2.7.2 Herstellung der Grabenstrukturen	- 34 -
3 Methoden.....	- 35 -
3.1 Physiko-chemische Oberflächencharakterisierung.....	- 35 -

3.1.1	Bestimmung der Benetzbarkeit und Oberflächenenergie.....	- 35 -
3.1.2	Energiedispersive Röntgenanalyse (EDX).....	- 36 -
3.2	Zellbiologische Methoden.....	- 36 -
3.2.1	Humane Osteoblasten (MG-63).....	- 36 -
3.2.1.1	Zellkultivierung.....	- 36 -
3.2.1.2	Passage und Lagerung der Zellen.....	- 37 -
3.2.2	Untersuchung der Zellmorphologie.....	- 38 -
3.2.3	Zeitliche Untersuchung der Zellausbreitung (Spreading).....	- 38 -
3.2.4	Bestimmung der Zellausrichtung.....	- 39 -
3.2.5	Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion.....	- 39 -
3.2.6	Analyse der Integrinexpression.....	- 40 -
3.2.7	Untersuchung des Proliferationsverhaltens.....	- 40 -
3.2.8	Immunzytochemische Färbungen.....	- 42 -
3.2.8.1	Aktin.....	- 42 -
3.2.8.2	Vinkulin.....	- 42 -
3.2.8.3	Integrin β -1.....	- 43 -
3.2.9	Quantifizierung der Aktinfilament-Formation.....	- 44 -
3.2.10	Proteinextraktion und Western Blot Analyse.....	- 45 -
3.3	Mikroskopie.....	- 46 -
3.3.1	Konfokale Laserrastermikroskopie.....	- 46 -
3.3.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	- 47 -
3.4	Durchflusszytometrie.....	- 49 -
3.5	Statistische Auswertung.....	- 50 -
4	Ergebnisse.....	- 51 -
4.1	Physiko-chemische Charakterisierung der Titanoberflächen.....	- 51 -
4.1.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM).....	- 51 -
4.1.2	EDX-Analyse der Titanschicht.....	- 53 -
4.1.3	Bestimmung der Benetzbarkeit und der Oberflächenenergie.....	- 54 -
4.2	Zellbiologische Untersuchungen.....	- 56 -
4.2.1	Zellmorphometrische Analyse.....	- 57 -
4.2.1.1	Zellmorphologie auf mikrostrukturierten Titanoberflächen.....	- 57 -
4.2.1.2	Zeitabhängige Untersuchung der Zellausbreitung.....	- 62 -
4.2.1.3	Bestimmung der Zellausrichtung.....	- 67 -
4.2.2	Quantitative Analyse der Zelladhäsion.....	- 69 -

4.2.3	Untersuchung des Aktinzytoskeletts	- 70 -
4.2.3.1	Organisation des Aktinzytoskeletts	- 70 -
4.2.3.2	Quantifizierung der Aktinfilamentformation mit FilaQuant	- 74 -
4.2.3.3	Proteinexpression von β -Aktin	- 77 -
4.2.4	Adaption der Aktinformation an die Oberflächentopographie - Ursachen	- 78 -
4.2.4.1	Lokalisation von β 1-Integrin	- 78 -
4.2.4.2	Einfluss durch adsorbierte Proteine	- 79 -
4.2.4.3	Einfluss durch Oberflächenchemie – Titan gegen Silizium	- 80 -
4.2.4.4	Mechanischer Einfluss durch Gravitation	- 81 -
4.2.5	Analyse von Komponenten des Fokalen Adhäsionskomplexes	- 82 -
4.2.5.1	Formation von Vinkulinkontakten.....	- 82 -
4.2.5.2	Bestimmung der Proteinexpression von Vinkulin.....	- 84 -
4.2.5.3	Expressionsanalyse von Integrinrezeptoren	- 84 -
4.2.6	Bestimmung der Proliferationsaktivität.....	- 85 -
4.2.7	Expressionsanalyse knochenspezifischer Matrixproteine	- 87 -
5	Diskussion.....	- 89 -
6	Zusammenfassung	- 101 -
	Literaturverzeichnis	- 103 -
	ANHANG	- 114 -
	Danksagung	- 114 -
	Eidesstattliche Erklärung.....	- 116 -
	Publikationen und Präsentationen	- 117 -

Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialo Protein
ca.	circa
Ca	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDX	Energiedispersive Röntgenanalyse (engl.: energy dispersive X-ray analysis)
eV	Kiloelektronenvolt
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum, FKS)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hydroxylapatit
IgG	Immunglobulin G
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MEMS	micro-electro-mechanical system
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm

Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Polyethylen
PFA	Paraformaldehyd
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPAAm	plasma-polymerisiertes Polyallylamin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Aminosäuresequenz aus den L-Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp oder im Einbuchstabencode: RGD)
RNase	Ribonuklease
Rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris-buffered saline
TCPS	Tissue culture polystyrene
TGF	Transoforming Growth Factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehung / Minute
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Motivation

Der Einsatz künstlicher Implantate in der klinischen Praxis ist heutzutage unerlässlich und in Zeiten steigender Lebenserwartung und damit einhergehenden zunehmenden Anforderungen an die Medizin von stetig wachsender Bedeutung.

Sind Organe, Organteile oder Körperstrukturen durch Krankheit, Verletzung oder Alterungsprozesse in ihrer Funktion eingeschränkt oder funktionsunfähig geworden, so übernehmen Implantate deren temporären oder permanenten Ersatz und ermöglichen so die Aufrechterhaltung der Körperfunktionen und damit den Erhalt der Lebensqualität der Patienten. Die Akzeptanz und Einheilung von Implantaten wird dabei maßgeblich von der Qualität der Zell-Implantat-Interaktion bestimmt, welche wiederum von den physiko-chemischen Eigenschaften des Biomaterials abhängig ist.

Trotz zahlreicher Studien und stetig zunehmenden Innovationen in der Implantattechnologie sind die komplexen Zusammenhänge dieser Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen Zelle und Biomaterial jedoch bis heute noch nicht vollständig verstanden und Korrelationen individueller Zellreaktionen mit spezifischen Materialcharakteristika ungenügend. Dies macht es erforderlich, die grundlegenden Mechanismen detailliert zu analysieren und aufzuklären, um so zukünftig zu einer Optimierung von Implantaten mit dem Ziel einer verbesserten Integration und Funktionalität beizutragen.

1.2 Anatomie und Funktion des menschlichen Knochens

Der Knochen ist ein hochorganisiertes, metabolisch aktives Gewebe, welches als hartes Stützgewebe das Skelett von Wirbeltieren bildet. Er entwickelt sich aus dem embryonalen Bindegewebe, dem Mesenchym, und dient hauptsächlich dem Schutz der inneren Organe sowie der mechanischen Stützung von Körperstrukturen. Überdies ermöglicht er die Verankerung von Muskeln, welches die Beweglichkeit gewährleistet und ist im Bereich des Knochenmarks Ort der Hämatopoiese [1]. Durch den hohen Anteil an anorganischem Material ist das Knochengewebe ein bedeutendes Reservoir für mineralische Nährstoffe und spielt so eine wichtige Rolle in der Kalzium- und Phosphathomöostase [2].

Der Knochen setzt sich aus Knochenzellen und Knochenmatrix zusammen. Die Knochenmatrix besteht dabei zu 70 % aus anorganischen Komponenten, zu 20 % aus organischen Komponenten und zu 10 % aus Wasser. Der anorganische Anteil beinhaltet hauptsächlich Kalziumphosphatverbindungen, v. a. Hydroxylapatit (HA), ein hydroxyliertes Kalziumphosphatsalz mit der chemischen Formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Der organische Teil der Knochenmatrix besteht zu 90 % aus kollagenen Proteinen (97 % Kollagen-I, 3 % Kollagen-V) sowie zu weiteren 10 % aus nicht-kollagenen Proteinen und Proteoglykanen (glykosylierte Glykoproteine, welche aus einem Protein und kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen (GAG) bestehen) [1]. Das Kollagen im Knochen ist überwiegend vom Typ-I und bildet in Form eines fibrillären Netzwerkes von Kollagenfasern, mit einer Periodizität von 67 nm und 35-40 nm Lücken zwischen den Enden der einzelnen Kollagenfibrillen, das strukturelle Gerüst für die Einlagerung der Hydroxylapatit-Kristalle [3]. Dies gewährleistet die Druck- und Zugfestigkeit (Rigidität) des Knochens unter gleichzeitiger Beibehaltung einer gewissen Elastizität des Gewebes. Zu den nicht-kollagenen Proteinen gehören hauptsächlich Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin und Bone Sialo Protein (BSP). Sie gehören zu den Glykoproteinen und werden während des osteoblastären Reifungsprozesses von Osteoblasten und/oder Osteozyten gebildet und können teilweise auf Grund ihres spezifischen Expressionsmusters als funktionelle Marker in der Osteogenese angesehen werden. Sie besitzen multiple Funktionen hinsichtlich Zellproliferation, Differenzierung und Mineralisierung [4]. Einige dieser nicht-kollagenen Proteine, u. a. BSP und Osteopontin, besitzen die RGD-Sequenz, ein spezifisches Aminosäuremotiv aus Arginin, Glycin und Asparagin, welches sie befähigt an Integrinrezeptoren zu binden und somit Einfluss auf die Zelladhäsion in Zell-Matrix-Interaktionen zu nehmen [5]. Osteocalcin wird ausschließlich von Osteoblasten sezerniert und ein erhöhter Osteocalcin-Spiegel geht beispielsweise mit einem gesteigerten Knochenaufbau bzw. -umbau einher [4]. Osteopontin wird sowohl von Osteoblasten als auch Osteozyten in deren frühen Differenzierungsstadien gebildet und besitzt eine regulatorische Funktion in der Osteoklastogenese [6]. Das Bone Sialo Protein und Osteonectin werden ebenfalls von Osteoblasten sezerniert und fungieren als Kristallisationskeim für die Anlagerung von Hydroxylapatitkristallen und somit als Initiator für die Mineralisierung. Bedingt durch ihre Fähigkeit zur Bindung von Hydroxylapatit und Kalziumionen, werden sie als typische Marker für den Knochenumbau angesehen [7].

1.2.1 Knochenzellen

Die Knochenzellen werden in drei verschiedene Zelltypen eingeteilt: Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten.

Die *Osteoblasten* entwickeln sich aus multipotenten, mesenchymalen Stammzellen und sind neben der Regulation des Knochenstoffwechsels und der Osteoklastengnese, vor allem für den Knochenaufbau verantwortlich. Sie synthetisieren und sezernieren knochenspezifische Matrixproteine, wie Kollagen-I, Alkalische Phosphatase (ALP), Osteonectin, Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialo Protein, welche die Grundlage der organischen Knochenmatrix, dem Osteoid, bilden [1][8]. Durch die nachfolgende Einlagerung von Kalziumphosphatverbindungen, v. a. Hydroxylapatit, kommt es dann zur Mineralisierung des Osteoids. Sind Osteoblasten vollständig in die Knochenmatrix eingebettet und folglich im Knochen integriert, so werden sie als *Osteozyten* bezeichnet. Osteozyten machen den größten Anteil der Knochenzellen aus. Sie liegen in kleinen Knochenzellhöhlen (Lacunae osseae), welche von Interzellularsubstanz umgeben sind und besitzen allseitige Fortsätze, welche in die Knochenkanälchen (Canaliculi ossei) hineinragen und über deren Lumen mit dem Gefäßsystem zum Zwecke des Stoffaustausches in Verbindung stehen [9]. Auch untereinander stehen die einzelnen Fortsätze über spezifische Zell-Zell-Kanäle (Gap Junctions) miteinander in Kontakt, was die interzelluläre Signalübermittlung und somit den Informationssaustausch gewährleistet [9]. Funktionell betrachtet haben Osteozyten jedoch die meisten ihrer ursprünglich osteoblastären Eigenschaften verloren. Dies wird besonders an der stark reduzierten Syntheseleistung in Bezug auf die Matrixproteinproduktion deutlich. Für den Erhalt des Knochens sind sie jedoch unabdingbar [4].

Im Gegensatz zu Osteoblasten und Osteozyten bauen *Osteoklasten* den Knochen ab. Sie sind polykaryotische Zellen, welche sich aus hämatopoetischen Stammzellen differenzieren. Osteoklasten besitzen eine spezifische Zellform mit charakteristischen Einfaltungen in der Zellmembran (ruffled border), mit welcher sie durch hier befindliche Vakuolen und Lysosomen, gefüllt mit säurehaltigen Substanzen und proteolytischen Enzymen (Milchsäure, Zitronensäure, saure Phosphatase, saure Hydroxylase), fähig sind, mineralisierten Knochen zu resorbieren und so alte Knochensubstanz abzubauen [1][2][10].

1.2.2 Der Prozess des Knochenumbaus

Der Prozess des Knochenumbaus (Bone Remodelling) ist ein über die gesamte Lebensdauer ständig stattfindender, dynamischer Vorgang. Er ermöglicht die Reparatur kleinerer Knochendefekte und gewährleistet somit die mechanische und strukturelle Integrität der skelettalen Komponenten, als auch die Steuerung und Regulation der Freisetzung von Kalzium und Phosphaten aus dem Knochengewebe [11]. Die räumlich-zeitliche Interaktion zwischen Knochenaufbau durch Osteoblasten und Knochenabbau durch Osteoklasten steht in einem empfindlichen physiologischen Gleichgewicht, in welchem sich Osteoblasten und Osteoklasten gegenseitig steuern und regulieren [12].

Der Knochenumbau läuft in vier Hauptphasen in spezifischer zeitlicher Abfolge ab: Resorption, Umwandlung, Knochenformation und Mineralisierung (siehe Abb. 1). Die Initiation der Knochenresorption erfolgt durch Rekrutierung von Prä-Osteoklasten an der Knochenoberfläche, welche dort als aktive Osteoklasten ihre Funktion aufnehmen. Sie adhären an der Oberfläche und induzieren durch Sekretion säurehaltiger Stoffe die Resorption des anorganischen Materials. Die organischen Matrixbestandteile werden durch zusätzliche Abgabe proteolytischer Enzyme abgebaut. In den so entstandenen Resorptionslakunen lagern sich anschließend - nach erfolgter Oberflächenaufbereitung durch mononukleare, makrophagenartige Zellen - Prä-Osteoblasten an, welche dann als Osteoblasten mit der Synthese und Sekretion von Matrixproteinen und somit mit der Formation neuer Knochensubstanz beginnen. Mit der abschließenden Einlagerung anorganischer Komponenten und der so induzierten Mineralisierung ist die Knochenregeneration abgeschlossen [11].

Der komplette Prozess des Knochenumbaus, beginnend mit der Aktivierung von Osteoklasten und endend mit der osteoblastären Knochenneubildung, erstreckt sich über einen Zeitraum von insgesamt drei bis vier Monate. So werden bei einem gesunden Menschen pro Jahr durchschnittlich 5-10 % der Knochensubstanz ersetzt.

Die Formation und Resorption von Knochen unterliegt der Regulation durch zahlreiche autokrine und parakrine Faktoren, z. B. Parathormon oder Östrogen. Ist die Balance zwischen Knochenaufbau und -abbau gestört, können sich pathologische Veränderungen ausbilden. Als ein Beispiel dafür ist die Osteoporose zu nennen, bei welcher auf Grund der Dysbalance im Knochen-Remodelling ein beschleunigter Knochenabbau stattfindet, welcher in einer pathologischen Mikrostruktur des Knochens mit einer verminderten

Knochendichte und damit einhergehender gesteigerter Frakturanfälligkeit resultiert [2][12].

Prozess des Knochenumbaus

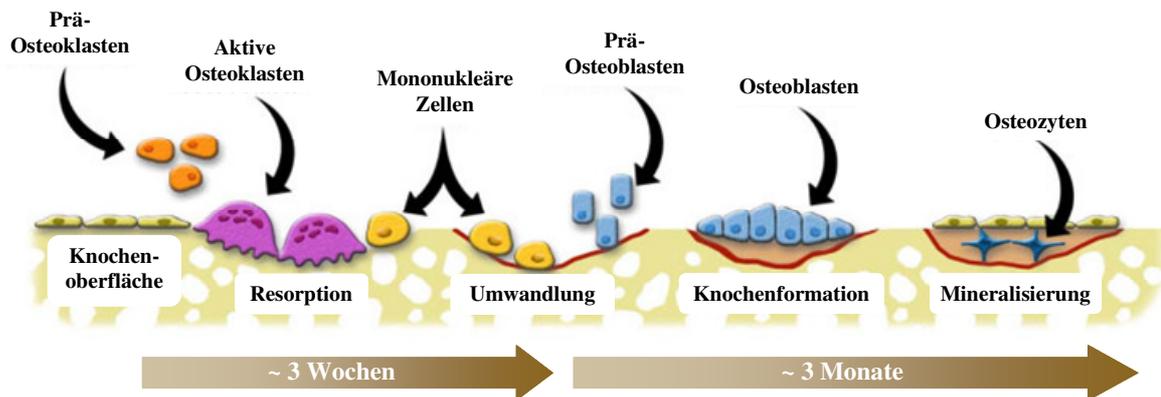


Abb. 1: Prozess des Knochenumbaus. Aktive Osteoklasten resorbieren den Knochen. Durch nachfolgende Anlagerung von Osteoblasten wird der Knochen wieder aufgebaut und somit regeneriert. (<http://www.ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/img/bone.jpg>)

1.3 Biomaterialien

1.3.1 Definition

Der Begriff Biomaterial wurde erstmalig im Jahre 1982 vom *National Institute of Health* definiert. Demnach sind Biomaterialien jede von einem Arzneimittel zu unterscheidende Substanz oder Kombination von Substanzen natürlichen oder synthetischen Ursprungs, die für unlimitierte Zeit als Ganzes oder als Teil des menschlichen Körpers verwendet werden kann, um ein Gewebe, ein Organ oder eine Funktion des menschlichen Körpers zu behandeln, zu vermehren oder zu ersetzen [13]. In Anbetracht der zahlreichen Innovationen auf diesem Gebiet hinsichtlich der Neu- und Weiterentwicklungen von medizinischen Verfahren und Technologien, z. B. Tissue Engineering, pharmakologische Wirkstofffreisetzungssysteme (drug delivery) oder Mikrosystemtechnik (micro-electro-mechanical systems, MEMS) sowie von biomedizinischen Werkstoffen, siehe Biopolymere oder Nanopartikel, ist eine Anpassung bzw. Erweiterung dieser ursprünglichen Begriffsdefinition unerlässlich geworden. Daher wird der Begriff

Biomaterial laut D. F. Williams von 2009 [14] seither wie folgt formuliert: „*A biomaterial is a substance that has been engineered to take a form which, alone or as part of a complex system, is used to direct, by control of interactions with components of living systems, the course of any therapeutic or diagnostic procedure, in human or veterinary medicine.*“, d. h. also als ein Material bzw. eine Substanz, welche allein oder als Teil eines komplexen Systems gezielt mit dem biologischen System hinsichtlich jeglichen therapeutischen oder diagnostischen Zweckes interagiert. Hier wird also speziell auch der Bereich der medizinischen Diagnostik, inklusive temporärer Substitute oder medizinischer Messinstrumente, involviert. Überdies wird die Begrifflichkeit des Biomaterials neben Anwendungen im humanmedizinischen Bereich um das Gebiet der Veterinärmedizin erweitert.

1.3.2 Anforderungen an Biomaterialien

Biomaterialien stehen in direktem Kontakt mit dem Körper und somit in chemischer, physikalischer und biologischer Wechselwirkung mit dem umgebenden Biosystem. Dies stellt besondere Anforderungen an das Biomaterial und macht es erforderlich, dass grundlegende Kriterien erfüllt sein müssen, um die Biofunktionalität eines Biomaterials zu gewährleisten und über den gewünschten bzw. erforderlichen Zeitraum zu erhalten. Die Grundvoraussetzung ist dabei die Biokompatibilität, d. h. das Biomaterial muss vom Körper toleriert bzw. akzeptiert werden und darf keine unerwünschte immunologische Antwort induzieren, welche zu einem Funktionsverlust oder gar zu einer Abstoßungsreaktion führen könnte [14]. Darüber hinaus muss ein Biomaterial bzw. Implantat - je nach medizinischer Applikation - weiteren spezifischen Anforderungen genügen, um das funktionsgeschädigte Gewebe, Organ oder Körperteil bestmöglich zu ersetzen. Dies wird als technische Funktionsfähigkeit bezeichnet. Bei einem Einsatz im Hartgewebereich, wie z. B. Hüft- oder Knieprothesen, sind vor allem mechanische Eigenschaften, wie hohe mechanische Belastbarkeit, Härte und Beweglichkeit erforderlich, welche die funktionale Kompatibilität zum zu ersetzenden Gewebe/Organ gewährleistet. Bei Biomaterialien zum Ersatz von Weichgewebe, wie z. B. bei Gefäßen, ist wiederum eine gewisse Durchlässigkeit von essentieller Bedeutung um den Stoffaustausch zwischen dem artifiziellen Gefäß mit dem umgebenden Gewebe weiterhin garantiert.

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Verweildauer von Implantaten im Körper. Permanente Implantate, welche dem Langzeiterersatz dienen, sollen eine Langlebigkeit besitzen, so dass sie für mehrere Jahre - optimal für die Restlebensdauer - im Patienten verbleiben können und ihre Funktion gleichbleibend aufrechterhalten wird (Biostabilität). So können unnötige Folgeoperationen und Revisionen, welche zu neuen Defekten führen und daher oftmals mit Problemen behaftet sind, vermieden werden. Implantate, welche lediglich dem temporären Ersatz dienen und zur Heilung kleinerer Knochendefekte eingesetzt werden, wie beispielsweise Schrauben, Nägel oder Pins, sollten wiederum resorbierbar sein, d. h. nach erfolgter Knochenbildung vollständig vom Körper degradiert werden. Dies bedeutet einen entsprechenden Entwicklungsbedarf von bioaktiven Implantaten, welche gezielt mit der biologischen Umgebung interagieren und so spezifische zellbiologische Reaktionen, wie z. B. eine Stimulation der Zellproliferation zur Optimierung der Osteogenese, induzieren sollen, um die Regeneration des Gewebes aktiv zu fördern. Somit wird neben der bloßen Ersatzfunktion (bioinerte Implantate) zusätzlich eine Biofunktionalisierung von Implantaten (bioaktive Implantate) angestrebt.

1.3.3 Klassifizierung

Durch den stetig wachsenden Bedarf an Implantaten für unterschiedlichste medizinische Applikationen sowie die zahlreichen Innovationen auf dem Gebiet der Implantatentwicklung, ist ein breites Spektrum verschiedenster Biomaterialien vorhanden. Dabei sind die entsprechenden technischen Anforderungen je nach Funktion und Einsatzort sehr verschieden, weshalb Materialien aus verschiedenen Stoffklassen verwendet werden. Biomaterialien können entweder synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein und in eine der folgenden Klassen eingeteilt werden [14][15][16]:

- Metalle, Metalllegierungen (z. B. Titan, Nickel)
- Keramiken (z. B. Kalziumphosphat- und Oxidkeramiken)
- Polymere (z. B. Polyethylen (PE), Silikon)
- Komposite (z. B. Hydroxylapatit-Titan)
- Biologische Materialien (z. B. dezellularisierte Matrix)

In der Gruppe der Metalle und Metallegierungen, welche zu den am häufigsten verwendeten Biomaterialien im klinischen Bereich zählen, gehört Titan zu den präferiert eingesetzten Werkstoffen. Durch seine Biokompatibilität und weitere positive physikalische Eigenschaften, wie mechanische Stabilität, Elastizität und Korrosionsresistenz, ist Titan ein bereits langjährig etabliertes Biomaterial, welches in einem breiten klinischen Anwendungsspektrum im Bereich des Hartgewebeersatzes zum Einsatz kommt [17]. Hier werden Titan und Titanlegierungen vor allem für die Herstellung von Knochersatzmaterialien im orthopädischen Bereich (Hüft-, Knie- oder Gelenkprothesen) oder der Zahnchirurgie verwendet (siehe Abb. 2). Überdies dienen sie in Form von Schrauben, Drähten oder Marknägeln als Hilfsmittel zur Fixation von Strukturen.

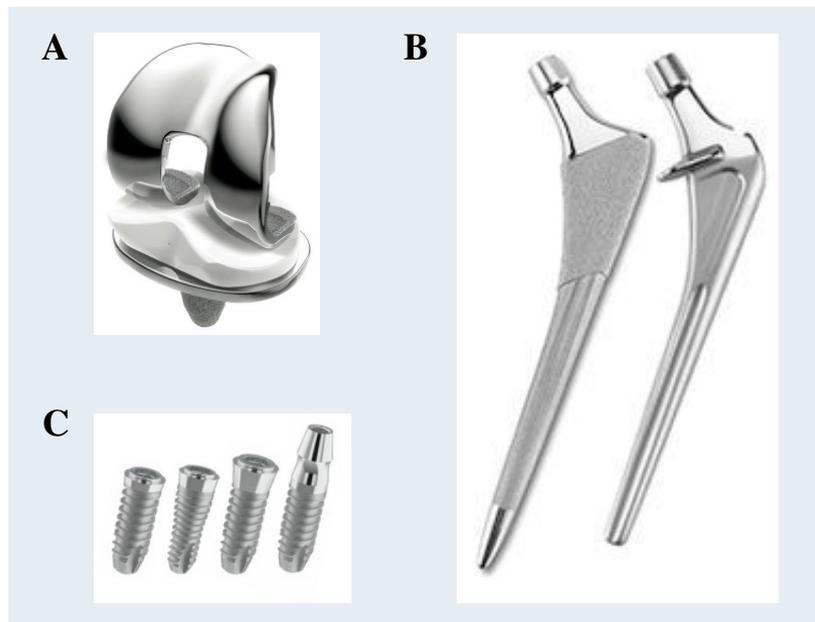


Abb. 2: Endoprothetische Implantate. (A) Kniegelenkprothese (© DePuy Orthopädie GmbH), (B) Hüftschaftprothese (© Smith & Nephew), (C) Schraubenimplantate aus Titan (© 2007-2011 Dr. Markus Schulte)

1.3.4 Funktionalisierung von Biomaterialoberflächen

Galt es vor einigen Jahrzehnten noch primär das geschädigte Gewebe, Organ oder Körperteil durch ein Implantat rein mechanisch (bioinert) zu ersetzen, so sind in der heutigen Zeit wachsender Innovationen und zunehmender Applikationen in der Implantattechnologie die qualitativen und funktionellen Anforderungen an ein Implantat

stetig steigend. Die derzeit in der klinischen Praxis eingesetzten Biomaterialien weisen im Allgemeinen eine gute Biokompatibilität auf und erfüllen die gewünschten mechanischen Anforderungen hinsichtlich der entsprechenden medizinischen Applikation. Neben der Verwendung von rein passiven bzw. bioinerten Biomaterialien liegt der Fokus jedoch zunehmend in der Entwicklung und Herstellung von funktionalisierten Biomaterialien, welche das angrenzende Biosystem aktiv beeinflussen sollen, um die Regeneration des Gewebes zu fördern und eine bessere Gewebekundktivität und -induktivität zu erzielen.

Eine Vielzahl wissenschaftlicher Studien zeigen, dass die Zellphysiologie sowohl durch chemische als auch topographische Eigenschaften eines Biomaterials beeinflusst wird und es in Abhängigkeit dessen sowohl zu phänotypischen als auch funktionellen Veränderungen der Zellphysiologie kommt [7][18][19]. Folglich kann die Biofunktionalisierung von Oberflächen entweder durch chemische oder topographische Oberflächenmodifikationen erreicht werden.

1.3.4.1 Chemische Oberflächenfunktionalisierung

Chemische Oberflächenfunktionalisierungen von Implantaten können entweder von biologischer oder nicht-biologischer Art sein. Untersuchungen zu chemischen Funktionalisierungen biologischer Art beschäftigen sich hauptsächlich mit Applikationen im Bereich der Proteinadsorption. Dazu zählen z. B. Beschichtungen mit Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsproteinen. Unter den Wachstumsfaktoren werden v. a. Mitglieder aus der Transforming Growth Factor- β -Familie, wie TGF- β 1 oder Bone Morphogenetic Protein (BMP) verwendet, welche in ihrer Funktion als wachstumsstimulierende Substanzen, die Knochenregeneration fördern sollen [20][21][22][23]. Hinsichtlich der Oberflächenmodifikation mit Adhäsionsproteinen kommen RGD-Peptide oder extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen oder Fibronectin, zum Einsatz [24][25][26]. Die vorhandene RGD-Sequenz vermittelt die Bindung an Membranproteine, speziell an die Integrine, und soll so die rezeptorvermittelte Zelladhäsion fördern und dadurch die mechanische Integration des Biomaterials verbessern. Zu den chemischen Oberflächenmodifikationen nicht-biologischer Art zählen z. B. Oberflächenbeschichtungen mit Hydroxylapatit, welches als natürlich in der Knochenmatrix vorkommendes Kalziumphosphat die Knochenregeneration nach erfolgter Implantation erleichtern soll [27][28]. Weiterhin können auch verschiedene physikalische

Plasmen für die Oberflächenfunktionalisierung von Implantaten verwendet werden. Hier zeigten Untersuchungen beispielsweise eine verstärkte Adhäsion von MG-63 Osteoblasten auf plasma-polymerisiertem Allylamin (PPAAm)-beschichteten Titanoberflächen [29] bzw. ein erhöhtes Spreading von MG-63 Zellen auf entsprechend mit Argon-Sauerstoff-Plasma-behandelten Oberflächen [30]. Auch die Beschichtung mit antimikrobiellen Substanzen, wie Antibiotika oder Kupfer, welche eine Besiedlung mit Bakterien und eine postoperative Inflammation reduzieren bzw. vermeiden soll, stellt eine vielversprechende Methode zur Funktionalisierung von Biomaterialien dar [31].

1.3.4.2 Topographische Oberflächenfunktionalisierung

Zellen sind dazu fähig, Strukturen im Mikrometer- bis hin zum Nanometerbereich zu erkennen und entsprechend darauf mit einer Anpassung ihrer Zellphysiologie zu reagieren [32][33][34]. Zahlreiche Studien belegen, dass die Topographie von Oberflächen diverse zelluläre Prozesse, wie z. B. die Zellanhaftung und -adhäsion sowie die sich anschließende Zellausbreitung (Spreading) und Migration beeinflusst [35][36][37][38]. Die Qualität dieser initialen Phase der Zell-Material-Interaktion bestimmt nachfolgende zellbiologische Vorgänge, wie die Regulation von Proliferation und Zelldifferenzierung und ist somit fundamental für das Wachstum und das Überleben der Zellen [7][39]. Die dabei zugrunde liegenden zellulären Prozesse sind wiederum von der Organisation intrazellulärer Strukturen, wie dem Aktinzytoskelett, der Expression von Adhäsionsrezeptoren, den Integrinen, intrazellulär assoziierten Adapterproteinen, wie z. B. Vinkulin sowie von der Sekretion und Komposition von Proteinen der extrazellulären Matrix abhängig, deren Expression in Antwort auf die externen biophysikalischen Stimuli modifiziert ist [39][40][41][42]. Die topographische Modifikation von Biomaterialoberflächen stellt eine etablierte Methode zur Optimierung von Implantatdesigns dar und bietet großes Potential für zukünftige Implantatentwicklungen. Folglich ist die Analyse topographisch-induzierter Effekte auf die Zellphysiologie Gegenstand einer Vielzahl von biologischen und klinischen Untersuchungen [43][44][45].

Die topographische Modifikation von Titanoberflächen wirkt förderlich auf die Osseointegration von Implantaten und folgende Regenerationsprozesse des Knochengewebes [46][47]. Bedingt durch die Art des technischen Herstellungsprozesses

(Lithographie, Ätzprozesse, etc.) können verschiedene Oberflächenstrukturierungen fabriziert werden. Stochastische Oberflächenprofile, d. h. mit zufällig angeordneter Strukturierung, beinhalten meist Oberflächen mit unterschiedlichen Rauigkeitsprofilen, wie beispielsweise polierte, sandgestrahlte oder korundgestrahlte Oberflächen. Mit zunehmenden technischen Innovationen, können überdies auch Oberflächen hergestellt werden, welche regelmäßig geordnete Topographien im Mikro- bis hin zum Nanometerbereich aufweisen.

Der Großteil der wissenschaftlichen Studien, welche sich mit der Analyse des Einflusses der Oberflächentopographie von Biomaterialien auf die Zellfunktion beschäftigen, wurde auf stochastisch strukturierten Oberflächen durchgeführt. Dies basiert auf der Tatsache, dass im Vergleich zu glatten Oberflächen auf rauen Oberflächen eine bessere Knochen-Implantat-Interaktion sowie eine erhöhte Osseointegration stattfinden [17][46]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass raue Oberflächen bereits rein mechanisch betrachtet zu einer besseren Verankerung des Implantats im Knochenbereich führen. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass raue Oberflächen auf Grund struktureller Ähnlichkeiten zur natürlichen Knochenstruktur (mit einer anorganischen Korngröße von 10-50 nm) eine Osseointegration begünstigen.

In-vitro Studien haben gezeigt, dass das Zellverhalten von Osteoblasten auf Titanoberflächen mit unterschiedlichen Rauigkeitsprofilen, d. h. poliert, korundgestrahlt oder sandgestrahlt, hinsichtlich verschiedener zellbiologischer Funktionen, wie Zellanhaftung, Zelladhäsion, Zellproliferation oder auch die Differenzierung der Zellen, rauigkeitsabhängig beeinflusst ist [48][49][50][51][52].

Dabei konnten bereits einzelne Korrelationen zwischen der Rauigkeit stochastisch strukturierter Titanoberflächen und spezifischen Zellfunktionen von MG-63 Osteoblasten, wie Zellwachstum und Expression spezifischer Rezeptoren (Integrine) nachgewiesen werden [48]. Überdies belegen numerische Kalkulationen eine bevorzugte Proteinadsorption an Strukturkanten und -spitzen, hervorgerufen durch das dortige lokale elektrische Feld [53], welches wiederum nachfolgende zelluläre Prozesse, wie die Zelladhäsion, beeinflussen kann.

Neben der Verwendung von Oberflächen mit stochastischen Rauigkeitsprofilen können definierte Oberflächengeometrien zu einer gerichteten Zellausbreitung und -migration führen [54][55]. Untersuchungen auf definiert mikrostrukturierten dentalen Implantaten haben gezeigt, dass die definierte Mikrogeometrie zu einem verminderten Überwachsen mit Epithelzellen und zu einer erhöhten Ausreißkraft (pull-out strength) des Implantats

führen [45]. Dies verdeutlicht das Potential von geometrisch definiert mikrostrukturierten Biomaterialien für klinische Applikationen. Zudem kann der Einsatz definierter Oberflächenstrukturen dazu beitragen Kausalitäten zwischen topographischen Eigenschaften auf individuelle zelluläre Funktionsparameter herzustellen und somit zu einer Vereinfachung entsprechender Korrelationen im Zell-Material-Dialog führen. Dies basiert auf der Tatsache, dass im Gegensatz zu stochastischer Strukturierung, Strukturen mit regulären Oberflächengeometrien sehr gut durch ein limitiertes Set an charakteristischen Parametern (z. B. Länge, Breite, Höhe) beschrieben werden können.

Zusätzlich ist es dabei möglich, eine systematische und schrittweise Änderung der strukturellen Parameter vorzunehmen und so entsprechende Korrelationen zwischen einzelnen physiko-chemischen Eigenschaften und ausgewählten zellbiologischen Aspekten durchzuführen, wie es bereits durch aktuelle Studien belegt wird, in welchen beispielsweise nanostrukturierte Grabenstrukturen für entsprechende Korrelationen verwendet werden [56]. Somit stellt die definierte Strukturierung von Biomaterialien eine potentielle Methode zur Oberflächenfunktionalisierung dar, welche nicht nur die Studie und das Verstehen von Zell-Material-Interaktionen vereinfachen kann sondern auch applikabel für den klinischem Bereich ist.

1.4 Zelluläre Mechanismen in der Zell-Biomaterial-Interaktion

Im biologischen System sind Zellen Bestandteil eines Verbandes und stehen in einer spezifischen Mikroumgebung untereinander und mit Komponenten der sie umgebenden extrazellulären Matrix in struktureller und funktioneller Verbindung.

Beim Kontakt des Biosystems mit einem Implantat ist die Qualität der Interaktion für dessen Akzeptanz, Integration und Langzeitstabilität von entscheidender Bedeutung.

Die Zellanhaftung bzw. Zelladhäsion stellt dabei das initiale Ereignis dar und ist elementar für das Überleben der Zellen und somit Grundlage für den Ablauf aller nachfolgenden Prozesse, wie Spreading, Proliferation oder Differenzierung [57][58]. Der Adhäsionsprozess von Zellen ist ein komplexer Vorgang, welcher eine Vielzahl biologischer Komponenten involviert. Dazu gehören extrazelluläre Matrixproteine, Zellmembranproteine sowie zytoskelettale Proteine, welche in einer funktionellen Einheit miteinander verbunden sind und zusammen interagieren [39] (siehe folgende Abschnitte 1.4.1-1.4.3).

So wird die Zelle befähigt, externe Signale aufzunehmen, diese in das Zellinnere bis hin zum Zellkern zu transduzieren und so durch Änderungen in der Genexpression ihre Physiologie in Antwort auf die äußeren Einflussfaktoren anzupassen.

1.4.1 Extrazelluläre Matrixproteine

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein dynamisches Netzwerk aus Polysacchariden sowie fibrösen und adhäsiven Proteinen, welche von eukaryotischen Zellen synthetisiert und sezerniert wird. Sie weist, je nach Gewebetyp, eine charakteristische Zusammensetzung auf und besitzt eine Vielzahl von Funktionen, wie beispielsweise Formgebung von Gewebe und Organen, Gewährleistung von Gewebeelastizität oder -zugfestigkeit, Reservoir für Signalstoffe, wie z. B. Zytokine sowie - basierend auf der bilateralen Interaktion mit Zellen - in der Signaltransduktion und beeinflusst so diverse zellphysiologische Prozesse, wie z. B. Adhäsion, Migration oder Proliferation und die Expression einzelner Gene [59][60].

