

UNTERSUCHUNGEN ZUR IMMOBILISIERUNG UND FREISETZUNG
VON REKOMBINANTEM HUMANEM BONE MORPHOGENETIC
PROTEIN 2 (BMP-2) IN BIOLOGISCH AKTIVER FORM AUF
METALLISCHEN IMPLANTATTOBERFLÄCHEN

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) im Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen

MARIA CHATZINIKOLAIDOU
AUS ERBACH

Essen 2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. P. Jennissen angefertigt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. P. Jennissen
 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. G. Peschel
- Vorsitzende: Frau PD Dr. K. Stachelscheid

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2004

Vernünftige Einsicht zu haben ist die größte Tugend, und Weisheit ist es, Wahres zu reden und gemäß der Natur zu handeln, indem man auf sie hört.

Heraklit von Ephesos, griechischer Philosoph

(ca. 540- 480 v. Chr.)

Meinen Eltern

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen und unterstützten:

Herrn Prof. Dr. H. P. Jennissen gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, seine Anregungen und die ständige Bereitschaft mir bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Hierdurch hat er maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. G. Peschel möchte ich recht herzlich für seine stete Gesprächsbereitschaft, seinen Rat, seine bewundernswerte verständnisvolle Art und die fruchtbaren Diskussionen danken. Ohne seine initiale Empfehlung wäre diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen.

Für die Rasterelektronenmikroskopischen und die Rockwell Untersuchungen bedanke ich mich bei Herrn Dipl.-Ing. R. Büscher aus dem Institut für Werkstofftechnik der Universität Duisburg-Essen. Herrn Dipl.-Ing. W. Piepenbring und den Mitarbeitern der Feinmechanik danke ich für die Entwicklung technischer Geräte.

Bei Herrn Dr. M. Laub bedanke ich mich für die stete Ansprechbarkeit, die anregenden Diskussionen und die sofortige Unterstützung bei sämtlichen Computerproblemen.

Herrn Dr. T. Zumbrink danke ich für die Einarbeitung in das biochemische Arbeiten und in die Beschichtungsmethoden. Frau Dr. H. M. Rumpf danke ich für das Anleiten zu den molekularbiologischen Methoden und die stete Bereitschaft für anregende Gespräche rund um das BMP-2.

Herrn M. Steinkamp und Frau H. Caron möchte ich für die hilfreiche Unterstützung bei der BMP-Präparation und ihre Analytik meinen Dank aussprechen. Auch bei Frau M. Suslo möchte ich mich für die Durchführung der Zellkultur bedanken.

Frau H. Buballa gilt ein herzliches Dankeschön für die zahlreichen organisatorischen Abwicklungen und ihre stete Bereitschaft für unterstützende und fruchtbare Gespräche.

Meinen Eltern, meinen griechischen und nicht-griechischen Freunden, die mir mit jeglicher Art von Unterstützung, Verständnis und Hilfe zur Seite standen und für angenehme Abwechslung vom Laborleben sorgten, gilt ein herzliches Dankeschön.

Abschließend möchte ich mich besonders herzlich bei allen Mitarbeitern des Labors für das hervorragende, freundschaftliche Arbeitsklima und die interessanten Diskussionen und bei allen hier nicht namentlich erwähnten Personen, die mich während meines Studiums und meiner Promotion freundschaftlich unterstützt haben, bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	IX
Glossar.....	XIV
1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	4
2.1 Proteine: Ubiquitin und Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2).....	4
2.1.1 Vorkommen, Funktion und Struktur von Ubiquitin.....	4
2.1.2 Vorkommen und Funktion von Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2).....	8
2.1.3 Struktur und Sequenz von BMP-2.....	10
2.1.4 Signaltransduktion von BMP-2.....	13
2.2 Proteinadsorption.....	15
2.2.1 Grundlagen der Proteinadsorption.....	15
2.2.2 Adsorptions- und Desorptionsisothermen.....	16
2.2.2.1 Isothermen nach Langmuir.....	16
2.2.2.2 Isothermen nach Freundlich.....	17
2.2.2.3 Isothermen nach Temkin.....	18
2.2.2.4 Die Gitterstellenbindungs- und Ligandenbindungsfunktion.....	18
2.2.2.5 Adsorptionshysterese.....	20
2.2.3 Adsorptions- und Desorptionskinetiken.....	21
2.2.4 Hydrophobe Adsorption und Ionenaustausch.....	23
2.3 Modifikationsreaktionen an Oberflächen.....	26
2.3.1 Additive und subtraktive Säureätzverfahren.....	26
2.3.2 Aktivierungs- und Kopplungsreaktionen.....	31
2.4 Metallische Biomaterialien.....	33
2.5 Kontaktwinkelmessung und Benetzbarkeit.....	37
2.6 Fluoreszenz und Epifluoreszenz.....	43
3 Material und Methoden.....	48
3.1 Präparative Methoden.....	48
3.1.1 Oberflächenätzen mit Chromschwefelsäure [Jennissen et al., 1999].....	49

3.1.2	Chemische Modifikation der Metalloberflächen mit Silanen	49
3.1.3	Aktivierung mit 1,1'-Carbonyldiimidazol [Bethell et al., 1979; Jennissen et al., 1999]	50
3.1.4	Präparation und chromatographische Aufreinigung von BMP-2.....	51
3.2	Analytische Methoden	52
3.2.1	Messung des dynamischen Kontaktwinkels von Wasser an Metalloberflächen [Andrade et al., 1985; Jennissen et al., 1999]	52
3.2.2	Proteinbestimmung nach Lowry [Lowry et al., 1951]	52
3.2.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
3.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [Laemmli, 1970]....	53
3.2.3.2	Färben und Entfärben der Gele	55
3.2.3.3	Dokumentation der SDS-Polyacrylamid-Gele	55
3.2.4	Photometrische Messung der biologischen Aktivität des löslichen BMP-2....	56
3.2.5	Fluoreszenzmessung der biologischen Aktivität des immobilisierten BMP-2	57
3.2.5.1	Zusätzliche Fluoreszenzfärbemethoden der Zellen	59
3.3	Proteinadsorptionsmessungen	61
3.3.1	Radioaktive Markierung von Ubiquitin und BMP-2 mit ¹²⁵ I].....	61
3.3.2	Immobilisierung von Proteinen.....	63
3.3.2.1	Adsorption und kovalente Kopplung von Ubiquitin auf Metallplättchen	64
3.3.2.2	Adsorption und kovalente Kopplung von rhBMP-2 auf Metallplättchen	65
3.3.3	Kovalente Kopplung von Ethanolamin und Adsorption vom Protein.....	65
3.4	Desorptionsexperimente	67
3.4.1	Freisetzung von Ubiquitin und rhBMP-2	67
3.5	Tierexperimente	68
3.5.1	rhBMP-2 Immobilisierung der Implantate für das Experiment in Kaninchen..	68
3.5.2	<i>In vivo</i> Experiment in Kaninchen.....	68
3.5.3	rhBMP-2 Immobilisierung der Implantate für das Pilotexperiment im Schaf..	70
3.5.4	<i>In vivo</i> Experiment im Schafkondylus	71
4	Ergebnisse	73
4.1	Chemische Modifikation von Metalloberflächen	73
4.1.1	Charakterisierung der Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie.....	75

4.1.2	Charakterisierung der Oberflächen mittels konfokaler Laser-Rasterelektronenmikroskopie (CLSM).....	78
4.1.3	Messung und Stabilität des dynamischen Kontaktwinkels.....	79
4.2	Biochemie immobilisierter Proteine auf Metalloberflächen.....	84
4.2.1	Immobilisierung von Ubiquitin.....	84
4.2.2	Freisetzung des Ubiquitin von Titanoberflächen.....	91
4.2.2.1	Waschen mit 0.05 N NaOH / 0.5 % SDS.....	91
4.2.2.2	Freisetzung durch homologe Alkylamine.....	93
4.2.2.3	„Schonende“ Freisetzung durch niedrige SDS-Konzentration bei pH 10.0 und 7.4.....	97
4.2.3	Immobilisierung von rhBMP-2.....	109
4.2.3.1	rhBMP-2 auf elektropolierter Titanoberfläche.....	110
4.2.3.2	rhBMP-2 auf sandgestrahlter Titanoberfläche.....	115
4.2.3.3	rhBMP-2 auf Titanplasmaspray-beschichteter Titanoberfläche.....	116
4.2.3.4	rhBMP-2 auf Cobaltchrommolybdän-Legierung.....	117
4.2.4	Freisetzung von rhBMP-2.....	120
4.2.4.1	rhBMP-2-Freisetzung von einer elektropolierten Titanoberfläche.....	120
4.2.4.2	rhBMP-2-Freisetzung von sandgestrahlter Titanoberfläche.....	125
4.2.4.3	rhBMP-2-Freisetzung von Titanplasmaspray-beschichteter Titanoberfläche.....	126
4.2.4.4	rhBMP-2-Freisetzung von Cobaltchrommolybdän-Legierung.....	128
4.2.4.5	Einwirkung von Proteinen auf die Freisetzungsraten von rhBMP-2 von Metalloberflächen.....	130
4.3	Untersuchungen von rhBMP-2 <i>in vitro</i>	132
4.3.1	Toxizitätstestung von rhBMP-2.....	132
4.3.2	Nachweis der biologischen Aktivität von löslichem rhBMP-2.....	135
4.3.3	Nachweis der biologischen Aktivität des immobilisierten rhBMP-2 an Metalloberflächen.....	139
4.4	Untersuchungen von rhBMP-2 <i>in vivo</i>	143
4.4.1	Untersuchung der Oberflächenmodifikation auf inflammatorische Reaktionen in Kaninchen.....	143

4.4.2	Untersuchung der biologischen Aktivität von immobilisiertem rhBMP-2 auf Titanoberflächen im Kaninchen	144
4.4.3	Untersuchung der biologischen Aktivität von immobilisiertem rhBMP-2 im Schaf.....	148
5	Diskussion	152
5.1	Stabilität der Metalloberflächen	152
5.1.1	Dynamische Kontaktwinkel.....	152
5.1.2	Adhäsionsprüfung der Metalloxidschicht	156
5.1.3	Vergrößerung der Metalloberflächen	157
5.2	Immobilisierung und Freisetzung von Ubiquitin und rhBMP-2.....	159
5.2.1	Immobilisierung von Ubiquitin	159
5.2.2	Freisetzung von Ubiquitin	163
5.2.3	Immobilisierung von rhBMP-2.....	167
5.2.4	Freisetzung von rhBMP-2	172
5.3	Biologische Aktivität von rhBMP-2 <i>in vitro</i>	179
5.3.1	Toxizitätstestung von rhBMP-2.....	179
5.3.2	Biologische Aktivität vom löslichen rhBMP-2.....	181
5.3.3	Biologische Aktivität vom immobilisierten rhBMP-2 an Metalloberflächen...	183
5.4	Biokompatibilität und Osteointegration vom immobilisierten rhBMP-2 <i>in vivo</i>	185
6	Zusammenfassung.....	189
7	Literatur	193

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1:** Struktur von Ubiquitin aus der Proteindatenbank (RasMol, Version 2.6), wobei die einzelnen Aminosäuren mit ihren Seitenketten dargestellt werden. 7
- Abbildung 2.2:** Dendrogramm der TGF- β -homologen Cytokine (Homo sapiens) [Laub & Jennissen, 2003]. Die Längen der horizontalen Linien entsprechen der Anzahl der evolutionären Unterschiede zwischen Proteinen oder Proteingruppen abgeleitet von der Sequenzhomologie. Die BMP-Gruppe (rot) entspricht ca. einem Drittel der TGF- β -Superfamilie und bildet somit die größte Untergruppe. GDF1-3 und 5 sind nahe der BMP-Proteine angesiedelt. Das spiegelt den Befund wieder, dass die physiologischen Funktionen der BMP-Proteine sich nicht nur auf die Knochenentwicklung reduzieren, sondern auch Zellproliferation und –differenzierung einschließen..... 9
- Abbildung 2.3:** Struktur von rhBMP-2 aus der Proteindatenbank (RasMol, Version 2.6), wobei die einzelnen Aminosäuren mit ihren Seitenketten veranschaulicht werden. 11
- Abbildung 2.4:** Dreidimensionale Faltungstopologie des nativen rhBMP-2 Dimers [Scheufler et al., 1999]: α -Helix-Strukturen werden als Spirale, β -Faltblatt-Strukturen als Pfeile und Disulfidbrücken als grüne Stäbe dargestellt. Die beiden identischen Polypeptid-Untereinheiten (in den Farben orange und blau gezeigt) werden über eine Disulfidbrücke (grün) zum biologisch aktiven Dimer kovalent gebunden. 12
- Abbildung 2.5:** Aminosäuren werden der hydrophoben Gruppe zugeordnet, wenn die Hydrophobizität größer oder gleich 0.7 ist, und der hydrophilen Gruppe, falls die Hydrophobizität kleiner als -2.4 ist. Bei der in WebLab Viewer verwendeten Hydrophobizität-Skala handelt es sich um die Kyte-Doolittle scale [Kyte & Doolittle, 1982]. 12
- Abbildung 2.6:** Schematische englischsprachige Darstellung der Signaltransduktion durch BMP-Rezeptoren einer Zelle [ten Dijke et al., 2003]. Nach Oligomerisierung der BMP-induzierten Typ-I/Typ-II-Rezeptoren, phosphoryliert die aktive Typ-II-Rezeptorkinase den Typ-I-Rezeptor in seiner Glycin/Serin-Domäne. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor phosphoryliert die R-Smads (Smad1, Smad5 oder Smad8), die einen heteromeren Komplex mit Co-Smad (Smad4) bilden. Die heteromeren Smad-Komplexe werden in den Zellkern überführt, wobei sie direkt oder durch Transkriptionspartner an spezifischen DNA-Sequenzen in den Promoterregionen der Zielgene binden und ihre Transkription regulieren können..... 14
- Abbildung 2.7:** Schematische Darstellung hydrophober Wechselwirkungen zwischen Protein und modifizierter Metalloberfläche mit hydrophoben Liganden. Dabei handelt es sich um starke, nicht-

kovalente Kräfte mit einer Bindungsenergie von bis zu 10 kJ/mol, die die unpolaren Bereiche der Proteinmoleküle (schwarze Areale) zusammenhalten.....	24
Abbildung 2.8: Schematische Darstellung einer Elektropolierzelle in Serienschaltung [Petzow, G., 1976c]. Die Anordnung der Anode (Probe) zu Kathode kann je nach Metall angepasst werden. Die Elektrolyte enthalten oft Phosphor-, Schwefel- und Perchlorsäure, gemischt mit ionisierenden Flüssigkeiten und viskositätserhöhenden Zusätzen.....	26
Abbildung 2.9: Idealisierte Stromdichte-Spannungskurve [Petzow, G., 1976b]. Die einzelnen Vorgänge wie Passivierung und Polieren werden im Text beschrieben.....	28
Abbildung 2.10: Graphische Darstellung der Gewebereaktion als Funktion der Korrosions- und Polarisationsbeständigkeit [Steinemann, 1998]. Daten aus Korrosionsexperimenten für unterschiedliche Metalle und Metalllegierungen <i>in vivo</i>	36
Abbildung 2.11: Oberflächenspannungskomponenten eines Flüssigkeitstropfens auf einer Festkörperoberfläche im Gleichgewicht (γ_s : Oberflächenspannung des Festkörpers, γ_l : Oberflächenspannung der Flüssigkeit, γ_{sl} : Grenzflächenspannung an der Phasengrenze fest/flüssig, θ : Kontaktwinkel) [Zisman, W. A., 1964].	37
Abbildung 2.12: Beispiel einer idealen Quarzglasoberfläche. Nach dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reinigungsverfahren zeigt die Kontaktwinkelmessung keine oder nur noch eine geringe Hysterese. Der Kontaktwinkel beträgt im hier dargestellten Fall $\theta=0^\circ$ für Rückzugs- und Vorrückwinkel.	38
Abbildung 2.13: Die Wilhelmy-Plate-Methode zur Messung von Oberflächenspannungen und Kontaktwinkeln. (1) Das Plättchen befindet sich nur mit der Luft in Kontakt. Dies ist der Leerwert der Messung. (2) Das Plättchen taucht in die Flüssigkeit ein. (3) Die Gesamtkraft F ist die Gewichtskraft zuzüglich der Kraft, die aus der Oberflächenspannung (γ_L) resultiert. Zusätzlich wird die Auftriebskraft (F_b) wirksam [Andrade et al. (1985)].	40
Abbildung 2.14: Wilhelmy-Plate-Methode, Kraftdifferenz ΔF als Funktion der Immersionstiefe.....	41
Abbildung 2.15: Anregung und Emission von Fluoreszenz [Cantor, C. R., 1980]. (a) Energieniveaus: Die Energieniveaus sind in unterschiedliche Schwingungszustände aufgespalten und (b) Spektrum: Das Emissionsspektrum ist gegenüber dem Anregungsspektrum zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Der strahlungslose Übergang von S_c nach S_b relaxiert schneller als jeglicher Deaktivierungsprozess, der S_b zum Grundzustand S_a umwandelt.	44

- Abbildung 2.16:** Entstehung der Fluoreszenz und Wege der Anregung und Desaktivierung von angeregten Zuständen. S_a : Singulettgrundzustand, S_b : angeregter Singulettzustand und T_b : angeregter Triplettzustand [Cantor, C. R., 1980]. 45
- Abbildung 2.17:** Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes [Robenek, H., 1995a]. (Beschreibung s. Text). 46
- Abbildung 2.18:** Schematische Darstellung eines Fluoreszenzmikroskopes mit Auflichtanregung [Robenek, H., 1995b]. (Beschreibung s. Text). 47
- Abbildung 3.1:** Reaktion der Hydroxylgruppen der Metallbulkphase (Me-OH-Matrix) mit dem Silanisierungsagens 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) (analog zu [Hansen et al., 1988]). 49
- Abbildung 3.2:** Aktivierung der silanisierten Metalloberfläche mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI). 51
- Abbildung 3.3:** Das Prinzip der enzymvermittelten Bildung des fluoreszierenden ELF-97 Alkoholpräzipitates aus dem ELF-97 Phosphatasesubstrat. 58
- Abbildung 3.4:** Schematisch dargestellter Reaktionsmechanismus der Adsorption (nicht-kovalent immobilisiert) von Proteinen auf Metalloberflächen. Das Protein wird durch hydrophobe Wechselwirkung mit dem Propylrest adsorbiert. 64
- Abbildung 3.5:** Schematisch dargestellter Reaktionsmechanismus der kovalenten Kopplung von Proteinen auf Metalloberflächen. 64
- Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der kovalenten Kopplung von Ethanolamin mit dem Kohlenstoffatom des Imidazolamids und anschließender Adsorption des Proteins am Propylrest des N-Ethyl-N'-(propyldiethoxy)silyl-Harnstoffs durch hydrophobe Wechselwirkungen. 66
- Abbildung 3.7:** Periostlappenexperiment: Umwicklung eines Titanplättchens mit einem Perioststreifen zu einem Implantatkompositum. Von der Vorderkante der Tibia erwachsener Kaninchen wurde ein 20 x 7 mm großer Perioststreifen entnommen, die Titanplättchen damit umwickelt und das Kompositum in den Muskel *M. gastrocnemius* implantiert. 69
- Abbildung 4.1:** Makroskopische Aufnahmen von Metallplättchen vor und nach Behandlung mit Chromschwefelsäure. 74
- Abbildung 4.2:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von elektropolierten Stahlplättchen (A und C): elektropolierte Kontrolle (A), mit Chromschwefelsäure behandelte Stahloberfläche (C) und Titanplättchen mit 2000-facher Vergrößerung (B und D): elektropolierte Kontrolle (B), mit Chromschwefelsäure behandelte Titanoberfläche (D). 76

- Abbildung 4.3:** Mikroskopische Aufnahmen vom Rockwell Adhäsionstest für Titan- und Stahlplättchen zur Abschätzung der Bindungskräfte der Oberfläche nach Oxidation mit Chromschwefelsäure. Die oberen Aufnahmen wurden mit einem Reflexionslichtmikroskop mit 100-facher Vergrößerung erhalten und zeigen den Indenter-Abdruck auf der linken Seite als dunklen Halbkreis und die native Oberfläche auf der rechten Seite. Die unteren Bilder zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der eingerahmten Vierecke, die auf dem oberen Bild dargestellt werden und umfassen den Übergangsbereich zwischen zusammengedrückter und nativer Oberfläche..... 77
- Abbildung 4.4:** Beispiel einer ultrahydrophilen Quarzglasoberfläche. Der Kontaktwinkel beträgt im hier dargestellten Fall $\theta = 0^\circ$ für Vorrück- und Rückzugswinkel. Die Kontaktwinkelmessung zeigt eine vollkommene Hysteresefreiheit ($\Delta\theta = 0^\circ$)..... 79
- Abbildung 4.5:** Dynamische Kontaktwinkelmessungen nach der Wilhelmy-Plate-Methode für elektropolierte Titanplättchen (linke Spalte) und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen (rechte Spalte): A. acetongereinigt, B. mit 5 % Salpetersäure (HNO_3) behandelt und C. mit Chromschwefelsäure (CSS) geätzt..... 82
- Abbildung 4.6:** Messungen des dynamischen Kontaktwinkels nach der Wilhelmy-Plate-Methode nach 50 d Lagerung der mit Chromschwefelsäure behandelten Plättchen in Methanol. $\theta_V =$ Vorrückwinkel, $\theta_R =$ Rückzugswinkel und $\Delta\theta =$ Hysterese. A. Elektropoliertes Titanplättchen mit $\theta_V = 3^\circ$, $\theta_R = 3^\circ$ und $\Delta\theta = 0^\circ$. B. Anodisch oxidiertes Titanplättchen mit $\theta_V = 4^\circ$, $\theta_R = 3^\circ$ und $\Delta\theta = 1^\circ$. C. 316-L rostfreies Stahlplättchen mit $\theta_V = 14^\circ$, $\theta_R = 7^\circ$ und $\Delta\theta = 7^\circ$. D. Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen mit $\theta_V = 6^\circ$, $\theta_R = 4^\circ$ und $\Delta\theta = 2^\circ$ 83
- Abbildung 4.7:** Ablösen von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI durch 0.05 M NaOH / 0.5 % SDS-Lösung bei RT..... 92
- Abbildung 4.8:** (A & B): Verdrängung von ^{125}I -Ubiquitin vom elektropolierten Ti-CSS-APS und Ti-CSS-APS-CDI durch 2 M Heptylamin bei pH 7.4 als Funktion der Zeit. (A) Darstellung in %: $\text{APS}_{100\%} = 989 \text{ ng/cm}^2$, $\text{CDI}_{100\%} = 1831 \text{ ng/cm}^2$, (B) Darstellung in ng/cm^2 . (C & D): Verdrängung von Ubiquitin von elektropoliertem Ti-CSS-APS und Ti-CSS-APS-CDI durch 2 M Octylamin bei pH 7.4 mit der Zeit. (C) Darstellung in %: $\text{APS}_{100\%} = 214 \text{ ng/cm}^2$, $\text{CDI}_{100\%} = 730 \text{ ng/cm}^2$, (D) Darstellung in ng/cm^2 94
- Abbildung 4.9:** Graphische Darstellung der Einteilung in eine schnelle Anfangs- und eine langsamere Endphase bei der spontanen Desorption von Ubiquitin von Ti-CSS-APS in Phosphat-Puffer bei pH 10.0 mit / ohne 0.066 % SDS. (A) Beladung vs. Zeit und (B) halblogarithmische Auftragung: $\log[\text{Beladung}]$ vs. Zeit. Auflegung der Geraden der linearen Regression unter Berücksichtigung einer

schnellen und einer langsameren Phase. Die Steigung dieser Geraden ist gleich k und daraus lässt sich $t_{0.5}$ berechnen. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	98
Abbildung 4.10: Spontane Desorption von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem (A) Titan- HNO_3 -APS und (B) Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in Phosphat-Puffer bei pH 10.0 in An- bzw. Abwesenheit von 0.066 % SDS.	100
Abbildung 4.11: Freisetzung von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem Titan- HNO_3 -APS-CDI-Ethanolamin und Titan-CSS-APS-CDI-Ethanolamin durch Phosphat-Puffer bei pH 10.0 in An- bzw. Abwesenheit von SDS. Es handelt sich um zwei separate Experimente.	102
Abbildung 4.12: Spontane Desorption von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem (A) Titan- HNO_3 -APS und Titan- HNO_3 -APS-CDI und (B) Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in Tris/ NaCl -Puffer bei pH 7.4 in An- bzw. Abwesenheit von SDS.	106
Abbildung 4.13: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese einer selbst hergestellten und chromatographisch aufgereinigten rhBMP-2-Probe. Die Proteine wurden mit Coomassie Blau gefärbt. Bahn 1 und 8 sind Molekulargewichtsstandard (LMW). Bahn 2 und 3 sind rhBMP-2-Monomere (13 kDa), da sie mit Mercaptoethanol behandelt wurden. Bahn 5 und 6 sind rhBMP-2-Dimere (26 kDa). Die Bahnen 4 und 7 sind leer.	110
Abbildung 4.14: Spontane Desorption des ^{125}I -rhBMP-2 von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in 2, 20 und 200 ml physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$	121
Abbildung 4.15: Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von der Titan-Osteopromote-Oberfläche in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) nach dem Zweiphasen-Zerfallsmodell. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$	125
Abbildung 4.16: Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von der Titanplasmaspray-beschichteten Titanlegierung in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) nach dem Zweiphasen-Zerfallsmodell. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$	127
Abbildung 4.17: Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von CoCrMo-Legierungsplättchen in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. In der Tabelle der Langzeitdesorption mit einer gesamten Messzeit von $t = 64 \text{ d}$ erfolgte ein zehntäglicher Pufferwechsel.	129
Abbildung 4.18: Verdrängung von ^{125}I -rhBMP-2 von elektropoliertem Titan in 70 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) bei pH 7.4 bei RT. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. Während der Messzeit $t = 8 \text{ d}$ erfolgte ein täglicher BSA-Lösungswechsel.	131

- Abbildung 4.19:** Frequenz der Mikrokerne und der Mitosen in der V79 Hamsterzelllinie nach Inkubation mit unterschiedlichen rhBMP-2 Konzentrationen und Vergleich mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle..... 133
- Abbildung 4.20:** Frequenz der Mikrokerne und der Mitosen in der humanen AFFL Zelllinie nach Inkubation mit unterschiedlichen rhBMP-2 Konzentrationen und Vergleich mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle..... 134
- Abbildung 4.21:** (A) nichtlineare (hyperbolische) und (B) doppelt reziproke Darstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve vom in *E. coli* gentechnisch hergestellten rhBMP-2 unter Verwendung des alkalischen-Phosphatase-Induktionstests in MC3T3-E1 Zellen (Zusammenarbeit mit Dr. M. Wiemann, AG Prof. Dr. D. Bingmann, Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Essen)..... 136
- Abbildung 4.22:** Vergleich der alkalischen-Phosphatase-Aktivität zwischen nativem rhBMP-2 und dem nach der Bolton-Hunter Methode radioaktiv markierten ¹²⁵I-rhBMP-2 in MC3T3-E1 Zellen (Zusammenarbeit mit Dr. T. Zumbrink und Dr. M. Wiemann, AG Prof. Dr. D. Bingmann, Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Essen)..... 137
- Abbildung 4.23:** Nachweis der biologischen Aktivität des immobilisierten BMP-2 auf Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierungsplättchen in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 durch Induktion der alkalischen Phosphatase mittels des grünfluoreszierenden Substrates ELF-97. 140
- Abbildung 4.24:** Nachweis der biologischen Aktivität des immobilisierten BMP-2 auf elektropolierte Titanplättchen in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 durch Induktion der alkalischen Phosphatase mittels des grünfluoreszierenden Substrates ELF-97. 141
- Abbildung 4.25:** Nachweis der biologischen Aktivität des immobilisierten BMP-2 auf Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 durch Induktion der alkalischen Phosphatase mittels des grünfluoreszierenden Substrates ELF-97 (C). Zum Vergleich sind zwei Kontrollplättchen ohne und mit Chromschwefelsäure-Behandlung (A und B) ohne rhBMP-2 aufgestellt, in denen die angewachsenen Zellen durch Zellkernfärbung in blau visualisiert wurden. 142
- Abbildung 4.26:** Silanisiertes Chromschwefelsäure-behandeltes Titanimplantat (Ti-CSS-APS) nach 4 Wochen. In der 100-fachen Vergrößerung ist kein Nachweis für eine Entzündungsreaktion erkennbar. Das Implantat wurde mit einem Perioststreifen (nicht gezeigt) und einer dünnen Schicht Kollagenbindegewebe umwickelt (Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, Universitätsklinikum Essen). 144

- Abbildung 4.27:** Mikroradiographische Aufnahmen von Implantaten mit (A) freiem, löslichem und (B) chemisch immobilisiertem rhBMP-2 im Periostlappenexperiment in Kaninchen. Zwischen Knochen und Metall ist eine fibröse Bindegewebeschicht (A) zu erkennen. Der direkte Kontakt zwischen Knochen und Metallimplantat ist in (B) deutlich erkennbar (Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, Universitätsklinikum Essen). 146
- Abbildung 4.28:** Mikrophotographische Aufnahmen von gefärbten Implantatpräparationen, die mit (A) freiem, löslichem und (B) chemisch immobilisiertem rhBMP-2 im Periostlappentest in Kaninchen implantiert wurden (Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, Universitätsklinikum Essen). 147
- Abbildung 4.29:** Knocheninduktion an rhBMP-2 beschichteten Implantaten (B, C) und Vergleich mit einem Kontrollimplantat (A) in einem Spaltüberbrückungsverfahren. Querschnitte von Knochenimplantaten nach Entfernung vom Schafoberschenkelknochen. Eine starke Induktion von spongiossem (B) und kompaktem Knochen (C) an Titanimplantate mit immobilisiertem rhBMP-2 kann gezeigt werden. In der Negativkontrolle ohne rhBMP-2 (A) lässt sich eine sehr geringe Neubildung von Knochen erkennen. Hier handelte es sich um Titanplasmaspray-beschichtete Titanimplantate, die im Femurkondylus eines Schafes eingesetzt wurden und nach 9 Wochen Einwirkungszeit explantiert wurden. (B) zeigt den Querschnitt eines Implantats, das mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) chemisch modifiziert und rhBMP-2 adsorptiv immobilisiert wurde. Im Falle von (C) handelte es sich um ein Implantat, das mit APS und CDI modifiziert und rhBMP-2 kovalent gebunden wurde (Zusammenarbeit mit Dr. T. Lichtinger, AG Prof. Dr. R. Müller, Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Essen). 149
- Abbildung 4.30:** Osteointegration an einem rhBMP-2-beschichteten Implantat innerhalb von vier Wochen im Schafoberschenkelknochen. Querschnitte durch Implantate, die in einem Spaltüberbrückungsverfahren erhalten wurden. (A) ist ein Kontrollimplantat mit einer Brushit-Beschichtung ohne rhBMP-2 und (B) ein rhBMP-2-beschichtetes Implantat. Hier lässt sich eine vollständige Osteointegration, bedingt durch den direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat und vollständige Überbrückung des Spaltes erkennen (Zusammenarbeit mit Dr. T. Lichtinger, AG Prof. Dr. R. Müller, Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Essen). 151
- Abbildung 5.1:** Verteilung der hydrophoben Areale (blau) auf der Oberfläche des BMP-2 Moleküls. Die Solvent-zugängliche Oberfläche vom humanen BMP-2 wurde unter Verwendung des Programms WeblabViever 4.0 (Molecular Simulations Inc., San Diego, USA) verwendet. Der Probenradius betrug 1.4 Å (0.14 nm). Die Maschenbreite des gezeigten Gitters beträgt 0.5 nm. Das

Molekülmodell wird - beginnend mit der Position (A) - um 90 ° entlang der x-Achse rotiert [Chatzinikolaidou et al., 2002].	178
---	-----

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 4.1:** Bestimmung der Oberflächenvergrößerung vor (HNO_3) und nach Behandlung mit der Chromschwefelsäure (CSS) für elektropoliertes Titan, Titanplasmaspray-beschichtete Titanlegierung, rostfreien Stahl und Cobaltchrommolybdän-Legierung mittels konfokaler Laser-Rasterelektronenmikroskopie. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Ing. R. Büscher, AG. Prof. Dr. A. Fischer, Institut für Werkstoffkunde, Universität Duisburg-Essen und mit Herrn Dipl.-Ing. Ch. Heßing, AG. Prof. Dr. M. Pohl, Institut für Werkstoffe, Ruhr-Universität Bochum ermittelt..... 78
- Tabelle 4.2:** Dynamische Kontaktwinkelmessungen nach der Wilhelmy-Plate Methode mit Standardabweichung ($10 \geq n \geq 3$). Unterschiedlich oberflächenbehandelte Metallplättchen wurden direkt nach Behandlung oder 50 d nach Lagerung in Methanol in der Wilhelmy-Plate-Apparatur gemessen. Aceton: mit Aceton gereinigt, HNO_3 : mit 5 % Salpetersäure behandelt, CSS: mit Chromschwefelsäure behandelt..... 81
- Tabelle 4.3:** Abhängigkeit der immobilisierten Menge an ^{125}I -Ubiquitin von der Konzentration der Ubiquitinlösung. Immobilisierung von Ubiquitin auf elektropolierten Titanplättchen (10 x 15 x 1 mm). Die Inkubation der Metallplättchen erfolgte in 0.3 bzw. 1.0 mg/ml ^{125}I -CT-Ubiquitin-Lösung in 50 mM Na_2HPO_4 Puffer bei pH 10.0. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche..... 85
- Tabelle 4.4:** Wiederholung des Immobilisierungsexperimentes zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit: Abhängigkeit der immobilisierten Menge an ^{125}I -Ubiquitin von der Konzentration der Ubiquitinlösung. Immobilisierung von Ubiquitin auf elektropolierten Titanplättchen (10 x 15 x 1 mm) (n=3). Die Inkubation der Metallplättchen erfolgte in 0.3 bzw. 1.0 mg/ml ^{125}I -CT-Ubiquitin-Lösung in 50 mM Na_2HPO_4 Puffer bei pH 10.0. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche..... 87
- Tabelle 4.5:** Vergleich zwischen Waschen der Metallplättchen mit Phosphat-Puffer und einer alkalischen Natriumdodecylsulfatlösung nach der Immobilisierung von ^{125}I -Ubiquitin auf elektropolierten Titan- und rostfreien Stahlplättchen 316L (10 x 15 x 1 mm). Die Inkubation der Metallplättchen (n=2) erfolgte in einer ^{125}I -CT-Ubiquitinlösung mit der Konzentration von 0.9 mg/ml in 50 mM Na_2HPO_4 Puffer bei pH 10.0. Nach der Immobilisierung wurde mit Puffer und anschließend 15 min mit einer 0.1 N NaOH / 1 % SDS Lösung bei 60 °C gewaschen und die Beladungsmengen berechnet. Der mit Sternchen (*) gekennzeichnete Beladungswert von 4180

ng/cm ² auf Ti-CSS-APS wurde aus dem Verhältnis der immobilisierten Werte der Ti-APS-CDI zu Ti-APS der Tabelle 4.4 errechnet. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm ²] beziehen sich auf die geometrische Fläche.	89
Tabelle 4.6: Beispielhafte Umrechnung des immobilisierten ¹²⁵ I-Ubiquitin auf realer Titan- und rostfreier Stahloberfläche. Die Beladungswerte pro geometrischer Fläche stammen aus der Tabelle 4.5. c _{Ubiquitin} = 0.9 mg/ml.	90
Tabelle 4.7: Ablösen von ¹²⁵ I-Ubiquitin durch 50 mM NaOH / 0.5 % SDS bei RT. Es werden die initial immobilisierten Mengen Ubiquitin Γ_0 , die Beladungsmengen nach 1 h und die am Ende der 112 h-kinetischen Untersuchung und die Halbwertszeiten in der langsamen Phase dargestellt. c _{Ubiquitin} = 0.3 mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm ²] beziehen sich auf die geometrische Fläche.	93
Tabelle 4.8: Verdrängung des ¹²⁵ I-Ubiquitin vom elektroplierten Ti-CSS-APS und Ti-CSS-APS-CDI durch diverse Alkylaminlösungen mit unterschiedlicher Alkylkettenlänge (C ₂ , C ₄ , C ₆ , C ₇ , C ₈) bei variierten pH-Werten. Es werden die Initialbeladungsmengen an Ubiquitin Γ_0 , die Endwerte Γ_t zum Zeitpunkt t (t entspricht der in Klammern angegebenen Messzeit der kinetischen Untersuchung) und die Halbwertszeiten der schnellen Anfangs- / und der langsameren Endphase dargestellt. c _{Ubiquitin} = 0.3 mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm ²] beziehen sich auf die geometrische Fläche.	96
Tabelle 4.9: Vergleich der ermittelten Halbwertszeiten durch eine Auswertung nach einem biphasischen Zerfallsmodell und einer manuellen Auswertung. Die Phaseneinteilung bezieht sich auf die Kurven der Abbildung 4.9. Bei der manuellen Auswertung wurden für die lineare Regression der jeweiligen Phase Koeffizienten r ² von 1.0000, 1.0000, 0.9510 und 0.8736 ermittelt.	99
Tabelle 4.10: Spontane Desorption von ¹²⁵ I-Ubiquitin vom elektroplierten Titan in 50 mM Na ₂ HPO ₄ Puffer bei pH 10.0, mit / ohne SDS. c _{Ubiquitin} = 0.3 mg/ml.	104
Tabelle 4.11: Spontane Desorption von Ubiquitin von elektropliertem Titan in 50 mM Tris / 150 mM NaCl Puffer bei pH 7.4, in An- / Abwesenheit von SDS. Es werden die Initialbeladung, die Beladungsmengen an Ubiquitin am Ende der 26 d-gemessenen kinetischen Untersuchung (t) in [ng/cm ²] und in %, die Halbwertszeiten in der schnellen Anfangs- / langsameren Endphase (t _{0,5} ¹ / t _{0,5} ²) und die apparente Geschwindigkeitskonstante k ₋₂ in der zweiten, langsameren Phase in [s ⁻¹] [1993] dargestellt. c _{Ubiquitin} = 0.3 mg/ml. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t	

immobilisierten Menge ^{125}I -Ubiquitin. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	108
Tabelle 4.12: Vergleich zwischen Immobilisierung von nativem rhBMP-2 und mit Chloramin-T-modifiziertem rhBMP-2 (CT-rhBMP-2) für drei unterschiedliche Konzentrationen auf elektropoliertem Titan ($n = 3$). $c_{\text{rhBMP-2}} = c_{\text{CT-rhBMP-2}} = 0.01, 0.03$ und 0.15 mg/ml. Der Vergleich beider experimentellen Gruppen zeigt, dass der Unterschied nicht signifikant ist ($p > 0.05$). Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	111
Tabelle 4.13: Vergleich der Immobilisierungsmengen von ^{125}I -rhBMP-2 auf elektropoliertem Titan ($n = 3$) bei Verwendung eines 125 mM Borat-Puffers bei pH 10.0 und eines 10 mM Phosphat-Puffers mit 150 mM NaCl (PBS) bei pH 7.4 als Inkubationspuffer. In beiden Fällen ist $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.1$ mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	113
Tabelle 4.14: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf elektropoliertem Titan (Plättchen $5 \times 10 \times 1$ mm). $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ and 0.6 mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	114
Tabelle 4.15: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf elektropoliertem Titan- HNO_3 und Ti-CSS (Plättchen $10 \times 15 \times 1$ mm, $n = 4$) und modifiziert mit unterschiedlichen Alkylsilanen. $c_{\text{BMP-2}} = 0.1$ mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	115
Tabelle 4.16: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf Titan-Osteopromote (Altatec) (Plättchen $8 \times 8 \times 2$ mm). $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ and 0.6 mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	116
Tabelle 4.17: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf Titanplasmaspray-beschichteter Titanlegierung (DOT) (Plättchen $5 \times 10 \times 1$ mm). $c_{\text{BMP-2}} = 0.25$ mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	117
Tabelle 4.18: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf Cobaltchrommolybdän-Legierung (Plättchen $5 \times 10 \times 1$ mm). $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ und 0.6 mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.	118
Tabelle 4.19: Beispielhafte Umrechnung des immobilisierten ^{125}I -rhBMP-2 auf die reale Oberfläche. Die Beladungswerte pro geometrischer Fläche stammen aus den Tabelle 4.14, Tabelle 4.17 und Tabelle 4.18. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ mg/ml.	119

- Tabelle 4.20:** Spontane Desorption des ^{125}I -rhBMP-2 von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in 2, 20 und 200 ml physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. In der Tabelle werden die Initialbeladungsmenge an rhBMP-2 (Γ_0), die Endbeladungsmenge nach der 65 d-kinetischen Untersuchung (Γ_t), die Halbwertszeiten ($t_{0.5}^1, t_{0.5}^2$) in [d] und die Geschwindigkeitskonstanten in [s^{-1}] für die schnelle Anfangs- (k_{-1}) und die langsamere Endphase (k_{-2}) dargestellt. 122
- Tabelle 4.21:** Freisetzung von ^{125}I -rhBMP-2 von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. Alle unten aufgelisteten Puffer und Lösungen haben pH 7.4. Messzeit $t = 6 - 8 \text{ d}$. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge rhBMP-2. Die Berechnung der Halbwertszeiten der Verdrängung durch Alkylaminlösungen für die schnelle Anfangs- / langsamere Endphase erfolgte nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm^2] beziehen sich auf die geometrische Fläche. 124
- Tabelle 4.22:** Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von der Titan-Osteopromote-Oberfläche (Altatec) in PBS bei pH 7.4 ($t = 7 \text{ d}$ Messzeit). Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der Beladung am Ende der kinetischen Untersuchung zum Zeitpunkt t ($t = 7 \text{ d}$ Messzeit) immobilisierten Menge rhBMP-2. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. Die Halbwertszeiten der Anfangs- / Endphase wurden nach dem Zweiphasen-Zerfallsmodell berechnet. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm^2] beziehen sich auf die geometrische Fläche. 126
- Tabelle 4.23:** Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von der Titanplasmaspray-beschichteten Titanlegierung (TPS) in PBS bei pH 7.4 ($t = 11 \text{ d}$ Messzeit). Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge rhBMP-2. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. Die Halbwertszeiten werden für die schnelle Anfangs- / langsamere Endphase ermittelt. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm^2] beziehen sich auf die geometrische Fläche. 128
- Tabelle 4.24:** Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von CoCrMo-Legierungsplättchen in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. In der Tabelle der Langzeitdesorption mit einer gesamten Messzeit von $t = 64 \text{ d}$ erfolgte ein zehntäglicher Pufferwechsel. 128
- Tabelle 4.25:** Verdrängung des ^{125}I -rhBMP-2 von CoCrMo-Legierungsplättchen. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. Alle unten aufgelisteten Lösungen haben pH 7.4. Messzeit $t = 8 \text{ d}$. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge rhBMP-2. Die Berechnung der Halbwertszeiten der Verdrängung durch Alkylaminlösungen erfolgte aus der schnellen Anfangs- / langsameren

Endphase eines biphasischen Zerfallsmodells. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm ²] beziehen sich auf die geometrische Fläche.....	130
Tabelle 4.26: Vergleich zwischen der Verdrängung des ¹²⁵ I-rhBMP-2 von elektropolierten Titanplättchen durch 70 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA) und der Desorption in PBS (Kontrolle) bei pH 7.4. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ mg/ml. Die Messzeit t betrug 8 d. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge rhBMP-2. Die Berechnung der Halbwertszeiten der Verdrängung durch BSA erfolgte für die langsamere Endphase ($t_{0.5}^2$) nach einem biphasischen Zerfallsmodell. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm ²] beziehen sich auf die geometrische Fläche.....	131
Tabelle 4.27: Anzahl der ausgezählten V79 Hamster- und AFFL Humanzellen nach Behandlung mit Phosphat-Puffer (PBS, Negativkontrolle), Cisplatin (Positivkontrolle) und unterschiedlichen rhBMP-2 Konzentrationen und ihrer Markierung mit Bisbenzimid (Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Dopp, AG Prof. Dr. A. W. Rettenmeier, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Universitätsklinikum Essen).....	133
Tabelle 4.28: Biologische Aktivitätsmessung anhand der Induktion der alkalischen Phosphatase. Die Absorption bei 405 nm von drei unterschiedlich behandelten rhBMP-2-Proben der gleichen Konzentration wird in MC3T3-E1 Zellen gemessen. Es handelt sich um eine native rhBMP-2-Probe in PBS mit bekannter biologischen Aktivität als Positivkontrolle, eine rhBMP-2-Probe, die nach der Chloramin-T-Methode (CT) modifiziert wurde und eine native rh-BMP-2-Probe. Beide letzteren Proben lagen in Borat/SDS-Puffer vor. Alle rhBMP-2 Proben stammen aus derselben Präparation.....	138
Tabelle 4.29: Experimentelle Gruppen mit variablen Oberflächenbehandlungen im Periostlappenexperiment in Kaninchen. Ti-CSS: Chromschwefelsäure-behandeltes Titanplättchen, APS: 3-Aminopropyltriethoxysilan, CDI: 1,1'-Carbonyldiimidazol. (Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, Universitätsklinikum Essen).....	145

Glossar

a	Konzentration der besetzten Bindungsstellen
a₀	Gesamtkonzentration der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche
A_{AB}	Geschwindigkeit der spontanen Emission des Überganges von A nach B
A_m	gemessene Fläche
APS	3-Aminopropyltriethoxysilan
AFFL	Amnionflüssigkeit fibroblastenähnliche Zelllinie (amniotic fluid fibroblast-like)
A_g	geometrische Fläche
BMP-2	Knochenmorphogenetisches Protein (B one M orphogenetic P rotein 2)
B-H-Reagenz	N-Succinimidyl 3-(4-hydroxy, 5-[¹²⁵ I]iodophenyl)propionat (Bolton-Hunter)
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
C	Konzentration
C₀	Konzentration der Proteine in der Bulkphase
C_{rhBMP-2}	Konzentration des rhBMP-2 in der Inkubationslösung
C_{Ubiquitin}	Konzentration des Ubiquitin in der Inkubationslösung
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CoCrMo	Cobaltchrommolybdän-Legierung CoCr29Mo6
cp	commercially pure
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
CSS	Chromschwefelsäure oder (-behandelt)
CSS-APS	mit Chromschwefelsäure und 3-Aminopropyltriethoxysilan behandelt
CSS-APS-CDI	mit Chromschwefelsäure, 3-Aminopropyltriethoxysilan und 1,1'- Carbonyldiimidazol behandelt
CT	N-Chlortoluol-4-sulfonamid Natriumsalz oder Chloramin T
DPBS	Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELF-97	Enzyme-Labeled-Fluorescence-97 Phosphat
ep	elektrolytisch poliert
F	Kraft
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s^2)
G	Freie Enthalpie
h	Höhe des Plättchens
h	Plancksche Konstante ($6.62618 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)
HNO₃	Salpetersäure oder (-behandelt)
HNO₃-APS	mit Salpetersäure und 3-Aminopropyltriethoxysilan behandelt
HNO₃-APS-CDI	mit Salpetersäure, 3-Aminopropyltriethoxysilan und 1,1'-Carbonyldiimidazol behandelt
IgG	Immunglobulin G
k	Boltzmannkonstante ($1.38066 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$)
K_{0.5}	Halbsättigungskonstante
k₊₁	Geschwindigkeitskonstante der Adsorption
k₋₁	Geschwindigkeitskonstante der Desorption
K_d	Gleichgewichtskonstante
K_D	Halbsättigungskonstante
k_f	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz
K_H	Hillkonstante
k_{on}	interaktionsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante
k_{off}	interaktionsabhängige Desorptionsgeschwindigkeitskonstante
k_{on}^{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante der Adsorption
k_{off}^{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante der Desorption
m₀	Masse des Plättchens

MC3T3-E1	murine embryonale Schädeldach-Osteoblasten-Zelllinie
Me	Metalloberfläche / (-matrix)
MH1	Mad homology-1
m/v	Gewichtsprozent (g/100 ml)
1/n_F	Freundlichscher Adsorptionsexponent
n_H	Hillkoeffizient
OD	optische Dichte
P	Grenzwert der Desorption
P	Umfang des Plättchens
P_i	Plateau
p	Probenumfang
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Personalcomputer
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
rh	rekombinant human
rh-BMP-2	rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein 2
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Dicke des Plättchens
t_{0.5}¹	Halbwertszeit der Phase 1
t_{0.5}²	Halbwertszeit der Phase 2
TGF-β	Wachstumsfaktor (T ransforming G rowth F actor- β)
Ti	Titan
TPS	Titanplasma-spray-beschichtet
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
U	Geschwindigkeit der Luftblase im wässrigen Medium
v_o	Geschwindigkeit der Teilchen in der Bulkphase (Durchflußrate)

v	Geschwindigkeit der Teilchen nahe der Oberfläche
V	Volumen
V79	Zelllinie chinesischer Hamsterzellen
v/v	Volumenprozent (ml/100 ml)
w	Breite des Plättchens
z. B.	zum Beispiel
α	Kooperativitäts- oder Interaktionskonstante
α	Adsorptionskoeffizient in der Isotherme nach Freundlich
β	Kooperativitäts- oder Interaktionskonstante
γ_0	Oberflächenspannung
γ_s	Oberflächenspannung des Festkörpers
γ_l	Oberflächenspannung der Flüssigkeit
γ_{sl}	Oberflächenspannung der Phasengrenze fest/flüssig
Γ_t	Proteinmenge pro geometrische Fläche zum Zeitpunkt t
Γ_0	Initial immobilisierte Proteinmenge pro geometrische Fläche
Γ_r^s	Konzentration der oberflächengebundenen Substituenten
ΔF	Kraftdifferenz
ΔG	Änderung der Gibbs Freien Energie
ΔH	Änderung der Enthalpie
ΔS	Änderung der Entropie
η	Adsorptionskoeffizient (der Freundlich-Isotherme)
ϑ	Konstante der Adsorption in der Temkin-Isotherme
θ_K	Kontaktwinkel
θ_R	Rückzugswinkel
θ_V	Vorrückwinkel
Θ	fraktionelle Sättigung
Θ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
ν	Frequenz
ρ_1	Dichte der Flüssigkeit

τ_R	Lebensdauer des angeregten Zustandes
$1/\tau$	Desorptionsgeschwindigkeitskonstante
φ	Konstante der Desorption in der Temkin-Isotherme

1 Einleitung

Bei der Entwicklung und Herstellung von Biomaterialien für die medizinische Anwendung spielt die Biokompatibilität im Bereich der Implantatforschung eine übergeordnete Rolle. Die Aufgabenstellung, funktionelle, biokompatible und gewebespezifische Implantate herzustellen, ist wegen ihrer Komplexität nur durch eine effiziente Zusammenarbeit zwischen Medizin, Biologie, Chemie, Physik und Materialwissenschaft erfolgreich zu lösen.

Häufig vorkommende Biomaterialien, die als Implantate Anwendung finden, sind die künstlichen intraokularen Linsen, Herzklappen, Gefäßstützen, Hüftgelenkprothesen und Dentalimplantate [Ratner, B. D., 1996a].

Künstliche Hüftgelenkimplantate ersetzen oft aufgrund degenerativer oder rheumatologischer Erkrankungen das Hüftgelenk, so dass die Funktion einige Tage nach der Operation wiederhergestellt wird [Ratner, B. D., 1996a]. In anderen Fällen ist eine längere Einheilungszeit erforderlich, bis die Befestigung zwischen Implantat und Knochen gewährleistet ist und die Hüfte das Körpergewicht tragen kann. Nach 10 – 15 Jahren ist wegen einer möglichen Lockerung des Implantates eine zweite Operation notwendig [Jennissen, 2000b].

Die weitverbreitete Einführung von Titanimplantaten hat die Dentalimplantologie revolutioniert. Dentalimplantate bilden eine künstliche Zahnwurzel, auf die eine Krone gesetzt wird. Eine besondere Anforderung bei den Materialien in dieser Anwendung ist die Fähigkeit, eine enge Dichtung gegen bakteriellen Eingriff an der Stelle zu gewährleisten, an der das Implantat das Zahnfleisch durchquert. Einer der ursprünglich beschriebenen Vorteile bei Titanimplantaten war die Haftfestigkeit am Kieferknochen. In den letzten Jahren wird diese Befestigung jedoch genauer beschrieben als eine feste Positionierung oder mechanische Anpassung und nicht als echte feste Bindung.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt, der großes Interesse erweckt, sind die mechanischen, Verschleiß- und Korrosionseigenschaften von Titan und anderen Implantatwerkstoffen.

Die erste Reaktion, die beim Einbringen eines Implantates in den Organismus stattfindet, ist die Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche [Jennissen, 1988]. Bei Implantaten mit immobilisierten Proteinen ist ihre Freisetzung für die Wechselwirkung mit dem Zielgewebe

von entscheidender Bedeutung. Deshalb ist die Untersuchung der Adsorption und Desorption von Proteinen auf Implantatoberflächen von substanzieller Bedeutung.

In der Therapie von Knochendefekten wird das knochenmorphogenetische Protein BMP-2 häufig in einem Trägersystem (delivery system) zusammen mit einem Implantat, das meistens ein Titanimplantat ist, angewandt. Als Trägermaterialien fungieren Kollagen [Sigurdsson et al., 1997], Kollagenschwamm [Boyne et al., 1997], Kollagengel [King et al., 1998] oder Gelatine-Hydrogele [Hong et al., 1998]. In anderen Methoden wird BMP-2 mit demineralisiertem lyophilisiertem humanem Knochenpulver eingebracht [Niederwanger & Urist, 1996]. In vielen Studien wird die Kombination von BMP-2 mit Hydroxylapatit [Tsuruga et al., 1997] und Kalziumphosphat beschrieben [Laffargue et al., 1999; Oda et al., 1997]. Auch abbaubare Polylactide werden mit BMP-2 kombiniert [Duggirala et al., 1996; Saito et al., 1999; Winn et al., 1999]. Eine andere Anwendungsart verbindet das Protein mit einer knochenfördernden Membran („osteopromotive membrane“), die Entzündungszellen daran hindert, das Implantat zu erreichen [Zellin et al., 1996]. In vielen Experimenten, in denen BMP-2 im Zusammenhang mit einem der oben genannten Trägermaterialien verwendet wurde, konnten keine signifikanten Effekte im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden. Aus diesem Grund folgt der Schluß, dass einfaches Zusammenbringen des Implantates mit BMP-2 ohne Berücksichtigung einer signifikanten Immobilisierung des Proteins auf der Implantatoberfläche nicht zu dem erwünschten Ergebnis führt. Das kann dadurch erklärt werden, dass das Protein die Stelle aufgrund von Diffusions- oder Abbaueffekten verlassen oder an andere Strukturen und Proteine binden kann. Ein zusätzliches Problem bereitet die Gefahr der ektopischen Knochenbildung. In dieser Hinsicht ist die Herstellung einer spezifischen Oberfläche, die vom Zielgewebe biologisch erkannt wird, essentiell. Zu diesem Zweck sind rationale Prozesse zur Immobilisierung von Proteinmolekülen erforderlich [Jennissen et al., 1999; Voggenreiter et al., 2001]. Das Ziel ist, eine biokompatible Biologisierungsschicht auf dem Implantat anzubringen. Eine solche Oberfläche hat zwei wichtige Funktionen: (i) die Zellen des Zielgewebes durch eine kontrollierte Freisetzung des Proteins chemotaktisch „anzulocken“ und (ii) bei den erreichten Zellen behalten zu bleiben und sie mittels eines juxtakrinen Mechanismus möglichst lange zu stimulieren [Jennissen, 2000b].

Bei der Herstellung einer Oberfläche, die über die Eigenschaften verfügt, die bereits beschrieben wurden, sind gleichzeitig mehrere Voraussetzungen zu erfüllen: (i) die

Herstellung einer stabilen Grundierungsschicht, die der Implantatoberfläche bioadhäsive Eigenschaften verleihen kann, (ii) die Funktionalisierung der Oberfläche mittels Anker-molekülen, um die Proteinbindungsart gezielt zu variieren und zu differenzieren, (iii) die Biologisierung der Oberfläche durch Immobilisierung biologisch aktiver Proteinmoleküle [Jennissen, 1999].

Tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten, Hunden, Kaninchen und Affen zeigten keine Spezies-spezifität für BMP-2, so dass *in vivo* Experimente plausibel sind [Cook et al., 1994a; Cook et al., 1994c; Cook et al., 1995].

Das Ziel dieser Arbeit war es, biologisch aktives rhBMP-2 herzustellen und es in aktiver Form auf metallischen Implantatoberflächen zu immobilisieren, um eine hohe und kontrollierte Osteointegration *in vivo* zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche implantierbare Metalloberflächen chemisch behandelt und modifiziert, die Adsorption und Desorption des Modellproteins Ubiquitin und des knocheninduzierenden rhBMP-2 auf diesen Metalloberflächen untersucht, die Beladungsmengen quantitativ mittels radioaktiv markierten Proteine ermittelt und die Halbwertszeiten der Desorptionskinetiken berechnet. Der Nachweis der biologischen Aktivität sowie eine Toxizitätstestung von rhBMP-2 erfolgte in der Osteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1. Um diese biologisierten Oberflächen mit rhBMP-2 auf ihre klinische Relevanz zu prüfen, wurden *in vivo* Experimente durchgeführt. Dabei war es wichtig, die biologische Aktivität des immobilisierten rhBMP-2 auf Metallplättchen nachzuweisen, die modifizierten Oberflächen auf toxische oder Entzündungsreaktionen zu untersuchen und das osteoinduktive Potential der Implantatoberflächen zu ermitteln.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Proteine: Ubiquitin und Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)

In der vorliegenden Arbeit wurden Adsorptions-, kovalente Kopplungs- und Desorptionsexperimente an metallischen Implantatwerkstoffen mit dem Modellprotein Ubiquitin, mit dem in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. P. Jennissen über ein Jahrzehnt lang intensiv geforscht wurde und dem knocheninduzierenden Protein BMP-2 durchgeführt. Die Primärfunktion vom ubiquitinabhängigen Abbau zahlreicher intrazellulärer Proteine scheint in der Beseitigung von anomalen, denaturierten oder Fremdproteinen zu liegen [Jennissen, 1995]. Der Mechanismus und die Regulation der ubiquitinabhängigen Proteolyse scheinen trotz verbreiteter Meinung noch ein Rätsel zu sein. Außerdem ist das extrazelluläre Vorkommen des Modellproteins Ubiquitin für die folgend beschriebenen Kopplungsexperimente von großer Bedeutung. Das zweite verwendete Protein, BMP-2, ist ein Mitglied der Superfamilie der Wachstumsfaktoren TGF- β , auf die hier näher eingegangen wird. Eine besondere Bedeutung kommt außer der Funktion auch der Struktur beider Proteinmoleküle zu, die für die Kopplung an Metalloberflächen sehr bedeutend zu sein scheint.

2.1.1 Vorkommen, Funktion und Struktur von Ubiquitin

Ubiquitin, ein in allen untersuchten Prokaryonten und Eukaryonten vorkommendes Protein, ist mit 8.5 kDa ein kleines Protein, das erstmalig im Thymusgewebe von Goldstein et al. 1975 isoliert wurde. Die ursprüngliche Bezeichnung war UBIP (Ubiquitäres Immunopoetisches Polypeptid).

Sein ubiquitäres Vorkommen in unterschiedlichen Geweben aller Eukaryonten wurde in vielen Studien nachgewiesen [Durner & Boeger, 1995; Mayer & Doherty, 1992; Ozkaynak et al., 1984; Vierstra et al., 1985; Wolf et al., 1993].

In den letzten 30 Jahren konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin und seine Konjugate mit anderen Proteinen in diversen biologischen Funktionen wie z.B. in der Proteolyse, in der

Stressantwort der Zelle [Bond & Schlesinger, 1985], in der DNA-Reparatur [Freiberg et al., 2000; Madura et al., 1990; Sung et al., 1990], in der Regulation des Zellzyklus [Bastians et al., 1999; Bloom et al., 2003; Glotzer et al., 1991], in der Zellteilung [Sudakin et al., 1995], in der Morphogenese von Neuronen [Mayer & Doherty, 1992; Morishima-Kawashima et al., 1993] und als extrazellulärer Modulator [May & Ghosh, 1998] eine signifikante Rolle spielen. Aufgrund der weiten Verbreitung der Ubiquitin-Konjugate stellten Hershko et al. [Hershko et al., 1983] folgendes Konzept der Ubiquitin-Protein-Ligase auf, um die Bindung von Ubiquitin an verschiedene Proteine zu erklären: In einem ersten, ATP-abhängigen Schritt wird ein aktivierendes Enzym durch ein Ubiquitin am C-Terminus adenyliert und unter Eingehung einer Thioester-Bindung und Freisetzung des AMP an das E1 gebunden. E1 überträgt das gebundene Ubiquitin auf ein Ubiquitin konjugierendes Enzym, mit dem es ebenfalls eine Thioester-Bindung eingeht. So gibt es zwei Möglichkeiten, die den weiteren Fortgang des Ubiquitins beschreiben können: Ubiquitin wird direkt mittels E2 auf das zu ubiquitylierende Protein übertragen. Ubiquitin wird mittels einer E3 Reaktion (E3 ist das substratbindende bzw. das Zielprotein bindende Protein) auf das zu ubiquitylierende Protein übertragen. Die Ubiquitylierung des Zielproteins erfolgt über den C-Terminus der Carboxylgruppe des Ubiquitins unter Bildung einer NH_2 -Gruppe des Lysins bzw. an den N-Terminus des ubiquitylierten Proteins.

Als Substrat für die Ubiquitylierung wurden bisher Actin [Ball et al., 1987], Myosin-Leichtketten [Laub & Jennissen, 1991] und verschiedene Rezeptoren verwendet.

Während sehr viele Studien über den intrazellulären Proteinabbau durch Ubiquitin beschrieben wurden, sind vergleichsweise nur sehr wenige Arbeiten über das extrazelluläre Ubiquitin bekannt. Aufgrund der Immobilisierungsexperimente mit Ubiquitin im Rahmen der vorliegenden Arbeit kommt der extrazellulären Funktion von Ubiquitin eine große Bedeutung zu.

Das extrazelluläre Vorkommen von Ubiquitin wurde aufgrund seiner adenylatzyklenstimulierenden Wirkung im Zusammenhang mit der Uterusaktivität beschrieben [Lippert et al., 1987].

Majetschak et al. [Majetschak et al., 2004] zeigten, dass eine Ubiquitin-Behandlung *in vivo* eine heilsame Wirkung während der lethalen Endotoxämie aufweist. Damit spielt

extrazelluläres Ubiquitin therapeutisch eine potentielle Rolle bei hämatopoetischen und inflammatorischen Reaktionen.

In einer anderen Studie [Daino et al., 1996] wurden die Effekte des extrazellulären Ubiquitins auf die Koloniebildung humaner hämatopoetischer Progenitorzellen untersucht. Extrazelluläres Ubiquitin sollte das Wachstum von KT3 (T-Lymphoblasten)-, K562 (Erythroleukämie)- und Daudi (Burkitt's Lymphom)-Zellen hemmen, das Wachstum von HL60 (promyelozytische Leukämie)- und Jurkat (T-ALL)-Zellen stimulieren und keine Effekte auf das Wachstum von U937 (monozytische Leukämie)-Zellen zeigen.

Sutovsky et al. [Sutovsky et al., 2001] haben einen ubiquitin-abhängigen Samen-Qualitätskontroll-Mechanismus beschrieben, der im Säugetier-Epididymis, an der Stelle der Samenreifung und -lagerung vorkommt. Sie zeigten, dass Ubiquitin vom Epididymisepithel abgesondert wird und an der Oberfläche der defekten Samen bindet.

In weiteren Studien wurde der Mechanismus der extrazellulären Ubiquitylierung eines 70 kDa Samenrezeptors im Eidotter von *Halocynthia roretzi* und der Abbau während der Befruchtung untersucht [Sakai et al., 2003; Sawada, 2002].

Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren haben Schlüsselrollen bezüglich der Zellproliferation und -differenzierung. Es wurde gezeigt, dass der Abbau dieser Inhibitoren in der Hefe CKI, Far 1p durch extrazelluläre ubiquitin-abhängige Proteolyse kontrolliert wird [Henchoz et al., 1997].

Struktur und Sequenz von Ubiquitin

Kernmagnetresonanz- (NMR-) und chemische Studien zeigten, dass Ubiquitin ein kompaktes, globuläres Protein mit einem charakteristischen hydrophoben Kern ist [Vijay-Kumar et al., 1985]. Die physiologisch aktive Form von Ubiquitin besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 76 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 8565 Da. Seine Sekundärstruktur beinhaltet dreieinhalb Drehungen einer α -Helix, ein gemischtes β -Faltblatt mit vier Strängen und sieben reversen Drehungen. Ungefähr 90 % der Polypeptidkette ist in eine Wasserstoffbindung-Sekundärstruktur involviert. Die Tyrosin-, Histidin- und einer der Phenylalaninreste befinden sich auf der Moleküloberfläche. Ubiquitin ist außer seiner physiologischen Rolle aufgrund seiner Stabilität und ausgesprochener Sequenzkonservierung von besonderem Interesse. Das Proteinmolekül ist trotz der Anwesenheit von sieben Lysin- und vier Argininresten extrem resistent zu tryptischer

Verdauung. Außerdem ist Ubiquitin über einen weiten pH- und Temperaturbereich stabil. NMR-Studien zeigten keine apparente Denaturierung von Ubiquitin über einen Temperaturbereich von 23 – 80 °C und pH-Bereich von 1.18 – 8.48.

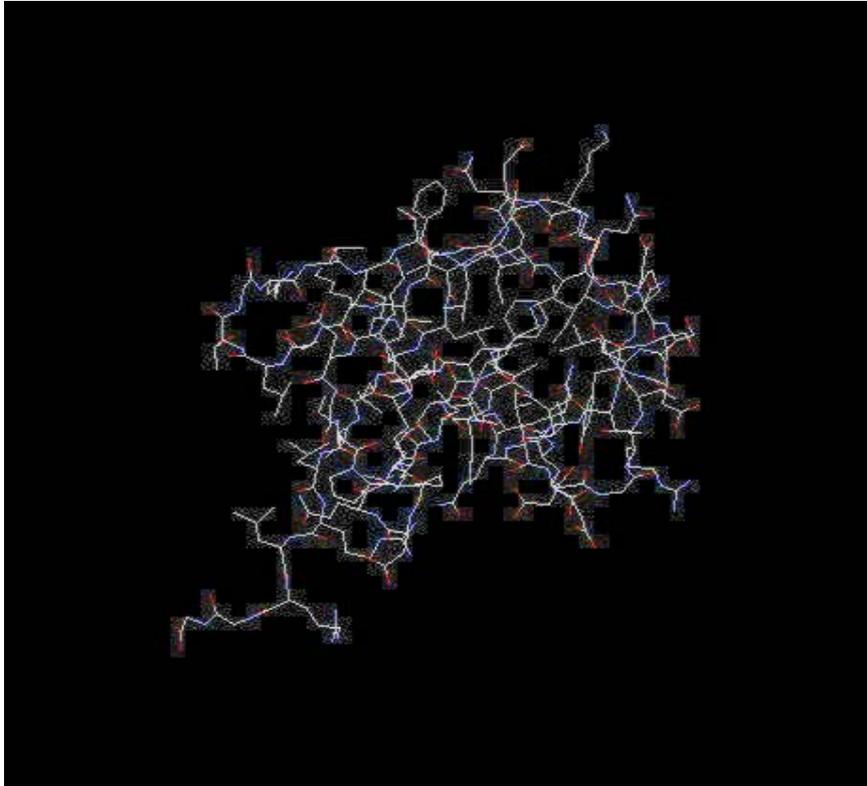


Abbildung 2.1: Struktur von Ubiquitin aus der Proteindatenbank (RasMol, Version 2.6), wobei die einzelnen Aminosäuren mit ihren Seitenketten dargestellt werden.

Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und hat folgende Sequenz:

MQIFV**K**TLTG **K**TITLEVEPS DTIENV**KAKI** QD**K**EGIPPDQ QRLIFAG**K**QL EDGRTLSDYN
IQ**K**ESTLHLV LRLRGG

Anzahl der Lysinreste (K): 7

2.1.2 Vorkommen und Funktion von Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)

BMP-2 ist ein hitzestabiles, in der Evolution hochkonserviertes Protein mit knorpel- und knocheninduzierenden Eigenschaften [Urist, 1965]. Es kommt in großen Mengen in der Knochenmatrix, im Lungen-, Milz- und Colongewebe und in geringeren aber signifikanten Mengen in Herz, Gehirn, Plazenta, Leber, Skelettmuskeln, Niere, Pankreas, Prostata, Eierstöcken und Dünndarm vor [Chang et al., 2002; Goumans & Mummery, 2000; Hogan, 1996].

Knochenmorphogenetische Proteine (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) sind pleiotrope, knocheninduzierende Wachstumsfaktoren der TGF- β (Transforming Growth Factor- β) Superfamilie [Wozney et al., 1988], die Schlüsselfunktionen in der Zelle wie Chemotaxis, Mitose und Differenzierung regulieren [Reddi, 1995a].

Die TGF- β -Superfamilie stellt eine Gruppe von multifunktionellen Mediatoren dar, die wichtige Rollen in der Entwicklung und in der Kontrolle der Differenzierung und Proliferation der Zellen spielen [ten Dijke et al., 2003]. Mitglieder der TGF- β Superfamilie wurden in vielen tierischen Spezies wie Mäusen, Zebras, Fischen und *Xenopus* und auch in Spezies wie *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* identifiziert. *In vivo* Experimente an *Drosophila*, Ratten, Hunden, Kaninchen und Primaten zeigten keine Speziespezifität für BMP-2 [Cook et al., 1994b; Cook et al., 1995; Padgett et al., 1993; Sampath et al., 1993].

Neben ihrer ursprünglich identifizierten Funktion, ektopisch Knorpel- und Knochenbildung zu induzieren [Sampath & Reddi, 1981; Urist, 1965], wurden BMPs wichtige Rollen in der Bestimmung der Entwicklung der Mesenchymzellen zugeordnet [Katagiri et al., 1994]. Einerseits stimulieren sie durch die Osteoblasten die Differenzierung und andererseits inhibieren sie die Differenzierung durch Myoblasten. Spätere Studien zeigten, dass sowohl BMPs als auch andere TGF- β -Proteine eine multifunktionelle Rolle in unterschiedlichen Weichgeweben spielen. Tatsächlich wurde gezeigt, dass BMPs nicht nur im Skelett sondern auch im Weichgewebe exprimiert werden [Hogan, 1996]. Studien bezüglich der Effekte bestimmter BMP-Familienmitgliedern über den Verlust von Funktionen in Mäusen zeigten ihre signifikante Rolle in der Skelettgenese und in der Entwicklung und Funktion von pulmonalen, kardiovaskulären, reproduktiven und urogenitalen Organen und des Nervensystems [Chang et al., 2002; Goumans & Mummery, 2000].

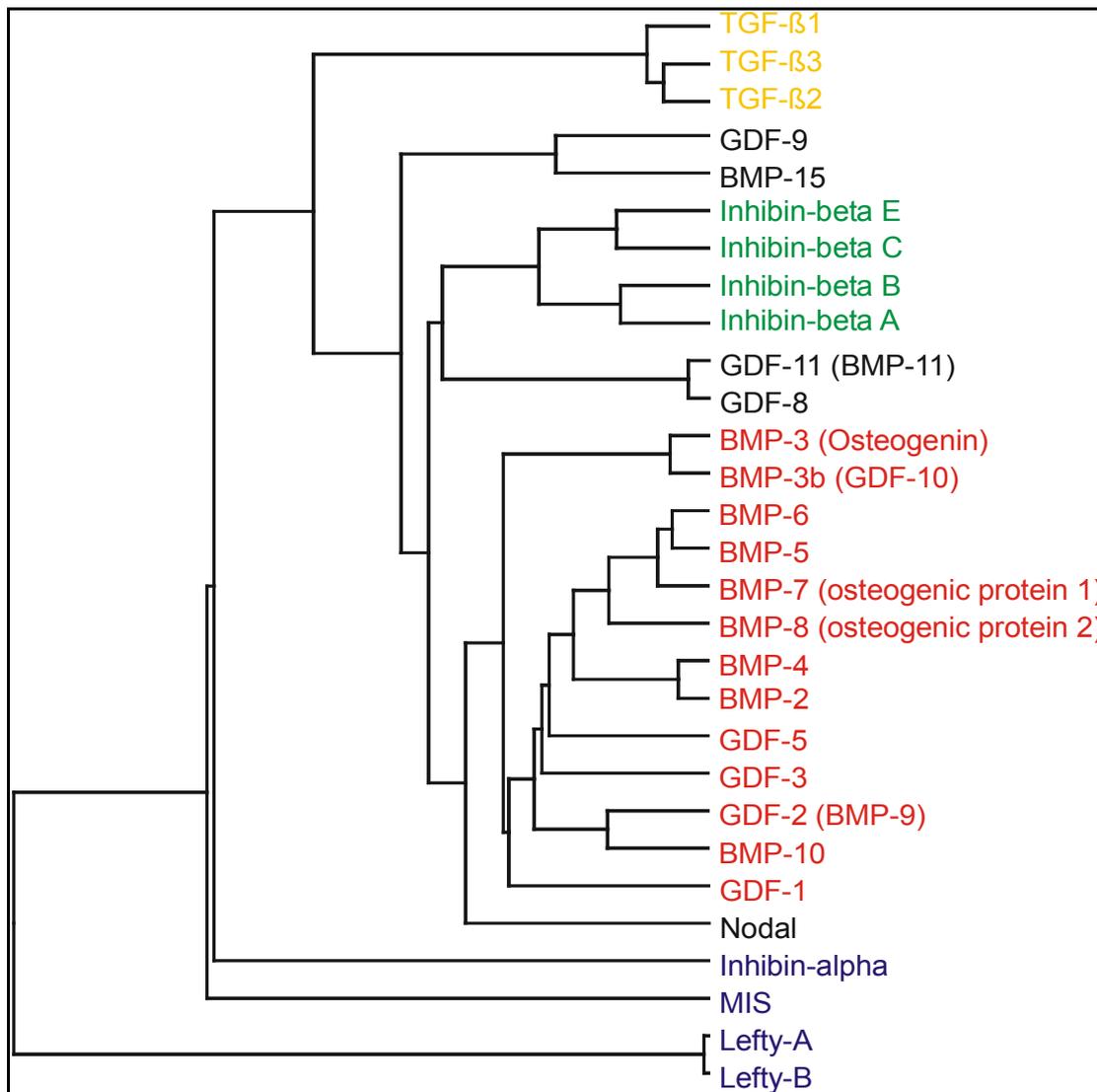


Abbildung 2.2: Dendrogramm der TGF-β-homologen Cytokine (Homo sapiens) [Laub & Jennissen, 2003]. Die Längen der horizontalen Linien entsprechen der Anzahl der evolutionären Unterschiede zwischen Proteinen oder Proteingruppen abgeleitet von der Sequenzhomologie. Die BMP-Gruppe (rot) entspricht ca. einem Drittel der TGF-β-Superfamilie und bildet somit die größte Untergruppe. GDF1-3 und 5 sind nahe der BMP-Proteine angesiedelt. Das spiegelt den Befund wieder, dass die physiologischen Funktionen der BMP-Proteine sich nicht nur auf die Knochenentwicklung reduzieren, sondern auch Zellproliferation und -differenzierung einschließen.

Bisher ist es nur wenigen Forschergruppen gelungen, signifikante Mengen an rekombinantem humanen knochenmorphogenetischen Protein 2 (rhBMP-2) herzustellen. Biologisch aktives rhBMP-2 konnte zuerst aus chinesischen Hamsterovalenzellen (CHO Zellen) synthetisiert werden [Wang et al., 1990]. 1995 wurde das Baculovirus/Sf-9-Insektenzellsystem zur Synthese des nativen Proteins verwendet [Maruoka et al., 1995]. Im *E. coli* System wurde rhBMP-2 von Ruppert et al. präpariert [Ruppert et al., 1996]. In einem

ähnlichen System wurden signifikante rhBMP-2 Mengen in *E. coli* präpariert [Jennissen et al., 1999].

Für klinische Anwendungen ist es günstiger, das rekombinante humane BMP-2 (rhBMP-2) anstelle des aus Knochenmatrix isolierten und aufgereinigten humanen BMP-2 (ph-BMP-2) zu verwenden. Dennoch wurde in Studien beschrieben, dass die biologische Aktivität des rhBMP-2 geringer ist als die Aktivität des natürlichen Proteins [Bessho et al., 1999; Ruppert et al., 1996].

2.1.3 Struktur und Sequenz von BMP-2

Die Primärstruktur der Proteine, die der TGF- β -Superfamilie angehören, besteht aus einer aminoterminalen Signalsequenz und dem carboxyterminalen reifen Peptid, das durch eine furinvermittelte Spaltung freigesetzt wird [ten Dijke et al., 2003]. Furin ist eine Proteinase, die für die Aktivierung zahlreicher anderer wichtiger Proteine in lebenden Zellen zuständig ist [Henrich et al., 2003]. Die reife Domäne ist hochkonserviert und hat ein charakteristisches 7-Cystein-Motiv. Sie bildet Homo- oder Heterodimere, die in den meisten Fällen über eine Disulfidbrücke kovalent gebunden sind. Die Kristallstruktur von TGF- β 2 hat gezeigt [Daopin et al., 1992], dass sechs der sieben Cysteinreste Intrapolypeptid-Disulfidbindungen bilden und ein Cysteinrest (Cys78 beider Untereinheiten) zur Disulfidbrückenbindung zwischen den zwei Polypeptidketten zur Bildung des Dimers beiträgt. Diese charakteristische Topologie der Disulfidbindung wurde als Cystinknoten bezeichnet [McDonald & Hendrickson, 1993] und kommt auch in BMP-2 vor.

Aus der Abbildung 2.2 lässt sich erkennen, dass die BMP/Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs) die größte Gruppe innerhalb der TGF- β -Superfamilie bilden, die in andere Untergruppen mit hochstrukturellen Verwandproteinen aufgeteilt werden können.

Das reife, biologisch aktive BMP-2 ist ein Homodimer, bestehend aus zwei Untereinheiten mit jeweils 114 Aminosäuren und es repräsentiert die C-terminale Sequenz eines langen Vorläuferproteins aus 396 Aminosäuren. Dieses Proprotein wird glycolyiert, proteolytisch gespalten und dimerisiert, um das native Homodimer mit den Dimensionen 7.0 x 3.5 x 3.0 nm zu bilden [Scheufler et al., 1999].

Die Aminosäuresequenz des monomeren BMP-2 ist folgende:

```
QAKHKQRKRL KSSCKRHPLY VDFSDVGWND WIVAPPGYHA FYCHGECPPF  
LADHLNSTNH AIVQTLVNSV NSKIPKACCV PTELSAISML YLDENEKVVL  
KNYQDMVVEG CGC R
```

Anzahl der Lysinreste pro Monomer (K): 9

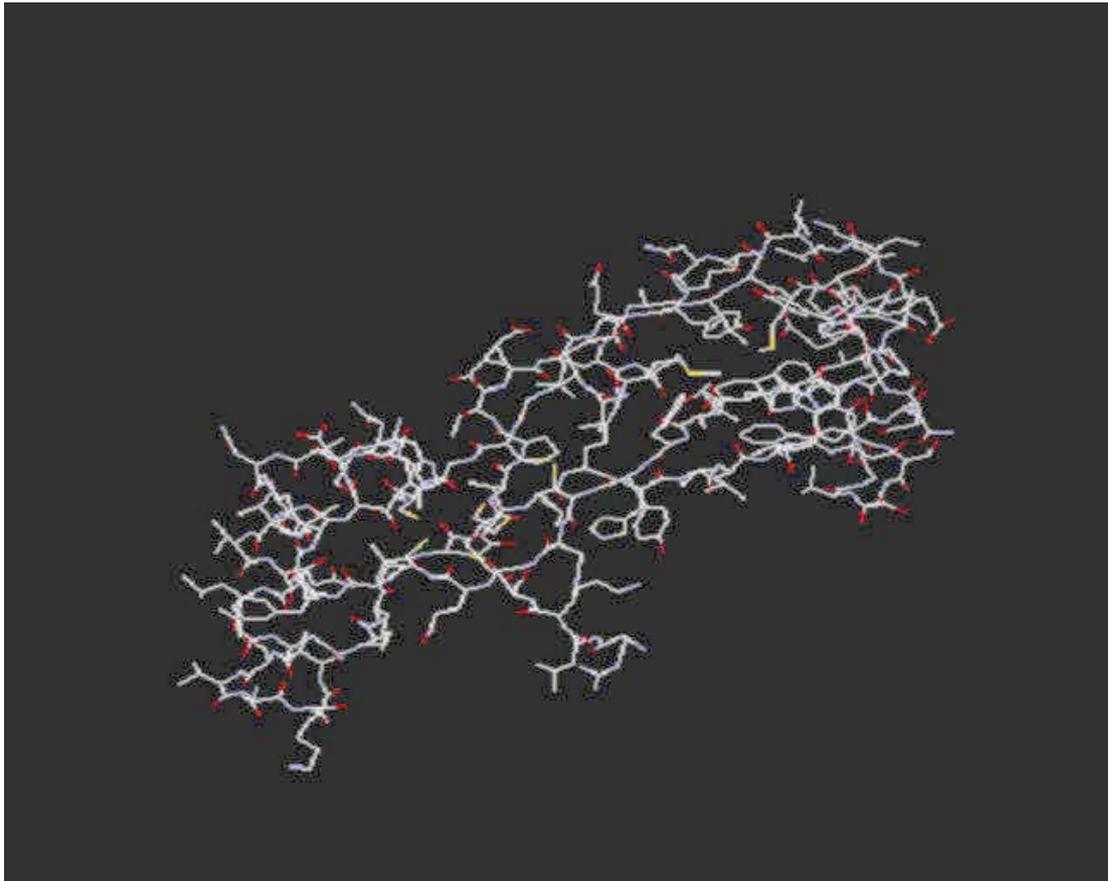


Abbildung 2.3: Struktur von rhBMP-2 aus der Proteindatenbank (RasMol, Version 2.6), wobei die einzelnen Aminosäuren mit ihren Seitenketten veranschaulicht werden.

Die Solvent-zugängliche Oberfläche des BMP-2-Dimers zeigt große hydrophobe Areale. Insbesondere beide Seiten der „Finger“ weisen extensiv unpolare Taschen auf. Das begründet die Beobachtungen, dass BMP-2 „ungewöhnliche Löslichkeitseigenschaften“ hat und zur Aggregatbildung tendiert [Ruppert et al., 1996].

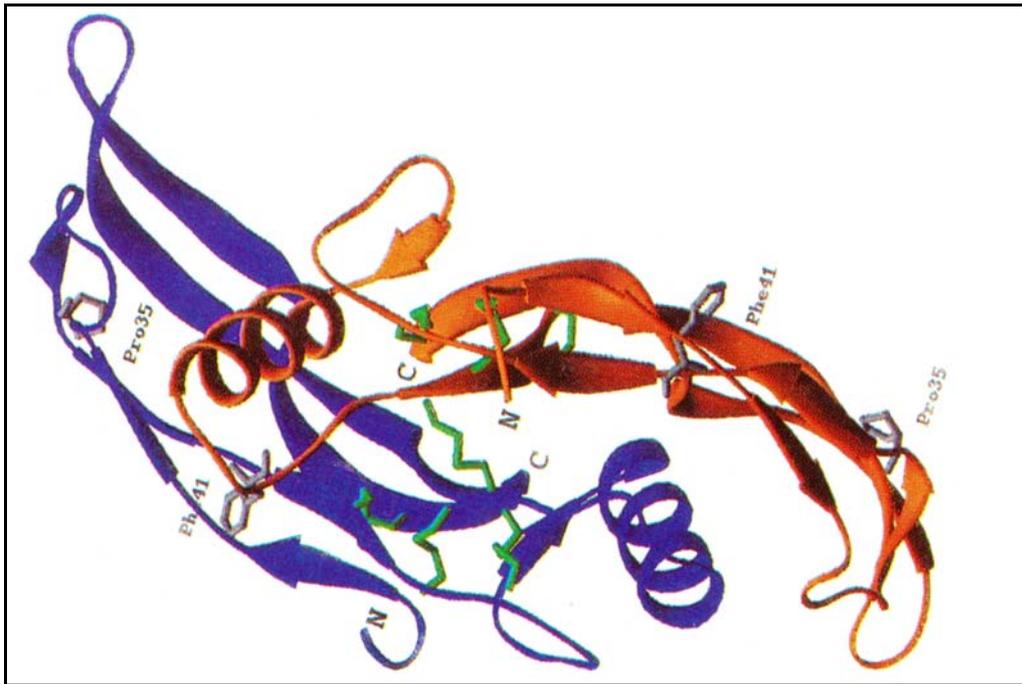


Abbildung 2.4: Dreidimensionale Faltungstopologie des nativen rhBMP-2 Dimers [Scheufler et al., 1999]: α -Helix-Strukturen werden als Spirale, β -Faltblatt-Strukturen als Pfeile und Disulfidbrücken als grüne Stäbe dargestellt. Die beiden identischen Polypeptid-Untereinheiten (in den Farben orange und blau gezeigt) werden über eine Disulfidbrücke (grün) zum biologisch aktiven Dimer kovalent gebunden.

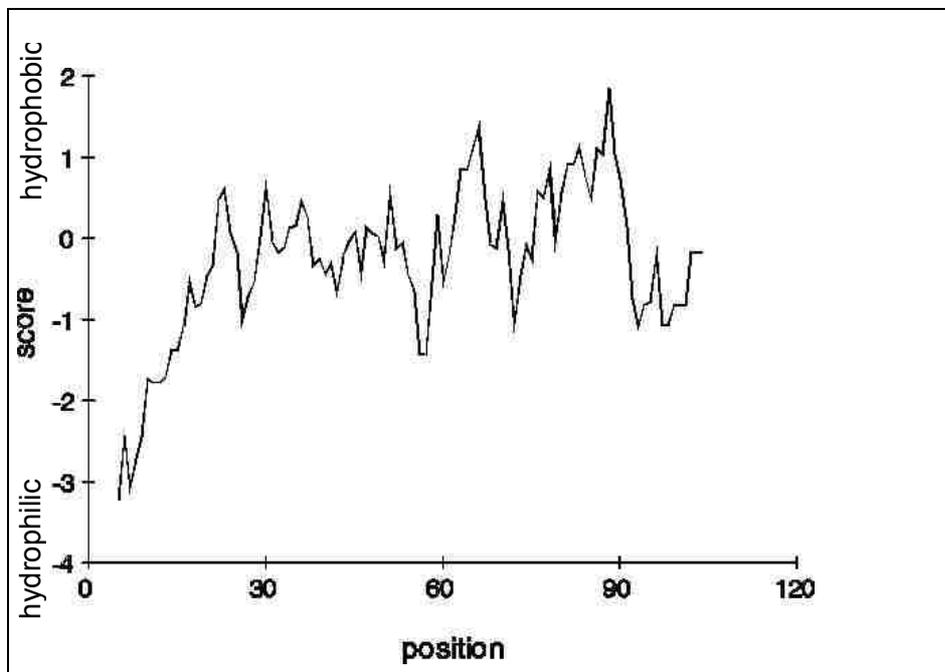


Abbildung 2.5: Aminosäuren werden der hydrophoben Gruppe zugeordnet, wenn die Hydrophobizität größer oder gleich 0.7 ist, und der hydrophilen Gruppe, falls die Hydrophobizität kleiner als -2.4 ist. Bei der in WebLab Viewer verwendeten Hydrophobizität-Skala handelt es sich um die Kyte-Doolittle scale [Kyte & Doolittle, 1982].

2.1.4 Signaltransduktion von BMP-2

Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs) sowie andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie gehen Bindungen mit spezifischen heteromeren Komplexen zweier Rezeptortypen I und II ein [Kawabata et al., 1998; Massague J, 1998]. Es handelt sich um einzelne Transmembranproteine mit einer cysteinreichen extrazellulären Domäne und einem intrazellulären Anteil mit einer Serin/Threonin-Kinase-Domäne (s. Abbildung 2.6).

Der Mechanismus der TGF- β -Superfamilie-Rezeptoraktivierung wurde für TGF- β charakterisiert und läuft in ähnlicher Weise für die BMP-Proteine ab [Wrana et al., 1994]. Nach Bildung des ligandeninduzierten heteromeren Komplexes phosphoryliert die aktive Typ-II-Kinase den Typ-I-Rezeptor an besonderen Serin- und Threonin-Resten in der GS-Domäne. Der Typ-I-Rezeptor ist ein Typ-II-Kinasesubstrat und wirkt damit als „downstream“ des Typ-II-Rezeptors. Übereinstimmend mit dieser Vorstellung ist die Tatsache, dass der Typ-I-Rezeptor die Signalspezifität im Rezeptorkomplex bestimmt [Carcamo et al., 1994]. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor initiiert die intrazelluläre Signaltransduktion durch Phosphorylierung von spezifischen Proteinen einschließlich der Smad-Proteine [Kawabata et al., 1998; Massague J, 1998]. Bezüglich der Struktur und Funktion wird die Smad-Proteinfamilie in drei Kategorien unterteilt [Kawabata et al., 1998; Massague J, 1998]: (i) rezeptorregulierende Smads (R-Smads), die durch aktivierte Typ I-Rezeptoren phosphoryliert werden. Dazu gehören Smad1, 2, 3, 5 und 8, (ii) allgemein Vermittler Smads (Co-Smads) wie Smad4, die heteromere Komplexe mit aktivierten R-Smads bilden und (iii) Inhibitor-Smads (I-Smads) wie Smad6 und Smad7, die mit R-Smads für die Wechselwirkung mit dem aktivierten Typ-I-Rezeptor konkurrieren und eine mögliche Signalübertragung hemmen, indem Ubiquitinligasen zum Typ-I-Rezeptor rekrutieren, womit die Funktionsfähigkeit der Rezeptoren ausfällt. Während BMP-Rezeptoren die Phosphorylierung von Smad1, Smad5 und Smad8 induzieren, fördern Activin- und TGF- β -Typ-I-Rezeptoren die Phosphorylierung von Smad3 und Smad4. R-Smad und Co-Smads teilen sich zwei Regionen höherer Ähnlichkeit an Amino- und Carboxyterminalenden, die jeweils als MH1- (Mad homology-1) und MH2-Domänen bezeichnet werden. I-Smads haben eine MH2-Domäne, aber ihre N-terminalen Regionen zeigen nur eine geringe Ähnlichkeit zur MH1-Domäne. Bislang sind acht Smads-Mitglieder im humanen Genom charakterisiert [Venter et al., 2001].

Nach Aktivierung durch den Typ-I-Rezeptor, akkumulieren R-Smad/Smad4-Komplexe im Zellkern, indem sie an der Regulierung der Zielgene teilnehmen [Kawabata et al., 1998; Massague J, 1998]. Die direkte Bindung der R-Smads und Co-Smads (außer Smad2) zur DNA wird durch ihre MH1-Domänen ermöglicht. BMP-spezifische R-Smads interagieren mit GC-reichhaltigen Sequenzen. Eine effiziente BMP-induzierte Aktivierung der Id1-Promoter erfordert die Kooperation von drei bestimmten Sequenzelementen, d.h. SBE (Smad binding elements), GGCG und CAGC [Ishida et al., 2000]. Nach Bindung an die DNA findet die Transkriptionsaktivierung der R-Smads durch ihre MH2-Domänen statt, die Co-Aktivatoren rekrutieren können.

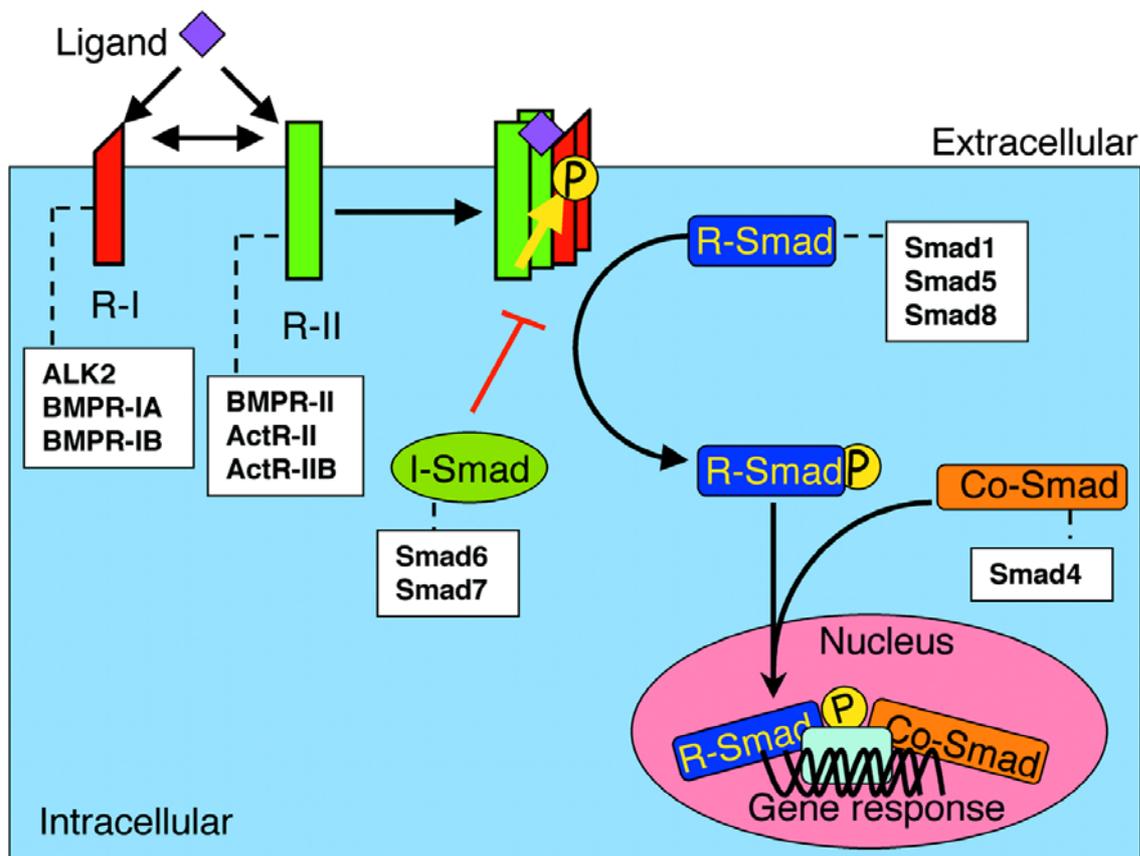


Abbildung 2.6: Schematische englischsprachige Darstellung der Signaltransduktion durch BMP-Rezeptoren einer Zelle [ten Dijke et al., 2003]. Nach Oligomerisierung der BMP-induzierten Typ-I/Typ-II-Rezeptoren, phosphoryliert die aktive Typ-II-Rezeptorkinase den Typ-I-Rezeptor in seiner Glycin/Serin-Domäne. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor phosphoryliert die R-Smads (Smad1, Smad5 oder Smad8), die einen heteromeren Komplex mit Co-Smad (Smad4) bilden. Die heteromeren Smad-Komplexe werden in den Zellkern überführt, wobei sie direkt oder durch Transkriptionspartner an spezifischen DNA-Sequenzen in den Promoterregionen der Zielgene binden und ihre Transkription regulieren können.

2.2 Proteinadsorption

2.2.1 Grundlagen der Proteinadsorption

Von Adsorption wird beim Prozess der Anlagerung von gelösten oder gasförmigen Substanzen an Phasengrenzflächen gesprochen. Die Bindung, die zwischen Adsorptiv und Adsorbens entsteht, ist nicht kovalent. Da eine Adsorption nur stattfindet, wenn die Freie Enthalpie G des Systems abnimmt, ist die Art der gebildeten Bindungen des Adsorptivs und des Adsorbens und die entsprechenden Bindungsenergien von Interesse.

Bei der Adsorption von Proteinen an Festkörperoberflächen handelt es sich in den meisten Fällen um eine Physisorption (Adsorptionenthalpie < 50 kJ/mol), die durch folgende Wechselwirkungen entstehen kann:

- (i) Wasserstoffbrückenbindungen, die sich zwischen partial positiv geladenen Wasserstoffatomen und partial negativ geladenen Heteroatomen ausbilden. Die Bindungsenergien liegen im Bereich von 4 kJ/mol.
- (ii) Ionische Wechselwirkungen, die zwischen geladenen Gruppen an der Grenzfläche und geladenen Aminosäureresten auftreten. Die Bindungsenergien liegen hier bei 4 kJ/mol.
- (iii) Hydrophobe Wechselwirkungen, die durch Verdrängung der strukturierten Wasserschicht eines Proteins bei Kontakt mit der hydrophoben Oberfläche entstehen. Diese sind starke Wechselwirkungen mit einer Bindungsenergie von bis zu 10 kJ/mol.
- (iv) Van der Waals'sche Wechselwirkungen, deren Bindungsenergien bei bis zu 4 kJ/mol liegen.
- (v) „Charge-transfer“-Wechselwirkungen.

Bei der Chemisorption handelt es sich um eine kovalente Bindung zwischen den Reaktionspartnern. Eine der oben genannten Wechselwirkungen der Physisorption wird vorausgesetzt, damit in einem weiteren Schritt Chemisorption erfolgt.

2.2.2 Adsorptions- und Desorptionsisothermen

Für eine thermodynamische Betrachtung der Adsorption eines Proteins auf einer Oberfläche ist die Aufnahme einer Gleichgewichts-Adsorptionsisotherme von entscheidender Bedeutung, da aus dieser die Bestimmung der Gleichgewichts-Adsorptionskonstanten möglich ist. Aus dieser Konstanten ließe sich theoretisch die Enthalpie und Entropie der Adsorption berechnen.

Zur Auswertung einer Adsorptionsisotherme wird die adsorbierte Proteinmenge im Gleichgewicht als Funktion der Gleichgewichtskonzentration des Proteins in der Bulkphase aufgenommen. Durch Variation der das Gleichgewicht beeinflussenden Parameter wie pH-Wert, Ionenstärke, Ladung oder Art der Oberfläche kann mittels der Isotherme festgestellt werden, welche der oben genannten Wechselwirkungen bei der Adsorption eine Rolle spielen. Die Adsorption von Proteinen an Festkörperoberflächen kann unter Bildung von Monolagenschichten oder Mehrlagenschichten ablaufen. In der vorliegenden Arbeit soll die Darstellung der Modelle auf diejenigen zur Monolagenschichtung beschränkt werden.

2.2.2.1 Isothermen nach Langmuir

Langmuir [Langmuir, 1940] ging bei der Beschreibung der klassischen hyperbolischen Adsorptionsisotherme von folgenden Annahmen aus:

- (i) Die Adsorption ist reversibel. Es stellt sich ein Gleichgewicht ein.
- (ii) Jede Bindungsstelle kann nur ein Molekül binden.
- (iii) Die Adsorptionenthalpie aller Bindungsstellen ist gleich und bleibt bei der Adsorption unverändert.
- (iv) Es treten keine Wechselwirkungen mit anderen adsorbierten Proteinen auf.

Unter diesen Voraussetzungen kann man folgende Gleichung für die Adsorption von Proteinen an einer Oberfläche aufstellen:

$$a = \frac{a_0 c}{K_d + c} \quad (1)$$

a entspricht der Konzentration der besetzten Bindungsstellen. K_d entspricht der Gleichgewichtskonstanten. c ist die Konzentration des Proteins in Lösung. a_0 entspricht der Gesamtkonzentration der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche.

a_0 und K_d lassen sich durch die doppelt-reziproke Auftragung von $1/c$ gegen $1/a$ graphisch ermitteln. Die aus der reziproken Auftragung resultierende Gerade besitzt die Steigung K_d/a_0 und den y-Achsenabschnitt $1/a_0$.

2.2.2.2 Isothermen nach Freundlich

Wenn die Bindungsplätze nicht unabhängig voneinander sind, ist eine Anpassung der Daten mit dem Langmuirmodell nicht möglich. Bei einer Wechselwirkung der an der Oberfläche gebundenen Moleküle mit neu adsorbierenden Molekülen werden die Adsorptionseigenschaften verändert. Man spricht von einem kooperativen Prozeß [Jennissen & Botzet, 1979]. Ein positiv-kooperativer Prozess liegt vor, wenn die Affinität eines Adsorptivs zur Oberfläche mit steigender Konzentration auf der Oberfläche zunimmt. Eine Abnahme der Affinität mit zunehmender Oberflächenkonzentration wird als negativ-kooperativer Prozess bezeichnet [Jennissen, 1976]. Diese Wechselwirkungen führen zu vom Langmuirmodell abweichenden Adsorptionseigenschaften.

Die von Freundlich [Freundlich, 1907] aufgestellte mathematische Beziehung beinhaltet diese Abweichung.

$$a = \alpha c^{1/n_F} \quad (2)$$

In dieser Formel entspricht a den besetzten Bindungsstellen, α dem Adsorptionskoeffizienten, c der Gleichgewichtskonzentration des Proteins in Lösung und $1/n_F$ dem Freundlichschen Adsorptionsexponenten. Die Gleichung kann durch Umformung in einen doppeltlogarithmischen Ausdruck linearisiert werden. Daraus können die Unbekannten graphisch ermittelt werden.

2.2.2.3 Isothermen nach Temkin

Mit der Temkinschen Isotherme [Temkin & Pyzhev, 1940] können Adsorptionen beschrieben werden, bei denen die Affinität der Proteine linear mit der Belegung der Oberfläche abnimmt. Dies kann durch Repulsionskräfte oder durch Heterogenität der Oberfläche entstehen [Hayward & Trapnell, 1964]. Der Tempkin-Isotherme liegt folgenden Gleichung zugrunde:

$$a = \varphi \ln(\vartheta c) \quad (3)$$

Hierbei entspricht a den besetzten Bindungsstellen, c der Gleichgewichtskonzentration der Moleküle in Lösung und φ und ϑ den Konstanten der Desorption und Adsorption. Bei Auftragung von a gegen $\ln(c)$ erhält man eine Gerade.

2.2.2.4 Die Gitterstellenbindungs- und Ligandenbindungsfunktion

Bisher existiert kein allgemeines Modell zur Adsorption nativer Proteine auf Grenzflächen. Daher ist es notwendig, Oberflächen herzustellen, auf denen sowohl die Anzahl reagierender Haftstellen (Valenzen) als auch die Anzahl von Wechselwirkungen pro Proteinmolekül (Haftstellen) kontrolliert untersucht werden können. Aus solchen Untersuchungen lassen sich Rückschlüsse auf die Oberflächentopographie des Proteins ziehen. Das Adsorptionsverhalten von Proteinen im Gegensatz zu künstlichen Polymeren wird dadurch begünstigt, dass Proteine leicht in homogener Lösung und damit monodispers zu erhalten sind.

Adsorptionsisothermen an gezielt modifizierten Oberflächen können nach Jennissen [Jennissen, 1981; Jennissen, 1988] in zwei Gruppen eingeteilt werden:

(i) Die Gitterstellenbindungsfunktion, die wie die Ligandenbindungsfunktion mit der Hill-Gleichung beschrieben werden kann. Hierbei wird das Protein als Adsorbens betrachtet und die Festkörperoberfläche, auf der das Protein adsorbiert ist, als Adsorptiv. Die Proteinkonzentration wird in der Gitterstellenbindungsfunktion konstant gehalten und die Konzentration der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche variiert. Die Gitterstellenbindungsfunktion ist [Jennissen, 1988]:

$$\frac{\Theta_1}{1 - \Theta_1} = K_{H1} (\Gamma_r^S)^{n_{H1}} \quad (4)$$

$\Theta = a/a_0$ entspricht der fraktionellen Sättigung. a ist die adsorbierte Proteinmenge, a_0 die adsorbierte Proteinmenge bei maximaler Sättigung. K_{H1} ist die Hill-Konstante, n_H der Hill-Koeffizient und Γ_r^S entspricht der Konzentration der oberflächengebundenen Substituenten. Bei einer monovalenten Adsorption wird $n_H = 1$ und die Gleichung geht in eine hyperbolische Isotherme des Langmuir-Typs über [Jennissen, 1976]. Bei einem Hill-Koeffizienten größer als eins entsteht eine sigmoide Isotherme, die einen Hinweis auf das Vorliegen eines positiv-kooperativen Prozesses gibt. In diesem Fall tritt eine multivalente Adsorption auf.

(ii) Die Ligandenbindungsfunktion kann als klassischer Typ einer Adsorptionsisotherme bezeichnet werden. Bei konstanter Gitterstellenkonzentration wird die freie Konzentration des Proteins in Lösung variiert. Die Ligandenbindungsfunktion ist [Jennissen, 1988]:

$$\frac{\Theta_2}{1 - \Theta_2} = K_{H2} [C_p]^{n_{H2}} \quad (5)$$

C_p ist die freie Proteinkonzentration. Bei $n_H = 1$ geht diese Isotherme in eine Langmuir-Isotherme über. Ein Hinweis auf das Vorliegen eines negativ-kooperativen Prozesses erhält man, wenn $n_H < 1$ ist. Die Isotherme geht dann in eine Isotherme des Freundlich- oder Temkin-Typs über. Dies kann durch eine sättigungsabhängige Abnahme der Bindungsstellenanzahl oder durch eine intermolekulare Abstoßung der Proteinmoleküle hervorgerufen sein.

Ein positiv-kooperativer Prozess, hervorgerufen durch intermolekulare Anziehung der adsorbierten Proteinmoleküle kann vorliegen, wenn $n_H > 1$ ist [Jennissen, 1989].

Es besteht außerdem ein Zusammenhang zwischen der Hill-Gleichung und der Gleichung von Freundlich [Jennissen, unveröffentlicht]. Die Hill-Gleichung lautet:

$$a = K_H (a_0 - a) c^{n_H} \quad (6)$$

wobei n_H dem Hill-Koeffizienten entspricht. Für $a \ll a_0$ entspricht das Produkt aus der Hill-Konstanten K_H und der Gleichgewichtskonzentration c dem Adsorptionskoeffizienten α aus der Gleichung für die Freundlich-Isotherme (s. Gleichung 2).

2.2.2.5 Adsorptionshysterese

Ein anderes Merkmal der Proteinadsorption außer der bereits besprochenen Kooperativität ist die Hysterese. Die Hysterese ist ein Ausdruck der thermodynamischen Irreversibilität der Adsorption und des Fehlens eines Gleichgewichtsüberganges. Bei der Bestimmung der Adsorptions- und Desorptionsisothermen wurde festgestellt, dass sie nicht aufeinander liegen, sondern dass sie zu einer geschlossenen Scheife verbunden werden konnten [Jennissen & Botzet, 1979]. Der Grund für die Hysterese konnte durch eine oberflächendynamische Hypothese erklärt werden. Nach diesem Modell sind die Hystereseschleifen auf Konformationsänderungen oder Reorientierungsvorgänge des Proteins auf der Oberfläche zurückzuführen, die über Sekundärreaktionen zu einer Erhöhung der Anzahl mit dem Protein reagierender Reste führen. Diese Vorgänge könnten zu metastabilen Konformationen und Orientierungen des Proteins auf der Oberfläche führen [Jennissen, 1984; Jennissen, 1985]. Da es sich bei den Adsorptions- und Desorptionsgleichgewichten nicht um echte Gleichgewichte, sondern wahrscheinlich um langlebige, metastabile Zustände handelt, wurde der Begriff der „apparenten Gleichgewichte“ verwendet [Jennissen, 1985; Neumann, 1973].

Nach dem zweiten thermodynamischen Hauptsatz laufen nur die Reaktionen spontan ab, die mit einer Entropiezunahme verbunden sind. Dabei besteht die Entropie aus einer Summe von zwei Komponenten, der reversiblen (Austausch mit der Umgebung) und der irreversiblen (im System) Entropie. Alle spontan ablaufenden Prozesse sind irreversibel. Bei einem Gleichgewichtsübergang tritt die irreversible Entropie nicht mehr in Erscheinung. Wenn die Übergänge bei einer Reaktion unter Gleichgewichtsbedingungen nicht mit der Gleichgewichts-Übergangslinie zusammenfallen, liegt kein Gleichgewichtsübergang vor. Das ist z. B. der Fall bei der Adsorptionshysterese von Gasen oder auch von Proteinen [Everett, 1967].

2.2.3 Adsorptions- und Desorptionskinetiken

Betrachtet man eine Adsorption auf der Oberfläche unter der Voraussetzung, dass zwischen den adsorbierenden Molekülen keine Wechselwirkungen vor und während der Adsorption stattfinden und dass die Bindungsplätze unabhängig voneinander sind, läßt sich folgende Gleichung für die Geschwindigkeit der Adsorption aufstellen [Corsel et al., 1986]:

$$\frac{d}{dt}\Gamma(t) = k_{\text{on}}(\Gamma_{\text{max}} - \Gamma(t))C(0, t) - k_{\text{off}}\Gamma(t) \quad (7)$$

$\Gamma(t)$ ist die Menge des adsorbierten Proteins pro Fläche zur Zeit t und Γ_{max} der Wert der maximalen Oberflächenbelegung. k_{on} und k_{off} sind die interaktionsabhängigen Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Adsorptionsreaktion. Die interaktionsabhängigen Konstanten wurden eingeführt, da häufig bei Proteinadsorptionen Wechselwirkungen beobachtet wurden, die zu einem nicht mit einer Langmuir-Isotherme beschreibbaren Verhalten führen. Um diese Wechselwirkungen von Molekülen während der Adsorption und Desorption zu berücksichtigen, wurde angenommen, daß sich die Konstanten k_{on} und k_{off} exponentiell mit der Belegung der Oberfläche ändern können. Die Veränderung der interaktionsabhängigen Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten mit der Oberflächenkonzentration bezeichnet man als negative oder positive Kooperativität. Der exponentielle Zusammenhang läßt sich über folgende Gleichung darstellen:

$$\begin{aligned} k_{\text{on}} &= k_1 e^{-\alpha\Gamma} \\ k_{\text{off}} &= k_{-1} e^{\beta\Gamma} \end{aligned} \quad (8)$$

k_1 und k_{-1} entsprechen den Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption bzw. der Desorption. Bei α und β handelt es sich um sogenannte Kooperativitäts- oder auch Interaktionskonstanten.

Die Konstanten k_{on} und k_{off} können außerdem vom Massentransport der Proteine zur Oberfläche limitiert bzw. beeinflusst werden. Deshalb führten Corsel et al. die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption und Desorption $k_{\text{on}}^{\text{app}}$ und $k_{\text{off}}^{\text{app}}$ ein. Damit ergibt sich für Gleichung (7) folgende Form:

$$\frac{d}{dt}\Gamma(t) = k_{\text{on}}^{\text{app}}(\Gamma_{\text{max}} - \Gamma(t))C(0,t) - k_{\text{off}}^{\text{app}}\Gamma(t) \quad (9)$$

Für Desorptionskinetiken [Corsel et al., 1986; Jennissen, 1986; Jennissen & Zumbrink, 2004] gilt: $C(0,t) \approx 0$, C_0 ist die Konzentration der freien Proteinmoleküle in der Bulkphase. Daraus folgt, daß [Corsel et al., 1986]

$$\frac{d}{dt}\Gamma(t) = -k_{\text{off}}\Gamma(t) \quad (10)$$

wird. Die Lösung dieser Differentialgleichung ist eine einfache exponentielle Zerfallsgleichung [Huetz et al., 1995]:

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 \exp^{-t/\tau} + P \quad (11)$$

$\Gamma(t)$ ist die adsorbierte Menge zum Zeitpunkt t , Γ_0 die adsorbierte Proteinmenge im Gleichgewicht der Adsorption. $1/\tau$ ist die Desorptionsgeschwindigkeitskonstante des Systems, die die Einheit $1/s$ hat und somit einer Relaxationszeit entspricht. P ist der Grenzwert der Desorption. Unter Bedingungen völliger Reversibilität wird $P = 0$.

Unter der Voraussetzung, daß bei der Desorption das Protein aus der Metalloberfläche freigesetzt wird ohne resorbiert zu werden, kann folgende Funktion zur mathematischen Auswertung verschiedener Bindungsstellen verwendet werden [Huetz et al., 1995]:

$$\Gamma(t) = \sum_{i=0}^n \Gamma_i \exp^{-t/\tau_i} + P_i \quad (12)$$

Es wird in diesem Fall für jede Bindungsstelle davon ausgegangen, daß die Desorption als Reaktion erster Ordnung betrachtet werden kann.

Die Anpassung der gemessenen Desorptionskinetiken an Gleichung (11) erfolgte mit Hilfe des PC-Programmes „GraphPad-Prism Version 4.0“ bzw. „OriginPro7.0“.

2.2.4 Hydrophobe Adsorption und Ionenaustausch

Hydrophobe Adsorption

Bevor das Prinzip der hydrophoben Adsorption von Proteinen erörtert wird, ist es sinnvoll, die außerordentliche Bedeutsamkeit der hydrophoben Wechselwirkungen in biologischen Systemen in einigen Beispielen darzustellen.

Hydrophobe Wechselwirkungen spielen eine große Rolle in der Stabilisierung einer Proteinkonformation, in der Assoziation kleiner Proteinuntereinheiten, in der Selbstassoziation der Phospholipide zur Ausbildung einer doppelschichtigen biologischen Membran, in der Bindung kleiner Moleküle an Proteine wie z. B. in der enzymatischen Katalyse, in der Erkennung von Steroid- oder Peptidhormonen durch ihre Rezeptoren, in der Regulation und im Transport durch Oberflächen.

Proteine können an Festkörperoberflächen durch hydrophobe Wechselwirkungen adsorbiert werden. Bei den hydrophoben Wechselwirkungen handelt es sich um starke, nicht-kovalente Kräfte mit einer Bindungsenergie von bis zu 10 kJ/mol, die die unpolaren Bereiche der Moleküle zusammenhalten. Die Stärke hydrophober Wechselwirkungen ist nicht auf eine tatsächlich vorhandene Anziehung zwischen unpolaren Teilchen zurückzuführen. Sie ist vorwiegend die Folge einer entropiegetriebenen Anziehung zwischen unpolaren Gruppen in Wasser. Die Anzahl ungeordneter Wassermoleküle, die zur Umgebung hydrophober Bereiche der gelösten Moleküle erforderlich sind, steigt, und das hat eine Entropiezunahme zur Folge [Jennissen, 2000a]. Die Änderung der Freien Enthalpie beim Auflösen eines unpolaren Stoffs in Wasser ist daher ungünstig: $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$. Unter der Bedingung $\Delta H \ll T \Delta S$, ist die Gibbs Freie Energie negativ ($-\Delta G \approx T \Delta S$) und daraus folgt eine entropiegetriebene Reaktion.

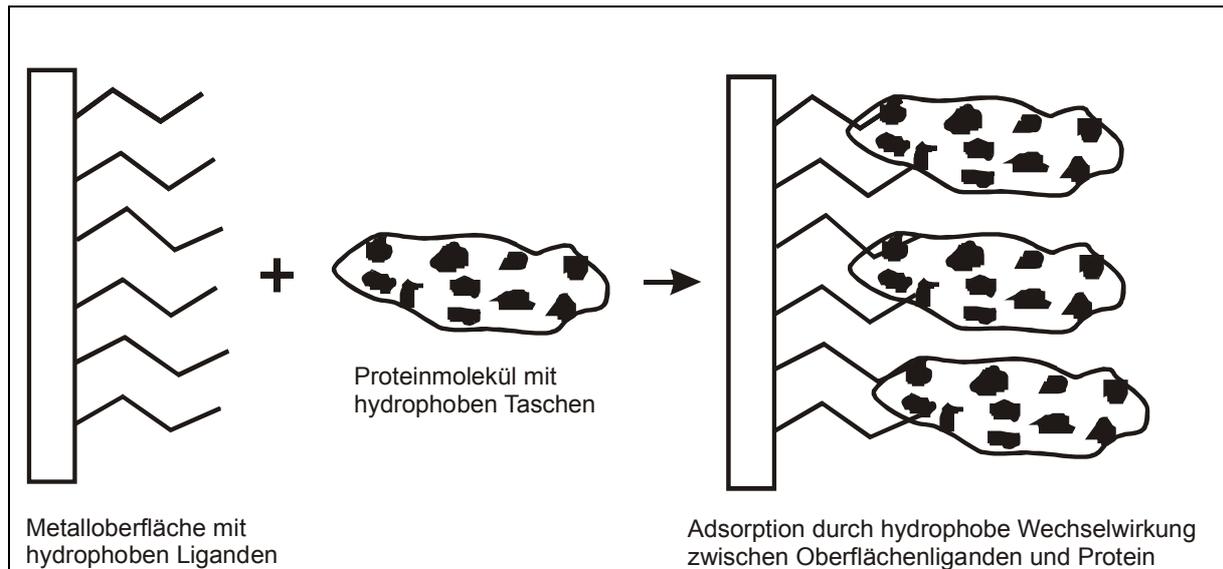


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung hydrophober Wechselwirkungen zwischen Protein und modifizierter Metalloberfläche mit hydrophoben Liganden. Dabei handelt es sich um starke, nicht-kovalente Kräfte mit einer Bindungsenergie von bis zu 10 kJ/mol, die die unpolaren Bereiche der Proteinmoleküle (schwarze Areale) zusammenhalten.

Die chromatographische Aufreinigung von Proteinen mittels hydrophober Wechselwirkungen wurde seit Anfang der 70er Jahre in Parallelstudien aufgestellt. Wichtige Kriterien für eine optimale chromatographische Proteinaufreinigung hängen mit folgenden Parametern zusammen [Jennissen, 2000a]:

- (i) der stationären Phase: sie soll extrem hydrophil und möglichst inert sein,
- (ii) der Kettenlänge der immobilisierten Alkylreste: sie soll variiert werden, damit die höchste Bindungsstärke des Proteins erreicht wird,
- (iii) der Oberflächenkonzentration der immobilisierten Alkylreste: Eine kritische Oberflächenkonzentration hydrophober Alkylreste am Gel soll vorhanden sein. Die Multivalenz zeigt die kooperative Wechselwirkung mehrerer immobilisierter Alkylreste mit dem Protein. Die Adsorptionshysterese im Falle einer multivalenten Proteinbindung entsteht durch das Zurückbleiben der Desorptionsisotherme im Vergleich zur Adsorptionsisotherme wegen der Zunahme der Bindungsaffinität nach Adsorption des Proteins.
- (iv) dem Salzeffekt: die Salzkonzentrationsvariation und die Auswahl der Ionenart (z.B. chaotropische Ionen) spielen eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung mit den Wassermolekülen und in den daraus resultierenden hydrophoben Kräften.

Ionenaustausch

Eine andere Art reversibler Wechselwirkungen, die zwischen einem geladenen Protein und einem chromatographischen Medium mit Gegenladung vorhanden ist und den Aufreinigungstechniken für Proteine zunutze kommt, ist die Ionenaustausch-Chromatographie (Amersham Pharmacia Biotech, Ion Exchange, Principles and Methods).

Die Oberflächenladung der Proteine variiert je nach pH-Wert in der Umgebung. Wenn dieser oberhalb des isoelektrischen Punktes (pI) des Proteins liegt, bindet das Protein an einem Anionenaustauscher, wenn es unterhalb seines pI liegt, bindet es an einem Kationenaustauscher. Der Ionenaustausch kann bei unterschiedlichen pH-Werten wiederholt werden, um mehrere Proteine mit unterschiedlichen Ladungseigenschaften aufzutrennen.

2.3 Modifikationsreaktionen an Oberflächen

2.3.1 Additive und subtraktive Säureätzverfahren

Elektrolytisches Polieren

Das elektrolytische Polieren gehört in der metallographischen Praxis zu den gebräuchlichsten Präparationsmethoden. Beim elektrolytischen Polieren, auch anodisches Polieren oder Elektropolieren genannt, wird die Einebnung durch anodische Auflösung der Schliifffläche in einer elektrolytischen Zelle erreicht [Petzow, G., 1976d]. In der Abbildung 2.8 ist eine einfache elektrolytische Zelle schematisch dargestellt. Die Anordnung von Anode (Probe) zu Kathode kann den jeweiligen Erfordernissen angepasst werden.

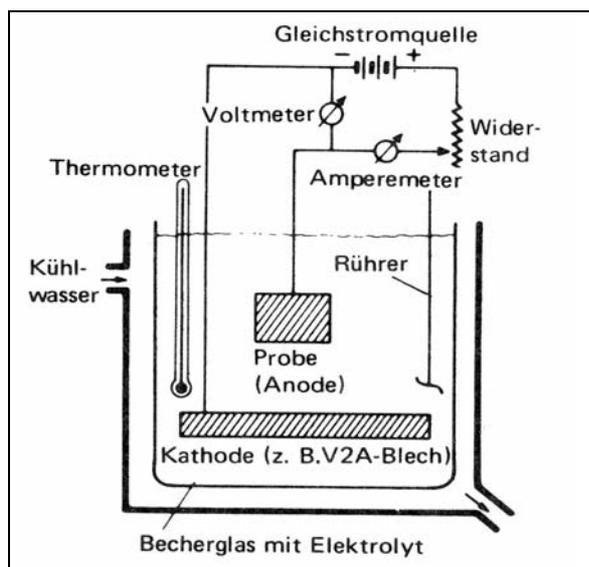


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung einer Elektropolierzelle in Serienschaltung [Petzow, G., 1976c]. Die Anordnung der Anode (Probe) zu Kathode kann je nach Metall angepasst werden. Die Elektrolyte enthalten oft Phosphor-, Schwefel- und Perchlorsäure, gemischt mit ionisierenden Flüssigkeiten und viskositätserhöhenden Zusätzen.

Die Elektrolyte, die zum anodischen Polieren Verwendung finden, enthalten oft Phosphor-, Schwefel- und Perchlorsäure, gemischt mit ionisierenden Flüssigkeiten, wie Wasser, Essigsäure oder Alkohol und viskositätserhöhenden Zusätzen wie Glycerin, Butylglycol, Harnstoff. Bei Metallen, die lösliche Hydroxidkomplexe bilden, werden alkalische und bei

Metallen, die lösliche Cyanidkomplexe bilden, werden cyanalische Bäder verwendet. Während die meisten Elektrolyte unter Beachtung der beim Umgang mit aggressiven Chemikalien üblichen Vorsichtsmaßnahmen ungefährlich sind, neigen die vielfach verwendeten Perchlorsäuremischungen zur Explosion.

Zur Makro- (Gefügeentwicklung für die Betrachtung mit bloßem Auge oder mit Lupenvergrößerung bis zu etwa 50 x) und Mikroätzung (Gefügeentwicklung für mikroskopische Betrachtungen meistens Vergrößerungen über 50 x) von Metallen und Metalllegierungen werden Elektrolyte mit verschiedenen Rezepturen unter variierten Bedingungen verwendet.

Bei gegebener Elektrolyt-Probenmaterial-Kombination wird der Poliervorgang von folgenden Faktoren beeinflusst: Stromdichte (A/cm^2) und Spannung (V), Elektrodenabstand, Größenverhältnis von Kathode zu Anode, Ausgangszustand der Anodenfläche, Polierzeit, Elektrolyttemperatur, Elektrolytbewegung und Elektrolytkonzentration [Petzow, G., 1976b]. Der Ausgangszustand der Anodenfläche (Schlifffläche) wirkt sich auf die Polierzeit aus. Im allgemeinen ist die Polierzeit umso kürzer, je feiner die Schlifffläche vorbereitet und je höher die Stromdichte ist. Die Anwendung des Elektropolierens setzt eine elektrische Leitfähigkeit des zu polierenden Materials voraus, wie sie bei allen Metallen und Legierungen, aber auch bei vielen nichtmetallischen Substanzen, wie z.B. Karbiden und Graphit vorhanden ist. Alle homogenen Metalle und Legierungen lassen sich prinzipiell einwandfrei elektropolieren. Heterogene Legierungen sind infolge der elektrochemischen Potentialunterschiede zwischen den Phasen von vornherein weniger für eine anodische Polierbehandlung geeignet.

Elektrolytische Zellen liefern mit Hilfe einer geeigneten Schaltung die in Abbildung 2.9 idealisiert dargestellte Abhängigkeit der Stromdichte von der angelegten Spannung. Die Stromdichte-Spannungskurve enthält vier charakteristische Kurvenabschnitte:

Zwischen A und B geht das Anodenmaterial direkt in Lösung. An der Anodenfläche bildet sich dabei eine flüssige Schicht aus, die eine höhere Metallkonzentration als das Elektrolyttinnere aufweist. Der Kurvenast A-B ist entscheidend für das elektrolytische Ätzen.

Als Ursache für den Abfall der Stromdichte zwischen B und C wird die Bildung einer dünnen Schicht aus Reaktionsprodukten also eine Passivierung angenommen.

Zwischen C und D erfolgt das eigentliche Polieren, das durch ein Zusammenwirken von Diffusions- und elektrochemischen Vorgängen bestimmt wird.

Zwischen D und E setzt Sauerstoffentwicklung ein. Die Bildungsgeschwindigkeit des Sauerstoffs ist anfangs gering und die Verweilzeit der Gasblasen an der Anodenfläche relativ groß. Dadurch wird der Poliervorgang gestört, was zu einer Grübchenbildung führt. Mit zunehmender Spannung wird die Bildungsgeschwindigkeit des Sauerstoffs größer und die Verweilzeit kleiner, so dass keine Blasen mehr an der Anodenfläche haften bleiben.

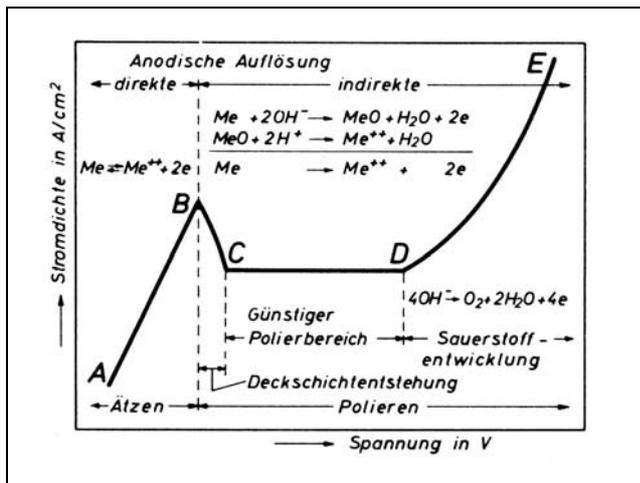


Abbildung 2.9: Idealisierte Stromdichte-Spannungskurve [Petzow, G., 1976b]. Die einzelnen Vorgänge wie Passivierung und Polieren werden im Text beschrieben.

Anodisches Polieren wird von Punkt B der Stromdichte-Spannungskurve ab beobachtet, wobei jedoch nur zwischen C und D keine Überlagerungen mit anderen Erscheinungen (Passivierungsschichtbildung und Sauerstoffentwicklung) vorkommen. Es ist deshalb einleuchtend, dass die meisten metallographischen Polierrezepte dem horizontalen Kurvenast C-D entsprechen. Im Kurvenast D-E wird nur gelegentlich, meistens bei der Anwendung des Elektropolierens in der industriellen Fertigung (anodisches Glänzen), gearbeitet.

Die in der schematischen Stromdichte-Spannungskurve der Abbildung 2.9 erhaltenen Kurvenabschnitte sind in den Realkurven keineswegs immer deutlich ausgeprägt. Für Elektrolyte mit starkem elektrischem Eigenwiderstand ist die Differenzierung in einzelne Ausschnitte gar nicht möglich.

Ätzen [Petzow, G., 1976a]

Nach dem Endpolieren ist der Anschliff nur dann zur makroskopischen bzw. mikroskopischen Gefügebeobachtung geeignet, wenn sich die Gefügebestandteile bereits zu erkennen geben.

Das trifft jedoch nur zu, wenn die Gefügebestandteile das Licht mit verschiedener Intensität reflektieren, wobei der Unterschied im Reflexionsvermögen mindestens 10 % betragen muss. Im allgemeinen zeigt eine fertigpolierte Schliifffläche kein Gefüge, da das auffallende Licht nahezu gleichmäßig reflektiert wird. Die geringen Reflexionsunterschiede zwischen den Gefügebestandteilen liegen unter der Wahrnehmbarkeitsgrenze des menschlichen Auges. Somit muss das Gefüge in der Regel zur Sichtbarmachung kontrastiert werden. Für diese Kontrastierung hat sich in der metallographischen Präparationstechnik der Begriff „Ätzen“ eingebürgert, obwohl es sich nicht immer um Ätzwvorgänge (Lösungsvorgänge, bei dem Teile der Oberfläche stärker angegriffen werden als andere) im eigentlichen Sinne handelt.