Der organische Teil der extrazellulären Knochenmatrix besteht hauptsächlich aus Kollagen und nicht-kollagenen Proteinen (z. B. Fibronectin, Osteonectin, Osteopontin, Bone Sialo Protein, Proteoglykane) (siehe Abschnitt 1.2). All diese Matrixproteine werden von Osteoblasten synthetisiert und sind an der Vermittlung des Adhäsionsprozesses zwischen Zelle und Implantat beteiligt. Die Adhäsion der Osteoblasten erfolgt dabei vorrangig an Fibronectin und Kollagen, auch an Vitronectin, jedoch weniger an Laminin [61]. Die adhäsive Wirkung der Matrixproteine basiert dabei auf dem Vorhandensein der RGD-Sequenz bei einigen dieser Proteine (u. a. bei Fibronectin, Kollagen, Bone Sialo Protein, Osteopontin), welche diese zur Bindung an die spezifischen Adhäsionsrezeptoren der Zellmembran - den Integrinen - befähigt und durch diese rezeptorvermittelte Zelladhäsion die Fixation der Zellen am Biomaterial bewirkt [62][63]. Auch das lineare, negativ geladene Proteoglykan Hyaluronsäure, welches nachweislich von Osteoblasten exprimiert wird, vermittelt v. a. in der initialen Phase des Zell-Biomaterial Kontaktes die Anlagerung und Adhäsion der Zellen an der Materialoberfläche [64]. Glykosaminoglykane können überdies auch chemotaktische Wirkung besitzen, indem sie Wachstumsfaktoren oder Zytokine binden können und dadurch nachfolgende Prozesse, wie Proliferation und Differenzierung der Zellen, beeinflussen [63].

1.4.2 Adhäsionsrezeptoren und Fokaler Adhäsionskomplex

Adhäsionsrezeptoren sind membrangebundene Rezeptoren, welche mit spezifischen Liganden der extrazellulären Matrix oder membranständigen Molekülen von benachbarten Zellen interagieren können. Die Einteilung der Adhäsionsrezeptoren erfolgt in vier Hauptklassen: Selektine, Immunglobuline, Cadherine und Integrine. Diese kommen je nach Zelltyp in unterschiedlicher Zusammensetzung vor. In Osteoblasten konnte bisher lediglich die Expression von Cadherinen und Integrinen nachgewiesen werden [39].

Die *Integrine* gehören zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen in Osteoblasten. Integrine sind heterodimere, transmembrane Rezeptoren, welche aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt sind. Derzeit sind 18 unterschiedliche α - und 8 unterschiedliche β -Untereinheiten bekannt, welche mindestens 24 Heterodimere bilden können [65]. Beide Untereinheiten bestehen aus einer langen extrazellulären, einer membranständigen sowie einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Mit ihrer extrazellulären Domäne können sie verschiedene Matrixproteine, wie Kollagen-I v. a. durch $\alpha1\beta1$ - oder $\alpha2\beta1$ - Heterodimer oder Bone Sialo Protein durch $\alpha V\beta3$ -Heterodimer, binden [65].

Durch die strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und zytoskelettalen Adapterproteinen, welche sich innerhalb der Zelle befinden, besitzen die Integrine eine elementare Bedeutung in der bilateralen „outside-in“ Signalübertragung der Zellen [66][67]. Integrine fungieren so als Mechanotransduktoren von extrazellulären Signalen, welche nachfolgende Prozesse, wie Adhäsion, Zellausbreitung oder Migration dynamisch regulieren und in Folge dessen Zellwachstum und Differenzierung dynamisch beeinflussen können [60][68][69].

Bei der Integrin-vermittelten Adhäsion in Osteoblasten sind die Integrine, zusammen mit weiteren Proteinen, in einem funktionellen Komplex, dem *fokalen Adhäsionskomplex (Fokalkontakt)*, organisiert (siehe Abb. 3). Die Fokalkontakte sind die Adhäsionspunkte zwischen Zelle und Substrat und bestehen aus einer Vielzahl von Proteinen. Die zytosolische Seite der Fokalkontakte wird durch die Integrinrezeptoren repräsentiert, die zytoplasmatische Seite durch diverse assoziierte Adapterproteine, wie u. a. die Strukturproteine Talin, Paxillin oder Vinkulin [70][71]. Daneben sind die Adapterproteine mit weiteren Signalmolekülen, wie Proteinkinasen - z. B. der fokalen Adhäsionskinase (FAK) - und Phosphatasen ko-lokalisiert und vermitteln die Signaltransduktion bis hin zum Zellkern und induzieren so nachfolgend die Regulation der Genexpression [71][72].

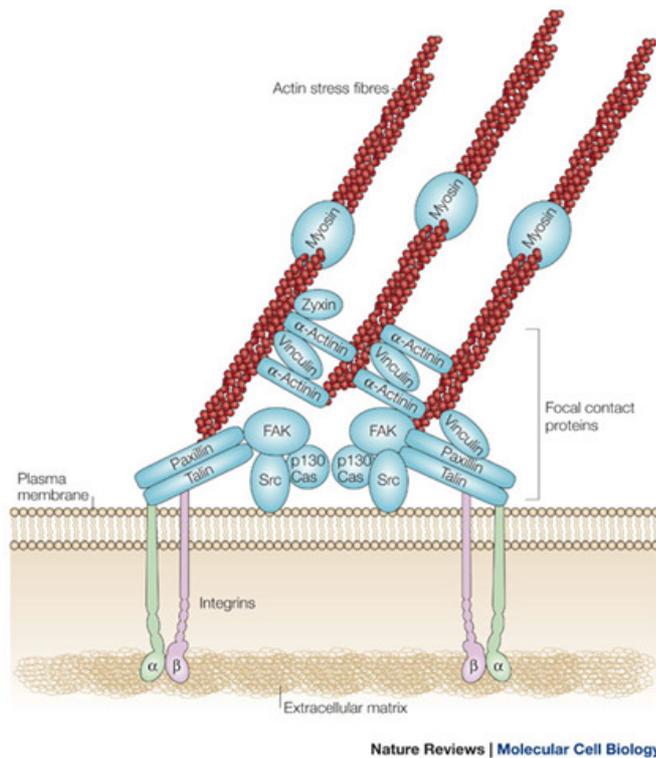


Abb. 3: Fokaler Adhäsionskomplex. Über Fokaladhäsionen ist die Zelle mit ihrer Umgebung verbunden. Dabei vermitteln Integrinrezeptoren über assoziierte Adapterproteine, wie z. B. Vinkulin oder fokale Adhäsionskinase (FAK), welche wiederum mit intrazellulären Strukturen - wie dem Aktinzytoskelett - in Verbindung stehen, die Transduktion extrazellulärer Signale ins Zellinnere (Abbildung aus Mitra et al. [73]).

Vinkulin ist eines der Hauptstrukturproteine in Fokaladhäsionen. Es ist ein membranständiges zytoskelettales Protein, welches die Verbindung integraler Proteine der Zellmembran, wie z. B. den Integrinen, mit den intrazellulären Aktinfilamenten des Zytoskeletts vermittelt [70][74]. Auf Grund dieser Funktion und des prominenten Vorkommens in fokalen Adhäsionskomplexen, kann es als repräsentatives Protein für die qualitative und quantitative Beurteilung der Ausbildung von Fokalkontakten dienen. Zusammen mit Talin und α -Aktinin verbindet es das F-Aktin mit der Plasmamembran der Zelle und beeinflusst so die Organisation von Aktinfilamenten, welches nachfolgend funktionelle Auswirkungen auf die Zellphysiologie hat [71][72][42].

1.4.3 Intrazelluläre Strukturen - Aktinzytoskelett

Das Aktinzytoskelett ist Bestandteil aller eukaryotischen Zellen und das Aktin zudem das dort am häufigsten vorkommende Strukturprotein. Aktinfilamente (filamentöses Aktin, F-Aktin) entstehen durch die Polymerisation einzelner, jeweils 43 kDa großer, globulärer

Monomere (G-Aktin) zu einer verdrehten Helix [75]. Die so entstandenen Aktinfilamente bilden als Mikrofilamente den Hauptbestandteil des intrazellulären Zytoskeletts. Die Regulation der Kinetik der F-Aktin Formation sowie der räumlichen Organisation der Aktinfilamente unterliegt einer strikten intrazellulären Kontrolle, wobei bei diesem dynamischen Prozess mehr als hundert aktinbindende Proteine (ABP) beteiligt sind [76][77].

Das Aktinzytoskelett übernimmt in der Zelle zahlreiche wichtige Funktionen: es ist bestimmend für den Großteil der mechanischen Eigenschaften der Zellen und dient der Aufrechterhaltung und Stabilisierung der Zellform [77]. Die dynamische Regulation des Aktinzytoskeletts ist essentiell für die Adhäsion von Zellen untereinander als auch zum extrazellulären Substrat sowie von zentraler Bedeutung für Zellausbreitungs- und Migrationsprozesse, Zellteilung, endozytotische Vorgänge sowie Apoptose [78][79][80][81][82]. Die Aktinfilamente in der Zelle sind Orte des intrazellulären Stoff- und Organellentransportes und stehen über die Kernmembranen in Verbindung zum Zellkern und können so über dynamische Veränderungen deren Organisation zu Änderungen in der Genexpression und somit zu einer modifizierten Zellphysiologie beitragen. Durch die Verbindung mit den fokalen Adhäsionskomplexen der Zelle wird über das Aktinzytoskelett die Transduktion extrazellulärer Signale und mechanischer Kräfte ins Zellinnere vermittelt [83]. Diese Vielzahl an elementaren Funktionen macht das Aktin bzw. die Aktinfilamentnetzwerk zu einer funktionell hoch bedeutsamen und zentralen Schlüsselkomponente in zellphysiologischen Prozessen. Bezüglich des Einflusses extrazellulärer Stimuli auf die dynamische Regulation des Aktinzytoskeletts zeigen Studien, dass eine mechanische Stimulation, beispielsweise verursacht durch hydrostatische Kompression, sowohl zu einer erhöhten Aktinexpression als auch zur einer vermehrten Ausbildung von Aktinfilamenten hinsichtlich Anzahl und Durchmesser führt [84]. Eine andere Studie zeigt, dass die Ausübung eines hohen mechanischen Druckes in einer Distorsion bzw. zu einem Abbau kortikaler Aktinfilamente führt, was jedoch nach Verminderung des Druckes wieder reversibel ist [85]. Auch hinsichtlich der Oberflächentopographie von Biomaterialien als externer Stimulus konnte gezeigt werden, dass es zu phänotypischen Veränderungen des Aktinzytoskeletts kommt, welche wiederum funktionelle Veränderungen in der Zelle nach sich ziehen [86][87]. Somit kommt dem Aktinzytoskelett und insbesondere dessen struktureller Organisation eine wesentliche Rolle in der Vermittlung externer Signale, wie beispielsweise induziert durch die Interaktion zwischen Zelle und Biomaterial, zu.

1.5 Ziel der experimentellen Arbeit

Die Qualität der Interaktion zwischen Zellen und einem Implantat ist für dessen Integration in den Körper von entscheidender Bedeutung. Diese Wechselwirkungen werden dabei maßgeblich durch die spezifischen physiko-chemischen Eigenschaften des Biomaterials bestimmt. Obwohl diverse Studien zeigen, dass die Mikro- und Nanotopographie von Implantatoberflächen einen wesentlichen Einfluss auf die Zellphysiologie des angrenzenden Biosystems besitzt, sind die genauen molekularen Mechanismen die dieser Interaktion zugrunde liegen, noch weitgehend unklar und quantitative Korrelationen individueller Zellfunktion mit ausgewählten Materialcharakteristika bis heute ungenügend. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es daher, die komplexen Zellfunktionen von humanen MG-63 Osteoblasten in Abhängigkeit physikalischer, chemischer und elektrischer Eigenschaften definiert mikrostrukturierter Titanoberflächen, als exemplarische Modelloberflächen, zu untersuchen. Der Einsatz von Oberflächen mit regulären Oberflächengeometrien soll dabei der Vereinfachung des Auffindens von Zusammenhängen in der Zell-Material-Interaktion dienen und ist somit als fortschrittlicher Ansatz zu bestehenden Studien mit stochastisch strukturierten Oberflächen anzusehen. Dabei soll ein umfassendes Spektrum zellulärer Aspekte in Abhängigkeit definiert mikrostrukturierter Titanoberflächen analysiert werden, wobei sowohl phänotypische als auch funktionelle Aspekte untersucht werden sollen.

Diese zellbiologischen Untersuchungen beinhalten die Betrachtung initialer Zellfunktionen, wie Zelladhäsion und Zellausbreitung (Spreading), gefolgt von der Auswertung weiterer morphometrischer Parameter, speziell des zellulären Phänotyps und der Ausrichtung der Zellen. Ein wesentliches Kriterium zur Beurteilung der Wechselwirkungen zwischen Zellen und Biomaterial ist die Ausbildung von Fokalkontakten, welche nicht nur als Verankerungspunkte der Zellen mit der Extrazellulären Matrix dienen sondern auch die Transduktion mechanischer Signale vermitteln. Um die Ausprägung von Fokaladhäsionen zu untersuchen, wird sowohl das Adapterprotein Vinkulin als auch die Expression von Integrinen, als wichtige Rezeptoren in der Zell-Material-vermittelten Signaltransduktion, analysiert. Die Organisation intrazellulärer Strukturen, speziell des Aktinzytoskeletts, ist essentiell für viele zellphysiologische Funktionen, wie Zellmigration, Zellteilung oder endozytotische Vorgänge. Auf Grund dieser zentralen Funktion des Aktinzytoskeletts wird eine eingehende qualitative als auch quantitative Bestimmung der Ausbildung des

Aktinfilamente in Abhängigkeit der Mikrotopographie der Titanoberflächen vorgenommen. Die quantitative Betrachtung erfolgt mit Hilfe einer eigens dafür erstellten Software, welche während der Arbeit innerhalb des Graduiertenkollegs durch Dr. rer. nat. H. Birkholz entwickelt wurde und so umfassende Daten zur Bewertung der Aktinfilamentformation liefert. Die Fähigkeit von Zellen sich zu vermehren und zellspezifische Proteine zu exprimieren und sekretieren stellt die Grundvoraussetzung für ein erfolgreiches Zusammenspiel zwischen Biomaterial und Biosystem dar. Daher sollen funktionelle Parameter, speziell die Proliferationsaktivität und die Expression der knochenspezifischen Matrixproteine Kollagen und Bone Sialo Protein (BSP) in Abhängigkeit der Oberflächentopographie quantitativ bestimmt werden.

Die zusätzliche Durchführung einer elektrochemischen Oberflächencharakterisierung der Titanoberflächen zur Gewinnung spezifischer physiko-chemischer Materialparameter, wie Benetzbarkeit und Oberflächenenergie, ermöglicht zusammen mit den ermittelten zellbiologischen Daten die übergreifende Betrachtung und nachfolgende Bewertung einzelner Aspekte der Zell-Material-Interaktion. Dadurch sollen mögliche Zusammenhänge zwischen der Zellfunktion von MG-63 Osteoblasten auf definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen mit spezifischen Materialparametern aufgedeckt werden. Das Auffinden etwaiger Korrelationen leistet einen wichtigen Beitrag um Vorgänge an der Grenzfläche zwischen Biomaterial und Zellen aufzuklären und kann somit zu zukünftigen Optimierungen von Implantatoberflächen für eine bessere Integration im Körper beitragen.

2 Materialien

2.1 Chemikalien / Reagenzien

Tab. 1: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories GmbH
Aqua dest.	Baxter S.A.
Azeton	J.T. Baker
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA
CDP-Star Detektionslösung	Roche Deutschland Holding GmbH
Cellfix™	Becton Dickinson
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA
DMEM	Life Technologies GmbH
DMSO	Merck
Ethanol 70 %	Universitätsmedizin Rostock, Zentralapotheke
FACS Flow	Becton Dickinson
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Gentamicin	Ratiopharm
Glutaraldehyd	Merck KGaA
Glyzerol	Merck KGaA
Glyzin	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem GmbH

Tab. 1: Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Methanol	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natrium-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Paraformaldehyd (PFA) (95%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phenol	Merck KGaA
PBS	PAA Laboratories GmbH
PBS (inkl. Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Universitätsmedizin Rostock, Zentralapotheke
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNase	Life Technologies GmbH
SDS	Merck KGaA
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,02 %)	PAA Laboratories GmbH
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.2 Kits und Assays

Tab. 2: Kits und Assays

Kit / Assay	Hersteller
Cell Titer 96 Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay	Promega Corporation
Cell Lysis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH
PKH-26 Red Fluorescent General Cell Linker Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.3 Antikörper

Tab. 3: Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Methode ¹	Verdünnung	Spezies ²
Phalloidin-TRITC	Sigma Aldrich-Chemie GmbH	IFM	1:10	
β-Aktin	Santa Cruz Biotechnology Inc.	WB	1:1000	M
BSP-2	Acris Antibodies GmbH	WB	1:1000	K
IgG1	BD Biosciences	FACS	1:6	M
CD49b	Immunotech	FACS	1:6	M
CD49c	Immunotech	FACS	1:6	M
CD29	Immunotech	FACS	1:6	M
CD29	Beckman Coulter GmbH	IFM	1:20	M
CD61	Immunotech	FACS	1:6	M
Kollagen-I	Rockland	WB	1:3000	K
Vinkulin	Sigma Aldrich-Chemie GmbH	WB	1:1000	M
Vinkulin	Sigma Aldrich-Chemie GmbH	IFM	1:100	M

¹IFM. = Immunfluoreszenzmikroskopie, FACS = Durchflusszytometrie, WB = Western Blot

²K = Kaninchen, M = Maus

Tab. 4: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Methode ³	Verdünnung	Spezies ⁴
Maus-IgG1 (Fab2)	Sigma Aldrich-Chemie GmbH	FACS	1:16	S
Maus-IgG-Alexa Fluor 488	Molecular Probes	IFM	1:300	Z
Maus-IgG-AP-konjugiert	DAKO	WB	1:10000	Z
Kaninchen-IgG-AP-konjugiert	DAKO	WB	1:10000	Sw
Maus-IgG-Cy3	Jackson Immuno Research	IFM	1:300	K

³IFM. = Immunfluoreszenzmikroskopie, FACS = Durchflusszytometrie, WB = Western Blot

⁴K = Kaninchen, S = Schaf, Sw = Schwein, Z = Ziege

2.4 Medien, Lösungen, Puffer

Trypsin-EDTA: 0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (w/v) in PBS (PAA Laboratories GmbH)

PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (Universität Rostock, Klinikum-Zentralapotheke):

4,335 g NaCl
 0,1 g KCl
 0,575 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,1 g KH₂PO₄
 0,05 g CaCl₂ x 2 H₂O
 Aqua dest. ad 0,5 l

Einbettmedium:
 30 g Glyzerin
 12 g Polyvinylalkohol
 30 ml Aqua dest.
 0,5 g Phenol
 Substanzen mischen und 12 h bei 40-45 °C inkubieren
 60 ml Tris 0,1 M pH 8,5
 Lagerung bei 4 °C

Materialien

Lämmli-puffer: 62,5 g Tris-HCl (pH 6,8)
 5 mm EDTA
 10 % Glyzerol
 2 % SDS
 2 % β -Mercaptoethanol

Puffer für Western Blot

Waschpuffer pH 7,4 (TBS): 4,84 g Tris (10 mM)
 2,32 g NaCl (10 mM)
 4 ml Tween 20 (0,1 %)
 Aqua dest. ad 4 l

Blockpuffer: 285 ml Waschpuffer (TBS)
 15 g Magermilchpulver

Laufpuffer pH 8,3: 27,27 g Tris (75 mM)
 126,9 g Glyzin
 9 g SDS (10 mM)
 Aqua dest. ad 3 l

Assaypuffer: 1,21 g Tris (10 mM)
 0,584 g NaCl (10 mM)
 2,03 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (20 mM)
 Aqua dest. ad 1 l

Transferpuffer: 9 g Tris
 43,5 g Glyzin
 Aqua dest. ad 3 l

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
2 ml Pipetten (serologisch)	Greiner Bio-One GmbH
5 ml Pipetten (serologisch)	Greiner Bio-One GmbH
10 ml Pipetten (serologisch)	Greiner Bio-One GmbH
15 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
25 ml Pipetten (serologisch)	Greiner Bio-One GmbH
50 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG
BD Falcon 5 ml Polystyrene Tubes	BD Biosciences
Cellstar 24-Wellplatte	Greiner Bio-One GmbH
Deckgläser (20 x 20 mm)	Gerhard Menzel GmbH
flexiPERM Zellkultureinsatz (ø 12 mm)	Sarstedt AG & Co.
Fotofilm	Agfa Gaevert
Nunc 4-Wellplatte	Nunc GmbH & Co. KG
Objekträger (76 x 26 mm)	Gerhard Menzel GmbH
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific, Inc.
PVDF.Membran	Roche
T 25-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH
T 75-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH

2.6 Geräte

Tab. 6: Geräte

Gerät	Hersteller
Axiovert-Mikroskop 40C	Carl Zeiss AG
BD FACSCalibur Flow Cytometer	BD Biosciences
CASY Cell Counter	Roche Deutschland Holding GmbH
CO ₂ -Begasungsbrutschrank CB 150	Binder GmbH
DIGIDROP Goniometer	GBX Instrumentation Scientifique
LSM 410	Carl Zeiss AG
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH
Pipetboy Comfort	Integra Biosciences GmbH
Sicherheitswerkbank Safeflow 1.2	Nunc GmbH & Co. KG
Ultraschallreinigungsgerät Sonorex Digitec	Bandelin
Vacusaft Comfort	Integra Biosciences GmbH
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG

2.7 Titanoberflächen

Für die Experimente wurden definiert mikrostrukturierte Titanoberflächen, welche reguläre, periodisch wiederholende Oberflächengeometrien aufwiesen, verwendet.

Im Speziellen waren dies (i) Oberflächen mit einer Pfostenstrukturierung in den Dimensionierungen: $3 \times 3 \times 5 \mu\text{m}$ (SU-8 3x3) und $5 \times 5 \times 5 \mu\text{m}$ (SU-8 5x5) (Länge x Breite x Höhe pro Pfosten) mit einem entsprechenden Pfostenabstand von $3 \mu\text{m}$ und $5 \mu\text{m}$ sowie (ii) eine Grabenstruktur in der Dimensionierung: $2 \times 2 \mu\text{m}$ (Gabenbreite x Grabentiefe) mit einem Grabenabstand von jeweils $2 \mu\text{m}$ (G-2-2).

Die Fabrikation der Oberflächen mit der Pfostenstruktur erfolgte durch die Universität Tübingen. Die Grabenstrukturen wurden kommerziell vom Zentrum für Mikrotechnologie ZFM, Chemnitz bezogen.

Alle Proben wurden durch Mikrostrukturierung von Siliziumwafern ($\varnothing 150 \text{ mm}$) hergestellt. Der technische Herstellungsprozess ist den Kapiteln 2.7.1 und 2.7.2 zu

entnehmen. Nach abschließender Beschichtung mit Titan (Schichtdicke: 100 nm) wurden die Siliziumwafer geschnitten, so dass gleich große Proben mit einer jeweiligen Größe von 10 x 10 mm erhalten wurden (siehe Abb. 4).

Die qualitative Kontrolle der Proben wurde mit Hilfe der Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FEI XL-30 FEG, FEI; FE-SEM Supra 25, Carl Zeiss AG) durchgeführt. Als Referenz für die zellbiologischen Untersuchungen dienten unstrukturierte, planare Titanoberflächen (Ti-Ref), welche analog zum Herstellungsprozess fabriziert wurden. Vor der Kultivierung mit Zellen wurden die Titanoberflächen in 70% Ethanol gereinigt und für 15 min in PBS (PAA Laboratories GmbH) gewaschen.

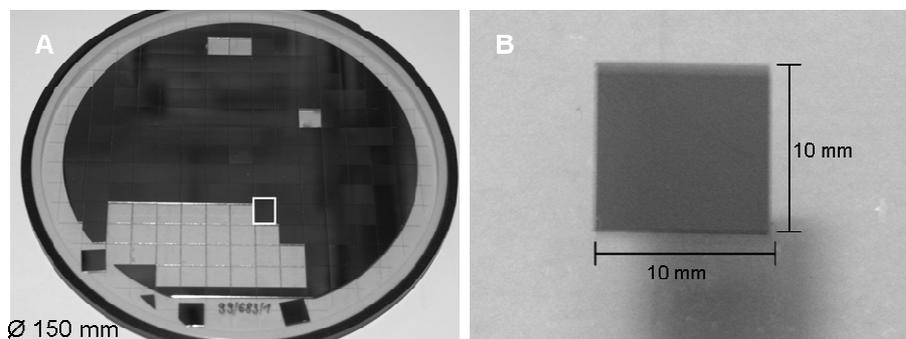


Abb. 4: Größe und Dimensionierung der fabrizierten Titanoberflächen. (A) Wafer Ø150 mm mit Einzelchips von 10x10 mm, (B) Einzelchip 10x10 mm mit Mikrostruktur.

2.7.1 Herstellung der Pfostenstrukturen

Die technische Herstellung der Pfostenoberflächen erfolgte in einem photolithografischen Prozess mit Hilfe des Photolacks SU-8 (MicroChem, Newton, MA, USA) [86]. SU-8 ist ein chemisch amplifizierter, negativ-geladener Photolack, welcher biokompatibel ist [88]. Vollständig quervernetztes SU-8 weist eine hohe mechanische, thermische sowie chemische Stabilität auf, welches besonders bei der hier verwendeten Applikation hilfreich ist [89][90]. Als Basis für die Probenherstellung wurden Siliziumwafer verwendet; diese wurden in einem ersten Schritt mit einem Sauerstoffplasma gereinigt. Anschließend wurde Ammoniumfluorid aufgebracht, welches zur Entfernung der nativen Siliziumoxidschicht und somit einer verbesserten Adhäsion des SU-8 Photolacks auf dem Substrat dienen sollte [91]. Das Aufbringen des Photolacks auf den Siliziumwafer erfolgte mittels des Spin-Coating-Verfahrens von SU-8 (100-fach verdünnt in 1-Methoxy 2-Propylacetat (MPA), im

Verhältnis 1,6: 1 bei 4000 rpm für 30 s) und resultierte in einer finalen SU-8-Schichtdicke von 5 μm . Danach erfolgte ein Backprozess bei 95°C für 1,5 min, nach welchem die Proben langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel entfernt wurde. Abschließend wurden die Siliziumwafer in Einzelproben mit einer jeweiligen Größe von 10 x 10 mm gebrochen. So wurden Kantenartefakte verhindert und eine uniforme Mikrostrukturierung jeder Probe gewährleistet.

Die fabrizierten Oberflächen wiesen nun eine definierte Geometrie von kubischen Pfosten mit vertikalen Seitenwänden auf. Diese Pfosten besaßen folgende Dimensionierungen (Länge x Breite x Höhe pro Pfosten): 3x3x5 μm in einem Abstand von 3 μm (SU-8 3x3) und 5x5x5 μm , Abstand 5 μm (SU-8 5x5). In einem abschließenden Schritt wurden diese mikrostrukturierten Proben in einer Kathodenzerstäubungsanlage (Sputter Coater) gleichmäßig mit einer 100 nm dicken Titanschicht überzogen. Als Kontrolloberflächen wurden planare Siliziumwafer, welche in gleicher Verfahrensweise mit 100 nm Titan beschichtet wurden, verwendet.

2.7.2 Herstellung der Grabenstrukturen

Die Grabenstrukturen wurden kommerziell vom Zentrum für Mikrotechnologie ZFM; Chemnitz erworben. Die Herstellung der Grabenprofile erfolgte durch Reaktives Ionentiefenätzen (engl.: deep reactive ion etching; DRIE) von Siliziumwafern, welche einen Durchmesser von 150 mm und eine Dicke von 500 μm aufwiesen [54][92]. Die so mikrostrukturierten Proben besaßen eine finale Größe von jeweils 10 x 10 mm und wiesen eine definierte Grabenstrukturierung von 2-2 μm (Grabenbreite x Grabentiefe) mit einem Abstand von jeweils 2 μm auf. Als Referenz wurden planare Siliziumoberflächen verwendet. Abschließend wurden die Proben in einer Kathodenzerstäubungsanlage (Sputter Coater) gleichmäßig mit einer 100 nm dicken Titanschicht bedampft.

3 Methoden

3.1 Physiko-chemische Oberflächencharakterisierung

3.1.1 Bestimmung der Benetzbarkeit und Oberflächenenergie

Die Bestimmung der Benetzbarkeit und der Oberflächenenergie der mikrostrukturierten Titanoberflächen erfolgte durch Kontaktwinkelmessungen mittels der Methode des liegenden Tropfens (engl.: sessile drop). Bei dieser Methode wird ein Tropfen konstanten Volumens auf die Festkörperoberfläche aufgebracht und bleibt während der Messung statisch. Die Oberflächenenergie setzt sich additiv aus dem polaren und dispersiven Anteil der molekularen Wechselwirkungskräfte zwischen Flüssigkeit und Festkörper zusammen. Der polare Anteil entsteht dabei entweder durch Wechselwirkungen zwischen zwei Dipolen (Keesom-Wechselwirkung) oder eines Dipols mit einem polarisierbaren Molekül (Debye-Wechselwirkung). Der disperse Anteil hingegen resultiert aus den Wechselwirkungskräften zwischen zwei polarisierbaren Moleküle (Londonsche Kräfte) [93][94]. Der Kontaktwinkel einer Oberfläche wird sowohl von dessen Chemie als auch Topographie beeinflusst [46]. In Abhängigkeit dessen sind somit sind die resultierenden Messergebnisse, inklusive der Berechnung des polaren und dispersiven Anteils, differenziert zu betrachten.

Für die Bestimmung der Benetzbarkeit, welche Auskunft über die Hydrophobie von Festkörperoberflächen gibt, wurde der Kontaktwinkel (in °) gegenüber Wasser bestimmt. Zur Berechnung der Oberflächenenergie wurden Kontaktwinkelmessungen mit den Lösungen Aqua dest., Diiodmethan und Formamid, welche jeweils unterschiedliche Polaritäten besitzen, durchgeführt. Die daraus resultierende Kalkulation der Oberflächenenergie, inklusive des polaren und dispersiven Anteils, erfolgte automatisch mit Hilfe der Software WinDrop++ auf mathematischer Basis der Owens-Wendt Theorie [95]. Für alle Kontaktwinkelmessungen wurde das Goniometer DIGIDROP (GBX Instrumentation Scientifique) im Labor von Prof. Dr. H. F. Hildebrand, Groupe de Recherche sur les Biomateriaux, INSERM U1008, Universität Lille, Frankreich, verwendet. Die Messung der Kontaktwinkel für jede Lösung erfolgte dabei jeweils 5 s nach Tropfenaufgabe auf die jeweilig zu testende Titanoberfläche bei 37 °C. Die Tropfen

besaßen ein Volumen von je 5 µl und die Bestimmung der Kontaktwinkel wurde pro Probe und Lösung je 5-mal wiederholt.

3.1.2 Energiedispersive Röntgenanalyse (EDX)

Zur qualitativen Analyse der Titanbeschichtung auf den mikrostrukturierten Oberflächen wurde die Methode der Energiedispersiven Röntgenanalyse (engl.: energy dispersive X-ray analysis, EDX) mit Hilfe eines Feldemission-Rasterelektronenmikroskopes durchgeführt (FE-SEM Supra 25; Quantax, Bruker AXS Microanalysis). Die EDX-Analyse von Titan erfolgte dabei in einem jeweiligem Probenanalysebereich von 11,4 µm x 8,6 µm unter Verwendung einer Erregungsspannung von 10-20 kV.

Die theoretischen Grundlagen dieser Methode sind detailliert in Kapitel 3.3.2 beschrieben.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Humane Osteoblasten (MG-63)

Für die Experimente wurden humane MG-63 Osteoblasten verwendet (CRL-1427, ATCC), welche von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen wurden. Bei MG-63 Zellen handelt es sich um eine Osteosarkomzelllinie, die funktionelle Eigenschaften eines frühen Osteoblastenstadiums aufweist und ein bereits langjährig etabliertes Modellsystem für repräsentative in vitro Untersuchungen der Physiologie von Osteoblasten darstellt [96][97][98].

3.2.1.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS) (PAA Laboratories GmbH), 1 % Gentamicin (40 mg/ml) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchte. Das fertige Zellkulturmedium inklusive der Zusätze wird im Folgenden als Kompletmedium bezeichnet. Für die zellbiologischen Experimente wurden die Zellen mit einer Dichte von

3×10^4 Zellen/cm² in Kompletmedium auf die mikrostrukturierten Titanoberflächen ausgesät und unter oben angegebenen Kultivierungsbedingungen kultiviert.

3.2.1.2 Passage und Lagerung der Zellen

Für das Passagieren der Zellen sowie die zellbiologischen Versuche wurden die Zellen (im subkonfluenten Wachstumsstadium, siehe Abb. 5) mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen und anschließend für 5 min mit 0,05 % Trypsin-0,02 % EDTA inkubiert, um sie von der Oberfläche der Zellkulturflasche zu lösen. Trypsin ist eine Protease, welche durch proteolytische Spaltung von Zellmembranproteinen, das Ablösen der adhären Zellen bewirkt [99]. Durch Zusatz des Chelatbildners EDTA, welcher zweiwertige Kationen wie z. B. Ca²⁺ und Mg²⁺ binden kann, können die Adhäsionsproteine stabilisiert werden. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in Kompletmedium aufgenommen. Durch die im FKS enthaltenen Protease-Inhibitoren wurde dabei gleichzeitig die Trypsin-EDTA Wirkung gehemmt. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen dann in entsprechender Zellzahl in Zellkulturflaschen bzw. auf die mikrostrukturierten Titanoberflächen ausgesät. Für alle Versuche wurden Zellen der Passagen 5-25 verwendet. War eine längere Lagerung der Zellen notwendig, so erfolgte die Einlagerung in flüssigen Stickstoff. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, 5 min bei 2000 U/min (Hettich Universal) abzentrifugiert und danach in Kompletmedium mit 10 % DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in ein Gefriergefäß (2 ml Kryoröhrchen) überführt und mindestens 24 h auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend bis zur weiteren Verwendung in flüssigen Stickstoff eingelagert.

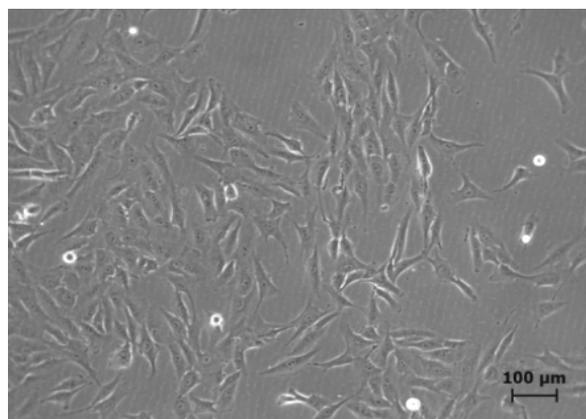


Abb. 5: MG-63 Osteoblasten in subkonfluentem Wachstumsstadium nach 24 h Kultivierungsdauer auf Polystyrol-Zellkulturgefäß (TCPS) (Axiovert 40 C, Carl Zeiss).

3.2.2 Untersuchung der Zellmorphologie

Die Morphologie der humanen MG-63 Osteoblasten wurde mit der Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Nach einer Kultivierungsdauer der Zellen von 30 min sowie 24 h auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 % Glutaraldehyd für 1 h fixiert. Zur Vorbereitung für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte die Kritische Punkttrocknung der Proben. Dazu wurden die Proben zweimal mit 0,1 M Natriumphosphat gespült, gefolgt von einer schrittweisen Dehydratation in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe mit Aceton (30 % 5 min, 50 % 5 min, 75 % 10 min, 90 % 15 min, 100 % zweimal 10 min). Die anschließende Kritische Punkttrocknung erfolgte nach Herstellerangaben im Emitech K850 (EMITECH). Nach dieser Trocknung wurden die Proben aus dem Gerät entnommen und im Vakuum mit einer Kathodenzerstäubungsanlage (Sputter Coater SCD 004, BAL-TEC, Balzers) gleichmäßig mit einer dünnen elektrischen Leitschicht aus Gold überzogen (Schichtdicke 15-50 nm). Danach erfolgte die Analyse der Zellen im Rasterelektronenmikroskop DSM 960A (Carl Zeiss AG) des Elektronenmikroskopischen Zentrums der Universitätsmedizin Rostock bzw. im Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop FE-SEM Supra 25 (Carl Zeiss AG) des Institutes für Gerätesysteme und Schaltungstechnik der Universität Rostock. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellmorphologie in Z-Ebene, wurden die Proben nach 24-stündiger Kultivierung mit den Zellen mittels Behandlung mit flüssigem Stickstoff gebrochen und an den so entstandenen horizontalen Bruchkanten mikroskopiert.

3.2.3 Zeitliche Untersuchung der Zellausbreitung (Spreading)

Für die Bestimmung des zeitlichen Ausbreitungsverhaltens der Osteoblasten in Abhängigkeit der Mikrostruktur der Titanoberflächen wurden kultivierte MG-63 Zellen mit 0,05 % Trypsin-0,02 % EDTA abgelöst und in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Membran der vitalen MG-63 Zellen mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff PKH-26 (General Cell Linker Kit, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 5 min in Suspension. Dann wurden die Zellen auf den Titanoberflächen ausgesät und dort für jeweils 10 min, 30 min, 1 h, 3 h und 24 h kultiviert. Nach zweimaliger Waschung der

Zellen in PBS und der Fixierung mit 4 % PFA für 10 min bei RT, wurden die Präparate auf doppelseitigem Klebeband aufgebracht und in Einbettmedium eingebettet. Die Analyse des Spreadings erfolgte im konfokalen Laserrastermikroskop LSM 410 (Carl Zeiss AG) durch Ausmessen der Zellflächen mittels der geräteinternen Software (Funktion: „area measurement“). Dabei wurde die Zellfläche von jeweils 40 Zellen pro Zeitpunkt und pro Oberfläche bestimmt.

3.2.4 Bestimmung der Zellausrichtung

Zur Untersuchung des Einflusses der Mikrotopographie auf die Zellausrichtung, erfolgte eine quantitative Bestimmung der Zellmorphologie von MG-63 Zellen auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen. Dazu wurden aus rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von Zellen nach 24 h Kultivierungsdauer, die Zellfläche und der Umfang von jeweils 40 Zellen pro Oberfläche mit der Software ImageJ Vers. 1.43 ausgemessen. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der Zellform mittels Berechnung des Formfaktor (F) der Zellen. Der Formfaktor jeder Zelle ergibt sich aus der Berechnungsformel $F = 4\pi A/U^2$, dabei ist A die Zellfläche und U der Zellumfang [100]. Der so kalkulierte Index beschreibt die Zellfläche unter Annahme ihrer Irregularität, dabei beschreibt $F = 1,0$ eine perfekt runde Zelle hingegen $F < 1,0$ eine polygonale Zellform. Dies bedeutet: je kleiner der Formfaktor, desto polygonaler die Zelle.

3.2.5 Quantitative Bestimmung der Zelladhäsion

Um die initiale Adhäsion der Zellen auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen zu quantifizieren, wurden je 200 µl von in Kompletmedium suspendierten MG-63 Zellen mit einer definierten Zellzahl auf die Titanoberflächen ausgesät (30.000 Zellen pro Oberfläche) und für 10 min bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Ablauf dieser Adhäsionszeit wurden die nicht-adhären Zellen des Überstandes von der Oberfläche abgezogen, die Oberfläche einmal vorsichtig mit 100 µl FACS-PBS (FACS Flow, Becton Dickinson) gespült und die Zellen anschließend mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences) akquiriert und die Zellzahl mittels der Software CellQuestPro 4.0.1 (BD Biosciences) analysiert. Durch vorherige Bestimmung der Zellzahl der Zellsuspension zum

Zeitpunkt 0 (= Ausgangswert) konnte nun indirekt - durch Subtraktion der Anzahl der nicht-adhärenen Zellen vom Ausgangswert - der prozentuale Anteil der adhärenen Zellen auf den Oberflächen kalkuliert werden.

3.2.6 Analyse der Integrinexpression

Für die quantitative Bestimmung der Expression der Integrin-Untereinheiten wurden die MG-63 Osteoblasten für 24 h auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 0,05 % Trypsin-0,02 % EDTA abgelöst und für 10 min bei 2000 U/min (Hettich Universal) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit jeweils 20 µl monoklonalem Primärantikörper Anti-Integrin-Maus gegen: $\alpha 2$ (CD49b), $\alpha 3$ (CD49c), $\beta 1$ (CD29), $\beta 3$ (CD61) (Immunotech) bzw. mit Anti-IgG1-Maus (BD Biosciences) für die Kontrolle (jeweils 1:6 in PBS verdünnt). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl FITC-konjugiertem Sekundärantikörper Schaf-Anti-Maus-IgG1 (Fab2) (1:16 verdünnt in PBS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und 10 min bei 2000 U/min (Hettich Universal) zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 500 µl CellFix (Becton Dickinson) resuspendiert und die Zellen im Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences) bei 488 nm mit dem Programm CellQuest Pro Vers. 4.0.1 (BD Biosciences) gemessen und ausgewertet. Die Ergebnisdarstellung erfolgte als quantitativer Wert der Fluoreszenzintensität (mean channel) abzüglich der IgG-Kontrolle [101].

3.2.7 Untersuchung des Proliferationsverhaltens

Die Untersuchung des Einflusses der mikrostrukturierten Titanoberflächen auf die Proliferation bzw. die Zellzyklusphasen der MG-63 Osteoblasten erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse. Dafür wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ auf den Titanoberflächen kultiviert, anschließend mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin-0,02 % EDTA von der Oberfläche abgelöst. Danach erfolgte die Aufnahme der Zellen in 1 ml Komplettmedium und eine Zentrifugation für 10 min bei

2000 U/min (Hettich Universal). Die Zellen wurden dann in PBS resuspendiert und dieser Waschvorgang zweimal wiederholt. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mit 1 ml eiskaltem 70 %igen Ethanol und eine Lagerung über Nacht bei -20°C. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml RNase (1 mg/ml, 37°C) versetzt und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 2000 U/min (Hettich Universal) und die Aufnahme des Zellpellets in 500 µl Propidiumjodid (50 µg/ml) zur Anfärbung der DNA der Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte im FACSCalibur mit der Software CellQuest Pro Vers. 4.0.1 (BD Biosciences), die Zellzyklusphasen wurden mit der Software ModFit LT Vers. 4.0 (BD Biosciences) ausgewertet. Die Proliferationsrate resultierte dabei aus der Bestimmung des Anteils der Zellen in der Synthese + Gap2/Mitose (S+G2/M)-Phase; die Apoptoserate aus der Auswertung des sub-G1 peaks der Zellen (exemplarisches DNA-Histogramm siehe Abb. 6).

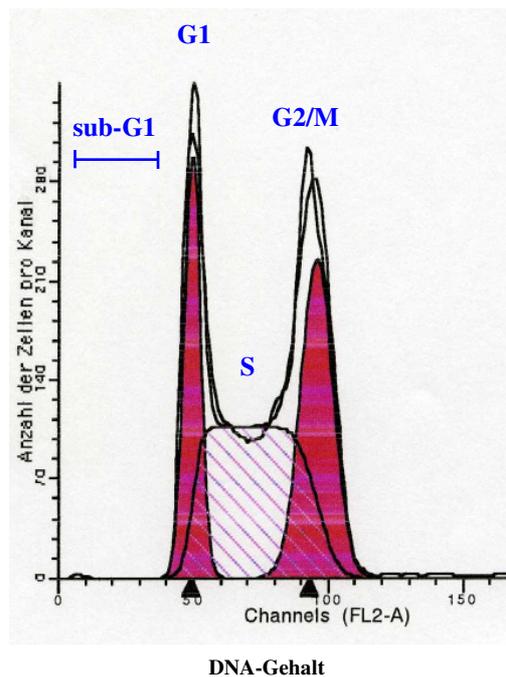


Abb. 6: Exemplarische Abbildung eines DNA-Histogramms, inklusive der Zellzyklusphasen (sub-G1, G1, S, G2/M) gemessen mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie.

3.2.8 Immunzytochemische Färbungen

3.2.8.1 Aktin

Zur Untersuchung der Ausbildung des Aktinzytoskeletts wurden die MG-63 Osteoblasten für 24 h auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % PFA für 10 min bei RT. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS, wurde 0,1 % Triton X-100 für 10 min bei RT hinzugegeben, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Danach wurde nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Zur Anfärbung der Aktinfilamente wurden die Zellen anschließend mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (1:10 verdünnt) (Sigma Aldrich Chemie GmbH) für 60 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Proben mit doppelseitigem Klebeband auf einem Objektträger fixiert und in Einbettmedium eingebettet. Die mikroskopische Analyse der Zellen erfolgte am konfokalen Laserrastermikroskop LSM 410 mittels des internen Helium/Neon-Lasers (Exzitation: 543 nm) und dem ZEISS 63x Wasserimmersion-Objektiv (C-Apochromat 63, 1.25 W / 0.17) (Carl Zeiss AG). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen (512 x 512 pixel) wurden für die anschließende Quantifizierung der Aktinfilamentformation durch die FilaQuant-Software verwendet (siehe Kapitel 3.2.9).

Für die Analyse des Aktinzytoskeletts entgegen der Schwerkraft wurden die MG-63 Zellen initial für 15 min auf den Titanoberflächen kultiviert. Anschließend wurden die Titanoberflächen umgedreht und auf einen flexiPERM® Zellkultureinsatz aus Silikon (ø 15 mm) (Sarstedt AG & Co.) als Abstandshalter gelegt, so dass die restliche Kultivierungszeit der Zellen entgegen der Schwerkraft erfolgte. Nach 24 h Kultivierung entgegen der Schwerkraft, erfolgte die Färbung des Aktinzytoskeletts und dessen konfokalmikroskopische Analyse wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben.

3.2.8.2 Vinkulin

Für die mikroskopische Analyse des fokalen Adhäsionsproteins Vinkulin, wurden die MG-63 Zellen für 24 h auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen kultiviert. Danach wurden

die Zellen mit PBS gewaschen, mit 4 % PFA für 10 min bei RT fixiert und nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS mit 0,1% Triton X-100 für 10 min bei RT permeabilisiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS und die Zugabe des Primärantikörpers anti-Vinkulin-Maus (1:100 verdünnt) (Sigma Aldrich Chemie GmbH), mit welchem die Zellen für 24 h bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubiert wurden. Danach folgte die Zugabe des Sekundärantikörpers Kaninchen-anti-Maus-IgG-Cy3 (1:300 verdünnt) (Jackson Immuno Research) für 60 min im Dunkeln bei RT. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, auf einem Objektträger fixiert und in Einbettmedium eingebettet. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserrastermikroskop LSM 410 mit dem internen Helium-Neon-Laser (Exzitation: 543 nm) im ZEISS 63x Wasserimmersion-Objektiv (C-Apochromat 63, 1.25 W / 0.17) (Carl Zeiss AG).

3.2.8.3 Integrin β -1

Für die konfokalmikroskopische Analyse des β 1-Integrinrezeptors, wurden die MG-63 Zellen nach 24-stündiger Kultivierung auf den Titanoberflächen zweimal mit kalzium- und magnesiumhaltigem PBS (zur Stabilisierung der Ca^{2+} -/ Mg^{2+} -abhängigen Integrinrezeptoren um so ein Ablösen der unfixierten Zellen zu verhindern) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Primärantikörper anti-Integrin- β 1-Maus (CD29; 1:20 verdünnt) (Beckman Coulter) für 30 min bei RT. Nach wiederholtem Waschen mit PBS (+ Ca^{2+} und Mg^{2+}) schloss sich die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-IgG-Alexa 488 (1:300 verdünnt) (Molecular Probes) für 30 min an. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS (+ Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und anschließend bei RT für 10 min mit 4 % PFA fixiert. Nach einem letzten Waschvorgang mit PBS (+ Ca^{2+} und Mg^{2+}) wurden die Proben auf einem Objektträger fixiert und mit Einbettmedium bedeckt. Die konfokalmikroskopische Analyse der Präparate erfolgte am LSM 410 mittels des externen Argon-Lasers bei einer Exzitation von 488 nm unter Verwendung des ZEISS 63x Wasserimmersion-Objektiv (C-Apochromat 63, 1.25 W / 0.17) (Carl Zeiss AG).

3.2.9 Quantifizierung der Aktinfilament-Formation

Um die Formation des Aktinzytoskeletts in MG-63 Osteoblasten in Abhängigkeit der Mikrostruktur der verwendeten Titanoberflächen effizient zu analysieren, wurde die Software FilaQuant verwendet [102][103][104]. Diese Software wurde in interdisziplinärer Zusammenarbeit innerhalb des Graduiertenkollegs welisa durch Dr. rer. nat. Harald Birkholz vom Institut für Mathematik im Rahmen seiner Promotion neu entwickelt. FilaQuant ist eine semi-automatische Software zur Verarbeitung von Bildern zum Zwecke der quantitativen Auswertung des Aktinzytoskeletts in Osteoblasten aus konfokalmikroskopischen Aufnahmen. Die Software ist eine implementierte Win32 Anwendung, welche durch Embarcadero® C++Builder® 2010 erstellt wurde.

Basierend auf einer mathematischer Bildauswertung, werden die konfokalmikroskopischen Aufnahmen in drei Schritten semi-automatisch prozessiert: Vorverarbeitung, Merkmalerkennung und Quantifizierung. In der Vorverarbeitung der Aufnahmen werden zunächst visuelle Bildartefakte wie z. B. Rauschen und irreguläre Hintergrundbeleuchtungen, welche zu einer qualitativen Minderung der Bildauswertung führen könnten, dezimiert. Nach dieser Vorverarbeitung der Bildaufnahmen erfolgt anschließend die Merkmalerkennung anhand Feinsegmentation der Bildpixel, basierend auf spezifischen mathematischen Berechnungs-Algorithmen. Daraus ergibt sich eine Superposition in einzelne Aktinfilamente, welche durch den sich anschließenden letzten Arbeitsschritt hinsichtlich mehrerer Charakteristika quantifiziert werden können. Die resultierenden Parameter zur Beschreibung der Aktinfilament-Formation sind: Gesamtfilamentlänge, durchschnittliche Filamentlänge, maximale Filamentlänge und Orientierung der Aktinfilamente. Der Parameter Orientierungsverteilung beschreibt dabei das mögliche Vorhandensein einer bevorzugten Orientierung der Aktinfilamente. Entsprechende Werte reichen von 0° - 28.65° , wobei ein Wert von 0° exakt eine präferierte Vorzugsrichtung und ein Wert von 28.65° eine uniforme Verteilung der Aktinfilamente repräsentiert.

Für diese Software-gestützte Quantifizierung der Formation der Aktinfilamente in MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen von jeweils 30 Zellen pro Oberfläche nach einer Kultivierungszeit von 24 h ausgewertet.

3.2.10 Proteinextraktion und Western Blot Analyse

Zur Untersuchung der Expression knochenspezifischer Proteine in MG-63 Osteoblasten wurden Western Blot Analysen durchgeführt und die Proteinmengen anschließend semi-quantitativ bestimmt.

Für den Versuch wurden die Zellen 24 h auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen kultiviert. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin-0,02 % EDTA abgelöst, anschließend durch Zugabe von je 50 µl Lysepuffer (Bio-Rad Laboratories GmbH) lysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Die Proteinmengen wurden mit Hilfe eines Bradford-Assays [105] und anschließender Comassie-Färbung [106] bestimmt. So wurde gewährleistet, dass bei der nachfolgenden Probenauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese jeweils gleiche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen wurden. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran gebロットet und anschließend mit 5 % Magermilch (in TBS) geblockt und 6-mal in TBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C. Es wurden folgende Primärantikörper eingesetzt: anti-Kollagen-I-Kaninchen (Rockland) und anti-BSP-2-Kaninchen (Acris Antibodies GmbH), anti-Vinkulin-Maus (Sigma Aldrich Chemie GmbH), anti-β-Aktin-Maus (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Danach wurde ein AP-konjugierter Sekundärantikörper (DAKO) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert.

Die resultierenden Fluoreszenzen, wurden mittels des chemilumineszenten Substrates für die alkalische Phosphatase (CDP-Star-Lösung) detektiert. Die anschließende Quantifizierung der Proteinmengen erfolgte durch densitometrische Auswertung mittels des Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS und der Quantity One® 1-D analysis Software Vers. 4.6.7 für Windows (Bio-Rad Laboratories GmbH).

Für die Detektion jedes Proteins wurde der Versuch jeweils dreimal mit Zellysaten aus drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Konfokale Laserrastermikroskopie

Im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie wird bei der Konfokalmikroskopie nicht die gesamte zu mikroskopierende Probe beleuchtet sondern das einfallende Anregungslicht immer nur auf einen spezifischen Bereich des Präparats (Fokalebene) fokussiert.

Alle Lichtsignale, welche von außerhalb der Fokusebene stammen, werden durch die sich im Konfokalmikroskop befindliche Lochblende (engl.: pinhole) im Strahlengang des detektierten Lichtes inhibiert und somit nicht abgebildet. Daraus resultiert eine hochauflösende optische Abbildung des Objektes.

Bei der konfokalen Laserrastermikroskopie (engl.: Laserscanning microscopy, LSM) wird ein fokussierter Laserstrahl verwendet, welcher die Oberfläche des Präparats punktförmig abrastert. Dabei ist er zu jeder Zeit so fokussiert, dass nacheinander jeder Punkt in der Fokalebene jeweils maximal fokussiert ist. Das Laserlicht wird dazu verwendet, um die sich in der jeweiligen Fokalebene befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen.

Das erhaltene Licht aus dem Fokus wird anschließend durch das gleiche Objektiv auf die Lochblende fokussiert. Von dort gelangt es zu einem, sich hinter der Lochblende befindlichen, lichtsensitiven Strahendetektor (Photomultiplier). Dabei liegen Anregungs- und Detektionsfokus konfokal, also übereinander. Da das erhaltene Signal (Licht) zu jedem Zeitpunkt lediglich aus nur einem Punkt der Probe stammt, ist für das Abbilden des Objektes eine sukzessive Abrasterung der Präparats sowie eine sich daran anschließende nachträgliche Bildzusammensetzung der optischen Informationen der einzelnen Punkte erforderlich. Dabei bestimmen der Durchmesser der Lochblende und die Größe des Objektivs die Schichtdicke (Fokalebene) des zu mikroskopierenden Präparats. Werden mehrere Schnitte in unterschiedlichen Fokusebenen aufgezeichnet, lässt sich das Bild des abgebildeten Objektes nachträglich dreidimensional rekonstruieren.

Für alle hier durchgeführten konfokalmikroskopischen Analysen wurde das konfokale Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskop LSM 410 (Carl Zeiss AG) verwendet, welches folgenden technischen Aufbau besitzt:

- Inverses Auflicht-Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 100“ mit motorisiertem z-Hub

- Externer Argon-Laser (488 nm)
- zwei interne Helium-Neon-Laser (543 nm, 633 nm)
- xy-Scanner mit zwei galvanisch angetriebenen Spiegeln, bestehend aus einem Durchlichtdetektor und zwei Auflicht-Fluoreszenzdetektoren (PMT) mit vorgeschalteten Emissionsfiltern (für PMT 1: Langpassfilter (LP) 515 nm, LP 570 nm; für PMT 2: Bandpassfilter (BP) 510-525 nm, BP 590-610 nm)
- Strahlendetektor mit variabler Lochblende (pinhole)
- Zeiss 63x Öl-Immersionobjektiv Plan-Neofluar (1.25 oil/ 0,17)
- Zeiss 63x Wasser-Immersionobjektiv Plan-Neofluar (1.25 water/ 0,17)
- Angeschlossener PC mit LSM-Software 3.98

3.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie stellt eine gängige Methode in der Oberflächenanalytik dar. Mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskopes (REM) wird ein hochenergetischer Elektronenstrahl erzeugt, welcher fein gebündelt über ein Objekt geführt (gerastert) wird. Die anschließende Auswertung der bei der Abrasterung der Objektoberfläche entstehenden Wechselwirkungen zwischen Elektronen und Objekt führt zur Abbildung des Objektes bzw. der Objektoberflächen und gibt spezifischen Aufschluss über die Objektbeschaffenheit. Im Gegensatz zu lichtmikroskopischen Verfahren wird durch die Nutzung von Elektronenstrahlen, welche geringere Wellenlängen als sichtbares Licht besitzen, eine wesentlich höhere Auflösung und Schärfentiefe bei der Objektabbildung erreicht.

Die Erzeugung des Elektronenstrahls im Rasterelektronenmikroskop erfolgt in einer Elektronenquelle, welche meist aus einem haarnadelförmig gebogenen Wolfram-Draht besteht. Durch dessen Erhitzung kommt es zur Emission von Elektronen, welche anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Die angelegten Beschleunigungsspannungen betragen dabei üblicherweise 8-30 kV. Mit Hilfe von Magnetspulen wird der Elektronenstrahl auf einen Punkt auf dem Objekt fokussiert. Daraufhin erfolgt die Abrasterung der Objektoberfläche. Um dabei unerwünschte Wechselwirkungen mit Atomen oder Molekülen aus der Luft zu vermeiden, wird im Hochvakuum gearbeitet.

Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe kommt es zu verschiedenen Wechselwirkungen mit der Festkörperoberfläche. Einige Elektronen des Strahls (Primärelektronen) dringen in die oberste Oberflächenschicht ein (Eindringtiefe: einige nm) und erzeugen die Emission weiterer Elektronen (Sekundärelektronen). Die Auswertung der Sekundärelektronen mittels des entsprechenden Detektors gibt Auskunft über die Topographie der Objektoberfläche.

Weiterhin können von der Oberfläche reflektierte Primärelektronen (Rückstreuелеktronen) detektiert werden; sie ergeben das Materialkontrastbild. Die Signalstärke ist dabei von der mittleren Ordnungszahl des Materials abhängig. Schwere Elemente induzieren eine starke Rückstreuung und somit heller erscheinende Bereiche analog dazu erscheinen Bereiche mit leichteren Elementen dunkler. Die Auswertung des Rückstreuелеktronenkontrastbildes ermöglicht so Rückschlüsse über die chemische Zusammensetzung bzw. mögliche Inhomogenität des Objektes.

Ein weiteres auswertbares Signal bei der Interaktion zwischen Elektronen und Probe ist die simultan erzeugte Röntgenstrahlung, welche entsteht, wenn ein Primärelektron des Elektronenstrahls ein kernnahes Elektron der Probe aus seiner Position schlägt. Beim nachfolgenden Ersetzen des nun fehlenden Elektrons durch eines aus einer Orbitalschale höherer Energie, wird die Energiedifferenz in Form von Röntgenquanten frei. Die Intensität der emittierten Röntgenquanten ist für jedes Element charakteristisch, wodurch eine quantitative Elementanalyse des Objektes durchgeführt werden kann. Diese - als Energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl.: energy dispersive X-ray analysis EDX) bezeichnete - Methode gibt somit direkten Aufschluss über die Elementzusammensetzung des Objektes.

Bei Feldemission-Rasterelektronenmikroskopen (engl.: field emission-scanning electron microscope, FE-SEM) wird eine sehr feine Kathode verwendet. Durch Anlegen einer sehr hohen elektrischen Feldstärke werden hier die Elektronen aus der Kathode heraus getunnelt und besitzen überdies eine definierte Geschwindigkeit. Dies resultiert auch bei niedrigen Beschleunigungsspannungen in einer sehr guten Bildqualität. Das Arbeiten mit geringen Beschleunigungsspannungen (Minimum: 1 kV) hat die Vorteile, dass eine positive Aufladung der Objektoberfläche weitgehend vermieden wird und somit auf das Bedampfen (Sputtern) mit Edelmetallen wie z. B. Gold verzichtet werden kann und überdies einer Zerstörung der Probe durch hohe Strahlungseinwirkung vorgebeugt wird.

3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, welche auf optischer bzw. elektrischer Sensorik basiert und für die zytometrische Analyse von Zellen, zellulären Partikeln, Proteinen sowie zur Separation einzelner Zellen aus Zellpopulationen eingesetzt wird. Dieses breite Anwendungsspektrum macht die Durchflusszytometrie so zu einer vielseitigen Methode für biologische oder medizinische Fragestellungen [107].

Bei der fluoreszenz-basierten Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Sonderform dieser Methode, bei welcher unterschiedliche Fluoreszenzen / Fluoreszenzintensitäten erkannt werden können und zusätzlich die Zellen in Abhängigkeit von ihren Streulichteigenschaften analysiert.

Die Durchflusszytometrie basiert auf dem Prinzip der Analyse optischer Signale einer Zelle durch einen Laserstrahl bei der Passage. Die Zellen einer Zellsuspension werden einzeln über eine Kapillare angesaugt und gelangen anschließend durch einen die Kapillare umspülenden Hüllstrom (zellfreie Flüssigkeit), welcher die Zellen voneinander trennt, vereinzelt und fokussiert, in eine Mikrokanalküvette aus Quarz oder Glas. Durch diese hydrodynamische Fokussierung wird gewährleistet, dass jede Zelle einzeln den Bereich des Laserstrahls passiert. Das bei dieser Passage durch die Zelle erzeugte Streulicht bzw. Fluoreszenzlicht, wird von einem Detektor erfasst und ausgewertet, wodurch quantitative Ergebnisse über jede analysierte Zelle erhalten werden. Je nach Streuwinkel des abgelenkten Lichtes können dabei Aussagen hinsichtlich spezifischer zellzytometrischer Eigenschaften getroffen werden: Bei einer Lichtstreuung im flachen Winkel (von 0° bis 10°), auch als Vorwärtsstreulicht oder Forward Scatter (FSC) bezeichnet, gibt Auskunft über das Volumen der Zelle, d.h. Zellgröße und -durchmesser. Ist das emittierte Licht im 90° -Winkel gebrochen, das so genannte Seitwärtsstreulicht oder Sideward-Scatter (SSC), können Aussagen über die Granularität der Zelle, der Größe und Struktur des Zellkerns und der Menge der zellulären Vesikel bestimmt werden.

Durch die Markierung spezieller Zellkomponenten, wie Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine, können diese bei Passage nach Anregung durch den Argon-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm quantifiziert werden.

Dabei wird das von den Zellen emittierte Fluoreszenzlicht mit Hilfe verschiedener Blenden und Filter in Farbbereiche aufgetrennt und mit spezifischen Detektoren erfasst und so nach Umwandlung in elektrische Signale mit einer spezifischen Software ausgewertet.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde das Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences), welches u. a. mit einem Argon-Laser (Wellenlänge: 488 nm) ausgestattet ist, verwendet. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software CellQuest Pro Vers. 4.0.1, die Analyse der Zellzyklusphasen mit der Software ModFit LT Vers. 4.0 (BD Biosciences).

3.5 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Messwerte bei unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungen (n) gleicher Versuche erfolgte als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die anschließende statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit Hilfe der SPSS-Software Vers. 15.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Dabei wurden folgende Tests verwendet: Kolmogorov-Smirnov-Test zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung sowie ungepaarter und gepaarter *t*-Test. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant angenommen. Dabei erfolgte die Unterteilung in * $p < 0,05$ (schwach signifikant), ** $p < 0,01$ (signifikant) und *** $p < 0,001$ (stark signifikant).

4 Ergebnisse

4.1 Physiko-chemische Charakterisierung der Titanoberflächen

Zum Auffinden möglicher Zusammenhänge zwischen individuellen Zellfunktionen und spezifischen physiko-chemischen Oberflächeneigenschaften wurden die mikrostrukturierten Titanoberflächen hinsichtlich verschiedener elektrochemischer Parameter charakterisiert. Dazu erfolgte in einem ersten Schritt die qualitative Kontrolle der Proben mittels rasterelektronenmikroskopischer Analyse. Anschließend wurde die Benetzbarkeit sowie die Oberflächenenergie der mikrostrukturierten Titanoberflächen im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche bestimmt. Diese Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln (siehe 4.1.1 - 4.1.3) dargestellt.

4.1.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM)

Zur Überprüfung der Qualität der fabrizierten Mikrostrukturen erfolgte zuerst eine Analyse im Rasterelektronenmikroskop. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der hergestellten mikrostrukturierten Titanoberflächen, bestehend aus den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5, der Grabenstruktur G-2-2 sowie der planaren Referenz (Ti-Ref) sind in Abb. 7 dargestellt.

Bei der rasterelektronenmikroskopischen Betrachtung ist zu erkennen, dass die Mikrostrukturierung der Proben in Dimensionierung und Anordnung sehr gut mit dem gewünschten Zieldesign übereinstimmen. Das Resultat sind definierte Mikrostrukturen mit einer regelmäßigen Geometrie in gleichmäßiger Anordnung.

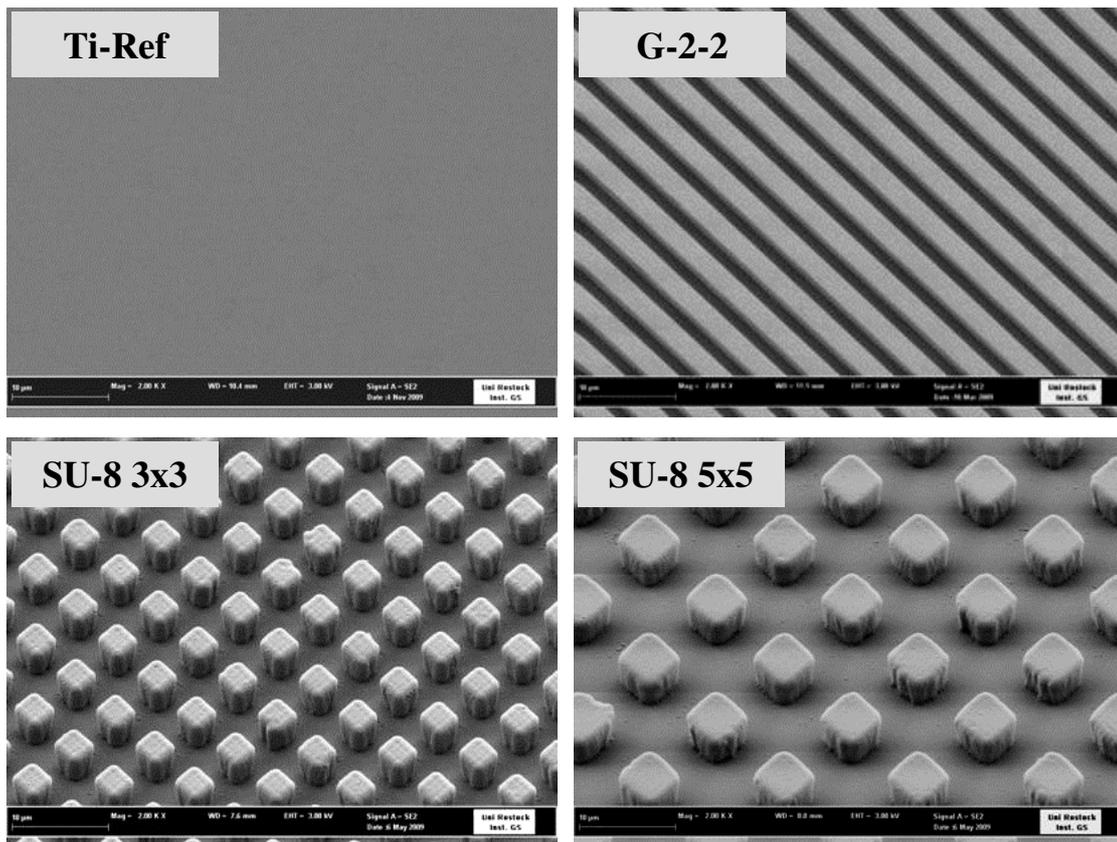


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mikrostrukturierten Titanoberflächen mit regulären Geometrien: planare Titan-Referenz (Ti-Ref), rechteckige Grabenstruktur mit einer Strukturgröße von jeweils $2\ \mu\text{m}$ (G-2-2), kubische Pfostenoberflächen in den Dimensionierungen $3\times 3\times 5\ \mu\text{m}$ (SU-8 3x3) und $5\times 5\times 5\ \mu\text{m}$ (SU-8 5x5) (FE-SEM Supra 25, Carl Zeiss AG, 30° -Aufnahmen) (in Kooperation mit dem Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Universität Rostock, Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von R. Lange).

Bezüglich der Pfostenstrukturierungen der Oberflächen zeigt sich eine geringfügige Abrundung der Pfostenecken, wie in der detaillierten Aufnahme der Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 dargestellt ist (siehe Abb. 8). Dies ist durch die relative kurze Belichtungszeit im lithografischen Herstellungsprozess bedingt, ließe sich jedoch durch den Einsatz einer höheren Belichtungszeit vermindern, welches jedoch wiederum zu Lasten vergrößerter Mikrostrukturen geht [108].

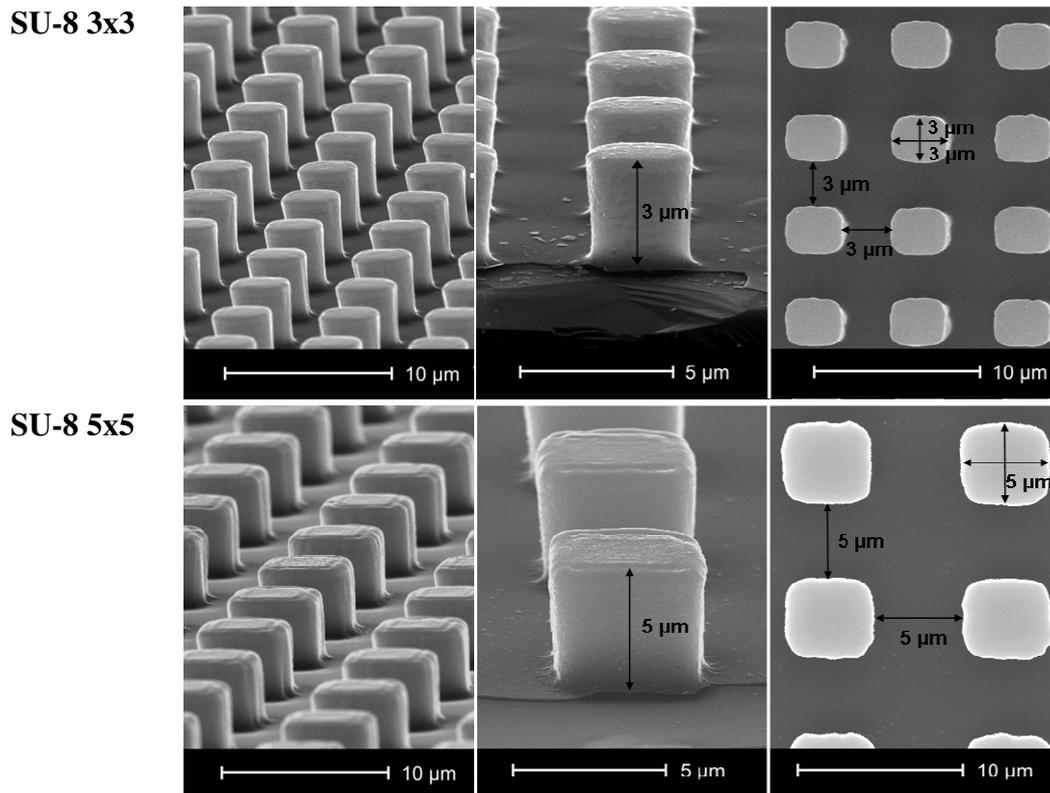


Abb. 8: Dimensionierungen der SU-8 Pfostenoberflächen. Titan-beschichtete SU-8 Pfosten mit einer Größe von $3 \times 3 \times 5 \mu\text{m}$ (SU-8 3x3) und $5 \times 5 \times 5 \mu\text{m}$ pro Pfosten (SU8 5x5) und einem entsprechendem Abstand von $3 \mu\text{m}$ und $5 \mu\text{m}$ (FEI XL-30 FEG, FEI) (in Kooperation mit dem Institut für Angewandte Physik, Universität Tübingen, Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von R. Löffler).

4.1.2 EDX-Analyse der Titanschicht

Zur Untersuchung der Probenqualität hinsichtlich der aufgetragenen Titanschicht auf den mikrostrukturierten Oberflächen, wurde eine Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) von Titan mit Hilfe des Feldemission-Rasterelektronenmikroskopes (FE-SEM Supra 25, Carl Zeiss AG) durchgeführt. Die Ergebnisse der EDX-Messung belegen das Vorhandensein einer homogenen Titanschicht auf der gesamten Probenoberfläche. Dies ist exemplarisch in Abb. 9 am Beispiel der EDX-Analyse von Titan auf der Pfostenoberfläche SU-8 5x5 dargestellt.

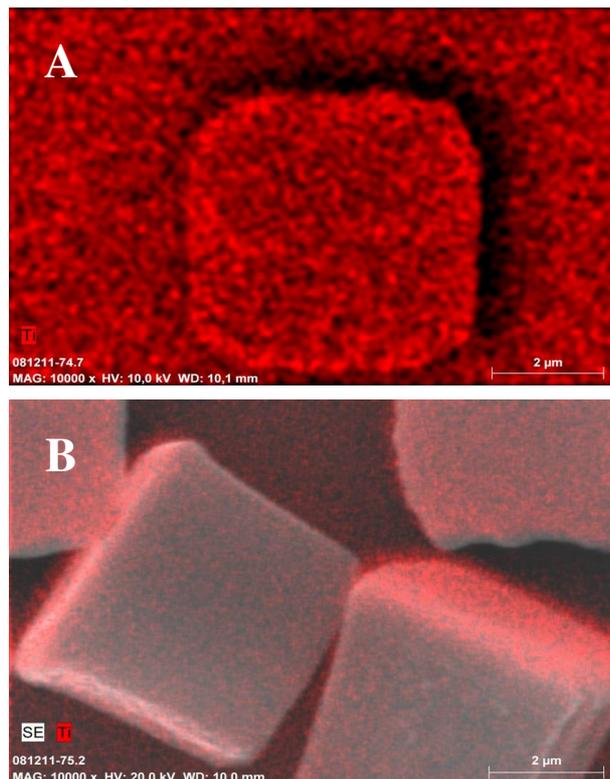


Abb. 9: EDX-Analyse von Titan (rot) auf der Pfostenoberfläche SU-8 5x5. (A) Aufsicht auf einen Einzelpfosten, (B) Seitenansicht der Pfosten (mit FE-SEM-Aufnahme überlagert). Auf den Pfosten ist eine homogene Titanschicht zu erkennen (Quantax, Bruker AXS; FE-SEM Supra 25, Carl Zeiss AG) *(in Kooperation mit dem Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Universität Rostock, Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von R. Lange).*

Bei den mikrostrukturierten Oberflächen treten jedoch leichte Abstufungen hinsichtlich der Dicke der aufgetragenen Titanschicht zwischen den Plateaus und den Seitenwänden der Mikrostrukturen auf. Eine kompakte Titanschicht lässt sich auf den horizontalen Plateaus sowie im oberen Bereich der vertikalen Seitenwände der Strukturen gewährleisten. Aufgrund des Auftretens von Abschattungseffekten während des Beschichtungsprozesses mit der Kathodenzerstäubungsanlage (Sputter Coater) nimmt die Dicke der Titanschicht mit steigender Strukturtiefe etwas ab. Dies stellt jedoch keine signifikante Verminderung der Probenqualität dar, da das Vorliegen einer insgesamt kontinuierlichen Titanbeschichtung erhalten bleibt.