Die Möglichkeiten zur Gefügekcontrastierung sind zahlreich und ganz verschiedenartig. Je nachdem, ob die Kontrastierung ohne oder mit einer Verdrängung der polierten Schliifffläche vorgenommen wird, unterscheidet man zwischen „optischen“ oder „elektrochemischen“ (chemische) bzw. „physikalischen“ Ätzmethode. Da für die vorliegende Arbeit das „elektrochemische Ätzen“ metallischer Werkstoffe von besonderem Interesse ist, wird darauf ausführlich eingegangen.

Das „optische Ätzen“ beruht auf der Anwendung spezieller Beleuchtungsverfahren, die alle das Prinzip des Köhlerschen Strahlenganges beibehalten.

Zum „physikalischen Ätzen“ gehören das Ionenätzen, auch kathodische Zerstäubung genannt, wobei der Kontrast durch Austritt von Atomen aus der Schliiffoberfläche erreicht wird und das thermische Ätzen, das auf dem Austritt von Atomen aus der Oberfläche infolge thermischer Energiezufuhr beruht.

Beim „elektrochemischen Ätzen“, oft auch als „chemisches Ätzen“ bezeichnet, laufen elektrochemische Vorgänge (Reduktions-Oxidationsprozesse/Redoxprozesse) ab. Im Kontakt mit Lösungen haben alle Metalle ein verschieden starkes Bestreben, unter Abgabe von Elektronen in den ionisierten Zustand überzugehen. Erfasst man die Stärke dieser Reaktion durch eine elektrochemische Potentialmessung, wobei das Potential des Metalls gegen das Eigenpotential einer Normalelektrode gemessen wird, so ergibt sich die elektrochemische Spannungsreihe der Elemente:

Li, Na, K, Ca, Ba, Be, Mg, Al, Mn, Zn, Cr, Cd, Tl, Co, Ni, Pb, Fe, H, Sn, Sb, Bi, As, Cu, Ag, Hg, Au, Pt.

Die Elemente sind nach abnehmender Stärke ihrer Elektroaffinität geordnet. Alle Elemente, die hier vor dem Wasserstoff eingeordnet sind, werden demzufolge von Säuren unter H₂-

Entwicklung angegriffen. Stehen sie hinter dem Wasserstoff, so ist ein Angriff durch Säuren ohne Zusatz von Oxidationsmitteln nicht möglich. Das elektrochemische Ätzen ist in gewissem Sinne als „gewollte Korrosion“ aufzufassen. Die Potentialunterschiede der Gefügebestandteile bewirken eine Aufteilung der Schliffoberfläche in zahlreiche mikroskopisch kleine, aneinandergrenzende kathodische und anodische Bezirke (Lokalelemente). Aufgrund der Potentialunterschiede zwischen den verschiedenen Gefügebestandteilen erfolgt ein verschieden starker Materialabtrag von der Schlifffläche, der letztlich den Kontrast bewirkt.

Als Ätzmittel stehen in großer Zahl Säuren, Basen, neutrale Lösungen, Lösungsgemische, Salzschnmelzen und Gase zur Verfügung. Die Angriffsgeschwindigkeit wird im Wesentlichen vom Dissoziationsgrad und von der elektrischen Leitfähigkeit des Ätzmittels bestimmt. Die Ätzzeiten liegen zwischen Sekunden und Stunden. Ätzzeit und Ätztemperatur stehen in Zusammenhang: durch Erhöhung der Ätztemperatur lässt sich die Ätzzeit verkürzen.

Beim elektrochemischen Ätzen wirkt das Ätzmittel in der beschriebenen Weise ohne äußere Stromzufuhr auf die Schlifffläche ein. Im Gegensatz dazu wird beim elektrolytischen oder anodischen Ätzen der Probe ein elektrisches Potential über einen äußeren Stromkreis aufgezwungen [Petzow, G., 1976a]. Hierzu kann die in der Abbildung 2.8 gezeigte Zweielektrodenanordnung zum elektrolytischen Polieren verwendet werden. Die beiden Elektroden, die anodisch geschaltete Probe und die kathodische Gegenelektrode befinden sich in einem Gefäß, das den Elektrolyt bzw. die Ätzlösung enthält.

Beim anodischen Ätzen treten aus der Schlifffläche positiv geladene Metallionen in den Elektrolyten über und eine äquivalente Anzahl von Elektronen bleibt im Werkstoff zurück. Daraus resultiert ein direkter Ätzprozess, also ein echter Materialabtrag ohne Schichtbildung. Der Materialabtrag kann aber auch mit einer gleichzeitigen Bildung von Deckschichten verbunden sein. Das ist der Fall, wenn die aus der Schlifffläche austretenden Metallionen mit Nichtmetallionen des Elektrolyten zu unlöslichen Bestandteilen reagieren und diese sich als unterschiedlich dicke Schichten auf der Schlifffläche absetzen. Die Schichtdicke ist von der Orientierung und Zusammensetzung der Gefügebestandteile abhängig, so dass diese infolge Interferenz verschieden angefärbt erscheinen. Diese Variante des elektrolytischen Ätzens wird als Anodisieren bezeichnet.

2.3.2 Aktivierungs- und Kopplungsreaktionen

Reaktion mit Silanen

Festkörperoberflächen werden mittels Methoden der Grenzflächenchemie räumlich variiert und funktionell konstruiert. Zum Beispiel dienen verschiedene Oberflächen, die mit Kopplungsreagenzien umgesetzt werden, als geeignete experimentelle Werkzeuge zur Untersuchung der Effekte der Oberflächenligandenkonzentration für die Proteinadsorption und Zelladhäsion [Liu & Hlady, 1996].

Silane gehören zu den häufig verwendeten Kopplungsreagenzien zur Oberflächenmodifikation von Gläsern und Quarzglas. 3-Aminopropyltriethoxysilan fand Einsatz in vielen Studien, in denen die hydrolytische Stabilität [Ishida & Koenig, 1980] und die Wirkung der Reaktionsbedingungen auf die Silan-Struktur anorganischer Oberflächen mittels unterschiedlicher Charakterisierungsmethoden [Vandenberg et al., 1991] untersucht wurden. Die Charakterisierung modifizierter Glasoberflächen mit 3-Mercaptopropyl-triethoxysilan zur Adsorption von Fibrinogen wurde von Liu und Hlady gezeigt [Liu & Hlady, 1996].

3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) reagiert mit den freien Hydroxylgruppen oxidierter Metalle mittels eines S_N2 -Substitutionsmechanismus, in dem die Ethoxygruppen des Silans durch Silanol-Sauerstoff unter Bildung von Ethanol substituiert werden. Hier handelt es sich um eine durch die Aminogruppe des APS selbstkatalysierte Reaktion. Dabei ersetzt die Base eine Ethoxygruppe von APS und die Substitution der Base durch eine Oberflächen-Hydroxylgruppe verläuft über einen intermediären Zustand eines pentakoordinierten Silans [Kinkel & Unger, 1984].

In der Literatur ist einiges über die Schichtdicke, die Morphologie und die Konformation von APS bei unterschiedlichen Bedingungen bekannt [Vandenberg et al., 1991]. Das Lösungsmittel für das Silan scheint eine Rolle in der Bildung der Film-Dichte zu spielen. Oberflächenwasser ist für die Reaktion des APS mit der Oberfläche im trockenen organischen Lösungsmittel erforderlich. Die Anzahl der protonierten Amine und hydrolysierten Ethoxygruppen hängt mit der Wassermenge an der Oberfläche zusammen. Das Waschen von APS-Schichten, die im organischen Lösungsmittel hergestellt wurden mit Wasser senkt ihre Wechselwirkung mit der Oberfläche [Sudholter et al., 1985]. Die APS-Konformation ist zwischen Raumtemperatur- und Hitzetrocknung-behandelten Proben

unterschiedlich [Chiang et al., 1982]. Während APS-Schichten in trockener Umgebung stabil sind, führt ihr Aussetzen in wässriger Lösung zum Zerfall starker Wasserstoffbrückenbindungen und demzufolge zur Bildung von Polysiloxan [Boerio et al., 1980].

Aktivierung mit 1,1'-Carbonyldiimidazol

1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) ist ein hochreaktives Carbonylierungsreagenz, das sich zuerst als hervorragendes Agens zur Bildung der Amidbindung in der Peptidsynthese erwiesen hat [Paul & Anderson, 1962]. Später wurde es zur Aktivierung von Carboxyl- und Hydroxylgruppen für die Immobilisierung aminhaltiger Liganden verwendet [Bartling et al., 1973; Hearn, 1987].

Die Aktivierung der Carboxylgruppe mit CDI bietet der Matrix ein intermediäres Amid mit einem Imidazolring als reaktive Abgangsgruppe. In Anwesenheit einer primären aminhaltigen Komponente wird Imidazol abgespalten, um eine stabile Amidbindung zwischen der Matrix und dem Liganden zu bilden [Hermanson, G. T., 1992].

CDI reagiert mit hydroxylhaltigen Matrices zur Bildung eines intermediären Imidazolylcarbamats, das mit N-Nukleophilen zur Ausbildung einer stabilen N-Alkylcarbammatbindung reagieren kann. Proteine werden auf diese Art durch ihren N-Terminus (α -Amin) und ihre Lysinseitenketten (ϵ -Amin) gekoppelt. Die endgültige Matrix-Ligand-Bindung führt zu einem ungeladenen urethanähnlichen Derivat von höchster chemischer Stabilität.

2.4 Metallische Biomaterialien

Alle metallischen Werkstoffe, die in der vorliegenden Arbeit behandelt wurden, dienen als Biomaterialien für medizinische Anwendungen. Trotz der Vielfalt der Biomaterialien und ihres variierten Anwendungsbereichs, gibt es einen gemeinsamen Faden, der sie verbindet: die Wechselwirkung zwischen biologischen Systemen und synthetischen oder modifizierten natürlichen Materialien.

Obwohl Gold vor mehr als 2000 Jahren von Römern, Chinesen und Azteken als „Biomaterial“ in der Zahnheilkunde verwendet wurde, ist es schwierig, die genauen Wurzeln des Begriffs in der modernen Geschichte festzulegen [Ratner, B. D., 1996a]. Wahrscheinlich wurde das heutzutage erkannte Gebiet durch den wissenschaftlichen Erfolg der Biomaterialien-Symposien der Universität Clemson (USA) in den späten 60er und frühen 70er Jahren etabliert, so dass im Jahre 1975 die Gesellschaft für Biomaterialien (Society For Biomaterials) gegründet wurde.

Mehrere Definitionen wurden für den Begriff „Biomaterial“ vorgeschlagen. Eine davon, die 1987 von Williams [Williams, D. F., 1986] formuliert wurde, ist aus dem englischen übersetzt folgende: „Ein Biomaterial ist ein lebloses Material, das in einer medizinischen Vorrichtung verwendet wird und ist dafür bestimmt, mit biologischen Systemen zu wechselwirken“.

Eine ergänzende Definition, die zum Verständnis des Ziels der Biomaterial-Wissenschaften sehr bedeutsam ist, ist der Begriff der „Biokompatibilität“ und wird von Williams folgendermaßen formuliert: „Biokompatibilität ist die Fähigkeit eines Materials, eine geeignete Antwort des Wirts in einer spezifischen Anwendung zu erfüllen.“

Zu den Materialien, die in Medizin Einsatz finden, zählen die Dental-, Kiefer- und orthopädischen Implantate (künstliches Knie, Hüfte), Kontaktlinsen, Herzklappen, Koronargefäßstützen (Stents), Brustprothesen, Katheter, Nierendialysatoren, chirurgische Instrumente, biomedizinische Sensoren und künstliche Organe [Jennissen, 2000b].

Einige synthetische und modifizierte natürliche Materialwerkstoffe, die in der Medizin Anwendung finden, sind: Metalle wie Titan und Titanlegierungen, rostfreie Stähle, Cobaltchromlegierungen, Aluminium, Platin und Polymere wie Teflon, Silikon, Polyurethan, Polyacrylat, Hydrogele, Kollagen und Zellulose.

Metallische Implantatwerkstoffe haben im Bereich der Biomaterialien eine hohe wirtschaftliche und klinische Wertstellung. Es ist deshalb besonders wichtig, die Zusammensetzung, Struktur und Eigenschaften dieser metallischen Implantatmaterialien zu beschreiben und zu untersuchen.

Titan und Titanlegierung [Ratner, B. D., 1996b]

CP (commercially pure)-Titan und Ti-6Al-4V-Legierung sind zwei sehr verbreitete Implantatwerkstoffe auf Titanbasis. Das cp-Titan kommt bezüglich seines Sauerstoffgehaltes in vier Graden vor und besteht zu 98.9-99.6 % aus Titan. Der Sauerstoffgehalt wirkt signifikant auf seinen Ertrag und seine Beständigkeit. Zum Beispiel zeigt cp-Titan Grad 1 mit 0.18 % Sauerstoffanteil eine Druckbeständigkeit (yield strength) von 170 MPa, der cp-Titan Grad 2 liegt mit 0.27 % Sauerstoff bei 216 MPa, beim Grad 4 hingegen mit 0.40 % Sauerstoff steigt dieser Wert auf 485 MPa.

Bei der Ti-6Al-4V-Legierung zeigen die einzelnen Ti-Al- und Ti-V-Phasendiagramme Effekte im Zusatz zu der Gesamtlegierung. Aluminium ist ein α -Phasenstabilisator während Vanadium ein β -Phasenstabilisator ist. Die in der Implantatherstellung verwendete 6Al-4V-Legierung ist eine $\alpha\beta$ -Legierung, deren Eigenschaften mit der Vorbehandlung zusammenhängen und stark variieren.

In charakteristischen α -Phasen-Mikrostrukturen für Implantate aus Reintitan konnten Nachweise milder Kaltverarbeitung und Korndurchmesser von 10-150 μm – abhängig von der Herstellung – gezeigt werden. Andere Bestandteilelemente wie O, C, N in Titan und 6Al-4V-Legierung verstärken das Metall mittels interner Stärkungsmechanismen, wobei Stickstoff einen fast doppelt so hohen Härtungseffekt (pro Atom) im Vergleich zu Kohlenstoff oder Sauerstoff zeigt.

Großes Interesse besteht für die chemische und physikalische Natur des Oxids auf der Titan- und Titanlegierungsoberfläche. Die nominelle Zusammensetzung des Oxids ist Titandioxid (TiO_2). Das Oxid beschafft Korrosionsbeständigkeit und sollte zur Biokompatibilität des Titans beitragen, wie in Studien mit hoher Osteointegration von Oralimplantaten gezeigt wurde [Kasemo & Lausmaa, 1988].

Legierungen auf Cobalt-Basis [Ratner, B. D., 1996b]

Die bekanntesten Legierungen, die als Implantatwerkstoffe verwendet werden sind (i) Co-Cr-Mo mit 58.9 – 69.5 % Cobalt-, 27 – 30 % Chrom-, 5 – 7 % Molybdängehalt und anderen Bestandteilen wie Mangan, Silizium, Nickel, Eisen, Kohlenstoff, Stickstoff unter 1 %, (ii) Co-Cr-W-Ni mit 45.5 – 56.2 % Cobalt-, 19.0 – 21.0 Chrom-, 14.0 – 16.0 % Wolfram-, 9.0 – 11.0 % Nickel-, maximal 3.00 % Eisen-, 1.00 – 2.00 % Mangangehalt und Kohlenstoff, Phosphor, Silizium und Schwefel unter 1 % und (iii) Co-Ni-Cr-Mo-Ti mit 29.0 – 38.8 % Cobalt-, 33.0 – 37.0 % Nickel-, 19.0 – 21.0 % Chrom-, 9.0 – 10.5 % Molybdängehalt und Titan, Silizium, Schwefel, Eisen, Mangan mit Maximalgehalt von 1 %.

Die Haupteigenschaft einer Co-Cr-Mo-Legierung, die mit ihrer Bulkzusammensetzung und dem Oberflächenoxid (Cr_2O_3) zusammenhängt, ist ihre Korrosionsbeständigkeit in Chloridlösungen. Die Härtebeständigkeit der stickstoffhaltigen Cobalt-Legierungen ist doppelt so hoch wie diese ohne Stickstoff.

Um strukturelle und mechanische Eigenschaften der Cobalt-Legierungen wie Makro- und Mikroporosität oder Materialermüdung, die zum Brechen führen kann (fatigue crack sites) zu vermeiden, werden beim Herstellungsprozess Pulvermetallurgische Methoden eingesetzt. Zum Beispiel wird feines Pulver aus Legierungsmaterial im heißen isostatischen Druckverfahren unter geeigneten Druck- und Temperaturbedingungen (100 MPa bei 1100 °C für 1 h) zusammengedrückt, gesintert und anschließend zur Endform geschmiedet. Die charakteristische Mikrostruktur weist eine Korngröße von ca. 8 µm auf.

316-L Stahl [Ratner, B. D., 1996b]

Mehrere rostfreie Stähle werden als Biomaterialien eingesetzt. Der am häufigsten vorkommende ist der 316L Stahl, Grad 2, der weniger als 0.030 % (wt. %) Kohlenstoff beinhaltet, um die Korrosionswahrscheinlichkeit *in vivo* zu reduzieren. L (low) weist in der Bezeichnung 316L auf den niedrigen Kohlenstoffgehalt hin. Die 316L Legierung besteht vorwiegend aus Eisen (60 – 65 %), großen Mengen an Chrom (17 – 19 %) und Nickel (12 – 14 %) und kleinen Mengen an Stickstoff, Mangan, Molybdän, Phosphor, Silizium und Schwefel. Die Legierungszusätze sind für die Metalloberfläche und die Bulkstruktur entscheidend. Die Schlüsselfunktion von Chrom ist durch Bildung eines starken Oberflächenoxids (Cr_2O_3) die Entwicklung eines korrosionsbeständigen Stahls. Der Nachteil des Chroms ist, dass es zur Stabilisierung der Ferrit-Phase tendiert, die schwächer ist als die

Austenit-Phase. Molybdän und Silizium sind ebenfalls Ferrit-Stabilisatoren. Um die Tendenz zur Ferrit-Bildung auszugleichen, wird Nickel zur Stabilisierung der Austenit-Phase zugesetzt. Der wichtigste Grund für den niedrigen Kohlenstoffgehalt bezieht sich auf die Korrosion. Falls der Kohlenstoffgehalt des Stahls 0.03 % überschreitet, steigt die Gefahr der Bildung von Carbiden wie Cr_{23}C_6 . Das hat die Präzipitatbildung an Korngrenzflächen zur Folge und weiterhin die abnehmende Bildung des schützenden chrombasierenden Oxids Cr_2O_3 . Stähle, in welchen sich solche Carbide bilden, sind wegen korrosionsbedingter Frakturen, die an den „schwächenden“ Korngrenzen entstehen, als Implantatwerkstoffe nicht geeignet. Die erwünschte Struktur von 316L Stahl ist der Austenit und die empfohlene Korngröße ist 100 μm oder feiner. In der Mikrostruktur sollten es keine freien Ferrit- oder Carbidphasen geben. Eine bemerkenswerte mikrostrukturelle Eigenschaft von 316L ist die plastische Deformation zwischen den Körnern. Das Metall wird regulär in einem 30 % Kaltverarbeitungsstand verwendet, weil das kaltverarbeitete Metall eine merklich höhere Ausbeute, Zugfestigkeit und Ermüdungsbeständigkeit aufweist als das warmbehandelte Material. Der Nachteil ist die abnehmende Duktilität, was allerdings bei Implantatprodukten nicht von großer Bedeutung ist.

Bei den Implantaten zur chirurgischen Frakturbehandlung, ob es sich um solche mit vorübergehend stabilisierender Funktion handelt wie z.B. Schrauben, Platten, Nägel oder um Langzeitimplantate wie Endoprothesen, bleibt als Zentralfrage für den jeweiligen Implantatwerkstoff, wie seine chemischen, physiologischen und mechanischen Eigenschaften sind, damit es schnell zur Heilung kommt und das Langzeitimplantat nicht als „Fremdkörper“ vom Organismus abgestoßen wird.

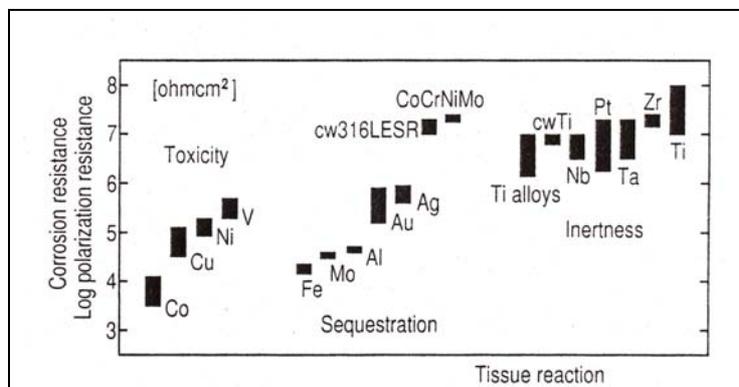


Abbildung 2.10: Graphische Darstellung der Gewebereaktion als Funktion der Korrosions- und Polarisationsbeständigkeit [Steinemann, 1998]. Daten aus Korrosionsexperimenten für unterschiedliche Metalle und Metalllegierungen *in vivo*.

2.5 Kontaktwinkelmessung und Benetzbarkeit

Zur Bestimmung des dynamischen Kontaktwinkels von Wasser an Quarzglas wird die Wilhelmy-Plate Analyse verwendet. Dieser Winkel gibt einen Aufschluß über die Hydrophilizität der Oberfläche. Gleichzeitig kann die Messung eine Aussage über die Homogenität und die Reproduzierbarkeit der Oberfläche geben. Die Messung läßt aber keine Aussage über die Bindungs- und Strukturverhältnisse an der Oberfläche zu. Diese Möglichkeit hätte man bei Verwendung anderer Methoden wie XPS, insbesondere ESCA (Electron surfaces chemical analyses) und ATR-IR (attenuated total reflection infrared spectroscopy) oder FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy).

In einem 3-Phasen-Zustand ist der Kontaktwinkel im 3-Phasen-Kontaktpunkt über die Gleichung von Young [Young, T., 1855] wie folgt definiert:

$$\gamma_s = \gamma_{sl} + \gamma_l \cos \theta \quad (13)$$

mit:

γ_s : Oberflächenspannung des Festkörpers

γ_l : Oberflächenspannung der Flüssigkeit

γ_{sl} : Grenzflächenspannung der Phasengrenze fest/flüssig

θ : Kontaktwinkel

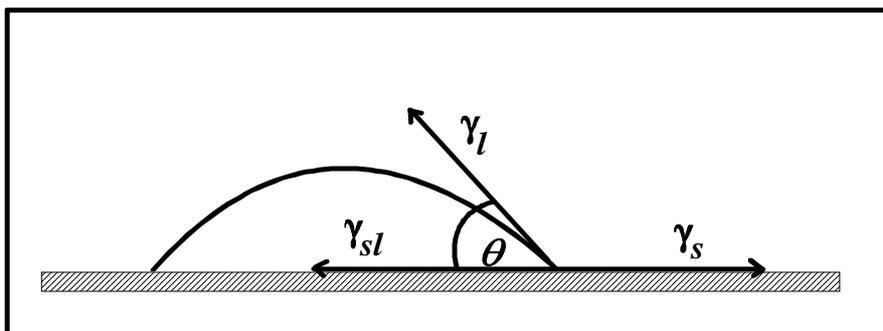


Abbildung 2.11: Oberflächenspannungskomponenten eines Flüssigkeitstropfens auf einer Festkörperoberfläche im Gleichgewicht (γ_s : Oberflächenspannung des Festkörpers, γ_l : Oberflächenspannung der Flüssigkeit, γ_{sl} : Grenzflächenspannung an der Phasengrenze fest/flüssig, θ : Kontaktwinkel) [Zisman, W. A., 1964].

Die Größe des Kontaktwinkels ist direkt proportional zur Benetzbarkeit der Oberfläche. Bei Kontaktwinkeln von 0° spricht man von vollständiger Benetzbarkeit, wobei bei Kontaktwinkeln von 90° und größer die Flüssigkeit den Festkörper nicht benetzen kann [Adamson, 1967].

Es gibt statische und dynamische Methoden zur Kontaktwinkelmessung. Die statische Methode misst den Kontaktwinkel in einem Punkt in dem 3-Phasen-Zustand fest/flüssig/gasförmig. Dies geschieht bei der Bestimmung des Kontaktwinkels mit Hilfe trigonometrischer Berechnungen aus der Tropfenform einer ruhenden Flüssigkeit auf einer Oberfläche [Kwok et al., 1999]. Ein weiteres Beispiel für die Messung eines statischen Kontaktwinkels wäre die mikroskopische Messung des Kontaktwinkels einer ruhenden Flüssigkeit auf einer Oberfläche mit Hilfe eines Winkelmessokulares.

Bei der dynamischen Kontaktwinkelmessung wird die Grenzfläche entlang der Probenfläche bewegt. Es wird der fortschreitende (engl.: advancing) und rückschreitende (engl.: receding) Winkel gemessen. Diese werden als Vorrück- und Rückzugswinkel bezeichnet. Die Differenz zwischen Vorrück- und Rückzugswinkel wird Kontaktwinkel-Hysterese genannt. Sie ist bei idealen Oberflächen gleich Null (s. Abbildung 2.12).

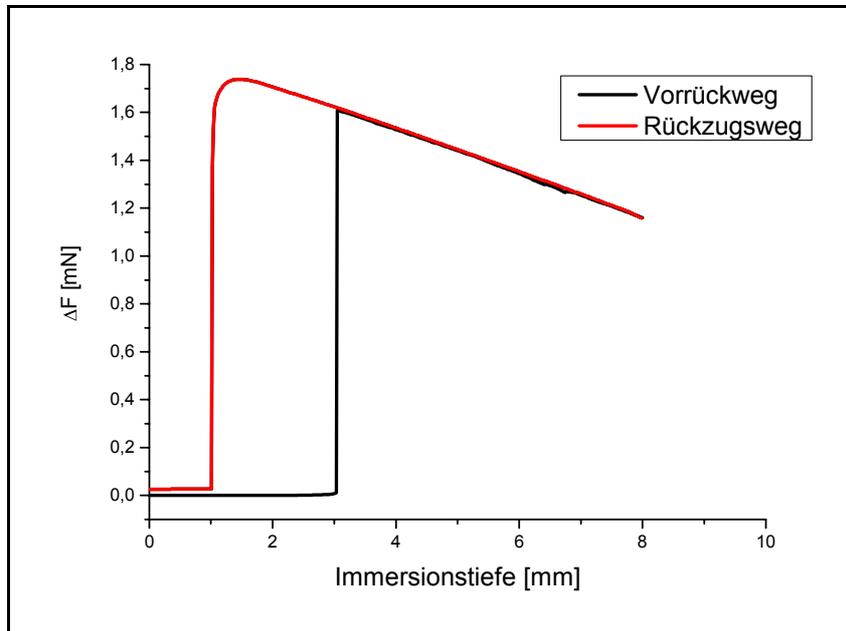


Abbildung 2.12: Beispiel einer idealen Quarzglasoberfläche. Nach dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reinigungsverfahren zeigt die Kontaktwinkelmessung keine oder nur noch eine geringe Hysterese. Der Kontaktwinkel beträgt im hier dargestellten Fall $\theta=0^\circ$ für Rückzugs- und Vorrückwinkel.

Die dynamische Methode zur Messung des Kontaktwinkels bietet gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass hierbei der Kontaktwinkel in einem sich verändernden

Gleichgewichtszustand gemessen werden kann und die dann messbaren Hysteresen dieser Kontaktwinkelmessung Aufschlüsse über die Reproduzierbarkeit und Einheitlichkeit der Oberfläche geben. Ein Beispiel für eine solche Methode ist die Du Nouy-Ring-Methode [Huh & Mason et al., 1975] und die in der vorliegenden Arbeit verwendete Wilhelmy-Plate-Methode.

Man unterscheidet zwei Klassen von Kontaktwinkelhysteresen [Andrade et al., 1985]:

1. Die „echte“ oder thermodynamische Hysterese, bei der die Hystereseurve nicht von der Zeit oder der Anzahl der Zyklen abhängt.
2. Die kinetische Hysterese, bei der die Kurve sich mit der Zeit oder der Anzahl der Zyklen ändert.

Beide Arten von Hysteresen können durch unterschiedliche Effekte [Johnson-Jr & Dettre, 1969; Neumann, 1973] erzeugt werden. Diese sind:

1. Die Oberflächenrauigkeit, die bei Rauigkeiten von über 10-20 nm zu Hysteresen des ersten Types führen kann.
2. Die Heterogenität der Oberflächen.
3. Eine Oberflächenveränderung während der Messung, die z.B. durch Quellungs- und Gelbildungseffekte hervorgerufen werden kann. Dies führt zur 2. Art der Kontaktwinkelhysterese.
4. Die Oberflächendynamik und Reorientierung funktioneller Gruppen.

Die Wilhelmy-Plate-Methode zur Messung von Oberflächenspannungen von Flüssigkeiten beruht auf einer Kraftmessung und ist bereits im neunzehnten Jahrhundert entwickelt worden [Wilhelmy, 1863]. Johnson und Dettre [Johnson-Jr & Dettre, 1969] entwickelten sie soweit, daß mit ihr der Kontaktwinkel an der Phasengrenze fest/flüssig/gasförmig bestimmt werden kann (siehe Abbildung 2.13).

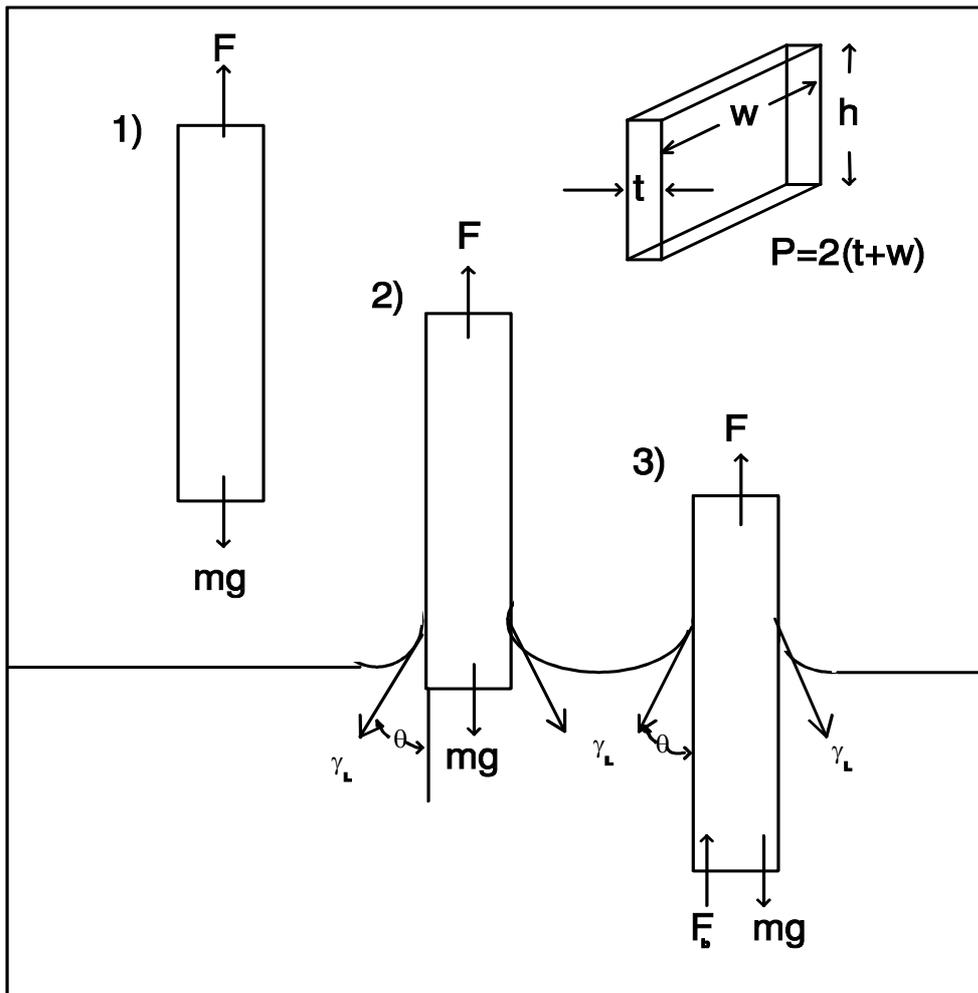


Abbildung 2.13: Die Wilhelmy-Plate-Methode zur Messung von Oberflächenspannungen und Kontaktwinkeln. (1) Das Plättchen befindet sich nur mit der Luft in Kontakt. Dies ist der Leerwert der Messung. (2) Das Plättchen taucht in die Flüssigkeit ein. (3) Die Gesamtkraft F ist die Gewichtskraft zuzüglich der Kraft, die aus der Oberflächenspannung (γ_L) resultiert. Zusätzlich wird die Auftriebskraft (F_b) wirksam [Andrade et al. (1985)].

Auf ein Plättchen wirkt die Gewichtskraft

$$F = m_0 \cdot g \quad (14)$$

mit g = Erdbeschleunigung, m_0 = Masse des Plättchens

Wenn dieses Plättchen in eine Flüssigkeit eintaucht, wird es durch die aus der Oberflächenspannung resultierende Kraft weiter heruntergezogen. Es gilt:

$$\Delta m \cdot g = (m_0 - m)g = P\gamma_L \cos \theta = \Delta F \quad (15)$$

P = Umfang des Plättchens

m = Masse des Plättchens durch Benetzung mit der Flüssigkeit

γ_l = Oberflächenspannung der Flüssigkeit

Bei weiterem Eintauchen vergrößert sich das Volumen des Plättchens, so daß die Auftriebskraft kontinuierlich vergrößert wird. Es gilt:

$$(m_0 - m)g = P\gamma_l \cos \theta - \rho_l g h t w = \Delta F \quad (16)$$

h = Höhe des Plättchens

w = Breite des Plättchens

t = Dicke des Plättchens

ρ_l = Dichte der Flüssigkeit

Durch Extrapolation der Vorrücklinie auf den Nullwert beim Eintauchvorgang ($x=0$) (siehe Abbildung 2.14) kann Gleichung (12), die nur vom Umfang des Plättchens P und von der Oberflächenspannung γ_l abhängig ist, zur Ermittlung des Kontaktwinkels verwendet werden. ΔF wird gemessen. Somit kann direkt aus diesen drei Parametern der Kontaktwinkel θ bestimmt werden.

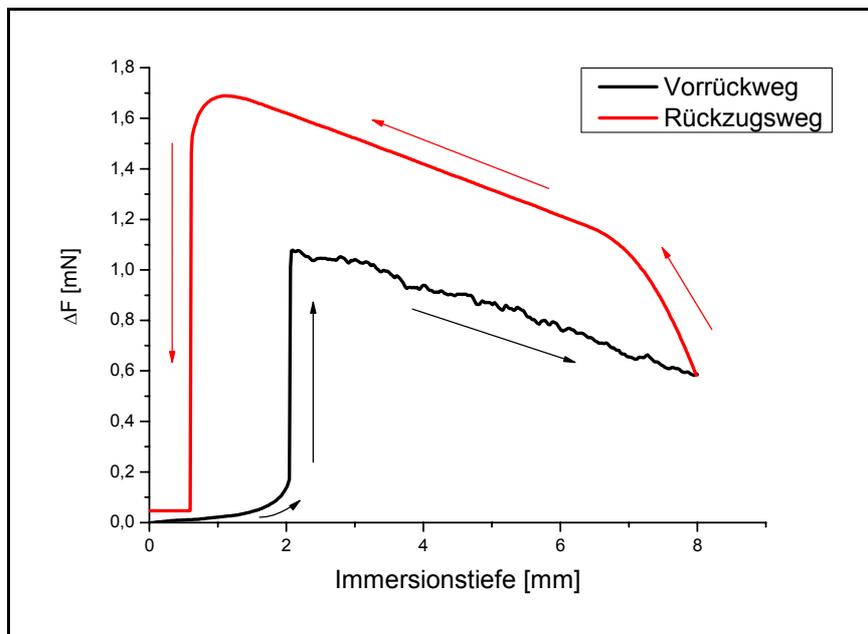


Abbildung 2.14: Wilhelmy-Plate-Methode, Kraftdifferenz ΔF als Funktion der Immersionstiefe.

Die Wilhelmy-Plate-Methode besitzt gegenüber anderen Methoden einige Vorteile:

1. Die Kraftmessung mit Hilfe einer Elektrowaage erfolgt sehr viel genauer als die direkte Bestimmung des Kontaktwinkels mittels eines Goniometers.
2. Die Genauigkeit der Messung ist nur abhängig von der Reproduzierbarkeit der Festkörperoberfläche und durch die Standardabweichung vom Umfang des Plättchens.
3. Weiterhin kann die Messung vollständig automatisiert werden, was die Analyse von zeitabhängigen Veränderungen der Kontaktwinkel und der Kontaktwinkel-Hysterese ermöglicht.

Auch in biologischen Systemen ist das Vorkommen benetzbarer Oberflächen relevant [Jennissen, 2001]. Nicht nur in der Botanik bei der Selbstreinigung der Blätter, die durch das Abperlen der Wassermoleküle von ihrer hydrophoben Oberfläche bedingt wird, sondern auch im Bereich der Biomaterialien werden der Hydrophilizität und Hydrophobizität eine große Bedeutung zugeordnet.

In einer Studie von Baier [Jennissen, 2001] wird ein Modell beschrieben, in dem die kritische Oberflächenspannung von Festkörpern, die Bioadhäsion und die Biokompatibilität korreliert werden. Aus diesem Modell, das ursprünglich für den Kontakt zwischen Blut und Biomaterial entwickelt wurde, ist es signifikant, dass die „Zone der starken Bioadhäsion“ im Kontaktwinkelbereich von $0 - 31^\circ$ liegt.

In einer anderen Studie [Schakenraad et al., 1986] wurde die Zelladhäsion und Zellspreizung als Funktion der Oberflächenenergie γ_s untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass auf hydrophoben Oberflächen ($\gamma_s < 60 \text{ dyn/cm}$) praktisch keine Zelladhäsion von Fibroblasten beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu war eine starke Fibroblasten-Adhäsion und – Spreizung auf hydrophilen Oberflächen mit $\gamma_s > 60 \text{ dyn/cm}$ erkennbar.

2.6 Fluoreszenz und Epifluoreszenz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung fluoreszierender Substanzen beim enzymatischen Nachweis der alkalischen Phosphatase mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Allgemein handelt es sich bei einem Fluoreszenzmikroskop um ein Spezialmikroskop, das zur Untersuchung von Objekten dient, die sich zur Fluoreszenz anregen lassen.

Fluoreszenz

Die Fluoreszenz kann bei einem Übergang eines Elektrons von einem elektronisch angeregten Zustand in einen elektronischen Grundzustand entstehen. Bei einem elektronischen Übergang ändert sich das Übergangsdipolmoment.

Der Übergangsdipol zwischen den Zuständen wird wie folgt definiert [Atkins, P. W., 1987]:

$$\mu_{EA} = \int \Psi_E^* \mu \Psi_A d\tau \quad (17)$$

$$\mu = -er$$

Ψ_E^* und Ψ_A sind die Wellenfunktionen der Zustände A und E. μ ist das Dipolmoment, e die Ladung eines Elektrons und r der Abstand der Ladungsträger. Man führt die dimensionslose Oszillatorstärke f ein, da sie direkt mit dem Ausgangs- und Endzustand des Überganges zusammenhängt [Atkins, P. W., 1987].

$$f = \left(\frac{8\pi^2}{3}\right) \left(\frac{m_e v}{h e^2}\right) |\mu_{EA}|^2 \quad (18)$$

Wenn die Wellenfunktionen bekannt sind, kann daraus die Oszillatorstärke berechnet werden. Die Oszillatorstärke ist ein Maß für die Intensität des Überganges. Für intensive Übergänge erwartet man $f = 1$.

Aus der Oszillatorstärke kann der Absorptionskoeffizient berechnet werden.

Nach dem Übergang in den elektronisch angeregten Zustand erfolgt eine strahlungslose Desaktivierung in einen Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes.

Da in den meisten Fällen die Umgebung nicht in der Lage ist, den energiereichen elektronischen Zustand zu deaktivieren, erfolgt eine spontane Emission im Einklang mit dem Franck-Condon-Prinzip. Das resultierende Fluoreszenzspektrum besitzt eine Schwingungsstruktur, die charakteristisch für den elektronisch angeregten Zustand ist.

Die Fluoreszenz erfolgt normalerweise bei kleineren Frequenzen als die Absorption, da die Emission erst stattfindet, nachdem das Molekül ein Teil seiner Anregungsenergie an die Umgebung abgegeben hat (s. Abbildung 2.15).

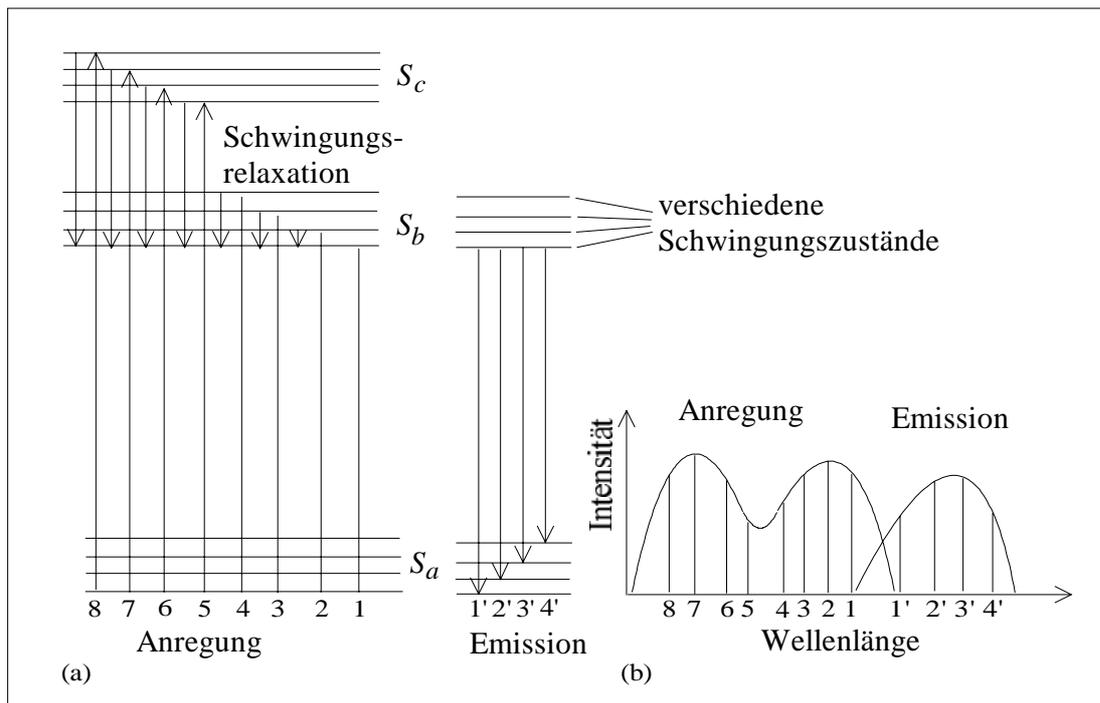


Abbildung 2.15: Anregung und Emission von Fluoreszenz [Cantor, C. R., 1980]. (a) Energieniveaus: Die Energieniveaus sind in unterschiedliche Schwingungszustände aufgespalten und (b) Spektrum: Das Emissionsspektrum ist gegenüber dem Anregungsspektrum zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Der strahlungslose Übergang von Sc nach Sb relaxiert schneller als jeglicher Deaktivierungsprozess, der Sb zum Grundzustand Sa umwandelt.

Außer der Entstehung von Fluoreszenz können auch andere Strahlungsprozesse ablaufen. Welcher Strahlungsprozeß bevorzugt abläuft, hängt von der Lebensdauer der Strahlung ab, die mit der Geschwindigkeit der spontanen Emission des angeregten Zustandes wie folgt zusammenhängt [Lakowicz, J. R., 1999]:

$$\tau_R = 1/A_{AB} \quad (19)$$

τ_R ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes und A_{AB} ist die Geschwindigkeit der spontanen Emission des Überganges von A nach B. Daraus ergibt sich für die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz [Lakowicz, J. R., 1999]

$$k_f = A_{BA} = 1/\tau_R \quad (20)$$

unter der Voraussetzung, dass die stimulierte Emission vernachlässigt werden kann. Die Lebensdauer der Strahlung für aromatische Chromophore ist dabei mit $10^{-7} - 10^{-9}$ s relativ lang. Die Prozesse „Internal conversion“ und „Intersystem crossing“ konkurrieren um die „Entvölkerung“ des angeregten Zustandes. Die Größe der Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktionen entscheidet, welcher Prozess bevorzugt in dem entsprechenden Zustand abläuft (siehe Abbildung 2.16).

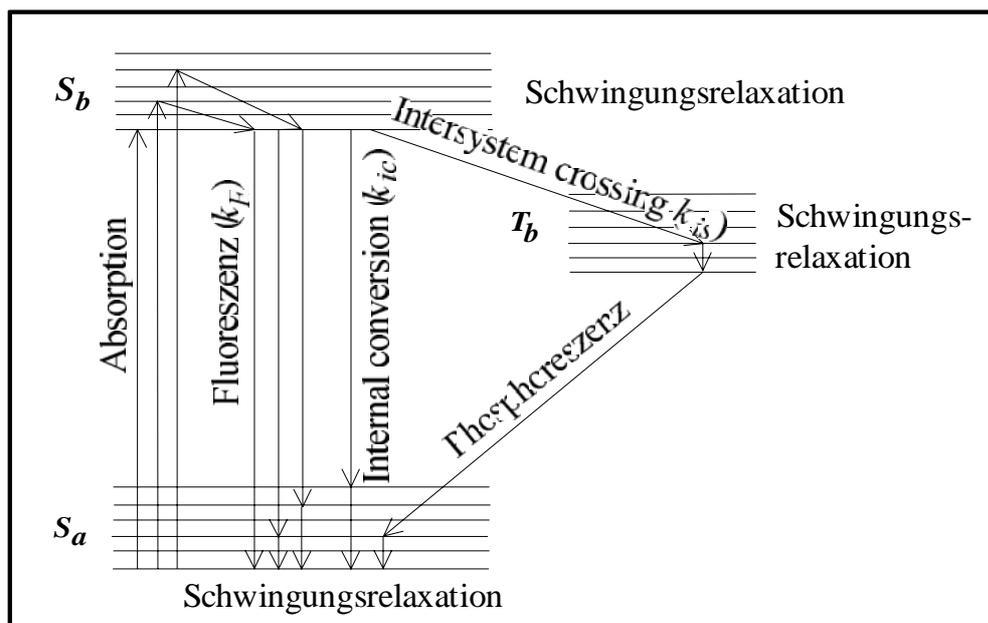


Abbildung 2.16: Entstehung der Fluoreszenz und Wege der Anregung und Desaktivierung von angeregten Zuständen. S_a : Singulettgrundzustand, S_b : angeregter Singulettzustand und T_b : angeregter Triplettzustand [Cantor, C. R., 1980].

Die Fluoreszenzquantenausbeute Θ_F hängt wie folgt mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten zusammen [Lehrer, 1971]:

$$\Theta_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IS} + k_{IC} + k_q(Q)} \quad (21)$$

k_F ist die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz, k_{IS} die Geschwindigkeitskonstante für das „intersystem crossing“, k_{IC} die Geschwindigkeitskonstante für das „internal conversion“ und $k_Q(Q)$ die Geschwindigkeitskonstante für die durch einen s. g. Quencher hervorgerufene Deaktivierung der angeregten elektronischen Zustände. Die Fluoreszenzquantenausbeute gibt an, wie groß der Anteil von angeregten Singulettzuständen ist, der durch Fluoreszenz deaktiviert wird. Sie entspricht damit dem Verhältnis von den aus einem System emittierten Photonen zu den von einem System absorbierten Photonen.

Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes

Ein Fluoreszenzmikroskop ist mit Zubehörteilen ausgerüstet, damit Fluoreszenzen beobachtet werden können. Dazu ist zunächst eine Lichtquelle erforderlich, die sehr helles Licht aussendet, damit genügend intensive Fluoreszenzen zustande kommen. Die Lichtquelle muss weiterhin besonders auch kurzwellige Strahlung abstrahlen, denn um z.B. blaue Fluoreszenzen sichtbar zu machen, ist mindestens violettes Anregungslicht erforderlich [Robenek, H., 1995c]. Das Anregungslicht soll vom fluoreszenzfähigen Stoff absorbiert werden. Dazu werden die passenden Wellenlängen aus der von der Lichtquelle abgegebenen Strahlung mit einem Filter, dem Anregungsfilter, isoliert. Die Fluoreszenz ist so empfindlich, dass sie von dem äußerst hellen Anregungslicht völlig überstrahlt wird. Um das zu vermeiden, muss das Anregungslicht nach Auslösung der Fluoreszenz ausgeschaltet werden. Das geschieht mit einem weiteren Filter, dem Sperrfilter, das das Anregungslicht möglichst vollständig absorbiert und das Fluoreszenzlicht ungeschwächt transmittiert (s. Abbildung 2.17).

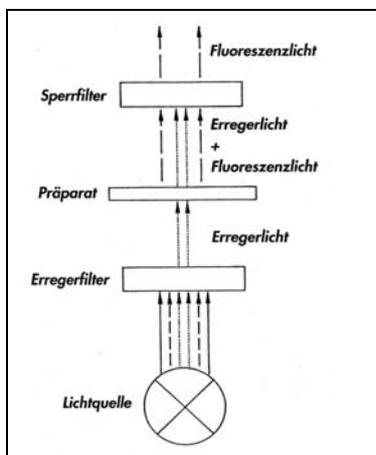


Abbildung 2.17: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes [Robenek, H., 1995a]. (Beschreibung s. Text).

Die dichromatische Teilerplatte ist über dem Objektiv angeordnet und stellt eine Art Interferenzfilter dar, die das kurzwellige Licht bevorzugt reflektiert und langwelliges Licht transmittieren lässt. Auf diese Weise wird das kurzwellige, zur Anregung dienende Licht zu einem hohen Prozentsatz ins Präparat geschickt, wo es die Fluoreszenz auflöst. Da diese aus längerwelligem Licht besteht, wird sie von der Teilerplatte durchgelassen und kann beobachtet werden. Gleichzeitig werden Reste des Anregungslichtes, die vom Präparat eventuell reflektiert werden, von der Teilerplatte zum größten Teil in Richtung Lichtquelle reflektiert und die geringen Reste, die durch die Teilerplatte passieren, werden vom Sperrfilter quantitativ absorbiert. So entstehen ein völlig dunkler Untergrund und ein Bild mit optimalem Kontrast (s. Abbildung 2.18).

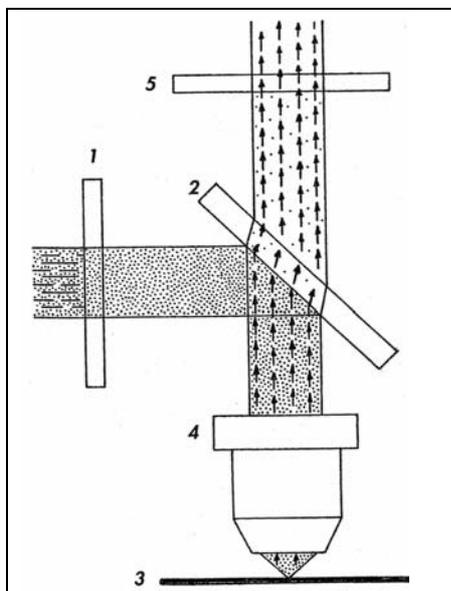


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung eines Fluoreszenzmikroskopes mit Auflichtanregung [Robenek, H., 1995b]. (Beschreibung s. Text).

3 Material und Methoden

3.1 Präparative Methoden

Bei den metallischen Proben, die zur Bildung einer chemischen Primärschicht mit der Chromschwefelsäure-Methode und zur Biologisierung mit Proteinmolekülen für *in vitro* und *in vivo* Experimente eingesetzt wurden, handelte es sich um unterschiedliche Biomaterialwerkstoffe:

- (i) Titanplatte cp (commercially pure) Grad 2 (Fa. GB IMPLANT, Essen), die mit einem chromsäure- und ammoniumwasserstoffdifluorid-haltigen Elektrolyt elektrolytisch poliert (Fa. POLIGRAT GMBH, München) und in 10 x 15 x 1 mm bzw. 10 x 5 x 1 mm kleine Plättchen gestanzt wurde (Fa. BALTEC AG, Pfäffikon, Schweiz) [Jennissen et al., 1999],
- (ii) Titanlegierung (Ti-6Al-4V) (Fa. GB IMPLANT, Essen) die mit Titanplasmaspray (TPS) beschichtete wurde (Fa. DOT, Rostock) in Form von hantelförmigen Prüfkörpern oder viereckigen Plättchen (10 x 5 x 1 mm),
- (iii) sandgestrahlte Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen (CoCr29Mo6, ISO 5832-4) mit der Dimension 10 x 5 x 1 mm, (Fa. ESKA IMPLANTS GMBH, Lübeck),
- (iv) elektropolierter AISI 316L medizinischer rostfreier Stahl (X2CrNiMo 18 15 3, DIN 17443, 1.4441) wurde in Plättchen mit der Dimension 10 x 15 x 1 mm gestanzt (Fa. BALTEC AG, Pfäffikon, Schweiz),
- (v) Titan Osteopromote cp Grade 4, sandgestrahlt mit der Dimension 8 x 8 x 2 mm (Fa. ALTATEC, Wurmberg).

Für sämtliche Experimente, in denen Wasser verwendet wurde, wurde entionisiertes Wasser verwendet, das durch Destillation und Filtrierung durch ein MilliQ 4-fach Reinstwassersystem (Fa. MILLIPORE GMBH, Schwalbach) aufgereinigt wurde.

3.1.1 Oberflächenätzen mit Chromschwefelsäure [Jennissen et al., 1999]

Die Oberflächen der Titan-, Stahl- und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen wurden mit Aceton entfettet und in einer 5 % (v/v) Salpetersäurelösung (65 % HNO₃, Fa. J.T. BAKER, Griesheim) 2 h unter Rückfluß bei 80 °C erhitzt, gründlich mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die trockenen Plättchen wurden in Chromschwefelsäure (92 % H₂SO₄, 1.3 % CrO₃, Dichte 1.84 g/cm³, Fa. MERCK, Darmstadt) 1 h bei 240 °C erhitzt, 30 min abgekühlt und gründlich mit Wasser gewaschen. Alle Metallplättchen wurden unter diesen Temperaturbedingungen behandelt mit Ausnahme der Stahlplättchen, die bei 230 °C erhitzt wurden. Dann wurden sie mit einer 2 % (m/v) Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA) 30 min bei 100 °C zur Komplexbildung der mono- und bivalenten Ionen behandelt und anschließend in Wasser 30 min bei 100 °C neutralisiert und in Methanol gelagert.

3.1.2 Chemische Modifikation der Metalloberflächen mit Silanen

Die mit 5 % Salpetersäure (Metall-HNO₃) und/oder mit Chromschwefelsäure (Metall-CSS) behandelten Metallplättchen wurden mit unterschiedlichen Alkylsilanen (Fa. ABCR, KARLSRUHE) modifiziert.

Die Mischung der Edukte für die Reaktionen mit Silanen erfolgte in einer Glovebox unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff 5.0) in ausgeheizten Glasgeräten. In 50 ml eines 5 % (v/v) Lösungsgemisches aus 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS, Fa. SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen) in trockenem Toluol wurden die Metallplättchen unter Rückfluß 3.5 h zum Sieden erhitzt [Vandenberg et al., 1991; Weetall, 1970]. Nach Reaktionsende wurden die Plättchen abgekühlt und einzeln dreimal in jeweils 10 ml Chloroform, dreimal in Aceton und dreimal in Methanol gewaschen.

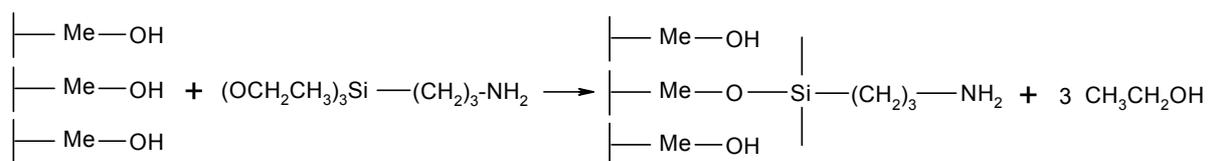


Abbildung 3.1: Reaktion der Hydroxylgruppen der Metallbulkphase (Me-OH-Matrix) mit dem Silanisierungsagens 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) (analog zu [Hansen et al., 1988]).

Zur Modifizierung mit Hexyltrichlorsilan [Hansen et al., 1988; Horsley et al., 1991] (bzw. Dimethyldichlor- oder Propyltrichlorsilan) wurden die Plättchen an der Luft unter der Laminarflow (Gelaire HF 48, Fa. FLOW LABORATORIES) getrocknet und unter Inertgasatmosphäre (mit N₂) in eine 10 % (v/v) Hexyltrichlorsilan- (bzw. Dimethyldichlor- oder Propyltrichlorsilan-) Lösung in trockenem Toluol (Fa. SIGMA-ALDRICH, TAUFKIRCHEN) eingebracht. Nach 2 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden die Plättchen dreimal mit jeweils 10 ml Ethanol, dann mit Wasser gewaschen und anschließend im Exsikkator unter Vakuum bei 60 °C über Nacht getrocknet.

Zur Modifizierung mit Propyltrimethoxysilan wurden die trockenen Plättchen unter Inertgasatmosphäre (mit N₂) in eine 5 % (v/v) Propyltrimethoxysilan-Lösung in trockenem Trichlorethylen gegeben [Liu & Hlady, 1996]. Nach 12 h Reaktion bei Raumtemperatur unter Rühren, wurden die Metallplättchen dreimal mit jeweils 10 ml Trichlorethylen, Aceton und Ethanol gewaschen und anschließend im Exsikkator unter Vakuum bei 60 °C über Nacht getrocknet.

Zur Modifizierung mit Propyldimethylchlorsilan wurden die trockenen Plättchen unter Inertgasatmosphäre (mit N₂) in eine 5 % (v/v) Propyldimethylchlorsilan-Lösung mit 5 % (v/v) Pyridin in trockenem Toluol gegeben [Sanders & Jennissen, 1994; van Damme & Feijen, 1991]. Nach einer Stunde Reaktion bei Raumtemperatur unter Rühren, wurden die Metallplättchen dreimal mit jeweils 10 ml Ethanol, 0.01 M Salzsäure und Wasser gewaschen und anschließend im Exsikkator unter Vakuum bei 60 °C über Nacht getrocknet.

3.1.3 Aktivierung mit 1,1'-Carbonyldiimidazol [Bethell et al., 1979; Jennissen et al., 1999]

Die Aktivierung der mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) modifizierten Metallplättchen wurde in einer 5 % (m/v) 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI, 15 mmol, Fa. SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen) in trockenem Aceton 4 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Reaktionsende wurden die aktivierten Plättchen einzeln dreimal in 10 ml Aceton und dreimal in 10 ml Wasser gewaschen.

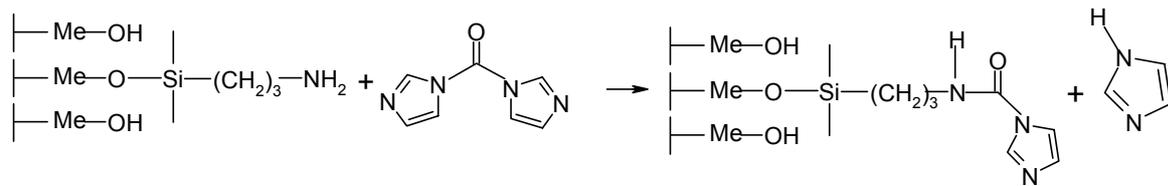


Abbildung 3.2: Aktivierung der silanisierten Metalloberfläche mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI).

3.1.4 Präparation und chromatographische Aufreinigung von BMP-2

Biologisch aktives dimeres rekombinantes **h**umanes **B**one **M**orphogenetic **P**rotein 2 (rhBMP-2) wurde gentechnisch in Bakterium *E. coli* synthetisiert [Jennissen et al., 1999] und chromatographisch aufgereinigt. Der Protein-Rohextrakt wurde nach Ankonzentrierung in einer Ultrafiltrationszelle (Amicon, UM 10.000 MWCO, Fa. MILLIPORE GMBH, Schwalbach) einer doppelten Gelfiltration unterworfen, um das Dimermolekül rhBMP-2 aus anderen verunreinigten Proteinen aufgrund unterschiedlichen Molekulargewichts zu trennen. Für die Gelfiltration wurde das kommerzielle Gel Superose 6pg verwendet (Fa. AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg).

Das nach Gelfiltration angereicherte rhBMP-2 wurde mittels Affinitätschromatographie bis zu 99 % aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde als Matrix Heparin-Sepharose verwendet (Fa. AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg). Heparin hat die Funktion eines Kationaustauschers hoher Kapazität aufgrund seiner anionischen Sulfatgruppen. Der Auftragspuffer bestand aus 50 mM Tris-hydroxy-aminomethan (Tris, Fa. MERCK, Darmstadt), 5 mM EDTA (Fa. MERCK, Darmstadt), 150 mM NaCl (Fa. MERCK, Darmstadt) und 33 mM CHAPS (Fa. MERCK BIOSCIENCE, Schwalbach). Die Elution von rhBMP-2 erfolgte durch Anlegen eines Salzgradienten, der von 150 mM bis 1 M NaCl verlief.

3.2 Analytische Methoden

3.2.1 Messung des dynamischen Kontaktwinkels von Wasser an Metalloberflächen [Andrade et al., 1985; Jennissen et al., 1999]

Sämtliche Messungen des Kontaktwinkels wurden in einem temperierten Raum ($22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) in Wasser durchgeführt.

Die rechteckigen Quarzglasplättchen, die sich als Vergleichsoberfläche für eine stark hydrophile Oberfläche eigneten, wurden unabhängig von den Metallplättchen 1 h bei 100 °C in Chromschwefelsäure gereinigt, gründlich mit Wasser gespült und anschließend 30 min in Wasser bei 100 °C gekocht.

Das zu messende viereckige Quarzglas- oder Metallplättchen wurde unter staubfreien Bedingungen an einer Werkbank aus dem Aufbewahrungsgefäß herausgenommen und unter gasförmigem Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurde es in einer Halterung befestigt und in das Kontaktwinkelmessgerät eingebracht. Die Messung wurde gegen Wasser ($T=22\text{ °C}$) durchgeführt. Mittels einer beweglichen Hebebühne wurde das Wassergefäß mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1 mm/min relativ zum Plättchen aufwärts (Vorrückwinkel, engl. *advancing contact angle*, θ_A) und abwärts (Rückzugswinkel, engl. *receding contact angle*, θ_R) bewegt. Über eine elektronische Waage wurde die Kraft, die auf das Plättchen ausgeübt wird, gemessen und die Gewichtsänderungen mittels Computer in Kraftdifferenzen umgerechnet. Zur Berechnung des Kontaktwinkels θ wurde der Umfang des zu messenden Plättchens ($22 \times 10^{-3}\text{ m}$) und die Oberflächenspannung des Wassers bei 22 °C (72.3 mN/m) benötigt.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry [Lowry et al., 1951]

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry wurde die Proteinlösung, falls sie für den Test störende Substanzen wie z.B. CHAPS (3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) enthält, vorher mit einer 10 % (m/v) Trichloressigsäurelösung gefällt (Endkonzentration: 5 % Trichloressigsäure). Durch die Ausfällung wurde das Protein von den

in Lösung befindlichen Störsubstanzen, die mit dem Proteinreagenz Folin reagieren, abgetrennt. Nach 15 min bei 0 °C wurde 4 min mit 14000 rpm (10000 x g) abzentrifugiert (Fa. EPPENDORF, Hamburg) und das Proteinpellet in Lowry-Waschlösung (1 % Natriumdodecylsulfat, 0.1 N Natriumhydroxid) aufgenommen. Von dieser Stammlösung ausgehend wurden verschiedene Verdünnungen in Lowry-Waschlösung angesetzt. Aus den sich ergebenden Proteinbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet.

Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte im Technikon Autoanalyzer (Fa. TECHNIKON, Bad Vibel). Ein Aliquot der Proteinprobe wurde bei Raumtemperatur mit einem gleichen Volumen 0.1 % (m/v) Kupfersulfatpentahydrat, 0.24 % (m/v) Dinatriumtartratdihydrat vermischt. Eine Minute später erfolgte der Zusatz eines 4.25-fachen Volumens 0.2 M Natriumhydroxid und 2.12 % (m/v) Natriumcarbonat, nach einer weiteren Minute der Zusatz eines gleichen Volumens an Folin-Ciocalteus-Reagenz (1:4 verdünnt, Fa. MERCK, Darmstadt). Die Extinktion von Molybdänblau, eines der Reaktionsprodukte wurde im Durchflussphotometer bei 660 nm nach 5 min bestimmt. Für die Eichung des Tests erfolgte vor jeder Messung die Bestimmung von Rinderserumalbumin-Lösungen mit vier bekannten Konzentrationen im Bereich von 0.24 – 0.86 mg/ml. Durch lineare Regression wurde aus diesen Werten eine Eichgerade ermittelt, die für die Bestimmung der unbekannt Proteinlösungen verwendet wurde.

3.2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [Laemmli, 1970]

Zum Ansatz der Polyacrylamid-Gele wurden folgende Lösungen benötigt:

- (i) 30 % (m/v) Acrylamid, 0.8 % (m/v) Methylenbisacrylamid
- (ii) 1.5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure, 0.4 % (m/v) Natriumdodecylsulfat, pH=8.8
- (iii) 0.5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure, 0.4 % (m/v) Natriumdodecylsulfat, pH=6.8

(iv) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

(v) 10 % (m/v) Ammoniumperoxidsulfat (frisch angesetzt)

Die Ansätze für zwei Gele in dem System Mini Elektrophorese (Fa. BIORAD, München) setzen sich wie folgt zusammen:

Lösung	Polyacrylamidkonzentration	
	17 % (Trenngele)	4 % (Sammelgele)
(i)	8.5 ml	1.5 ml
(ii)	3.75 ml	-
(iii)	-	2.5 ml
(iv)	0.03 ml	0.01 ml
(v)	0.05 ml	0.03 ml
H ₂ O	2.7 ml	6.0 ml
Summe (für zwei Gele)	15.0 ml	10.0 ml

Zum Gießen der Gele wurden Glasplatten mit den Maßen 7.4 x 10.1 cm benutzt. Der Abstand zwischen den Platten, die mit integrierten Abstandhaltern versehen sind, beträgt 1.0 mm. Der taschenbildende Elektrophoresekamm besitzt 10 Zähne, die Zahnbreite beträgt 5 mm und die Zahnlänge 11 mm. Damit ergibt sich ein theoretisches Schachtvolumen von 0.055 ml. Die Glasplatten mit den integrierten Abstandhaltern wurden zunächst mit Klammern fixiert und dann in den vertikalen Gießständer des Mini-Elektrophorese Systems eingespannt. Der Raum zwischen den Glasplatten wurde mit der Trenngelmischung eingefüllt und während der Polymerisation mit Wasser überschichtet. Anschließend wurde das Sammelgel darüber polymerisiert und vorsichtig, ohne Blasenbildung, der Kamm zwischen die Platten der Gelmischung eingesetzt.

Als Kammerpuffer diente eine Mischung von: 0.25 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0.192 M Glycin und 0.1 % (m/v) Natriumdodecylsulfat, pH 8.3. Die Proben wurden vor dem Auftrag 5 Minuten bei 98 °C im Probenpuffer erhitzt. Der Laemmli-Probenpuffer bestand aus: 10 % (m/v) Glycin, 2 % (m/v) Natriumdodecylsulfat, 0.001 % (m/v) Bromphenolblau, 0.065 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan/Salzsäure und ggfl. 5 % (m/v) Mercaptoethanol. Die Laufzeit der Gele betrug ca. 2 Stunden bei 65 mA und 160 V.

Als Eichproteine wurde der Proteinmolekularstandard SDS-7 (Fa. SIGMA-ALDRICH, München) verwendet:

Eichprotein	MW [Da]
Bovines Serum Albumin	66000
Ovalbumin	45000
Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	36000
Carbo-Anhydrase	29000
Trypsinogen	24000
Trypsin-Inhibitor	20100
α -Lactalbumin	14200

3.2.3.2 Färben und Entfärben der Gele

Die Gele wurden aus den Glasplatten entnommen und 30 min in 0.25 % (m/v) Coomassie-Blau (Serva Blue R, Fa. SERVA, Heidelberg), 50 % (v/v) Methanol und 9.2 % (v/v) Essigsäure unter ständigem Rütteln gefärbt und anschließend in 7.5 % (v/v) Essigsäure und 5 % (v/v) Methanol über Nacht entfärbt und gelagert [Weber & Osborn, 1969].

3.2.3.3 Dokumentation der SDS-Polyacrylamid-Gele

Die entfärbten SDS-Gele wurden mit Wasser abgespült, um die toxische und korrosive Entfärberlösung zu entfernen. Dann wurden sie auf eine Klarsichtfolie gelegt und im Durchlicht auf einem Lichtkasten (MS 14-7, Fa. ARISTO, New York, USA) mit einer Spiegelreflexcamera (Fa. NIKON GMBH, Düsseldorf) mit Gelbfilter (Y-2, Fa. HAMA) in unterschiedlichen Belichtungszeiten (1/4 – 1/15 Sekunde) und Variationen der Blende (8 – 16) photographiert. Zur Dokumentation wurde orthochromatischer, stark kontrastierender Film (Agfa Ortho 25, DIN 15, Fa. AGFA-GEVAERT, Leverkusen) verwendet.

Zusätzlich zu der photographischen Dokumentation wurden einige SDS-Gele in einem Scanner (Scan Jet 4c/T, Fa. HEWLETT PACKARD) abgetastet und elektronisch mit einem Graphikprogramm (ISIS Draw 2.3) bearbeitet.

3.2.4 Photometrische Messung der biologischen Aktivität des löslichen BMP-2

Die biologische Aktivität des gentechnisch hergestellten und aufgereinigten rhBMP-2 wurde durch die Induktion der *de novo* Synthese der alkalischen Phosphatase in der murinen, embryonalen Schädeldach-Osteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1 (Informationsprotokoll der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) untersucht. Für den Test wurden die Passagen 4 bis 12 eingesetzt [Wiemann et al., 2001].

MC3T3-E1 Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen in α -modifiziertem Eagles Medium (α -MEM), dem Glutamin (2 mM), Penicillin (50 I.U./ml), Streptomycin (50 μ g/ml) und entweder 1 % oder 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurden, in einem Zellinkubator (Hera cell, FA. HERAEUS) mit feuchter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 35 °C angewachsen. Sämtliche Zellkulturenreagenzien wurden bei der Fa. GIBCO erworben. Konfluent gewachsene Zellen wurden 30-60 Sekunden mit 5 μ g/ml Trypsin gelöst in Moscona Puffer (133 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 0.18 mM KH₂PO₄, 4 mM KCl) aus dem Boden der Kulturflasche gelöst und passagiert. Nachdem die Zellen zu 50-60 % konfluent ausgesät wurden, konnten sie für 4-5 Tage bis zur nächsten Passagierung wachsen. Auf einen höheren Konfluenzgrad wurde verzichtet damit das Zellwachstum nicht beeinträchtigt wird.

Der biologische Test für die BMP-2-Aktivität beruht auf der Induktion der alkalischen Phosphatase in MC3T3-E1 Zellen durch Stimulierung mit BMP-2. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde p-Nitrophenylphosphat (Fa. SIGMA-ALDRICH, München) verwendet.

2×10^4 frisch trypsinierte Zellen in α -MEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) wurden in jede Well einer 96er Mikrotiterplatte (*well plate*) eingebracht und zur Konfluenz wachsen lassen. Nach 6 Stunden wurde das Medium gegen frisches α -MEM mit 1 % FCS ersetzt, in dem entsprechende BMP-2 Konzentrationen aus einer BMP-2 Stammlösung gelöst wurden. Die Stammlösungen beinhalten 0.3 mg/ml BMP-2 in Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (DPBS, 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM

KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.4, Fa. PAA, Linz, Österreich). Nach drei Tagen wurden die Zellen dreimal mit Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (DPBS) gewaschen und mit 2 % p-Formaldehyd gelöst in DPBS ohne Calcium und Magnesium fixiert. Nach 10 min wurden die Zellen dreimal mit DPBS kurz gewaschen, um das Fixiermittel zu entfernen. Anschließend wurden 100 μl /well der alkalischen Phosphatase Substratlösung (7.6 mM p-Nitrophenylphosphat gelöst in 50 mM Tris/HCl, pH 10.3) dazugegeben. Nach 60 min Reaktionszeit wurde die Farbreaktion mit einem äquivalentem Volumen 0.2 M NaOH gestoppt und die optische Dichte der mit BMP-2 stimulierten Zellen gegen die unstimulierten Kontrollen bei 405 nm in einem Absorptions- und Fluoreszenzdetektor gemessen (FL 600 microplate fluorescence reader, Fa. BIOTEK INSTRUMENTS, INC., Vermont, USA). Die Bestimmung wurde dreifach durchgeführt. Die Halbsättigungskonstanten des kommerziellen und des selbsthergestellten BMP-2 lagen bei 20-75 nM.

3.2.5 Fluoreszenzmessung der biologischen Aktivität des immobilisierten BMP-2

Die biologische Aktivität des auf Metalloberflächen immobilisierten rhBMP-2 wurde in der murinen, embryonalen Schädeldach-Osteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1 (Informationsprotokoll der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) gemessen. Für den Test wurden die Passagen 4 bis 12 eingesetzt [s. 3.2.4].

Der biologische Test für die Aktivität des immobilisierten rhBMP-2 beruhte auf der Induktion der alkalischen Phosphatase in MC3T3-E1 Zellen durch Stimulierung mit BMP-2. Zur Detektion der endogenen Phosphatase wird das Reagenz 2-(5'-Chloro-2-phosphoryloxyphenyl)-6-chloro-4(3H)-quinazolinon oder ELF (Enzyme-Labeled-Fluorescence)-97 Phosphat (Fa. MOLECULAR PROBES, INC., Oregon, USA) verwendet. Es handelte sich um ein im blauen Bereich selbst schwach fluoreszierendes Substrat, das aufgrund enzymatischer Entfernung seines Phosphatmoleküls zur Bildung eines intensiv gelb-grünfluoreszierenden Präzipitats führt. Der Reaktionsmechanismus ist folgender:

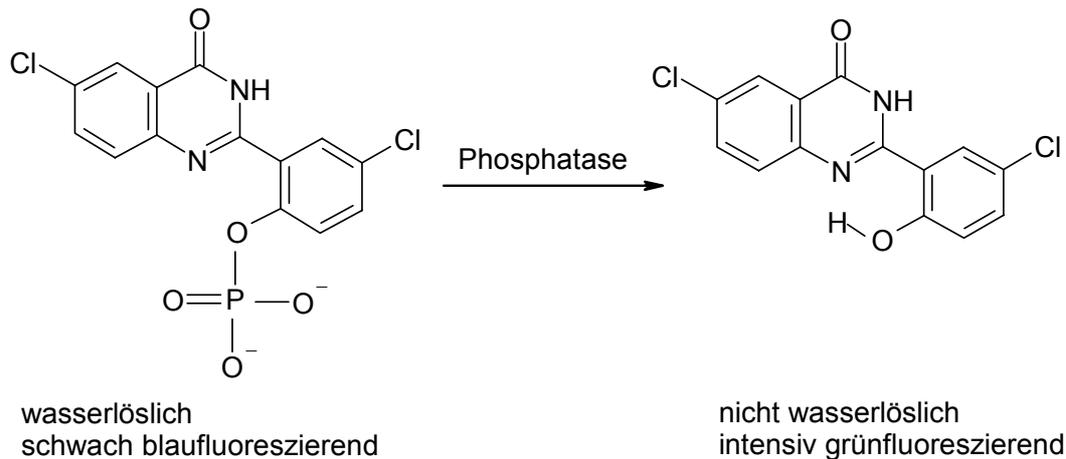


Abbildung 3.3: Das Prinzip der enzymvermittelten Bildung des fluoreszierenden ELF-97 Alkoholpräzipitates aus dem ELF-97 Phosphatasesubstrat.

MC3T3-E1 Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen in α -modifiziertem Eagles Medium (α -MEM), dem Glutamin (2 mM), Penicillin (50 I.U./ml), Streptomycin (50 μ g/ml) und entweder 1 % oder 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurden, in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO_2 bei 37 °C angewachsen. Sämtliche Zellkulturreagenzien wurden bei der Fa. GIBCO (Fa. INVITROGEN GMBH, Karlsruhe) erworben. Konfluent gewachsene Zellen wurden mit Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (DPBS, 137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.4, Fa. PAA, Linz, Österreich) gewaschen und 30-60 Sekunden in 1 mM EDTA gelösten Trypsin (0.25 % Trypsin in 1mM EDTA) aus dem Boden der Kulturflasche gelöst.

5×10^5 frisch trypsinisierte Zellen in α -MEM mit 10 % FCS wurden auf jedes Metallplättchen, das sich in der Well einer 48er Mikrotiterplatte (*well plate*) befindet, eingebracht. Nach 6 Stunden wurde das Medium gegen frisches α -MEM mit 1 % FCS ersetzt und die Mikrotiterplatte wurde in einem Zellinkubator (Hera Cell, Fa. HERAEUS) mit feuchter Atmosphäre und 5 % CO_2 bei 35 °C inkubiert. Nach drei bis zehn Tagen wurden die Zellen dreimal mit Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (DPBS) gewaschen und mit 2 % p-Formaldehyd gelöst in 0.1 ml/l Natriumphosphat-Puffer fixiert. Nach 10 min wurden die Plättchen mit den Zellen dreimal mit DPBS gewaschen, um das Fixiermittel zu entfernen, dann wurden sie 10 min in DPBS/Tween 20 0.2 % (v/v) zur Permeabilisierung der Zellmembran inkubiert und mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden 20 μ l/well der alkalischen Phosphatase Substratlösung (Fluoreszenzsubstrat ELF-97,

1:20 im beiliegenden Puffer nach Produktbeschreibung verdünnt und in Mikrofilter zur Vermeidung größerer fluoreszierenden Agglomeraten filtriert) dazugegeben. Nach 5-10 min Einwirkungszeit wird die Reaktion mit 500 µl Levamisolhydrochlorid (1-2,3,5,6-Tetrahydro-6-phenyl-imidazol(2,1-b)thiazol, Fa. SYNORHARM GMBH, Barsbüttel) gestoppt, mit Phosphat Puffer DPBS 10 min gewaschen und die Epifluoreszenz der mit BMP-2 stimulierten Zellen gegen die unstimulierten Kontrollen mit einem speziell für das ELF-97-Substrat optischen Filter (Excitationswellenlänge: 345 nm, Emissionswellenlänge: 530 nm) in einem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop gemessen (Nikon Eclipse E 400, Fa. NIKON GMBH, Düsseldorf).

3.2.5.1 Zusätzliche Fluoreszenzfärbemethoden der Zellen

Die Visualisierung der Zellkerne und des Zytoskeletts parallel zur Darstellung der alkalischen Phosphatase Induktion ließ sich durch zwei weitere darauffolgende Färbemethoden ermöglichen.

Zur Darstellung der Zellkerne wurde das Substrat 4',6-Diamidino-2-phenylindol x 2 HCl (DAPI, Fa. SERVA, Heidelberg) verwendet, das mit der Doppelstrang DNA einen bei 465 nm fluoreszierenden Komplex liefert. Die Zellen, die auf BMP-2 immobilisierte Metallplättchen auf die alkalische Phosphatase-Induktion untersucht wurden (s. 3.2.5), wurden 10 min mit Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (DPBS, 137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4, Fa. PAA, Linz, Österreich) gewaschen, für 15 min bei 37 °C in einer DAPI-Färbelösung (1:200 in Methanol verdünnte Lösung aus einer 0.1 mg/ml DAPI in Phosphat Puffer DPBS Stammlösung) inkubiert, anschließend mit Methanol gewaschen und mit einem optischen Filter (Excitationswellenlänge: 345 nm, Emissionswellenlänge: 450 nm) in einem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop (Nikon Eclipse E 400, Fa. NIKON GMBH, Düsseldorf) untersucht.

Die Sichtbarmachung der Zytoskeletts erfolgte durch Verwendung eines sehr empfindlichen zytochemischen Substrats, das fluoreszenzmarkiertes Phalloidin enthält (Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat konjugierte Phalloidin, TRITC-Phalloidin, Fa. CHEMICON INTERNATIONAL, INC. CA / SIGMA-ALDRICH, München), um die lokale Orientierung der Aktinfilamente im Inneren der Zelle zu detektieren. Die auf BMP-2 immobilisierten

Metallplättchen ausgesäten Zellen wurden 10 min mit Dulbecco's Phosphat gepufferter Salzlösung mit Calcium und Magnesium (DPBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} , 137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 0.9 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgCl_2$, Fa. PAA, Linz, Österreich) gewaschen, für 15 min bei Raumtemperatur mit 3 % Paraformaldehyd fixiert und dann für 2 min mit 0.05 % Triton X-100 zur Permeabilisierung der Zellmembran inkubiert. Nach erneutem Waschen mit DPBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} wurden die Zellen 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur mit 10 μ l pro Probenplättchen TRITC-Phalloidin (25 μ g/ml in DPBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) inkubiert, anschließend 10 min mit DPBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} gewaschen und mit einem optischen Filter (Excitationswellenlänge: 540 nm, Emissionswellenlänge: 570 nm) in einem Fluoreszenz-Auflichtmikroskop (Eclipse E 400, Fa. NIKON GMBH, Düsseldorf) untersucht.

3.3 Proteinadsorptionsmessungen

3.3.1 Radioaktive Markierung von Ubiquitin und BMP-2 mit ^{125}I

Die modifizierte nach Ciechanover et al. [Ciechanover et al., 1980] radioaktive Markierung von Ubiquitin und rhBMP-2 mit der Chloramin-T erfolgte nach der Methode von Gehrke und Jennissen [Gehrke & Jennissen, 1987]. RhBMP-2 wurde nach der Bolton-Hunter Methode [Bolton & Hunter, 1973] radiojodiert.

^{125}I -CT-Ubiquitin

160 μl Ubiquitin (Fa. SIGMA, München) mit der Konzentration 50 mg/ml (8 mg) gelöst in Wasser wurden mit 40 μl 1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ Puffer, pH 7.5 vermischt. Dazu wurden 80 μl der radioaktiven Spezies Na^{125}I (8 mCi, Fa. AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) und 40 μl N-Chlortoluol-4-sulfonamid Natriumsalz oder Chloramin T-Lösung (Fa. SERVA, Heidelberg) gegeben und gut durchmischt. Nach 90 s Inkubationzeit wurde die Reaktion mit 40 μl frisch angesetzter Natriummetabisulfit Lösung gestoppt und mit 800 μl KI versetzt. Chloramin T, Natriummetabisulfit und Kaliumjodid wurden in 150 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5 aufgenommen und stets am Tag der Jodierung frisch angesetzt. Ein Aliquot (5 μl) der frisch radioaktiv markierten Proteinlösung wurde mit 5 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) zur Bestimmung der Markierungsrate gefällt. Zur Entfernung des freien Jod-Anteils (nicht am Protein gebundenes ^{125}I) wurde dreimal gegen 1 L 20 mM Tris Puffer, pH 7.5 dialysiert. Nach der letzten Dialyse wurde erneut wie oben beschrieben eine TCA Fällung durchgeführt, um den endgültigen Anteil an freiem Jod zu ermitteln. Pellet und Überstand wurden in einem γ -Counter (AUTOMATIC GAMMA COUNTER 1480 WIZARDTM 3'', Fa. WALLAC) gemessen. Der Anteil an freiem Jod lag nach der dritten Dialyse bei 5 %, die Einbaurrate lag bei 95 %, die Proteinausbeute bei 70 % und die spezifische Radioaktivität betrug 0.8 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

^{125}I -CT-BMP-2

200 μl rhBMP-2 mit der Konzentration 0.16 mg/ml (32 μg) gelöst in 125 mM Borat/0.067 % SDS pH 7.5 wurden mit 10 μl 0.5 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4/0.9$ % SDS Puffer, pH 7.5 vermischt.

Dazu wurden 30 µl der radioaktiven Spezies Na¹²⁵I (3 mCi, Fa. AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) und 10 µl frisch angesetzte N-Chlortoluol-4-sulfonamid Natriumsalz oder Chloramin T-Lösung (2 mg/ml, Fa. SERVA, Heidelberg) gegeben und gut durchmischt. Nach 90 s Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 10 µl frisch angesetzter Natriummetabisulfit Lösung (2 mg/ml) gestoppt und mit 90 µl NaI (10 mg/ml) versetzt. Chloramin T, Natriummetabisulfit und Natriumjodid wurden in 100 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,5 aufgenommen und stets am Tag der Jodierung frisch angesetzt.

Gleichzeitig erfolgte in einem separaten Reaktionsgefäß eine Markierung von rhBMP-2 mit Chloramin T ohne radioaktive Spezies. Hierzu wurden 1100 µl rhBMP-2 (177 µg, 0.16 mg/ml) in 125 mM Borat/0.067 % SDS pH 7.5 mit 25 µl 0.5 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄/0.9 % SDS Puffer, pH 7.5 vorgelegt, 50 µl NaI (6 µg/ml) und 25 µl frisch angesetzte Chloramin T-Lösung (2 mg/ml) dazugegeben und gut durchmischt. Nach 90 s Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 25 µl frisch angesetzter Natriummetabisulfit Lösung (2 mg/ml) gestoppt und mit 225 µl NaI (10 mg/ml) versetzt. Zunächst wurde die radioaktiv markierte mit der nicht-radioaktiven Chloramin T-BMP-2-Lösung vermischt.

Ein Aliquot (5 µl) der frisch radioaktiv markierten Proteinlösung wurde mit 5 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) zur Bestimmung der Markierungsrate gefällt. Zur Entfernung des freien Jod-Anteils (nicht am Protein gebundenes ¹²⁵I) wurde dreimal gegen 1 L 125 mM Borat/0.067 % SDS Puffer, pH 10.0 dialysiert. Nach der letzten Dialyse wurde erneut wie oben beschrieben eine TCA Fällung durchgeführt, um den endgültigen Anteil an freiem Jod zu ermitteln. Pellet und Überstand wurden in einem γ-Counter (AUTOMATIC GAMMA COUNTER 1480 WIZARD™ 3'', Fa. WALLAC) gemessen. Der Anteil an freiem Jod lag nach der dritten Dialyse bei 5 %. Die Einbaurrate lag bei 95 %, die Proteinausbeute bei 72 % und die spezifische Radioaktivität betrug 19 µCi/µg.

Markierung von rhBMP-2 mit ¹²⁵I nach Bolton-Hunter [Bolton & Hunter, 1973]

2 mCi N-Succinimidyl 3-(4-hydroxy, 5-[¹²⁵I]iodophenyl)propionat (Bolton-Hunter Reagenz) (Fa. AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH, Freiburg) wurden unter Stickstoffstrom, der über eine mit Sicapent® (Fa. MERCK, Darmstadt) gefüllte Flasche getrocknet wurde, vollständig eingedampft. Hierzu wurde über eine Einmalkanüle der Stickstoff in das Reaktionsgefäß eingeleitet. Für den Abstrom wurde eine weitere Einmalkanüle, welche mit einem Aktivkohlefilter versehen war, in das Reaktionsgefäß eingestochen. Die vollständige

Trocknung wurde durch das Erscheinen eines weißen Ringes am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar (ca. 30 min). Dann erfolgte die Zugabe von 0.5 ml BMP-2-Lösung (0.1 mg/ml). Der Ansatz wurde für 30 Minuten unter langsamen Schütteln auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.15 ml 0.2 M Glycinlösung, pH 8,4 gestoppt, für 30 min auf Eis gestellt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde nochmals mit 0.15 ml 0.2 M Glycinlösung gespült. Die Glycinlösung und Proteinlösung wurden in 125 mM Borsäure, pH 8.4 frisch angesetzt. Dann wurden 2 ml Bolton-Hunter-BMP-2 (0.15 mg/ml) hinzugefügt, und der Ansatz auf ein Volumen von 0.5 ml mit 20 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, pH 8.0 aufgefüllt. Zur Bestimmung der Einbauraten wurden 5 µl des Ansatzes mit 50 µl BSA (Fa. SERVA, Heidelberg) (30 mg/ml) TCA gefällt. Pellet und Überstand wurden im γ -Counter (AUTOMATIC GAMMA COUNTER 1480 WIZARD™ 3'', Fa. WALLAC) gemessen. Die Einbauraten betrug 80%. Um den Anteil an freien N-Succinimidyl 3-(4-hydroxy, 5-[¹²⁵I]iodophenyl)propionat zu verringern wurde der Ansatz in Centricon 10 (Fa. AMICON, Witten) in einer Beckmann-Kühlzentrifuge (Fa. BECKMANN, München, 4000× g, 4°C) gegen 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, pH 8.0 100-fach umdialysiert. Die Proteinausbeute betrug 89%, der Anteil der freien Aktivität betrug 3 %.

3.3.2 Immobilisierung von Proteinen

Das Modellprotein Ubiquitin und das knocheninduzierende Protein rhBMP-2 werden auf metallischen Oberflächen nach zwei Mechanismen, die durch unterschiedliche chemische Modifikation bedingt werden, immobilisiert: (i) die Proteinmoleküle werden auf einer silanisierten Metallschicht (s. Kapitel 3.1.2, Abbildung 3.1) durch hydrophobe Wechselwirkungen mit hydrophoben Resten adsorbiert (s. Abbildung 3.4) oder (ii) die Proteinmoleküle reagieren mit dem intermediären Imidazolamid unter Abspaltung des Imidazolrings, der eine reaktive Abgangsgruppe ist, um eine stabile Harnstoffbindung zu bilden. In dieser Weise werden N-Nukleophile (Proteine) auf einer mit Carbonyldiimidazol aktivierten Metalloberfläche, die vorher mit 3-Aminopropyltriethoxysilan umgesetzt wurde (s. Kapitel 3.1.3, Abbildung 3.2), kovalent gebunden (s. Abbildung 3.5). Dies erfolgt durch Reaktion des Kohlenstoffatoms der Amidbindung der chemisch modifizierten Metalloberfläche mit der ϵ -Aminogruppe der Lysinreste der Proteinmoleküle. In diesem Fall

handelt es sich bei der immobilisierten Proteinmenge um einen Anteil an kovalent gebundenem und einen Anteil an nicht-kovalent immobilisiertem Protein.

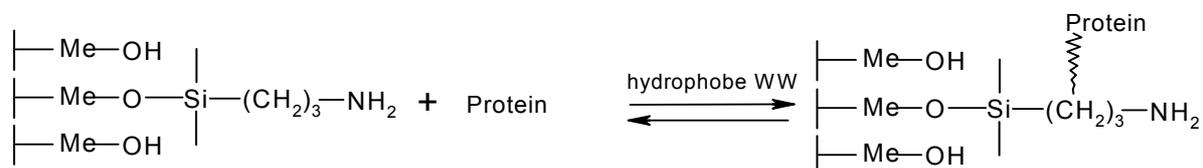


Abbildung 3.4: Schematisch dargestellter Reaktionsmechanismus der Adsorption (nicht-kovalent immobilisiert) von Proteinen auf Metalloberflächen. Das Protein wird durch hydrophobe Wechselwirkung mit dem Propylrest adsorbiert.

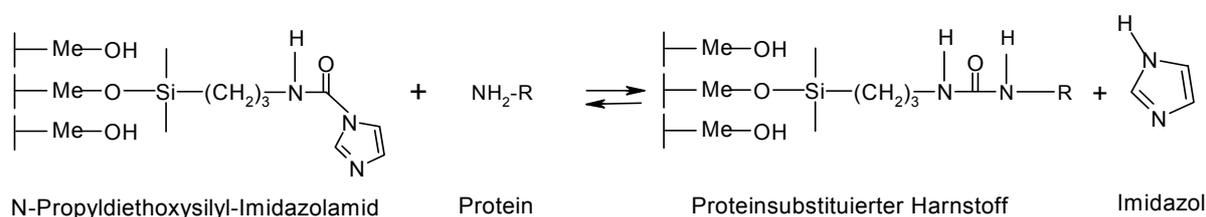


Abbildung 3.5: Schematisch dargestellter Reaktionsmechanismus der kovalenten Kopplung von Proteinen auf Metalloberflächen.

3.3.2.1 Adsorption und kovalente Kopplung von Ubiquitin auf Metallplättchen

Die Metallplättchen (5 x 10 x 1 mm) wurden nach Behandlung mit Chromschwefelsäure (s. Kapitel 3.1.1) oder chemischer Modifizierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (s. Kapitel 3.1.2) und 1,1'-Carbonyldiimidazol (s. Kapitel 3.1.3) mit Wasser gewaschen, an der Luft unter einer Laminarflow (Gelaire HF 48, Fa. FLOW LABORATORIES) getrocknet und anschließend in kleine (2 ml) Reaktionsgefäßen gegeben, in denen sich jeweils 0.5 ml einer Lösung aus 0.3 mg/ml Ubiquitin mit ^{125}I radioaktiv markiertem Ubiquitin (^{125}I -CT-Ubiquitin) in 50 mM Na_2HPO_4 Puffer bei pH 10.0 befand. Für die Beladung der größeren Plättchen (10 x 15 x 1 mm) wurden 2 ml der gleichen Ubiquitin-Lösung zur Inkubation verwendet. Ubiquitin wurde in lyophilisierter Form bei der Fa. SIGMA-ALDRICH, München erworben. Die spezifische Radioaktivität der Proteinlösung betrug 10 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (10^7 cpm/mg). Die Plättchen wurden 12 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend viermal in jeweils 2 ml 50mM Na_2HPO_4 Puffer, pH 10.0 für 15 min gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die auf den Plättchen gebundene Radioaktivität in einem γ -Counter (AUTOMATIC

GAMMA COUNTER 1480 WIZARD™ 3'', Fa. WALLAC) gemessen und daraus die Beladungsmenge (ng Ubiquitin/cm² geometrische Metalloberfläche) berechnet.

3.3.2.2 Adsorption und kovalente Kopplung von rhBMP-2 auf Metallplättchen

Die Metallplättchen (5 x 10 x 1 mm) wurden nach Behandlung mit Chromschwefelsäure oder chemischer Modifizierung mit Aminopropyltriethoxysilan und Carbonyldiimidazol mit Wasser gewaschen, an der Luft unter einer Laminarflow (GELAIRE HF 48, Fa. FLOW LABORATORIES) getrocknet und anschließend in kleine (2 ml) Reaktionsgefäßen gegeben, in denen sich jeweils 0.5 ml einer mit ¹²⁵I radioaktiv markierten rhBMP-2 Lösung in 125 mM Borat/NaOH/0.066 % SDS, pH 10.0 befand. Für die Beladung der größeren Plättchen (10 x 15 x 1 mm) wurden 2 ml einer rhBMP-2-Lösung zur Inkubation verwendet. Für die Adsorption und kovalente Kopplung von rhBMP-2 auf unterschiedliche Metallplättchen wurden drei unterschiedliche Proteinkonzentrationen eingesetzt: 0.1, 0.25 und 0.6 mg/ml. Das rhBMP-2 wurde in allen Fällen in 125 mM Borat/NaOH/0.066 % SDS, pH 10.0 gelöst. Die spezifische Radioaktivität der Proteinlösung betrug 10 µCi/mg (10 x 10⁶ cpm/mg). Die Plättchen wurden 12 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend viermal in jeweils 2 ml 125 mM Borat/NaOH/0.066 % SDS, pH 10.0 für 15 min gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die auf den Plättchen gebundene Radioaktivität in einem γ-Counter (AUTOMATIC GAMMA COUNTER 1480 WIZARD™ 3'', Fa. WALLAC) gemessen und daraus die Beladungsmenge (ng rhBMP-2/cm² geometrische Metalloberfläche) berechnet.

3.3.3 Kovalente Kopplung von Ethanolamin und Adsorption vom Protein

Nach der Aktivierung mit Carbonyldiimidazol (CDI, s. Kapitel 3.1.3) wurden die Metallplättchen in einer wässrigen 2 M Ethanolamin Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Nach Ende der Reaktion wurden die Plättchen dreimal mit jeweils 10 ml Wasser gewaschen und in der ¹²⁵I-CT-Ubiquitin- bzw. ¹²⁵I-CT-rhBMP-2-Lösung über Nacht (12 h) wie im Kapitel 3.3.2.1 beschrieben inkubiert.

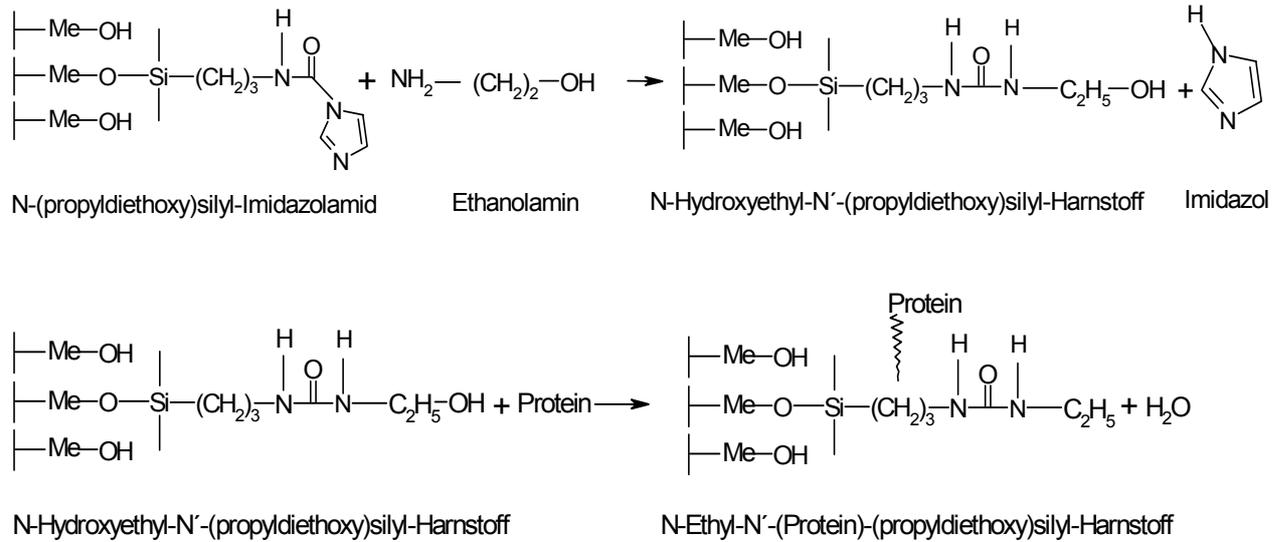


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der kovalenten Kopplung von Ethanolamin mit dem Kohlenstoffatom des Imidazolamids und anschließender Adsorption des Proteins am Propylrest des N-Ethyl-N'-(propyldiethoxy)silyl-Harnstoffs durch hydrophobe Wechselwirkungen.

3.4 Desorptionsexperimente

3.4.1 Freisetzung von Ubiquitin und rhBMP-2

Nach der Adsorption von Ubiquitin oder rhBMP-2 auf den Metallplättchen und der Messung der gebundenen Radioaktivität im γ -Counter wurden die Plättchen einzeln in verschließbaren Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 2 ml des entsprechenden Desorptionspuffers bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der Wechsel des Desorptionspuffers erfolgte je nach Angabe im jeweiligen Experiment täglich, zwei- oder zehntägig und die Radioaktivitätsabnahme, die durch die Proteinfreisetzung bedingt war, wurde im γ -Counter (AUTOMATIC GAMMA COUNTER 1480 WIZARD™ 3'', Fa. WALLAC) gemessen.

Für die Freisetzung des Ubiquitin von der Titanoberfläche bei Raumtemperatur wurden folgende Lösungen verwendet:

(i) 50 mM Tris / 150 mM NaCl bei pH 7.4, 50 mM Tris / 150 mM NaCl / 0.066 % SDS bei pH 7.4, (ii) 50 mM Na₂HPO₄ bei pH 10.0, 50 mM Na₂HPO₄ / 0.066 % SDS bei pH 10.0, (iii) 50 mM NaOH / 0.5 % SDS.

Für die Desorption des rhBMP-2 von den Metalloberflächen bei Raumtemperatur wurde Phosphat/NaCl-Puffer (PBS) bei pH 7.4 verwendet.

Zur Verdrängung des Ubiquitin von der Metalloberfläche wurden folgende Alkylaminlösungen verwendet:

(i) 2M Ethylamin bei pH 4.0, 7.4 und 10.0, (ii) 2M Butylamin bei pH 4.0, 7.4 und 10.0, (iii) 2M Hexylamin bei pH 4.0, 7.4 und 10.0, (iv) 2M Heptylamin bei pH 7.4 und 10.0, (vi) 2M Octylamin pH 4.0 und 7.4.

Zur Verdrängung des rhBMP-2 von den Metalloberflächen wurden folgende Lösungen (bei pH 7.4) verwendet:

(i) 2M Ethylamin, (ii) 2M Butylamin, (iii) 1 M Hexylamin, (iv) 2M Hexylamin, (v) 2M Heptylamin, (vi) 2M Octylamin und (vii) 70 mg/ml Rinder-Serumalbumin (BSA).

3.5 Tierexperimente

3.5.1 rhBMP-2 Immobilisierung der Implantate für das Experiment in Kaninchen

Die Behandlung der Probenkörper mit Salpetersäure (Ti-HNO₃) oder Chromschwefelsäure (Ti-CSS) für das *in vivo* Experiment in Kaninchen erfolgte nach der Methode, die im Kapitel 3.1.1 beschrieben wurde. Die Modifizierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan und 1,1'-Carbonyldiimidazol erfolgte nach Kapitel 3.1.2 unter sterilen Bedingungen.

Für das *in vivo* Experiment in Kaninchen wurde eine nicht-radioaktive rhBMP-2 Lösung in 125 mM Borat/0.066 % SDS, pH 10.0 mit der Konzentration 0.3 mg/ml verwendet. Nach 12 h Inkubationszeit der Titanimplantate in der rhBMP-2 Lösung wurden sie herausgenommen und viermal mit sterilfiltriertem 125 mM Borat Puffer pH 7.4 gewaschen. Anschließend wurden die chemisch modifizierten und biologisierten Implantate an der Luft der Laminarflowbank getrocknet und in sterilen Eppendorf-Gefäßen verpackt. Alle Schritte wurden mit sterilen Lösungen und Gefäßen in der Laminarflowbank (Fa. WOETHO GMBH, Teningen) unternommen.

3.5.2 *In vivo* Experiment in Kaninchen

Die *in vivo* Experimente in Kaninchen wurden in Kooperation mit PD Dr. G. Voggenreiter in der Unfallklinik im Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Von der Vorderkante der Tibia erwachsener Kaninchen wurde ein großer Perioststreifen entnommen, die Titanplättchen damit umwickelt und das Kompositum in den Muskel *M. gastrocnemius* implantiert. Bei den Implantaten handelte es sich um viereckige Plättchen (10 x 6 x 0.8 mm) aus elektropolierem Titan (cp Titan, grade 2, Fa. GB IMPLANT, Essen) mit einer Gesamtfläche von 1.2 cm².

Die Modifikation der Implantate für die Experimente wurde in zwei Hauptgruppen aufgeteilt. In der ersten Gruppe wurden Titanplättchen (Ti-HNO₃, Ti-CSS, Ti-HNO₃-APS, Ti-CSS-APS) in Abwesenheit von rhBMP-2 (negative Kontrollen) implantiert (n=12). Die zweite Gruppe kann in zwei anderen Untergruppen aufgeteilt werden: (i) Titanplättchen, die mit Chromschwefelsäure behandelt, mit 3-Aminopropyltriethoxysilan modifiziert, mit 1,1'-

Carbonyldiimidazol aktiviert und mit rhBMP-2 biologisiert wurden (Ti-CSS-APS-CDI-BMP-2) (n=8) und (ii) Titanplättchen, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurden und *in situ* 20 µl rhBMP-2 Lösung in 50 mM Natrium β-Glycerophosphat/0.066 % SDS, pH 7.0 (c=0.05 mg/ml) zwischen Periost und Implantat injiziert wurde (n=8).

Die Operation wurde von PD Dr. G. Voggenreiter und Mitarbeitern unter Berücksichtigung der Richtlinien des Landes NRW über Versuche mit Labortieren durchgeführt.

Von der Vorderkante der Tibia erwachsener Kaninchen (CHbb:CH, Fa. THOMAE, Biberach/Riß, Körpergewicht 3-3.5 kg) wurde nach Totalanästhesie (Ketamin/Xylazin) ein 7 x 20 mm großer Perioststreifen entnommen. Die Titanimplantate wurden in einer besonderen Vorrichtung fixiert und mit dem Perioststreifen umwickelt (s. Abbildung 3.7). Letzter wurde mit zwei 5-0 Polydigoxanon Nähten (Fa. ETHIKON, Norderstedt) aufgenäht. In dem Muskelbauch des *M. gastrocnemius* wurde eine 7 mm breite und 10 mm tiefe Tasche geöffnet, in die das Implantat-Periost-Kompositum eingeführt wurde. Im Falle der Injektion vom löslichen rhBMP-2, wurde dieses nach Einführung des Kompositums in die Muskeltasche appliziert, um Verluste der rhBMP-2 Lösung zu vermeiden. Die Tiere wurden nach 28 d durch Überdosis an T61 (Fa. HOECHST-ROUSSEL VET., Frankfurt) eingeschläfert.

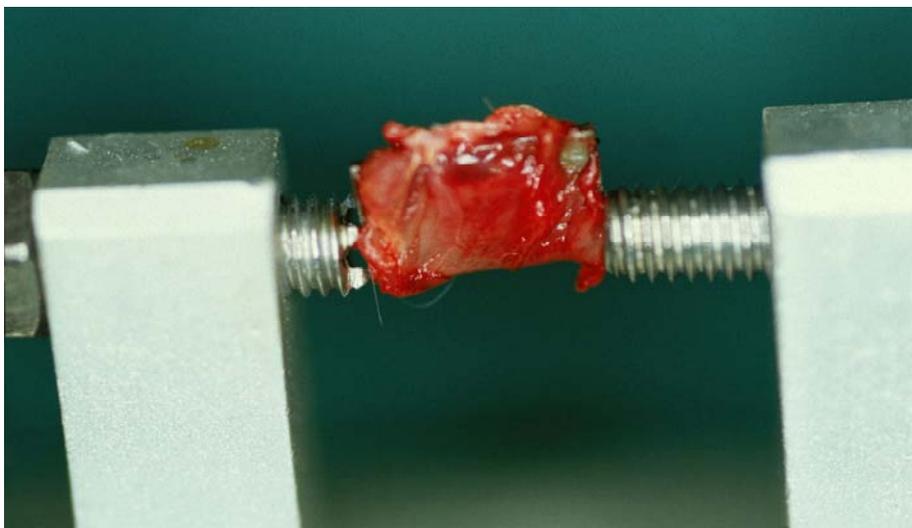


Abbildung 3.7: Periostklappenexperiment: Umwicklung eines Titanplättchens mit einem Perioststreifen zu einem Implantatkompositum. Von der Vorderkante der Tibia erwachsener Kaninchen wurde ein 20 x 7 mm großer Perioststreifen entnommen, die Titanplättchen damit umwickelt und das Kompositum in den Muskel *M. gastrocnemius* implantiert.

Die Implantate wurden mit einer umgebenden Schicht von Muskel explantiert, in 40 % Ethanol fixiert und in Methylmethacrylat eingebettet. Mittels einer rotierenden Säge

(Innenlochsäge 1600, Fa. LEICA INSTRUMENTS GMBH, Nusslach) wurden Serienschritte mit einer Dicke von 150 μm gemacht. Die Serienschritte wurden auf hochauflösende Platten gelegt (2 x 2 x 0.65 inch., Fa. INTAS, Göttingen) und mikroradiographisch (Faxitron® Radiographic Inspection System 43805, Fa. HEWLETT PACKARD INC. Mc Minnville, USA) untersucht. Die Schnitte wurden mit einem Cyanoacrylat-basierenden Kleber (Roti®coll 1, Fa. CARL ROTH GMBH, KARLSRUHE) auf Glas aufgebracht, auf eine Dicke von 60 μm geschliffen (SIC PAPER #1000-4000, Fa. STRUERS, Kopenhagen, Dänemark) und mit Basisfuchsin gefärbt.

Die morphometrische Analyse zur Abschätzung der Gesamtmenge des neugebildeten Knochens wurde anhand der Mikroradiographien für alle Schnitte und alle Proben durchgeführt. Zur Auswertung wurden mittels einer analogen Kamera (XC-77CE CCD VIDEO CAMERA MODULE, Fa. SONY INC., Japan) mit einer 7-fachen Vergrößerung Aufnahmen gemacht, die anhand eines photoanalysierenden Systems (KS 400 Vs. 2, Fa. KONTRON, Eching) digital analysiert wurden. Folgende Parameter wurden ausgewertet: das Knochenvolumen (mm^3), die Knochenfläche (mm^2), die Anzahl der Trabekel und die Implantat-Knochen Kontaktfläche (mm^2).

Die statistischen histomorphometrischen Parameter wurden von den gefärbten Schnitten ausgewertet. Es wurden Aufnahmen mit einer Digitalkamera (LEICA DC 200, Fa. LEICA MICROSCOPY SYSTEMS AG, Heerbrugg, Schweiz) und einem Lichtmikroskop (Leica DM LB, Fa. LEICA MICROSYSTEMS GMBH, Wetzlar) mit 100-facher Vergrößerung erhalten.

Die statistische Analyse inklusive Berechnung des Mittelwerts und Standardabweichung wurde mittels SPSS 7.5 (Fa. SPSS INC., Chicago, IL.) durchgeführt. Ein Vergleich zwischen den Gruppen wurde unter Verwendung einer einheitlichen Variationsanalyse (unifactorial analysis of variance) unternommen.

3.5.3 rhBMP-2 Immobilisierung der Implantate für das Pilotexperiment im Schaf

Die Behandlung der Probenkörper mit der Chromschwefelsäure für das *in vivo* Experiment in Schafen erfolgte nach der Methode, die im Kapitel 3.1.1 beschrieben wurde. Die Modifizierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan erfolgte nach Kapitel 3.1.2 unter sterilen Bedingungen.

Zur Immobilisierung von rhBMP-2 auf den hantelförmigen Implantaten wurde eine nicht-radioaktive rhBMP-2 Lösung in 125 mM Borat / 0.066 % SDS, pH 10.0 mit der Konzentration 0.15 mg/ml verwendet. Nach 12 h Inkubationszeit der Implantate in der rhBMP-2 Lösung wurden sie herausgenommen und viermal mit sterilfiltriertem 125 mM Borat Puffer pH 7.4 gewaschen. Anschließend wurden die chemisch modifizierten und biologisierten Implantate an der Luft der Laminarflowbank getrocknet und in sterilen Eppendorf-Gefäßen verpackt. Alle Schritte wurden mit sterilen Lösungen und Gefäßen in der Laminarflowbank (Fa. WOETHO GMBH, Teningen) unternommen.

3.5.4 In vivo Experiment im Schafkondylus

Die *in vivo* Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. R. Müller in der Klinik für Orthopädie im Universitätsklinikum Essen durchgeführt. In der Implantation handelte es sich um hantelförmige Implantate aus einer Ti-6Al-4V Legierung mit einer Gesamtlänge von 10 mm, Zylinderlänge 7.5 mm, Durchmesser der Verankerungsrollen 7 mm und Durchmesser des zylindrischen Teils 4.2 mm (Fa. GB IMPLANT, Essen). Der zylindrische Teil des Implantats war mit einer Titan-Plasma-Spray Oberfläche mit einer Dicke von ca. 0.4 mm beschichtet (TPS, Fa. DOT, Rostock).

Die Implantate wurden in beiden Seiten des Oberschenkels (distaler Femurkondylus) erwachsener weiblicher Texel-Schafe eingesetzt. Es wurde nach dem Spaltüberbrückungsverfahren vorgegangen [Soballe et al., 1991]. Zuerst wurde durch Bohrung ein künstlicher Knochendefekt verursacht, in den das Implantat eingesetzt wurde. In diesem Modell befand sich ein 1000 µm Spalt um den zylindrischen Teil des Implantats herum, der mit neuem Knochen gefüllt werden sollte. Das Spaltüberbrückungsverfahren lieferte auf diese Weise die Methode zur Messung der vollständigen Überbrückung des Knochendefekts. Höchstens vier solcher Implantate wurden in jeden Kondylus positioniert, ohne die Stabilität des Femurs zu beeinträchtigen.

Es wurden drei Gruppen von Implantaten mit unterschiedlicher Oberflächenmodifikation eingesetzt: (i) Titanlegierungs-Implantate mit Titanplasmaspray-Beschichtung (TPS), die mit Chromschwefelsäure behandelt, mit 3-Aminopropyltriethoxysilan modifiziert und mit rhBMP-2 biologisiert wurden (Ti-CSS-APS-BMP-2) (ii) Titanlegierungs-Implantate (TPS) mit

Kalziumphosphat-Beschichtung (Ti-CaP) (Fa. GB IMPLANT, Essen) und (iii) Titanlegierungs-Implantate (TPS), die mit Chromschwefelsäure behandelt wurden, ohne rhBMP-2 Beschichtung, mit *in situ* Applikation während der Implantation von 20 µl einer rhBMP-2 Lösung in 50 mM Natrium β-Glycerophosphat/0.066 % SDS, pH 7.0 (c=0.05 mg/ml).

Die Operation wurde von Prof. Dr. R. Müller und Mitarbeitern nach Totalanästhesie (intravenös Dormicum®, Fa. ROCHE LTD, BASEL, SCHWEIZ, Ketamin) kombiniert mit einem periduralem Lokalanästhetikum (5 ml Carbostesin®, Astra 0.25 %) durchgeführt. Nach Markierung der Gelenkkavität mit einer Kanüle, wurden zwei Löcher mit einem Durchmesser von jeweils 7 mm und 2.2-2.5 mm tief gebohrt und in jedem Loch zwei Implantate vollständig im Knochen versenkt. Nach Schließung der Wunde und Ende der Narkose wurde den Schafen ein prophylaktisches Antibiotikum (4 ml Tardomycocel comp III, Fa. BAYERVITAL, Leverkusen) verabreicht. Die Tiere konnten sich direkt nach der Implantation im freien Lauf unter Vollbelastung des Femurs bewegen. In allen Fällen betrug die Beobachtungszeit vier Wochen (28 d).

Die Schafe wurden durch Applikation (i.m.) mit Dormicum® (Fa. ROCHE LTD. Basel, Schweiz) und Ketamin narkotisiert und durch intravenöse Injektion von 20 ml T61 (Fa. HOECHST-ROUSSEL VET., Frankfurt) eingeschläfert. Die distalen Femori wurden explantiert und einer Röntgenuntersuchung unterzogen (Kontaktradiographie, FAXITRON SERIES, Fa. HEWLETT PACKARD). Die Knochen wurden in zunehmenden Alkohollösungen entwässert, dann in Histeoclear® (Fa. SCHANDAN, Frankfurt) und über Monate in Technovit® 9100 (Fa. HERAEUS-KULZER, Weinheim) bei -20 °C eingebettet. Mittels einer oszillierenden Diamantbandsäge (Fa. EXAKT APPARATEBAU, Norderstedt) wurden 100 µm dicke Querschnitte durch die Knochenimplantatseite durchgeführt und anschließend für die mikroskopischen Schnitte präpariert. Diese wurden nach zusätzlichem Schleifen und Polieren für die Mikroradiographie einer Röntgenuntersuchung unterworfen.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung einer stabilen chemischen Primärschicht an den Metalloberflächen und einer weiteren Biologisierungsschicht, die mit dem Zielgewebe wechselwirken und zur Verbesserung des Heilungsprozesses und der Integration von Implantatmaterialien führen kann.

4.1 Chemische Modifikation von Metalloberflächen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten metallischen Biomaterial-Werkstoffe, die nach der im Kapitel 3.1.1 beschriebenen Chromschwefelsäure-Methode behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu ihren Kontrollen charakteristische Oberflächeneigenschaften, wie erhöhte Bindungskapazität für die Immobilisierung von Proteinmolekülen, die mit einer Oberflächenvergrößerung durch das Ätzen zusammenhängt. Die Behandlung der verwendeten Metalloberflächen mit Chromschwefelsäure führte zu einer stabilen, oberflächenvergrößerten, mikroskopisch homogenen Schicht.

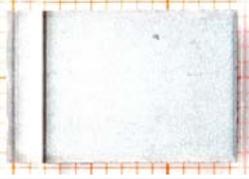
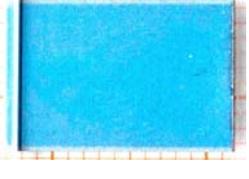
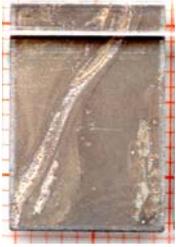
	Oberflächenbehandlung	Gereinigt	Chromschwefelsäure oxidiert
A	Titan Elektropoliert		
B	Titan anodisch oxidiert	(i).  (ii). 	
C	316L rostfreier Stahl elektropoliert		
D	CoCrMo-Legierung sandgestrahlt		
E	Titanplasma-spray- beschichtete Titanlegierung		

Abbildung 4.1: Makroskopische Aufnahmen von Metallplättchen vor und nach Behandlung mit Chromschwefelsäure.

4.1.1 Charakterisierung der Oberflächen mittels Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung und der Rockwell Adhäsionstest von Stahl- und Titanplättchen wurden von Herrn Dipl.-Ing. R. Büscher (AG Prof. Dr. A. Fischer) im Institut für Werkstofftechnik der Universität Duisburg-Essen im Rahmen einer Kooperation durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigen nach Behandlung mit der Chromschwefelsäure-Methode charakteristische Strukturen.

Die Abbildung 4.2 zeigt ein elektropoliertes Stahlplättchen (A) und ein elektropoliertes Titanplättchen (B). Oben sind die unbehandelten (A und B) und unten die mit Chromschwefelsäure behandelten Plättchen zu sehen (C und D). Das behandelte Stahlplättchen zeigt eine geometrisch definierte polygonale Struktur mit Dimensionen 4 - 5 μm und das behandelte Titanplättchen eine „blumenkohlartige“ Struktur mit Dimensionen bei 1 μm . Ferner zeigen die mit Chromschwefelsäure behandelten Oberflächen eine nanostrukturierte passive Oxidschicht mit einer Dicke von 50 – 150 nm für Titan und 10 – 50 nm für Stahl.

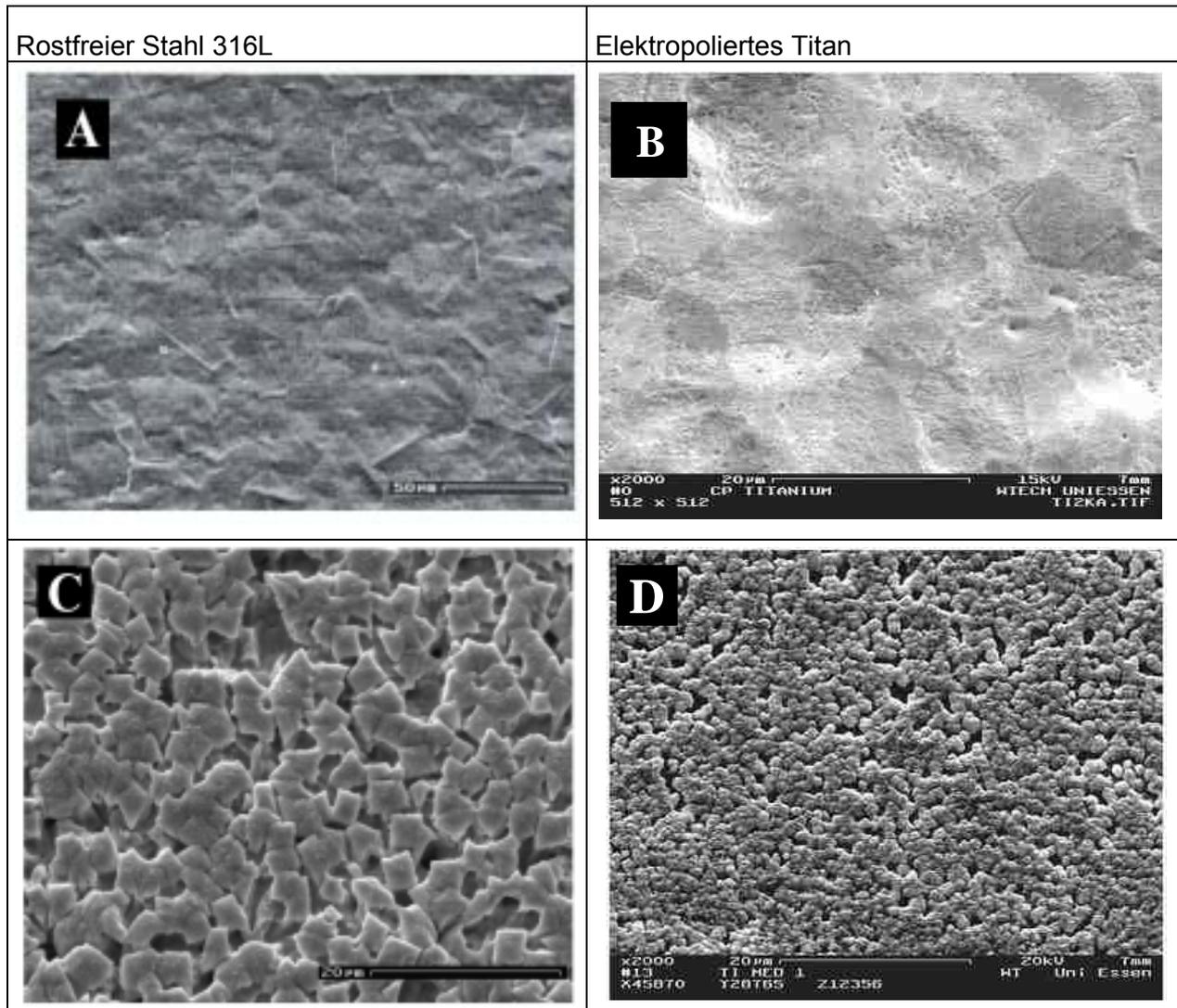


Abbildung 4.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von elektropolierten Stahlplättchen (A und C): elektropolierte Kontrolle (A), mit Chromschwefelsäure behandelte Stahloberfläche (C) und Titanplättchen mit 2000-facher Vergrößerung (B und D): elektropolierte Kontrolle (B), mit Chromschwefelsäure behandelte Titanoberfläche (D).

Der Rockwell Adhäsionstest wurde mittels eines Härteprüfgerätes zur Abschätzung der Bindungskräfte der gebildeten Oxidschicht nach Behandlung der Metallplättchen mit Chromschwefelsäure durchgeführt. Hierbei wird ein Diamant- oder metallischer Kegel (Indenter) mit definierter Kraft (Anfangskraft = 98.1 N und Zusatzantrieb = 1373 N) auf die Oberfläche hineingedrückt. Auf diese Art kann die Zerbrechlichkeit und die Adhäsion der Oberfläche zur unteren Schicht kontrolliert werden. Aus der Abbildung 4.3 lässt sich erkennen, dass sowohl für Titan als auch für Stahl die Oberfläche nach Behandlung mit Chromschwefelsäure weder spröde noch leicht zu entfernen ist. Tatsächlich zeigen beide Oberflächen eine hohe Plastizität, die der eigenen Metalloberfläche sehr ähnlich ist. Der

Kegel drückt die Polygonalstrukturen des Stahls und die „blumenkohlartigen“ Strukturen des Titans zusammen, ohne dass Brüche oder die Zerstörung von Schichten entstehen.

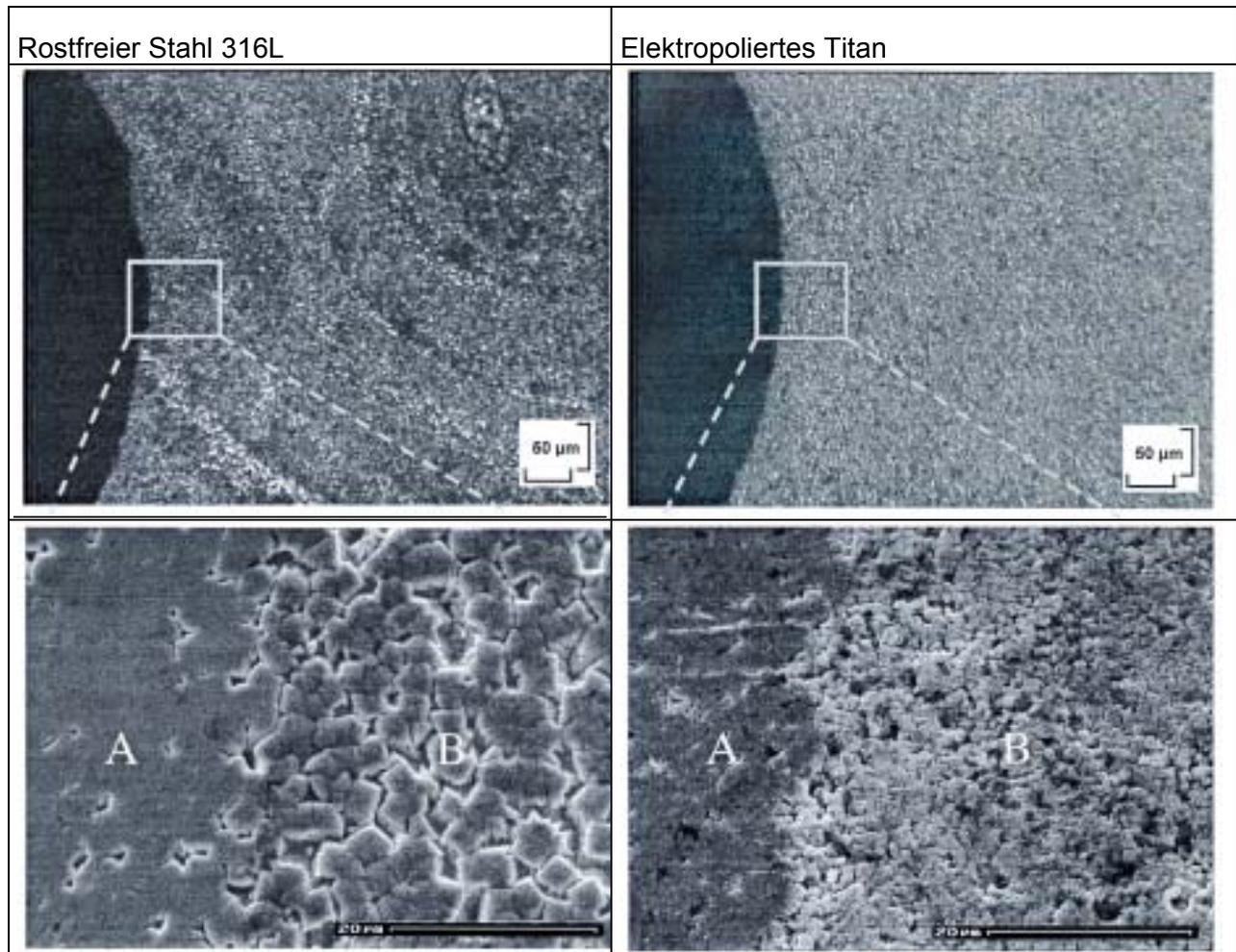


Abbildung 4.3: Mikroskopische Aufnahmen vom Rockwell Adhäsionstest für Titan- und Stahlplättchen zur Abschätzung der Bindungskräfte der Oberfläche nach Oxidation mit Chromschwefelsäure. Die oberen Aufnahmen wurden mit einem Reflexionslichtmikroskop mit 100-facher Vergrößerung erhalten und zeigen den Indenter-Abdruck auf der linken Seite als dunklen Halbkreis und die native Oberfläche auf der rechten Seite. Die unteren Bilder zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der eingerahmten Vierecke, die auf dem oberen Bild dargestellt werden und umfassen den Übergangsbereich zwischen zusammengedrückter und nativer Oberfläche.