4.1.3 Bestimmung der Benetzbarkeit und der Oberflächenenergie

Die Benetzbarkeit von Oberflächen (Hydrophobie) sowie die Oberflächenenergie sind wichtige physiko-chemische Messgrößen der Materialanalytik, welche sowohl durch

chemische als auch topographische Oberflächeneigenschaften beeinflusst werden können und überdies Auswirkungen auf das zelluläre Verhalten besitzen [46]. Zur Bestimmung dieser Parameter wurden auf der planaren und den pfostenstrukturierten Oberflächen vergleichende Kontaktwinkelmessungen mit Hilfe eines Goniometers (DIGIDROP, GBX Instrumentation Scientifique) durchgeführt, welche Aufschluss über den Einfluss der Mikrotopographie der Titanoberflächen auf deren Benetzbarkeit und Oberflächenenergie geben sollen. Für die grabenstrukturierte Oberfläche G-2-2 war die Bestimmung dieser Parameter nicht möglich, da hier eine anisotrope Benetzbarkeit auftrat, welches eine korrekte Auswertung verhinderte.

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen mit destilliertem Wasser sind in Abb. 10 dargestellt. Die planare Referenzoberfläche (Ti-Ref) weist einen Wasserkontaktwinkel von $83,7^\circ$ auf. Im Vergleich dazu ist der Kontaktwinkel für SU-8 3x3 und SU-8 5x5 mit jeweils $128,4^\circ$ und $122,6^\circ$ signifikant höher. Im Allgemeinen werden Oberflächen mit einem Kontaktwinkel von $<90^\circ$ gegenüber Wasser als hydrophil und solche mit einem Winkel von $>90^\circ$ als hydrophob angesehen [46][109]. Dies impliziert, dass die planare Titanoberfläche folglich einen hydrophileren Charakter besitzt, hingegen beide Pfostenstrukturen (SU-8 3x3 und 5x5) auf Grund ihrer Oberflächentopographie eine höhere Hydrophobie aufweisen.

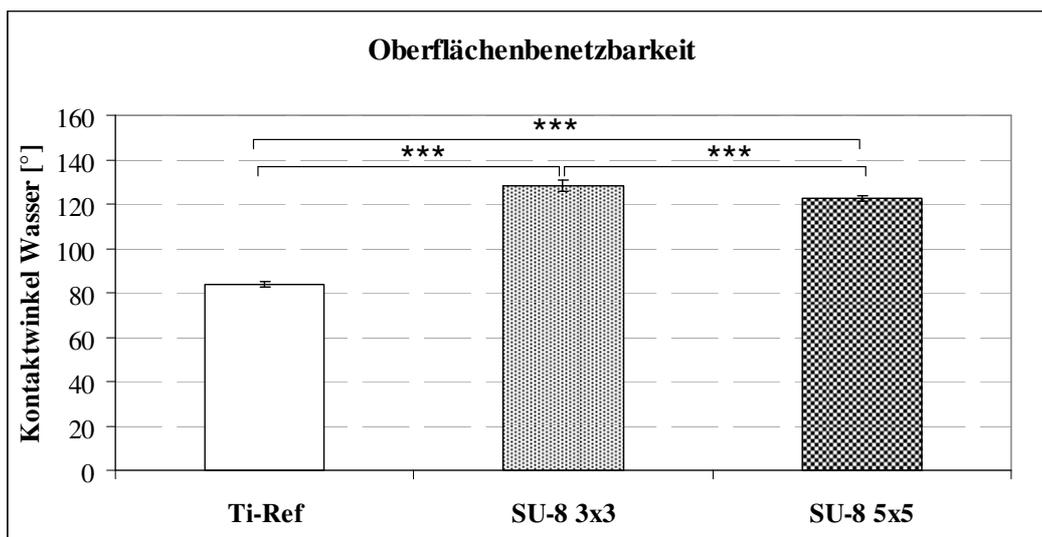


Abb. 10: Bestimmung des Wasserkontaktwinkels auf mikrostrukturierten Titanoberflächen (SU-8 3x3 und SU-8 5x5) im Vergleich zur planaren Referenz (Ti-Ref). Basierend auf der Mikrostrukturierung der Oberfläche ist die Hydrophobie der Pfostenstrukturen ca. 1,6-mal höher, als auf der unstrukturierten Referenzoberfläche (MW \pm SD, *** $p < 0,001$, ungepaarter t -Test, $n = 5$). (DIGIDROP, GBX Instrumentation Scientifique) (in Kooperation mit der Groupe de Recherche sur les Biomateriaux, INSERM U1008, Universität Lille, Frankreich, Prof. H. F. Hildebrand, Dr. Feng Chai).

Die Berechnung der Oberflächenenergie erfolgte mittels Owens and Wendt's Model nach Bestimmung der Kontaktwinkel gegenüber Aqua dest., Diiodmethan und Formamid. Die Ergebnisse aus dieser Berechnung sind in Abb. 11 dargestellt.

Dabei weist die planare Referenzoberfläche (Ti-Ref) die höchsten Werte sowohl für die Oberflächenenergie ($37,3 \text{ mJ/m}^2$), als auch für die polare ($3,2 \text{ mJ/m}^2$) und die dispersive Komponente ($34,1 \text{ mJ/m}^2$) auf. Im Gegensatz dazu ist die Oberflächenenergie der beiden mikrostrukturierten Pfostenoberflächen deutlich geringer. Hier zeigen sich Werte von $25,4 \text{ mJ/m}^2$ für SU-8 3x3 und $25,5 \text{ mJ/m}^2$ für SU-8 5x5. Dabei ist der Anteil der polaren Komponente bei SU-8 3x3 höher als bei SU-8 5x5.

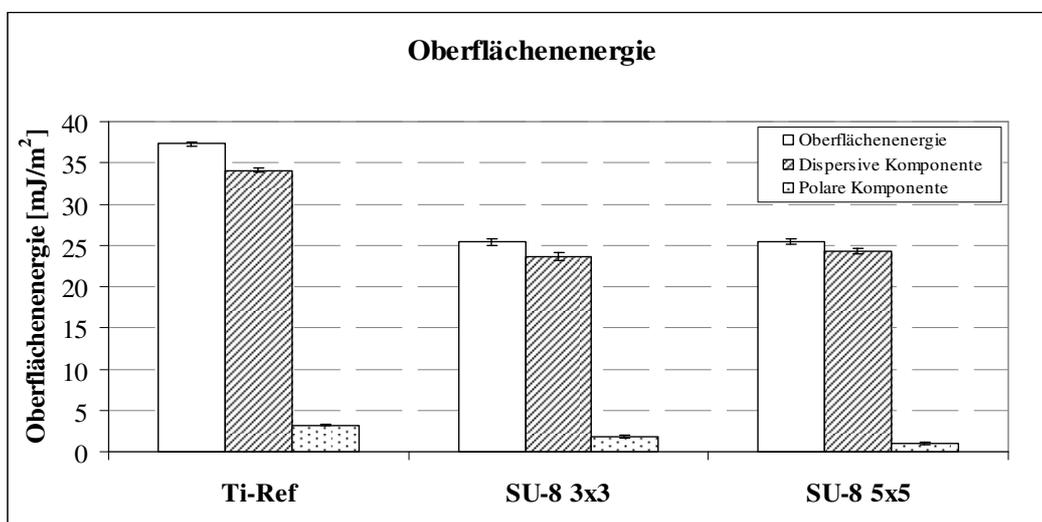


Abb. 11: Berechnung der Oberflächenenergie der mikrostrukturierten Titanoberflächen aus Kontaktwinkelmessungen. Im Vergleich zur planaren Titan-Referenz, ist die Oberflächenenergie als auch der Anteil der polaren Komponente auf den Oberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 deutlich reduziert (MW \pm SD, n = 5) (DIGIDROP, GBX Instrumentation Scientifique (in Kooperation mit der Groupe de Recherche sur les Biomatériaux, INSERM U1008, Universität Lille, Frankreich, Prof. H. F. Hildebrand, Dr. Feng Chai).

4.2 Zellbiologische Untersuchungen

Für die Charakterisierung der Zellphysiologie von MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen wurde ein umfangreiches Spektrum an zellbiologischen Untersuchungen durchgeführt. Diese umfassen die Analyse morphologischer Parameter, wie Zellmorphologie, Zellfläche und Zellausrichtung. Darüber hinaus wurde die Zelladhäsion und die Formation von Fokalkontakten anhand des Adapterproteins Vinkulin untersucht, ebenso erfolgten Expressionsanalysen der

Integrinrezeptoren sowie die Untersuchung des Proliferationsverhaltens und der Expression knochenspezifischer Matrixproteine. Im Fokus der Untersuchungen stand die Ausbildung von intrazellulären Strukturen, insbesondere das Aktinzytoskelett, dessen Ausbildung und Organisation eingehend analysiert und quantifiziert wurde.

Auf Grund der Limitation an Probenmaterial hinsichtlich Menge und zeitlicher Verfügbarkeit im Falle der grabenstrukturierten Oberfläche G-2-2, waren einige wenige der zellbiologischen Versuche für diese Oberfläche lediglich eingeschränkt durchführbar.

4.2.1 Zellmorphometrische Analyse

Zellen besitzen die Fähigkeit sensitiv auf die Oberflächentopographie eines Materials zu reagieren und in Abhängigkeit dieser mit entsprechend morphologisch-funktionellen Änderungen zu reagieren. Spezifische zellmorphologische Parameter resultieren dabei aus der Adaption der Zellen an ihre Umgebung, welches wiederum mit funktionellen Änderungen in Zusammenhang steht (Phänotyp-Funktions-Beziehung). Daher bietet die Auswertung zellmorphometrischer Parameter einen umfassenden Ansatz um Zell-Material-Interaktionen zu analysieren.

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der morphometrischen Untersuchung von MG-63 Osteoblasten in Abhängigkeit geometrisch definierter Mikrostrukturen von Titanoberflächen.

4.2.1.1 Zellmorphologie auf mikrostrukturierten Titanoberflächen

Die Morphologie von MG-63 Osteoblasten wurde nach einer Kultivierungszeit von 30 min und 24 h auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen vergleichend zur planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Die Ergebnisse dieser rasterelektronenmikroskopischen Betrachtungen sind im Folgenden dargestellt.

Zellmorphologie nach 30 min:

Die Analyse der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen nach 30 min zeigt deutliche Unterschiede in der Morphologie der MG-63 Zellen auf geometrisch mikrostrukturierten

Titanoberflächen (G-2-2, SU-8 3x3 und SU-8 5x5) im Vergleich zur planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref).

Bereits nach einer relativ kurzen Kultivierungszeit von 30 min auf den Titanoberflächen sind die Zellen auf der planaren Referenz und auch auf der Grabenstruktur (G-2-2) etwas stärker ausgebreitet als auf den Pfostenoberflächen (siehe Abb. 12). Dabei kommt es bei den Zellen, welche auf der planaren Oberfläche kultiviert wurden bereits zur Ausbildung erster Filopodien. Verglichen dazu sind die Zellen auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 nicht so stark ausgebreitet. Sie besitzen noch einen weitgehend kugeligen Phänotyp, mit welchem sie der Pfostenoberfläche aufliegen.

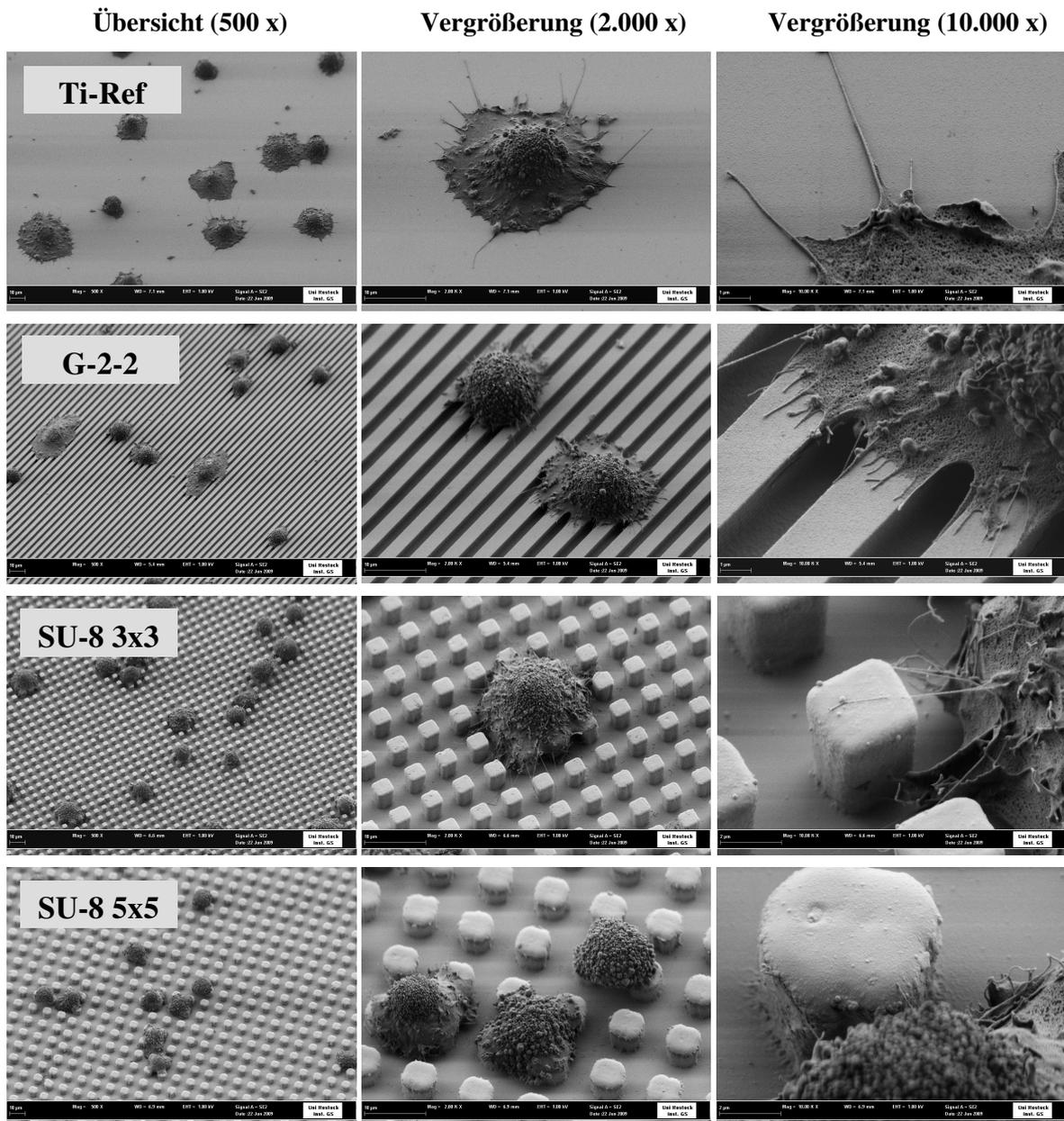


Abb. 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie von MG-63 Osteoblasten nach 30 min Kultivierungszeit auf mikrostrukturierten Titanoberflächen. (FE-SEM Supra 25, Carl Zeiss AG, 30 °-Aufnahmen) (in Kooperation mit dem Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Universität Rostock, Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von R. Lange).

Zellmorphologie nach 24 h:

Nach einer Kultivierungszeit von 24 h werden die bereits anfänglich beobachteten zellmorphologischen Unterschiede noch deutlicher sichtbar (siehe Abb. 13).

Die Zellen auf der planaren Oberfläche (Ti-Ref) sind sehr gut ausgebreitet. Sie besitzen einen flachen und Osteoblasten-typischen Phänotyp und adhären mit der gesamten Zellfläche eng an der Titanoberfläche. Im Gegensatz dazu ist die Zellfläche der MG-63

Osteoblasten, welche auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen G-2-2, SU-8 3x3 und SU-8 5x5 gewachsen sind, deutlich kleiner.

Auch die Zellform der Osteoblasten ist in Abhängigkeit der Mikrostruktur der Oberfläche verändert. Verglichen zur planaren Referenz (Ti-Ref) besitzen die MG-63 Zellen sowohl auf der Grabenoberfläche G-2-2 als auch auf den SU-8 Pfostenoberflächen einen langgestreckten Phänotyp mit langen Zellausläufern, welche sich entlang der Gräben orientieren bzw. auf den Pfostenoberflächen in einem Winkel von 45° und 90° zu den Pfosten ausgerichtet sind [54]. Interessanterweise wird diese Zellelongation durch alle Mikrostrukturen - unabhängig von deren spezifischer Geometrie (Graben gegenüber Pfosten) - induziert.

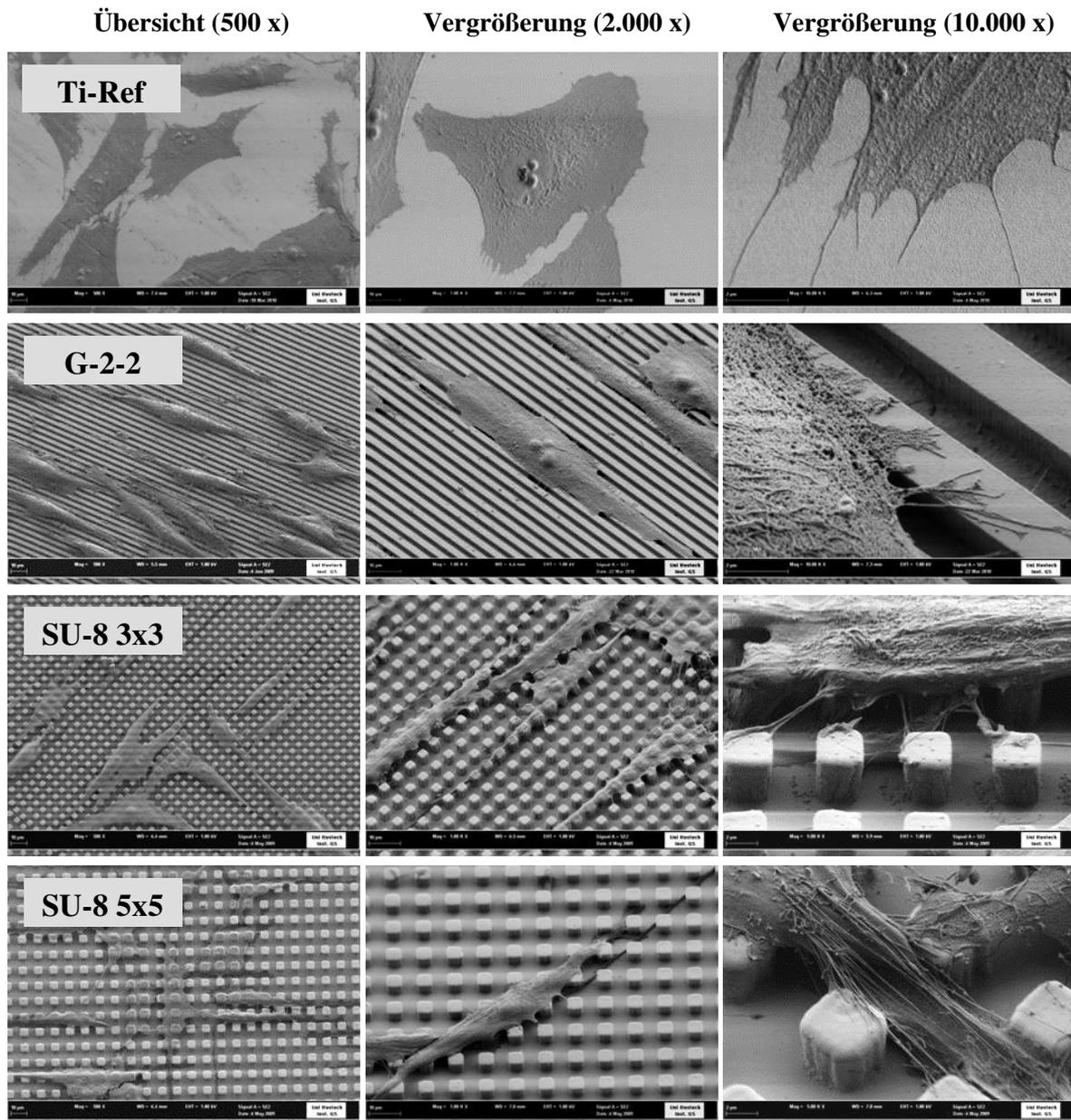


Abb. 13: REM-Darstellung der Zellmorphologie von MG-63 Zellen nach 24 h auf definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen. Im Gegensatz zu Ti-Ref adhären die Zellen auf den Mikrostrukturen G-2-2, SU-8 3x3 und SU-8 5x5 ausschließlich auf den Plateaus der Gräben und Pfosten. Lediglich die Filopodien erreichen die Probenunterseite (FE-SEM Supra 25, Carl Zeiss AG) (in Kooperation mit dem Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Universität Rostock, Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von R. Lange).

Hinsichtlich der Zelladhäsion ist ersichtlich, dass die MG-63 Osteoblasten auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen fast ausschließlich auf den Plateaus der Mikrostrukturen adhären; hier begrenzt sich die Adhäsion auf die Plateaus der Gräben (bei G-2-2) sowie auf die Pfostenplateaus. Lediglich einzelne Filopodien sind fähig die Pfostenzwischenräume zu passieren und somit die Probenunterseite zu erreichen. Dies ist

im vertikalen Querschnitt (Z-Schnitt) der Zellen auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 deutlich zu erkennen (siehe Abb. 14).

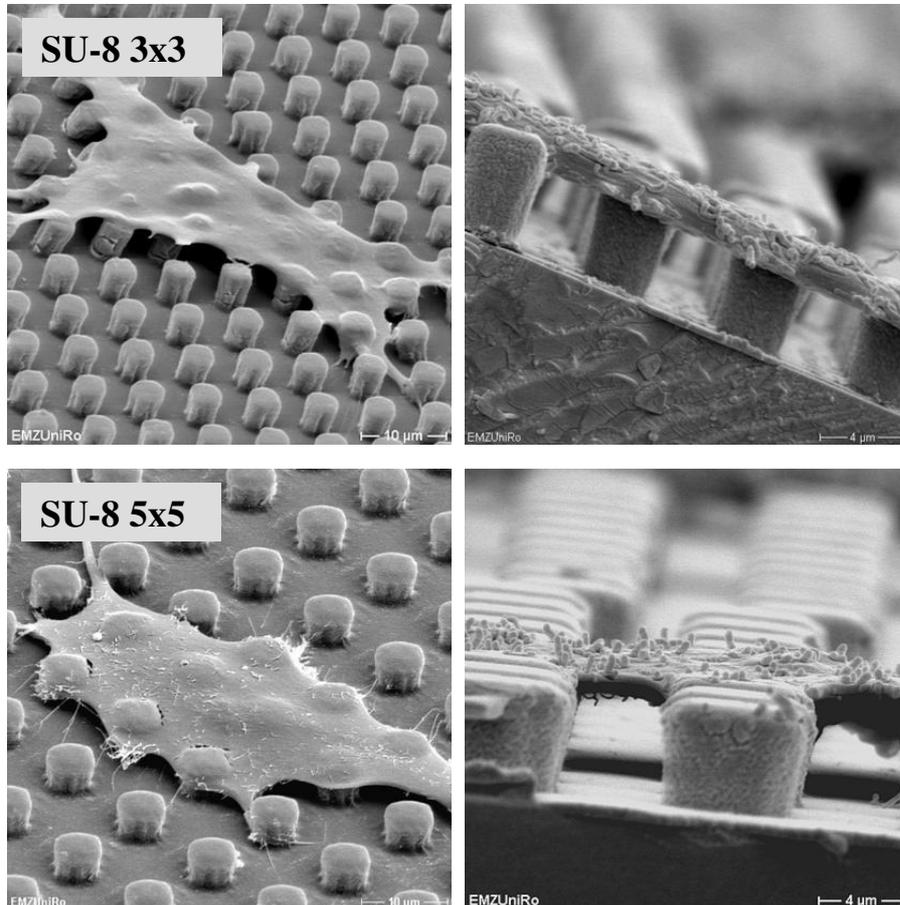


Abb. 14: REM-Aufnahmen der Zellmorphologie von MG-63 Osteoblasten auf SU-8 3x3 und SU-8 5x5 nach 24 h inklusive Z-Schnitt (rechts). Im Z-Schnitt wird deutlich, dass die Zellkörper ausschließlich auf der Pfostenoberfläche adhärirt (DSM 960 A, Carl Zeiss AG, links: 50 °-Aufnahme).

4.2.1.2 Zeitabhängige Untersuchung der Zellausbreitung

Die Ausbreitung von Zellen (Spreading) ist ein zeitabhängiger Prozess. Um den Einfluss der Mikrostruktur von Titanoberflächen auf das zeitliche Ausbreitungsverhalten von MG-63 Osteoblasten zu untersuchen, wurden die Zellen nach 10 min, 30 min, 60 min, 3 h und 24 h Kultivierungsdauer auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen mikroskopisch analysiert, deren Zellfläche anschließend quantifiziert und vergleichend ausgewertet.

Für die Grabenstruktur G-2-2 war die Auswertung der Zellfläche lediglich nach 24 h möglich. Daher sind diese Ergebnisse gesondert dargestellt (siehe Abb. 17 + Abb. 18).

Zeitabhängiges Spreading auf SU-8 Pfostenoberflächen

Die konfokalmikroskopische Analyse des zeitlichen Ausbreitungsverhaltens von MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Pfostenoberflächen und der planaren Referenz ist in Abb. 15 dargestellt. Diese zeigt, dass sich die Zellen auf allen Titanoberflächen in Abhängigkeit der Zeit zunehmend ausbreiten, verdeutlicht an der Vergrößerung der Zellfläche mit wachsender Zeit.

Beim Vergleich der mikrostrukturierten Oberflächen untereinander ist jedoch schon bei der subjektiven Betrachtung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen ein vermindertes Spreading der MG-63 Zellen auf den Pfostenoberflächen auf SU-8 3x3 und SU-8 5x5 im Vergleich zur planaren Referenz (Ti-Ref) zu erkennen. Diese Unterschiede im Ausbreitungsverhalten zeichnen sich bereits nach einer Kultivierungsdauer von 60 min ab und werden mit zunehmender Zeit noch deutlicher sichtbar. Nach 24 h ist zu erkennen, dass die MG-63 Osteoblasten auf der planaren Kontrolloberfläche fast doppelt so groß sind wie auf den Pfostenoberflächen. Beim Vergleich der beiden Pfostenstrukturen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 sind dabei jedoch keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Ausbreitungsverhaltens der Zellen zu beobachten.

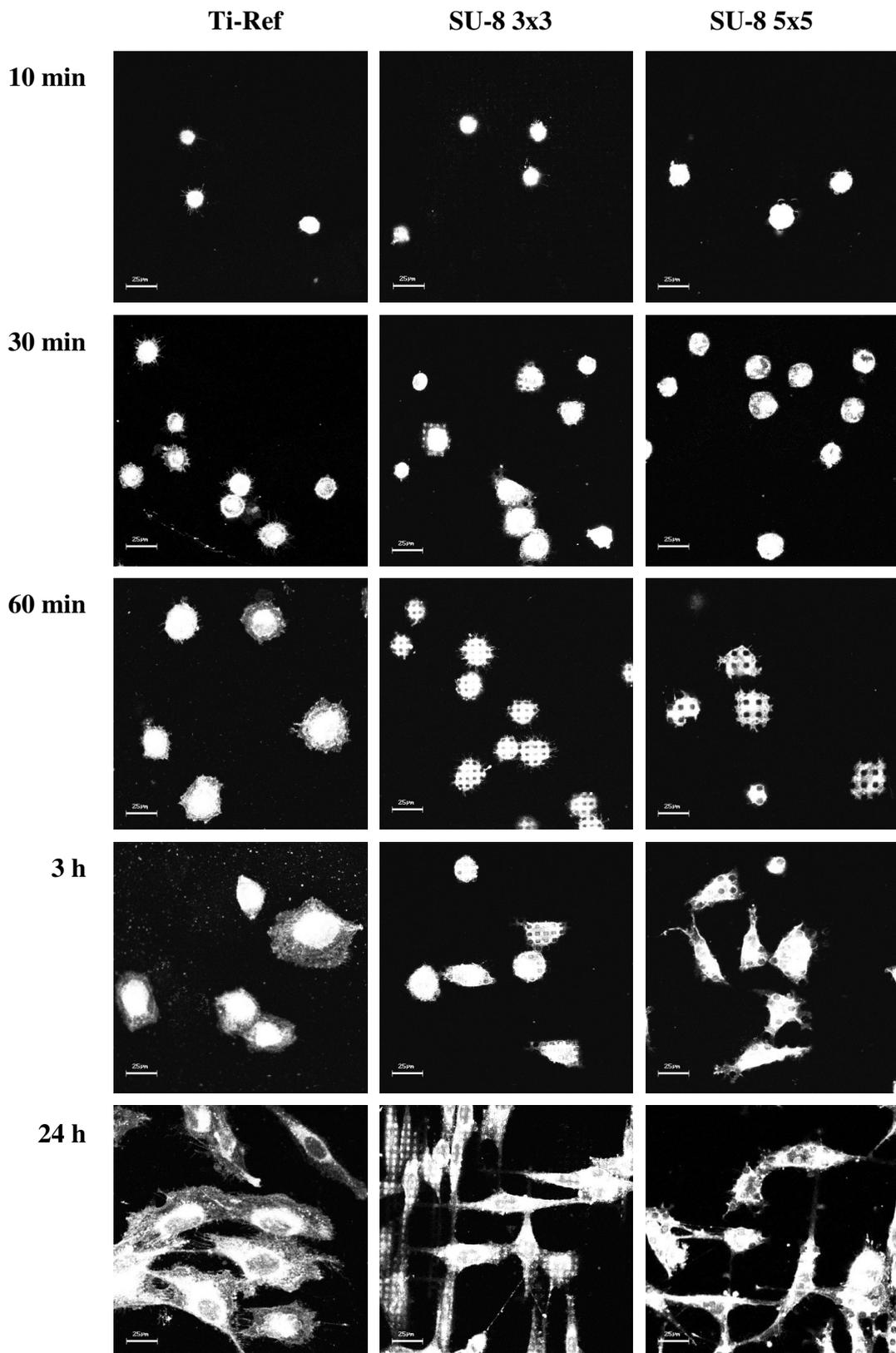


Abb. 15: Zeitabhängiges Spreading von MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Oberflächen (SU-8 3x3 und SU-8 5x5) nach 10 min bis 24 h Kultivierungsdauer im Vergleich zur planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref) (PKH-26 Färbung, LSM 410, Carl Zeiss AG).

Die Beobachtungen aus den konfokalmikroskopischen Aufnahmen werden durch die anschließende quantitative Auswertung verifiziert (siehe Abb. 16).

Wird die Ausbreitung von MG-63 Osteoblasten *in Abhängigkeit der Zeit* betrachtet, so zeigen die Ergebnisse der Zellflächenanalyse, dass während des Kultivierungszeitraums von 10 min bis 24 h sowohl auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 als auch auf der planaren Referenz Ti-Ref eine gleichermaßen zunehmende Zellausbreitung stattfindet, repräsentiert durch die stetig wachsende Zellfläche der MG-Osteoblasten mit steigender Kultivierungszeit.

Die vergleichende Betrachtung der Zellflächen von MG-63 Osteoblasten *in Abhängigkeit der Mikrotopographie* von Titanoberflächen zeigt deutliche Unterschiede im zellulären Ausbreitungsverhalten. Hier ist erkennbar, dass bereits beginnend bei einer Kultivierungsdauer von 60 min eine signifikante Reduktion der Zellfläche auf den mikrostrukturierten Pflasteroberflächen im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche vorliegt. Dabei sind die Zellen nach 24 h Kultivierung auf der planaren Referenz mit einer durchschnittlichen Fläche von $2090,5 \mu\text{m}^2$ sogar mehr als doppelt so groß wie die Zellen auf den Pflasteroberflächen, auf welchen die MG-63 Osteoblasten lediglich eine Zellfläche von $940,4 \mu\text{m}^2$ /SU-8 3x3 bzw. $938,9 \mu\text{m}^2$ (SU-8 5x5) aufweisen.

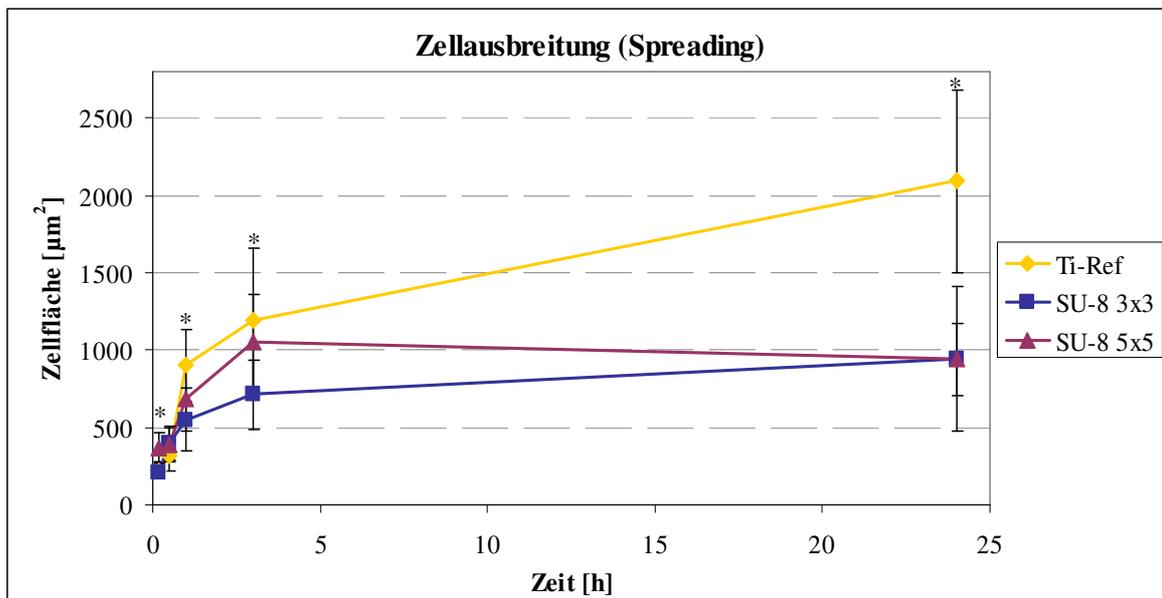


Abb. 16: Zeitabhängige Darstellung der Zellausbreitung (Spreading) von MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen (SU-8 3x3 und SU-8 5x5) im Vergleich zur planaren Referenz (Ti-Ref). (MW \pm SD; *p < 0,05, ungepaarter t-test, n = 40) Signifikanzen: 10 min: Ti-Ref vs. SU-8 5x5 p < 0,001, SU-8 3x3 vs. SU-8 5x5 p < 0,001; 60 min: Ti-Ref vs. SU-8 3x3 p < 0,001, Ti-Ref vs. SU-8 5x5 p < 0,001, SU-8 3x3 vs. SU-8 5x5 p < 0,01; 3 h: Ti-Ref vs. SU-8 3x3 p < 0,001, SU-8 3x3 vs. SU-8 5x5 p < 0,001; 24 h: Ti-Ref vs. SU-8 3x3 p < 0,001, Ti-Ref vs. SU-8 5x5 p < 0,001) (LSM 410, Carl Zeiss AG).

Zellausbreitung auf der Grabenoberfläche nach 24 h

Für die grabenstrukturierte Titanoberfläche G-2-2 erfolgte die Analyse der Zellausbreitung im Vergleich zu den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 sowie der planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref auf Grund der mengenmäßigen Limitation an G-2-2 Proben lediglich nach 24 h. Daher ist diese Auswertung in den folgenden Abbildungen (siehe Abb. 17 + Abb. 18) gesondert aufgeführt.

Der konfokalmikroskopischen Betrachtung (siehe Abb. 17) ist zu entnehmen, dass die MG-63 Zellen auf der Grabenstruktur kleiner sind als auf der planaren Referenz, jedoch noch immer eine größere Zellfläche besitzen, als diejenigen, welche auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 kultiviert wurden.

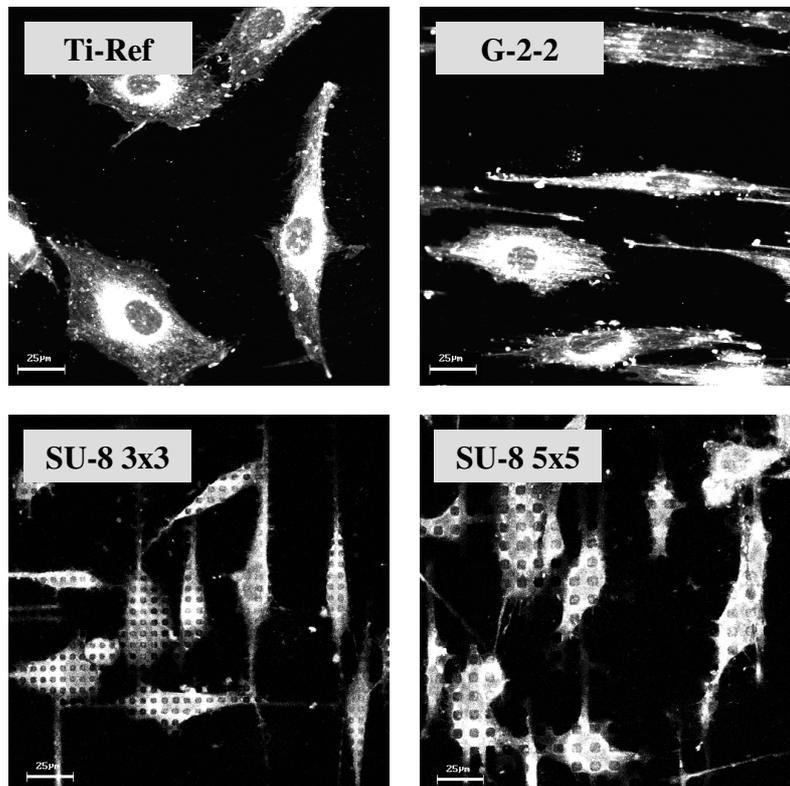


Abb. 17: Zellausbreitung von MG-63 Zellen nach 24 h auf mikrostrukturierten Titanoberflächen. Im Gegensatz zur planaren Referenz (Ti-Ref) weisen die Zellen auf allen mikrostrukturierten Oberflächen eine verminderte Zellausbreitung auf (PKH-26 Färbung, LSM 410, Carl Zeiss AG).

Die anschließende quantitative Bestimmung zeigt, dass diese Unterschiede hinsichtlich der Zellausbreitung signifikant sind (siehe Abb. 18). Die MG-63 Zellen auf der Grabenstruktur G-2-2 besitzen mit $1383,7 \mu\text{m}^2$ eine signifikant größere Zellfläche als auf beiden SU-8

Pfostenoberflächen. Im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref bleibt die Zellausbreitung der MG-63 Osteoblasten - wie bereits bei SU-8 3x3 und SU-8 5x5 beobachtet - jedoch geringer.

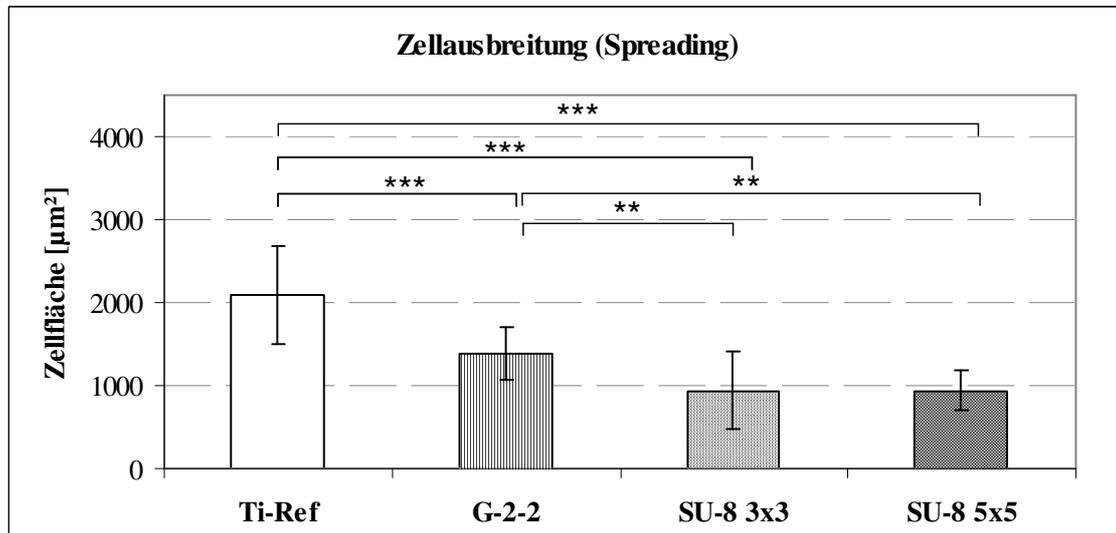


Abb. 18: Quantifizierung der Zellausbreitung von MG-63 Zellen nach 24 h auf mikrostrukturierten Titanoberflächen (G-2-2, SU-8 3x3 und SU-8 5x5) im Vergleich zur planaren Referenz (Ti-Ref). Auf allen mikrostrukturierten Oberflächen liegt eine signifikante Reduktion der Zellfläche vor (MW \pm SD; **p < 0,01, ***p < 0,001, ungepaarter *t*-test, n = 40) (LSM 410, Carl Zeiss AG).

Zusammenfassend wird aus der Analyse des Ausbreitungsverhaltens von MG-63 Osteoblasten ersichtlich, dass auf allen mikrostrukturierten Titanoberflächen, verglichen mit der planaren Kontrolloberfläche, eine signifikante Reduktion der Zellfläche vorliegt.

4.2.1.3 Bestimmung der Zellausrichtung

Bei der Betrachtung der REM-Aufnahmen der MG-63 Osteoblasten nach 24 h auf den Titanoberflächen ist zu erkennen, dass auf allen mikrostrukturierten Oberflächen eine Ausrichtung der Zellen in Abhängigkeit der Oberflächentopographie stattfindet (siehe Abb. 19). Im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref, auf welcher die Zellen einen flächigen Phänotyp ohne bevorzugte Orientierungsrichtung besitzen, sind die MG-63 Osteoblasten sowohl auf der Grabenstruktur G-2-2 als auch auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 langgestreckt und richten sich in paralleler Orientierung zu den Gräben bzw. in 45°- und 90°-Winkel zu den Pfosten aus.

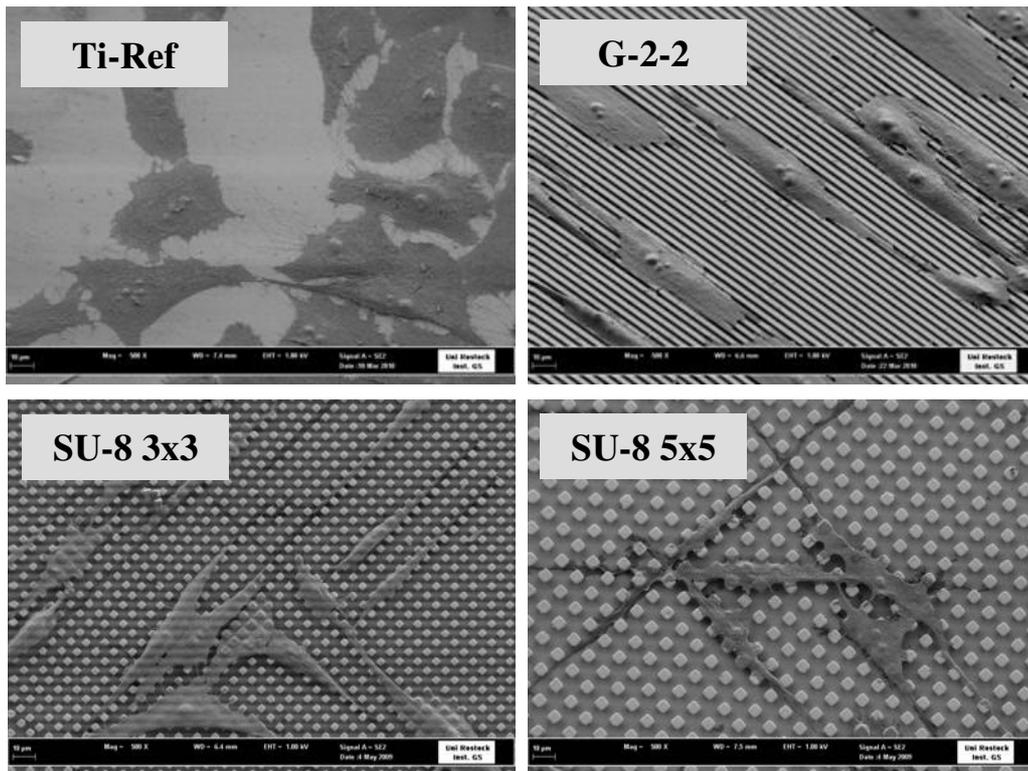


Abb. 19: REM-Aufnahmen der Morphologie von MG-63 Zellen auf Titanoberflächen nach 24 h. Im Gegensatz zur planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref) erfolgt auf allen mikrostrukturierten Oberflächen (G-2-2, SU-8 3x3 und SU-8 5x5) eine Ausrichtung der Zellen (FE-SEM Supra 25, Carl Zeiss AG) (in Kooperation mit dem Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Universität Rostock, Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von R. Lange).

Durch die Berechnung des Formfaktors lässt sich die Zellform und somit die Ausrichtung der Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen quantifizieren (siehe Abb. 20).

Der Formfaktor ist hoch (maximaler Wert = 1), wenn die Zelle eine runde Form besitzt und wird zunehmend kleiner desto polygonaler die Zelle ist.

Zur Berechnung des Formfaktors wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen PKH-26-gefärbter MG-63 Osteoblasten nach 24 h Kultivierung auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen (siehe Abb. 17) ausgewertet. Die quantitativen Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt und bestätigen die mikroskopischen Beobachtungen bezüglich des Vorkommens einer topographisch-induzierten Ausrichtung von MG-63 Zellen auf mikrostrukturierten Titanoberflächen. Der abnehmende Formfaktor von $0,44 > 0,22 > 0,2 > 0,18$ für die Zellen auf Ti-Ref > SU-8 5x5 > G-2-2 > SU-8 3x3 belegt, dass die Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen polygonaler sind als auf der planaren Referenz. Dabei treten beim Vergleich der Mikrostrukturen untereinander erstaunlicherweise jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zellform auf, d. h.

sowohl die Grabenstrukturierung als auch die Pfostenstruktur induzieren die Elongation von MG-63 Osteoblasten gleichermaßen.

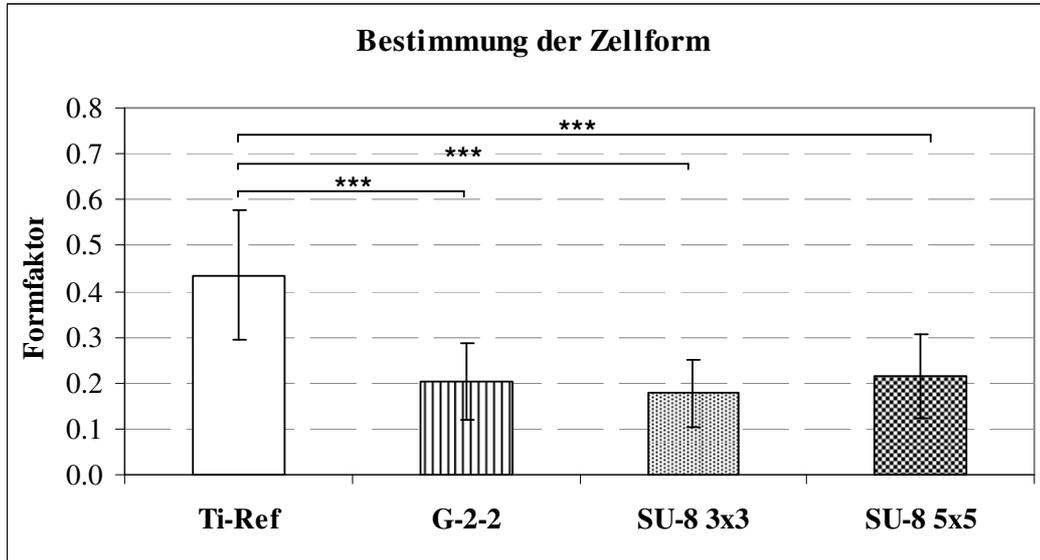


Abb. 20: Bestimmung der Elongation von MG-63 Osteoblasten nach 24 h auf mikrostrukturierten Titanoberflächen. Die Zellform wurde anhand der Berechnung des Formfaktors bestimmt. Umso kleiner der Formfaktor, desto polygonaler ist die Zellform. Die niedrigeren Werte für die Formfaktoren der Zellen auf den mikrostrukturierten Oberflächen induzieren eine erhöhte Elongation dieser Zellen verglichen mit der planaren Referenz (Ti-Ref) (MW \pm SD; *** p < 0,001, ungepaarter t -test, n = 40) (LSM 410, Carl Zeiss AG).

4.2.2 Quantitative Analyse der Zelladhäsion

Die Zelladhäsion stellt ein wichtiges Ereignis in der initialen Phase der Interaktion zwischen Zelle und Biomaterial dar.

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse wurde anhand der Berechnung des prozentualen Anteils adhärenter MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen die initiale Zelladhäsion nach 10 min bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt. Diese zeigen eine verminderte Anzahl adhärenter Zellen auf den mikrostrukturierten Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 im Vergleich zur planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref). Diese Unterschiede waren jedoch nur marginal und statistisch nicht signifikant.

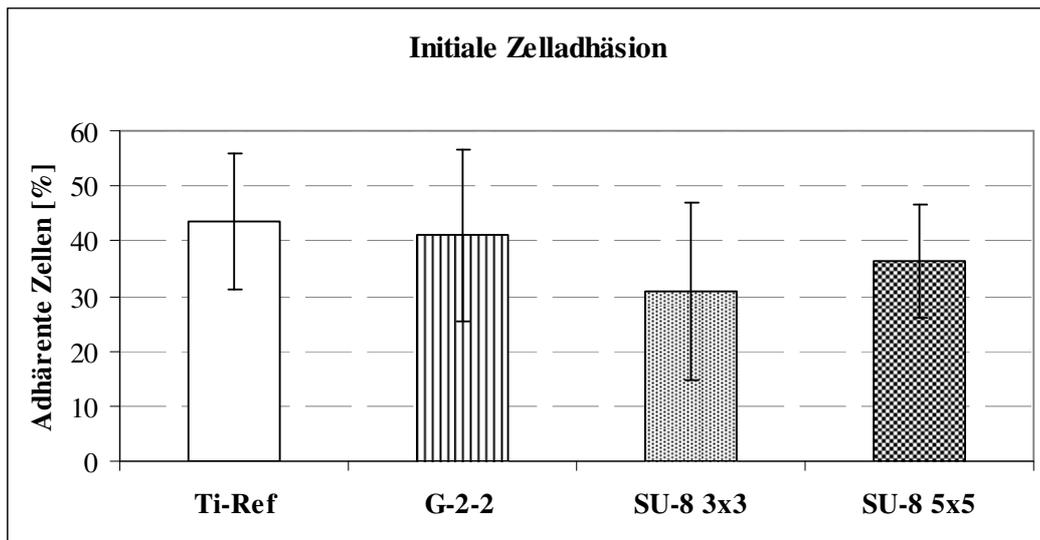


Abb. 21: Initiale Zelladhäsion nach 10 min von MG-63 Zellen auf definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen. Beim Vergleich des prozentualen Anteils adhärenter Zellen auf den Mikrostrukturen liegen keine signifikanten Unterschiede vor (MW \pm SD, ungepaarter *t*-test, n = 4) (FACSCalibur, BD Biosciences).

4.2.3 Untersuchung des Aktinzytoskeletts

4.2.3.1 Organisation des Aktinzytoskeletts

Aktin ist die Hauptkomponente des Zytoskeletts und spielt eine wesentliche Rolle in diversen zellulären Prozessen, welche sowohl das morphologische als auch funktionelle Verhalten der Zellen beeinflussen. Aus diesem Grunde wurde die Formation des Aktinzytoskeletts in MG-63 Osteoblasten in Abhängigkeit von definiert mikrostrukturierten Oberflächentopographien untersucht.

Die Ausbildung von Aktinfilamenten in MG-63 Zellen nach 24 h auf der planaren Titan-Referenz und den mikrostrukturierten Titanoberflächen mit Pfosten- (SU-8 3x3 und SU-8 5x5) und Grabenstruktur (G-2-2) ist in Abb. 22 dargestellt.

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass das Aktin auf der planaren Titanoberfläche als ein Netzwerk von langen und gut definierten Aktinfilamenten in den Zellen organisiert ist. Die Aktinfilamente spannen dabei durch die gesamte Zelle, so wie es typisch für Osteoblasten ist. Im Gegensatz dazu erfolgt auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen die Ausbildung des Aktinzytoskeletts in Anpassung an die jeweilige Oberflächentopographie. Auf der Grabenstruktur G-2-2 kommt es zu einer parallelen Orientierung der Aktinfilamente mit periodischer Ausrichtung entlang der einzelnen Kanten des Grabenprofils. Auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-5x5 hingegen

liegt das Aktin nicht in Form langer Filamente vor, sondern lediglich als kurze Aktinfasern, welche sich in irregulärer Verteilung auf den Pfostenstrukturen befinden. Dabei ist eine starke Akkumulation der Aktinfragmente auf den Plateaus und Kanten der Pfosten zu verzeichnen, welche die darunter liegende Oberflächenstrukturierung reflektiert.

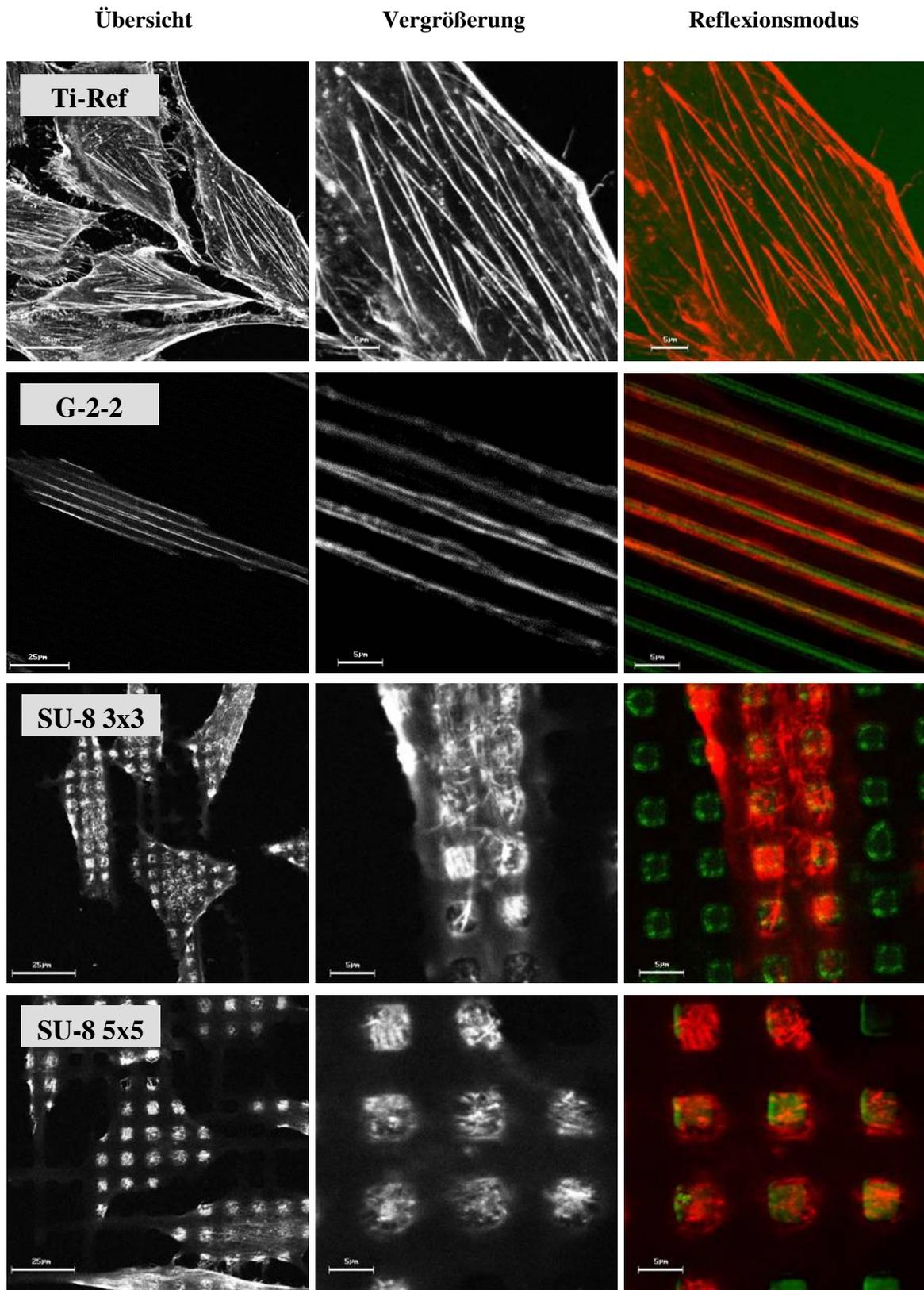


Abb. 22: Formation des Aktinzytoskeletts in MG-63 Osteoblasten nach 24 h. Auf der planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref) sowie der Grabenstruktur G-2-2 ist das Aktin in definierten Stressfasern organisiert. Auf den Pfostenstrukturen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 hingegen ist eine starke Akkumulation kurzer Aktinfilamente auf den Plateaus und Kanten der Pfosten zu sehen (LSM 410, Carl Zeiss AG, grün: Reflexion der Oberfläche, rot: phalloidin-TRITC für Aktin).

Um zu überprüfen, ob diese beobachtete spezifische Organisation des Aktinzytoskeletts auf den Pfostenoberflächen innerhalb der gesamten Zelle vorkommt oder lediglich auf die Ebene der Pfosten beschränkt ist, wurden mehrere horizontale Querschnitte der MG-63 Zellen (Z-Stapel) angefertigt, welches repräsentativ in Abb. 23 dargestellt ist. Wie die Auswertung dieses Z-Schnittes eines MG-63 Osteoblasten auf der Pfostenoberfläche SU-8 5x5 verdeutlicht, ist die Ausbildung der kurzen Aktinfasern ausschließlich eindimensional auf die Pfostenebene begrenzt. Wie in der basalen Aufnahme zu erkennen ist, bleibt dabei die Fähigkeit der Zelle lange Aktinfilamente auszubilden weiterhin erhalten.

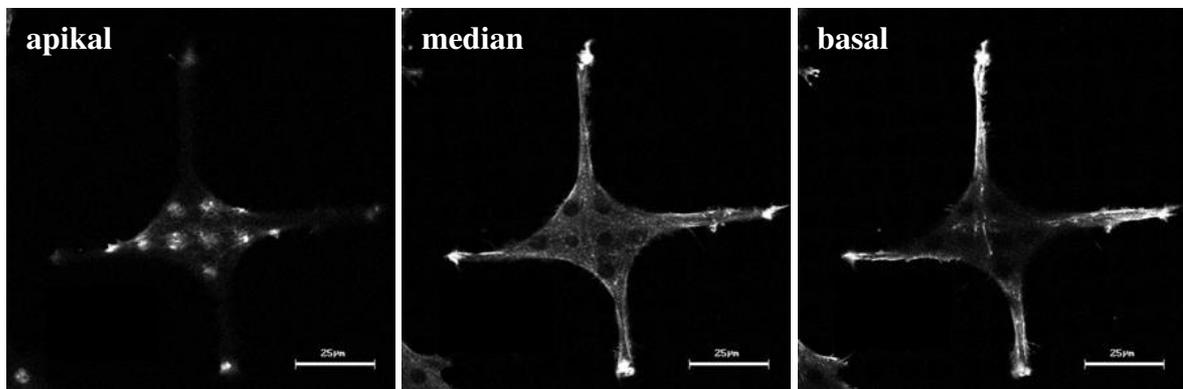


Abb. 23: Lokale Verteilung der Aktinfilamente in MG-63 Osteoblasten auf SU-8 5x5 nach 24 h im Z-Schnitt. Deutlich zu erkennen ist die eindimensionale Konzentration der kurzen Aktinfragmente in der apikalen Zellebene auf dem Pfosten (LSM 410, Carl Zeiss AG).

Um zu erfassen, ab welchem Zeitpunkt die Ausbildung der kurzen Aktinfragmente auf den Pfostenoberfläche beginnt, wurde das Aktin nach 30 min gefärbt. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass in den MG-63 Osteoblasten auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 das Aktin bereits nach 30 min beginnt, sich auf den Pfostenplateaus und -kanten in Form von kurzen Fragmenten zu formieren und dort zu akkumulieren (siehe Abb. 24).

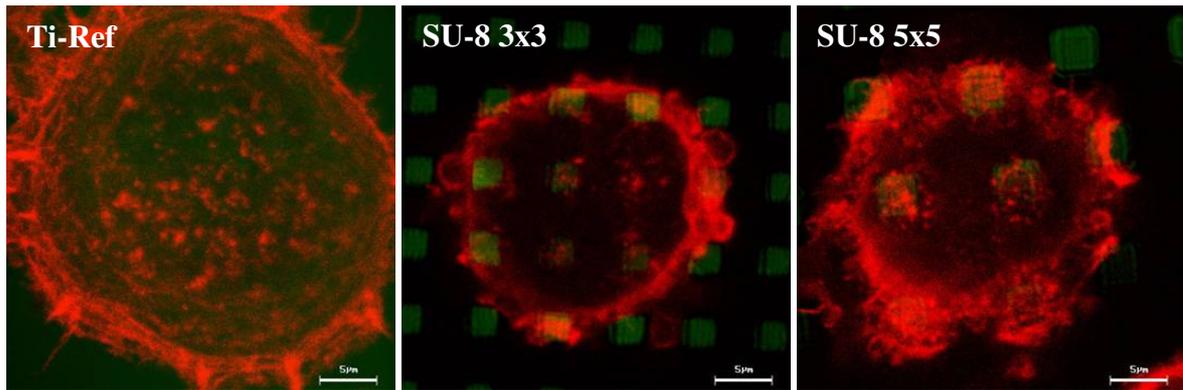


Abb. 24: Aktinfilamentformation in MG-63 Osteoblasten nach 30 min. Bereits nach 30 min ist auf den Oberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 eine beginnende Akkumulation von Aktinfasern auf den Pfosten zu beobachten (LSM 410, Carl Zeiss AG, grün: Reflexion der Oberfläche, rot: phalloidin-TRITC für Aktin).

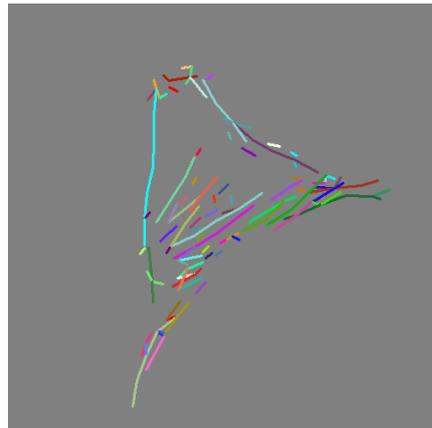
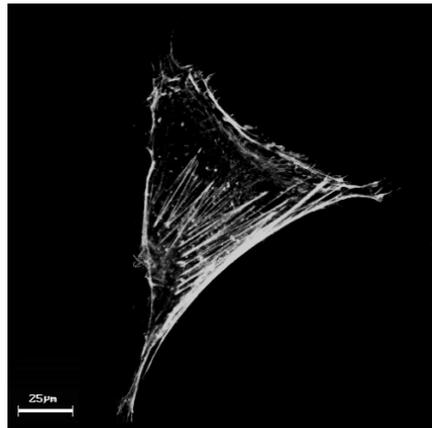
4.2.3.2 Quantifizierung der Aktinfilamentformation mit FilaQuant

Die quantitative Auswertung des Aktinzytoskeletts in MG-63 Osteoblasten wurde mit Hilfe der eigens dafür, neu entwickelten Software FilaQuant (Dr. rer. nat. Harald Birkholz, Institut für Mathematik) durchgeführt [102][103][104]. Auf Basis der konfokalmikroskopischen Aufnahmen erfolgte zuerst die automatische Erkennung der Aktinfilamente (siehe Abb. 25) und anschließend deren Quantifizierung (siehe Tab. 7).

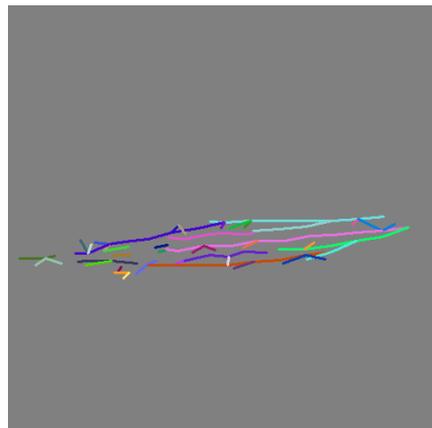
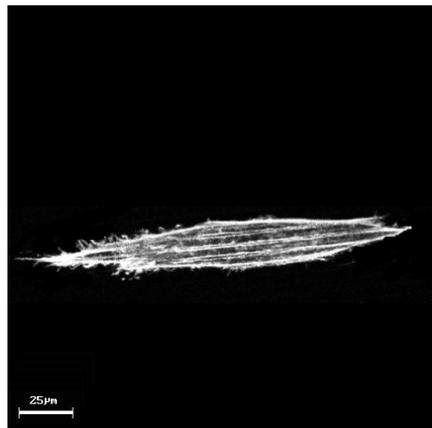
In Abb. 25 sind die konfokalmikroskopischen Aufnahmen des Aktinzytoskeletts den durch die Software prozessierten Abbildungen gegenüber gestellt. Bei der vergleichenden Betrachtung dieser Abbildungen ist zu erkennen, dass die Software die Aktinformation auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen repräsentativ widerspiegelt. Somit ist die Grundvoraussetzung für die sich anschließende Quantifizierung gegeben.

Bereits bei der ersten Betrachtung der prozessierten Aufnahmen ist die Ausbildung der stark verkürzten Aktinfilamente auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 im Vergleich zu den langen Aktinfilamenten auf der planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref sowie der Grabenstruktur G-2-2 deutlich auffallend.

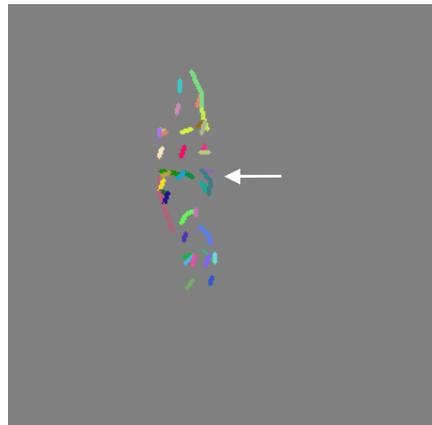
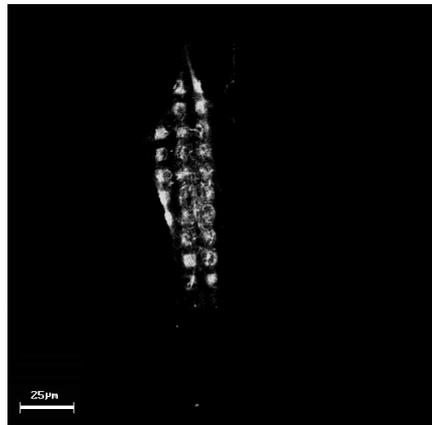
Ti-Ref



G-2-2



SU-8 3x3



SU-8 5x5

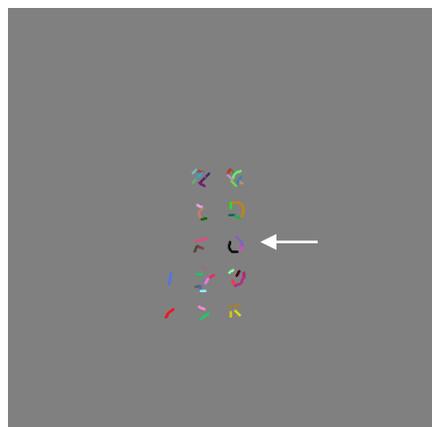
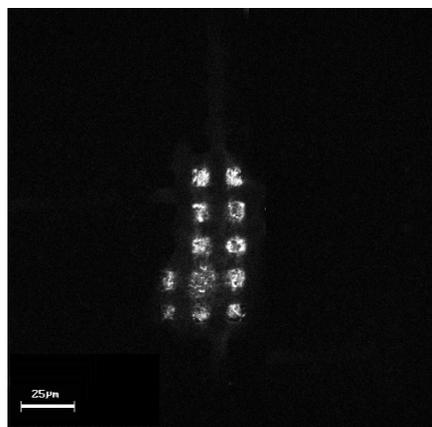


Abb. 25: Quantifizierung der Aktinfilamentformation. Linke Spalte: konfokalmikroskopische Aufnahmen (LSM 410, Carl Zeiss AG), rechte Spalte: automatisch prozessierte Bilder der FilaQuant Software. Die Aktinfilamente sind als farbige Linien dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die stark reduzierte Filamentlänge auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 (Pfeile).

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Aktinfilamentformation sind in folgender Tabelle aufgeführt (siehe Tab. 7). Die Daten resultieren aus der Auswertung der entsprechenden konfokalmikroskopischen Aufnahmen durch die FilaQuant Software (siehe Abb. 21).

Tab. 7: Quantitative Auswertung der Aktinfilamentformation in MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen nach 24 h. Im Vergleich zu Ti-Ref ist auf den Pfostenoberflächen die maximale, die durchschnittliche als auch die gesamte Filamentlänge drastisch reduziert. Der niedrige Wert für die Orientierungsverteilung für G-2-2 verdeutlicht die Ausrichtung und Orientierung der Zellen entlang der Grabenstrukturen (MW \pm SD, ungepaarter *t*-test, n = 30).

	Ti-Ref	G-2-2	SU-8 3x3	SU-8 5x5
Anzahl der Filamente	114,3 \pm 39,0	38,6 \pm 21,7 ^a	44,7 \pm 20,4 ^a	49,5 \pm 11,7 ^a
Gesamtfilamentlänge [μm]	1126,3 \pm 353,0	494,9 \pm 244,2 ^a	130,4 \pm 70, ^{a,b}	161,2 \pm 45,0 ^{a,b}
Durchschnittliche Filamentlänge [μm]	10,0 \pm 1,3	13,2 \pm 2,2 ^a	2,8 \pm 0,6 ^{a,b}	3,2 \pm 0,3 ^{a,b}
Maximale Filamentlänge [μm]	166,4 \pm 26,7	53,6 \pm 19,0 ^a	12,4 \pm 6,6 ^{a,b}	8,1 \pm 2,6 ^{a,b}
Orientierungsverteilung [$^{\circ}$]	20,9 \pm 3,4	9,0 \pm 2,8 ^a	24,2 \pm 1,8 ^{c,d}	26,0 \pm 1,5 ^{a,b}

a...***p < 0,001 vs. Ti-Ref; b...***p < ,001 vs. G-2-2; c...*p < 0,05 vs. Ti-Ref ; d...**p < 0,01 vs. G-2-2

Die quantitative Auswertung der Aktinfilamentformation zeigt, dass im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref auf allen mikrostrukturierten Titanoberflächen eine signifikante Abnahme in der Anzahl der Aktinfilamente zu verzeichnen ist.

Darüber hinaus sind sowohl die gesamte- als auch die maximale Filamentlänge auf allen mikrostrukturierten Oberflächen stark signifikant reduziert mit einer entsprechenden Abnahme von Ti-Ref > G-2-2 > SU-8 5x5 > SU-8 3x3 bzw. Ti-Ref > G-2-2 > SU-8 5x5 > SU-8 3x3. Dabei ist die maximale Filamentlänge auf der planaren Referenz ca. 12-mal größer als auf den Pfostenoberflächen. Auch die durchschnittliche Länge der Aktinfilamente ist auf den Pfostenoberflächen mit 2,8 μ m für SU-8 3x3 und 3,2 μ m für SU-8 5x5 signifikant kleiner als bei Ti-Ref (10,0 μ m) und der Grabenstruktur G-2-2 (13,2 μ m).

Die Orientierung der Aktinfilamente in den Zellen in Abhängigkeit der Oberflächenstruktur wird durch den Parameter Orientierungsverteilung beschrieben. Hier zeigt sich für die Grabenstruktur G-2-2 ein geringer Wert von 9,0 $^{\circ}$. Dies induziert, dass die Aktinfilamente der Zellen auf G-2-2 eine spezielle Orientierungsrichtung bevorzugen, nämlich - wie aus den konfokalmikroskopischen Aufnahmen ersichtlich ist - entlang der

Kanten der einzelnen Grabenprofile (siehe Abb. 22). Im Gegensatz dazu ist der entsprechende Wert für Ti-Ref mit $20,9^\circ$ höher, jedoch noch immer statistisch kleiner als für die Pfofenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5, welche mit $24,2^\circ$ und $26,0^\circ$ die höchsten Werte für die Orientungsverteilung aufweisen. Diese hohen Werte spiegeln den zunehmenden Verlust der Ausrichtung von Aktinfilamenten auf den Pfofenoberflächen wider und charakterisieren das Vorliegen einer weitgehend uniformen Verteilung der Aktinfasern, ohne dass eine spezielle Vorzugsrichtung existiert.

Interessanterweise ist jedoch trotz der deutlich abweichenden Ausbildung des Aktinzytoskeletts auf den Pfofenoberflächen verglichen mit der Grabenoberfläche die Orientierung der Zellen auf SU-8 3x3 und SU-8 5x5 vergleichbar mit der auf G-2-2 (siehe Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1.3), d. h. obwohl die Zellen auf den Pfofen nur kurze, lokal angeordnete, unorientierte Aktinfragmente aufweisen, sind die Zellen in der Lage sich auszurichten und einen elongierten Phänotyp auszubilden.

4.2.3.3 Proteinexpression von β -Aktin

Zur quantitativen Bestimmung der Expression des Proteins β -Aktin in MG-63 Osteoblasten in Abhängigkeit der Mikrostruktur von Titanoberflächen wurde nach 24 h eine Western Blot Analyse durchgeführt, welche anschließend densitometrisch ausgewertet wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass die β -Aktin-Expression, im Vergleich zur planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref), auf beiden SU-8 Pfofenoberflächen signifikant reduziert ist (siehe Abb. 26). Dabei ist auf SU-8 5x5 die insgesamt niedrigste Proteinexpression von β -Aktin zu verzeichnen. Verglichen mit der Pfofenoberfläche SU-8 3x3 ist diese Reduktion jedoch nicht signifikant.