4.1.2 Charakterisierung der Oberflächen mittels konfokaler Laser-Rasterelektronenmikroskopie (CLSM)

Da die Titan- und Stahloberflächen nach Behandlung mit Chromschwefelsäure eine höhere Bindungskapazität an Proteinmolekülen aufwiesen, war es denkbar, dass dieser Effekt mit der Vergrößerung der Oberfläche zusammenhängt. Aus diesem Grund wurde die Fläche der Metallplättchen vor und nach Behandlung mit Chromschwefelsäure mittels konfokaler Laser-Rasterelektronenmikroskopie (CLSM) gemessen und das Verhältnis zwischen gemessener realer und geometrischer Fläche gebildet. Dieses Verhältnis nach der Behandlung mit Chromschwefelsäure beträgt für das elektropolierte Titan 2.5, für den 316L rostfreien Stahl 2.5, für die Titanplasmaspray-beschichtete Titanlegierung 20 und für die Cobaltchrommolybdän-Legierung 3.5. Ohne Behandlung mit Chromschwefelsäure, bzw. nur bei Vorbehandlung mit HNO_3 liegen die Verhältnisse für die Titanplasmaspray-beschichtete Titanlegierung bei 10 und für die Cobaltchrommolybdän-Legierung bei 1.5. Für die beiden letzten Oberflächen lässt sich eine Vergrößerung um Faktor 2 – 2.5 ermitteln.

Tabelle 4.1: Bestimmung der Oberflächenvergrößerung vor (HNO_3) und nach Behandlung mit der Chromschwefelsäure (CSS) für elektropoliertes Titan, Titanplasmaspray-beschichtete Titanlegierung, rostfreien Stahl und Cobaltchrommolybdän-Legierung mittels konfokaler Laser-Rasterelektronenmikroskopie. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Ing. R. Büscher, AG. Prof. Dr. A. Fischer, Institut für Werkstoffkunde, Universität Duisburg-Essen und mit Herrn Dipl.-Ing. Ch. Heßing, AG. Prof. Dr. M. Pohl, Institut für Werkstoffe, Ruhr-Universität Bochum ermittelt.

Metall	A_m / A_g (gemessene/geometrische)
Titan, elektropoliert, CSS	2.5
316L rostfreier Stahl, CSS	2.5
Titanplasmaspray-beschichtete Titanlegierung, HNO_3	10
Titanplasmaspray-beschichtete Titanlegierung, CSS	20
Cobaltchrommolybdän-Legierung, HNO_3	1.5
Cobaltchrommolybdän-Legierung, CSS	3.5

4.1.3 Messung und Stabilität des dynamischen Kontaktwinkels

Wegen der zunehmenden Bedeutung der hydrophilen Eigenschaften einer Oberfläche in biologischen Systemen, wurden dynamische Kontaktwinkelmessungen an allen Metalloberflächen, die mit einer Proteinschicht im Rahmen dieser Arbeit biologisiert wurden, durchgeführt.

Der dynamische Kontaktwinkel von rechteckigen elektrolytisch polierten Titan-, anodisch oxidierten Titan-, 316-L rostfreien Stahl- und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen wurde in Wasser nach der Wilhelmy-Plate-Methode gemessen. Zum Vergleich wurden ebenfalls rechteckige Quarzglasplättchen zur Bestimmung des Kontaktwinkels gemessen, die nach dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reinigungsverfahren behandelt wurden (s. Kapitel 3.2.1).

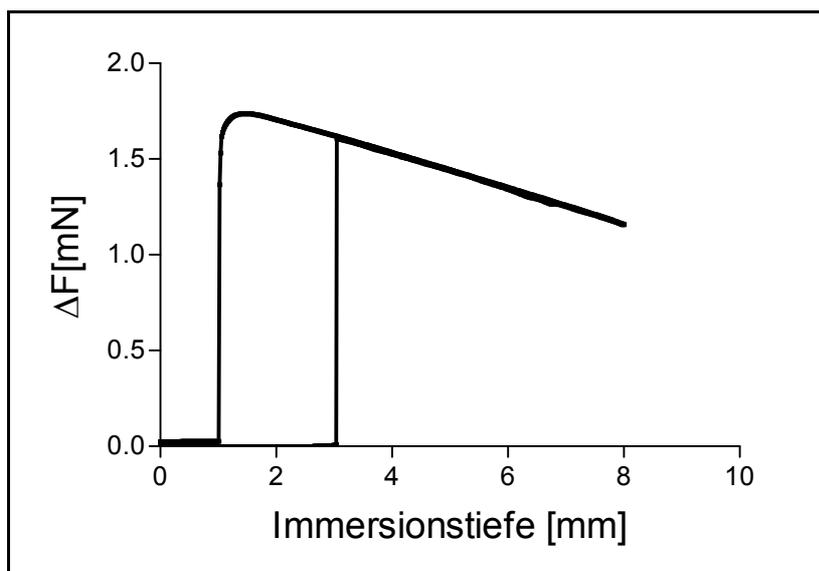


Abbildung 4.4: Beispiel einer ultrahydrophilen Quarzglasoberfläche. Der Kontaktwinkel beträgt im hier dargestellten Fall $\theta = 0^\circ$ für Vorrück- und Rückzugswinkel. Die Kontaktwinkelmessung zeigt eine vollkommene Hysteresefreiheit ($\Delta\theta = 0^\circ$).

Die elektrolytischen Titanoberflächen (s. Tabelle 4.2) zeigen nach Reinigung mit Aceton Vorrückwinkel von 60° , nach Behandlung mit 5 % Salpetersäure 40° und nach Behandlung mit Chromschwefelsäure 1° . Anodisch oxidierte Titanoberflächen weisen nach Aceton-Reinigung Vorrückwinkel von 75° auf, nach Behandlung mit 5 % Salpetersäure 40° und nach Chromschwefelsäure-Behandlung 2° . Für den rostfreien Stahl 316-L wurden nach

Aceton-Reinigung Vorrückwinkel von 48° gemessen, nach Salpetersäure-Behandlung 55° und nach Chromschwefelsäure-Ätzung 9° . Schließlich wurden für die Cobaltchromlegierung nach Aceton-Reinigung Vorrückwinkel von 66° erhalten, nach Salpetersäure-Behandlung 48° und nach Chromschwefelsäure-Behandlung 7° . Es ist damit erkennbar, dass der Vorrückwinkel nach Behandlung mit 5 % Salpetersäure um ca. 20° erniedrigt wird. Aus den Kontaktwinkeln aller acetongereinigten und salpetersäurebehandelten Metallplättchen lässt sich eine große Hysterese von ca. $30 - 65^\circ$ erkennen. Nach Behandlung der Titanplättchen mit Chromschwefelsäure ist keine Hysterese zu beobachten. Im Falle der rostfreien Stahl- und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen wurde ebenfalls keine oder nur eine sehr geringe Hysterese gemessen. Oberflächen, die nach Behandlung mit Chromschwefelsäure dynamische Kontaktwinkel unter 10° und keine Kontaktwinkelhysterese aufweisen, werden als ultrahydrophile Oberflächen bezeichnet [Jennissen, 2001].

Eine wichtige Fragestellung war, wie stabil diese ultrahydrophilen Metalloberflächen nach Behandlung mit Chromschwefelsäure sind. Nachdem die dynamischen Kontaktwinkel-messungen sofort nach der Säurebehandlung durchgeführt wurden, war es wichtig, die funktionelle Stabilität dieser Metalloberflächen nach siebenwöchiger (50 d) Lagerung in Methanol zu untersuchen. Aus folgender Tabelle lässt sich deutlich erkennen, dass alle Metallplättchen mit einziger Ausnahme der Stahlplättchen nach 50-tägiger Lagerung in Methanol immer noch ultrahydrophile Eigenschaften mit dynamischen Kontaktwinkeln unter 10° aufweisen. Im Fall der rostfreien Stahlplättchen ist die Erhöhung des Vorrückwinkels von 9° auf 14° wahrscheinlich nicht signifikant.

Tabelle 4.2: Dynamische Kontaktwinkelmessungen nach der Wilhelmy-Plate Methode mit Standardabweichung ($10 \geq n \geq 3$). Unterschiedlich oberflächenbehandelte Metallplättchen wurden direkt nach Behandlung oder 50 d nach Lagerung in Methanol in der Wilhelmy-Plate-Apparatur gemessen. Aceton: mit Aceton gereinigt, HNO₃: mit 5 % Salpetersäure behandelt, CSS: mit Chromschwefelsäure behandelt.

Oberflächen- behandlung	Kontaktwinkel, ° sofort gemessen			Kontaktwinkel, ° nach 50 d		
	Vorrück	Rückzug	Hysterese	Vorrück	Rückzug	Hysterese
Titan elektro- poliert, Aceton	61 ± 1 (2)	3 ± 1	58			
Titan elektro- poliert, HNO ₃	39 ± 6 (5)	13 ± 4	26	39 ± 7 (4)	8 ± 5	31
Titan elektro- poliert, CSS	1 ± 1 (5)	1 ± 2	0	3 ± 3 (4)	3 ± 2	0
Titan anodisch oxidiert, Aceton	75 ± 2 (2)	9 ± 4	66			
Titan anodisch oxidiert, HNO ₃	41 ± 2 (3)	8 ± 2	33	55 ± 12 (4)	5 ± 2	50
Titan anodisch oxidiert, CSS	2 ± 3 (4)	0 ± 0	2	6 ± 5 (4)	1 ± 2	5
316-L rostfreier Stahl, Aceton	48 ± 2 (2)	5 ± 5	43			
316-L rostfreier Stahl, HNO ₃	55 ± 4 (5)	13 ± 8	42			
316-L rostfreier Stahl, CSS	9 ± 6 (6)	9 ± 6	0	14 ± 1 (4)	7 ± 2	7
CoCrMo- Legierung, Aceton	66 ± 6 (3)	7 ± 4	59			
CoCrMo- Legierung, HNO ₃	48 ± 2 (2)	5 ± 1	43			
CoCrMo- Legierung, CSS	7 ± 10 (10)	2 ± 4	5	6 ± 8 (4)	3 ± 4	3

In der Abbildung 4.5 werden dynamische Kontaktwinkelmessungen nach der Wilhelmy-Plate-Methode für elektropolierte Titanplättchen und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen

nach den drei Behandlungen (mit Aceton, HNO_3 und CSS) dargestellt. Es lässt sich erkennen, wie der Kontaktwinkel nach der Behandlung der Plättchen mit Chromschwefelsäure abnimmt und dabei die Hysterese gleich 0 ist.

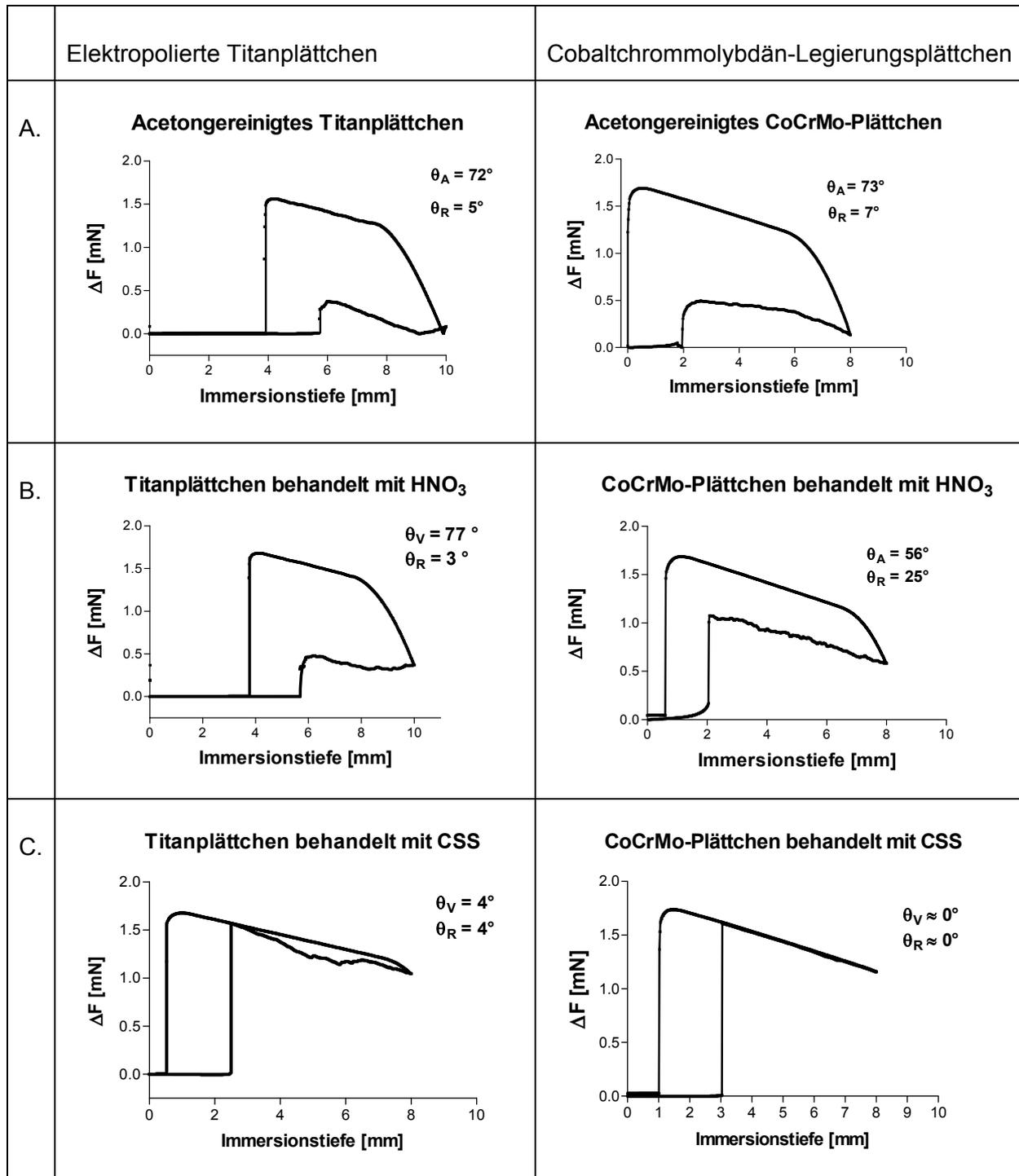


Abbildung 4.5: Dynamische Kontaktwinkelmessungen nach der Wilhelmy-Plate-Methode für elektropolierte Titanplättchen (linke Spalte) und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen (rechte Spalte): A. acetongereinigt, B. mit 5 % Salpetersäure (HNO_3) behandelt und C. mit Chromschwefelsäure (CSS) geätzt.

Die Stabilität der Kontaktwinkel nach 50-tägiger Lagerung in Methanol wird in den Messungen der Abbildung 4.6 dargestellt. Bei allen Metallplättchen – mit Ausnahme des rostfreien Stahls – werden Vorrück- und Rückzugswinkel unter 10° und eine sehr geringe oder keine Hysterese gemessen.

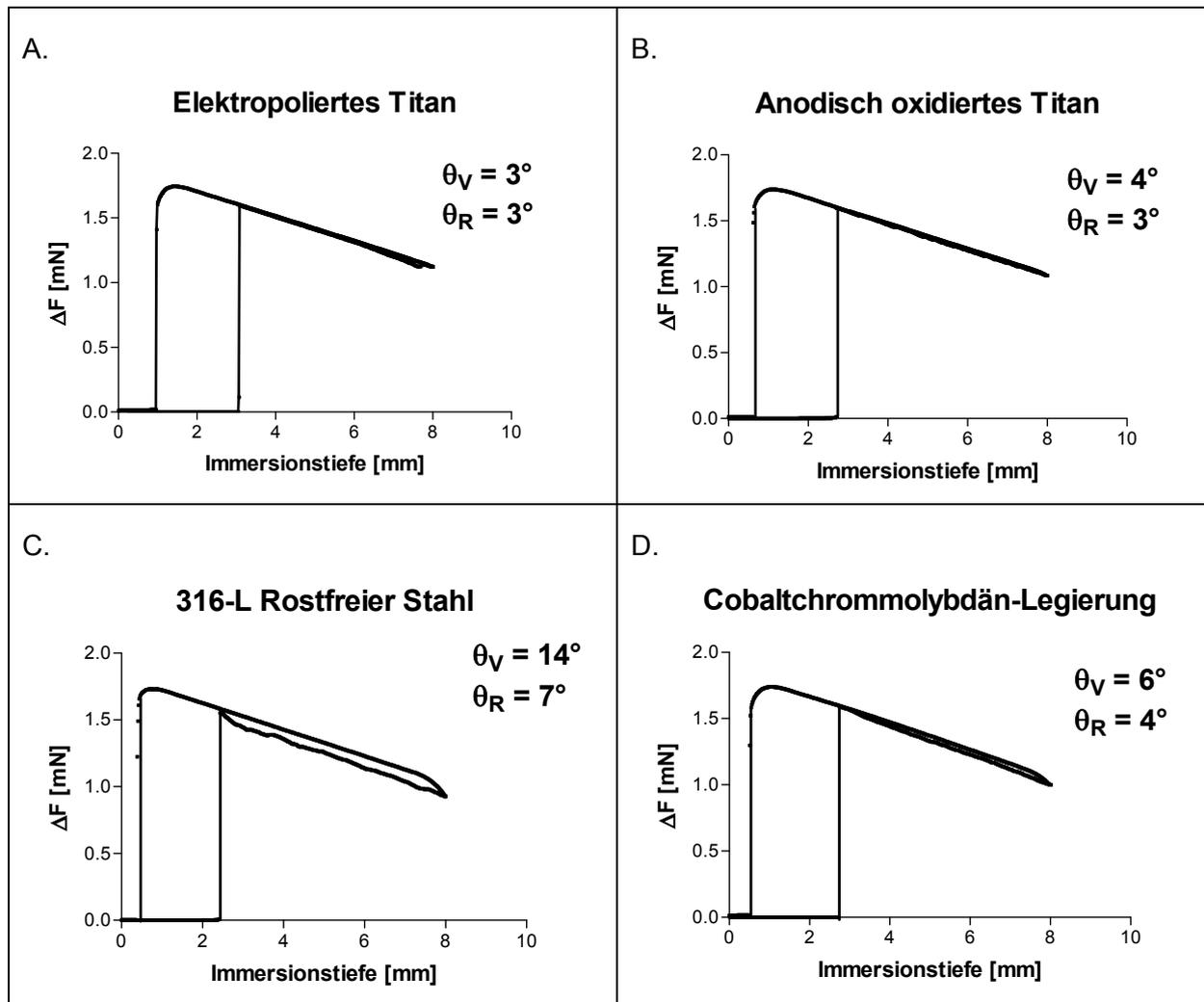


Abbildung 4.6: Messungen des dynamischen Kontaktwinkels nach der Wilhelmy-Plate-Methode nach 50 d Lagerung der mit Chromschwefelsäure behandelten Plättchen in Methanol. θ_V = Vorrückwinkel, θ_R = Rückzugswinkel und $\Delta\theta$ = Hysterese. A. Elektropoliertes Titanplättchen mit $\theta_V = 3^\circ$, $\theta_R = 3^\circ$ und $\Delta\theta = 0^\circ$. B. Anodisch oxidiertes Titanplättchen mit $\theta_V = 4^\circ$, $\theta_R = 3^\circ$ und $\Delta\theta = 1^\circ$. C. 316-L rostfreies Stahlplättchen mit $\theta_V = 14^\circ$, $\theta_R = 7^\circ$ und $\Delta\theta = 7^\circ$. D. Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen mit $\theta_V = 6^\circ$, $\theta_R = 4^\circ$ und $\Delta\theta = 2^\circ$.

4.2 Biochemie immobilisierter Proteine auf Metalloberflächen

4.2.1 Immobilisierung von Ubiquitin

Unter dem Begriff der Immobilisierung sind im Rahmen dieser Arbeit die Adsorption und die kovalente Kopplung der Proteine Ubiquitin und rhBMP-2 zu verstehen.

Die Immobilisierung des Modellproteins Ubiquitin auf Titanoberflächen erfolgte nach (i) Modifizierung des Metalls mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) oder (ii) Modifizierung mit APS und anschließender Aktivierung mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) (s. Kapitel 3.3.2). Im ersten Fall wird die Adsorption (nicht-kovalente Immobilisierung) des Proteins auf einer silanisierten Metalloberfläche untersucht. Im zweiten Fall wird die kovalente Kopplung des Proteins durch Aktivierung der Metalloberfläche mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) ermöglicht. Darüberhinaus wurde die Adsorption auf chemisch unmodifizierten (oder nicht-funktionalisierten) Metalloberflächen, sogenannten Kontrollen untersucht. Im folgenden sei in diesem Zusammenhang der Begriff der unspezifischen Adsorption verwendet.

Die nicht-kovalente und kovalente Bindung sowie die unspezifische Adsorption des Modellproteins Ubiquitin an elektropolierten Titanplättchen (10 x 15 x 1 mm) wurden für die Ubiquitinlösungen mit den Konzentrationen 0.3 und 1.0 mg/ml der Inkubationslösung in der Tabelle 4.3 dargestellt. Dabei wurden unbehandelte Kontrollen (HNO_3) und mit Chromschwefelsäure behandelten Metalloberflächen (CSS) als Grundoberflächen verwendet. Die Oberflächenbeladung steigt mit zunehmender Konzentration der Ubiquitin-Inkubationslösung. Die adsorbierten Proteinmengen auf der Ti- HNO_3 -APS-Oberfläche betragen 509 und auf der mit Chromschwefelsäure-behandelten Oberfläche (Ti-CSS-APS) 762 ng/cm^2 in der Proteinlösung mit der Konzentration von 0.3 mg/ml. Bei einer Protein-Inkubationslösung mit der Konzentration von 1.0 mg/ml beträgt die adsorbierte Ubiquitinmenge auf der Ti- HNO_3 -APS-Oberfläche 826 und auf der mit Chromschwefelsäure-behandelten Oberfläche (Ti-CSS-APS) 1334 ng/cm^2 . Die immobilisierten Ubiquitinmengen in einer Protein-Inkubationslösung mit der Konzentration von 0.3 mg/ml betragen auf der Ti- HNO_3 -APS-CDI-Oberfläche 1078 und auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche 1683 ng/cm^2 .

Zwischen den nicht-kovalent immobilisierten Mengen auf den Oberflächen HNO₃-APS und CSS-APS liegt für beide Konzentrationen der Proteinlösung ein Faktor von 1.6 in der Beladungsmenge. Zwischen den immobilisierten Beladungsmengen bei der Proteinkonzentration von 0.3 mg/ml auf den Oberflächen HNO₃-APS-CDI und CSS-APS-CDI liegt ein Faktor von 1.6. Dieser Faktor könnte durch eine vergrößerte Titanoberfläche oder vermehrte Hydroxylgruppen auf der Oberfläche nach der Behandlung mit Chromschwefelsäure erklärt werden.

Die gemessene unspezifische Adsorption von Ubiquitin an elektropolierten Titanplättchen lieferte für die Inkubationslösung mit der Konzentration von 0.3 mg/ml Beladungswerte von 63 ng/cm² für die unbehandelten Kontrollen (HNO₃) bzw. 13 ng/cm² für die mit Chromschwefelsäure behandelten Titanoberflächen (CSS). Diese unspezifisch adsorbierten Mengen entsprechen 4 bzw. 0.8 % der immobilisierten Proteinmenge auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche. Vergleichbar niedrig waren die Werte der unspezifischen Adsorption bei einer Ubiquitinlösung mit der Konzentration von 1.0 mg/ml, wobei die entsprechenden Beladungsmengen bei 88 ng/cm² für die unbehandelten Kontrollen (HNO₃) und bei 15 ng/cm² für die mit Chromschwefelsäure behandelten Titanplättchen (CSS) liegen (s. Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Abhängigkeit der immobilisierten Menge an ¹²⁵I-Ubiquitin von der Konzentration der Ubiquitinlösung. Immobilisierung von Ubiquitin auf elektropolierten Titanplättchen (10 x 15 x 1 mm). Die Inkubation der Metallplättchen erfolgte in 0.3 bzw. 1.0 mg/ml ¹²⁵I-CT-Ubiquitin-Lösung in 50 mM Na₂HPO₄ Puffer bei pH 10.0. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm²] beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Titan elektropoliert Modifizierung	Immobil. Ubiquitin 0.3 mg/ml [ng/cm ²]	Immobil. Ubiquitin 1.0 mg/ml [ng/cm ²]
HNO ₃ -Kontrollen	63 ± 7 (n=12)	88 ± 15 (n=3)
CSS-Kontrollen	13 ± 5 (n=12)	15 ± 5 (n=3)
HNO ₃ -APS, nicht-kovalent	509 ± 54 (n=12)	826 ± 33 (n=3)
CSS-APS, nicht-kovalent	762 ± 48 (n=12)	1334 ± 144 (n=3)
HNO ₃ -APS-CDI	1078 ± 30 (n=9)	-
CSS-APS-CDI	1683 ± 60 (n=9)	-

In der Tabelle 4.4 werden die Ergebnisse einer Wiederholung der Immobilisierung von Ubiquitin dargestellt, um die Reproduzierbarkeit des Experimentes, das in der Tabelle 4.3 aufgeführt wurde, zu überprüfen. Hierbei wurden ebenfalls sowohl Oberflächen mit der gleichen chemischen Modifikation als auch Ubiquitinlösungen mit den Konzentrationen 0.3 und 1.0 mg/ml zur Inkubation verwendet. Die adsorbierten Proteinmengen auf der Ti-HNO₃-APS-Oberfläche betragen 1.9 und auf der mit Chromschwefelsäure-behandelten Oberfläche (Ti-CSS-APS) 3.3 µg/cm² in der Proteinlösung mit der Konzentration von 0.3 mg/ml. Bei einer Proteinlösung mit der Konzentration von 1.0 mg/ml beträgt die adsorbierte Ubiquitinmenge auf der Ti-HNO₃-APS-Oberfläche 2.2 und auf der mit Chromschwefelsäure-behandelten Oberfläche (Ti-CSS-APS) 3.8 µg/cm². Die immobilisierten Ubiquitinmengen in einer Protein-Inkubationslösung mit der Konzentration von 0.3 mg/ml betragen auf der Ti-HNO₃-APS-CDI-Oberfläche 2.2 und auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche 5.4 µg/cm². Bei einer Proteinlösung mit der Konzentration von 1.0 mg/ml beträgt die adsorbierte Ubiquitinmenge auf der Ti-HNO₃-APS-CDI-Oberfläche 2.5 und auf der mit Chromschwefelsäure-behandelten Oberfläche (Ti-CSS-APS-CDI) 7.2 µg/cm².

Zwischen den nicht-kovalent immobilisierten Mengen auf den Oberflächen HNO₃-APS und CSS-APS liegt für beide Inkubations-Konzentrationen ein Faktor von 1.7 in der Beladungsmenge. Zwischen den immobilisierten Beladungsmengen auf den Oberflächen HNO₃-APS-CDI und CSS-APS-CDI liegt ein Faktor von 2.4 bzw. 2.9.

Die unspezifische Adsorption des Ubiquitin auf elektropolierten Titanplättchen für die Inkubationslösung mit der Konzentration 0.3 mg/ml lieferte Beladungswerte von 266 ng/cm² für die unbehandelten Kontrollen (HNO₃) und 108 ng/cm² für die mit Chromschwefelsäure behandelten Titanoberflächen (CSS). Diese adsorbierten Mengen entsprechen 5 bzw. 2 % der immobilisierten Proteinmenge auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche. Vergleichbar niedrig – 5 bzw. 3 % waren die Werte der unspezifischen Adsorption bei einer Ubiquitin-Inkubationslösung mit der Konzentration von 1.0 mg/ml, wobei die entsprechenden Beladungsmengen bei 330 ng/cm² für die unbehandelten Kontrollen und bei 202 ng/cm² für die mit Chromschwefelsäure behandelten Titanplättchen liegen.

Tabelle 4.4: Wiederholung des Immobilisierungsexperimentes zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit: Abhängigkeit der immobilisierten Menge an ^{125}I -Ubiquitin von der Konzentration der Ubiquitinlösung. Immobilisierung von Ubiquitin auf elektropolierten Titanplättchen (10 x 15 x 1 mm) (n=3). Die Inkubation der Metallplättchen erfolgte in 0.3 bzw. 1.0 mg/ml ^{125}I -CT-Ubiquitin-Lösung in 50 mM Na_2HPO_4 Puffer bei pH 10.0. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Titan, elektropoliert Modifizierung	Immobil. Ubiquitin c = 0.3 mg/ml [ng/cm ²]	Immobil. Ubiquitin c = 1.0 mg/ml [ng/cm ²]
HNO ₃ -Kontrollen	266 ± 44	330 ± 46
CSS-Kontrollen	108 ± 14	202 ± 53
HNO ₃ -APS, nicht-kovalent	1911 ± 69	2169 ± 282
CSS-APS, nicht-kovalent	3314 ± 120	3769 ± 248
HNO ₃ -APS-CDI	2218 ± 137	2503 ± 160
CSS-APS-CDI	5351 ± 641	7213 ± 161

Beim Vergleich der absoluten Beladungswerte zwischen Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4 lässt sich erkennen, dass trotz identischen Modifikationsbedingungen die Beladungsmengen der Tabelle 4.4 um einen Faktor von 2 – 4 höher liegen. Das konnte durch die unterschiedliche Anzahl reaktiver Gruppen auf der Metalloberfläche erklärt werden. Solche Unterschiede können auf der Reaktivität des Silans mit den Hydroxylgruppen der Metallmatrix beruhen. Außerdem wird in der Tabelle 4.4 keine signifikante Abhängigkeit der Beladung von der Proteinkonzentration beobachtet.

Weiterhin wurde die Immobilisierung von Ubiquitin auf elektropolierten Titan- und rostfreien Stahlplättchen 316L in einer Ubiquitin-Inkubationslösung mit der Konzentration von 0.9 mg/ml untersucht. Zusätzlich wurden in diesem Experiment zwei unterschiedliche Methoden zur Entfernung des Proteins nach der Inkubation der Metallplättchen in der Proteinlösung verwendet: eine Waschung mit Phosphat-Puffer bei pH 10.0 und anschließend mit einer alkalischen Natriumdodecylsulfat-Lösung (0.1 N NaOH / 1 % SDS) bei 60 °C für 15 min (s. Tabelle 4.5). Die adsorbierten Ubiquitinmengen betragen auf der Ti-HNO₃-APS-Oberfläche 0.3 und auf der Ti-CSS-APS-Oberfläche 4.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Für Stahl-CSS-APS liegt die Beladungsmenge bei 0.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die immobilisierten Ubiquitinmengen liegen für Ti-HNO₃-

APS-CDI bei 1.3 und für Ti-CSS-APS-CDI bei 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Für Stahl betragen die entsprechenden Mengen 0.65 und 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Auf elektropoliertem Titan werden mit 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ doppelt so hohe Ubiquitinmengen kovalent gebunden (auf CSS-APS-CDI) als auf Stahl mit 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die um einen Faktor von 5 – 6 höheren Ubiquitinmengen auf Stahl- und Ti-CSS-APS-CDI im Vergleich zu Stahl- und Ti-HNO₃-APS-CDI könnten durch eine Oberflächenvergrößerung oder Vermehrung der Hydroxylgruppen auf der Metalloberfläche nach der Behandlung mit Chromschwefelsäure erklärt werden.

Die unspezifisch adsorbierten Proteinmengen liegen für beide Metalloberflächen in der gleichen Größenordnung. Nach Waschen mit dem Phosphatpuffer entsprechen die unspezifisch adsorbierten Proteinmengen auf Ti-HNO₃ 5 % und auf Ti-CSS 2 % der immobilisierten Mengen auf der CSS-APS-CDI-Oberfläche. Beim rostfreien Stahl entspricht die unspezifisch adsorbierte Ubiquitinmenge auf Stahl-HNO₃ 10 % und auf Stahl-CSS 5 % der immobilisierten Menge auf der Stahl-CSS-APS-CDI-Oberfläche.

Das Waschen der Metallplättchen mit einer alkalischen Natriumdodecylsulfat-Lösung (0.1 N NaOH / 1 % SDS) bei 60 °C für 15 min führt, wie aus der Tabelle 4.5 zu entnehmen ist, zu einer Abnahme der zurückgebliebenen Proteinmenge auf der Oberfläche um bis zu 97 %. Natriumdodecylsulfat, der Schwefelsäureester des Laurylalkohols (SDS, C₁₂H₂₅-O-SO₃Na) ist ein Detergens mit stark amphiphilen Eigenschaften. Es zerlegt oligomere Proteine in die Untereinheiten und denaturiert diese. An die entfalteten Peptidketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Schwache Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte, ionische Bindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorbens werden zerstört und somit löst sich das Protein durch eine Spaltung der Bindung von der Metalloberfläche ab.

Diese Waschmethode führt innerhalb von 15 min zu einer bis 97 % Freisetzung des Proteins von der Oberfläche und zur Denaturierung des Proteins. Die beobachtete Ablösung des Proteins von der Oberfläche macht sich besonderes stark bei der nicht-kovalenten Immobilisierung bemerkbar. Nach dem Waschen mit NaOH / SDS bleiben bei der nicht-kovalent immobilisierten Beladungsmenge (auf Ti-HNO₃-APS) nur noch 30 von ursprünglich 300 ng/cm^2 (3 – 10 %). Auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche bleiben 2.6 von ursprünglich immobilisierten 8.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (33 %) zurück. Auf Stahl-CSS-APS bleiben nur noch 8 von

ursprünglich immobilisierten 300 ng/cm^2 (3 %) zurück und auf Stahl-CSS-APS-CDI 1.3 von $4 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ (33 %).

Tabelle 4.5: Vergleich zwischen Waschen der Metallplättchen mit Phosphat-Puffer und einer alkalischen Natriumdodecylsulfatlösung nach der Immobilisierung von ^{125}I -Ubiquitin auf elektropolierten Titan- und rostfreien Stahlplättchen 316L (10 x 15 x 1 mm). Die Inkubation der Metallplättchen (n=2) erfolgte in einer ^{125}I -CT-Ubiquitinlösung mit der Konzentration von 0.9 mg/ml in 50 mM Na_2HPO_4 Puffer bei pH 10.0. Nach der Immobilisierung wurde mit Puffer und anschließend 15 min mit einer 0.1 N NaOH / 1 % SDS Lösung bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ gewaschen und die Beladungsmengen berechnet. Der mit Sternchen (*) gekennzeichnete Beladungswert von 4180 ng/cm^2 auf Ti-CSS-APS wurde aus dem Verhältnis der immobilisierten Werte der Ti-APS-CDI zu Ti-APS der Tabelle 4.4 errechnet. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng/cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Oberflächen-modifizierung	Immobilisiertes Ubiquitin auf elektropoliertem Titan c = 0.9 mg/ml [ng/cm ²]			Immobilisiertes Ubiquitin auf rostfreiem Stahl 316L c = 0.9 mg/ml [ng/cm ²]		
	nach Puffer-Waschung	nach NaOH-Waschung		nach Puffer-Waschung	nach NaOH-Waschung	
HNO ₃ -Kontrollen	410	30	7 %	410	21	5 %
CSS-Kontrollen	130	9	7 %	200	12	6 %
HNO ₃ -APS	300	30	10 %	-	-	-
CSS-APS	4180*	-	-	300	8	3 %
HNO ₃ -APS-CDI	1300	350	27 %	650	150	23 %
CSS-APS-CDI	8000	2600	33 %	4000	1300	33 %

Die bisher angegebenen Beladungswerte bezogen sich auf die geometrischen Oberflächen. Nachdem das Verhältnis zwischen geometrischer und realer Oberfläche ermittelt wurde (s. Tabelle 4.1), lassen sich an dieser Stelle die immobilisierten Ubiquitinmengen pro realer Fläche berechnen (s. Tabelle 4.6). Somit betragen die Beladungswerte pro realer Fläche für Ti-CSS-APS 1.7 und für Ti-CSS-APS-CDI $3.2 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$. Bei rostfreiem Stahl liegen die Beladungswerte pro realer Fläche mit 0.1 für CSS-APS und $1.6 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ für CSS-APS-CDI niedriger als beim Titan.

Tabelle 4.6: Beispielhafte Umrechnung des immobilisierten ^{125}I -Ubiquitin auf realer Titan- und rostfreier Stahloberfläche. Die Beladungswerte pro geometrischer Fläche stammen aus der Tabelle 4.5. $c_{\text{Ubiquitin}} = 0.9 \text{ mg/ml}$.

Metall / Biomaterial	Modifikation	A_m / A_g (gemessen/geometr.)	Immobil. ^{125}I -Ubiquitin [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	
			pro geometr. Fläche	pro realer Fläche
Titan, electropoliert,	APS	2.5	4.2	1.7
CSS	APS-CDI	2.5	8.0	3.2
316L rostfreier	APS	2.5	0.3	0.1
Stahl, CSS	APS-CDI	2.5	4.0	1.6

4.2.2 Freisetzung des Ubiquitin von Titanoberflächen

Im Kapitel 4.2.1 wurde gezeigt, wie das Modellprotein Ubiquitin auf Metalloberflächen kovalent oder nicht-kovalent immobilisiert wird. Im Falle der Immobilisierung auf der APS-Oberfläche handelt es sich um eine reine nicht-kovalente Art der Immobilisierung. Auf einer APS-CDI-Oberfläche wird die kovalente Immobilisierung des Proteins ermöglicht.

Die Desorptionsexperimente mit Ubiquitin von Titanplättchen wurden zum besseren Verständnis der Bindungsaffinität und zur Differenzierung zwischen kovalent und nicht-kovalent immobilisierten Proteinmengen auf der modifizierten Metalloberfläche durchgeführt. Da auf der APS-CDI-Oberfläche wahrscheinlich beide Spezies vertreten sind, sollten kovalent und nicht-kovalent Immobilisierungsarten einzeln untersucht und korreliert werden.

Zu diesem Zweck wurden kinetische Untersuchungen durch Verwendung unterschiedlicher Lösungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Zusätzlich wurde zwischen Chromschwefelsäure-behandelter und -unbehandelter Titanoberfläche differenziert.

In den folgenden Abbildungen, die die Freisetzung von Ubiquitin von den unterschiedlich modifizierten Titanoberflächen darstellen, wird die Abnahme der Beladungsmenge als Funktion der Zeit gezeigt. Die Anpassung an die statistischen Daten erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms GraphPad Prism 4.0.

4.2.2.1 Waschen mit 0.05 N NaOH / 0.5 % SDS

Zunächst wird beabsichtigt, die nicht-kovalent immobilisierte Menge Ubiquitin von der Metalloberfläche vollständig zu entfernen, so dass diese möglichst auf 0 % des Anfangswertes Γ_0 sinkt. Zu diesem Zweck wurden die mit Ubiquitin beladenen Titanplättchen mit einer alkalischen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 0.05 N NaOH / 0.5 % SDS bei RT gewaschen. In der Tabelle 4.5 wurde bereits gezeigt, dass die Verwendung einer 0.1 N NaOH / 1 % SDS bei 60 °C für 15 min über 90 % zur Ablösung des nicht kovalent und 33 % des kovalent immobilisierten Ubiquitin führte. Wie bereits im Kapitel 4.2.1 erwähnt, ist Natriumdodecylsulfat (SDS) ein Detergens mit stark amphiphilen Eigenschaften. Es zerlegt oligomere Proteine in die Untereinheiten und denaturiert diese. An die entfaltenen

Peptidketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Schwache Wechselwirkungen, wie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorbens werden zerstört und damit wird das Protein von der Metalloberfläche abgespalten. Abbildung 4.7 zeigt die rasche Ablösung von Ubiquitin von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI durch Verwendung einer 0.05 M NaOH / 0.5 % SDS-Lösung bei RT. Schon in der ersten Stunde kann ein Effekt der Ablösung beobachtet werden (s. Tabelle 4.7). Die Menge Ubiquitin der über 112 h gemessenen kinetischen Untersuchung erreicht für Titan-CSS-APS 2 %, für Titan-CSS-APS-CDI 37 % der Gesamtmenge und die Halbwertszeiten betragen jeweils unter 0.5 h für die schnelle und 9 und 39 h für die langsame Phase. Beim Erreichen eines Plateaus tritt das Gleichgewicht ein und die Desorption des Proteins von der Oberfläche wird als vollständig betrachtet.

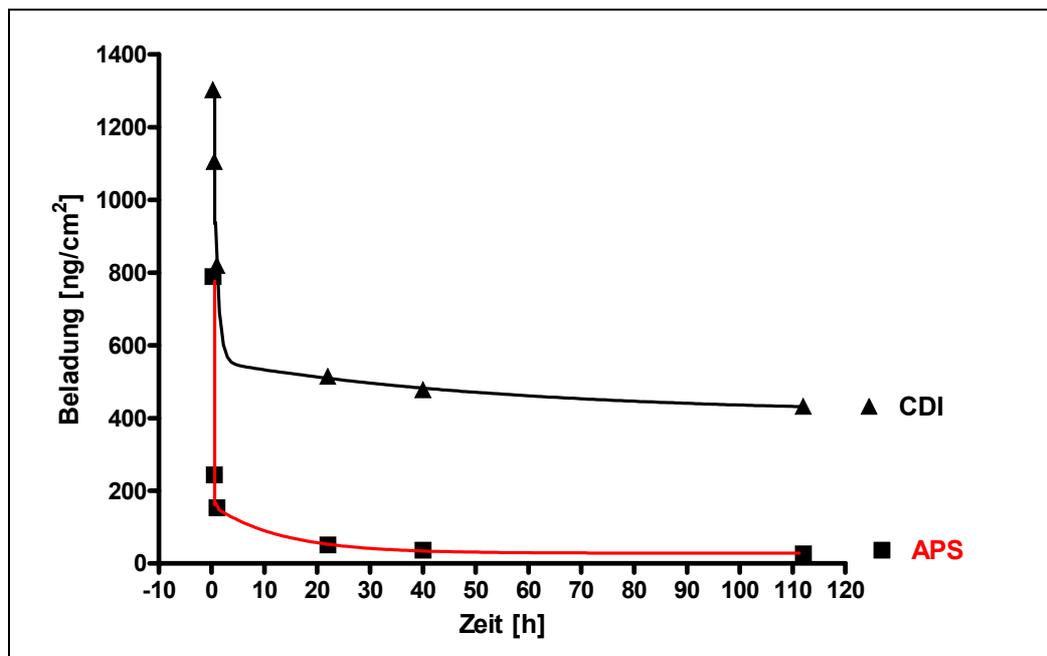


Abbildung 4.7: Ablösen von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI durch 0.05 M NaOH / 0.5 % SDS-Lösung bei RT.

Die Freisetzung von ^{125}I -Ubiquitin in 0.05 M NaOH / 0.5 % SDS von der mit Chromschwefelsäure behandelten Titanoberfläche erfolgte mit sehr kurzen Halbwertszeiten von kleiner als 0.5 h für die schnelle Anfangsphase, wie aus der 112 h-kinetischen Untersuchung, die auf der Tabelle 4.7 dargestellt wird, zu entnehmen ist. Die Verwendung dieser alkalischen SDS-Lösung führt dazu, dass innerhalb von 1 h nur 20 % der nicht-kovalent immobilisierten Ubiquitinmenge auf der Oberfläche zurückbleibt. In der gleichen Zeit

bleiben nur noch 63 % des immobilisierten Proteins auf der APS-CDI-Oberfläche erhalten. Nach 112-h Untersuchung wird fast alles nicht-kovalent immobilisierte Ubiquitin von der APS-Oberfläche abgelöst und es bleiben noch 37 % der Ubiquitinmenge auf der APS-CDI-Oberfläche zurück. Sobald sich nach 112 h die Desorptionskurven für beide Oberflächen einem Plateau annähern, lässt sich schließen, dass auf der mit CDI modifizierten Titanoberfläche ca. 40 % des immobilisierten Ubiquitin kovalent und der Rest nicht-kovalent gebunden ist.

Tabelle 4.7: Ablösen von ^{125}I -Ubiquitin durch 50 mM NaOH / 0.5 % SDS bei RT. Es werden die initial immobilisierten Mengen Ubiquitin Γ_0 , die Beladungsmengen nach 1 h und die am Ende der 112 h-kinetischen Untersuchung und die Halbwertszeiten in der langsamen Phase dargestellt. $c_{\text{Ubiquitin}} = 0.3$ mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Lösung	Oberflächen- modifikation	Initial	Immobil.	Immobil. Ubiquitin		Halbwertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$
		immobil. Ubiquitin Γ_0	Ubiquitin nach 1 h	nach 112 h		
50 mM NaOH		$[\text{ng}/\text{cm}^2]$		$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	%	$[\text{h}]$
/ 0.5 % SDS	CSS-APS	789 ± 88	154	16 ± 3	2	0.05 / 9
	CSS-APS-CDI	1303 ± 468	820	477 ± 123	37	0.05 / 39

4.2.2.2 Freisetzung durch homologe Alkylamine

Nachdem die rasche Ablösung von Ubiquitin von der Titanoberfläche innerhalb von einigen Stunden durch 50 mM NaOH / 0.5 % SDS gezeigt wurde, stellte sich die Frage, ob es eine weniger drastische und nicht-denaturierende Methode zur Desorption des nicht-kovalent immobilisierten Anteils an Ubiquitin von der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche gibt. Zu diesem Zweck wurde die Verdrängung von Ubiquitin durch die Verwendung homologer Alkylaminlösungen bei verschiedenen pH-Werten eingesetzt. Die Alkylaminlösungen können die adsorbierten Proteinmoleküle durch schwache Wechselwirkungen wie hydrophobe Wechselwirkungen oder Ionenaustausch aufgrund der positiv geladenen Aminogruppe von der Oberfläche verdrängen. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse dieser Untersuchungen ist Tabelle 4.8 zu entnehmen.

Abbildung 4.8 zeigt zwei Beispiele der schnellen Verdrängung von ^{125}I -Ubiquitin von der Titanoberfläche durch 2 M Heptyl- und Octylaminlösung bei pH 7.4. Aus diesen Graphiken, die die Verdrängung als Exponentialzerfall darstellen, lässt sich erkennen, dass eine schnelle Anfangsphase innerhalb der ersten Minuten und eine langsamere Endphase vorhanden ist. Nach 2 d-Messzeit erreicht die Freisetzung von Ubiquitin ein Plateau, in dem fast 90 % des Proteins von der Titanoberfläche verdrängt wird.

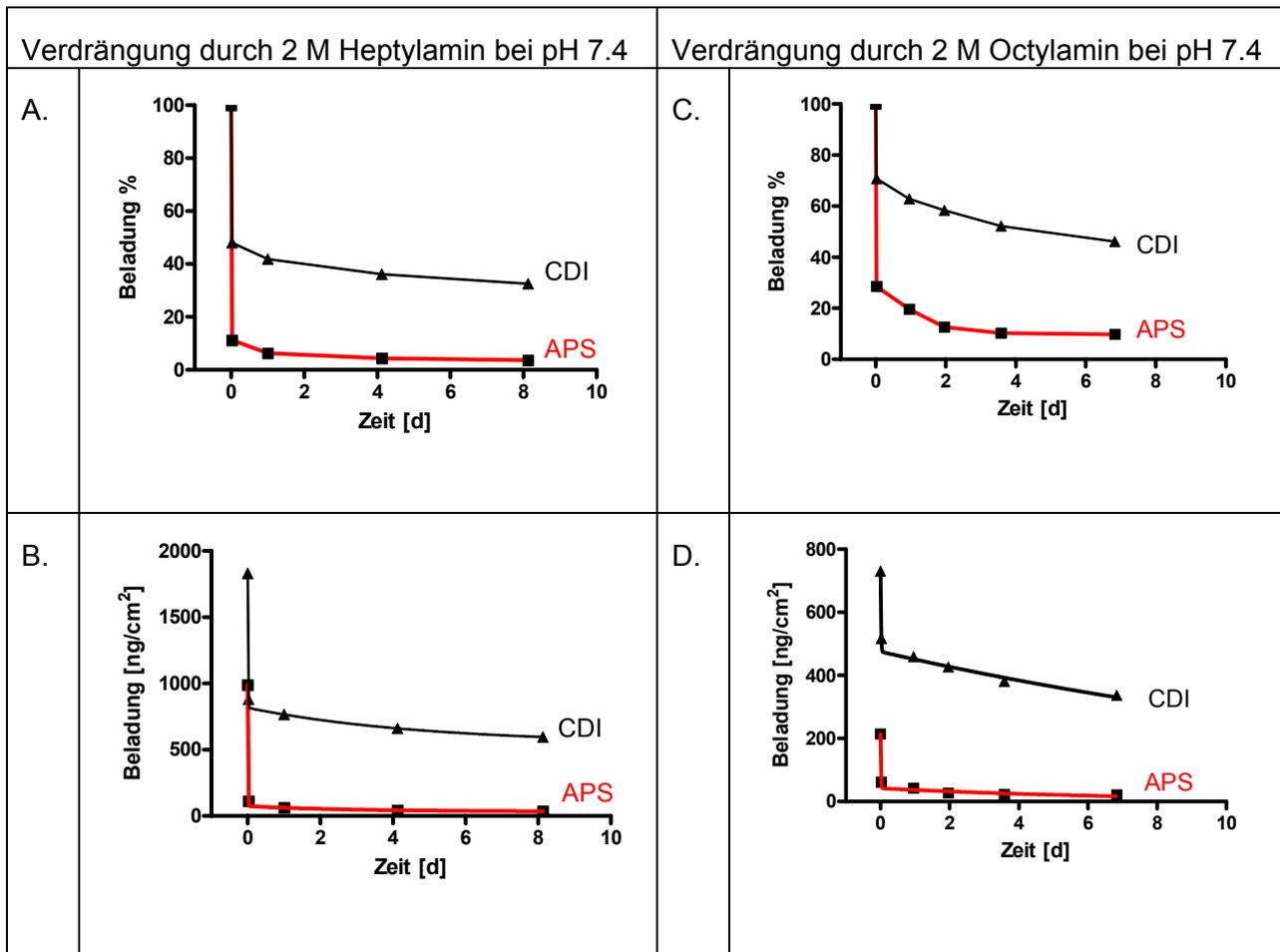


Abbildung 4.8: (A & B): Verdrängung von ^{125}I -Ubiquitin vom elektropolierten Ti-CSS-APS und Ti-CSS-APS-CDI durch 2 M Heptylamin bei pH 7.4 als Funktion der Zeit. (A) Darstellung in %: $\text{APS}_{100\%} = 989 \text{ ng/cm}^2$, $\text{CDI}_{100\%} = 1831 \text{ ng/cm}^2$, (B) Darstellung in ng/cm^2 . (C & D): Verdrängung von Ubiquitin von elektropoliertem Ti-CSS-APS und Ti-CSS-APS-CDI durch 2 M Octylamin bei pH 7.4 mit der Zeit. (C) Darstellung in %: $\text{APS}_{100\%} = 214 \text{ ng/cm}^2$, $\text{CDI}_{100\%} = 730 \text{ ng/cm}^2$, (D) Darstellung in ng/cm^2 .

Nach 2 d Verdrängungszeit durch die Heptylaminlösung bei pH 7.4 bleiben nur noch 6 % der ursprünglich nicht-kovalent immobilisierten Ubiquitinmenge auf der Ti-CSS-APS-Oberfläche und 39 % auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche. Vergleichbar sind die Werte in der 2 d-gemessenen Verdrängung durch die Octylaminlösung bei pH 7.4: hier bleiben 13 % der

ursprünglich nicht-kovalent immobilisierten Ubiquitinmenge auf der Ti-CSS-APS-Oberfläche und 58 % auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche zurück. Wenn das nicht-kovalent gebundene (Ti-CSS-APS) von dem kovalent gebundenen (Ti-CSS-APS-CDI) Retentat subtrahiert wird, lässt sich aus beiden Desorptionsexperimenten schließen, dass 33 % (in Heptyl-) bzw. 45 % (in Octylaminlösung) des immobilisierten Ubiquitin auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche kovalent und der Rest nicht-kovalent gebunden sein soll.

In der Tabelle 4.8 werden die Initial- und Endbeladungsmengen des immobilisierten Ubiquitin und die Halbwertszeiten der Verdrängung durch alle verwendeten homologen Alkylaminlösungen bei unterschiedlichen pH-Werten auf mit Chromschwefelsäure behandelten elektropolierten Titanplättchen zusammengestellt. Die Beladung der Plättchen erfolgte in einer Ubiquitinlösung mit der Konzentration 0.3 mg/ml bei pH 10.0. Die Messung der Verdrängung von Ubiquitin wurde nach täglichem Alkylaminlösungswechsel und anschließender Messung der Radioaktivitätsabnahme im γ -Counter unter Berücksichtigung des Eigenzerfalls des ^{125}I -Isotops verfolgt. Zur Freisetzung des Proteins wurden jeweils 2 M einer Ethyl-, Butyl-, Hexyl-, Heptyl- und Octylaminlösung mit pH-Werten von 4.0, 7.4 und 10.0 verwendet. Die jeweiligen Messzeiten richteten sie sich nach den experimentell ermittelten Halbwertszeiten.

Die Verdrängung von Ubiquitin in der schnellen Anfangsphase zeigt für alle verwendeten Alkylamine kurze Halbwertszeiten zwischen 0.001 – 0.3 d. Bei der zweiten, langsameren Phase liegt die schnellste Verdrängung des nicht-kovalent immobilisierten Proteins auf der APS-Oberfläche durch 2 M Hexyl- und Heptylaminlösung bei Halbwertszeiten von 1 d und auf der APS-CDI-Oberfläche von 6 – 9 d. Diese Halbwertszeiten, die um 5 - 25 d niedriger liegen als die Halbwertszeiten der Verdrängung in Ethyl- oder Butylaminlösung zeigen eine Abhängigkeit der Verdrängung von Ubiquitin von der Kohlenstoffkettenlänge der Alkylaminlösung. Das zeigt, dass die Proteinmoleküle tatsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen von der Oberfläche abgelöst werden, um dann durch Alkylaminmoleküle ersetzt zu werden.

Tabelle 4.8: Verdrängung des ^{125}I -Ubiquitin vom elektropolierten Ti-CSS-APS und Ti-CSS-APS-CDI durch diverse Alkylaminlösungen mit unterschiedlicher Alkylkettenlänge (C_2 , C_4 , C_6 , C_7 , C_8) bei variierten pH-Werten. Es werden die Initialbeladungsmengen an Ubiquitin Γ_0 , die Endwerte Γ_t zum Zeitpunkt t (t entspricht der in Klammern angegebenen Messzeit der kinetischen Untersuchung) und die Halbwertszeiten der schnellen Anfangs- / und der langsameren Endphase dargestellt. $c_{\text{Ubiquitin}} = 0.3$ mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Verdrängungslösung	Modifizierung Ti-CSS-	Γ_0 ^{125}I -Ubiquitin $[\text{ng}/\text{cm}^2]$	Γ_t ^{125}I -Ubiquitin $[\text{ng}/\text{cm}^2]$	Halbwertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$ [d]
2M Ethylamin pH 4.0	APS	640 ± 32	319 (10 d)	0.01 / 10
2M Ethylamin pH 4.0	APS+CDI	730 ± 78	397 (7 d)	0.01 / 25
2M Ethylamin pH 7.4	APS	1725 ± 172	829 (13 d)	0.004 / 11
2M Ethylamin pH 7.4	APS+CDI	1866 ± 567	1362 (13 d)	0.003 / 34
2M Ethylamin pH 10.0	APS	1725 ± 172	556 (13 d)	0.3 / 20
2M Ethylamin pH 10.0	APS+CDI	1866 ± 567	997 (13 d)	0.01 / 26
2M Butylamin pH 4.0	APS	641 ± 32	346 (2 d)	0.002 / 4
2M Butylamin pH 4.0	APS+CDI	658 ± 78	451 (2 d)	0.001 / 7
2M Butylamin pH 7.4	APS	958 ± 116	549 (5 d)	0.3 / 12
2M Butylamin pH 7.4	APS+CDI	1904 ± 217	1409 (5 d)	0.2 / 17
2M Butylamin pH 10.0	APS	958 ± 32	507 (5 d)	0.3 / 10
2M Butylamin pH 10.0	APS+CDI	1904 ± 365	1240 (5 d)	0.3 / 12
2M Hexylamin pH 4.0	APS	682 ± 79	194 (2 d)	0.001 / 6
2M Hexylamin pH 4.0	APS+CDI	665 ± 98	420 (2 d)	0.001 / 17
2M Hexylamin pH 7.4	APS	815 ± 102	133 (2 d)	0.003 / 1
2M Hexylamin pH 7.4	APS+CDI	813 ± 206	501 (2 d)	0.003 / 9
2M Hexylamin pH 10.0	APS	448 ± 22	43 (2 d)	0.005 / 1
2M Hexylamin pH 10.0	APS+CDI	1535 ± 560	923 (2 d)	0.003 / 10
2M Heptylamin pH 7.4	APS	989 ± 293	55 (2 d)	0.005 / 3
2M Heptylamin pH 7.4	APS+CDI	1831 ± 459	720 (2 d)	0.002 / 12
2M Heptylamin pH 10.0	APS	989 ± 293	260 (2 d)	0.008 / 1
2M Heptylamin pH 10.0	APS+CDI	1831 ± 459	110 (2 d)	0.003 / 6
2M Octylamin pH 4.0	APS	647 ± 62	390 (2 d)	0.004 / 5
2M Octylamin pH 4.0	APS+CDI	730 ± 247	488 (2 d)	0.003 / 17
2M Octylamin pH 7.4	APS	214 ± 35	27 (2 d)	0.005 / 3
2M Octylamin pH 7.4	APS+CDI	730 ± 247	426 (2 d)	0.005 / 11

4.2.2.3 „Schonende“ Freisetzung durch niedrige SDS-Konzentration bei pH 10.0 und 7.4

Nach der Freisetzung von Ubiquitin durch Verwendung der drastischen Methode einer alkalischen SDS-Lösung und weiterhin durch Verdrängung mit unterschiedlichen Alkylaminlösungen, wird nun eine etwas „mildere“ oder „schonendere“ Methode untersucht, nämlich die spontane Freisetzung von Ubiquitin von der Titanoberfläche bei pH 7.4 und 10.0 in An- und Abwesenheit von geringer (0.066%) Natriumdodecylsulfat- (SDS-) Konzentration. Zuerst wird in einem Beispiel die Einteilung einer Kinetik in eine schnelle Anfangs- und eine langsamere Endphase als auch die Berechnung der Halbwertszeit aus der halblogarithmischen Darstellung gezeigt.

Die Abnahme der Beladungsmenge wird als Funktion der Zeit aufgenommen und halblogarithmisch aufgetragen. Mittels linearer Regression erhält man eine Gerade, deren Steigung für eine Reaktion erster Ordnung gleich der Geschwindigkeitskonstante k ist. Daraus lässt sich die Halbwertszeit $t_{0.5}$ dieser Reaktion berechnen.

Für den Exponentialzerfall gilt: $\Gamma = \Gamma_0 e^{-kt}$. Aus der Definition der Halbwertszeit erhält man $\Gamma = \frac{1}{2} \Gamma_0$ bei $t = t_{0.5}$.

Durch Ersetzen entsteht:

$$\frac{1}{2} \Gamma_0 = \Gamma_0 e^{-kt_{0.5}} \quad (22)$$

$$e^{kt_{0.5}} = 2 \quad (23)$$

durch Logarithmieren wird $kt_{0.5} = \ln 2 = 0.693$ oder

$$t_{0.5} = 0.693 / k \quad (24)$$

In einem Beispiel eines Desorptionsexperimentes lassen sich beide Kurven, die in Abbildung 4.9 (A) dargestellt werden, durch lineare Regression in zwei Phasen einteilen: in eine schnelle Anfangs- und in eine darauffolgende langsamere Geschwindigkeit, wie in Abbildung 4.9 (B) gezeigt wird. In diesen Berechnungen wurde für die lineare Regression ein Koeffizient r^2 zwischen 0.87 und 1.00 bestimmt.

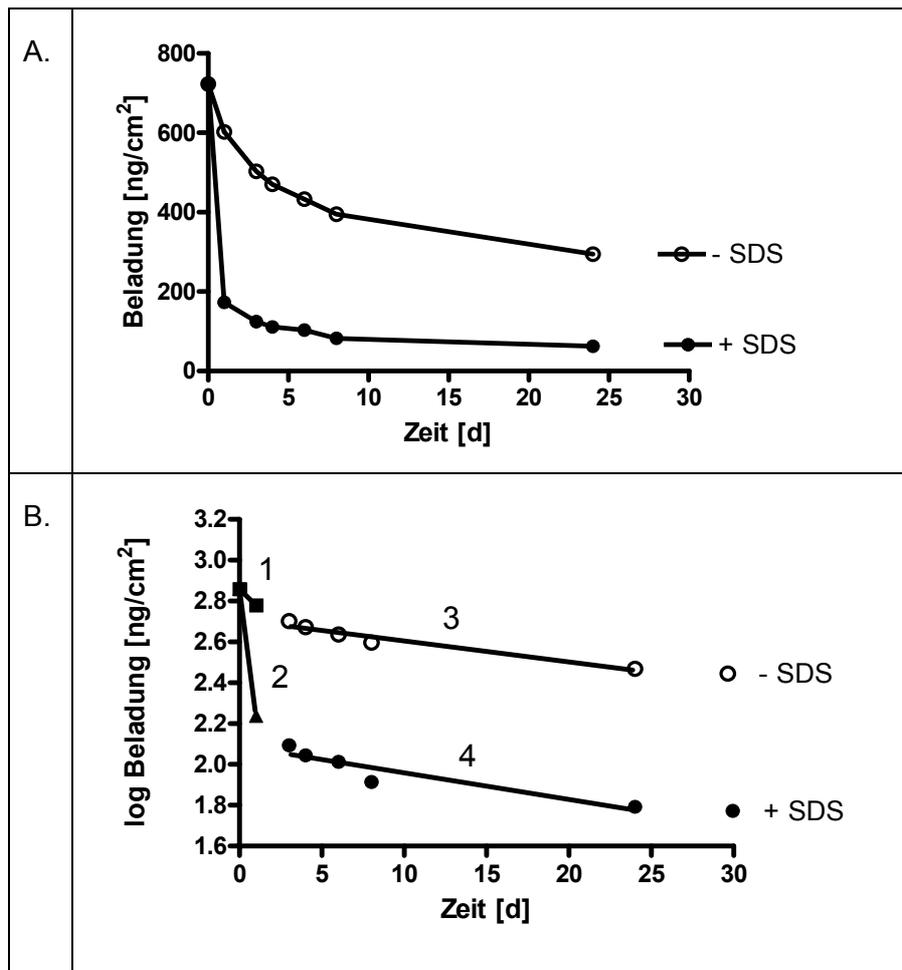


Abbildung 4.9: Graphische Darstellung der Einteilung in eine schnelle Anfangs- und eine langsamere Endphase bei der spontanen Desorption von Ubiquitin von Ti-CSS-APS in Phosphat-Puffer bei pH 10.0 mit / ohne 0.066 % SDS. (A) Beladung vs. Zeit und (B) halblogarithmische Auftragung: \log [Beladung] vs. Zeit. Auflegung der Geraden der linearen Regression unter Berücksichtigung einer schnellen und einer langsameren Phase. Die Steigung dieser Geraden ist gleich k und daraus lässt sich $t_{0,5}$ berechnen. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Tabelle 4.9 zeigt exemplarisch für das Desorptionsexperiment der Abbildung 4.9 den Vergleich zwischen den Halbwertszeiten, die entweder durch automatische Auswertung nach einem biphasischen Zerfallsmodell mittels des Computerprogramms GraphPad Prism oder durch die Steigung der linearen Regression der halblogarithmischen Auftragung mit Hilfe der Gleichung (24) (manuelle Auswertung) ermittelt wurden. Für dieses spezielle Beispiel liegen die Halbwertszeiten der manuellen Auswertung mit 67 und 53 d für die langsame Phase um einen Faktor 2 höher als bei der automatischen Auswertung nach einem biphasischen Zerfallsmodell.

Tabelle 4.9: Vergleich der ermittelten Halbwertszeiten durch eine Auswertung nach einem biphasischen Zerfallsmodell und einer manuellen Auswertung. Die Phaseneinteilung bezieht sich auf die Kurven der Abbildung 4.9. Bei der manuellen Auswertung wurden für die lineare Regression der jeweiligen Phase Koeffizienten r^2 von 1.0000, 1.0000, 0.9510 und 0.8736 ermittelt.

Phase	Auswertung in Prism	Manuelle Auswertung	
	Halbwertszeit [d]	Halbwertszeit [d]	Steigung k
1	1	9	0.07954
2	0.3	1	0.6211
3	35	67	0.01031
4	20	53	0.01302

In der Abbildung 4.9 und in der Tabelle 4.9 erfolgte die Einteilung der Kurven in zwei Phasen durch willkürliche Auswahl der beiden Bereiche zur Berechnung der linearen Regression unter Berücksichtigung der Messpunkte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die automatische Anpassung der Messpunkte nach einem biphasischen Exponentialzerfallsmodell mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism 4.0 zur Auswertung gewählt. Durch Vergleich dieser beiden Auswertungsmethoden, werden bei der Auswertung nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell Halbwertszeiten ermittelt, die um 50 % geringer sind als diejenigen nach der geometrischen Auswertung.