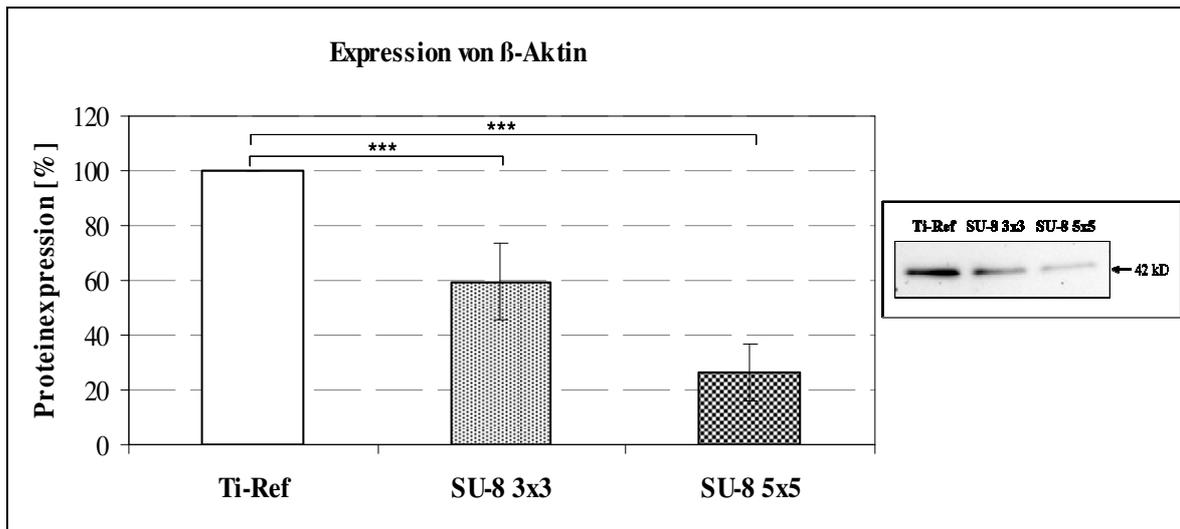


Abb. 26: Densitometrische Analyse der Proteinexpression von β -Aktin in MG-63 Osteoblasten nach 24 h. Im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche Ti-ref ist die β -Aktin-Expression auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 signifikant reduziert (MW \pm SD, ** p < 0,01, ungepaarter *t*-test, n = 3) (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS, Quantity One® 1-D analysis software, Bio-Rad).

4.2.4 Adaption der Aktinformation an die Oberflächentopographie - Ursachen

Die deutlich gezeigte Adaption der Aktinfilamentformation in MG-63 Osteoblasten an die Mikrostruktur der Pfostenoberflächen (SU-8 3x3 und SU-8 5x5) wirft die Frage auf, welche möglichen Phänomene als ursächlich dafür in Betracht gezogen werden könnten. Um sich der Beantwortung dieser Frage zu nähern, wurden die in diesem Kapitel aufgeführten Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden sowohl mögliche zellbiologische (siehe Kapitel 4.2.4.1 und 4.2.4.2) als auch physikalische Einflussparameter für die topographisch-induzierte Formation der Aktinfilamente analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden jeweils exemplarisch an der Pfostenoberfläche SU-8 5x5 im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref dargestellt.

4.2.4.1 Lokalisation von β 1-Integrin

Integrinrezeptoren sind wesentliche Bestandteile in Fokaladhäsionen und stehen mit Hilfe von spezifischen Adaptorproteinen in Verbindung mit dem Aktinzytoskelett. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der beobachteten Akkumulation der Aktinfilamente auf den Pfostenoberflächen (siehe Abb. 22) und der Lokalisation von Integrinrezeptoren zu

untersuchen, erfolgte eine exemplarische Analyse des β 1-Integrinrezeptors auf der Pfostenoberfläche SU-8 5x5 mit Hilfe der Konfokalmikroskopie. In Abb. 27 ist die Verteilung der β 1-Integrin-Untereinheit nach 24 h in MG-63 Osteoblasten auf SU-8 5x5 im Vergleich zur planaren Referenz (Ti-Ref) dargestellt. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass sowohl auf Ti-Ref als auch auf der Mikrostruktur SU 8 5x5 eine homogene Verteilung des β 1-Integrinrezeptors vorliegt. Insbesondere bei der vergleichenden Betrachtung der apikalen (auf Ebene der Pfosten) und basalen Zellebene auf SU-8 5x5 lassen sich keine Unterschiede im Verteilungsmuster des β 1-Integrinrezeptors innerhalb der gesamten Zelle erkennen; es kommt zu keiner Akkumulation von β 1-Integrin auf den Pfosten.

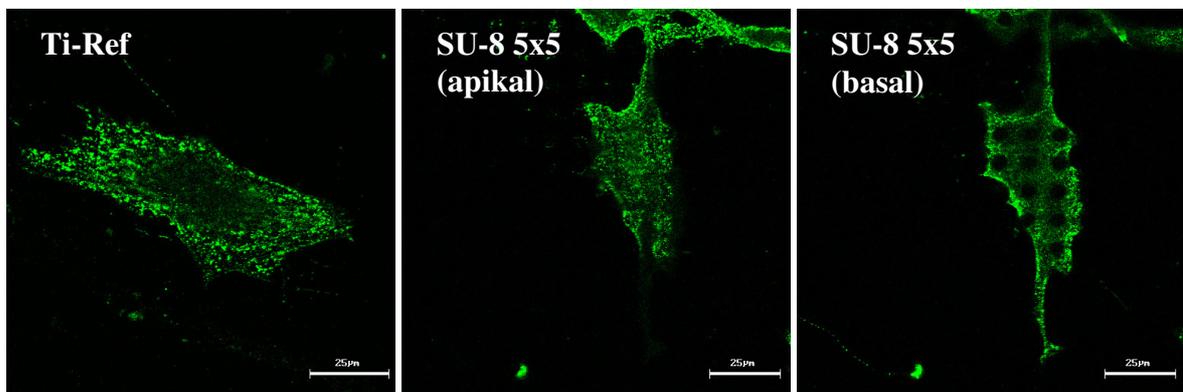


Abb. 27: Lokalisation des β 1-Integrinrezeptors in MG-63 Osteoblasten nach 24 h auf der planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref) und der Pfostenoberfläche SU-8 5x5 (in apikaler und basaler Zellebene). Auf beiden Oberflächen ist eine homogene Verteilung des β 1-Integrinrezeptors zu erkennen (LSM 410, Carl Zeiss AG).

4.2.4.2 Einfluss durch adsorbierte Proteine

Bevor Zellen an einer Oberfläche adhäreren und sich ausbreiten, kommt es zur Adsorption von extrazellulären Matrixproteinen, welche als Liganden für die Ausbildung von Fokalkontakten dienen, die wiederum mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung stehen. Um zu untersuchen, ob es zu einer Akkumulation solcher im Serum vorkommender Matrixproteine, wie Vitronektin oder Laminin, auf den Pfostenoberflächen kommt, welche ursächlich für die spezifische Formation der Aktinfilamente sein könnte, wurde der Zellversuch ohne Zusatz von Serum (FKS) durchgeführt.

Die konfokalmikroskopische Aufnahmen des Aktinzytoskeletts von MG-63 Osteoblasten auf der Pfostenoberfläche SU-8 5x5 nach 24-stündiger Kultivierung ohne Serum (siehe Abb. 28) belegen, dass die Aktinformation phänotypisch derer entspricht, welche sich auch mit Zusatz von Serum zeigt (siehe Abb. 22); d. h. die Akkumulation kurzer Aktinfilamente auf den Pfostenplateaus und -kanten wird trotz Fehlens der im Serum befindlichen Matrixproteine induziert.

Die Fähigkeit der Zellen lange Aktinfasern auszubilden bleibt auch ohne Serumzusatz erhalten, wie die konfokalmikroskopische Aufnahme auf der Kontrolloberfläche Ti-Ref zeigt; hier kommt es - wie unter der Zugabe von Serum - zur typischen Ausbildung der langen Aktinfilamente.

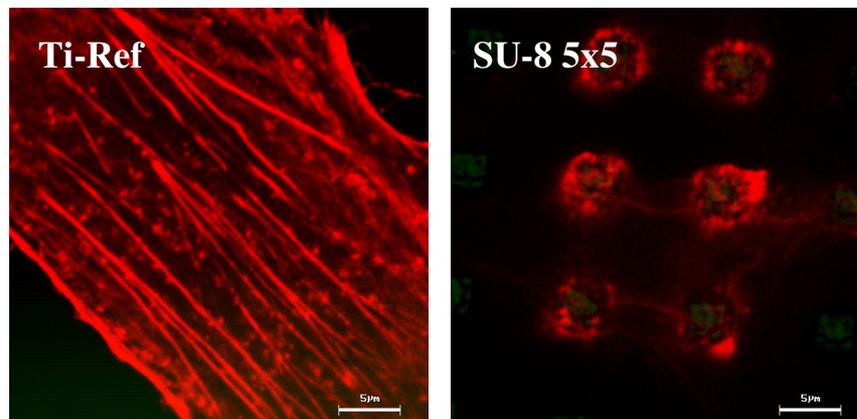


Abb. 28: Formation des Aktinzytoskeletts in MG-63 Osteoblasten nach 24 h Kultivierung ohne Zusatz von Serum (FKS) auf der Pfostenstruktur SU-8 5x5 und planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref). Auch ohne Serumzusatz bleibt die Akkumulation kurzer Aktinfilamente auf den Plateaus und Kanten der Pfosten erhalten (LSM 410, Carl Zeiss AG, grün: Reflexion der Oberfläche, rot: phalloidin-TRITC für Aktin).

4.2.4.3 Einfluss durch Oberflächenchemie – Titan gegen Silizium

Es ist bekannt, dass die Oberflächenchemie einen wesentlichen Einfluss auf das zellbiologische Verhalten hat. Um zu differenzieren, ob die spezifische Ausbildung der Aktinformation in MG-63 Osteoblasten auf den Pfostenoberflächen auf Grund der Oberflächenchemie, d. h. speziell durch Titan und dessen individuellen elektrochemischen Eigenschaften zustande kommt, wurde eine vergleichende Analyse der Ausbildung des Aktinzytoskeletts auf einer - der SU-8 5x5 Titanoberfläche - identisch pfostenstrukturierten Siliziumoberfläche (Si-5x5) untersucht (siehe Abb. 29). Als Referenz diente in diesem Fall eine planare Siliziumoberfläche.

Die Ergebnisse der Konfokalmikroskopie zeigen, dass sich auf der pfostenstrukturierten Siliziumoberfläche Si-5x5 die gleiche phänotypische Aktinformation in Form kurzer Aktinfilamente, konzentriert auf den Pfostenplateaus und -kanten, wie auf der pfostenstrukturierten Titanoberfläche SU-8 5x5 ausbildet. Dabei bleibt die Fähigkeit der MG-63 Zellen lange Aktinfilamente auszubilden weiterhin erhalten, wie die Aufnahmen auf der planaren Kontrolloberfläche Si-Ref belegen.

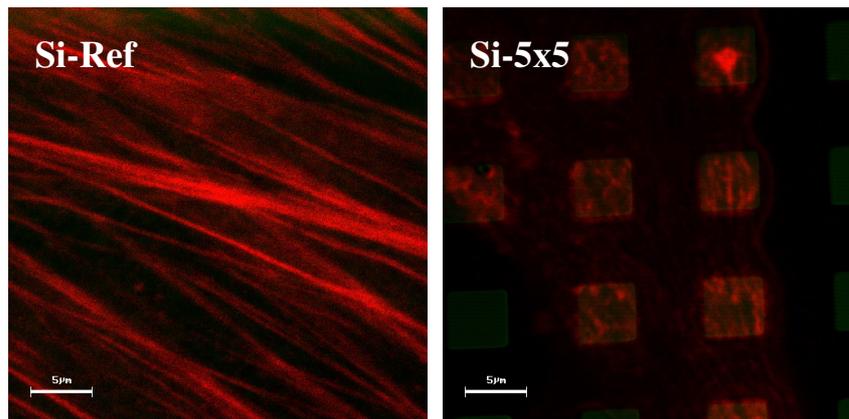


Abb. 29: Formation der Aktinfilamente in MG-63 Osteoblasten nach 24 h Kultivierung auf einer mit SU-8 5x5 identisch pfostenstrukturierten Siliziumoberfläche (Si-5x5) im Vergleich mit planarer Siliziumreferenz (Si-Ref). Es zeigt sich deutlich eine übereinstimmende phänotypische Ausbildung des Aktinzytoskeletts auf Si-5x5 wie auf der pfostenstrukturierten Titanoberfläche SU-8 5x5 (LSM 410, Carl Zeiss AG, grün: Reflexion der Oberfläche, rot: phalloidin-TRITC für Aktin).

4.2.4.4 Mechanischer Einfluss durch Gravitation

Um zu untersuchen, ob die Akkumulation der Aktinfilamente auf den Pfostenplateaus und -kanten durch dortiges lokales Eindringen der Zellmembran, wiederum verursacht durch die Gravitation und der damit auf die Zelle einwirkenden mechanischen Kräfte bedingt ist, wurde ein Versuchsansatz erstellt, um diesen Gravitationseinfluss auf die Zellen und somit auf die Aktinfilamentformation weitgehend auszuschließen. Dazu wurden die Zellen entgegen der Gravitation kultiviert (siehe Kapitel 3.2.8.1) und das Aktinzytoskelett nach 24 h konfokalmikroskopisch ausgewertet (siehe Abb. 30).

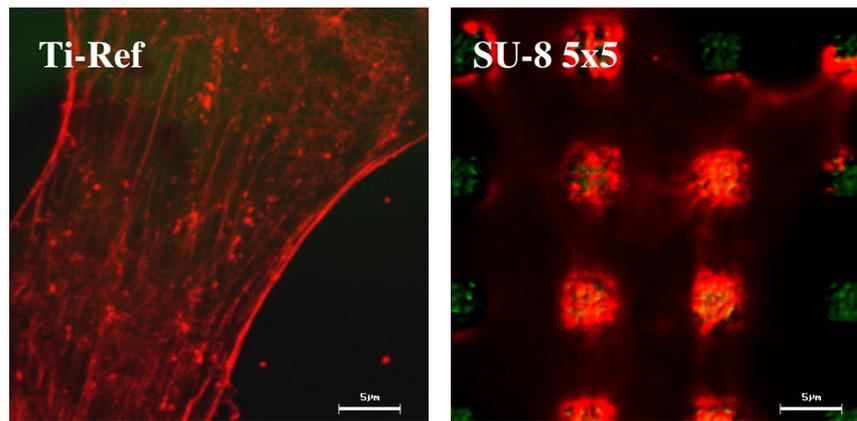


Abb. 30: Konfokalmikroskopische Darstellung des Aktinzytoskeletts in MG-63 Zellen nach 24 h Kultivierung entgegen der Gravitation. Es ist zu erkennen, dass die Konzentration der Aktinfasern auf den Pfostenplateaus der mikrostrukturierten Titanoberfläche SU-8 5x5 erhalten bleibt (LSM 410, Carl Zeiss AG, grün: Reflexion der Oberfläche, rot: phalloidin-TRITC für Aktin).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier untersuchten Einflussgrößen sich als nicht ursächlich für die adaptierte Aktinfilamentformation auf den Pfostenoberflächen herausgestellt haben. Hier konnte weder eine entsprechende lokale Konzentration der zellbiologischen Komponenten, wie β 1-Integrinrezeptor oder extrazelluläre Matrixproteine, nachgewiesen werden noch sind physikalisch-chemische Effekte, wie Materialspezifität oder allgemeine Gravitationseffekte für die Akkumulation der Aktinfasern auf den Pfostenplateaus und -kanten der mikrostrukturierten Pfostenoberflächen verantwortlich.

4.2.5 Analyse von Komponenten des Fokalen Adhäsionskomplexes

4.2.5.1 Formation von Vinkulinkontakten

Vinkulin ist ein prominentes Adapterprotein in den Fokalen Adhäsionskomplexen der Zelle und kann somit repräsentativ für die Analyse von Fokalkontakten herangezogen werden. Die Untersuchung der Expression von Vinkulin auf mikrostrukturierten Titanoberflächen nach 24 h lassen deutliche Unterschiede in der Formation und Lokalisation der Vinkulinkontakte auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 verglichen mit der planaren Kontrolloberfläche (Ti-Ref) erkennen.

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen von Vinkulin nach 24 h in MG-63 Osteoblasten zeigen auf Ti-Ref die Formation langer, fibrillärer Vinkulinkontakte, welche sich vorrangig

im peripheren Bereich der Zellen befinden (siehe Abb. 31). Auf den mikrostrukturierten Pfofenoberflächen hingegen bilden die MG-63 Zellen punktuelle und geclusterte Vinkulinkontakte aus, welche hauptsächlich auf den Pfofenplateaus sowie an den Kanten der Pfofen konzentriert sind.

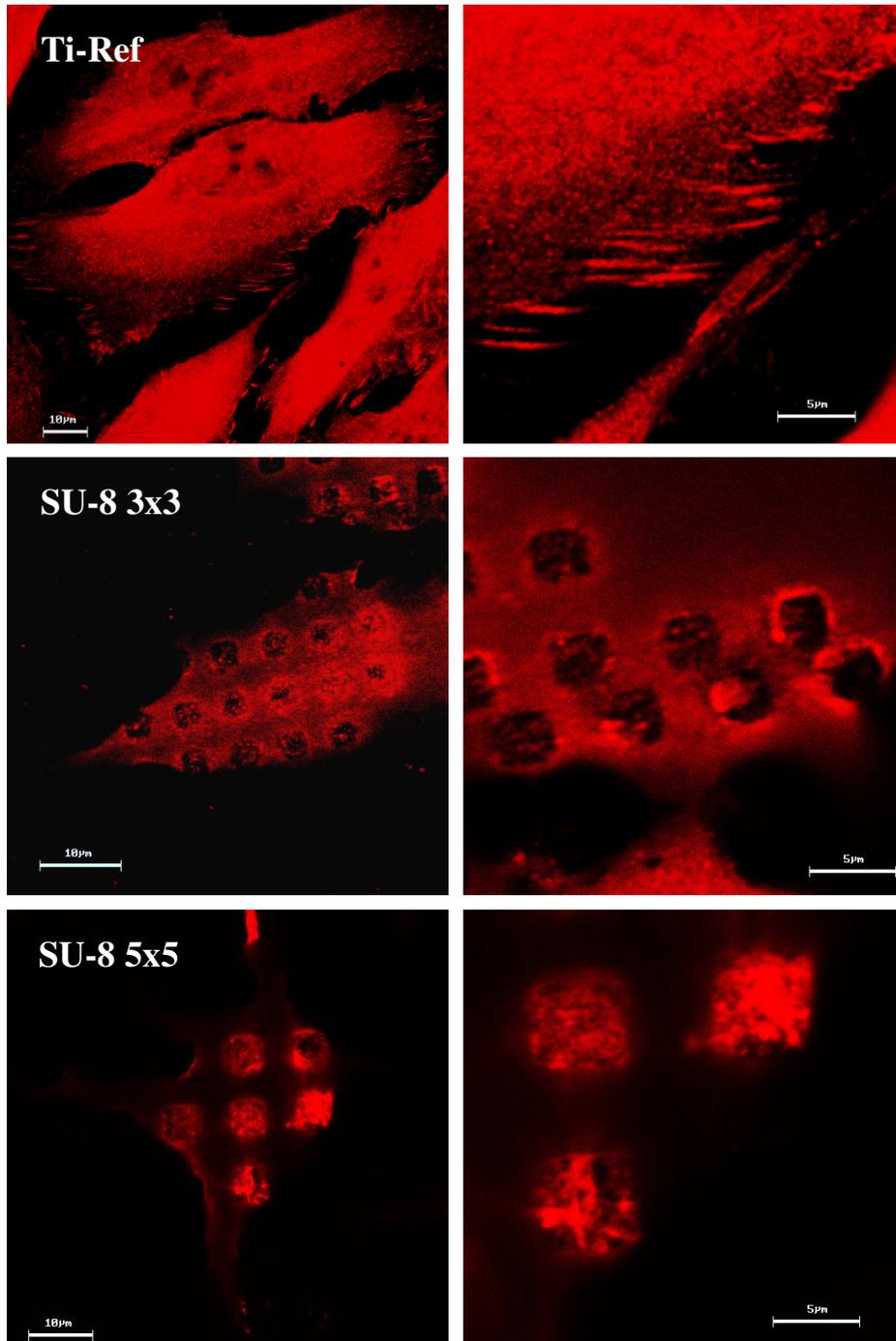


Abb. 31: Formation und Verteilung von Vinkulinkontakten in MG-63 Osteoblasten nach 24 h auf mikrostrukturierten Titanoberflächen (SU-8 3x3 und SU-8 5x5) im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref. Auf Ti-Ref bildet Vinkulin fibrilläre Adhäsionskontakte, welche randständig lokalisiert sind (siehe Pfeil). Auf SU-8 3x3 und SU-8 5x5 kommt es zur punktuellen Ausbildung von Vinkulinkontakten mit einer Clusterung auf den Pfofenplateaus und -kanten (siehe Pfeil) (LSM 410, Carl Zeiss AG).

4.2.5.2 Bestimmung der Proteinexpression von Vinkulin

Die Quantifizierung der Proteinexpression des Vinkulins erfolgte mittels Western Blot Analyse und anschließender densitometrischer Auswertung. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Vinkulin nach 24 h in MG-63 Osteoblasten auf den mikrostrukturierten Oberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 im Gegensatz zur planaren Referenz deutlich verringert ist (siehe Abb. 32). Dabei liegt bei SU-8 5x5 eine Signifikanz vor. Untereinander verglichen, ist die Abnahme des Vinkulins bei SU-8 5x5 stärker als bei SU-8 3x3.

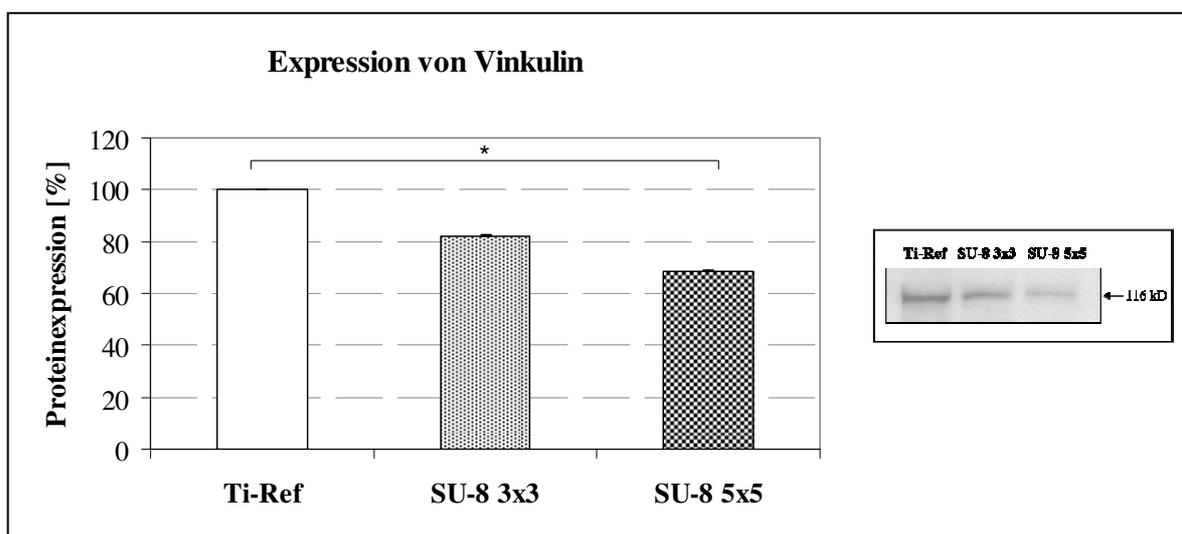


Abb. 32: Densitometrische Analyse der Expression von Vinkulin in MG-63 Osteoblasten nach 24 h. Im Vergleich zur planaren Referenz ist die Proteinexpression von Vinkulin auf SU-8 3x3 und SU-8 5x5 deutlich reduziert (MW \pm SD, *p < 0,05, ungepaarter *t*-test, n = 4) (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS, Quantity One® 1-D analysis software, Bio-Rad).

4.2.5.3 Expressionsanalyse von Integrinrezeptoren

Integrinrezeptoren besitzen eine wichtige Bedeutung in der Rezeptor-vermittelten Adhäsion zwischen Zellen und Biomaterial. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der Integrinexpression in MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen nach 24 h sind in Abb. 33 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Verminderung der Expression der β 3-Integrin-Untereinheit auf der Pfostenoberfläche SU-8 5x5 verglichen mit der planaren Kontrolloberfläche (Ti-Ref). Diese β 3-Untereinheit ist ein typischer Rezeptor für das Bone

Sialo Protein, dessen Expression auf den Pfostenoberflächen gleichermaßen reduziert war (siehe Abb.37).

Hinsichtlich der Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 1$ ist im Vergleich zur planaren Referenz eine Abnahme von Ti-Ref > G-2-2 > SU-8 3x3 > SU 8 5x5 zu erkennen. Auch die Expression von $\alpha 2$ war auf den Mikrostrukturen im Gegensatz zu Ti-Ref leicht vermindert. Diese beobachteten Differenzen in der Expression der $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - und $\beta 1$ -Integrinrezeptoren waren jedoch statistisch nicht signifikant.

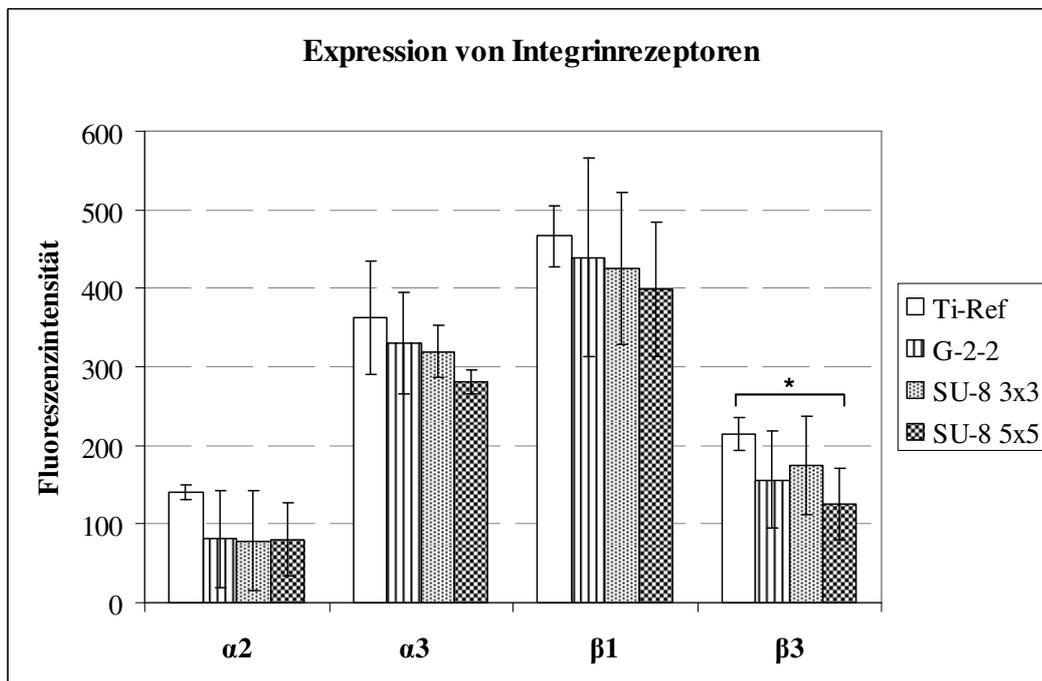


Abb. 33: Einfluss der Oberflächengeometrie auf die Expression von Integrinrezeptoren in MG-63 Osteoblasten nach 24 h. Im Gegensatz zur planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref) ist die Expression der $\beta 3$ -Untereinheit auf der Pfostenoberflächen SU-8 5x5 signifikant reduziert (MW \pm SD, *p < 0,05, gepaarter *t*-test, n = 3) (FACSCalibur, BD Biosciences).

4.2.6 Bestimmung der Proliferationsaktivität

Zur Untersuchung des Einflusses der Oberflächentopographie auf das Proliferationsverhalten von MG-63 Osteoblasten wurde die Proliferation mittels DNA-Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Zellzyklusphasen G0/G1 (Protein- und RNA-Synthese/Ruhephase, G = gap = Lücke), S (Synthesephase), G2/M (unmittelbar vor der Mitosephase) und Apoptose (programmierter

Zelltod) analysiert. Die Zellzyklusphasen S und G2/M repräsentieren dabei die proliferative Phase einer Zellpopulation.

Die Auswertung des prozentualen Anteils proliferativer MG-63 Osteoblasten nach 24 h auf den mikrostrukturierten Oberflächen im Vergleich zur planaren Referenz ist in Abb. 34 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Proliferationsrate der MG-63 Zellen auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche (Ti-Ref) signifikant geringer ist. Dabei lässt sich die niedrigste Proliferationsrate bei den Zellen finden, welche auf SU-8 3x3 gewachsen sind. Auch im Vergleich zur Grabenoberfläche G-2-2 lässt sich auf beiden Pfostenoberflächen eine signifikante Reduktion in der Proliferationsaktivität der Osteoblasten verzeichnen. Auf der Grabenstruktur G-2-2 dagegen ist die Zellproliferation mit 87,7 % annähernd identisch mit der proliferativen Rate der Zellen, welche auf der planaren Referenz (87,5%) gewachsen sind.

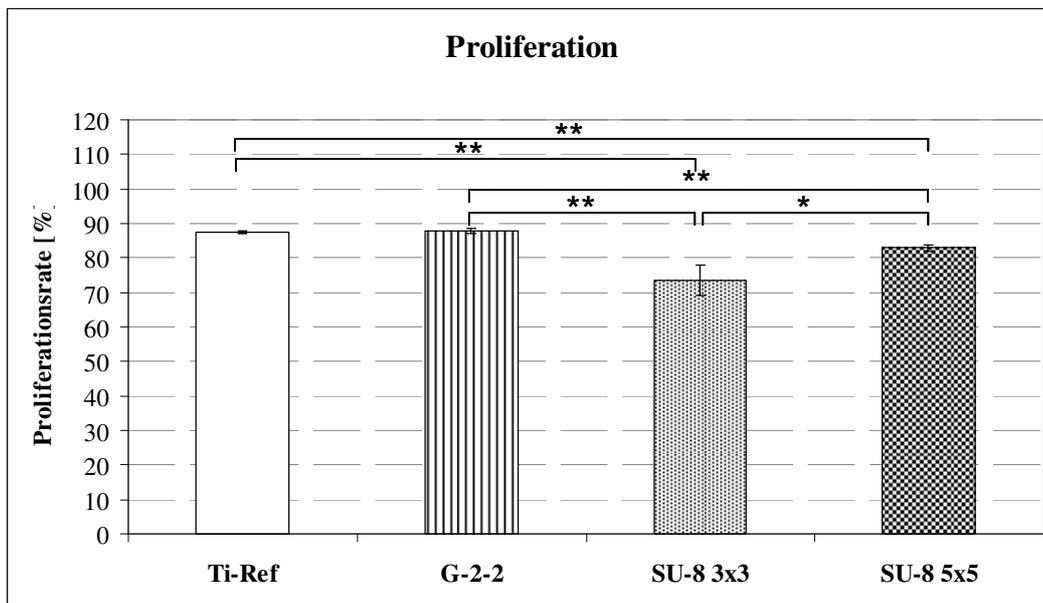


Abb. 34: Durchflusszytometrische Analyse der Proliferationsrate von MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen nach 24 h. Die Zellproliferation auf der Grabenstruktur versus Ti-Ref ist annähernd gleich. Im Gegensatz dazu ist die Proliferationsrate auf den Pfostenoberflächen signifikant reduziert (MW \pm SD; *p < 0,05, **p < 0,01, p < 0,001, ungepaarter *t*-test, n = 3 à 20.000 Zellen) (FACSCalibur, BD Biosciences).

Aus der durchflusszytometrischen Messung konnte gleichzeitig die Apoptoserate der MG-63 Zellen auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen bestimmt werden (siehe Abb. 35). Hier ist zu erkennen, dass keine der mikrostrukturierten Oberflächen eine erhöhte

Apoptose induziert, da im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche (Ti-Ref) keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen sind. Die Apoptoserate liegt auf allen Oberflächen unter 1,0 %.

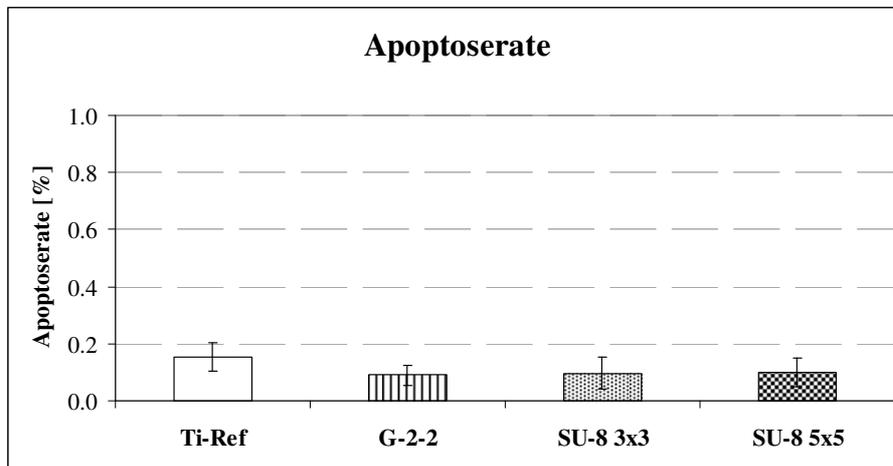


Abb. 35: Apoptoserate von MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen nach 24 h. Keine der mikrostrukturierten Oberflächen induziert eine erhöhte Apoptose bei den Zellen (MW \pm SD, ungepaarter *t*-test, n = 3 à 20.000 Zellen) (FACSCalibur, BD Biosciences).

4.2.7 Expressionsanalyse knochenspezifischer Matrixproteine

Die Synthese von Proteinen der Extrazellulären Matrix ist für Osteoblasten von funktioneller Bedeutung und ein Indikator für osteogene Differenzierung.

Daher wurde die Expression der knochenspezifischen Matrixproteine Kollagen-I und Bone Sialo Protein-2 (BSP-2) in MG-63 Osteoblasten nach 24 h in Abhängigkeit der Oberflächentopographie von Titanoberflächen untersucht. Dazu erfolgten Western Blot Analysen, welche anschließend densitometrisch ausgewertet wurden, wodurch eine quantitative Bestimmung der Proteinexpression ermöglicht werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind den folgenden Abbildungen (Abb.36 + Abb.37) zu entnehmen; dabei sind die einzelnen Werte jeweils normiert zur planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref dargestellt. Hinsichtlich der Expression des Proteins Kollagen-I in MG-63 Zellen nach 24 h, besteht eine signifikante Reduktion der Kollagensynthese auf den mikrostrukturierten Oberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 im Vergleich zur planaren Referenz (Ti-Ref) (siehe Abb. 36). Die Syntheserate von Kollagen-I ist dabei auf beiden Pfostenstrukturen um fast 50 % vermindert, wobei auf SU-8 5x5 mit 50,4 % der statistisch geringste Wert zu verzeichnen ist.

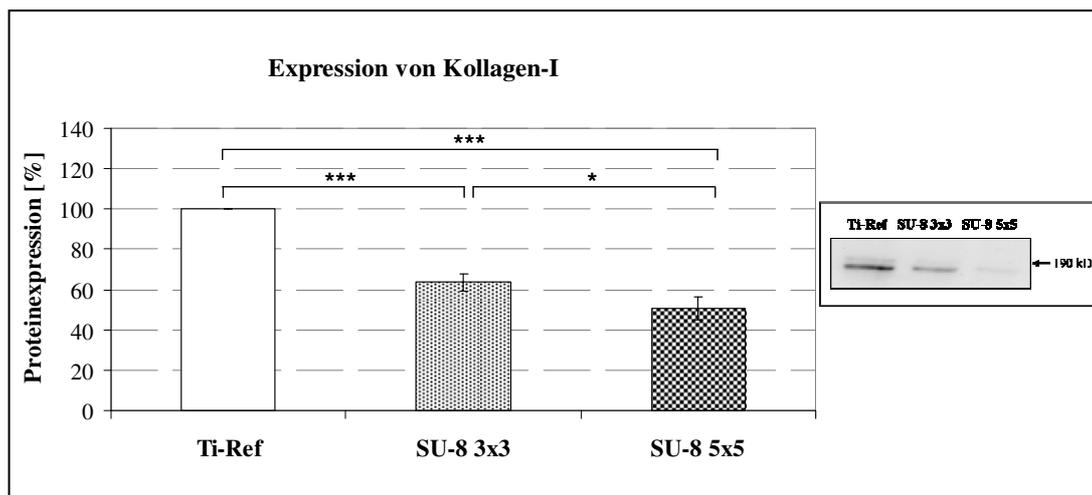


Abb. 36: Expression von Kollagen-I in MG-63 Osteoblasten nach 24 h auf mikrostrukturierten Titanoberflächen (links: densitometrische Analyse; rechts: Western Blot Auswertung). Im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche (Ti-Ref) ist die Proteinexpression von Kollagen-I auf beiden Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 signifikant reduziert. (MW \pm SD, * p < 0,05, *** p < 0,001, ungepaarter t -test, n = 4) (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS, Quantity One® 1-D analysis software, Bio-Rad).

Wird die Expression des Bone Sialo Proteins-2 (BSP-2) in MG-63 Zellen betrachtet (siehe Abb. 37), so zeigt sich nach 24 h auch hier - bezogen auf Ti-Ref - eine statistisch verminderte Syntheserate auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5, wie bereits schon im Fall der Kollagen-I Expression beobachtet werden konnte. Auf beiden Pfostenoberflächen ist die Expression von BSP-2 mit Werten von 46,8 % bei SU-8 3x3 und 19,9 % bei SU-8 5x5 stark reduziert. Dabei liegt auch hier eine statistisch höhere Abnahme der BSP-2 Synthese auf SU-8 5x5 als auf SU-8 3x3 vor.

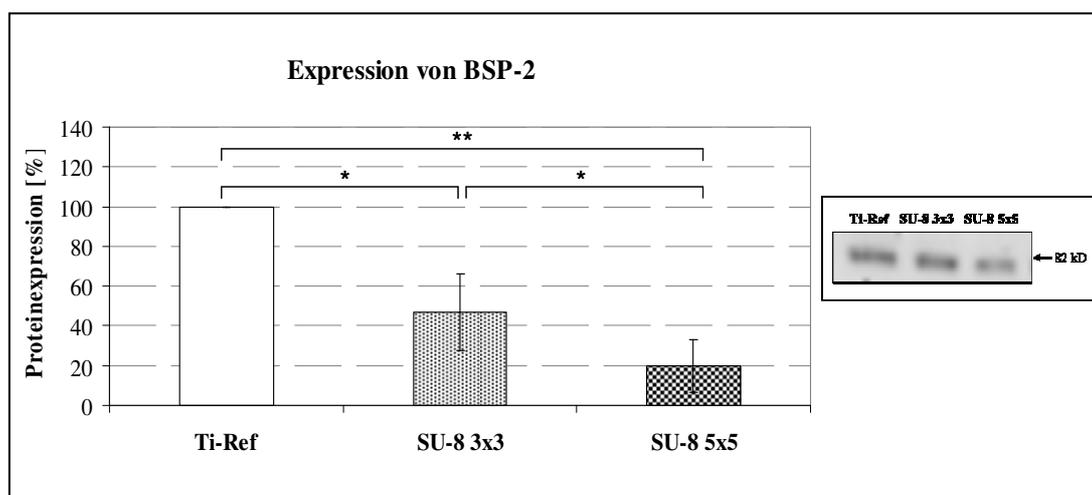


Abb. 37: Expression von BSP-2 in MG-63 Osteoblasten nach 24 h auf mikrostrukturierten Titanoberflächen (links: densitometrische Analyse; rechts: Western Blot Auswertung). Sowohl auf SU-8 3x3 als auch auf SU-8 5x5 ist die Expression von BSP-2 im Gegensatz zur planaren Referenz (Ti-Ref) signifikant reduziert (MW \pm SD, * p < 0,05, ** p < 0,01, ungepaarter t -test, n = 4) (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS, Quantity One® 1-D analysis software, Bio-Rad).

5 Diskussion

Zellen besitzen die Fähigkeit Veränderungen in ihrer Umgebung wahrzunehmen und auf diese durch die Transmission extrazellulärer Signale ins Zellinnere bis hin zum Zellkern zu reagieren [80]. An der Grenzfläche zwischen Zellen und Biomaterial werden diese Interaktionen hauptsächlich durch die physiko-chemischen Eigenschaften des Biomaterials bestimmt. Dabei spielen besonders die Oberflächenchemie als auch die Oberflächentopographie von Biomaterialien eine wesentliche Einflussgröße [35][37][46][110].

In Hinblick auf die topographische Modifikation von Oberflächen konnte gezeigt werden, dass diese das zelluläre Verhalten hinsichtlich verschiedenster Aspekte beeinflussen kann. Diese können nicht nur morphologische Veränderungen der Zelle, wie z. B. Änderungen in Zellform oder Zellausrichtung umfassen sondern überdies auch nachfolgende funktionelle Veränderungen der Zellphysiologie, wie beispielsweise der Genexpression, Proteinsynthese oder Mineralisierung bedingen [7][67].

Trotz der Existenz zahlreicher Studien über Interaktionen an der Zell-Material-Grenzfläche, sind die zugrunde liegenden Mechanismen bis zum heutigen Tage noch weitgehend ungeklärt und Korrelationen des zellbiologischen Verhaltens in Antwort auf physiko-chemischen Materialeigenschaften noch immer unzureichend [43][111][112].

Die Gründe dafür sind einerseits in der großen Komplexität und Diversität des biologischen Verhaltens zu sehen. Zum anderen besitzen auch die Biomaterialien per se eine hohe strukturelle und damit einhergehende physikalisch-chemische Komplexität, welches eine entsprechende Analyse von Zell-Material-Interaktionen zusätzlich erschwert.

In den meisten Studien werden stochastisch modifizierte Oberflächen mit einer randomisierten Topographie verwendet. Dies macht die Identifikation direkter Abhängigkeiten bzw. Kausalitäten zwischen spezifischen strukturellen Materialparametern und individuellen Aspekten der Zellantwort mehr als kompliziert. Folglich kann der Einsatz von Materialoberflächen mit geometrisch definierten Mikrostrukturen - wie in dieser Arbeit verwendet - die Analyse des topographischen Einflusses auf die Zellphysiologie vereinfachen.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen mit regulären Geometrien auf die Zellphysiologie von humanen osteoblastenähnlichen MG-63 Zellen zu untersuchen, um mögliche

Zusammenhänge zwischen Zellarchitektur und Zellfunktion in Abhängigkeit spezifischer physiko-chemischer Oberflächenparameter zu finden und aufzuklären.

Die erzielten Ergebnisse aus dieser Analyse der Zell-Material-Interaktion zeigen deutlich, dass die Mikrostruktur von Titanoberflächen in einer topographisch abhängigen Art und Weise diverse zelluläre Funktionen der Osteoblasten beeinflusst.

Im Einzelnen belegen die Ergebnisse definiert topographisch induzierter Effekte, u. a. Veränderungen der Zellmorphologie, der Zelladhäsion, des Ausbreitungsverhaltens (Spreading), der Expression von Integrinrezeptoren sowie der Proliferationsaktivität der MG-63 Zellen. Weiterhin konnte eindrücklich demonstriert werden, dass sowohl die Organisation intrazellulärer Strukturen, speziell das Aktinzytoskelett, als auch die Formation von Adhäsionskomplexen, repräsentiert an der Untersuchung des Adapterproteins Vinkulin, einer direkten Topographie-bedingten Beeinflussung unterlagen. In diesem Zusammenhang konnte gleichzeitig eine Verminderung in der Expression von Vinkulin, Aktin als auch darüber hinaus in der Synthese knochenspezifischer Matrixproteine, wie Kollagen-I und BSP-2, nachgewiesen werden.

Die morphologisch-funktionelle Analyse der Osteoblasten zeigt, dass die MG-63 Zellen ihre Morphologie sowie ihr Ausbreitungsverhalten in Abhängigkeit der Mikrostruktur der Titanoberflächen modulieren. Die Osteoblasten, die auf der planaren Referenzoberfläche gewachsen sind, bildeten eine polygonale Zellform aus, welche typisch für Osteoblasten ist [7][48]. Auf allen mikrostrukturierten Titanoberflächen hingegen besaßen die MG-63 Zellen einen langgestreckten Phänotyp. Dies wurde durch entsprechend niedrigere Formfaktoren für die Zellen auf den Pfostenoberflächen (SU-8 3x3 und SU-8 5x5) und der Grabenoberflächen G-2-2 im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche Ti-Ref quantitativ belegt.

Zusätzlich zu diesen beobachteten phänotypischen Veränderungen kam es auf allen mikrostrukturierten Oberflächen zu einer topographisch induzierten Ausrichtung (contact guidance) der MG-63 Osteoblasten, wobei eine Orientierung der Zellen parallel entlang der Gräben auf der Oberfläche G-2-2 sowie in 45 °- bzw. 90 °-Winkeln zu den Pfosten auf den SU-8 3x3- und SU-8 5x5 Pfostenoberflächen auftrat.

Das Auftreten dieses Phänomens wird durch andere Studien gestützt, welche zeigte, dass eine geometrisch definierte Mikrotopographie von Titanoberflächen, wie z. B. grabenstrukturierte Titanoberflächen in der Dimension 2-10 µm, zur Ausrichtung von MG-63 Zellen führt und dadurch eine veränderte Morphologie in Form elongierter Zellen induziert [46][54]. Des Weiteren beschreibt Sjöström et al. [113], dass Titanoberflächen

mit Pfosten in Nanodimensionierung (Pfostenhöhe: 55 nm und 100 nm) eine Elongation von MG-63 Zellen bewirken; hier führt eine zunehmende Pfostenhöhe zu einer erhöhten Zellelongation und darüber hinaus zu einer verminderten Zellausbreitung der Osteoblasten. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung war die Zellausbreitung der MG-63 Osteoblasten auf den Mikrostrukturen im Vergleich zur planaren Titanreferenz nach 24 h deutlich vermindert. Dabei war die Zellfläche auf allen mikrostrukturierten Oberflächen - unabhängig von der individuellen Oberflächengeometrie (Pfosten oder Graben) - um mehr als die Hälfte geringer als für die Zellen, welche auf der planaren Titanoberfläche gewachsen sind. Unbeachtet dessen waren innerhalb der Mikrostrukturen G-2-2 (Graben), SU-8 3x3 und SU-8 5x5 (Pfosten) nur geringe Differenzen hinsichtlich der Zellflächen zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass die Zellausbreitung der MG-63 Osteoblasten vermutlich nicht so stark von der spezifischen Geometrie der Titanoberfläche (d. h. Design und Dimensionierung) beeinflusst wurde, sondern dass eher der grundlegende oberflächentopographische Unterschied - planar gegen mikrostrukturiert - die übergeordnete Einflussgröße für diesen spezifischen zellphysiologischen Aspekt war.

Um die hier gezeigte Abnahme im Zellspreading auf den mikrostrukturierten Oberflächen, verglichen mit der planaren Titanoberfläche, zu erklären, bedarf es einer Betrachtung mehrerer Gesichtspunkte, welche als ursächlich dafür herangezogen werden können.

Ein Grund für das reduzierte Ausbreitungsverhalten der Zellen auf den Mikrostrukturen kann die dort vorliegende verminderte Adhäsionsfläche der Zelle sein. Andererseits besitzen topographisch modifizierte Oberflächen, basierend auf der Mikrostrukturierung allein, spezifische physikalische und chemische Eigenschaften, wie Unterschiede in der Oberflächenrauigkeit oder -benetzbarkeit, welche das Zellverhalten beeinflussen [114][115][116]. Die zum Zwecke der physiko-chemischen Oberflächencharakterisierung durchgeführten Untersuchungen zeigten Unterschiede in der Benetzbarkeit sowie der Oberflächenenergie zwischen den mikrostrukturierten Titanoberflächen im Vergleich zur planaren Kontrolloberfläche (Ti-Ref). Die Kontaktwinkelmessungen ergaben eine höhere Hydrophobie und eine niedrigere Oberflächenenergie (inklusive geringere polare Komponente) für die mikrostrukturierten Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 im Vergleich zur planaren Referenz.

Es ist bekannt, dass sowohl das Maß an Benetzbarkeit als auch die Oberflächenenergie durch verschiedene Materialcharakteristika, darunter Oberflächenchemie und -topographie, beeinflusst werden kann [117]. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Proben in gleicher Weise mit Titan beschichtet waren und somit die gleiche Oberflächenchemie aufwiesen,

kann der chemische Einfluss in diesem speziellen Fall ausgeschlossen werden. Folglich müssen die gemessenen Unterschiede in Benetzbarkeit und Oberflächenenergie direkt auf die Unterschiede durch die individuellen Oberflächengeometrien zurückzuführen sein. Der Grund für die Unterschiede in der Benetzbarkeit zwischen der planaren und den mikrostrukturierten Oberflächen ist wahrscheinlich durch die Strukturform der Pfosten, bzw. speziell der Kavitäten zwischen den einzelnen Pfosten zu sehen, welche eine Erhöhung des Kontaktwinkels gegenüber Wasser und somit eine entsprechend gesteigerte Hydrophobie dieser Oberflächen bewirken. Diesbezüglich belegen Studien aus der Literatur eine lineare Steigerung des Wasserkontaktwinkels mit steigender Rauigkeit bzw. mit Zunahme des Grades der Mikrostrukturierung von Titanoberflächen [118][119].

Studien zeigen, dass Oberflächen, welche eine moderate Hydrophilie aufweisen für die Adhäsion der Zellen sowie für die Zellausbreitung und -wachstum von Vorteil sind [120][121], was möglicherweise auf die bessere Proteinadsorption zurückzuführen ist [117][120].

Die Oberflächenenergie eines Materials ist ebenfalls ein wesentliches Materialcharakteristikum, welches zelluläres Verhalten beeinflusst. Diesbezüglich wird in mehreren Studien berichtet, dass auf Oberflächen mit niedriger Oberflächenenergie die Zelladhäsion als auch die Zellausbreitung vermindert sind [46][120]. Hinsichtlich Zelladhäsionsprozesse spielt insbesondere die polare Komponente der Oberflächenenergie, welche Auskunft über die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen permanenten Dipolen und permanenten und induzierten Dipolen gibt, eine wichtige Rolle.

Hier beschreibt Hallab et al. [117] das Vorkommen einer verstärkten Adhäsion von Fibroblasten auf Titanoberflächen mit zunehmendem Anteil der polaren Komponente der Oberflächenenergie und deutet somit auf einen kausalen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern hin. Auch für Osteoblasten, welche auf Implantatoberflächen mit höheren Oberflächenenergien und größerer Hydrophilie wuchsen (z. B. auf verschiedenen chemisch modifizierten Quarzoberflächen), konnte ein erhöhtes Maß an knochenbildender Aktivität festgestellt werden [7][116][122]. Diese Beobachtungen sind konform mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, wonach die Verringerung der initialen Zelladhäsion sowie die Verminderung der Zellausbreitung auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen simultan mit einer entsprechenden Reduktion der Oberflächenenergie (inklusive einer geringeren polaren Komponente) auf den dazugehörigen Oberflächen einhergehen.

Auf hydrophoben Oberflächen konnte eine reduzierte Adsorption von Proteinen gezeigt werden [117][120]. Überdies belegen aktuelle Untersuchungen zur Proteinexpression auf mikrostrukturierten, metallischen Biomaterialien, inklusive Titan, dass sowohl hydrophobe Oberflächen als auch eine geringe polare Komponente zu einer eingeschränkten Synthese von knochenspezifischen Matrixproteinen wie z. B. Kollagen, Osteocalcin und alkalischer Phosphatase (ALP) beitragen und so zu einer Verminderung des osteogenen Potenzials von Osteoblasten führen können [7][123][124]. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Abnahme der Expression der osteogenen Matrixproteine Kollagen-I und vor allem auch BSP-2 in MG-63 Zellen auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 nachgewiesen werden, welches mit einem erhöhten Wasserkontaktwinkel und einer geringeren Oberflächenenergie (inklusive verringerter polarer Komponente) dieser Mikrostrukturen einher geht und somit die angeführten Ergebnisse aus der Literatur bestätigt. Überdies können für diese beobachtete Syntheseinhibition jedoch auch weitere Ursachen, wie z. B. die stark veränderte Aktinformation auf den Pfostenstrukturen, verantwortlich gemacht werden.

Unbeachtet dessen ist jedoch die Aufklärung der zu Grunde liegenden Ursache-Wirkungs-Beziehung der topographisch induzierten quantitativ und qualitativ veränderten Gen- bzw. Proteinexpression weiterhin schwierig. So bleibt zu klären, ob die hier beobachtete Inhibition der Zelladhäsion und des Zellsreadings auf den mikrostrukturierten Oberflächen ursächlich für die verminderte Proteinsyntheserate ist oder ob die mangelhafte Fähigkeit der Zellen gewisse Adhäsionskomponenten, wie z. B. Integrinrezeptoren oder Fibronectin in erforderlichem Maße zu synthetisieren bzw. zu sekretieren dazu führen, dass infolge dessen die Zelladhäsion negativ beeinflusst ist. Zusätzlich kann auch das Vorliegen möglicher struktureller Änderungen in der Proteinkonformation und die somit einhergehende veränderte Zugänglichkeit entsprechender Substratbindungsstellen einen negativen Einfluss auf die Zellen haben und demnach zu einer verschlechterten Zellanhaftung auf den Oberflächen beitragen.

Durch die rasterelektronenmikroskopische Analyse der Zellmorphologie konnte klar gezeigt werden, dass die MG-63 Zellen lediglich auf den Plateaus der Pfosten adhäreren. Demnach besitzen die Zellen - relativ zur Gesamtzellfläche - auf den Pfostenoberflächen eine kleinere Kontaktfläche als auf der planaren Referenzoberfläche (Ti-Ref). Dies kann ein weiterer Grund für die verminderte Zelladhäsion auf den mikrostrukturierten Oberflächen sein.

Ein weiterer zentraler Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Ausbildung und Formation von Adhäsionskomplexen während der Interaktion zwischen MG-63 Osteoblasten und mikrostrukturierten Titanoberflächen. Zu diesem Zwecke wurde einerseits die Expression von Integrinen, welche für die rezeptorvermittelte Zelladhäsion verantwortlich sind [65][71], als auch die qualitative und quantitative Analyse der Vinkulinkontakte, als ein zentrales Adapterprotein im Adhäsionskomplex [70][74] untersucht.

Hinsichtlich der Integrinexpression konnte eine signifikante Abnahme in der Expression der $\beta 3$ -Untereinheit auf den Pflasteroberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 verzeichnet werden. Es ist bekannt, dass die Integrin- $\beta 3$ Untereinheit Heterodimere mit verschiedenen α -Untereinheiten bilden kann, u. a. mit der Untereinheit αv als Rezeptor für den Ligand BSP-2 [65]. Auf Grund dieser Tatsache scheint es daher einen direkten Zusammenhang mit der dazugehörig beobachteten verminderten BSP-2 Proteinexpression zu geben.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Integrine eine gewisse Substratsensitivität hinsichtlich der Oberflächentopographie aufzuweisen scheinen. Diese Hypothese wird durch bestehende Analysen gestützt [48][125], in welchen beispielsweise Olivares-Navarrete et al. [125] resümierte, dass speziell die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin Signalgebung für die osteogene Differenzierung auf Titan-Mikrostrukturen ausschlaggebend ist, welches folglich entsprechende Abhängigkeiten bezüglich der Interaktion mit Titanoberflächen widerspiegelt.

Jedoch bleibt die Frage, welche der physikalisch-chemischen Materialeigenschaften ursächlich für diese Variationen im Expressionsmuster der Integrine sind, weiterhin spekulativ. Ist es entweder die spezifische Oberflächentopographie (scharfkantig, spitz), elektrostatische Kräfte, die Metalloxidschicht oder sind es Unterschiede in der Oberflächenenergie?

Um sich dieser Antwort zu nähern, kann eine weitere Studie herangezogen werden, in welcher gezeigt wurde, dass auf stochastisch mikrostrukturierten Titanoberflächen die $\beta 3$ -Integrinuntereinheit sensitiv zur Rauigkeit der Titanoberflächen reagiert hat [48]. In dieser Studie konnte jedoch eine höhere $\beta 3$ -Integrin Expression in MG-63 Osteoblasten auf den mikrorauen Oberflächen gefunden werden. Eine mögliche Erklärung dieses - zu den hier vorliegenden Beobachtungen - kontroversen Ergebnisses kann die Tatsache sein, dass möglicherweise das Maß der Oberflächenenergie ein stärkerer Modulator dieser speziellen Zellfunktion ist, als die Oberflächenrauigkeit. Diese Vermutung wird auch in anderen Studien postuliert und stellt somit eine valide These zur Erklärung dieses Ergebnisses dar [110][124].

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Qualität von Interaktionen zwischen Zelle und Biomaterial ist die Ausbildung von Fokaladhäsionen, welche bei dieser von essentieller Bedeutung sind. In diesen Adhäsionskomplexen ist eine Vielzahl von Komponenten, wie Vinkulin, involviert, welches als ein wesentliches Adapterprotein für die Integrinrezeptoren fungiert [74][42]. Die Auswertung der mikroskopischen Untersuchungen zeigte, dass die Lokalisation und Formation der Vinkulinkontakte auf den mikrostrukturierten Titanoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 lediglich auf die Plateaus der Pfosten, d. h. auf die Adhäsionsflächen der Zellen, beschränkt war. Solch eine Vinkulinformation konnte auch auf korundgestrahlten Titanoberflächen beobachtet werden, auf welchen entsprechende Vinkulincluster vorrangig an den Ankerpunkten der Osteoblasten an den Kanten der mikrostrukturierten Metalloberfläche vorzufinden waren [48]. Die quantitative Auswertung der Expressionsdaten belegt weiterhin eine reduzierte Expressionsrate von Vinkulin auf den mikrostrukturierten Oberflächen im Gegensatz zur planaren Referenzoberfläche.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit schlussfolgern, dass in Hinblick auf die Ausbildung von Adhäsionskomplexen sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Verminderung in Folge der zu Grunde liegenden Oberflächentopographie vorliegt.

Diese lokal konzentrierte, inhomoge Verteilung der Adhäsionskontakte könnte eine zusätzliche Ursache für das reduzierte Ausbreitungsverhalten der Osteoblasten auf den Pfostenoberflächen sein. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus anderen Untersuchungen überein, welche belegen, dass bezüglich des Ausbreitungsverhaltens (Spreading) von Zellen eher glatte als strukturierte Oberflächen bevorzugt werden [7][41].

Neben der bereits erwähnten verminderten Ausbildung von Adhäsionskomplexen kann für das reduzierte Ausbreitungsverhalten der MG-63 auf den mikrostrukturierten Oberflächen jedoch auch die beobachtete intrazelluläre Veränderung des Aktinzytoskeletts verantwortlich gemacht werden, das eine fundamentale Rolle in zahlreichen zellulären Vorgängen, inklusive der Zellausbreitung, besitzt [80][81][126].

Die konfokalmikroskopische Auswertung zeigte, dass auf den Pfostenoberflächen eine stark veränderte Organisation der Aktinfasern vorherrschte. Hier war das Aktin nicht in typischer Form von langen Stressfasern, so wie auf der planaren Titanoberfläche, organisiert sondern lediglich als kurze Fragmente, welche akkumuliert auf den Plateaus und Ecken der Pfosten vorkamen [86].

Mit Hilfe der neu entwickelten Software FilaQuant konnten die beobachteten Unterschiede quantitativ bestimmt werden. Dies ermöglichte das Erbringen eines datenbasierten

Beweises für das Vorliegen struktureller Unterschiede in der Organisation des Aktinzytoskeletts [102][104][127].

Die erhaltenen Ergebnisse belegten hier eine signifikant verminderte durchschnittliche Filamentlänge auf den Pfostenoberflächen. Im Vergleich dazu war die Länge der Aktinfilamente auf der Grabenstruktur G-2-2 und der planaren Referenz annähernd gleich. Hinsichtlich der Anzahl der Aktinfilamente zeigte sich sowohl auf der Grabenstruktur als auch auf den Pfostenstrukturen eine signifikante Abnahme im Vergleich zur planaren Referenz. Somit könnten also diese phänotypischen, d. h. qualitativen, als auch die quantitativen Veränderungen ausschlaggebend für das reduzierte Zellspreading auf den mikrostrukturierten Oberflächen sein.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Proliferation der MG-63 Osteoblasten nach 24 h auf den pfostenstrukturierten Oberflächen deutlich reduziert war. Dem hingegen waren die Proliferationsraten der Zellen auf G-2-2 und Ti-Ref ähnlich. In diesem Zusammenhang sei zu erwähnen, dass auf allen Mikrostrukturen kein Apoptose-induzierender Effekt nachgewiesen werden konnte. Hunter et al. [128] berichtete, dass die Zellform ein wesentlicher Regulator der Zellproliferation ist; Zellen, welche sich nur in eingeschränktem Maße ausbreiten können, zeigten niedrigere Proliferationsraten als solche, welche eine größere Zellfläche besaßen. Dies würde auch im Falle der Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 zutreffen, jedoch nicht für die grabenstrukturierte Oberfläche G-2-2, auf welcher die MG-63 Zellen trotz geringerer Zellfläche als auf der planaren Referenz eine annähernd gleiche Proliferation wie bei Ti-Ref aufwiesen. Folglich scheinen die Beobachtungen von Hunter et al. zur Erklärung der Abnahme der Proliferation der MG-63 Osteoblasten auf den Pfostenoberflächen nicht ausreichend zu sein, was gleichzeitig bedeutet, dass nicht nur Veränderungen der Zellmorphologie (Spreading) alleine für Alterationen der Zellfunktion verantwortlich sind sondern zusätzliche Ursachen in Betracht gezogen werden müssen.

Daraus lässt sich also schlussfolgern, dass speziell die strukturelle Umordnung des Aktinzytoskeletts möglicherweise auch als ursächlich für die gleichzeitig ermittelte Abnahme der Proliferation von Osteoblasten auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 anzusehen ist.

Dies deutet darauf hin, dass die Architektur des Aktinzytoskeletts für gewisse Zellfunktionen entscheidender zu sein scheint, als andere zelluläre Komponenten oder Organellen, wie z. B. der Zellkern. Diesbezüglich wies Davidsson et al. [35][129] nach, dass trotz einer Deformation des Zellkerns, verursacht durch das Wachstum auf einer

Polylactid-Oberfläche mit Mikropfosten, die Zellfunktion von SaOs-2 Osteoblasten hinsichtlich der ALP-Aktivität und BrdU-Inkorporation, Letzteres charakteristisch für die Proliferationsaktivität der Zellen, unverändert blieb.

Darüber hinaus zeigte die konfokalmikroskopische Analyse des Aktinzytoskeletts eine Adaption der Aktinfilament-Organisation an die Oberflächentopographie, widergespiegelt durch die Aktinakkumulation an den Kanten und Plateaus jedes einzelnen Pfostens bei SU-8 3x3 und SU-8 5x5 sowie der streng parallelen Ausrichtung der Aktinfilamente entlang der Gräben bei G-2-2. Folglich konnte dadurch gezeigt werden, dass nicht nur allein die Morphologie der MG-63 Osteoblasten sondern überdies auch die Architektur des Aktinzytoskeletts in Abhängigkeit der Materialtopographie verändert ist.

Die Lokalisation von Aktinfasern an topographischen Diskontinuitäten von Materialoberflächen, wie Graten oder Kanten, konnte ansatzweise bereits in anderen Studien beobachtet werden, in welchen beispielsweise die Aktinausbildung auf Grabenstrukturen maschinierter Oberflächen analoge Ergebnisse zeigte [48][130][131]. Diese topographisch bedingte Organisation des Aktinzytoskeletts wurde jedoch speziell erst durch die Verwendung von Oberflächen mit regulären Geometrien, wie in der hier vorliegenden Arbeit, besonders eindrucksvoll deutlich.

Auch Curtis et al. [132] demonstrierte in humanen Makrophagen und Blutplättchen eine Aktinakkumulation gemäß der Nanostrukturierung von Polymersubstraten (Nanogräben und -pits). Er spekulierte, dass das topographisch induzierte Eindringen der Plasmalemma zum Entstehen eines Bereiches geordneter Verankerungspunkte für das Aktinzytoskelett führt und dies verantwortlich für den Effekt der geometrisch definierten Anordnung der Aktinfilamente ist. Dem gegenüber steht jedoch das Resultat der hier vorliegenden Arbeit, welches zeigt, dass es auch bei der Kultivierung der MG-63 Zellen entgegen der Schwerkraft zu einer Adaption der Aktinorganisation an die Mikrostruktur kommt. Somit können auf die Zelle wirkende Gravitationseinflüsse, die wiederum zu Druckeinflüssen führen, als Ursache für die Topographie-spezifische Aktininformation ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus kann auch das Vorliegen lokaler physiko-chemischer Materialparameter an den Strukturkanten ursächlich für eine dortige Akkumulation von Aktinfilamenten sein. Diesbezüglich zeigen elektrochemische Untersuchungen auf graben- und pfostenstrukturierten Titanoberflächen hinsichtlich der Interaktion mit MG-63 Osteoblasten in einer Studie von Kabaso et al. [133], dass die an den Strukturkanten

vorkommenden elektrostatischen Kräfte das „Festhalten“ der Membran an diesen Punkten und somit die starke Adhäsion der Zellen induziert, welche als ursächlich für die dortige, lokal veränderte Funktion und Osteointegration der MG-63 Zellen postuliert wird.

Dies scheint auch wahrscheinlicher zu sein als eine veränderte Proteinadsorption in diesen Bereichen, denn die in dieser Arbeit durchgeführten analogen Experimente unter Serumfreien Kulturbedingungen zeigte die gleiche phänotypische Ausbildung des Aktinzytoskeletts, wie bei den Experimenten unter Serumzusatz. Sollten physikochemische Einflussgrößen eine Rolle spielen, so müssten diese jedoch weitgehend unabhängig von der chemischen Komposition der Biomaterials sein, da die hier vorliegenden Untersuchungen verdeutlichen, dass sich auch auf identisch pfeifenstrukturierten Siliziumoberflächen die gleiche Aktinadaptation ausprägte wie auf den Pfeifen, welche aus Titan sind. Des Weiteren kann auch eine Akkumulation von Integrinrezeptoren, welche möglicherweise zu diesem Aktin-„Mimikry“ führen könnten, ausgeschlossen werden; hier zeigten die immunzytochemischen Ergebnisse bezüglich der Verteilung des β 1-Integrinrezeptors keine entsprechende Konzentration auf den Pfeifenplateaus und -kanten sondern eine homogen Verteilung des β 1-Integrins innerhalb der gesamten Zelle.

Auch Walboomers et al. [134], welcher die Adhäsion von Fibroblasten auf glatten und grabenstrukturierten (1-20 μ m breit, 0,5-5,4 μ m tief) Polystyroloberflächen untersuchte, postulierte, dass die Diskontinuitäten der Oberflächenstruktur, wie z. B. Kanten oder Grate spezifische lokale mechanische Reize darstellen, welche eine entsprechende Umorientierung der Aktinfilamente an diesen Stellen und somit eine entsprechende Anpassung der Zelle an die zu Grunde liegende Oberflächentopographie bewirken.

Wie die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, müssten diese Einwirkungen schon sehr früh Einfluss auf die intrazelluläre Organisation des Aktins haben, da bereits nach 30 min eine beginnende Akkumulation von Aktin auf den Pfeifenplateaus von SU-8 3x3 und SU-8 5x5 nachgewiesen werden konnte.

Eine weiterer möglicher Erklärungsansatz für die hier herausgestellte topographisch bedingte Organisation der Aktinfilamente auf den Pfeifenoberflächen, eröffnete sich im Rahmen der wissenschaftlichen Tagung „*Interface Biology of Implants (IBI)*“, im Mai 2012, Rostock-Warnemünde durch die persönliche Kommunikation mit Prof. Alexander Bershadsky, leitender Wissenschaftler des *Mechanobiology Institutes (MBI)* in Singapur. Er postulierte, dass die Mikrotopographie der Oberfläche möglicherweise eine Phagozytose initiiert, d. h. die Pfeifen von den MG-63 Osteoblasten als zu

phagozytierende Strukturen angesehen werden, sich dem zu Folge an den Mikropfosten der für die Phagozytose charakteristische Aktinring ausbildet [135] und sich somit die Umordnung des Aktinzytoskeletts auf den Pfostenstrukturen begründet.

Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Phagozytose und (Partikel-)größe externer Stimuli ist bekannt, dass Strukturen bzw. Partikel mit einer Größe von > 500 nm phagozytiert werden und Partikel mit einer kleineren Strukturgröße von phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Zellen durch endozytotische Prozesse internalisiert werden [135]. Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben, dass sowohl Osteoblasten-ähnliche Zellen, u. a. MG-63, als auch primäre Osteoblasten fähig sind, externe Partikel, wie z. B. Metall- oder Polymerpartikel zu phagozytieren [136][137]. Ein weiterer Beleg dafür ist bei Heinemann et al. [136] der Nachweis der Expression des Phagozytose-spezifischen Markers CD68 in Osteoblasten-ähnlichen Zellen (HOS 58) und primären Osteoblasten in vitro. Diese Ergebnisse induzieren also, dass Osteoblasten - gleichwohl diese per se nicht zu den professionell phagozytierenden Zellen, wie die Makrophagen oder Monozyten gehören, zur Phagozytose befähigt sind.

Überdies berichtete Vermes et al. [137] in seiner Studie über Partikel-Phagozytose in MG-63 Osteoblasten über eine damit einhergehende, verminderte Expression des Matrixproteins Kollagen-I. Wird also auch in unserem Falle von dieser Vermutung der Phagozytose ausgegangen, so könnte dies zusätzlich die auf den Pfostenoberflächen SU-8 3x3 und SU-8 5x5 aufgetretene Reduktion der Kollagen-I Synthese erklären. Auch die analog zur Aktinakkumulation stattfindende Anreicherung von Vinkulin auf den Pfostenplateaus, welches mit dem F-Aktin verbunden ist, kann mit einer Phagozytoseinduktion in Zusammenhang gebracht werden, da in Phagosomen eine Anreicherung des Proteins Vinkulin auftreten kann [138]. Hinsichtlich dessen zeigte Wojciak-Stothard et al. [139] in seinen Untersuchungen eine Anreicherung von Vinkulin und entsprechende Aktinpolarisation an Nanotopographien (Kanten und Gräben) in Makrophagen.

Zusammenfassend wird aus den Ergebnissen dieser Studien ersichtlich, dass auch in unserem Fall die Theorie der Phagozytoseinduktion durch die Mikrotopographie als Grund für die Umorganisation des Aktinzytoskeletts in MG-63 Osteoblasten eine valide Erklärung ist. Zur Verifizierung dieser Annahme, müssten jedoch aufbauende Untersuchungen, beispielsweise hinsichtlich der Expression von Phagozytose-Markern in MG-63 Osteoblasten auf den Pfostenstrukturen erfolgen.

Neben diesem Aspekt führt die beobachtete strukturelle Veränderung in der Aktinfilamentformation zu einer weiteren interessanten Fragestellung: dem Zusammenhang zwischen der Formation des Aktinzytoskeletts und der Ausrichtung von Zellen. Viele Studien behaupten, dass die charakteristische Ausbildung des Aktinzytoskeletts ursächlich für die Längskontrolle und die Ausrichtung von Zellen ist [140][141][142]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Zellorientierung durch die Formation der Aktinfilamente bestimmt wird und dabei die Elongation der Zellen konform mit der Orientierung der Aktinfasern entlang der polarisierten Zellachse ist. Obwohl dies der Grund für beobachtete Ausrichtung der MG-63 Osteoblasten auf der Grabenoberfläche G-2-2 sein mag, ist diese Theorie jedoch nicht ausreichend valide um die Orientierung der MG-63 Zellen auf den Pfostenoberflächen zu erklären. Auf diesen Oberflächen trat die Elongation der Zellen interessanterweise ohne eine begleitende Ausrichtung der Aktinfilamente entlang der Längsachse der Zellen auf. Folglich scheint es, dass das Auftreten von Zellorientierungen unabhängig von einer dazugehörigen Ausrichtung der Aktinfilamente ist, welches dem allgemein dazu vorherrschendem Kenntnisstand widersprüchlich ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen daher, dass die Blickwinkel hinsichtlich der zu Grunde liegenden Mechanismen für die Orientierung von Zellen überdacht bzw. erweitert werden sollte.

Zusammenfassend konnte in der hier vorliegenden morphologisch-funktionellen Analyse von Osteoblasten auf definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen ein starker Zusammenhang zwischen physiko-chemischen Oberflächencharakteristika und zellulären Funktionen in einer Topographie-bedingten Abhängigkeit demonstriert und neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Die Verwendung der im Graduiertenkolleg welisa neu entwickelten FilaQuant Software zur Quantifizierung der Aktinfilamente in Abhängigkeit der Oberflächentopographie war besonders hilfreich, um die Menge an zellbiologischen Daten zu erhöhen und so die Korrelation zellulärer Parameter mit spezifischen Materialeigenschaften zu optimieren. Perspektivisch kann die darauf aufbauende Erstellung von mathematisch-systembiologischen Modellen helfen, die Komplexität zwischen der Oberflächentopographie von Biomaterialien und dem Zellverhalten weiter aufzuklären und möglicherweise zukünftig entsprechende Vorhersagen zu erstellen, was bereits Abramson et al. mit der Entwicklung eines in silico-Modells zur Prädiktion des Wachstumsverhalten von Fibroblasten auf chemisch modifizierten Polymersubstraten gelang [143].

6 Zusammenfassung

Um die Zellphysiologie in Abhängigkeit von Implantatoberflächen zu verstehen und darüber hinaus gezielt steuern/regulieren zu können, ist ein detailliertes Wissen über die Art und Weise wie physiko-chemische Charakteristika von Biomaterialien Zellen an der Grenzfläche funktionell beeinflussen, essentiell.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine umfassende Analyse zellbiologischer Parameter von humanen osteoblastenähnlichen MG-63 Zellen auf definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen mit regulärer Geometrie. Dabei lag der Fokus auf der morphometrischen Detektion und Quantifizierung des topographisch induzierten Einflusses der Materialoberfläche auf den Zellphänotyp sowie auf intrazelluläre Adhäsionsstrukturen, speziell das Aktinzytoskelett. Darüber hinaus wurden funktionelle zelluläre Aspekte, wie Proliferation, Zellspreading und Expression knochenspezifischer extrazellulärer Matrixproteine in Zusammenhang mit elektrochemischen Eigenschaften der mikrostrukturierten Titanoberflächen betrachtet. Die erzielten Ergebnisse demonstrieren eindrücklich das Vorhandensein einer spezifischen Zellarchitektur-Zellfunktions-Beziehung von humanen Osteoblasten in Abhängigkeit regulär mikrostrukturierter Titanoberflächen und geben so eine Indikation dafür, wie eine definierte Mikrotopographie von Biomaterialoberflächen eingesetzt werden kann, um zelluläres Verhalten zu regulieren.

Im Speziellen konnte herausgefunden werden, dass die definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen mit Pfostenstrukturen die Zelladhäsion, das Zellspreading, die Expression des Integrinrezeptors $\beta 3$ sowie die Synthese der extrazellulären Matrixproteine Kollagen-I und BSP-2 reduzieren. Hinsichtlich der Ausbildung intrazellulärer Strukturen zeigte sich interessanterweise eine Adaption der Aktinfilamente an die zu Grunde liegende reguläre Oberflächentopographie mit einer streng begrenzten Akkumulation der Aktinfasern auf den Plateaus und den Kanten der Mikrostrukturen. Diese gravierende Änderung der Aktinzytoskelett-Architektur auf den Pfostenoberflächen scheint verantwortlich für die Zellfunktion zu sein, da die Expression der Matrixproteine auf diesen Mikrostrukturen simultan vermindert war. Dabei ermöglichte die Verwendung einer neu entwickelten Software (in Kooperation mit dem Institut für Mathematik) die quantitative Bestimmung der Aktinfilamentformation auf Grundlage der konfokalmikroskopischen Aufnahmen und somit die Korrelation der Daten: Filamentlänge, Filamentanzahl, Orientierung der Filamente mit den Materialdaten Mikrodimensionierung. Zellbiologisch interessant ist der

Aspekt, dass die topographisch induzierte morphologische Ausrichtung der Zellen auf den Mikrostrukturen nicht, wie bisher angenommen, von der Formation der Aktinfilamente abhängig ist, sondern unabhängig davon auftritt – selbst Zellen mit signifikant verkürzten, lokal akkumulierten, ungerichteten Aktinfilamenten entwickelten eine lang ausgestreckte Zellmorphologie auf den Pfostenstrukturen.