In der Abbildung 4.10 (A) wird die spontane Desorption des ^{125}I -Ubiquitin vom elektropolierten Titan- HNO_3 -APS und Titan- HNO_3 -APS-CDI in Phosphat-Puffer bei pH 10.0 in An- bzw. Abwesenheit von 0.066 % SDS dargestellt. Eine schnellere Desorption des Ubiquitin von 470 auf 145 ng/cm^2 im SDS-haltigen Puffer und auf 400 ng/cm^2 im nicht-SDS-haltigen Puffer nach 1 d auf der Ti- HNO_3 -APS-Oberfläche lässt sich in der Anfangsphase erkennen. Die Menge Ubiquitin auf Titan- HNO_3 -APS am Ende der 24 d-gemessenen kinetischen Untersuchung erreicht für die Desorption im SDS-haltigen Puffer 11 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 39 % der Initialbeladung und die Halbwertszeiten betragen 22 bzw. 33 d. Die Menge Ubiquitin auf Titan- HNO_3 -APS-CDI am Ende der kinetischen Untersuchung erreicht für die Desorption im SDS-haltigen Puffer 16 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 39 % der Gesamtmenge und die Halbwertszeiten betragen 24 bzw. 31 d (s. Tabelle 4.10).

Abbildung 4.10 (B) zeigt die spontane Desorption des ^{125}I -Ubiquitin vom elektropolierten Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in Phosphat-Puffer bei pH 10.0 in An- bzw. Abwesenheit von SDS. Auch hier tritt der oben beschriebene Effekt von SDS in der

Anfangsphase der Desorption auf. Auf der APS-Oberfläche wird die Beladungsmenge nach 1 d von 723 auf 173 ng/cm² im SDS-haltigen Puffer und auf 602 ng/cm² im nicht-SDS-haltigen Puffer reduziert. Die Beladungsmenge nimmt auf der APS-CDI-Oberfläche nach 1 d von 927 auf 604 ng/cm² ab im SDS-haltigen Puffer und auf 812 ng/cm² im nicht-SDS-haltigen Puffer (s. Tabelle 4.10).

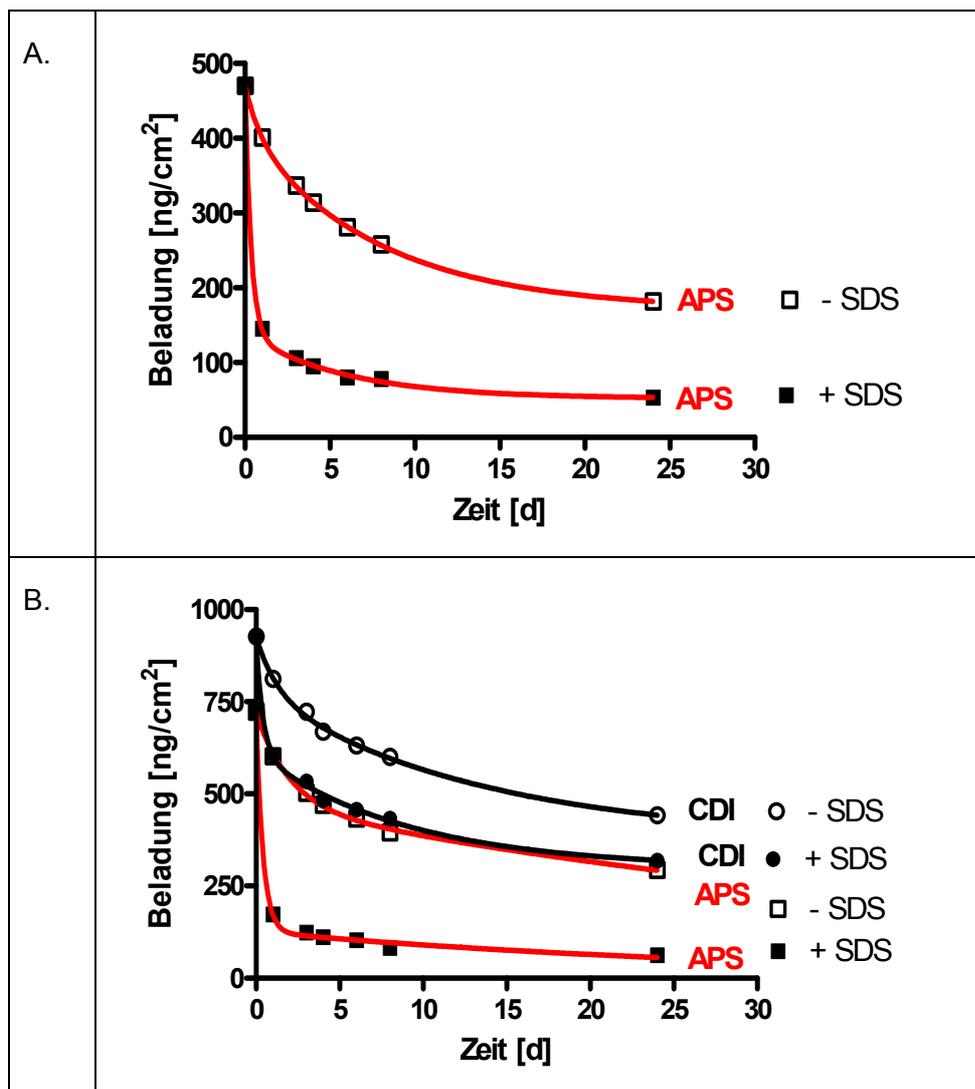


Abbildung 4.10: Spontane Desorption von ¹²⁵I-Ubiquitin von elektropliertem (A) Titan-HNO₃-APS und (B) Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in Phosphat-Puffer bei pH 10.0 in An- bzw. Abwesenheit von 0.066 % SDS.

Die Menge Ubiquitin auf Titan-CSS-APS am Ende der 24 d-gemessenen kinetischen Untersuchung erreicht für die Desorption im SDS-haltigen Puffer 9 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 41 % der Totalmenge und die Halbwertszeiten betragen 20 bzw. 35 d. Die Menge Ubiquitin auf Titan-CSS-APS-CDI am Ende der kinetischen Untersuchung erreicht für

die Desorption im SDS-haltigen Puffer 34 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 48 % der Totalmenge und die Halbwertszeiten betragen 31 bzw. 37 d (s. Tabelle 4.10).

Eine wichtige Frage war, durch welchen nicht-kovalenten Mechanismus Ubiquitin auf der Metalloberfläche immobilisiert wurde. Da Ubiquitin bei $\text{pH} > 7.0$ negativ geladen und die Aminogruppe des APS bei $\text{pH} 7.4$ positiv geladen sein kann, könnte die Adsorption von Ubiquitin durch einen Ionenaustausch-Mechanismus auf der APS-Oberfläche erklärt werden (s. Abbildung 3.4). Auf der APS-CDI-Oberfläche, die keine Ladungen trägt, wird ein Anteil des Proteins kovalent gebunden (s. Abbildung 3.5) und ein Anteil adsorptiv am Propylrest immobilisiert. Um die Hypothese eines möglichen Ionenaustausch-Mechanismus zu untersuchen, wurde Ethanolamin auf APS-CDI-Oberflächen kovalent gebunden (s. Abbildung 3.6). Das ungeladene Produkt, ein N-Hydroxyethyl-N'-(propyldiethoxy)silyl-Harnstoff verfügt über eine Propylgruppe. Auf dieser Oberfläche wurde dann Ubiquitin in ähnlicher Weise adsorbiert wie auf einer APS-Oberfläche.

In der Abbildung 4.11 wird die Freisetzung von ^{125}I -Ubiquitin vom Titan- HNO_3 -APS-CDI-Ethanolamin und Titan-CSS-APS-CDI-Ethanolamin in Phosphat-Puffer bei $\text{pH} 10.0$ in An- bzw. Abwesenheit von 0.066 % SDS dargestellt. In der Anfangsphase der Desorption lässt sich im SDS-haltigen Puffer der Beitrag zu einer beschleunigten Desorption erkennen. Nach 1 d nimmt die Beladungsmenge von 267 auf 48 ng/cm^2 im SDS-haltigen Puffer und auf 148 ng/cm^2 im nicht-SDS-haltigen Puffer. Die Menge Ubiquitin am Ende der 11 d-kinetischen Untersuchung auf Titan- HNO_3 -APS-CDI-Ethanolamin erreicht für die Desorption im SDS-haltigen Puffer 13 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 42 % der Totalmenge und die Halbwertszeiten betragen 28 bzw. 34 d. Die Menge Ubiquitin auf Titan-CSS-APS-CDI-Ethanolamin am Ende der 11 d-kinetischen Untersuchung erreicht für die Desorption im nicht-SDS-haltigen Puffer 52 % der Totalmenge und die Halbwertszeit beträgt 35 d (s. Tabelle 4.10).

Nach der Adsorption von Ubiquitin an dem N-Ethyl-N'-(propyldiethoxysilyl)-Harnstoff werden Halbwertszeiten von 28 d im SDS-haltigen Puffer für die Freisetzung von Ubiquitin erhalten, die mit denen der mit APS modifizierten Oberflächen gut übereinstimmen (s. Tabelle 4.10). Daraus lässt sich schließen, dass Ubiquitin auf der mit Ethanolamin umgesetzten CDI-Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Propylresten des APS immobilisiert wird. Damit scheint die positive Ladung der Aminogruppe des Silans keinen Einfluß auf die

Adsorption des negativ geladenen Ubiquitin auf der APS-Oberfläche zu haben und die Hypothese eines Ionenaustausches wird ausgeschlossen.

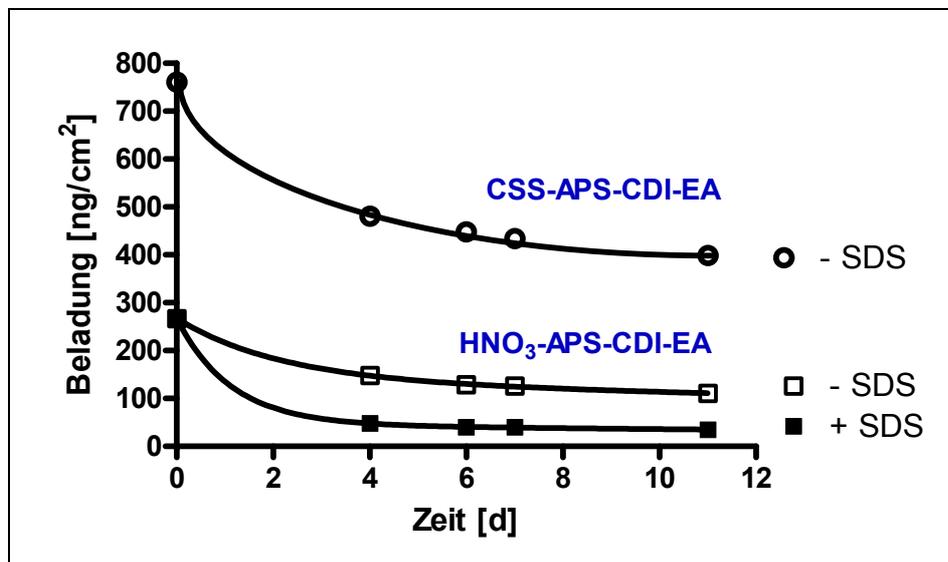
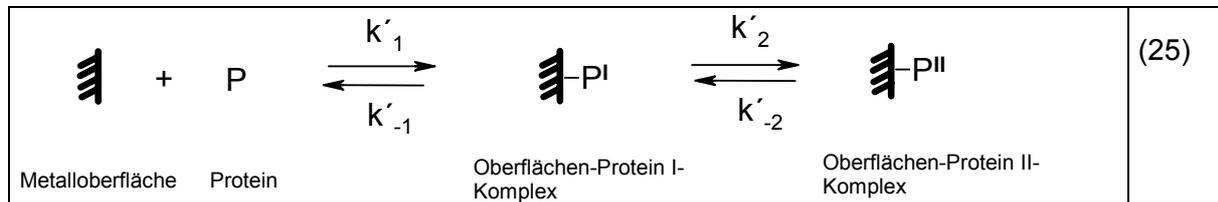


Abbildung 4.11: Freisetzung von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem Titan- HNO_3 -APS-CDI-Ethanolamin und Titan-CSS-APS-CDI-Ethanolamin durch Phosphat-Puffer bei pH 10.0 in An- bzw. Abwesenheit von SDS. Es handelt sich um zwei separate Experimente.

In der Tabelle 4.10 werden die Anfangs- und Endwerte der Immobilisierung von ^{125}I -Ubiquitin auf elektropoliertem Titan, die Freisetzung in 50 mM Natriumphosphat-Puffer bei pH 10.0 und ihre Abhängigkeit vom Natriumdodecylsulfat (SDS) zusammengestellt. Es ist offensichtlich, dass die Desorption im Phosphat-Puffer, der 0.066 % SDS beinhaltet, zur Abnahme der Halbwertszeiten von 33 auf 22 d auf der HNO_3 -APS-Oberfläche und von 35 auf 20 d auf der CSS-APS-Oberfläche und damit zu einer um 30 – 50 % schnelleren Freisetzung des Proteins aus der chemisch modifizierten Metalloberfläche führt. Es wird am Anfangsteil der Desorptionskurve sichtbar, dass ein Teil des Ubiquitin durch schwache Wechselwirkung immobilisiert sein muss, um durch die Wirkung von 0.066 % SDS, die im Puffer enthalten sind, schneller aus der Oberfläche abgetragen zu werden. In diesem Fall konnte man von zwei Spezies von Ubiquitin sprechen, einer fest und einer lockerer gebundenen. Die Desorption ist am Anfang schneller und damit werden die Halbwertszeiten im allgemeinen im SDS-haltigen Phosphat-Puffer kleiner.

Die Beobachtung, dass die Anfangsphase der Desorption schneller als die Endphase abläuft, also das Zustandekommen einer biphasischen Desorption und die daraus resultierende Annahme, dass zwei unterschiedliche Proteinspezies mit verschiedenem Bindungs- und

Desorptionsverhalten vorhanden sein können, lässt sich in folgender Reaktionsgleichung der Metallmatrix mit dem Protein P beschreiben:



P^I entspricht der auf der Oberfläche fester gebundenen Proteinspezies und P^{II} der weniger fest immobilisierten Proteinspezies, die in der Anfangsphase schneller desorbiert wird. k'_{1} , k'_{-1} und k'_{2} , k'_{-2} sind die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten. Die Reaktionsgleichung (25) beschreibt keine „echten“ Gleichgewichte und P^{II} kann durch eine separate Reaktionsgleichung desorbiert werden (wird hier nicht gezeigt). Damit wird ein konsekutiver Mechanismus in zwei aufeinanderfolgenden Schritten [Jennissen et al., 1982; Jennissen & Zumbrink, 2004] für die Desorption vorgeschlagen. In den Tabelle 4.10 und 4.11 wird die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-2} der zweiten, langsamen Phase in $[s^{-1}]$ [1983; IUPAC, 1984] angegeben, die mit k'_{-2} der oben beschriebenen Reaktionsgleichung (25) nicht zu verwechseln ist.

Außerdem werden in der Tabelle 4.10 die Initialbeladungen, die Beladungsmengen am Ende der 24 d-Messzeit (t) in $[ng/cm^2]$ und in %, die Halbwertszeiten in der schnellen Anfangs- / langsameren Endphase ($t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$) angegeben. Bei den Kopplungen HNO_3 -APS-CDI und CSS-APS-CDI wurde ca. 50 % des erwarteten Wertes erreicht. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge ^{125}I -Ubiquitin. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[ng/cm^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Tabelle 4.10: Spontane Desorption von ^{125}I -Ubiquitin vom elektropolierten Titan in 50 mM Na_2HPO_4 Puffer bei pH 10.0, mit / ohne SDS. $c_{\text{Ubiquitin}} = 0.3 \text{ mg/ml}$.

Desorptions- Puffer	Oberflächen- modifikation	Γ_0	Γ_t		Halb- wertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$	k_{-2}
		^{125}I - Ubiquitin	^{125}I -Ubiquitin	%		
		[ng/cm ²]	[ng/cm ²]	%	[d]	[s ⁻¹]
50 mM Na_2HPO_4 pH 10.0	HNO_3 -Kontrolle	69 ± 7	25 ± 3	36	-	
	CSS-Kontrolle	16 ± 11	6 ± 2	38	-	
	HNO_3 -APS	470 ± 5	182 ± 1	39	2 / 33	0.24x10 ⁻⁶
	CSS-APS	723 ± 77	294 ± 33	41	1 / 35	0.23x10 ⁻⁶
	HNO_3 -APS-CDI	412 ± 27	159 ± 15	39	1 / 31	0.27x10 ⁻⁶
	CSS-APS-CDI	927 ± 109	442 ± 50	48	1 / 37	0.22x10 ⁻⁶
	HNO_3 -APS-CDI- Ethanolamin	267 ± 60	111 ± 13	42	2 / 34	0.23x10 ⁻⁶
	CSS-APS-CDI- Ethanolamin	762 ± 146	399 ± 111	52	1 / 35	0.23x10 ⁻⁶

Desorptions- Puffer	Oberflächen- Modifikation	Γ_0	Γ_t		Halb- wertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$	k_{-2}
		^{125}I - Ubiquitin	^{125}I -Ubiquitin	%		
		[ng/cm ²]	[ng/cm ²]	%	[d]	[s ⁻¹]
50 mM Na_2HPO_4 / 0.066 % SDS pH 10.0	HNO_3 -Kontrolle	69 ± 7	10 ± 5	14	-	
	CSS-Kontrolle	16 ± 11	5 ± 3	31	-	
	HNO_3 -APS	470 ± 5	53 ± 2	11	0.3 / 22	0.37x10 ⁻⁶
	CSS-APS	723 ± 77	62 ± 26	9	0.3 / 20	0.39x10 ⁻⁶
	HNO_3 -APS-CDI	412 ± 27	64 ± 9	16	0.3 / 24	0.33x10 ⁻⁶
	CSS-APS-CDI	927 ± 109	319 ± 25	34	0.4 / 31	0.27x10 ⁻⁶
	HNO_3 -APS- CDI+Ethanolamin	267 ± 60	35 ± 13 (Messzeit 11 d)	13	0.8 / 28	0.29x10 ⁻⁶

Nachdem die spontane Desorption von Ubiquitin bei pH 10.0 durchgeführt wurde, folgen zunächst Desorptionsexperimente bei physiologischem pH 7.4, um eine mögliche pH-Abhängigkeit zu untersuchen.

In der Abbildung 4.12 (A) wird die spontane Desorption von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem Titan- HNO_3 -APS und Titan- HNO_3 -APS-CDI durch Tris / NaCl-Puffer bei pH 7.4 in An- bzw. Abwesenheit von SDS dargestellt. In der Anfangsphase findet die Desorption im SDS-haltigen Puffer schneller statt und damit werden die Halbwertszeiten kleiner. Auf der APS-Oberfläche nehmen die Beladungswerte nach 1 d von 548 auf 143 ng/cm^2 im SDS-haltigen Puffer und auf 446 ng/cm^2 im nicht-SDS-haltigen Puffer ab. Auf der APS-CDI-Oberfläche nehmen die Beladungswerte nach 1 d von 1152 auf 713 ng/cm^2 im SDS-haltigen Puffer und auf 1120 ng/cm^2 im nicht-SDS-haltigen Puffer ab. Die Menge Ubiquitin auf Titan- HNO_3 -APS am Ende der kinetischen Untersuchung nach 26 d erreicht für die Desorption im SDS-haltigen Puffer 11 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 34 % der Initialbeladung und die Halbwertszeiten betragen 24 bzw. 26 d. Die immobilisierten Mengen an Ubiquitin auf Titan- HNO_3 -APS-CDI am Ende der kinetischen Untersuchung erreicht für die Desorption im SDS-haltigen Puffer 33 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 52 % der Initialbeladung und die Halbwertszeiten betragen 30 bzw. 33 d.

Abbildung 4.12 (B) zeigt die spontane Desorption von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI durch Tris / NaCl-Puffer bei pH 7.4 in An- bzw. Abwesenheit von SDS. Auch hier ist ein Effekt von SDS zu einer beschleunigten Desorption in der Anfangsphase erkennbar. Auf der APS-Oberfläche nehmen die Beladungswerte nach 1 d von 800 auf 213 ng/cm^2 im SDS-haltigen Puffer und auf 660 ng/cm^2 im nicht-SDS-haltigen Puffer ab. Auf der APS-CDI-Oberfläche nehmen die Beladungswerte nach 1 d von 1725 auf 1135 ng/cm^2 im SDS-haltigen Puffer und auf 1674 ng/cm^2 im nicht-SDS-haltigen Puffer ab. Die Menge Ubiquitin auf Titan-CSS-APS am Ende der kinetischen Untersuchung nach 26 d erreicht für die Desorption im SDS-haltigen Puffer 12 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 30 % der Initialbeladung und die Halbwertszeiten betragen 26 bzw. 19 d. Die Menge Ubiquitin auf Titan-CSS-APS-CDI am Ende der kinetischen Untersuchung erreicht für die Desorption im SDS-haltigen Puffer 38 % und im nicht-SDS-haltigen Puffer 53 % der Initialbeladung und die Halbwertszeit beträgt 30 bzw. 36 d.

In beiden Teilen der Abbildung 4.12 (A und B) wird am Anfang der Desorptionskurve sichtbar, dass ein Teil von Ubiquitin nicht so fest immobilisiert sein muß, damit es durch die Wirkung

von 0.066 % SDS, die im Puffer enthalten sind, schneller aus der Oberfläche abgetragen werden kann. In diesem Fall konnte man von zwei Spezies von Ubiquitin sprechen, einer fest und einer lockerer gebundenen.

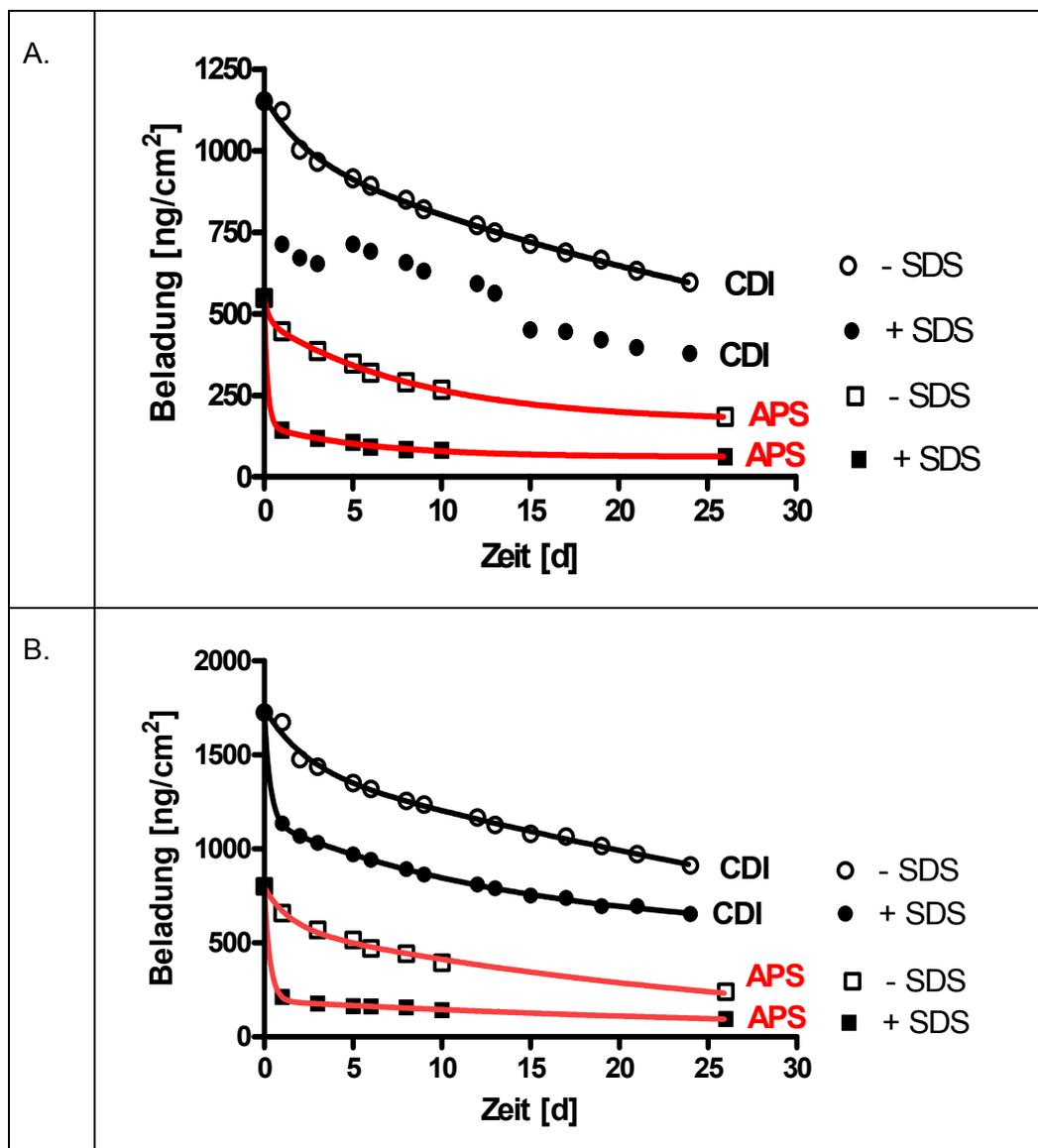


Abbildung 4.12: Spontane Desorption von ¹²⁵I-Ubiquitin von elektropoliertem (A) Titan-HNO₃-APS und Titan-HNO₃-APS-CDI und (B) Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in Tris/NaCl-Puffer bei pH 7.4 in An- bzw. Abwesenheit von SDS.

In der Tabelle 4.11 werden die Totalmengen Ubiquitin, die Beladungsmengen am Ende der 26 d-gemessenen kinetischen Untersuchung in [ng/cm²] und in %, die Halbwertszeiten und die apparenten Geschwindigkeitskonstanten in der zweiten, langsamen Phase der spontanen Desorption in Tris / NaCl-Puffer bei pH 7.4 in Ab- und Anwesenheit von 0.066 % Natriumdodecylsulfat (SDS) zusammengestellt. Die kovalent gebundene Menge an Ubiquitin

(auf CSS-APS-CDI) ist mit 1725 ng/cm^2 um einen Faktor 2 größer als die nicht-kovalente Beladung. Auf der mit Chromschwefelsäure behandelten (CSS) Oberfläche wird mit 800 ng/cm^2 (auf CSS-APS) und mit 1725 ng/cm^2 (auf CSS-APS-CDI) 35 % mehr Ubiquitin immobilisiert als auf der unbehandelten (HNO_3). Aus der kinetischen Untersuchung geht hervor, dass die Anwesenheit von 0.066 % SDS in Tris / NaCl-Puffer zu einer Abnahme der auf der Oberfläche zurückgebliebenen Proteinmenge führt. In der Anfangsphase findet die Desorption schneller statt und damit werden die Halbwertszeiten kleiner. In der zweiten, langsamen Phase bleiben sie unverändert. Allerdings konnte während der gemessenen kinetischen Untersuchung keine vollständige Desorption des Ubiquitin von der Titanoberfläche erreicht werden. Die Desorptionsexperimente mit Ubiquitin bei pH 7.4 und 10.0 zeigen keine Unterschiede in den Halbwertszeiten.

Wie bereits in der Reaktionsgleichung (25) für Tabelle 4.10 gezeigt wurde, werden auch in der Tabelle 4.11 die apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_{-2} in der zweiten, langsameren Phase in $[\text{s}^{-1}]$ [1983; IUPAC, 1984] angegeben.

Tabelle 4.11: Spontane Desorption von Ubiquitin von elektropoliertem Titan in 50 mM Tris / 150 mM NaCl Puffer bei pH 7.4, in An- / Abwesenheit von SDS. Es werden die Initialbeladung, die Beladungsmengen an Ubiquitin am Ende der 26 d-gemessenen kinetischen Untersuchung (t) in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ und in %, die Halbwertszeiten in der schnellen Anfangs- / langsameren Endphase ($t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$) und die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-2} in der zweiten, langsameren Phase in $[\text{s}^{-1}]$ [1993] dargestellt. $c_{\text{Ubiquitin}} = 0.3 \text{ mg/ml}$. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge ^{125}I -Ubiquitin. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Desorptions- Puffer	Oberflächen- modifikation	Γ_0	Γ_t		Halb- wertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$	k_{-2}
		^{125}I - Ubiquitin	^{125}I -Ubiquitin	%		
		$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	%	[d]	$[\text{s}^{-1}]$
50 mM Tris / 150 mM NaCl pH 7.4	HNO ₃ -Kontrolle	58 ± 18	20 ± 4	34	-	
	CSS-Kontrolle	9 ± 2	6 ± 1	66	-	
	HNO ₃ -APS	548 ± 20	184 ± 19	34	2 / 26	0.31x10 ⁻⁶
	CSS-APS	800 ± 18	241 ± 3	30	1 / 19	0.42x10 ⁻⁶
	HNO ₃ -APS-CDI	1152 ± 30	596 ± 67	52	2 / 33	0.24x10 ⁻⁶
	CSS-APS-CDI	1725 ± 54	912 ± 91	53	2 / 36	0.22x10 ⁻⁶

Desorptions- Puffer	Oberflächen- modifikation	Γ_0	Γ_t		Halb- wertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$	k_{-2}
		^{125}I - Ubiquitin	^{125}I -Ubiquitin	%		
		$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	%	[d]	$[\text{s}^{-1}]$
50 mM Tris / 150 mM NaCl / 0.066 % SDS pH 7.4	HNO ₃ -Kontrolle	58 ± 18	9 ± 6	17	-	
	CSS-Kontrolle	9 ± 2	4 ± 2	44	-	
	HNO ₃ -APS	548 ± 20	62 ± 1	11	0.3 / 24	0.33x10 ⁻⁶
	CSS-APS	800 ± 18	95 ± 9	12	0.2 / 26	0.31x10 ⁻⁶
	HNO ₃ -APS-CDI	1152 ± 30	379 ± 56	33	0.2 / 30	0.27x10 ⁻⁶
	CSS-APS-CDI	1725 ± 54	654 ± 81	38	0.3 / 30	0.27x10 ⁻⁶

4.2.3 Immobilisierung von rhBMP-2

Nachdem Immobilisierungsexperimente mit dem Modellprotein Ubiquitin auf Metalloberflächen durchgeführt wurden, sollte überprüft werden, ob die kovalente und nicht-kovalente Bindungsart und ihre Differenzierung auf das rhBMP-2 übertragbar sind.

Wie schon im Kapitel 4.2.1 erwähnt wurde, sind unter dem Begriff der Immobilisierung die Adsorption und die kovalente Kopplung des Proteins zu verstehen.

Es konnte die Adsorption des Modellproteins Ubiquitin auf Metalloberflächen gezeigt werden, die mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) modifiziert wurden. Die Adsorption ist auf hydrophobe Wechselwirkung zwischen Protein und Propylrest des Silans zurückzuführen. Die kovalente Kopplung des Proteins wird durch Aktivierung der Metalloberfläche mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) ermöglicht. Da die Oberfläche vor der CDI-Aktivierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) modifiziert wird (s. Abbildung 3.2), entspricht die Beladungsmenge einer Mischung aus nicht-kovalent (adsorptiv) und kovalent immobilisiertem Protein. Außerdem wurden die Beladungsmengen auf chemisch unmodifizierten (oder nicht-funktionalisierten) Metalloberflächen, sogenannten Kontrollen untersucht. Hierbei wurde der Begriff der unspezifischen Adsorption verwendet.

Zur Immobilisierung wurde rhBMP-2 verwendet, das bis zu 99 % chromatographisch aufgereinigt (s. Kapitel 3.1.4) und mittels SDS-PAGE charakterisiert wurde (s. Abbildung 4.13).

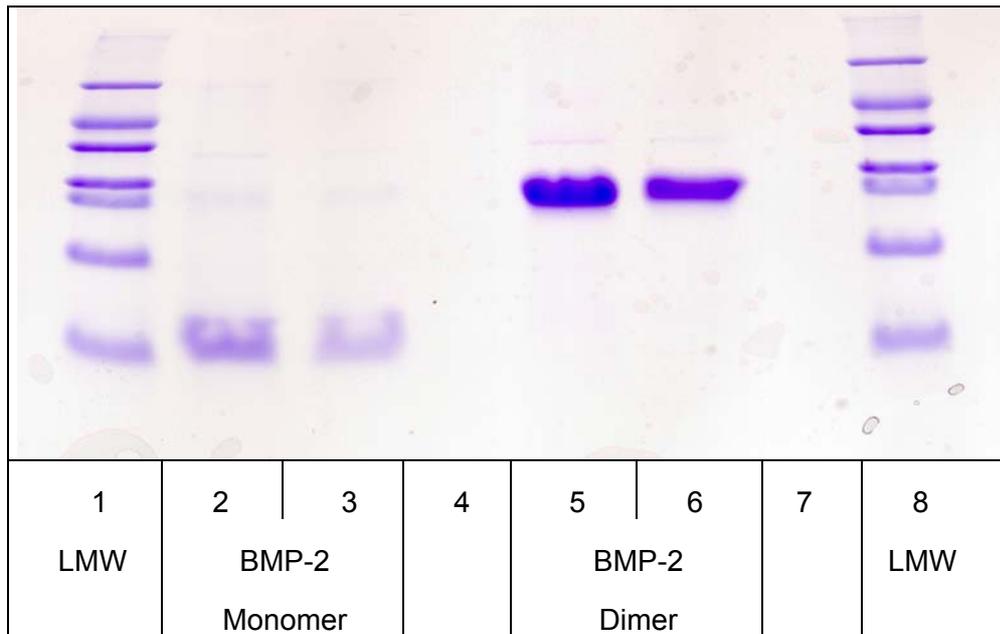


Abbildung 4.13: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese einer selbst hergestellten und chromatographisch aufgereinigten rhBMP-2-Probe. Die Proteine wurden mit Coomassie Blau gefärbt. Bahn 1 und 8 sind Molekulargewichtsstandard (LMW). Bahn 2 und 3 sind rhBMP-2-Monomere (13 kDa), da sie mit Mercaptoethanol behandelt wurden. Bahn 5 und 6 sind rhBMP-2-Dimere (26 kDa). Die Bahnen 4 und 7 sind leer.

4.2.3.1 rhBMP-2 auf elektropolierter Titanoberfläche

Aufgrund der Tatsache, dass zur Quantifizierung der Beladungsmenge des Proteins auf der Metalloberfläche radioaktiv markiertes rhBMP-2 nach der Chloramin-T-Methode der Protein-Inkubationslösung zugesetzt wurde (s. Kapitel 3.3.2.2), stellte sich die Frage, ob Unterschiede in der Beladungsmenge auftreten, wenn das nicht-radioaktiv markierte Protein in seiner nativen oder mit Chloramin-T-modifizierter Form eingesetzt wird. Da es sich um chemisch unterschiedliche Spezies handelt, ist eine Überprüfung notwendig gewesen. Tabelle 4.12 zeigt, dass die immobilisierten rhBMP-2 Mengen bei Inkubation in einer Lösung mit modifiziertem Protein um 10 – 60 % niedriger liegen als diejenigen mit nativem rhBMP-2. Für diese Experimente wurde mittels des Computerprogramms GraphPad Prism die Signifikanz p berechnet. Da diese Unterschiede nicht signifikant sind, werden die weiteren Immobilisierungsversuche mit nativem rhBMP-2 durchgeführt. Gleichzeitig lässt sich in diesen experimentellen Serien erkennen, dass die Beladungen sowohl mit modifiziertem als auch mit nativem rhBMP-2 mit steigender Konzentration der Inkubationslösung zunehmen.

Tabelle 4.12: Vergleich zwischen Immobilisierung von nativem rhBMP-2 und mit Chloramin-T-modifiziertem rhBMP-2 (CT-rhBMP-2) für drei unterschiedliche Konzentrationen auf elektropoliertem Titan ($n = 3$). $C_{\text{rhBMP-2}} = C_{\text{CT-rhBMP-2}} = 0.01, 0.03$ und 0.15 mg/ml. Der Vergleich beider experimentellen Gruppen zeigt, dass der Unterschied nicht signifikant ist ($p > 0.05$). Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

	^{125}I -CT-rhBMP-2 + natives rhBMP-2		
Oberflächen-modifikation	Immobil. BMP-2 $C_{\text{BMP-2}}=0.01$ mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$	Immobil. BMP-2 $C_{\text{BMP-2}}=0.03$ mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$	Immobil. BMP-2 $C_{\text{BMP-2}}=0.15$ mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$
Ti-HNO ₃	89 ± 10	142 ± 14	261 ± 80
Ti-CSS	357 ± 80	962 ± 57	813 ± 263
Ti-HNO ₃ -APS	87 ± 10	299 ± 11	641 ± 48
Ti-CSS-APS	177 ± 73	612 ± 58	1529 ± 187
Ti-HNO ₃ -APS-CDI	177 ± 13	510 ± 16	1065 ± 57
Ti-CSS-APS-CDI	503 ± 66	1565 ± 110	4367 ± 46

	^{125}I -CT-rhBMP-2 + CT-rhBMP-2		
Oberflächen-modifikation	Immobil. BMP-2 $C_{\text{BMP-2}}=0.01$ mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$	Immobil. BMP-2 $C_{\text{BMP-2}}=0.03$ mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$	Immobil. BMP-2 $C_{\text{BMP-2}}=0.15$ mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$
Ti-HNO ₃	53 ± 4	82 ± 4	237 ± 15
Ti-CSS	101 ± 9	354 ± 35	713 ± 319
Ti-HNO ₃ -APS	56 ± 5	176 ± 4	410 ± 15
Ti-CSS-APS	161 ± 26	278 ± 26	1278 ± 215
Ti-HNO ₃ -APS-CDI	113 ± 2	389 ± 40	635 ± 51
Ti-CSS-APS-CDI	289 ± 84	1204 ± 293	2627 ± 1001

Eine andere Beobachtung, die aus der Tabelle 4.12 hervorgeht, ist, dass die mit Chromschwefelsäure behandelte Oberfläche (Ti-CSS) höhere Beladungswerte aufweist als die Ti-HNO₃-Oberfläche. Bei einer Inkubationslösung mit der Konzentration 0.01 mg/ml beträgt die Adsorption auf der Ti-CSS-Oberfläche 101 und auf der Ti-HNO₃-Oberfläche 53 ng/cm². In einer 0.03 mg/ml Inkubationslösung liegen diese Werte bei 354 bzw. 82 ng/cm² und bei einer Konzentration von 0.15 mg/ml betragen sie 713 bzw. 237 ng/cm². Die

Beladungswerte der unspezifischen Adsorption auf Ti-HNO₃ betragen ca. 10 % der Beladung auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche. Diese Werte im Zusammenhang mit den ultrahydrophilen Oberflächen nach Behandlung mit der Chromschwefelsäure (s. Kapitel 4.1.3) weisen darauf hin, dass es sich möglicherweise um eine hydrophile Adsorption des rhBMP-2 auf der CSS-Oberfläche handelt. Das war bei den Vorversuchen der Immobilisierung von Ubiquitin nicht der Fall gewesen. Dort wurde der Begriff der unspezifisch adsorbierten Mengen verwendet, um die nicht-funktionalisierten Metalloberflächen zu bezeichnen, die als Kontrollen angesehen wurden (HNO₃- und CSS-Oberfläche). Bei Ubiquitin lagen die Beladungen zwischen 0.4 – 5 % der Beladungsmengen auf CSS-APS-CDI-modifizierten Oberflächen. Bei der Adsorption von rhBMP-2 kann nur die HNO₃-Oberfläche als Kontrolle bezeichnet werden, da die CSS-Oberfläche durch eine gewisse Funktionalisierung gekennzeichnet ist, die die hydrophile Adsorption von rhBMP-2 begünstigt. Die hohen Beladungen bedingt durch die hydrophile Adsorption auf der unmodifizierten Titanoxid-Oberfläche (CSS) könnten zu einem Dilemma führen, ob eine chemische Modifikation notwendig wäre, wenn auch ohne diese das Protein auf der Oberfläche adsorbiert werden kann. Die gemessenen Beladungen sind mit großen Schwankungen im Bereich von 2 – 60 % der Beladungsmenge auf CSS-APS-CDI-modifizierten Oberflächen behaftet. Die hohen adsorbierten rhBMP-2-Mengen auf der Chromschwefelsäure-behandelten Titanoberfläche hängen mit den hydrophilen Eigenschaften der Oberfläche zusammen, es findet eine hydrophile Adsorption statt, sie sich vom Mechanismus her stark von einer Adsorption durch hydrophobe Wechselwirkungen unterscheidet. Bei solchen ultrahydrophilen Oberflächen mit Kontaktwinkeln von 0 ° und abwesender Hysterese ist die Oberflächenenergie sehr groß und könnte die Proteinadsorption begünstigen. In diesem Fall würde es sich um eine hydrophile Adsorption des Proteins auf der Metalloberfläche handeln, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht werden sollte, im Gegensatz zur hydrophoben Adsorption. Ferner stellt sich die Frage, ob das unspezifisch bzw. hydrophil adsorbierte Protein eine ähnliche Freisetzung zeigt, und vergleichbar hohe biologische Aktivität mit dem Zielgewebe *in vivo* aufweist wie das gezielt immobilisierte Protein. Die Klärung dieser Frage erfordert in Zukunft weitere Experimente in dieser Richtung.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Immobilisierungsexperimente wurden mit rhBMP-2 in 125 mM Borat/0.066 % SDS-Puffer bei pH 10.0 als Inkubationspuffer durchgeführt. Es wurde allerdings in einer experimentellen Serie der Unterschied zwischen dem üblich verwendeten Borat / SDS- und dem PBS-Puffer bei pH 7.4 untersucht. Tabelle 4.13 zeigt den Einfluß des Immobilisierungspuffers PBS bei pH 7.4 im Vergleich zu dem üblich verwendeten Borat / SDS-Puffer bei pH 10.0, der kein NaCl enthält. Die freie Aminogruppe des Silans kann bei pH 7.4 positiv geladen sein und das Protein könnte zusätzlich zu hydrophoben Wechselwirkungen durch Ionenaustausch immobilisiert werden. BMP-2 könnte bei einem pH-Wert < 8.2 eine positive Ladung tragen. Man würde dann eine Abstoßung der BMP-2-Moleküle von der APS-Oberfläche erwarten. Die hohen Beladungsmengen auf der APS-Oberfläche können deshalb nicht durch eine Ionenaustausch-Hypothese erklärt werden. Es handelt sich hier wahrscheinlich um einen durch die Ladungen des Proteins bei den unterschiedlichen pH-Werten des Inkubationspuffers verursachten Effekts. Die mit Carbonyldiimidazol aktivierte Oberfläche trägt keine Ladung und dort sollten keine Unterschiede beobachtet werden.

Tabelle 4.13: Vergleich der Immobilisierungsmengen von ^{125}I -rhBMP-2 auf elektropoliertem Titan ($n = 3$) bei Verwendung eines 125 mM Borat-Puffers bei pH 10.0 und eines 10 mM Phosphat-Puffers mit 150 mM NaCl (PBS) bei pH 7.4 als Inkubationspuffer. In beiden Fällen ist $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.1 \text{ mg/ml}$. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Titan, elektropoliert Modifizierung	Immobil. rhBMP-2 in Borat / SDS-Puffer bei pH 10.0 0.1 mg/ml [ng/cm ²]	Immobil. rhBMP-2 in PBS- Puffer bei pH 7.4 0.1 mg/ml [ng/cm ²]
HNO ₃ -APS	376 ± 64	1426 ± 132
CSS-APS	1160 ± 503	2745 ± 806
HNO ₃ -APS-CDI	659 ± 40	1625 ± 73
CSS-APS-CDI	3926 ± 361	4163 ± 1875

Die in Tabelle 4.14 dargestellten Beladungen auf elektropolierten Titanplättchen (5 x 10 x 1 mm) wurden für zwei unterschiedliche rhBMP-2-Inkubationslösungen mit den Konzentrationen 0.25 und 0.6 mg/ml erhalten. Die Oberflächenbeladung steigt mit zunehmender Konzentration der rhBMP-2-Inkubationslösung und erreicht ein Maximum bei

der kovalenten Bindung auf der mit Chromschwefelsäure behandelten Oberfläche (CSS-APS-CDI) mit $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in der Proteinlösung mit der Konzentration $0.6 \text{ mg}/\text{ml}$. Auf der gleichen Oberfläche beträgt die nicht-kovalente Immobilisierung (auf CSS-APS) bei einer Proteinlösung der gleichen Konzentration $2.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die kovalent gebundene Proteinmenge (auf Ti-APS-CDI) ist um Faktor 1.5 - 4 höher als die nicht-kovalent immobilisierte Menge (auf Ti-APS). Dieser Faktor ist bei den mit Chromschwefelsäure behandelten Titanplättchen größer.

Tabelle 4.14: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf elektropoliertem Titan (Plättchen $5 \times 10 \times 1 \text{ mm}$). $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ and $0.6 \text{ mg}/\text{ml}$. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Titan, elektropoliert Modifizierung	Immobil. BMP-2 0.25 mg/ml [ng/cm ²]	Immobil. BMP-2 0.6 mg/ml [ng/cm ²]
HNO ₃	164 ± 47 (n=3)	566 ± 126 (n=3)
CSS	348 ± 164 (n=3)	1460 ± 364 (n=3)
HNO ₃ -APS	198 ± 22 (n=3)	1078 ± 148 (n=3)
CSS-APS	238 ± 57 (n=30)	2196 ± 951 (n=3)
HNO ₃ -APS-CDI	274 ± 27 (n=3)	1567 ± 10 (n=3)
CSS-APS-CDI	886 ± 371 (n=30)	4011 ± 1455 (n=3)

In der Tabelle 4.15 werden die immobilisierten rhBMP-2-Mengen auf elektropolierten Titanplättchen dargestellt, die in einer Proteinlösung mit der Konzentration $0.1 \text{ mg}/\text{ml}$ inkubiert wurden. Chromschwefelsäure behandelte (CSS) und unbehandelte (HNO₃) Plättchen wurden mit diversen Alkylsilanen, die über unterschiedliche Liganden verfügen, modifiziert. Die mit Chromschwefelsäure behandelten Titanplättchen (Ti-CSS) weisen Beladungen auf, die um einen Faktor 2 – 3 höher sind als die Beladungen bei den unbehandelten Plättchen (HNO₃). Die Werte für die immobilisierten Proteine in diesem Versuch liegen allgemein zu niedrig, was mit der damaligen BMP-2-Präparation, die zur Inkubation der alkylsilanisierten Titanplättchen verwendet wurde, zusammenhängen könnte. Trotzdem können an dieser Stelle durch die relativen Beladungswerte einige Rückschlüsse gezogen werden. Die höchsten Beladungsmengen liegen auf der mit Hexyltrichlorsilan

modifizierten Oberfläche bei 220 ng/cm^2 und sind um einen Faktor 2 höher als die mit Propyltrichlorsilan (PTC), Propyltrimethoxysilan (PTM) oder 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS). Die Beladungsmengen auf den Ti-CSS-Oberflächen, die mit letzteren drei Alkylsilanen modifiziert wurden, weisen vergleichbare Werte aus und liegen bei $105 - 120 \text{ ng/cm}^2$. Diese drei Silane haben die Gemeinsamkeit, dass sie alle über einen Propylrest verfügen. Daraus kann der Schluß gezogen werden, dass sobald gleiche Mengen Protein adsorbiert werden, die positive Ladung des APS für die Adsorption nicht nötig ist, und es lediglich auf die hydrophobe Wechselwirkungen ankommt.

Tabelle 4.15: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf elektropoliertem Titan- HNO_3 und Ti-CSS (Plättchen $10 \times 15 \times 1 \text{ mm}$, $n = 4$) und modifiziert mit unterschiedlichen Alkylsilanen. $C_{\text{BMP-2}} = 0.1 \text{ mg/ml}$. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng/cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Modifikation (Alkylsilan)	Immobil. rhBMP-2 Ti- HNO_3 [ng/cm^2]	Immobil. rhBMP-2 Ti-CSS [ng/cm^2]
Kontrolle, unspezifisch	22 ± 4	4 ± 2
Aminopropyltriethoxysilan (APS)	21 ± 2	105 ± 14
Propyltrichlorsilan (PTC)	71 ± 5	121 ± 25
Propyltrimethoxysilan (PTM)	68 ± 10	121 ± 27
Hexyltrichlorsilan (HTC)	81 ± 8	218 ± 67
n-Octyltriethoxysilan (C8)	59 ± 2	119 ± 31
(Pentafluorphenyl)- Propyltrimethoxysilan (F5PPC3)	50 ± 7	105 ± 13

4.2.3.2 rhBMP-2 auf sandgestrahlter Titanoberfläche

Bei den Titan-Osteopromote-Plättchen (Altatec) handelt es sich um eine sandgestrahlte Oberfläche, mit einer vergrößerten Oberfläche, die durch diese Behandlung bedingt wird. Hier wurden die Konzentrationen der BMP-2-Inkubationslösungen 0.25 und 0.6 mg/ml untersucht (s. Tabelle 4.16). Dabei nimmt die Beladung ebenfalls mit steigender Konzentration zu. Die immobilisierten Mengen an rhBMP-2 liegen auf der sandgestrahlten Titan-Osteopromote-Oberfläche um einen Faktor 2 höher als die Mengen auf elektropoliertem Titan, was auf die Oberflächenvergrößerung zurückzuführen ist. Bei einer

Inkubationslösung mit der Konzentration 0.6 mg/ml können bis zu 5.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ rhBMP-2 auf der CSS-APS-CDI-Oberfläche immobilisiert werden.

Tabelle 4.16: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf Titan-Osteopromote (Altatec) (Plättchen 8 x 8 x 2 mm). $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ and 0.6 mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Titan, Osteopromote (Altatec) Modifizierung	Immobil. rhBMP-2 0.25 mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$	Immobil. rhBMP-2 0.6 mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$
CSS	271 \pm 62 (n=3)	-
HNO ₃ -APS	-	1970 \pm 32 (n=3)
CSS-APS	394 \pm 66 (n=6)	2224 \pm 34 (n=3)
HNO ₃ -APS-CDI	-	2635 \pm 236 (n=3)
CSS-APS-CDI	1603 \pm 319 (n=6)	5197 \pm 597 (n=3)

4.2.3.3 rhBMP-2 auf Titanplasmaspray-beschichteter Titanoberfläche

Die Immobilisierung von rhBMP-2 auf Titanplasmaspray-beschichteten und mit Chromschwefelsäure behandelten (CSS) Titanlegierungsplättchen in einer Inkubationslösung mit der Konzentration 0.25 mg/ml lieferte Beladungswerte von 5.2 auf der CSS-APS- und 8.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf der CSS-APS-CDI-Oberfläche (s. Tabelle 4.17). Diese hohen Beladungswerte, die um einen Faktor zwanzig höher liegen als die immobilisierten Mengen auf elektropoliertem Titan, sind auf die Topologie der Titanplasmaspray-beschichteten Oberfläche zurückzuführen, die um das zwanzigfache höher liegt als die geometrische Oberfläche. Die unspezifisch adsorbierte rhBMP-2-Menge liegt mit 2.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sehr hoch.

Tabelle 4.17: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf Titanplasmaspray-beschichteter Titanlegierung (DOT) (Plättchen 5 x 10 x 1 mm). $c_{\text{BMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng/cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Plasmabeschichtetes Titan (DOT) Modifizierung	Immobil. rhBMP-2 0.25 mg/ml [ng/cm ²]	Anzahl n
CSS	2811 ± 86	3
CSS-APS	5221 ± 293	6
CSS-APS+CDI	8031 ± 331	6

4.2.3.4 rhBMP-2 auf Cobaltchrommolybdän-Legierung

Die Immobilisierung von rhBMP-2 auf der Cobaltchrommolybdän-Legierung in einer Inkubationslösung mit der Konzentration 0.25 mg/ml lieferte Beladungswerte von 0.84 für die HNO₃-APS- und 1.16 $\mu\text{g/cm}^2$ für die HNO₃-APS-CDI-Oberfläche und 0.26 für die CSS-APS- und 0.5 $\mu\text{g/cm}^2$ für die CSS-APS-CDI-Oberfläche. Die immobilisierten Proteinmengen nehmen bei höherer Konzentration der Inkubationslösung (0.6 mg/ml) zu. Hierbei liegen die Beladungswerte für die HNO₃-APS-Oberfläche bei 3.4 und für die HNO₃-APS-CDI-Oberfläche bei 5.0 $\mu\text{g/cm}^2$. Für die CSS-APS-Oberfläche betragen die Beladungsmengen 2.4 und für die CSS-APS-CDI-Oberfläche 3.9 $\mu\text{g/cm}^2$.

Sowohl die kovalent (auf CoCrMo-HNO₃-APS-CDI) als auch die nicht-kovalent (auf CoCrMo-HNO₃-APS) immobilisierten rhBMP-2-Mengen liegen für beide Konzentrationen der Proteinlösung (0.25 und 0.6 mg/ml) höher als die Beladungsmengen auf den analog modifizierten, aber mit Chromschwefelsäure behandelten Plättchen (CoCrMo-CSS).

Bei der Cobaltchrommolybdän-Legierung erhält man mit 0.6 - 2.4 $\mu\text{g/cm}^2$ unerwartet hohe Werte für die Adsorption auf den unbehandelten Metallplättchen bei beiden verwendeten Konzentrationen der rhBMP-2-Inkubationslösungen (s. Tabelle 4.18).

Tabelle 4.18: Immobilisierung von ^{125}I -rhBMP-2 auf Cobaltchrommolybdän-Legierung (Plättchen 5 x 10 x 1 mm). $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ und 0.6 mg/ml. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

CoCrMo-Legierung Modifizierung	Immobil. BMP-2 0.25 mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$	Immobil. BMP-2 0.6 mg/ml $[\text{ng}/\text{cm}^2]$
HNO_3	854 ± 240 (n=3)	2397 ± 118 (n=3)
CSS	589 ± 435 (n=3)	1781 ± 375 (n=3)
HNO_3 -APS	841 ± 140 (n=6)	3418 ± 266 (n=3)
CSS-APS	260 ± 23 (n=15)	2389 ± 213 (n=3)
HNO_3 -APS-CDI	1158 ± 118 (n=6)	5010 ± 612 (n=3)
CSS-APS-CDI	505 ± 64 (n=15)	3890 ± 203 (n=3)

Die bisher angegebenen Beladungswerte bezogen sich auf die geometrischen Oberfläche. Nachdem das Verhältnis zwischen geometrischer und realer Oberfläche ermittelt wurde (s. Tabelle 4.1), lassen sich an dieser Stelle die immobilisierten rhBMP-2-Mengen pro realer Fläche berechnen (s. Tabelle 4.19). Somit betragen die Beladungswerte pro realer Fläche auf der Ti-CSS-APS- 0.1 und auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche 0.36 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Bei der Titanplasmaspray-beschichteten Titanlegierung liegen die Beladungswerte pro realer Fläche bei 0.26 für CSS-APS und 0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für CSS-APS-CDI. Bei der Cobaltchrommolybdän-Legierung betragen die Beladungsmengen pro realer Fläche 0.5 für HNO_3 -APS und 0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für HNO_3 -APS-CDI und 0.08 für CSS-APS und 0.15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für CSS-APS-CDI.

Tabelle 4.19: Beispielhafte Umrechnung des immobilisierten ^{125}I -rhBMP-2 auf die reale Oberfläche. Die Beladungswerte pro geometrischer Fläche stammen aus den Tabelle 4.14, Tabelle 4.17 und Tabelle 4.18. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$.

Metall / Biomaterial	Modifikation	A_m / A_g (gemessen/geometr.)	Immobil. ^{125}I -rhBMP-2 [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	
			pro geometr. Fläche	pro realer Fläche
Titan, electropoliert, CSS	APS	2.5	0.24	0.10
	APS-CDI	2.5	0.89	0.36
TPS-Titan, CSS	APS	20	5.2	0.26
	APS-CDI	20	8.0	0.40
CoCrMo, HNO_3	APS	1.5	0.8	0.53
	APS-CDI	1.5	1.2	0.80
CoCrMo, CSS	APS	3.5	0.26	0.08
	APS-CDI	3.5	0.51	0.15

4.2.4 Freisetzung von rhBMP-2

Die Desorptionsexperimente von rhBMP-2 auf unterschiedlichen Metalloberflächen, die als Implantatwerkstoffe dienen, wurden zur Differenzierung zwischen kovalent und nicht-kovalent immobilisierten Proteinmengen auf der modifizierten Metalloberfläche durchgeführt. Die Vorexperimente mit dem Modellprotein Ubiquitin lieferten ein Bild zur Freisetzung des Proteins von der Metalloberfläche, das für die Untersuchung von rhBMP-2 als Grundlage dienen konnte. Im Falle der Ubiquitin-Freisetzung ließen sich die Daten an ein Zweiphasen-Zerfallsmodell anpassen mit einer schnellen Anfangs- und einer darauffolgenden langsameren Geschwindigkeit. Zur Freisetzung von rhBMP-2 wurden diverse Lösungen mit physiologischem pH-Wert verwendet. Alle Metalloberflächen wurden vorher mit Chromschwefelsäure behandelt.

In den folgenden Abbildungen, die die Freisetzung von rhBMP-2 darstellen, wird die Abnahme der Beladungsmenge als Funktion der Zeit gezeigt. Die Kurvenanpassung mit den statistischen Daten erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms GraphPad Prism 4.0.

Zuerst wird rhBMP-2 auf den mit Chromschwefelsäure behandelten und chemisch modifizierten elektropolierten Titan-, sandgestrahlten Titan-Osteopromote-, Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierungs- und CoCrMo-Legierungs-Plättchen immobilisiert. In einem weiteren Schritt wird die Freisetzung des ¹²⁵I-rhBMP-2 von der Metalloberfläche als Funktion der Zeit aufgenommen.

4.2.4.1 rhBMP-2-Freisetzung von einer elektropolierten Titanoberfläche

Zunächst wird die spontane Desorption des immobilisierten rhBMP-2 auf elektropoliertem Titan im physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4 untersucht.

In Abbildung 4.14 wird die Desorption von rhBMP-2 von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI durch 2, 20 und 200 ml physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4 dargestellt. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Desorptionsreaktion bis zum Gleichgewicht abläuft, ohne dass eine Rückreaktion (Readsorption) auftritt. Bis zum

zwanzigsten Tag der kinetischen Untersuchung erfolgte ein täglicher Wechsel des Waschpuffers und danach ein zweitäglicher Pufferwechsel. Aus der 65-d-kinetischen Untersuchung lässt sich durch die stete Abnahme der rhBMP-2-Beladungsmenge erkennen, dass unabhängig von dem Volumen des Desorptionspuffers keine Readsorption von rhBMP-2 auf der Titanoberfläche stattfindet. Das bedeutet, dass die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 der im Kapitel 4.2.2.3 beschriebenen Reaktionsgleichung (25) ausgeschlossen werden, und nur die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} und k_{-2} in Betracht genommen werden. Die Halbwertszeiten sind für die drei unterschiedlichen Volumina des Desorptionspuffers vergleichbar groß. Der tägliche bzw. zweitägliche Pufferwechsel führt nicht zur Einstellung eines Gleichgewichtes. Wie aus der Abbildung 4.14 zu entnehmen ist, wird kein Plateau erreicht. In der Tabelle 4.20 werden die Initialbeladungsmenge an rhBMP-2 (Γ_0), die Endbeladungsmenge an rhBMP-2 (Γ_t), die Halbwertszeiten ($t_{0.5^1}$, $t_{0.5^2}$) in [d] und die Geschwindigkeitskonstanten in [s^{-1}] für die schnelle Anfangs- (k_{-1}) und die langsamere Endphase (k_{-2}) der kinetischen Untersuchung dargestellt.

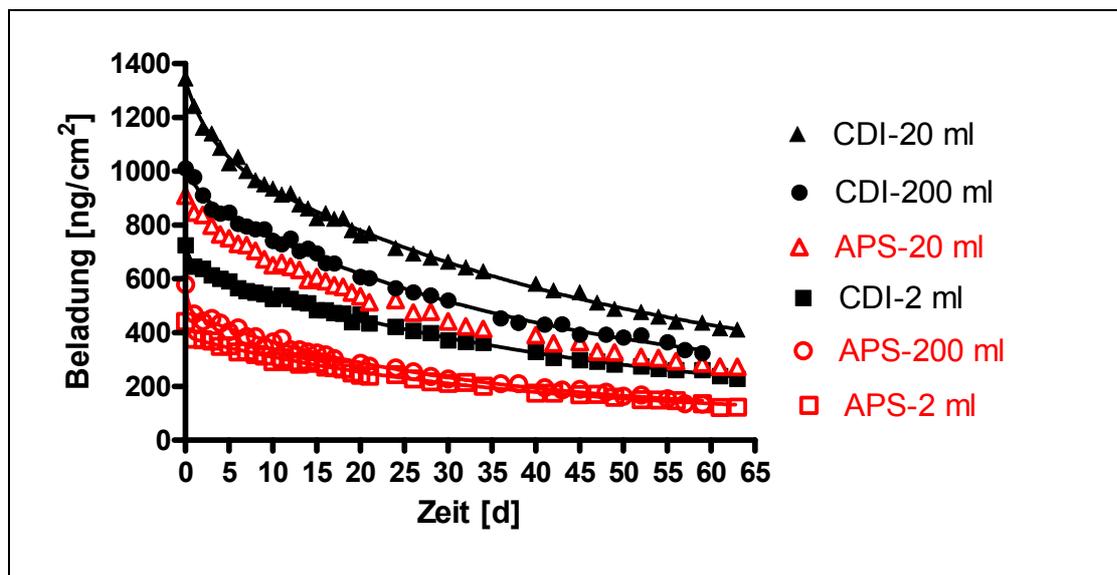


Abbildung 4.14: Spontane Desorption des ^{125}I -rhBMP-2 von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in 2, 20 und 200 ml physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$.

Tabelle 4.20: Spontane Desorption des ^{125}I -rhBMP-2 von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI in 2, 20 und 200 ml physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ mg/ml. In der Tabelle werden die Initialbeladungsmenge an rhBMP-2 (Γ_0), die Endbeladungsmenge nach der 65 d-kinetischen Untersuchung (Γ_t), die Halbwertszeiten ($t_{0.5}^1$, $t_{0.5}^2$) in [d] und die Geschwindigkeitskonstanten in [s^{-1}] für die schnelle Anfangs- (k_{-1}) und die langsamere Endphase (k_{-2}) dargestellt.

Volumen des Desorptionspuffers (PBS)	Ti-CSS-APS			Ti-CSS-APS-CDI		
	2 ml	20 ml	200 ml	2 ml	20 ml	200 ml
Γ_0 [ng/cm ²]	442	909	579	725	1344	1011
Γ_t [ng/cm ²]	123	272	135	228	411	324
$t_{0.5}^1$ schnelle Phase [d]	0.3	0.7	0.3	0.2	0.5	0.5
$t_{0.5}^2$ langsame Phase [d]	38	38	31	40	38	38
k_{-1} schnelle Phase $\times 10^{-6}$ [s^{-1}]	26.7	11.5	26.7	40.1	16.0	16.0
k_{-2} langsame Phase $\times 10^{-6}$ [s^{-1}]	0.21	0.21	0.26	0.20	0.21	0.21

Direkte Bestimmung der Halbwertszeiten

Volumen des Desorptionspuffers (PBS)	Ti-CSS-APS			Ti-CSS-APS-CDI		
	2 ml	20 ml	200 ml	2 ml	20 ml	200 ml
Γ_0 [ng/cm ²]	442	909	579	725	1344	1011
Γ_t ($t = t_{0.5}$) [ng/cm ²]	218	458	286	362	678	502
$t_{0.5}^2$ langsame Phase [d]	28	29	20	34	28	32

Nachdem bereits die spontane Desorption des rhBMP-2 in physiologischem PBS-Puffer bei pH 7.4 als Zweiphasenzerfall gezeigt wurde, wird nun die Verdrängung des rhBMP-2 in Alkylaminlösungen bei pH 7.4 dargestellt, um den kovalent vom nicht-kovalent immobilisierten Proteinanteil der Mischpopulation auf der APS-CDI-Oberfläche zu differenzieren.