Für die zellbiologischen Parameter Adhäsion, Spreading, Integrinexpression und Matrixproteinsynthese wurde ein positiv assoziierter Zusammenhang mit den elektrochemischen Materialcharakteristika Benetzbarkeit und Oberflächenenergie aufgedeckt.

Zusammenfassend konnten durch die Ergebnisse dieser Arbeit umfassende Erkenntnisse zu Zell-Material-Interaktionen mit dem Fokus auf den Einfluss definiert mikrostrukturierter Titanoberflächen gewonnen werden. Die aufgedeckten Zusammenhänge zwischen individuellen Zellfunktionen mit spezifischen physiko-chemischen Materialcharakteristika demonstrierten überdies den Stellenwert der Gewinnung quantitativer und somit korrelationsfähiger Daten. Hier wurde auch verdeutlicht, wie die Entwicklung neuer Methoden für biomedizinische Bildauswertung ein Zugewinn hinsichtlich Datenkorrelationen in Zell-Biomaterial-Untersuchungen bieten kann. Zukünftig könnten so Modelle *in silico* entwickelt werden, die eine Vorhersage des Zellwachstums in Abhängigkeit topographischer Materialdaten zulassen.

Literaturverzeichnis

- [1] Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodelling. *Ann NY Acad Sci* 2006;1092:385-96
- [2] Ng KW, Romas E, Donnan L, Findlay DM. Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1997;11(1):1-22
- [3] Dorozhkin SV, Epple M. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew. Chem.* 2002;114:3260-3277
- [4] Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. Academic Press 2008, 3rd edition, ISBN 978-0-12-098652-1
- [5] Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8(3):212–226
- [6] Ganten D, Ruckpaul K. Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien. Springer Verlag Berlin Heidelberg 2001, ISBN 3-540-67788-7
- [7] Jäger M, Zilkens C, Zanger K, Krauspe R. Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants. *J Biomed Biotechnol* 2007;2007(8):Article ID: 69036
- [8] Nakamura M, Udagawa N, Nakamura H. Bone remodeling and mineral homeostasis. *Clin Calcium* 2006;16(1):46-53
- [9] Schiebler TH, Korf H-W. Anatomie. Steinkopff Verlag 2007, 10. Auflage, ISBN 978-3-7985-1770-7
- [10] van den Berg F. Angewandte Physiologie: Band 1: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen. Georg Thieme Verlag KG 2011, 3. Auflage, ISBN 978-3-13-167583-5
- [11] Raisz LG. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clin Chemistry* 1999;45(8):1353-1358
- [12] Zuo C, Huang Y, Bajis R, Sahih M, Li YP, Dai K, Zhang X. Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodelling. *Osteoporos Int* 2012 (epub ahead of print)
- [13] Clinical Applications of Biomaterials. NIH Consens Statement 1982 Nov 1-3;4(5):1-19
- [14] Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009;30(30):5897-909
- [15] Woo RK, Jenkins D, Greco RS. Biomaterials: Historical Overview and Current Directions. in: *Nanoscale Technology in Biological Systems*. Edited by Greco RS, Prinz FB, and Smith RL, CRC Press 2004, ISBN: 978-0-8493-1940-2

- [16] Meyer U, Büchter A, Wiesmann HP, Joos U, Jones DB. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cells Mat*;2005;9:39-49
- [17] Uggeri J, Guizzardi S, Scandroglio R, Gatti R. Adhesion of human osteoblasts to titanium: A morpho-functional analysis with confocal microscopy. *Micron* 2010;41(3):210-219
- [18] Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P et al. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials* 2000;21:1567-1577
- [19] Craighead HG, James CD, Turner AMP. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. *Curr Opin Solid State Mater Sci* 2001;5:177-184.
- [20] Bell BF, Schuler M, Tosatti S, Textor M, Schwartz Z, Boyan BD. Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics. *Clin Oral Implants Res* 2011;22(8):865-872
- [21] Chen Y, Webster TJ. Increased osteoblast functions in the presence of BMP-7 short peptides for nanostructured biomaterial applications. *J Biomed Mater Res A* 2009;91(1):296-304
- [22] Poh CK, Shi Z, Tan XW, Liang ZC, Foo XM, Tan HC, Neoh KG, Wang W. Cobalt chromium alloy with immobilized BMP peptide for enhanced bone growth. *J Orthop Res* 2011;29(9):1424-1430
- [23] Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 2012;8(2):272-288
- [24] Magdolen U, Auernheimer J, Dahmen C, Schauwecker J, Gollwitzer H, Tübel J, Gradinger R, Kessler H, Schmitt M, Diehl P. Growth promoting in vitro effect of synthetic cyclic RGD-peptides on human osteoblast-like cells attached to cancellous bone. *Int J Mol Med* 2006;17(6):1017-1021
- [25] Pegueroles M, Aguirre A, Engel E, Pavon G, Gil FJ, Planell JA, Migonney V, Aparicio C. Effect of blasting treatment and FN coating on MG63 adhesion and differentiation on titanium: a gene expression study using real-time RT-PCR. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22(3):617-627
- [26] Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W. Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials*. 2006;27(32):5561-5571

- [27] Budiraharjo R, Neoh KG, Kang ET. Hydroxyapatite-coated carboxymethyl chitosan scaffolds for promoting osteoblast and stem cell differentiation. *J Colloid Interface Sci* 2012;366(1):224-232
- [28] Hirota M, Hayakawa T, Yoshinari M, Ametani A, Shima T, Monden Y, Ozawa T, Sato M, Koyama C, Tamai N, Iwai T, Tohnai I. Hydroxyapatite coating for titanium fibre mesh scaffold enhances osteoblast activity and bone tissue formation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41(10):1304-1309
- [29] Rebl H, Finke B, Lange R, Weltmann KD, Nebe JB. Impact of plasma chemistry versus titanium surface topography on osteoblast orientation. *Acta Biomater* 2012;8(10):3840-51
- [30] Duske K, Koban I, Kindel E, Schröder K, Nebe JB, Holtfreter B, Jablonowski L, Weltmann K-D, Kocher T. Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals. *J Clin Periodontol* 2012;39:400-407
- [31] Finke B, Polak M, Hempel F, Rebl H, Zietz C, Stranak V, Lukowski G, Hippler R, Bader R, Nebe JB, Weltmann K-D, Schröder K. Antimicrobial Potential of Copper-Containing Titanium Surfaces Generated by Ion Implantation and Dual High Power Impulse Magnetron Sputtering. *Adv Eng Mater* 2012;14:224-230
- [32] Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 1999;20:573-588
- [33] Rice JM, Hunt JA, Gallagher JA, Hanarp P, Sutherland DS, Gold J. Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanopography surfaces in a single culture model in vitro. *Biomaterials* 2003;24:4799-4818
- [34] Biggs MJP, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CDW, Dalby MJ. The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *J Mater Sci: Mater Med* 2007;18:399-404
- [35] Davidson PM, Özçelik H, Hasirci V, Reiter G, Anselme K. Microstructured surfaces cause severe but non-detrimental deformation of the cell nucleus. *Adv Mater* 2009;21:3586-3590
- [36] Ito Y. Surface micropatterning to regulate cell functions. *Biomaterials* 1999;20:2333-2342

- [37] Nebe JB, Lüthen F, Rychly J. Topology-dependent cellular interactions. In: Brems J, Thull R, Kirkpatrick CJ. *Metallic Biomaterial Interfaces*. Wiley-VCH Weinheim 2007:215-222
- [38] Zhao G, Zinger O, Schwartz Z, Wieland M, Landolt D, Boyan BD. Osteoblast-like cells are sensitive to submicron-scale surface structure. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(3):258-264
- [39] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-681
- [40] Curtis ASG, Wilkinson CDW. Reactions of cells to topography. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1998;9(12):1313-1329
- [41] Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann H-P. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 2004;25:625-31
- [42] Diener A, Nebe B, Lüthen F, Becker P, Beck U, Neumann H-G et al. Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials* 2005;26(4):383-392
- [43] Nebe JB, Lüthen F, Lange R, Beck U. Interface interactions of osteoblasts with structured titanium and the correlation between physicochemical characteristics and cell biological parameters. *Macromol Biosci* 2007;7:567-578
- [44] Passeri G, Cacchioni A, Ravaneti F, Gall C, Elezi E, Macaluso GM. Adhesion pattern and growth of primary human osteoblastic cells on five commercially available titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2010 ;21(7):756-765
- [45] Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, Boyan B. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 2005;26(14):1837-1847
- [46] Ismail FSM, Rohanzadeh R, Atwa S, Mason RS, Ruys AJ, Martin PJ, Bendavid A. The influence of surface chemistry and topography on the contact guidance of MG63 osteoblast cells. *J Mater Sci: Mater Med* 2007;(18):705-714
- [47] Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen, Creugers NHJ. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *J Dent Res* 2006;85(6):496-500
- [48] Lüthen F, Lange R, Becker P, Rychly J, Beck U, Nebe JB. The influence of surface roughness of titanium on β 1- and β 3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials* 2005;26:2423-2440
- [49] Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D. Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs* 2004;178:13-22

- [50] Lange R, Lüthen F, Nebe B, Rychly J, Beck U. Mathematical correlation between biomaterial and cellular parameters – a critical reflection. *Biomol Eng* 2007;24:526-530
- [51] Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res* 2000;49:155-166
- [52] Lee MH, Oh N, Lee SW, Leesungbok R, Kim SE, Yun YP, et al.. Factors influencing osteoblast maturation on microgrooved titanium substrata. *Biomaterials* 2010;31(14):3804-3815
- [53] Elter P, Thull R. Computer Simulations: Modeling of Protein Adsorption on Nanostructured Metallic Surfaces. In: Breme J, Thull R, Kirkpatrick CJ. *Metallic Biomaterial Interfaces*. Wiley-VCH Weinheim 2007:163-169
- [54] Lange R, Elter P, Biala K, Matschegewski C, Stähle S, Loeffler R et al. Titanium surfaces structured with regular geometry – material investigations and cell morphology. *Surf Interface Anal* 2010;42(6–7):497-501
- [55] Lu X, Leng Y. Quantitative analysis of osteoblast behavior on microgrooved hydroxyapatite and titanium substrata. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(3):677-687
- [56] Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, te Riet J, van Delft FC, Luttge R, et al. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials* 2010;31(12):3307e16
- [57] Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124:619-626.
- [58] Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:463-518
- [59] Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 2007;213:565-573
- [60] Boudreau NJ, Jones PL. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem J* 1999;339:481-488
- [61] Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1997;12:1189-1197
- [62] Grzesik WJ, Robey PG. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1994;9:487-496
- [63] Kunze R, Rösler M, Möller S, Schnabelrauch M, Riemer T, Hempel U, Dieter P. Sulfated hyaluronan derivatives reduce the proliferation rate of primary rat calvarial osteoblasts. *Glycoconj J* 2010;27:151-158

- [64] Nebe JGB, Lüthen F. Integrin- and Hyaluronan-mediated Cell Adhesion on Titanium. In: Breme J, Thull R, Kirkpatrick CJ. *Metallic Biomaterial Interfaces*. Wiley-VCH Weinheim 2007:179-183
- [65] Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrins at a glance. *J Cell Sci* 2006;119:3901-3903
- [66] Garcia AJ. Get a grip: Integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2005;26:7525-7529
- [67] Nebe B, Lüthen F, Lange R, Becker P, Beck U, Rychly J. Topography-induced alterations in adhesion structures affect mineralization in human osteoblasts on titanium. *Mater Sci Eng C* 2004;24:619-624
- [68] Arnaout MA, Goodman SL, Xiong J-P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:495-507
- [69] Legate KR, Wickström SA, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Gene Dev* 2009;23:397-418
- [70] Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 2001;114:3583-3590
- [71] Lo SH. Focal adhesion: what's new inside. *Dev Biol* 2006;294:280-291
- [72] Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behaviour. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1692:103-119
- [73] Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:56-68
- [74] Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 2007;179(5):1043-1057
- [75] Dominguez R, Holmes KC. Actin Structure and Function. *Annu Rev Biophys* 2011; 40:169-186
- [76] Brawley CM, Uysal S, Kossiakoff AA, Rock RS. Characterization of Engineered Actin Binding Proteins That Control Filament Assembly and Structure. *PloS ONE* 2010;5(11): e13960
- [77] Stricker J, Falzone T, Gardel ML. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *J Biomech* 2010;43(1):9-14
- [78] Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268:233-239

- [79] Humphries MJ. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:632-640
- [80] Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* 2003;116:1157-1173
- [81] Mooney DJ, Langer R, Ingber DE. Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. *J Cell Sci* 1995;108:2311-2320
- [82] Desouza M, Gunning PW, Stehn JR. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture*. 2012;2(3):75-87
- [83] Pollard TD, Cooper JA. Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 2009;326:1208-1212
- [84] Roelofsen J, Klein-Nulend J, Burger EH. Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro. *J Biomech* 1995;28:1493-1503
- [85] Pravin Kumar P, Bader DL, Knight MM. Viscoelastic cell mechanics and actin remodelling are dependent on the rate of applied pressure. *PLoS One* 2012;7(9):e43938
- [86] Matschegewski C, Staehle S, Löffler R, Lange R, Chai F, Kern D, Beck U, Nebe JB: Cell architecture–cell function dependencies on titanium arrays with regular geometry. *Biomaterials* 2010;31(22):5729–5740
- [87] Eisenbarth E, Linez P, Biehl V, Velten D, Breme J, Hildebrand HF. Cell orientation and cytoskeleton organization on ground titanium surfaces. *Biomol Eng* 2002;19:233-237
- [88] Abgrall P, Conedera V, Camon H, Gue A-M, Nguyen N-T. SU-8 as a structural material for labs-on-chips and microelectromechanical systems. *Electrophoresis* 2007;28,4539-4551
- [89] Reichmanis E, Houlihan F M, Nalamasu O, Neenan T X. Chemical amplification mechanisms for microlithography. *Chem Mater* 1991;3(3):394-407
- [90] Del Campo A, Greiner C. SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography. *J Micromech Microeng* 2007;17:81-95
- [91] SU-8 table of properties. http://www.microchem.com/products/pdf/SU8_50-100.pdf
- [92] Lärmer F, Schilp A. Method of anisotropically etching Silicon. German Patent No. DE4241045C1, 1994
- [93] Kendall K. *Molecular Adhesion and its Applications*. Kluwer Academic, 2001, ISBN 0-306-46520-5
- [94] Wu S. Polar and Nonpolar Interaction in Adhesion. *J. Adhesion* 1973;5:39-55

- [95] Owens DK, Wendt RC. Estimation of Surface Free Energy of Polymers. *J Appl Polym Sci* 1969;13(8):1741-1747
- [96] Pacheco-Pantoja EL, Ranganath LR, Gallagher JA, Wilson PJM, Fraser WD. Receptors and effects of gut hormones in three osteoblastic cell lines. *BMC Physiology* 2011;11:12-25
- [97] Themistocleous GS, Katopodis HA, Khaldi L, Papalois A, Doillon C, Sourla A, Soucacos PN, Koutsilieris M. Implants of Type I Collagen Gel Containing MG-63 Osteoblastlike Cells Can Act as Stable Scaffolds Stimulating the Bone Healing Process at the Sites of the Surgically-produced Segmental Diaphyseal Defects in Male Rabbits. *in vivo* 2007; 21:69-76
- [98] Clover J, Gowen M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* 1994;15(6):585-591
- [99] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag, 4. Auflage, 2003, ISBN 978-3527304929
- [100] Senju Y, Myata H. The Role of Actomyosin Contractility in the Formation and Dynamics of Actin Bundles during Fibroblast Spreading. *J Biochem* 2009;145(2):137-150
- [101] Shapiro HM. *Practical flow cytometry*. New York: Alan R Liss;1988
- [102] Birkholz H, Matschegewski C, Nebe JB, Engel K. Quantification of actin filament organization by estimating graph structures in confocal microscopical images. ISBN 978-3-642-03881-5, *IFMBE Proceedings* 2010;25/4:1932-1935
- [103] Birkholz H. A unifying approach to isotropic and anisotropic total variation denoising models. *J Comput Appl Math* 2011;235(2):2502-2514
- [104] Birkholz H. Extracting the ridge set as a graph for quantification of actin filaments obtained by focal laser scanning microscopy. *Proceedings of the SPIE* 8000, 2011;800006-800006-8
- [105] Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254
- [106] Meyer TS; Lambert BL. Use of Coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys Acta* 1965;107(1): 144-145
- [107] Lindl T. (2002) *Zell-und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Auflage 5, ISBN-13: 978-3827411945

- [108] Kang W-J, Rabe E, Kopetz S, Neyer A. Novel exposure methods based on reflection and refraction effects in the field of SU-8 lithography. *J Micromech Microeng* 2006;16:821-831
- [109] Robinson L, Isaksson J, Robinson ND, Berggren M. Electrochemical control of surface wettability of poly(3-alkylthiophenes). *Surf Sci Lett* 2006;600:148-152
- [110] Finke B, Lüthen F, Schroeder K, Bergemann C, Frant M, Ohl A, Nebe JB. The effect of positively charged plasma polymerization on initial osteoblastic focal adhesion on titanium surfaces. *Biomaterials* 2007;28/30:4521-34
- [111] Anselme K, Bigerelle M. Modelling approach in cell/material interactions studies. *Biomaterials* 2006;27:1187-1199
- [112] Giljean S, Ponche A, Bigerelle M, Anselme K. Statistical approach of chemistry and topography effect on human osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A* 2010;94(4):1111-1123
- [113] Sjöström T, Lalev G, Mansell JP, Su B. Initial attachment and spreading of MG63 cells on nanopatterned titanium surfaces via through-mask anodization. *Appl Surf Sci* 2011;257(10):4552-4558
- [114] Kirbs A, Lange R, Nebe B, Rychly J, Baumann A, Neumann H-G et al. Methods for the physical and chemical characterization of surfaces of titanium implants. *Mater Sci Eng C* 2003;23:425-429
- [115] Lange R, Lüthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe JGB. Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomol Eng.*2002;19(2-6):255-261
- [116] Lim JY, Shaughnessy MC, Zhou Z, Noh H, Vogler EA, Donahue HJ. Surface energy effects on osteoblast spatial growth and mineralization. *Biomaterials* 2008;12:1776-1784
- [117] Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Moses RL, Jacobs JJ. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue Eng* 2001;7(1):55-71
- [118] Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials* 2004;25:1429-1438
- [119] Lim JY, Oshida Y, Andres CJ, Barco MT. Surface characterizations of variously treated titanium materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16(3):333-42

- [120] Harnett EM, Alderman J, Wood T. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids Surf B* 2007;55:90-97
- [121] Lee JH, Khang G, Lee JW, Lee HB. Interaction of different types of cells of polymer surfaces with wettability gradient. *J Colloid Interface Sci* 1998;205:323-330
- [122] Saruwatari L. Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure. *J Bone Miner Res* 2005;20:2002-2016
- [123] Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J., Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res Part A* 2005; 74(1):49-58
- [124] Bren L, English L, Fogarty J, Policoro R, Zsidi A, Vance J et al. Hydrophilic/electron-acceptor surface properties of metallic biomaterials and their effect on osteoblast cell activity. *J Adhesion Sci Technol* 2004;18(15-16):1711-1722
- [125] Olivares-Navarrete R, Raz P, Zhao G, Chen J, Wieland M, Cochran DL et al. Integrin $\alpha 2\beta 1$ plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *PNAS* 2008;105(41):15767-15772
- [126] Hayes JS, Khan IM, Archer CW, Richards RG. The role of surface microtopography in the modulation of osteoblast differentiation. *Eur Cell Mater* 2010;20:98-108
- [127] Matschegewski C, Staehlke S, Birkholz H, Lange R, Beck U, Engel K and Nebe JB: Automatic Actin Filament Quantification of Osteoblasts and their Morphometric Analysis on Microtextured Silicon-Titanium Arrays. *Materials* 2012, 5(7), 1176-1195
- [128] Hunter A, Archer CW, Walker PS, Blunn GW. Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. *Biomaterial* 1995;16(4):287-295
- [129] Davidson PM, Özçelik H, Hasirci V, Reiter G, Anselme K. Micro-structured surfaces cause deformation of the nucleus but without killing cells. *BIOmaterialien* 2009;10(S1):16
- [130] Nebe B, Lüthen F, Lange R, Beck U. Cellular activity and biomaterial's surface topography. *Mater Sci Forum* 2007;539-543:517-522
- [131] Yang J-Y, Ting Y-C, Lai J-Y, Liu H-L, Fang H-W, Tsai W-B. Quantitative analysis of osteoblast-like cells (MG63) morphology on nanogrooved substrata with various groove and ridge dimensions. *J Biomed Mater Res A* 2009;90(3):629-640

- [132] Curtis AS, Dalby MJ, Gadegaard N. Nanoprinting onto cells. *J R Soc Interface* 2006;3:393-398
- [133] Kabaso D, Gongadze E, Perutková Š, Matschegewski C, Kralj-Iglič V, Beck U, van Rienen U, Iglič A: Mechanics and electrostatics of the interactions between osteoblasts and titanium surface. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 2011;14(5):469-482
- [134] Walboomers XF, Monaghan W, Curtis AS, Jansen JA. Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene. *J Biomed Mater Res* 1999;46(2):212-220
- [135] Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater.* 2009;8(1):15-23
- [136] Heinemann DEH, Lohmann C, Siggelkow H, Alves F, Engel I, G. Köster. Human osteoblast-like cells phagocytose metal particles and express the macrophage marker CD68 in vitro. *JBJS* 2000;82B(2):283-289
- [137] Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO., Roebuck KA, Glant TT. The Effects of Particulate Wear Debris, Cytokines, and Growth Factors on the Functions of MG-63 Osteoblasts. *JBJS* 2001;83A(2):201-211
- [138] May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2001;114:1061-1077
- [139] Wojciak-Stothard B, Curtis A, Monaghan W, Macdonald K, Wilkinson C. Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography. *Exp Cell Res* 1996;223:426-435
- [140] Kharitonova MA, Vasiliev JM. Length control is determined by the pattern of cytoskeleton. *J Cell Sci* 2003;117(10):1955-1960
- [141] Anselme K, Bigerelle M, Noël B, Iost A, Hardouin P. Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *J Biomed Mater Res* 2002;60(4):529-540
- [142] Krzysiek-Maczka G, Michalik M, Madeja Z, Korohoda, W. Involvement of cytoskeleton in orientation of cell division in contact guided cells. *Folia Biol (Krakow)* 2010;58(1-2):21-27
- [143] Abramson SD, Alexe G, Hammer PL, Kohn J. A computational approach to predicting cell growth on polymeric biomaterials. *J Biomed Mater Res B* 2005;73A(1):116-124

ANHANG

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs *welisa* 1505/1 der Universität Rostock im Arbeitsbereich Zellbiologie der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Prof. Dr. Joachim Rychly.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Barbara Nebe für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas und die umfassende und zielgerichtete Betreuung. Vor allem das stete Engagement, die wertvollen Diskussionen und Ratschläge sowie das sehr gute persönliche Arbeitsklima trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Burkel für die Übernahme des Zweitgutachtens, das Interesse und die engagierte Betreuung meiner Dissertation bedanken.

Ich bedanke mich besonders bei Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH für die freundliche Übernahme des Drittgutachtens.

Ich danke Frau Prof. Ursula van Rienen für die Aufnahme im DFG Graduiertenkolleg *welisa*. Vor allem die einzigartige Interdisziplinarität der Projekte und die daraus resultierende fächerübergreifende Zusammenarbeit bot ein fachlich exzellentes Umfeld für das Anfertigen der Dissertation.

Mein weiterer Dank gilt:

- Frau Dipl. Biol. Susanne Stähle für die laborpraktische Zuarbeit,
- Frau Dipl- Biol. Annika Kasten, Frau Dr. Nadja Engel-Lutz und Frau Dr. Kathrin Duske für die hilfreichen fachlichen Diskussionen, die angenehme Atmosphäre und die daraus entstandene Freundschaft,

- meinen Laborkollegen Frau Dipl.-Ing. (FH) Annelie Peters, Frau Dipl.-Ing. (FH) Petra Seidel, Herrn Dr. Frank Lüthen, Frau Dr. Petra Müller, Frau Dr. Claudia Bergemann, und Frau Dr. Ulrike Bulnheim für das kollegiale und warme Laborklima und ihre stete Hilfsbereitschaft,
- Gerhard Fulda, Wolfgang Labs sowie Herrn Prof. Jonas vom EMZ Rostock für technische Unterstützung bei den REM-Aufnahmen,
- Herrn Prof. Dr. Dieter Kern und Herrn Dipl.- Phys. Ronny Löffler von der Universität Tübingen für die Herstellung der mikrostrukturierten Titanproben.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen kooperierenden Stipendiaten und Antragstellern des GRK *welisa* für die produktive interdisziplinäre Zusammenarbeit. Hier gilt mein besonderer Dank vor allem:

- Herrn PD Dr. Ulrich Beck und Frau Dipl. Ing. Regina Lange aus dem Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik der Universität Rostock für die Kooperation und Durchführung der elektrochemischen Versuche und REM-Aufnahmen,
- Herrn Prof. Dr. Konrad Engel und Herrn Dr. Harald Birkholz aus dem Institut für Mathematik der Universität Rostock für die angenehme und produktive Zusammenarbeit und die Neuentwicklung der Bildverarbeitungssoftware FilaQuant, welche neue Möglichkeiten für zellbiologische Auswertungen eröffnete.

Ein besonderer Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums und das Anfertigen meiner Dissertation im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs *welisa* 1505/1.

Abschließend bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und Freunden, die mich stets in jeglicher Form unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Das bearbeitete Thema wurde von mir weder schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt noch bisher einer anderen Fakultät als Arbeit vorgelegt.



Rostock, 27.09.2012

Claudia Matschegewski

Publikationen und Präsentationen

Publikationen (Journal mit IF)

- (1) **Matschegewski C**, Staehlke S, Birkholz H, Lange R, Beck U, Engel K and Nebe JB: Automatic Actin Filament Quantification of Osteoblasts and their Morphometric Analysis on Microtextured Silicon-Titanium Arrays. *Materials* 2012;5(7),1176-1195
IF: 1.677 (2011)
- (2) Kabaso D, Gongadze E, Perutková Š, **Matschegewski C**, Kralj-Iglič V, Beck U, van Rienen U, Iglič A: Mechanics and electrostatics of the interactions between osteoblasts and titanium surface. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 2011;14(5):469-482
IF: 1.169 (2011)
- (3) **Matschegewski C**, Staehlke S, Löffler R, Lange R, Chai F, Kern D, Beck U, Nebe JB: Cell architecture–cell function dependencies on titanium arrays with regular geometry. *Biomaterials* 2010;31(22):5729-40
IF: 7.404 (2012)
- (4) Lange R, Elter P, Biala K, **Matschegewski C**, Stählke S, Löffler R, Fleischer M, Nebe JB, Kern D, Beck U: Titanium surfaces structured with regular geometry – material investigations and cell morphology. *Surface and Interface Analysis* 2010;42(6):497-501
IF: 1.180 (2012)

Publikationen (ohne IF)

- (1) **Matschegewski C**, Staehlke S, Birkholz H, Loeffler R, Kern D, Engel K, Nebe JGB: Quantitative analysis of the cellular actin cytoskeleton on geometrically designed surface topography. *Materials Science Forum* 2012;Vols. 706-709:543-548
- (2) Birkholz H, **Matschegewski C**, Nebe JB, Engel K: Quantification of actin filament organization by estimating graph structures in confocal microscopic images. ISBN 978-3-642-03881-5, IFMBE Proceedings 2009;25/4:1932-1935

Abstrakts + Poster

- (1) Kunz F, Quade A, **Matschegewski C**, Stählke S, Birkholz H, Rebl H, Steffen J, Nebe JB: Actin cytoskeleton mediated cell response of osteoblasts to plasma amino functionalised titanium surfaces. Interface Biology of Implants (IBI) 2012
- (2) Löffler R, Fleischer M, **Matschegewski C**, Stählke S, Nebe JB, Kern DP: Pyramid Array Substrates for Biomedical Studies. EIPBN 2012, Hawaii
- (3) Kunz F, Quade A, Schröder K, **Matschegewski C**, Nebe B: Impact of plasma polymer deposition on titanium on osteoblasts with disturbed cell functions due to impaired actin cytoskeleton. BIOMaterialien 2011;12(1-4):199
- (4) **Matschegewski C**, Birkholz H, Staehlke S, Lange R, Beck U, Engel K, Nebe JB: Determination of cellular phenotype and actin quantification of osteoblasts on geometrically defined microtextured titanium arrays. BIOMaterialien 2011;12(1-4):113
- (5) **Matschegewski C**, Birkholz H, Staehlke S, Loeffler R, Kern D, Engel K, Nebe JB: Quantification of intracellular structures as a tool for the correlation of material vs. cellular parameters. BMT 2011, Freiburg
- (6) Stählke S, **Matschegewski C**, Löffler R, Lange R, Beck U, Kern D, J. Nebe JB: Analyse der Interaktion von Osteoblasten auf mikrostrukturierten Oberflächen in Bezug auf die Organisation des Aktinzytoskeletts. BIOMaterialien 2011;12(1-4):115
- (7) **Matschegewski C**, Birkholz H, Staehlke S, Lange R, Beck U, Engel K and Nebe JB: Cell morphometric analysis of osteoblasts on geometrically microstructured titanium surfaces – basic research for orthopedic implants. World Congress on regenerative medicine WCRM 2011, Leipzig
- (8) **Matschegewski C**, Staehlke S, Loeffler R, Lange R, Birkholz H, Kern DP, Beck U, Engel K and Nebe JB: Quantitative analysis of the cell phenotype on geometrically designed surfacen topography. THERMEC 2011, Quebec, Kanada

- (9) **Matschegewski C**, Staehlke S, Loeffler R, Lange R, Chai F, Kern DP, Beck U, Nebe JB: Cell Architecture—Cell Function Dependencies on Micro-Arrays with Cubic Pillar Structures. Deutsche Gesellschaft für Materialkunde, DGM, Material Science and Engineering, Topic F: Biomat- F3: Interfaces, Darmstadt (2010)
- (10) Stählke S, **Matschegewski C**, Löffler R, Lange R, Beck U, Kern D, Nebe JB: Time dependent analysis of intracellular signaling molecules in osteoblasts on microstructured titanium surfaces. *BIOMaterialien* 2010;11:179
- (11) Nebe JB, Rebl H, Finke B, **Matschegewski C**, Stählke S, Beck U, Kern DP, Weltmann K-D, Schröder K: Plasmachemisch modifizierte Metalloberflächen und ihr Einfluss auf die Zellphysiologie. Workshop on Metallic Biomaterials, Geesthacht, abstract Booklet, p. 7 (2010)
- (12) Rebl H, Finke B, **Matschegewski C**, Staehlke S, Lange R, Kern DP, Beck U, Schroeder K, Nebe JB: Cell architecture on plasmafunctionalized, structured metal surfaces. 23th ESB 2010, Tampere, Finland, CD abstract no. h 3492
- (13) van Rienen U, Appali R, Bader R, Baumann W, Beck U, Behrend D, Benecke R, Biala K, Birkholz H, Burkel E, Engel K, Ewald H, Gimsa J, Gimsa U, Gongadze E, Grünbaum A, Haba Y, Liese F, Liu B, Lüder M, **Matschegewski C**, Mittelmeier W, Mix E, Nebe JB, Nowak KA, Pahnke J, Pau HW, Pauleweit S, Petersen S, Polnick S, Reimer T, Rott G, Salomon R, Vinter E, Weihe T, Wolkenhauer O: Analyse und Simulation von Wechselwirkungen von Implantaten und Biosystemen. (BMT, Rostock-Warnemünde) *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*. 2010;55(S1); ISSN (Online) 1862-278X, ISSN (Print) 0013-5585, DOI: 10.1515/BMT.2010.712/October/2010
- (14) **Matschegewski C**, Weidmann A, Lange R, Löffler R, Beck U, Kern D, Nebe JB: Time dependent activation of intracellular signaling proteins in osteoblasts on microstructured titanium surfaces. ISSN 0171-9335, *Eur J Cell Biol* 2009;88(S1, Suppl. 59):32

- (15) **Matschegewski C**, Weidmann A, Löffler R, Lange R, Beck U, Kern D, Nebe JB: Time dependent osteoblast response on defined titanium wafers. ISSN 1616-0177, BIOMaterialien 2009;10(S1):93
- (16) Lange R, Elter P, **Matschegewski C**, Weidmann A, Löffler R, Fleischer M, Nebe JB, Kern D, Beck U: Material and cell biological investigations on structured biomaterial surfaces with regular geometry. ISSN 1616-0177, BIOMaterialien 2009;10(S1):84
- (17) **Matschegewski C**, Stähle S, Löffler R, Kern D, Beck U, Lange R, Nebe JB: Definiert mikrostrukturierte Titanoberflächen und deren Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts von humanen Osteoblasten. ISSN 1616-0177, BIOMaterialien 2009;10(3/4):129
- (18) Nebe JB, Jesswein H, Weidmann A, Finke B, **Matschegewski C**, Lange R, Beck U, Schroeder K: Sensitivity of Osteoblasts to Topographical and Chemical Features of Metal Implants. ICMAT, Singapore 2009
- (19) Lange R, Elter P, Biala K, **Matschegewski C**, Stähle S, Löffler R, Fleischer M, Nebe JB, Kern D, Beck U: Titanium Surfaces Structured with Regular Geometry - Material and Cell Biological Investigations. ECASIA, Antalya 2009
- (20) Lange R, Elter P, **Matschegewski C**, Weidmann A, Löffler R, Fleischer M, Nebe JB, Kern D, Beck U: Material properties of Titanium surfaces with regular geometry and their influence on osteoblast behaviour. ESB, Lausanne 2009

Vorträge

Vorträge auf internationalen Fachkongressen

- (1) Cell morphometric analysis of osteoblasts on geometrically microstructured titanium surfaces – basic research for orthopedic implants. World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany (2011) (ausgewählter Vortrag)
- (2) Quantitative analysis of the cell phenotype on geometrically designed surface topography. 7th International Conference on Advanced Materials (THERMEC'2011), Quebec, Canada 2011 (ausgewählter Vortrag)

sonstige

- (1) Mimikry bei Zellen – der Einfluss von Materialstrukturen.
Interdisziplinäre Ringvorlesung GRK *welisa* an der Universität Rostock 01.12.2011,
- (2) Quantitative analysis of cell morphological parameters from microscopic images.
Workshop GRK *welisa* 05./06.05.2011, Gollwitz Insel Poel
- (3) Cell function of osteoblasts on titanium surfaces with regular geometry.
Forschungsseminar der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock; 03.12.2009,
Biomedizinisches Forschungszentrum, Rostock
- (4) Analysis of initial adhesion mechanisms of osteoblasts in dependence of chemical, physical and electrical characteristics of implant surfaces.
Workshop GRK *welisa*, 05.+06.11.2009, Graal-Müritz
- (5) Analysis of initial adhesion mechanisms of osteoblasts in dependence of chemical, physical and electrical characteristics of implant surfaces. Université de Lille, Faculté de Médecine, Laboratoire de la Biophysique, Groupe de la Recherche sur Biomatériaux, 20.04.2009, Lille, FRANKREICH

- (6) Analyse initialer Adhäsionsmechanismen von Osteoblasten in Abhängigkeit von definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen.

Workshop GRK *welisa*, 20.03.2009, Rostock-Warnemünde

- (7) Projekt A4-Untersuchungen initialer Mechanismen der Zelladhäsion und Signaltransduktion in Abhängigkeit von strukturierten Implantatoberflächen.

Kolloquium GRK *welisa*, 15.12.2008, BMFZ, Rostock

Teilnahme an nationalen und internationalen Fachkongressen

- 09.-11.05.2012 4th International Symposium “Interface Biology of Implants (IBI)”,
Rostock-Warnemünde (Abstrakt + Poster)
- 21.-24.03.2012 35th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ)
Dresden (Teilnahme)
- 10.-12.11.2011 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Biomaterialien
(DGBM), Gießen (Abstrakt + Poster)
- 02.-04.11.2011 World Conference on Regenerative Medicine (WRM), Leipzig
(Abstrakt + ausgewählter Vortrag)
- 28.10.-02.11.2011 World Congress on Engineering and Technology (CET), Shanghai,
CHINA (Teilnahme)
- 27.-30.09.2011 45. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Biomedizinische
Technik (DGBMT), Freiburg (Abstrakt + Poster)
- 01.-05.08.2011 7th International Conference on Advanced Materials
(THERMEC’2011), Quebec, KANADA (Abstrakt + Paper +
ausgewählter Vortrag)

- 07.-11.09.2009 11th International Congress of the IUPESM, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, München (Paper + Poster)
- 13.-15.05.2009 3rd International Symposium "Interface Biology of Implants (IBI)", Rostock-Warnemünde (Abstrakt + Poster)
- 24.-27.03.2009 32th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ), 1. Joint Congress of the Swiss and German Societies of Cell Biology, Konstanz (Abstrakt + Poster)
- 05.-07.03.2009 CeBit Hannover (Standbetreuung GRK *welisa*, Universität Rostock)
- 20.-22.11.2008 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), Hamburg (Teilnahme)

Forschungsaufenthalte

- 04/09-05/2009 Wissenschaftlicher Gastaufenthalt
Université de Lille
Faculté de Médecine, Laboratoire de la Biophysique
Groupe de la recherche sur les biomatériaux
Prof. Dr. H. F. Hildebrand / Dr. F. Chai
Lille, FRANKREICH

Sonstige Tätigkeiten

- seit 10/2011 Sprecherin der Stipendiaten DFG-Graduiertenkolleg *welisa* 1505/1 bei der Graduiertenakademie der Universität Rostock
- 11/2008 – 09/2012 Sprecherin der Stipendiaten/Kollegiaten DFG-Graduiertenkolleg *welisa* 1505/