In der Tabelle 4.21 werden die immobilisierten rhBMP-2-Mengen auf elektropolierten Titanplättchen, die Halbwertszeiten der schnellen Anfangsphase der Verdrängung und die Beladung nach Ende der kinetischen Untersuchung (Messzeiten von 6 - 8 d) zusammengefasst. Es wurden verschiedene Lösungen zur Verdrängung verwendet, die zur

Differenzierung des kovalent vom nicht-kovalent gebundenen rhBMP-2-Anteils auf der mit Chromschwefelsäure behandelten Titanoberfläche dienten. Die Verdrängung des Proteins wird einem Zweiphasen-Zerfallsmodell angepasst. Durch Vergleich der Halbwertszeiten, die sich aus der Verdrängung in 2 M Ethyl-, 2 M Butyl-, 1 M Hexyl-, 2 M Hexyl-, 2 M Heptyl- und 2 M Octylaminlösung ergeben, liegen die Halbwertszeiten der schnellen Anfangsphase mit 0.02 – 0.05 d in der gleichen Größenordnung für alle Alkylaminlösungen. In der zweiten, langsameren Phase werden die kleinsten Halbwertszeiten unter Verwendung von 2 M Hexyl-, Heptyl- und Octylaminlösung erhalten. Durch Verdrängung mit 2 M Heptylamin beträgt nach 8 d Messzeit die Endbeladung des nicht-kovalent immobilisierten BMP-2 auf der APS-Oberfläche 28 %, während die Proteinmenge auf der APS-CDI-Oberfläche nach der gleichen Verdrängungszeit 62 % des Ausgangswertes beträgt. Nach Subtraktion des nicht-kovalenten BMP-2-Anteils von der APS-CDI-Oberfläche, lässt sich schließen, dass 34 % der immobilisierten BMP-2-Menge auf der APS-CDI-Oberfläche kovalent gebunden ist. Vergleichbar niedrige Halbwertszeiten für die schnelle Phase werden bei der Verdrängung durch Octyl- und Hexylaminlösung erhalten. Hier ist eine Abhängigkeit der Verdrängung des BMP-2 von der Kohlenstoffkettenlänge der Alkylaminlösung erkennbar. Das zeigt, dass die Proteinmoleküle tatsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen von der Oberfläche abgelöst werden, um dann durch Alkylaminmoleküle ersetzt zu werden.

Tabelle 4.21: Freisetzung von ^{125}I -rhBMP-2 von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. Alle unten aufgelisteten Puffer und Lösungen haben pH 7.4. Messzeit $t = 6 - 8 \text{ d}$. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge rhBMP-2. Die Berechnung der Halbwertszeiten der Verdrängung durch Alkylaminlösungen für die schnelle Anfangs- / langsamere Endphase erfolgte nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Verdrängungslösung	Oberflächen- modifikation Ti-elektropol.	Γ_0	Γ_t		Halbwertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$
		^{125}I -rhBMP-2	^{125}I -rhBMP-2	%	
		$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	$[\text{ng}/\text{cm}^2]$		$[\text{d}]$
2 M Ethylamin (C_2)	CSS-APS	191 ± 35	134 ± 35	70	0.02 / 18
	CSS-APS-CDI	520 ± 142	401 ± 109	77	0.02 / 28
2 M Butylamin (C_4)	CSS-APS	234 ± 87	122 ± 45	52	0.03 / 11
	CSS-APS-CDI	667 ± 140	365 ± 191	55	0.02 / 15
1 M Hexylamin (C_6)	CSS-APS	216 ± 12	126 ± 9	58	0.02 / 15
	CSS-APS-CDI	1290 ± 991	942 ± 687	73	0.02 / 25
2 M Hexylamin (C_6)	CSS-APS	210 ± 60	86 ± 29	41	0.04 / 8
	CSS-APS-CDI	500 ± 170	318 ± 127	64	0.02 / 13
2 M Heptylamin (C_7)	CSS-APS	142 ± 2	40 ± 2	28	0.05 / 5
	CSS-APS-CDI	769 ± 497	473 ± 301	62	0.02 / 13
2 M Octylamin (C_8)	CSS-APS	226 ± 81	99 ± 45	44	0.04 / 6
	CSS-APS-CDI	631 ± 43	454 ± 33	72	0.02 / 13
2 M Octylamin (C_8)	CSS-APS-CDI +Ethanolamin	346 ± 34	215 ± 15	62	0.03 / 11

Wie im Fall des Ubiquitins gezeigt, stellte sich auch hier die Frage, nach welchem Mechanismus rhBMP-2 auf der Ti-APS-Oberfläche immobilisiert wird.

Die kovalente Kopplung von Ethanolamin auf der mit CDI aktivierten Ti-CSS-APS-Oberfläche ermöglicht nur eine nicht-kovalente Immobilisierung von rhBMP-2. Diese Oberfläche trägt keine Ladungen, so dass ein Ionenaustausch nicht möglich wäre. Die APS-Oberfläche ist bei pH 7.4 positiv geladen, rhBMP-2 kann bei $\text{pH} < 8.2$ eine positive Ladung tragen. Die Proteinverdrängung in 2 M Octylamin lieferte für die mit Ethanolamin gekoppelte APS-CDI-

Oberfläche Halbwertszeiten von 0.04 d. Diese stimmen sehr gut mit denen der nicht-kovalenten Bindung von rhBMP-2 (auf Ti-CSS-APS) überein. Das ist ein Hinweis darauf, dass rhBMP-2 auf der APS-Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Propylrest des Silans immobilisiert wird.

4.2.4.2 rhBMP-2-Freisetzung von sandgestrahlter Titanoberfläche

In der Abbildung 4.15 wird die Desorption von rhBMP-2 von der Titan-Osteopromote-Oberfläche in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) in einer kinetischen Untersuchung mit einer Messzeit von 7 d dargestellt.

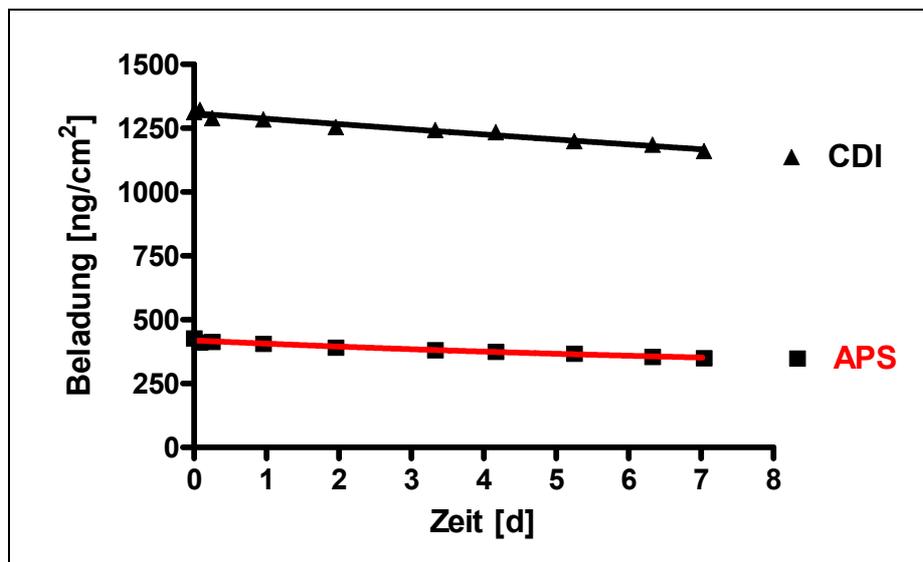


Abbildung 4.15: Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von der Titan-Osteopromote-Oberfläche in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) nach dem Zweiphasen-Zerfallsmodell. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$.

In der Tabelle 4.22 werden die Daten der kinetischen Untersuchung von rhBMP-2 auf Titan-Osteopromote-Plättchen, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurden, zusammengestellt. Die über 7 d gemessene kinetische Untersuchung ließ sich nach einer biphasischen Zerfallskurve anpassen. Für die Anfangsphase wurden Halbwertszeiten von 0.01 und 0.02 d und für die langsamere Endphase Halbwertszeiten von 32 d für das nicht-kovalent (CSS-APS) und 54 d für das kovalent immobilisierte rhBMP-2 (auf CSS-APS-CDI) ermittelt. Die Beladung der Oberfläche nach Inkubation in einer rhBMP-2-Lösung mit der Konzentration

0.25 mg/ml erreichte 428 für das nicht-kovalent (auf CSS-APS) und 1313 ng/cm² für das kovalent gebundene rhBMP-2 (auf CSS-APS-CDI). Diese Beladungswerte sind doppelt so hoch wie die Beladung auf den elektropolierten Titanplättchen (s. Tabelle 4.14). Nach 7 d Desorptionszeit unter täglichem Pufferwechsel bleiben 82 % der Initialbeladungsmenge auf der CSS-APS-Oberfläche und 88 % auf der CSS-APS-CDI-Oberfläche erhalten.

Tabelle 4.22: Spontane Desorption von ¹²⁵I-rhBMP-2 von der Titan-Osteopromote-Oberfläche (Altatec) in PBS bei pH 7.4 (t = 7 d Messzeit). Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der Beladung am Ende der kinetischen Untersuchung zum Zeitpunkt t (t = 7 d Messzeit) immobilisierten Menge rhBMP-2. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ mg/ml. Die Halbwertszeiten der Anfangs- / Endphase wurden nach dem Zweiphasen-Zerfallsmodell berechnet. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in [ng/cm²] beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Desorptions- Puffer	Oberflächen- modifikation Ti-Osteopromote	Γ_0	Γ_t		Halbwertszeit
		¹²⁵ I-rhBMP-2	¹²⁵ I-rhBMP-2	%	$t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$
		[ng/cm ²]	[ng/cm ²]		[d]
Phosphat- Puffer (PBS)	CSS-APS	428 ± 40	351 ± 30	82	0.01 / 32
	CSS-APS-CDI	1313 ± 553	1160 ± 495	88	0.02 / 54

4.2.4.3 rhBMP-2-Freisetzung von Titanplasmaspray-beschichteter Titanoberfläche

In der Abbildung 4.16 wird die Desorption von rhBMP-2 von der Titanplasmaspray-beschichteten Titanlegierung in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) in einer 11 d-kinetischen Untersuchung dargestellt. Die Anpassung nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell liefert für die Anfangsphase Halbwertszeiten von 0.2 d und für die zweite langsamere Phase Halbwertszeiten von 34 d für das kovalent (auf CSS-APS-CDI) und 25 d für das nicht-kovalent immobilisierte rhBMP-2 (auf CSS-APS).

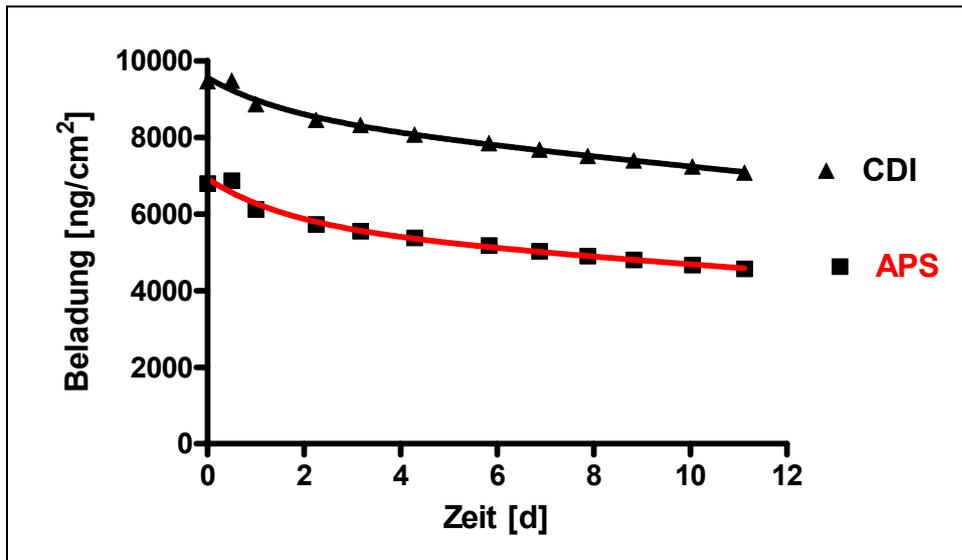


Abbildung 4.16: Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von der Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierung in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) nach dem Zweiphasen-Zerfallsmodell. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$.

Die Tabelle 4.23 zeigt die Ergebnisse einer kinetischen Untersuchung des rhBMP-2 von Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierungsplättchen, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurden. Die über 11 d gemessene kinetische Untersuchung lieferte für das nicht-kovalent immobilisierte rhBMP-2 (auf CSS-APS) Halbwertszeiten von 0.2 d für die Anfangs- und 25 d für die langsame Phase und für das kovalent gebundene rhBMP-2 (auf CSS-APS-CDI) 0.2 d für die Anfangs- und 34 d für die langsame Phase. Die Beladung der Oberfläche nach Inkubation in einer rhBMP-2-Lösung mit der Konzentration 0.25 mg/ml erreichte 6.8 für das nicht-kovalent und $9.5 \mu\text{g/cm}^2$ für das kovalent gebundene rhBMP-2. Diese hohen Beladungswerte hängen sehr stark mit der Oberflächentopologie der Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierung zusammen, die durch diese Schicht eine enorme Oberflächenvergrößerung aufweist, die offenbar den Proteinmolekülen für eine höhere Beladung zur Verfügung steht. Nach 11 d Desorptionszeit unter täglichem Pufferwechsel bleibt 67 % der Initialbeladungsmenge auf der CSS-APS-Oberfläche und 75 % auf der CSS-APS-CDI-Oberfläche erhalten.

Tabelle 4.23: Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von der Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierung (TPS) in PBS bei pH 7.4 ($t = 11$ d Messzeit). Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge rhBMP-2. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ mg/ml. Die Halbwertszeiten werden für die schnelle Anfangs- / langsamere Endphase ermittelt. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Desorptions-Puffer	Oberflächen-modifikation TPS-Ti-Legier.	Γ_0	Γ_t		Halbwertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$
		^{125}I -rhBMP-2	^{125}I -rhBMP-2	%	
		$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	$[\text{ng}/\text{cm}^2]$		$[\text{d}]$
Phosphat-Puffer (PBS)	CSS-APS	6792 ± 378	4571 ± 240	67	0.2 / 25
	CSS-APS-CDI	9461 ± 340	7076 ± 334	75	0.2 / 34

4.2.4.4 rhBMP-2-Freisetzung von Cobaltchrommolybdän-Legierung

In der Abbildung 4.17 wird die spontane Desorption des rhBMP-2 von Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurden, im physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4 in einer 64 d-kinetischen Untersuchung dargestellt. Diese liefert für die Anfangsphase Halbwertszeiten von 0.1 d und für die zweite, langsame Phase Halbwertszeiten von 86 d für die APS-CDI-Oberfläche und 46 d für das nicht-kovalent immobilisierte Protein auf der APS-Oberfläche (s. Tabelle 4.24). Nach Ende der kinetischen Untersuchung bleibt 46 % der Initialbeladungsmenge auf der APS-CDI-Oberfläche und 38 % der nicht-kovalent immobilisierten Menge rhBMP-2 auf der APS-Oberfläche zurück.

Tabelle 4.24: Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von CoCrMo-Legierungsplättchen in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ mg/ml. In der Tabelle der Langzeitdesorption mit einer gesamten Messzeit von $t = 64$ d erfolgte ein zehntäglicher Pufferwechsel.

Desorptionslösung	Oberflächen-Modifikation CoCrMo-Legier.	Γ_0	Γ_t		Halbwertszeit $t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$
		^{125}I -rhBMP-2	^{125}I -rhBMP-2	%	
		$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	$[\text{ng}/\text{cm}^2]$		$[\text{d}]$
Phosphat-Puffer (PBS)	CSS-APS	207 ± 32	78 ± 13	38 %	0.1 / 46
	CSS-APS-CDI	499 ± 31	232 ± 23	46 %	0.1 / 86

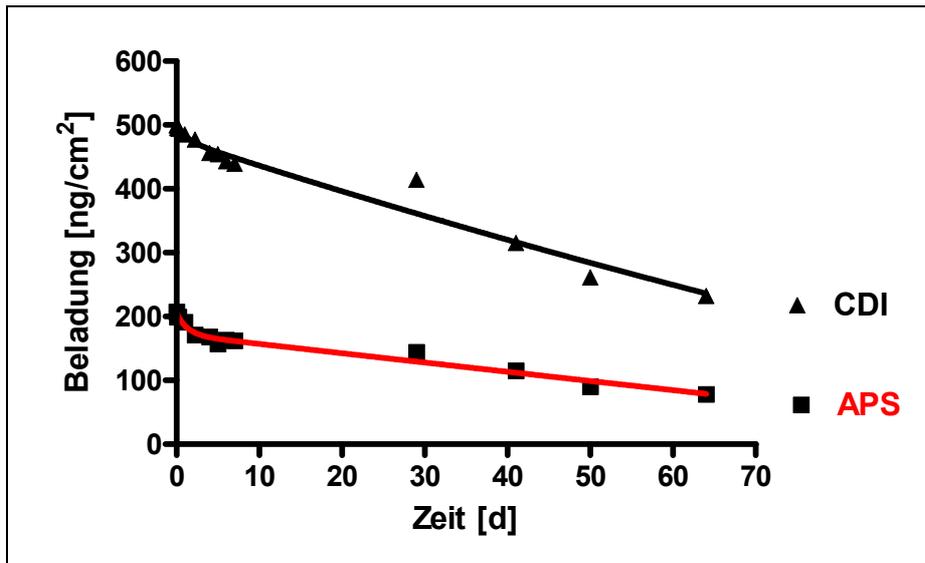


Abbildung 4.17: Spontane Desorption von ^{125}I -rhBMP-2 von CoCrMo-Legierungsplättchen in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. In der Tabelle der Langzeitdesorption mit einer gesamten Messzeit von $t = 64 \text{ d}$ erfolgte ein zehntäglicher Pufferwechsel.

In der Tabelle 4.25 wurden die immobilisierten rhBMP-2-Mengen auf Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen, die Halbwertszeiten und die Beladung nach Ende der 8 d-kinetischen Untersuchung zusammengefasst. Durch Vergleich der Halbwertszeiten, die sich aus der Verdrängung in 2 M Hexyl-, Heptyl- und Octylaminlösung ergeben, liegen die Halbwertszeiten der schnellen Anfangsphase bei allen drei Alkylaminen zwischen 0.02 – 0.08 d sowohl für das nicht-kovalent als auch für das kovalent gebundene rhBMP-2. In der langsamen Endphase liegen die Halbwertszeiten der Verdrängung durch Hexyl-, Heptyl- und Octylaminlösungen zwischen 6 – 7 d für das nicht-kovalent (auf CSS-APS) und 17 – 19 d für das kovalent gebundene Protein (auf CSS-APS-CDI).

Tabelle 4.25: Verdrängung des ^{125}I -rhBMP-2 von CoCrMo-Legierungsplättchen. $C_{\text{rhBMP-2}} = 0.25 \text{ mg/ml}$. Alle unten aufgelisteten Lösungen haben pH 7.4. Messzeit $t = 8 \text{ d}$. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge rhBMP-2. Die Berechnung der Halbwertszeiten der Verdrängung durch Alkylaminlösungen erfolgte aus der schnellen Anfangs- / langsameren Endphase eines biphasischen Zerfallsmodells. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng/cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Verdrängungslösung	Oberflächen- Modifikation	Γ_0	Γ_t		Halbwertszeit
		^{125}I -rhBMP-2 [ng/cm ²]	^{125}I -rhBMP-2 [ng/cm ²]	%	$t_{0.5}^1 / t_{0.5}^2$ [d]
2 M Hexylamin (C ₆)	CSS-APS	277 ± 45	108 ± 23	39	0.03 / 6
	CSS-APS-CDI	528 ± 131	358 ± 82	68	0.02 / 19
2 M Heptylamin (C ₇)	CSS-APS	207 ± 9	71 ± 8	34	0.08 / 7
	CSS-APS-CDI	442 ± 82	304 ± 65	69	0.02 / 19
2 M Octylamin (C ₈)	CSS-APS	246 ± 22	100 ± 10	41	0.08 / 7
	CSS-APS-CDI	532 ± 62	330 ± 24	62	0.02 / 17

4.2.4.5 Einwirkung von Proteinen auf die Freisetzungsraten von rhBMP-2 von Metalloberflächen

Eine mögliche Freisetzung des auf Implantatoberflächen immobilisierten rhBMP-2 wurde durch Zugabe einer hochkonzentrierten (70 mg/ml) Rinderserumalbuminlösung (BSA) bei pH 7.4 untersucht.

In der Abbildung 4.18 wird die Verdrängung des rhBMP-2 von elektropoliertem Titan in 70 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) bei pH 7.4 graphisch dargestellt. Die Titanplättchen wurden mit Chromschwefelsäure behandelt und entweder mit APS oder mit APS und CDI modifiziert. Die Halbwertszeiten dieser Protein-Protein-Verdrängung, die der Tabelle 4.26 entnommen werden können, wurden einem biphasischen Zerfallsmodell angepasst und liegen für elektropoliertes Titan bei 0.2 d für die schnelle und bei 19 d für die langsame Phase auf der APS-Oberfläche bzw. 30 d auf der APS-CDI-Oberfläche.

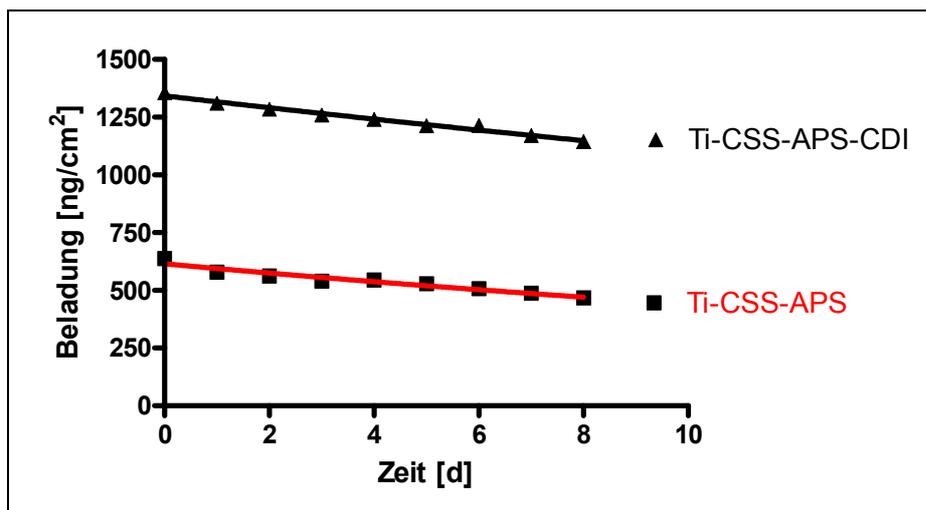


Abbildung 4.18: Verdrängung von ^{125}I -rhBMP-2 von elektropliertem Titan in 70 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) bei pH 7.4 bei RT. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ mg/ml. Während der Messzeit $t = 8$ d erfolgte ein täglicher BSA-Lösungswechsel.

Tabelle 4.26: Vergleich zwischen der Verdrängung des ^{125}I -rhBMP-2 von elektroplierten Titanplättchen durch 70 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA) und der Desorption in PBS (Kontrolle) bei pH 7.4. $c_{\text{rhBMP-2}} = 0.25$ mg/ml. Die Messzeit t betrug 8 d. Γ_0 entspricht der initial und Γ_t der zum Zeitpunkt t immobilisierten Menge rhBMP-2. Die Berechnung der Halbwertszeiten der Verdrängung durch BSA erfolgte für die langsamere Endphase ($t_{0.5}^2$) nach einem biphasischen Zerfallsmodell. Die angegebenen Immobilisierungsmengen in $[\text{ng}/\text{cm}^2]$ beziehen sich auf die geometrische Fläche.

Oberflächenmodifikation		Γ_0	$\Gamma_t (t = 8 \text{ d})$		Halbwertszeit
Verdrängung / Desorption		^{125}I -rhBMP-2	^{125}I -rhBMP-2		$t_{0.5}^2$
		$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	$[\text{ng}/\text{cm}^2]$	%	$[\text{d}]$
Titan elektropliert	CSS-APS	638 ± 117	468 ± 105	73	19
BSA-Verdrängung	CSS-APS-CDI	1356 ± 413	1144 ± 344	84	30
Titan elektropliert	CSS-APS	579	385	66	28
Kontrolle in PBS	CSS-APS-CDI	1344	966	72	27

Die Freisetzung des rhBMP-2 weist darauf hin, dass andere Proteinbestandteile des Serumalbumins das immobilisierte rhBMP-2 von der Metalloberfläche in einer Weise verdrängen, in der Halbwertszeiten zwischen den niedriger liegenden Halbwertszeiten der Verdrängung durch homologe 2 M Alkylaminlösungen und den höher liegenden Halbwertszeiten der spontanen Desorption im physiologischen Phosphatpuffer (PBS) erhalten werden.

4.3 Untersuchungen von rhBMP-2 *in vitro*

4.3.1 Toxizitätstestung von rhBMP-2

Das in *E. coli* gentechnisch hergestellte rhBMP-2 mit seiner breiten Anwendung in tierexperimentellen Modellen aufgrund seines knocheninduzierenden Potentials, wurde auf das Vorliegen einer möglichen Genotoxizität geprüft. Die Zellen von zwei unterschiedlichen Säugetier-Zelllinien wurden in 3 – 300 nM rhBMP-2 inkubiert und die Mikrokerne ausgezählt [Heddle, 1973 und Schmid, 1975]. Insgesamt wurden ca. 25000 Zellkerne der Zelllinie V79 chinesischer Hamsterzellen und 40000 Zellkerne der humanen Amnionflüssigkeit fibroblastenähnlicher Zelllinie (amniotic fluid fibroblast-like, abgekürzt: AFFL) auf die Frequenz der Mikrokerne überprüft. Der *in vitro* Mikrokerntest ist im Bereich der Toxikologie zur Überprüfung der Effekte physikalischer oder chemischer Reagenzien bezüglich der DNA Schädigung etabliert [Dopp et al., 1995 und 1997].

Die Ergebnisse der ausgezählten Mikrokerne wurden in Tabelle 4.27 und in Abbildung 4.19 und Abbildung 4.20 dargestellt. Zusätzlich wurden die Zellteilungen kontrolliert. Im Fall der V79 chinesischen Hamsterzellen wurde keine Zunahme der gezählten Mikrokerne festgestellt. Im Gegensatz dazu gibt es eine starke Zunahme der Anzahl der Mikrokerne in der mit Cisplatin behandelten Positivkontrolle. Bezüglich der Anzahl der Zellteilung wurde eine geringe und nicht signifikante Zunahme von ca. 12 % in den rhBMP-2 Konzentrationen 3 und 30 nM beobachtet. Bei 300 nM rhBMP-2 wurden die Kontrollwerte erreicht. Cisplatin führt zur Reduzierung der Zellteilung um ca. 11 %. Offensichtlich zeigt rhBMP-2 keine signifikante Zunahme in der Anzahl der Zellteilung.

Bei den humanen AFFL Zellen hat eine Inkubation mit 3 – 300 nM rhBMP-2 zu keiner Zunahme in der Induktion der Bildung von Mikrokernen geführt. Im Gegensatz dazu wurde die Anzahl der Mikrokerne der mit Cisplatin exponierten Zellen um 200 % erhöht. Die Anzahl der Zellteilung hat bei den rhBMP-2-haltigen Proben um 8 – 35 % und in der Positivkontrolle um 60 % abgenommen.

Tabelle 4.27: Anzahl der ausgezählten V79 Hamster- und AFFL Humanzellen nach Behandlung mit Phosphat-Puffer (PBS, Negativkontrolle), Cisplatin (Positivkontrolle) und unterschiedlichen rhBMP-2 Konzentrationen und ihrer Markierung mit Bisbenzimid (Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Dopp, AG Prof. Dr. A. W. Rettenmeier, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Universitätsklinikum Essen).

	Anzahl der ausgezählten V79 Zellen	Anzahl der ausgezählten AFFL Zellen
Negativkontrolle	3901	8020
Positivkontrolle	2335	8008
3 nM rhBMP-2	6111	6070
30 nM rhBMP-2	6066	10000
300 nM rhBMP-2	6055	8000

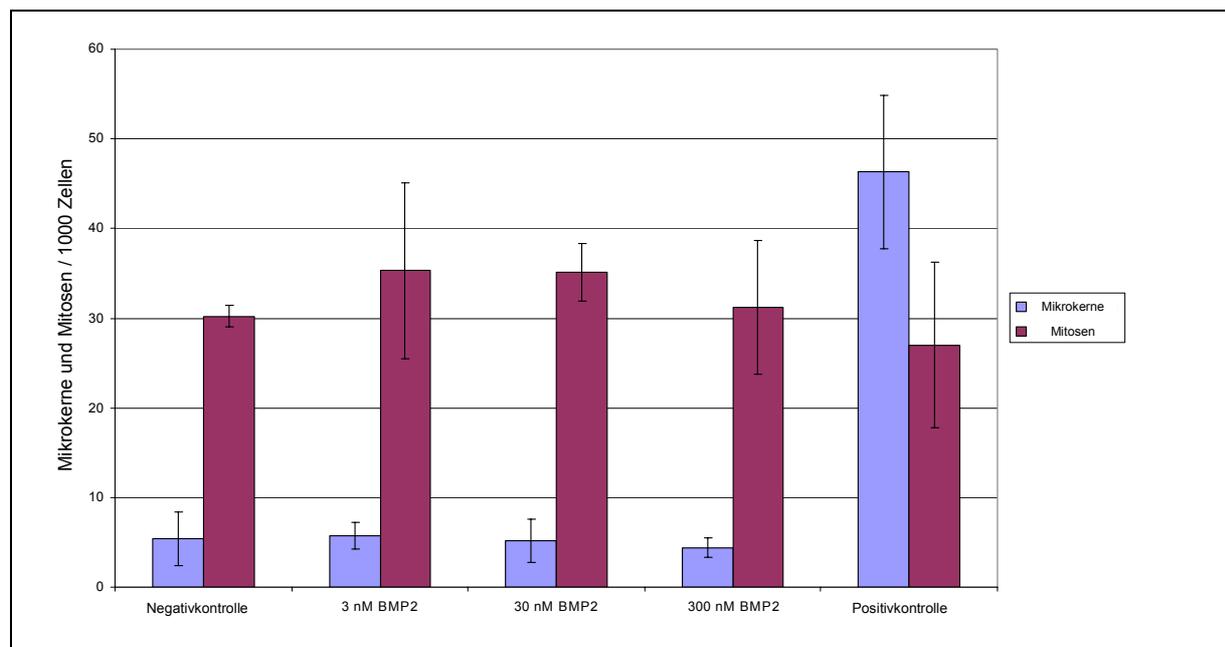


Abbildung 4.19: Frequenz der Mikrokerne und der Mitosen in der V79 Hamsterzelllinie nach Inkubation mit unterschiedlichen rhBMP-2 Konzentrationen und Vergleich mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle.

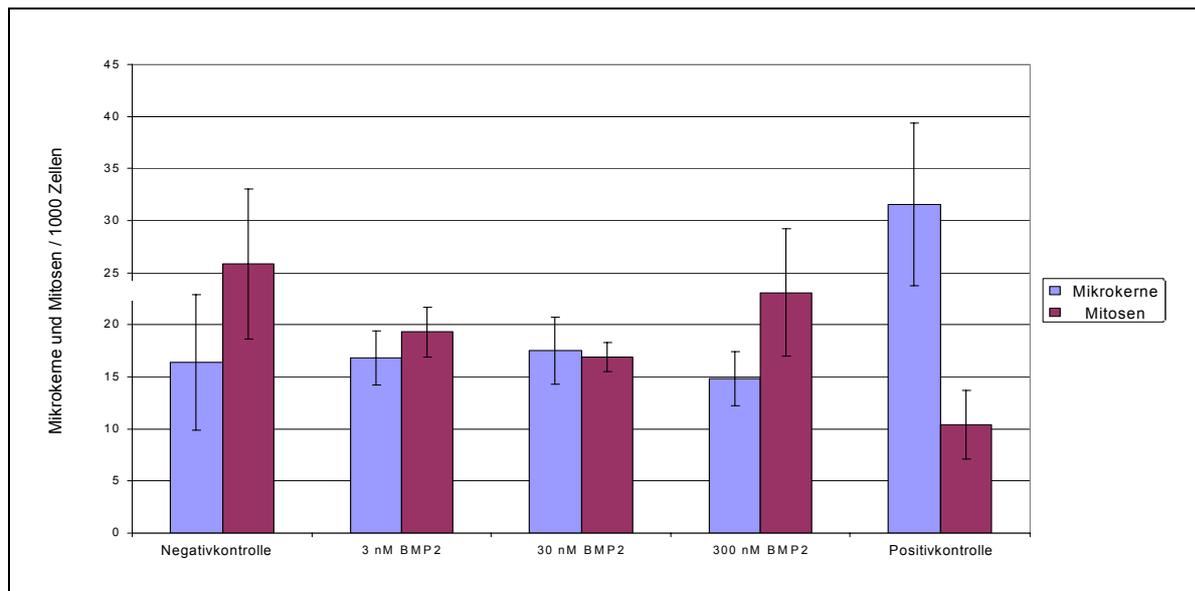


Abbildung 4.20: Frequenz der Mikrokerne und der Mitosen in der humanen AFFL Zelllinie nach Inkubation mit unterschiedlichen rhBMP-2 Konzentrationen und Vergleich mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle.

4.3.2 Nachweis der biologischen Aktivität von löslichem rhBMP-2

In der murinen Osteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1 erhöht BMP-2 die Induktion der alkalischen Phosphatase [Takuwa et al., 1991]. Die biologische Aktivität von BMP-2 wird deshalb oft in einem „alkalische Phosphatase-Stimulierungs-Test“ nach Wiemann et al. [Wiemann et al., 2001] in der Zelllinie MC3T3-E1 gemessen.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der MC3T3-E1 Osteoblastenzelllinie wurde mit den reinsten rhBMP-2 Fraktionen nach ihrer chromatographischen Aufreinigung ermittelt. Nachdem konfluent gewachsene Zellen 3 d lang in unterschiedlichen rhBMP-2 Konzentrationen inkubiert wurden, wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase photometrisch bei 405 nm gemessen. Die Daten wurden nichtlinear mittels des PC-Programms GraphPad Prism einer Hyperbel (Sättigungskurve) mit $r^2 = 0.9916$ angepasst. Der gemessene Konzentrationsbereich lag zwischen 0 und 30 nM rhBMP-2. Die Halbsättigungskonstante $K_{0.5}$ beträgt 17 nM rhBMP-2 mit einer Standardabweichung von 3 nM. Die maximale OD liegt unter 3.

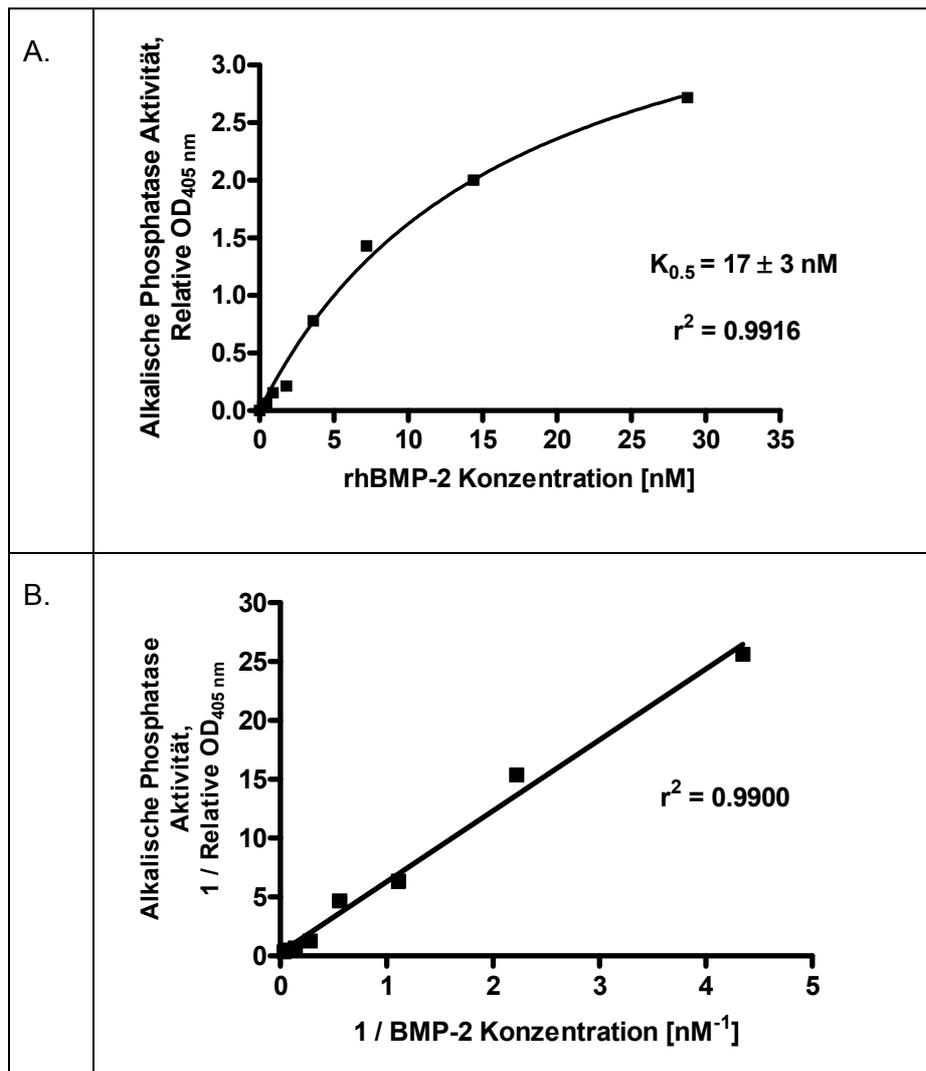


Abbildung 4.21: (A) nichtlineare (hyperbolische) und (B) doppelt reziproke Darstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve vom in *E. coli* gentechnisch hergestellten rhBMP-2 unter Verwendung des alkalischen-Phosphatase-Induktionstests in MC3T3-E1 Zellen (Zusammenarbeit mit Dr. M. Wiemann, AG Prof. Dr. D. Bingmann, Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Essen).

Eine interessante Fragestellung war, ob die biologische Aktivität von rhBMP-2 durch radioaktive Markierung mittels der Bolton-Hunter-Methode beeinflusst wird. Deshalb wurde natives rhBMP-2 gegenüber radioaktiv markiertem rhBMP-2 parallel untersucht (s. Abbildung 4.22).

Konfluent gewachsene MC3T3-E1 Zellen wurden 3 d lang in unterschiedlichen rhBMP-2 Konzentrationen inkubiert und anschließend die Aktivität der alkalischen Phosphatase photometrisch bei 405 nm gemessen. Die maximale OD liegt unter 2. Die Daten wurden nichtlinear einer Hyperbel (Sättigungskurve) mit $r^2 = 0.9984$ bzw. 0.9918 angepasst. Der gemessene Konzentrationsbereich lag zwischen 0 und 75 nM rhBMP-2. Die Halbsättigungskonstante $K_{0.5}$ beträgt 42 ± 3 nM für das native rhBMP-2 und 68 ± 15 nM für

das ^{125}I -Bolton-Hunter-rhBMP-2. Das zeigt, dass die biologische Aktivität von rhBMP-2 nach der Bolton-Hunter-Markierung um 40 % abnimmt. Das ist darauf zurückzuführen, dass Rezeptorbindungsstellen am rhBMP-2-Molekül durch die Markierung verändert werden und damit den Rezeptoren der Zellen nicht mehr zugänglich sind.

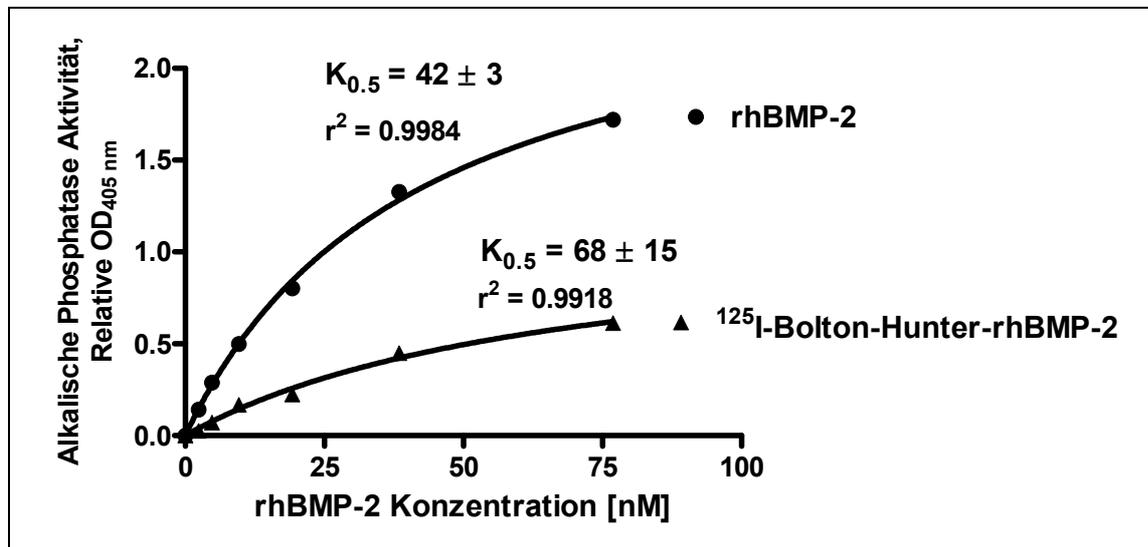


Abbildung 4.22: Vergleich der alkalischen-Phosphatase-Aktivität zwischen nativem rhBMP-2 und dem nach der Bolton-Hunter Methode radioaktiv markierten ^{125}I -rhBMP-2 in MC3T3-E1 Zellen (Zusammenarbeit mit Dr. T. Zumbink und Dr. M. Wiemann, AG Prof. Dr. D. Bingmann, Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Essen).

Eine weitere interessante Fragestellung war der Einfluß der Chloramin-T-Markierung auf rhBMP-2. Nachdem gezeigt wurde, dass die Markierung von rhBMP-2 nach der Bolton-Hunter-Methode, die als schonende Methode zur Proteinmodifizierung gilt, zu einer Abnahme der biologischen Aktivität um 40 % führt, sollte der Einfluß der etwas „aggressiveren“ Markierungs-Methode nach Chloramin-T untersucht werden. Tabelle 4.28 zeigt die biologische Aktivitätsmessung für eine native rhBMP-2-Probe in PBS mit bekannter biologischen Aktivität als Positivkontrolle, eine rhBMP-2-Probe, die nach der Chloramin-T-Methode (CT) modifiziert wurde und eine native rh-BMP-2-Probe. Die Parallelmessung dieser drei unterschiedlichen BMP-2-Proben, die photometrisch bei 405 nm ermittelt wurde, zeigt, dass ihre biologische Aktivität in der gleichen Größenordnung liegt. Da kein Plateau erreicht werden konnte, wurde keine Halbsättigungskonstante $K_{0,5}$ ermittelt.

Tabelle 4.28: Biologische Aktivitätsmessung anhand der Induktion der alkalischen Phosphatase. Die Absorption bei 405 nm von drei unterschiedlich behandelten rhBMP-2-Proben der gleichen Konzentration wird in MC3T3-E1 Zellen gemessen. Es handelt sich um eine native rhBMP-2-Probe in PBS mit bekannter biologischen Aktivität als Positivkontrolle, eine rhBMP-2-Probe, die nach der Chloramin-T-Methode (CT) modifiziert wurde und eine native rh-BMP-2-Probe. Beide letzteren Proben lagen in Borat/SDS-Puffer vor. Alle rhBMP-2 Proben stammen aus derselben Präparation.

rhBMP-2 Konzentration [nM]	Positivkontrolle rhBMP-2 OD _{405 nm}	Chloramin-T-rhBMP-2 OD _{405 nm}	Natives rhBMP-2 OD _{405 nm}
5	2.295	2.119	1.912
2.5	2.090	2.063	1.472
1.25	1.469	1.202	0.971
0.625	0.839	0.694	0.469
0.3125	0.341	0.256	0.179

4.3.3 Nachweis der biologischen Aktivität des immobilisierten rhBMP-2 an Metalloberflächen

In humanen, neonatalen Preosteoblasten-Kalvariazellen erhöht BMP-2 die alkalische Phosphatase-, Osteopontin-, Osteocalcin- und Typ1-Kollagen-Expression [Hay et al., 1999]. Auch in der murinen Osteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1 erhöht BMP-2 die Induktion der alkalischen Phosphatase und die Sekretion von Osteocalcin [Chung et al., 1999a; Takuwa et al., 1991]. Die biologische Aktivität von BMP-2 wird deshalb oft in einem „alkalische Phosphatase-Stimulierungs-Test“ nach Takuwa et al. [Takuwa et al., 1991] in der Zelllinie MC3T3-E1 gemessen.

Zur Detektion der endogenen Phosphatase wurde das Reagenz 2-(5'-Chloro-2-phosphoryloxyphenyl)-6-chloro-4(3H)-quinazolinon oder ELF (**E**nzyme-**L**abeled-**F**luorescence)-97 Phosphat verwendet. Es handelte sich um ein im blauen Bereich selbst schwach fluoreszierendes Substrat, das aufgrund enzymatischer Entfernung seines Phosphatmoleküls zur Bildung eines intensiv gelb-grünfluoreszierenden Präzipitats führt.

Der Nachweis der biologischen Aktivität der rhBMP-2 immobilisierten Metallplättchen erfolgte in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 durch Induktion des grünfluoreszierenden Substrates für die alkalische Phosphatase mittels Epifluoreszenz.

Die folgenden drei Abbildungen zeigen die biologische Aktivität des kovalent und nicht-kovalent immobilisierten rhBMP-2 auf Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierungs-, elektropolierten Titan- und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen in einem direkten Vergleich mit den Kontrollplättchen, die kein rhBMP-2 beinhalten. Auf jedem Bild (1, 2 und 3) sind zwei Plättchen zu sehen, die nebeneinander mikroskopisch untersucht und gleichzeitig unter den gleichen Parametern (z.B. Belichtungszeiten) fotografiert wurden. Auf diese Weise erhält man einen direkten Vergleich der Probenplättchen.

In der Abbildung 4.23 erkennt man auf dem linken Bild ein Titanplasma-spray-beschichtetes Titanlegierungsplättchen modifiziert mit APS in Abwesenheit von rhBMP-2 (1A, Negativkontrolle) und direkt daneben eins mit rhBMP-2 (1B), in dem die starke Fluoreszenz einen deutlichen Nachweis für eine biologisch aktive Oberfläche darstellt. Das Zentralbild zeigt ein Titanplasma-spray-beschichtetes Titanlegierungsplättchen modifiziert mit APS-CDI in

Abwesenheit von rhBMP-2 (2A, Negativkontrolle) und direkt daneben eins mit rhBMP-2 (2B), in dem eine starke Fluoreszenz zu erkennen ist. Das rechte Bild stellt die intensive Fluoreszenz eines mit APS (3A) und eines mit APS-CDI modifizierten Plättchens mit immobilisiertem rhBMP-2 (3B) dar, beide weisen vergleichbar hohe biologische Aktivität auf [Chatzinikolaidou et al., 2003].

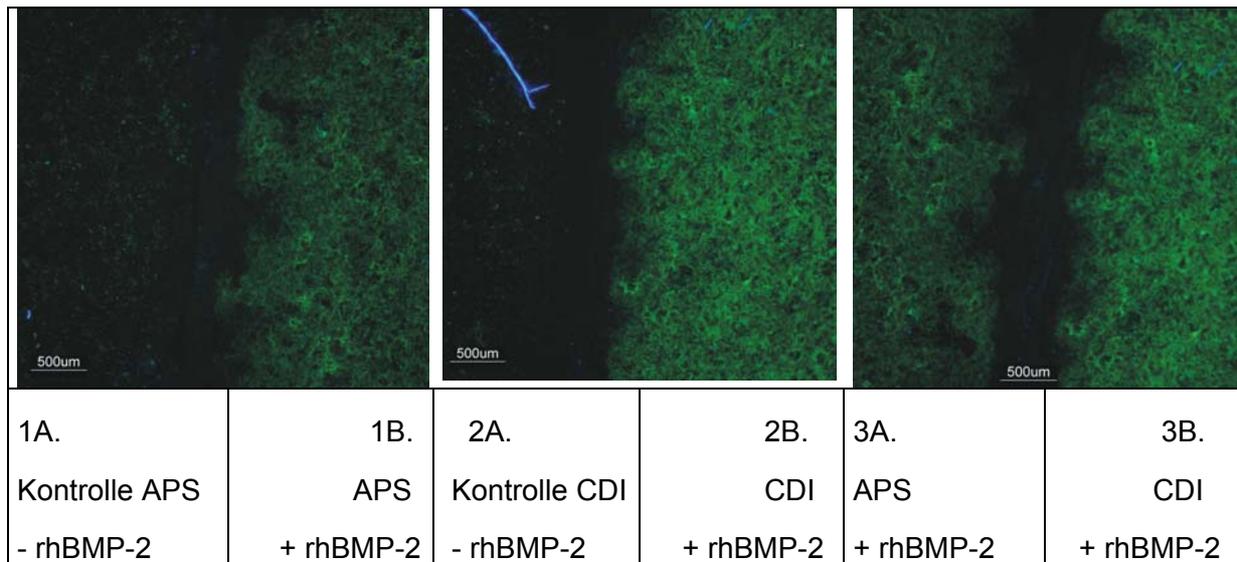


Abbildung 4.23: Nachweis der biologischen Aktivität des immobilisierten BMP-2 auf Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierungsplättchen in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 durch Induktion der alkalischen Phosphatase mittels des grünfluoreszierenden Substrates ELF-97.

In der Abbildung 4.24 erkennt man auf dem linken Bild ein elektropoliertes Titanplättchen modifiziert mit APS in Abwesenheit von rhBMP-2 (1A, Negativkontrolle) und direkt daneben eins mit rhBMP-2 (1B), in dem die starke Fluoreszenz einen deutlichen Nachweis für eine biologisch aktive Oberfläche darstellt. Das Zentralbild zeigt ein elektropoliertes Titanplättchen modifiziert mit APS-CDI in Abwesenheit von rhBMP-2 (2A, Negativkontrolle) und direkt daneben eins mit rhBMP-2 (2B), in dem eine starke Fluoreszenz, bedingt durch die hohe biologische Aktivität zu erkennen ist. Das rechte Bild stellt die intensive Fluoreszenz eines mit APS (3A) und eines mit APS-CDI modifizierten Plättchens mit immobilisiertem rhBMP-2 (3B) dar, die die hohe biologische Aktivität dieser Oberflächen nachweist.

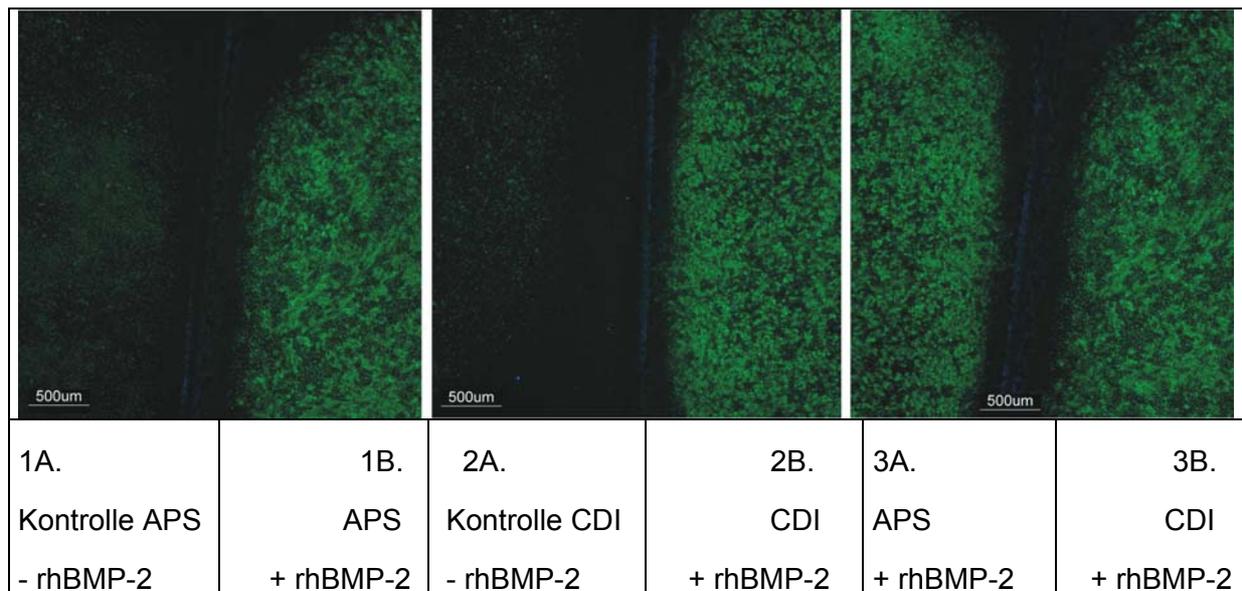


Abbildung 4.24: Nachweis der biologischen Aktivität des immobilisierten BMP-2 auf elektropolierte Titanplättchen in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 durch Induktion der alkalischen Phosphatase mittels des grünfluoreszierenden Substrates ELF-97.

In der Abbildung 4.25 wird die biologische Aktivität des adsorbierten rhBMP-2 auf Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen im Vergleich zu den Kontrollen, die kein rhBMP-2 behalten, gezeigt. Bei zwei Kontrollplättchen ohne rhBMP-2 (A und B) wurden die Zellkerne der angewachsenen Zellen mit Blaufluoreszenz visualisiert. Diese zeigen keine Induktion der alkalischen Phosphatase. Das Plättchen mit adsorbiertem rhBMP-2 (C) zeigt eine Grünfluoreszenz, bedingt durch die Induktion der alkalischen Phosphatase. Hierbei wurden die Zellkerne nicht dargestellt, weil eine starke Interferenz in beiden Fluoreszenzfärbungen auftreten konnte.

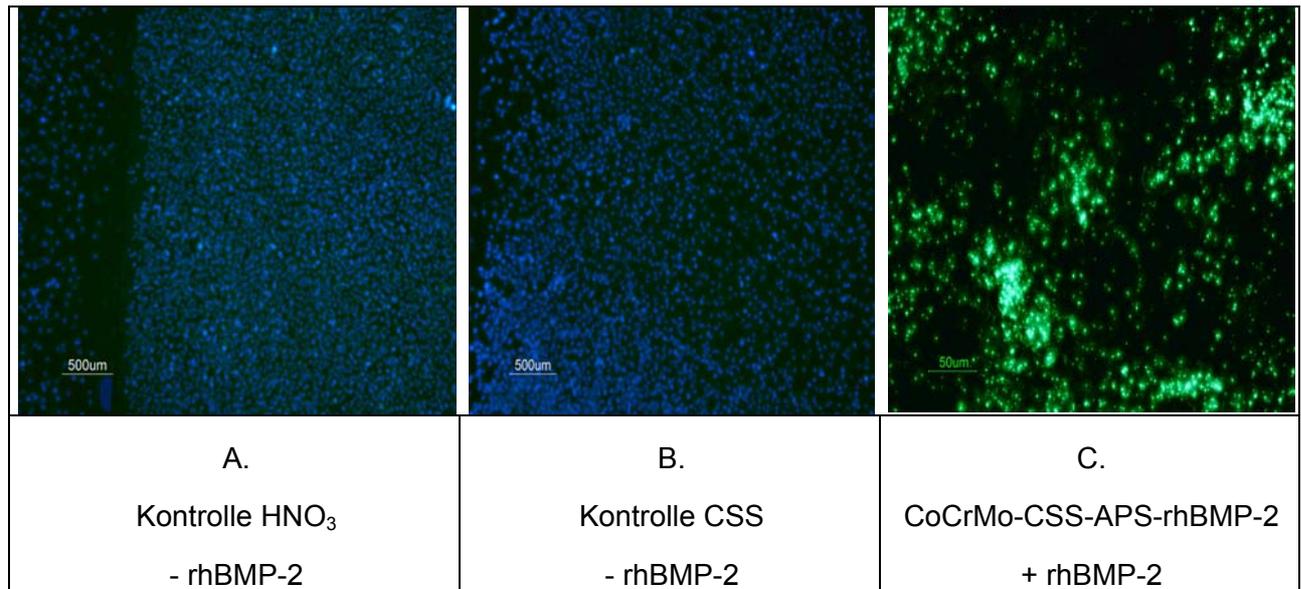


Abbildung 4.25: Nachweis der biologischen Aktivität des immobilisierten BMP-2 auf Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 durch Induktion der alkalischen Phosphatase mittels des grünfluoreszierenden Substrates ELF-97 (C). Zum Vergleich sind zwei Kontrollplättchen ohne und mit Chromschwefelsäure-Behandlung (A und B) ohne rhBMP-2 aufgestellt, in denen die angewachsenen Zellen durch Zellkernfärbung in blau visualisiert wurden.

4.4 Untersuchungen von rhBMP-2 *in vivo*

4.4.1 Untersuchung der Oberflächenmodifikation auf inflammatorische Reaktionen in Kaninchen

Im Periostlappenexperiment in Kaninchen handelte es sich um ein Modell ektopischer Knochenbildung, wobei die reine Menge des neu gebildeten Knochens unabhängig von der Regenerierungskapazität des umgebenden Knochens abgeschätzt wird. Die Implantation von Probenkörpern in einen Muskel ermöglicht die Untersuchung des eigentlichen osteoinduktiven Potentials eines Knochenersatzes oder Implantates. In Kombination mit BMP-2 werden Proliferation und Differenzierung von Mesenchymal-Progenitorzellen auf der feinen Periostschicht und eine Differenzierung der Osteoblasten-Zelllinie initiiert. Das führt zur enchondralen Knochenbildung [Voggenreiter et al., 2001].

Die Implantate für das Periostlappenexperiment in Kaninchen waren rechteckige Titanplättchen, die mit eigenem Knochenhautstreifen (Perioststreifen) umwickelt wurden (s. Abbildung 3.7 und Kapitel 3.5.2).

Die Probenkörper wurden 4 Wochen nach Implantation entfernt und histologisch untersucht. Im konventionellen Lichtmikroskop war kein histologischer Nachweis für eine Entzündungs- oder Makrophagenzellreaktion erkennbar. Die Implantate wurden mit einem Perioststreifen und einer dünnen Schicht von Kollagenbindegewebe mit spindelförmigen Zellen und wenigen Blutgefäßen umwickelt. Es wurden keine Unterschiede bezüglich der Gewebereaktion zwischen den verschiedenen Kontrollimplantaten erhalten. Keine lokalen oder allgemeinen (z.B. Fieber, Schock) immuninflammatorischen Reaktionen konnten aus den Untersuchungen beobachtet werden. Zusätzlich zeigte die Applikation sowohl löslichen als auch chemisch immobilisierten rhBMP-2 hervorragende Biokompatibilität.

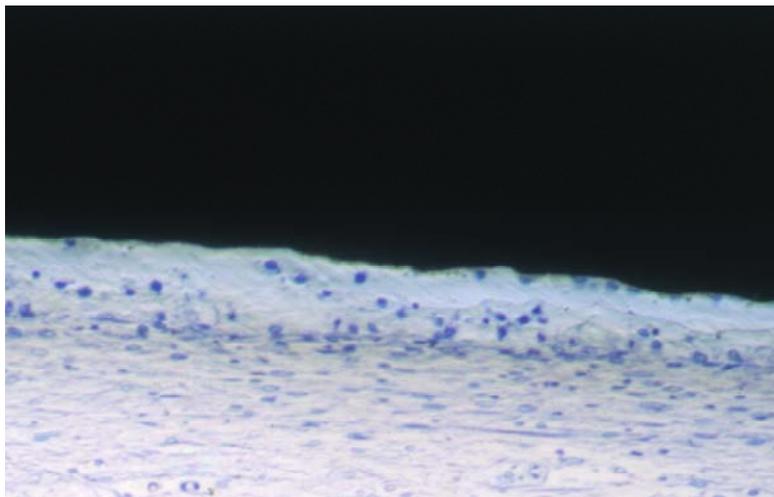


Abbildung 4.26: Silanisiertes Chromschwefelsäure-behandeltes Titanimplantat (Ti-CSS-APS) nach 4 Wochen. In der 100-fachen Vergrößerung ist kein Nachweis für eine Entzündungsreaktion erkennbar. Das Implantat wurde mit einem Perioststreifen (nicht gezeigt) und einer dünnen Schicht Kollagenbindegewebe umwickelt (Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, Universitätsklinikum Essen).

4.4.2 Untersuchung der biologischen Aktivität von immobilisiertem rhBMP-2 auf Titanoberflächen im Kaninchen

Bei den Titanimplantaten für das Periostlappenexperiment in Kaninchen handelte es sich um rechteckige Titanplättchen, die mit einem Perioststreifen umwickelt wurden (s. Kapitel 4.4.1). Diese wurden in zwei Hauptgruppen aufgeteilt: in die Gruppe I, die als Kontrollgruppe (ohne rhBMP-2) bezeichnet wurde und in die experimentelle Gruppe II, die chemisch unmodifizierte, mit Chromschwefelsäure behandelte Titanimplantate (Ti-CSS) mit löslichem rhBMP-2 und chemisch modifizierte, Chromschwefelsäure-behandelte Titanimplantate mit kovalent gekoppeltem rhBMP-2 (Ti-CSS-APS-CDI-rhBMP-2) enthielt. Wie aus der Tabelle 4.29 zu entnehmen ist, führt die Applikation von löslichem rhBMP-2 in 8 von 8 Fällen und bei dem chemisch immobilisierten rhBMP-2 auf Implantaten in 6 von 8 Fällen zu einer Knochenneubildung. In 2 von 8 Fällen des flüssig applizierten rhBMP-2 wurde eine fibröse Kapselbildung festgestellt (s. Abbildung 4.27), dagegen zeigten alle 6 von 6 knocheninduzierten rhBMP-2-beschichteten Implantate einen direkten Kontakt zu dem neu gebildeten Knochengewebe (s. Abbildung 4.28). Bei den Kontrollen ohne rhBMP-2 kommt es zu einer niedergradigen Knochenbildung, die auf die Progenitorzellen der feinen

Periostschicht zurückzuführen ist, die zur Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten führen.

Tabelle 4.29: Experimentelle Gruppen mit variablen Oberflächenbehandlungen im Periostlappenexperiment in Kaninchen. Ti-CSS: Chromschwefelsäure-behandeltes Titanplättchen, APS: 3-Aminopropyltriethoxysilan, CDI: 1,1'-Carbonyldiimidazol. (Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, Universitätsklinikum Essen).

Experimentelle Gruppe der Titanimplantate	n	Bemerkungen
Experimentelle Gruppe I (Kontrollen)		
Unmodifizierte Titanimplantate	2	1 Probenkörper mit niedergradiger Knochenbildung
Ti-CSS	2	-
Ti-APS	4	1 Probenkörper mit niedergradiger Knorpelbildung
Ti-CSS-APS	4	1 Probenkörper mit niedergradiger Knochenbildung
Experimentelle Gruppe II		
Unmodifizierte Ti-CSS + frei lösliches rhBMP-2	8	8/8 Knocheninduktion, 2/8 fibröses Bindegewebe
Ti-CSS-APS-CDI-rhBMP-2, modifiziertes, Ti-CSS + kovalent gebundenes rhBMP-2	8	6/8 Knocheninduktion, 6/6 Knochen-Metall Kontakt

In Abbildung 4.27 werden mikroradiographische Aufnahmen von Implantaten mit (A) freiem, löslichem und (B) chemisch immobilisiertem rhBMP-2 im Periostlappenexperiment in Kaninchen gezeigt. Im Falle des flüssigen rhBMP-2 ist es eindeutig, dass sich zwischen Knochen und Metall eine fibröse Bindegewebeschicht gebildet hat. Der direkte Kontakt zwischen Knochen und Metallimplantat ist im Fall (B) des immobilisierten rhBMP-2 deutlich erkennbar.

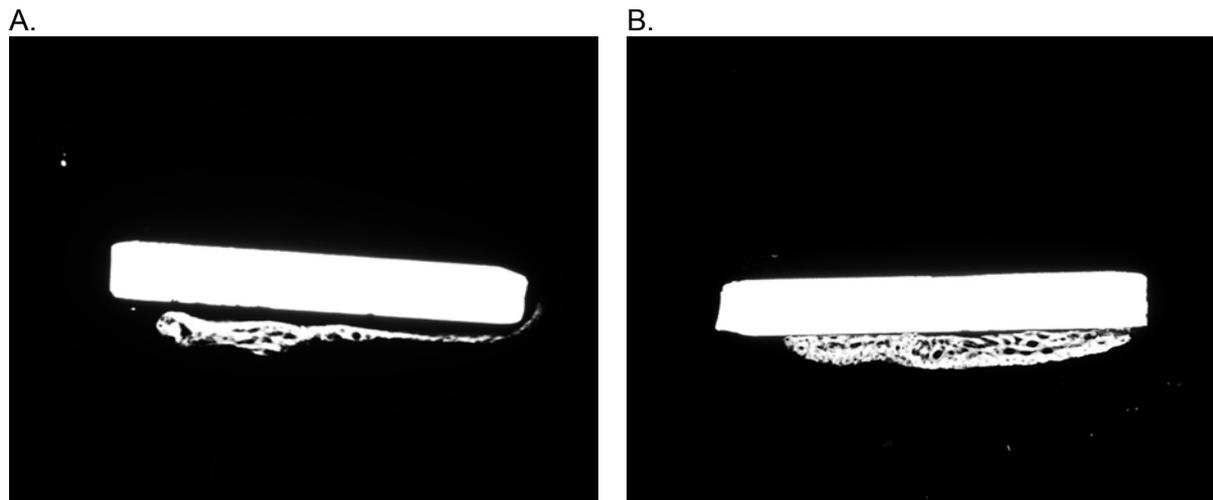


Abbildung 4.27: Mikroradiographische Aufnahmen von Implantaten mit (A) freiem, löslichem und (B) chemisch immobilisiertem rhBMP-2 im Periostlappenexperiment in Kaninchen. Zwischen Knochen und Metall ist eine fibröse Bindegewebeschicht (A) zu erkennen. Der direkte Kontakt zwischen Knochen und Metallimplantat ist in (B) deutlich erkennbar (Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, Universitätsklinikum Essen).

In der Abbildung 4.28 werden mikrophotographische Aufnahmen von gefärbten Implantatpräparationen dargestellt, die mit (A) freiem, löslichem und (B) chemisch immobilisiertem rhBMP-2 im Periostlappentest in Kaninchen implantiert wurden. Im Fall der Applikation von löslichem rhBMP-2 (A) bildet sich fibröses Bindegewebe zwischen dem Knochen und dem Metallimplantat. Beim chemisch immobilisierten rhBMP-2 lässt sich der direkte Kontakt zwischen Knochen und Implantat erkennen.

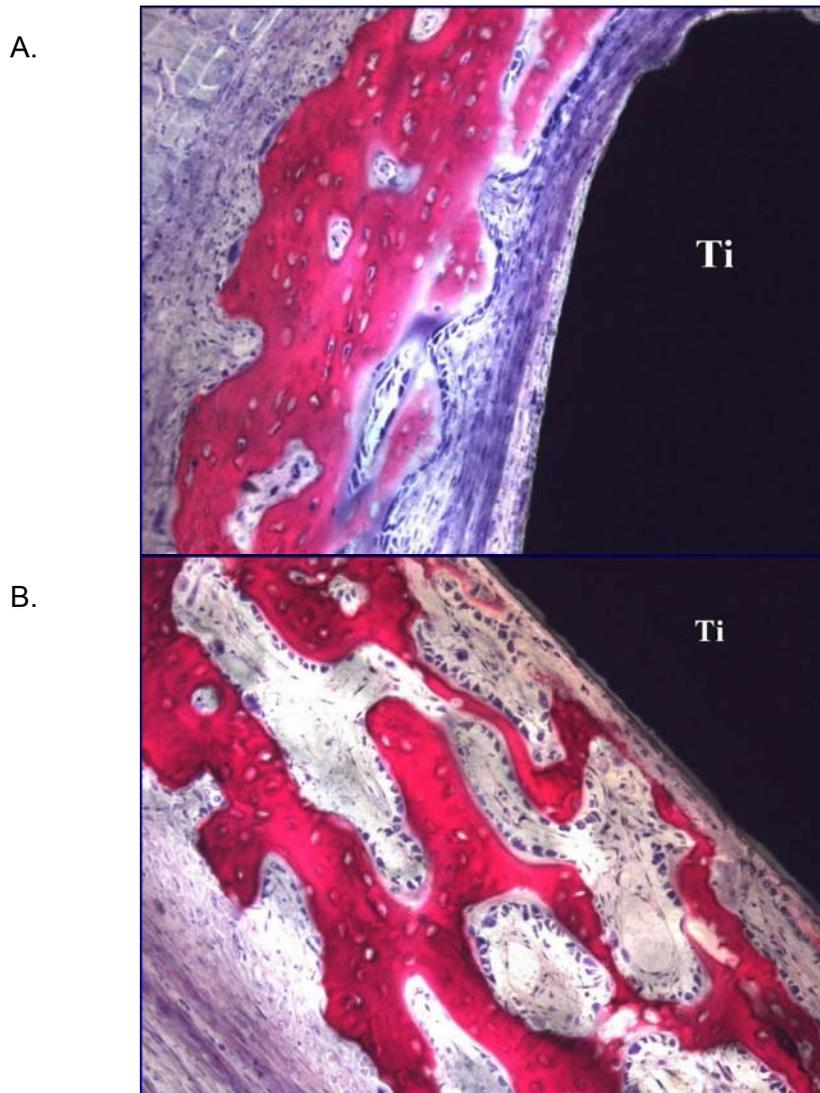
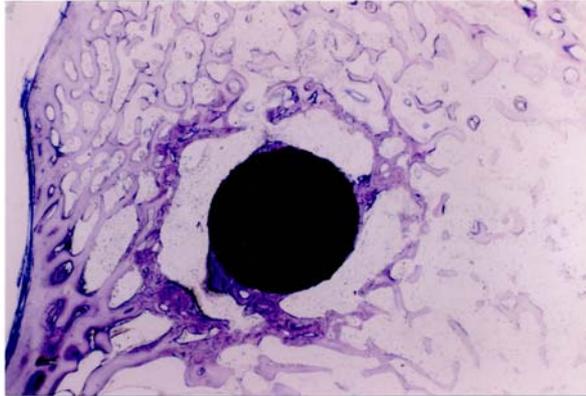


Abbildung 4.28: Mikrophotographische Aufnahmen von gefärbten Implantatpräparationen, die mit (A) freiem, löslichem und (B) chemisch immobilisiertem rhBMP-2 im Periostlappentest in Kaninchen implantiert wurden (Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, Universitätsklinikum Essen).

4.4.3 Untersuchung der biologischen Aktivität von immobilisiertem rhBMP-2 im Schaf

Nachdem die immobilisierten rhBMP-2 Mengen *in vitro* quantifiziert wurden und im Periostlappenexperiment in Kaninchen die biologische Aktivität des rhBMP-2 *in vivo* ohne toxische oder Entzündungseffekte nachgewiesen wurden, wurde die biologische Aktivität, d.h. das osteoinduktive Potential von rhBMP-2 in einem Spaltüberbrückungs-verfahren im distalen Femurkondylus im Schaf untersucht. Diese Pilotstudie ergab (s. Abbildung 4.29), dass eine starke Knocheninduktion unmittelbar um die rhBMP-2-beschichteten Implantate (B, C) beobachtet wurde. Im Vergleich dazu zeigt ein Kontrollimplantat (A) ohne rhBMP-2 nur eine sehr geringe Knochenneubildung. Querschnitte von Knochenimplantaten nach Entfernung vom Schafoberschenkelknochen zeigen eine starke Induktion von spongiösem (B) bzw. kompaktem (C) Knochen an Titanimplantate mit adsorptiv bzw. kovalent immobilisiertem rhBMP-2. Die Titanimplantate, die mit rhBMP-2 beschichtet wurden, weisen eine vollkommene Osteointegration auf.

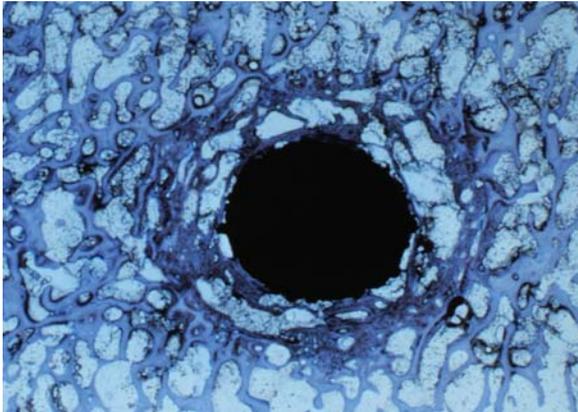
A.



Kontrolle

(ohne rhBMP-2)

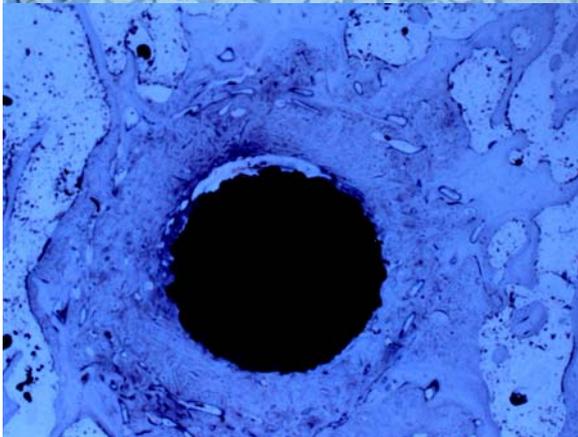
B.



Ti-APS-rhBMP-2

5.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

C.



Ti-APS-CDI-rhBMP-2

8.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Abbildung 4.29: Knocheninduktion an rhBMP-2 beschichteten Implantaten (B, C) und Vergleich mit einem Kontrollimplantat (A) in einem Spaltüberbrückungsverfahren. Querschnitte von Knochenimplantaten nach Entfernung vom Schafoberschenkelknochen. Eine starke Induktion von spongiösem (B) und kompaktem Knochen (C) an Titanimplantate mit immobilisiertem rhBMP-2 kann gezeigt werden. In der Negativkontrolle ohne rhBMP-2 (A) lässt sich eine sehr geringe Neubildung von Knochen erkennen. Hier handelte es sich um Titanplasma-spray-beschichtete Titanimplantate, die im Femurkondylus eines Schafes eingesetzt wurden und nach 9 Wochen Einwirkungszeit explantiert wurden. (B) zeigt den Querschnitt eines Implantats, das mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) chemisch modifiziert und rhBMP-2 adsorptiv immobilisiert wurde. Im Falle von (C) handelte es sich um ein Implantat, das mit APS und CDI modifiziert und rhBMP-2 kovalent gebunden wurde (Zusammenarbeit mit Dr. T. Lichtinger, AG Prof. Dr. R. Müller, Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Essen).

In der Abbildung 4.30 zeigt die obere Abbildungshälfte (A) einen Querschnitt eines mit Brushit ($\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) beschichteten Titanprobenkörpers, der nach vierwöchiger Implantation einen Spalt von 300-400 μm um den Implantatzylinderkörper aufweist. Im Spaltüberbrückungsverfahren wurde ursprünglich ein Spalt von 1 mm erzeugt und dieser sollte mit neu gebildetem Knochengewebe überbrückt werden. In der unteren Abbildungshälfte (B) handelte es sich um einen Titanplasma-spray-beschichteten Titanprobenkörper, der mit Chromschwefelsäure (CSS) geätzt, mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) modifiziert und mit rhBMP-2 biologisiert wurde (Ti-CSS-APS-rhBMP-2). Hierbei ist eine komplette Osteointegration, bedingt durch den direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat und vollständige Überbrückung des Spaltes erkennbar [Jennissen, 2002; Jennissen et al., 2000].

A.

Ti-Brushit ($\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) Kontrolle, ohne rhBMP-2

B.

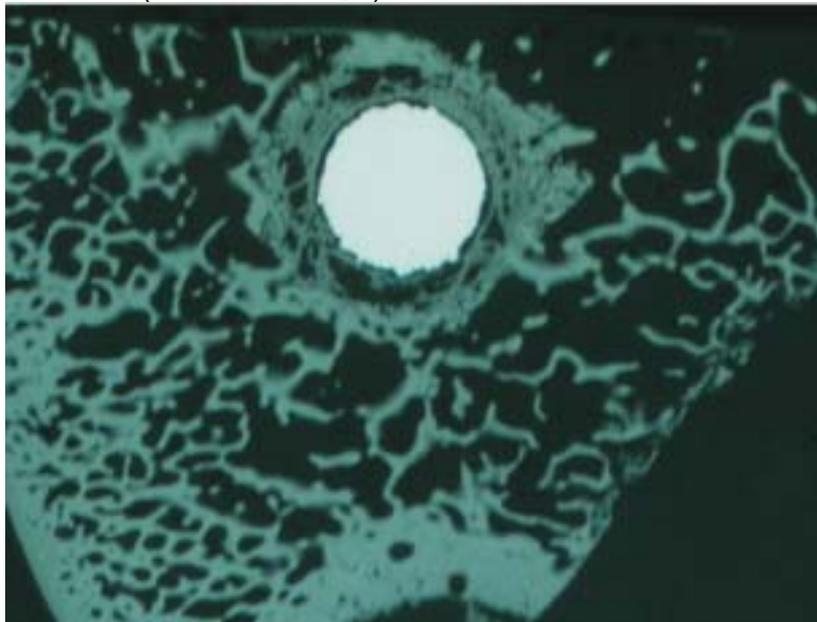
Ti-APS-rhBMP-2, $5.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

Abbildung 4.30: Osteointegration an einem rhBMP-2-beschichteten Implantat innerhalb von vier Wochen im Schafoberschenkelknochen. Querschnitte durch Implantate, die in einem Spaltüberbrückungsverfahren erhalten wurden. (A) ist ein Kontrollimplantat mit einer Brushit-Beschichtung ohne rhBMP-2 und (B) ein rhBMP-2-beschichtetes Implantat. Hier lässt sich eine vollständige Osteointegration, bedingt durch den direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat und vollständige Überbrückung des Spaltes erkennen (Zusammenarbeit mit Dr. T. Lichtinger, AG Prof. Dr. R. Müller, Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Essen).

5 Diskussion

5.1 Stabilität der Metalloberflächen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten metallischen Trägermaterialien, die nach der im Kapitel 3.1.1 beschriebenen Chromschwefelsäure-Methode behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu ihren Kontrollen charakteristische Oberflächeneigenschaften, z. B. erhöhte Bindungskapazität für die Immobilisierung von Proteinmolekülen, die mit einer Oberflächenvergrößerung durch das Ätzen zusammenhängt. Die Behandlung der verwendeten Metalloberflächen mit Chromschwefelsäure führt zu einer stabilen, oberflächenvergrößerten, mikroskopisch homogenen Metalloxidschicht.

5.1.1 Dynamische Kontaktwinkel

In biologischen Systemen spielen die Kontaktwinkel gerade im Bereich der Biomaterialien eine wichtige Rolle. Baier [Baier, 1972] hat 1972 ein Modell vorgeschlagen, in dem die Biokompatibilität, die Bioadhäsion und die kritische Oberflächenspannung der Festkörperoberflächen korreliert werden. Nach diesem Modell, das ursprünglich für den Kontakt zwischen Blut und unterschiedlichen polymeren Biomaterialien entwickelt wurde, definierte Baier den Bereich der kritischen Oberflächenspannung von 20 – 30 dyn/cm als „hypothetische Zone der Biokompatibilität“, wobei die Zelleninteraktion minimal ist. Den Bereich zwischen 45 – 75 dyn/cm bezeichnete er als „Zone der guten Bioadhäsion“. Diese Bereiche der kritischen Oberflächenspannung wurden von Jennissen [Jennissen, 2001] in Kontaktwinkelbereichen berechnet. Damit entspricht der Bereich von 20 – 32 dyn/cm hydrophoben Kontaktwinkeln θ von 114 – 145 ° und der Bereich der Oberflächenspannung von 42 – 72 dyn/cm hydrophilen Kontaktwinkeln von 0 – 90 °. Die „Zone der starken Bioadhäsion“ liegt bei 68 – 72 dyn/cm ($\theta = 0 – 31$ °). Bis heute konnte im hydrophoben Bereich von 20 – 32 dyn/cm keine Biokompatibilität für Biomaterialien belegt werden.

Schakenraad et al. [Schakenraad et al., 1986] untersuchten den Einfluß der Oberflächenenergie unterschiedlicher Polymer-Substratoberflächen auf die Zellspreizung und das Zellwachstum von humanen Haut-Fibroblasten. Berechnungsgrundlage für die Oberflächenenergie waren Kontaktwinkelmessungen auf den Substratoberflächen in verschiedenen Lösungen. Die Zelladhäsion und -spreizung stellte sich als charakteristische sigmoide Funktion der Oberflächenenergie der vermessenen Substrate dar. Eine starke Zelladhäsion und -spreizung kam nur im hydrophilen Bereich bei Oberflächenspannungen $\gamma_s > \sim 57$ dyn/cm vor.

Titanoberflächen weisen eine besondere Variabilität in ihren Benetzungseigenschaften auf [Jennissen, 2001; Jennissen et al., 1999]. Die Vorbehandlung wie Reinigungsprozesse, struktur- und topographieverändernde Schleif- und Polierverfahren oder nasschemische Ätzverfahren führen zur Veränderung der Topographie und der chemischen Struktur der Oberfläche, die sich sehr stark auf das Grenzflächenverhalten einer Titanoberfläche im Kontakt zu wässrigen Systemen auswirken [Rupp et al., 2001]. MacDonald et al. [MacDonald et al., 1998] haben hochpolierte Titanscheiben gereinigt, sie anschließend mit 40 % Salpetersäure passiviert und Kontaktwinkel von 36° gemessen. Nach Inkubation der Titanscheiben in einer 10 ng/ml und 1 μ g/ml Fibronectinlösung wurden unabhängig von der Proteinkonzentration die Kontaktwinkel mit 54° hydrophober. Bei höheren Konzentrationen kann Fibronectin eine quervernetzte Matrix bilden. Diese Konformationsänderungen könnten durchaus für die Wechselwirkung mit Gewebezellen von Bedeutung sein.

Wegen der Bedeutung der hydrophilen Eigenschaften einer Oberfläche in biologischen Systemen, wurden dynamische Kontaktwinkelmessungen an allen Metalloberflächen, die mit einer Proteinschicht im Rahmen dieser Arbeit biologisiert wurden, durchgeführt.

Die elektropolierten Titanoberflächen (s. Tabelle 4.2) zeigen nach einer Reinigung mit Aceton Vorrückwinkel von 60° , nach Behandlung mit 5 % Salpetersäure von 40° und nach Behandlung mit Chromschwefelsäure von lediglich 1° . Anodisch oxidierte Titanoberflächen weisen nach einer Reinigung mit Aceton Vorrückwinkel von 75° , nach Behandlung mit 5 % Salpetersäure von 40° und nach Chromschwefelsäure-Behandlung von 2° auf. Für den rostfreien Stahl 316-L wurden nach Aceton-Reinigung Vorrückwinkel von 48° gemessen, nach Salpetersäure-Behandlung 55° und nach Chromschwefelsäure-Ätzung 9° . Schließlich wurden für die Cobaltchrommolybdän-Legierung nach einer Reinigung mit Aceton Vorrückwinkel von 66° erhalten, nach Salpetersäure-Behandlung von 48° und nach

Chromschwefelsäure-Behandlung von 7° . Der Vorrückwinkel nach Behandlung mit 5 % Salpetersäure wird also um ca. 20° erniedrigt. Aus den Kontaktwinkeln aller acetongereinigten und salpetersäurebehandelten Metallplättchen lässt sich eine große Hysterese von ca. $30 - 65^\circ$ erkennen. Nach Behandlung der Titanplättchen mit Chromschwefelsäure ist die Hysterese abwesend. Im Falle der rostfreien Stahl- und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen wurde ebenfalls keine oder nur eine sehr geringe Hysterese gemessen. Oberflächen, die nach Behandlung mit Chromschwefelsäure dynamische Kontaktwinkel unter 10° und keine Kontaktwinkelhysterese aufweisen, werden als ultrahydrophile Oberflächen bezeichnet [Jennissen, 2001].

Die elektropolierte Titanoberfläche hat ursprünglich eine Rauigkeit von $\sim 1 \mu\text{m}$. Zum Vergleich des dynamischen Kontaktwinkels wurden Quarzglasplättchen auf eine Planarität von $\lambda / 10$ und eine Oberflächenrauigkeit von $2 - 3 \text{ nm}$ poliert, mit Chromschwefelsäure gereinigt und untersucht. Trotz des großen Unterschiedes in der ursprünglichen Oberflächenrauigkeit zwischen Metallplättchen und Quarzglas zeigen die Titanplättchen nach Behandlung mit Chromschwefelsäure vergleichbar niedrige dynamische Kontaktwinkel (unter 10°) wie die hochpolierte Quarzglasoberfläche. Das kann durch die Ausbildung einer Nanostruktur auf einer mikrostrukturierten Oberfläche besonderer Zusammensetzung und nicht durch eine auf die Politur zurückzuführende Homogenität und Glätte erklärt werden. Dieses Phänomen wird als „Inverser Lotuseffekt“ bezeichnet (anti-Lotuseffekt) [Jennissen, 2001]. Der Lotuseffekt ist seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts bekannt und ist für die Selbstreinigung der Lotusblütenblätter verantwortlich [Barthlott & Neinhuis, 1997]. Diese Selbstreinigung kommt dadurch zustande, dass sich Wasser auf der hydrophoben Blattoberfläche nicht ausbreitet, sondern abperlt: Rollt ein abperlender Wassertropfen über das Blatt, so nimmt er Schmutz von der Blattoberfläche mit sich. Die gemessenen Kontaktwinkel von Lotusblättern liegen zwischen $130 - 160^\circ$. Der Effekt der Selbstreinigung wurde auch auf der anderen Seite der Kontaktwinkelskala, nämlich im ultrahydrophilen Bereich beschrieben [Wang et al., 1997]. Wang et al. haben eine dünne polykristalline Anatas- und Rutil- TiO_2 -Schicht auf einer Glasoberfläche angebracht und durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht den Kontaktwinkel von 72° auf 0° verringert. Auch in diesem Fall handelt es sich um eine nicht glatte Oberfläche. Eine längere Lagerungszeit führte zur Zunahme des Kontaktwinkels, die Oberfläche wurde hydrophober.

Eine wichtige Frage, die es im Zusammenhang mit den Arbeiten von Wang et al. zu beantworten galt, war, wie stabil die durch die Behandlung mit Chromschwefelsäure im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Oxidschichten auf den Metalloberflächen sind. Nachdem dynamische Kontaktwinkelmessungen sofort nach Säurebehandlung durchgeführt wurden, war es wichtig, die funktionelle Stabilität dieser Metalloberflächen nach siebenwöchiger (50 d) Lagerung in Methanol zu untersuchen. Die gemessenen Vorrückwinkel lagen für elektropoliertes Titan bei 3° , für anodisch oxidiertes Titan bei 6° , für rostfreien Stahl 316-L bei 14° und für die Cobaltchrommolybdän-Legierung bei 6° . Diese Werte im Vergleich zu den sofort gemessenen Kontaktwinkeln zeigen, dass keine Änderung des Kontaktwinkels nach einer 50-tägiger Lagerung in Methanol erfolgte. Methanol wurde gewählt, um das Wachsen von Bakterien oder anderen Mikroorganismen während der langfristigen Lagerung der Metallplättchen zu verhindern. Alle Metallplättchen wiesen weiterhin ihre ursprünglichen ultrahydrophilen Eigenschaften mit dynamischen Kontaktwinkeln im Wasser unter 10° auf (s. Tabelle 4.2). Inzwischen wurden Titanplättchen nach 4-jähriger Lagerung in Methanol gemessen und auch sie hatten immer noch ultrahydrophile Oberflächen mit Vorrückwinkeln von unter 10° (eigene Arbeiten, Daten nicht gezeigt). Im Fall der rostfreien Stahlplättchen ist die Erhöhung des Vorrückwinkels von 9° auf 14° nicht signifikant. Hier wäre es interessant, die Kontaktwinkel nach Langzeit-Lagerung in Wasser zu untersuchen.

Bei der ultrahydrophilen TiO_2 -Schicht auf einer Glasoberfläche, die von Wang et al. beschrieben wurde, wird die Aufrechterhaltung des amphiphilen Charakters der TiO_2 -Oberfläche nach längerer Lagerung nicht gewährleistet (Lagerungsbedingungen werden nicht angegeben). Die Oberflächen verlieren ihre Hydrophilizität, die Kontaktwinkel steigen von 0° allmählich in Richtung höherer Hydrophobizität. Durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht entstehen möglicherweise Oberflächensauerstoff-Leerstellen an Brückenzentren, die zu einer Umkehrung der Ti^{4+} - zu Ti^{3+} -Stellen führen, die für dissoziative Wasseradsorption bevorzugt werden. Diese Defekte können die Affinität zu chemisorbiertem Wasser von ihren umgebenden Stellen beeinflussen und bilden hydrophile Areale, der Rest der Oberfläche hingegen bleibt lipophil. Mikroskopisch sind die hydrophilen und hydrophoben Areale differenzierbar, makroskopisch dagegen zeigen die TiO_2 -Oberflächen eine hohe Amphiphilie. Nicht auszuschließen ist, dass bei Langzeit-Lagerung die chemisorbierten Hydroxylgruppen durch Luftsauerstoff ersetzt werden [Wang et al., 1997].

Bei den ultrahydrophilen TiO_2 -Schichten, die nach der Chromschwefelsäure-Behandlung von Titanplättchen entstehen und bei den TiO_2 -beschichteten Glasoberflächen von Wang et al., die nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht erzeugt wurden, handelt es sich um Oberflächen mit unterschiedlichen Eigenschaften.

5.1.2 Adhäsionsprüfung der Metalloxidschicht

Die Oberflächenoxidschicht scheint für den Einsatz des Titans als Implantatmaterial eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Biokompatibilität zu spielen [Sawase et al., 2001]. Der Literatur kann entnommen werden, dass die Dicke der Titanoxidschicht vom jeweiligen Behandlungsverfahren abhängt. Suba et al. [Suba et al., 2003] untersuchten im Hinblick auf die schützende Rolle der Oxidschicht bei Titanimplantaten die Dicke der Titanoxidschicht mittels Sekundär-Ionen-Massenspektroskopie (SIMS) und Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS). Sie betrug 120 – 150 nm. Eine dickere Oberflächenoxidschicht zeigte eine verbesserte Korrosionsresistenz. Auch die Arbeiten von Velten et al. zeigten diesen Sachverhalt sehr deutlich: Die Korrosionsbeständigkeit des Reintitans (cp, commercially pure) und der Ti6Al4V-Legierung mit einer Oxidschichtdicke von 100 nm nahm nach Behandlung durch unterschiedliche Oxidationsverfahren deutlich zu im Vergleich zu der polierten Oberfläche mit natürlicher Oxidschicht [Velten et al., 2002]. Larsson et al. untersuchten die Knochenbildung von Titanimplantaten im Zusammenhang mit der Dicke ihrer Oxidschicht [Larsson et al., 1994]. Sie konnten mittels Auger-Elektronenspektroskopie, SEM und AFM zeigen, dass bei den elektrolierten Titanimplantaten die Oxidschicht bei 4 – 5 nm und bei der anodisch oxidierten Oberfläche bei 21 – 180 nm liegt. Die Struktur von thermalen Oberflächenoxidschichten auf Titan, die je nach Oxidationstemperatur eine Dicke von 6 – 40 nm aufweisen, erhält mit steigender Schichtdicke eine besser sichtbare Textur, die der Kornstruktur des oxidierten Metalls entspricht [Radegran et al., 1991].

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung und der Rockwell-Adhäsionstest von Stahl- und Titanplättchen zeigen nach Behandlung mit der Chromschwefelsäure-Methode charakteristische Nano- und Mikrostrukturen.

Chromschwefelsäure-behandelte Stahlplättchen zeigen eine geometrisch definierte polygonale Oberflächen-Struktur mit Dimensionen von 4 - 5 μm ; das behandelte Titanplättchen eine „blumenkohlartige“ Struktur mit Dimensionen von 1 μm (s. Abbildung 4.2). Ferner weisen die behandelten Oberflächen eine nanostrukturierte passive Oxidschicht mit einer Dicke von 50 – 150 nm für Titan und 10 – 50 nm für Stahl auf. Vor dem Hintergrund der der Literatur entnommenen, vorstehend dargelegten Sachverhalte, sollte sich eine solche Oxidschicht auch in aggressiver biologischer Umgebung als ausreichend schützend erweisen.

Der Rockwell Adhäsionstest mittels eines Härteprüfgerätes zeigte für den rostfreien Stahl 316-L, dass die nach Behandlung mit Chromschwefelsäure gebildete Oxidschicht plastisch deformierbar und weder spröde noch leicht zu entfernen ist [Buescher et al., 1999; Buescher et al., 2001]. Die TiO_2 -Schicht des elektropolierten Titans weist ebenfalls nach der Behandlung mit Chromschwefelsäure eine hohe Plastizität auf, die der der ursprünglichen Metalloberfläche ähnelt (s. Abbildung 4.3). Ein analoges Eigenschaftsprofil war beim Stahl zu beobachten. Der Kegel des verwendeten Prüfgerätes drückte die Polygonalstrukturen des Stahls und die „blumenkohlartigen“ Strukturen des Titans zusammen, ohne dass Brüche oder Schichtzerstörungen zu beobachten waren: Die Oxidschicht zeigte eine starke Adhäsion und ein Verformungsverhalten, die dem der Originalmetallobfläche sehr ähnelt.

5.1.3 Vergrößerung der Metalloberflächen

Da die Titanoberflächen nach Behandlung mit Chromschwefelsäure eine höhere Bindungskapazität an Proteinmolekülen aufwiesen, war es naheliegend, dass dieser Effekt mit der Vergrößerung der Oberfläche zusammenhängt [Jennissen et al., 1999]. Auch durch chemische Oxidation von Titanoberflächen (Reintitan, Grad 1) mit $\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$ wurde eine Oberflächenvergrößerung hervorgerufen, die zur Kopplung von 3-Aminopropyltriethoxysilan und weiteren Immobilisierung von Biomolekülen verwendet wurde [Nanci et al., 1998]. Die nicht-kovalent immobilisierten Ubiquitin-Mengen auf der Oberfläche Ti-CSS-APS liegt um Faktor 1.6 höher als die entsprechende Menge auf Ti- HNO_3 -APS (s. Tabelle 4.3). Der gleiche Faktor liegt bei den Oberflächen Ti- HNO_3 -APS-CDI und Ti-CSS-APS-CDI vor. Tabelle 4.5

zeigt, dass bei einer Konzentration von 0.9 mg/ml die immobilisierte Menge an Ubiquitin auf Titan- und Stahl-CSS-APS-CDI 6-fach höher sein kann als auf der entsprechenden HNO₃-APS-CDI-Oberfläche.

Bei einer Immobilisierung mit rhBMP-2 ist die Beladungsmenge auf der Ti-CSS-APS-Oberfläche um den Faktor 2 höher als auf Ti-HNO₃-APS (s. Tabelle 4.14). Die immobilisierte rhBMP-2-Menge auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche ist um den Faktor 2.6 – 3.2 höher als auf Ti-HNO₃-APS-CDI.

Aufgrund einer unterstellten Korrelation zwischen der Beladungskapazität und der Oberflächenvergrößerung wurde die Fläche der mit Chromschwefelsäure behandelten Metallplättchen mittels konfokaler Laser-Rasterelektronenmikroskopie (CLSM) untersucht und das Verhältnis zwischen realer gemessener und geometrischer Fläche gebildet. Dieses Verhältnis beträgt für das elektropolierte Titan 2.5, für den 316L rostfreien Stahl 2.5, für die Titanplasmaspray-beschichtete Titanlegierung 20 und für die Cobaltchrommolybdän-Legierung 3.5. Die ermittelten Werte für Titan und rostfreien Stahl wurden auch von Buescher et al. beschrieben [Buescher et al., 1999; Buescher et al., 2001].

Es lässt sich daraus schließen, dass die um den Faktor 2 - 3 erhöhten Beladungsmengen von Proteinen auf den untersuchten Metalloberflächen, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurden, durch eine Oberflächenvergrößerung um einen Faktor 2 – 3 wie sie die CLSM-Untersuchungen gezeigt haben, verursacht werden. Größere Faktoren bei der Beladungskapazität könnten auf eine zusätzliche Vermehrung der reaktiven Hydroxylgruppen auf der Metalloberfläche zurückzuführen sein.

5.2 Immobilisierung und Freisetzung von Ubiquitin und rhBMP-2

5.2.1 Immobilisierung von Ubiquitin

Die nicht-kovalente und kovalente Bindung sowie die unspezifische Adsorption des Modellproteins Ubiquitin an elektropolierten Titanplättchen (10 x 15 x 1 mm) wurden für die Konzentrationen 0.3 und 1.0 mg/ml der Inkubationslösung in den Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4 dargestellt. Dabei wurden unbehandelte Kontrollen (HNO₃) und mit Chromschwefelsäure behandelte Metalloberflächen (CSS) als Grundoberflächen verwendet. Diese Grundoberflächen wurden mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) funktionalisiert und mit dem Kopplungsreagenz 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert, um das Protein kovalent zu binden. Nanci et al. [Nanci et al., 1998] verwendeten zur Kopplung von alkalischer Phosphatase oder Albumin oxidierte Titanoberflächen, die mit 3-Aminopropyltriethoxysilan modifiziert und mit Glutaraldehyd aktiviert wurden. XPS-Analysen zeigten die Stabilität der Bindung von 3-Aminopropyltriethoxysilan an Titandioxid nach siebentägiger Lagerung in Wasser [Nanci et al., 1998]. In früheren Studien wurde die Stabilität der Bindung von Alkoxysilanen auf Siliziumdioxid gezeigt [Grushka & Kikta et al., 1977]. Silane haben sich als geeignete Kopplungsmoleküle zur Verankerung von Biomolekülen auf Titanoberflächen erwiesen [Jennissen, 1999]. Nach Modifikation einer ursprünglich ultrahydrophilen Titanoxidoberfläche mit 3-Aminopropyltriethoxysilan erhält diese hydrophobe Eigenschaften (Vorrückwinkel von 76 °, [Jennissen et al., 1999]), die die Proteinadsorption durch hydrophobe Wechselwirkungen begünstigen. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die adsorbierte Proteinmenge auf hydrophoben Oberflächen signifikant höher ist als auf hydrophilen Oberflächen [Cuypers et al., 1978]. Nach Modifikation von Glas mit 3-Aminopropyltriethoxysilan zur Immobilisierung von Lysozym wurden Vorrückwinkel von 70 ° ermittelt [Hansen et al., 1988].

Die Oberflächenbeladung steigt mit zunehmender Konzentration der Ubiquitin-Inkubationslösung (s. Tabelle 4.3). Die adsorbierten Proteinmengen auf der Ti-HNO₃-APS-Oberfläche betragen 509 und auf der Chromschwefelsäure-behandelten Oberfläche (Ti-CSS-APS) 762 ng/cm² bei Verwendung einer Proteinlösung der Konzentration 0.3 mg/ml. Bei einer

Protein-Inkubationslösung der Konzentration 1.0 mg/ml beträgt die adsorbierte Ubiquitinmenge auf der Ti-HNO₃-APS-Oberfläche 826 und auf der mit Chromschwefelsäure behandelten Oberfläche (Ti-CSS-APS) 1334 ng/cm². Die immobilisierten Ubiquitinmengen bei Verwendung einer Proteinlösung der Konzentration 0.3 mg/ml betragen 1078 ng/cm² auf der Ti-HNO₃-APS-CDI-Oberfläche und 1683 ng/cm² auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche. Durch dieses optimierte Modifikationsverfahren konnten Beladungswerte für Ubiquitin erhalten werden, die bis zu einem Faktor 100 höher liegen als die Beladungen bei der Bindung von Glucoseoxidase an Nickeloxid (16 ng/cm²), die von Weetall beschrieben wurden [Weetall & Hersh, 1970]. Martins et al. [Martins et al., 2003] ermittelten bei der Adsorption von ¹²⁵I-Serumalbumin aus einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 0.01 mg/ml auf hydrophobe Goldoberflächen eine Beladungsmenge von 30 ng/cm² und auf einer hydrophilen Goldoberfläche 10 – 20 ng/cm². Diese Werte liegen im Vergleich zu den Beladungswerten der Tabelle 4.12 um einen Faktor 5 – 10 niedriger. Ein direkter Vergleich ist aufgrund der unterschiedlichen Natur der Metalloberfläche und des Proteins nicht möglich. Immobilisierung von TGF-β1 auf Ti6Al4V lieferte Beladungsmengen von 2 pmol/cm² (entspricht unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes von TGF-β1 6 ng/cm²) [Fischer et al., 2003]. Andere Studien berichten von 500 ng/cm² gebundenen Antikörper nach Modifikation der Titanoberfläche mit Glutaraldehyd als Kopplungsreagenz [Ahluwalia et al., 1992] und 0.7 µg/cm² immobilisiertem Thrombomodulin auf oberflächenmodifizierten Polymeren [Kishida et al., 1994a; Kishida et al., 1994b]. Das Modifikationsverfahren zur Proteinkopplung ist, wie der Vergleich der bereits genannten Studien zeigt, maßgeblich für die erhaltenen Beladungsmengen.

Zwischen den nicht-kovalent immobilisierten Mengen auf den Oberflächen HNO₃-APS und CSS-APS liegt für beide Konzentrationen der Inkubationslösung ein Faktor von 1.6 in der Beladungsmenge. Zwischen den immobilisierten Beladungsmengen bei der Proteinkonzentration von 0.3 mg/ml auf den Oberflächen HNO₃-APS-CDI und CSS-APS-CDI liegt ein Faktor von 1.6. Dieser Faktor könnte durch eine vergrößerte Titanoberfläche oder vermehrte Hydroxylgruppen auf der Oberfläche nach der Behandlung mit Chromschwefelsäure erklärt werden. Die Tatsache, dass die Titanplättchen, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurden (CSS), eine um einen Faktor 2 höhere Beladung aufweisen als die unbehandelten Oberflächen (HNO₃), liegt in guter Übereinstimmung mit

dem ermittelten Verhältnis zwischen gemessener und geometrischer Oberfläche für elektropoliertes Titan vor, das bei 2.5 liegt (s. Tabelle 4.1).

Die gemessene unspezifische Adsorption von Ubiquitin an unmodifizierten elektropolierten Titanplättchen lieferte bei einer Konzentration der Inkubationslösung von 0.3 mg/ml Beladungswerte von 63 ng/cm² für die unbehandelten Kontrollen (HNO₃) bzw. 13 ng/cm² für die mit Chromschwefelsäure behandelten Titanoberflächen (CSS). Diese unspezifisch adsorbierten Mengen entsprechen 4 bzw. 0.8 % der immobilisierten Proteinmenge auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche und kommen durch schwache Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen und Metalloxidschicht zustande. Die höheren Beladungsmengen auf der Ti-HNO₃-Oberfläche können auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Ubiquitin und der hydrophoben HNO₃-Oberfläche zurückgeführt werden. Die gemessenen Vorrückwinkel auf Ti-HNO₃ liegen bei 61 ° (s. Tabelle 4.2).

Die Immobilisierung von Ubiquitin auf elektropolierten Titanplättchen lässt sich allgemein gut reproduzieren. Es gibt allerdings experimentelle Serien von Beladung mit Protein, in denen die gemessenen Beladungsmengen sich um den Faktor 2 – 5 von anderen Serien unterscheiden, obwohl die experimentellen Bedingungen und die ursprünglichen Oberflächen gleich sind. Das ist der Fall beim Vergleich der absoluten Beladungswerte zwischen Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4. Allerdings bleiben die Verhältnisse zwischen den unterschiedlich modifizierten Oberflächen gleich. Das konnte durch unterschiedlich reaktive Gruppen auf der Metalloberfläche erklärt werden. Solche Unterschiede können auf der Reaktivität des Silans mit den Hydroxylgruppen der Metallmatrix beruhen. Ein weiterer Grund dafür könnte eine mögliche Konformationsänderung des Proteins nach längeren Lagerungszeiten von einigen Monaten in Lösung sein. Das könnte für das radioaktiv markierte Ubiquitin gelten. Im Fall einer Konformationsänderung wäre das Vorkommen von Proteinspezies zu erwarten, die nicht so stark mit der chemischen Modifikation der Oberfläche wechselwirken wie andere Spezies. Ein anderer Grund für diese Streuung könnte mit der Modifizierung des Proteins mittels der Chloramin-T-Methode zusammenhängen. Hierbei wird der im Ubiquitinmolekül einzige Tyrosinrest iodiert, der eventuell für die Strukturhaltung von Bedeutung sein kann. Im Vergleich zur nicht-kovalenten Immobilisierung (auf Ti-CSS-APS) wurden für die kovalente Immobilisierung (auf Ti-CSS-APS-CDI) doppelt so hohe Beladungswerte erhalten. Auf erstgenannter Oberfläche macht sich der Effekt der Konzentration der Inkubationslösung

zwischen kovalent und nicht-kovalent gebundenem Ubiquitin mit einem Faktor 2 und einer Erhöhung der Beladungen von 3.3 auf 5.3 und von 3.8 auf 7.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bemerkbar. Hier handelt es sich möglicherweise um eine Koexistenz aus kovalent gebundenem und adsorbiertem Protein.

Beim Vergleich der Immobilisierung von Ubiquitin auf elektropolierten Titan- und rostfreien Stahlplättchen 316L in einer Ubiquitinlösung mit der Konzentration 0.9 mg/ml (s. Tabelle 4.5) werden auf elektropoliertem Titan mit 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ doppelt so hohe Ubiquitinmengen auf Ti-CSS-APS-CDI gebunden wie auf Stahl. Die mit 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ um den Faktor 5 höheren Ubiquitinmengen auf Stahl-CSS-APS-CDI im Vergleich zu Stahl-HNO₃-APS-CDI weisen auf eine Oberflächenvergrößerung nach der Behandlung mit Chromschwefelsäure hin. Das Verhältnis zwischen gemessener und geometrischer Oberfläche für 316L rostfreien Stahl liegt bei 2.5 (s. Tabelle 4.1). Möglicherweise beruht der bereits erwähnte Faktor 5 bei der Beladung auf einer Vermehrung der reaktiven Hydroxylgruppen.

Die unspezifischen und nicht-kovalenten Beladungsmengen liegen für beide Metalloberflächen mit 5 – 10 % in der gleichen Größenordnung. Waschen mit alkalischer Natriumdodecylsulfat-Lösung (0.1 N NaOH / 1 % SDS) bei 60 °C führt, wie aus der Tabelle 4.5 zu entnehmen ist, zu einer Abnahme der zurückgebliebenen Proteinmenge auf der Metalloberfläche um bis zu 97 %. Dieses Phänomen macht sich besonderes stark bei der nicht-kovalenten Immobilisierung (auf Metall-APS) bemerkbar. Nachdem die Metalloberflächen einer Lösung von NaOH / SDS ausgesetzt worden sind, bleiben auf beiden Metalloberflächen bei der nicht-kovalenten Bindung (auf Metall-APS) 3 - 10 % und bei der kovalenten Bindung (auf Metall-APS-CDI) 23 - 33 % der ursprünglich immobilisierten Proteinmenge zurück. Das zeigt, dass durch diesen Waschschrift ein großer Teil des Proteins von der Oberfläche abgelöst bzw. hydrolysiert werden kann. Natriumdodecylsulfat, der Schwefelsäureester des Lauroylalkohols (SDS, C₁₂H₂₅-O-SO₃Na) ist ein Detergens mit stark amphiphilen Eigenschaften. Es zerlegt oligomere Proteine in die Untereinheiten und denaturiert diese. An die entfalteten Peptidketten binden SDS-Moleküle und verleihen ihnen eine stark negative Ladung. Schwache Wechselwirkungen wie van-der-Waals-Kräfte oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorbens werden zerstört und somit löst sich das Protein durch eine Spaltung der Bindung von der Metalloberfläche ab.

Die zurückgebliebenen Mengen auf den unterschiedlich modifizierten Oberflächen nach dem NaOH / SDS-Waschschritt weisen darauf hin, dass auf der CDI-Oberfläche mehr und fester gebundenes Protein immobilisiert ist als auf der APS-Oberfläche.

5.2.2 Freisetzung von Ubiquitin

Die Desorptionsexperimente von Ubiquitin auf Titanplättchen wurden zum besseren Verständnis der Bindungsaffinität und zur Differenzierung zwischen kovalent und nicht-kovalent immobilisierten Proteinmengen auf der modifizierten Metalloberfläche durchgeführt. Da auf der APS-CDI-Oberfläche möglicherweise beide Spezies vertreten sind, sollten kovalente und nicht-kovalente Immobilisierungsmethoden einzeln untersucht und korreliert werden.

Zu diesem Zweck wurden kinetische Untersuchungen unter Verwendung unterschiedlicher Lösungen bei physiologischen und nicht-physiologischen pH-Werten unternommen. Die Freisetzung von Ubiquitin von den unterschiedlich modifizierten Titanoberflächen wurde durch die Abnahme der Beladungsmenge als Funktion der Zeit dargestellt. Die Anpassung an die statistischen Daten erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms GraphPad Prism 4.0.

Unter Verwendung einer alkalischen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 0.05 N NaOH / 0.5 % SDS bei RT ist eine fast vollständige Verdrängung von Ubiquitin von elektropoliertem Titan-CSS-APS gelungen. Schon in der ersten Stunde kann der Effekt der Verdrängung beobachtet werden (s. Tabelle 4.7). Die Verwendung dieser alkalischen SDS-Lösung führt dazu, dass nach 112-h Untersuchung fast alles nicht-kovalent immobilisierte Ubiquitin von der APS-Oberfläche abgelöst ist und lediglich 37 % der Ubiquitinmenge auf der APS-CDI-Oberfläche zurückbleiben, die als kovalent gebundener Proteinanteil angesehen werden können. Die Halbwertszeiten betragen weniger als 0.5 h für die schnelle und 9 bzw. 39 h für die langsame Phase. Daraus, dass sich nach 112 h die Desorptionskurven für beide Oberflächen einem Plateau angenähert haben, lässt sich schließen, dass auf der mit CDI modifizierten Titanoberfläche ca. 40 % des immobilisierten Ubiquitin kovalent und der Rest nicht-kovalent gebunden ist.

Die verwendete alkalische SDS-Lösung konnte in höheren Konzentrationen und bei 60 °C innerhalb von Stunden nicht nur den nicht-kovalenten Proteinanteil ablösen sondern auch

den kovalent gebundenen, und ist damit zur Differenzierung zwischen kovalent und nicht-kovalent immobilisiertem Protein nicht geeignet [Chatzinikolaidou et al., 2002]. Außerdem kann die alkalische SDS-Lösung auf das immobilisierte Protein denaturierend wirken und damit wäre die Oberfläche für eine bioaktive Anwendung nicht nützlich. Schwache Wechselwirkungen, wie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und Adsorbens werden durch die Verwendung der alkalischen SDS-Lösung zerstört.

Nachdem die rasche Ablösung von Ubiquitin von der Titanoberfläche innerhalb von einigen Stunden durch 50 mM NaOH / 0.5 % SDS gezeigt wurde, stellte sich die Frage, ob es eine weniger drastische, nicht denaturierende Methode zur Desorption des nicht-kovalent immobilisierten Anteils an Ubiquitin von der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche gibt. Zu diesem Zweck wurde die Verdrängung von Ubiquitin durch die Verwendung homologer Alkylaminlösungen bei verschiedenen pH-Werten eingesetzt. Alpha-Alkylamine wurden zur Variierung des Substitutionsgrades von Agarosegelen in der Chromatographie verwendet, um Gele mit unterschiedlicher Hydrophobizität zur Adsorption von Enzymen herzustellen [Jennissen & Heilmeyer-Jr, 1975]. Bei der Verdrängung von Ubiquitin, die als Exponentialzerfall dargestellt wird, lässt sich erkennen, dass eine schnelle Anfangsphase innerhalb der ersten Minuten und eine langsamere Endphase vorhanden ist. Das stellt einen Hinweis darauf dar, dass Ubiquitin in Form einer lockeren und einer fester gebundenen Spezies auf der Oberfläche immobilisiert sein kann. Die Desorption würde nach einem konsekutiven und nicht konkurrenten Mechanismus in zwei aufeinanderfolgenden Schritten [Jennissen et al., 1982; Jennissen & Zumbrink, 2004] verlaufen, wie es im Kapitel 4.2.2.3 nach Gleichung (25) beschrieben wird.

Nach Verdrängung durch die Heptylaminlösung bleiben nur noch 6 % der ursprünglich nicht-kovalent immobilisierten Ubiquitinmenge auf der Ti-CSS-APS-Oberfläche und 39 % auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche. Ähnlich sind die Werte der Verdrängung durch die Octylaminlösung: Hier bleiben 13 % der ursprünglich nicht-kovalent immobilisierten Ubiquitinmenge auf der Ti-CSS-APS-Oberfläche und 58 % auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche zurück (s. Tabelle 4.8). Wenn das nicht-kovalent gebundene (Ti-CSS-APS) von dem kovalent gebundenen (Ti-CSS-APS-CDI) Retentat subtrahiert wird, lässt sich aus beiden Desorptionsexperimenten schließen, dass 33 % (in Heptyl-) bzw. 45 % (in Octylaminlösung)

des immobilisierten Ubiquitin auf der Ti-CSS-APS-CDI-Oberfläche kovalent und der Rest nicht-kovalent gebunden ist.

Die Verdrängung von Ubiquitin in der schnellen Anfangsphase zeigt für alle verwendeten Alkylamine kurze Halbwertszeiten zwischen 0.001 – 0.3 d. Bei der zweiten, langsameren Phase hat die schnellste Verdrängung des nicht-kovalent immobilisierten Proteins auf der APS-Oberfläche durch 2 M Hexyl- und Heptylaminlösung Halbwertszeiten von 1 d. Hier ist eine Abhängigkeit der Verdrängung von Ubiquitin von der Kohlenstoffkettenlänge der Alkylaminlösung erkennbar. Das zeigt, dass die Proteinmoleküle tatsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen von der Oberfläche abgelöst werden, um dann durch Alkylaminmoleküle ersetzt zu werden.

Schließlich wurde eine etwas „mildere“ oder „schonendere“ Methode untersucht, nämlich die spontane Desorption von Ubiquitin von der Titanoberfläche bei pH 7.4 und 10.0 in An- bzw. Abwesenheit von geringer (0.066%) Natriumdodecylsulfat- (SDS-) Konzentration. SDS ist ein Detergenz, das denaturierende Wirkung auf Proteine hat. Bei einer Konzentration von 0.066 % wirkt es jedoch nicht denaturierend.

Bei der spontanen Desorption von ^{125}I -Ubiquitin von elektropoliertem und modifiziertem Titan in Phosphat-Puffer bei pH 10.0 in Anwesenheit von 0.066 % SDS lässt sich schon in der Anfangsphase ein Effekt der schnellen Desorption durch SDS erkennen (s. Abbildung 4.10 A). Aus den in der Tabelle 4.10 zusammengestellten Daten geht hervor, dass der Phosphat-Puffer bei pH 10.0, der 0.066 % SDS beinhaltet, zu einer um 30 – 50 % schnelleren Freisetzung des Proteins von der chemisch modifizierten Metalloberfläche führt. Anfänglich erfolgt eine schnellere Desorption und damit sind die Halbwertszeiten im allgemeinen im SDS-haltigen Phosphat-Puffer mit 0.3 – 0.8 d kleiner. In der zweiten, langsameren Phase wurden Halbwertszeiten von 20 – 37 d ermittelt.

Nachdem die spontane Desorption von Ubiquitin bei pH 10.0 durchgeführt wurde, folgten zunächst Desorptionsexperimente bei physiologischem pH 7.4, um eine mögliche pH-Abhängigkeit zu untersuchen. Der Vergleich der Tabelle 4.10 und der Tabelle 4.11 zeigt, dass bei den Desorptionsexperimenten mit Ubiquitin bei pH 7.4 und 10.0 keine Unterschiede in den Halbwertszeiten auftreten.

Eine wichtige Frage war, durch welchen nicht-kovalenten Mechanismus Ubiquitin auf der Metalloberfläche immobilisiert wurde. Ubiquitin ist bei $\text{pH} > 7.0$ vornehmlich negativ geladen und die Aminogruppe des APS wird bei $\text{pH} 7.4$ protoniert. Somit könnte die Adsorption von Ubiquitin durch einen Ionenaustausch-Mechanismus auf der APS-Oberfläche erklärt werden. Eine Adsorption nach diesem Mechanismus konnte auf die APS-CDI-Oberfläche jedoch nicht übertragen werden, da es hier keine Ladungen gibt. Um die Hypothese eines möglichen Ionenaustausch-Mechanismus zu untersuchen, wurde Ethanolamin auf APS-CDI-Oberflächen kovalent gebunden, was ein ungeladenes Addukt mit einer Propylgruppe ist. Auf dieser Oberfläche wurde dann Ubiquitin in ähnlicher Weise adsorbiert wie auf einer APS-Oberfläche.

Nach der kovalenten Kopplung von Ethanolamin auf der mit CDI aktivierten Oberfläche werden Halbwertszeiten von 28 bzw. 34 d für die Freisetzung von Ubiquitin erhalten. Diese Werte stimmen mit den Halbwertszeiten der Freisetzung von der APS-modifizierten Oberflächen sehr gut überein. Daraus lässt sich schließen, dass das Ubiquitin auf der Ethanolamin-gebundenen Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Propylresten des APS immobilisiert wird. Damit scheint die positive Ladung der Aminogruppe des Silans keinen Einfluß auf die Adsorption des negativgeladenen Ubiquitins auf der APS-Oberfläche zu haben. Die Hypothese eines Ionenaustausches kann auf diese Weise nicht bestätigt werden.

Bei allen Freisetzungsexperimenten wurde der Eigenzerfall des Radioisotopes ^{125}I berücksichtigt. Der radiolytische Abbau des ^{125}I -Tyrosinrestes liegt bei 1 – 4 % im Monat und das entspricht Halbwertszeiten von 527 – 2108 d [Evans, 1976]. Die verwendete Meßmethode gibt also tatsächlich die Freisetzung des Proteins an und nicht den Zerfall der radioaktiv markierten Aminosäureeinheit.

Anhand eines rechnerischen Beispiels lässt sich eine Verknüpfung zwischen der Oberflächenkonzentration von Alkylresten und der Anzahl immobilisierter Proteinmoleküle erstellen. Die Oberflächenkonzentration beträgt 1 nmol/cm^2 , wie sich aus der Bestimmung der Aminogruppenanzahl nach APS Modifikation nach der Bolton-Hunter-Methode ergeben hat. Diese Oberflächenkonzentration entspricht 60 Alkylresten pro 10 nm^2 [Chatzinikolaidou et al., 2002]. Aus diesem Wert lässt sich ein mittlerer Abstand von ca. 0.4 – 0.5 nm zwischen

den Alkylresten ermitteln. Hat das Ubiquitinmolekül mit den Dimensionen 2.7 x 3.1 x 4.4 nm [Laub, unveröffentlicht] einen errechneten mittleren Radius von 1.4 nm und einen sich daraus ergebenden „Adsorptions-footprint“ von 6 nm², der der Flächenbelegung mit kugelförmigen Molekülen unter Berücksichtigung des maximalen Durchmessers entspricht, könnte ein adsorbiertes Ubiquitinmolekül ca. 36 Alkylreste auf der Metalloberfläche abdecken ohne Berücksichtigung der Orientierung. Eine spontane Wechselwirkung von 20 – 30 % dieser Alkylreste mit den hydrophoben Taschen des Ubiquitinmoleküls könnte die hohe Affinität erklären. Unter der oben genannten Hypothese des „Adsorptions-footprint“ wird errechnet, dass eine maximale Belegung der geometrischen Metalloberfläche mit einer Protein-Monolage von ca. 240 ng/cm² möglich wäre. Dieser theoretische Beladungswert der adsorbierten Ubiquitin-Menge wurde oft experimentell bestätigt. Bei Fällen, in denen höhere Beladungen ermittelt werden konnten, liegt es nahe, dass es zu einer intermolekularen Wechselwirkung zwischen Ubiquitinmolekülen kommt. Im Falle der kovalent gebundenen Ubiquitinmoleküle auf einer mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) aktivierten Metalloberfläche dürfen die ε-Aminogruppen der Lysinreste für die Bindung in Betracht gezogen werden. Aus der Aminosäuresequenz von Ubiquitin ergeben sich maximal 7 Lysinreste (s. Kapitel 2.1.1), von denen allerdings nur die sich auf der Oberfläche des Proteins befindlichen Reste für die Bindung zugänglich sind.

5.2.3 Immobilisierung von rhBMP-2

Nachdem Immobilisierungsexperimente mit dem Modellprotein Ubiquitin auf Metalloberflächen durchgeführt worden waren, sollte überprüft werden, ob die kovalente und nicht-kovalente Bindungsart und ihre Differenzierung auf das rhBMP-2 übertragbar sind.

Aufgrund der Tatsache, dass zur Quantifizierung der Beladungsmenge des Proteins auf der Metalloberfläche radioaktiv markiertes rhBMP-2 nach der Chloramin-T-Methode der Protein-Inkubationslösung zugesetzt wurde (s. 3.3.2.2), stellte sich die Frage, ob Unterschiede in der Beladungsmenge auftreten, wenn das nicht-radioaktiv markierte Protein in seiner nativen oder in der mit Chloramin-T-modifizierten Form eingesetzt wird. Da es sich um chemisch unterschiedliche Spezies handelt, war eine Überprüfung notwendig. Es wurde gezeigt (s. Tabelle 4.12), dass die immobilisierten rhBMP-2 Mengen bei Inkubation in einer Lösung mit

modifiziertem Protein um 10 – 60 % niedriger liegen als diejenigen mit nativem rhBMP-2. Da dieser Unterschied allerdings nicht signifikant ist ($p > 0.05$), wurden die nachfolgend beschriebenen Immobilisierungsversuche mit nativem rhBMP-2 durchgeführt.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Immobilisierungsexperimente wurden mit rhBMP-2 in 125 mM Borat / 0.066 % SDS-Puffer bei pH 10.0 als Inkubationspuffer durchgeführt. Herausgearbeitet werden konnte der Einfluß des Immobilisierungspuffers PBS bei pH 7.4 im Vergleich zu dem üblichen Borat / SDS-Puffer bei pH 10.0, der kein NaCl enthält (s. Tabelle 4.13). Die freie Aminogruppe des Silans kann bei pH 7.4 positiv geladen sein und das Protein könnte außer durch hydrophoben Wechselwirkungen zusätzlich durch Ionenaustausch immobilisiert werden. BMP-2 könnte bei einem pH-Wert < 8.2 eine positive Ladung tragen. Man würde dann eine Abstoßung der BMP-2-Moleküle von der APS-Oberfläche erwarten. Die hohen Beladungsmengen auf der APS-Oberfläche können deshalb nicht durch eine Ionenaustausch-Hypothese erklärt werden. Es handelt sich hier wahrscheinlich um einen durch die Ladungen des Proteins bei den unterschiedlichen pH-Werten des Inkubationspuffers verursachten Effekts. Die mit 1,1'-Carbonyldiimidazol aktivierte Oberfläche trägt keine Ladung und folglich sollten dort keine Unterschiede beobachtet werden. Schwankungen können möglicherweise durch unterschiedliche reaktive Gruppen der Metalloberfläche erklärt werden. Bierbaum et al. [Bierbaum et al., 2003] zeigten abhängig vom Inkubationspuffer immobilisierte Kollagenmengen auf Ti6Al4V zwischen 40 und 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 30 – 80 ng/cm^2 kollagengebundenes Fibronectin bei der Verwendung von Inkubationslösungen mit den Konzentrationen 10 und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Bezüglich der Quantifizierung von immobilisierten Proteinmengen an unterschiedlichen Metalloberflächen wird auf die entsprechende im Kapitel 5.2.1 zitierte Literatur verwiesen. Die Immobilisierung von rhBMP-2 auf elektropolierten Titanplättchen (5 x 10 x 1 mm) wurde unter Verwendung zweier unterschiedlicher rhBMP-2-Inkubationslösungen mit den Konzentrationen 0.25 und 0.6 mg/ml durchgeführt (s. Tabelle 4.14). Offenbar steigt die Oberflächenbeladung mit zunehmender Konzentration der rhBMP-2-Inkubationslösung und erreicht ein Maximum bei der kovalenten Bindung auf der mit Chromschwefelsäure behandelten Oberfläche mit 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in der Proteinlösung mit der Konzentration 0.6 mg/ml. Auf der gleichen Oberfläche beträgt die Beladung bei nicht-kovalenter Immobilisierung

(gleiche Proteinkonzentration) $2.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die kovalent gebundene Proteinmenge (auf Ti-APS-CDI) ist also um den Faktor 1.5 - 4 höher als die nicht-kovalent immobilisierte Menge (auf Ti-APS). Der Umstand, dass der Faktor bei den mit Chromschwefelsäure behandelten Titanplättchen größer ist, ist eine unmittelbare Folge der Oberflächenvergrößerung, die bereits im Kapitel 5.1.3 diskutiert wurde.

Erstaunlicherweise nehmen die adsorbierten Beladungsmengen auf nicht-funktionalisierten Oberflächen (ohne APS- bzw. APS-CDI-Modifikation) mit steigender Konzentration der rhBMP-2-Inkubationslösung zu und erreichen zum Teil die Beladungsmengen der chemisch modifizierten Oberflächen, bei denen das Protein gezielt auf der Oberfläche immobilisiert wird. Überraschend war das insbesondere deswegen, weil es diesen Befund bei den Vorversuchen der Immobilisierung von Ubiquitin nicht gab. Allerdings handelte es sich bei der Adsorption von Ubiquitin um eine Adsorption an eine nicht-funktionalisierte Oberfläche (unspezifische Adsorption an HNO_3 - und CSS-behandelten Oberflächen). Diese diente als Kontrollversuch für die jeweilige Ubiquitin-Immobilisierung an den analogen, funktionalisierten Metalloberflächen (HNO_3 -APS, HNO_3 -APS-CDI, CSS-APS und CSS-APS-CDI). Bei Ubiquitin lagen die unspezifischen Beladungen (an HNO_3 - und CSS-behandelten Oberflächen) zwischen 0.4 – 5 % der Beladungsmengen auf CSS-APS-CDI-modifizierten Oberflächen. Bei der Adsorption von rhBMP-2 muß zwischen der HNO_3 - und der CSS- behandelten Oberfläche differenziert werden: Auf der CSS-Oberfläche wird auch unspezifisch eine um den Faktor 4 größere Menge an rhBMP-2 adsorbiert als an der HNO_3 -Oberfläche. Aus diesem Grund wird die Hypothese aufgestellt, dass die „blumenkohlartige“ Oberflächentopographie mit ihrer erhöhten Porosität, im Zusammenspiel mit dem größeren Protein die Überladung der Trägeroberfläche durch Kondensationsprozesse fördert. Im Falle des Ubiquitin fällt einer dieser beiden Faktoren weg, da die Molekülgröße zu gering zu sein scheint, als dass innerhalb der porenähnlichen Strukturen die Protein-Protein-Wechselwirkung zur Anlagerung von weiterem Ubiquitin aus der Lösung führt.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Grund für die erhöhte rhBMP-2-Beladung auf der CSS-Oberfläche in der im Vergleich zu Ubiquitin besseren Wechselwirkung zwischen rhBMP-2 und der ultrahydrophilen Metalloberfläche liegt. Die CSS-Oberfläche ist durch Kontaktwinkel von 0° bei abwesender Kontaktwinkelhysterese (s. Kapitel 4.1.3) und

somit durch eine hohe Oberflächenenergie charakterisiert. Auf einer solchen Oberfläche ist die Adsorption von Proteinen sicherlich hydrophiler Natur.

An dieser Stelle soll nicht verschwiegen werden, dass die gemessenen unspezifischen rhBMP-2-Beladungen zunächst großen Schwankungen unterlagen. Sie betrug 2 – 60 % der Beladungsmenge auf CSS-APS-CDI-modifizierten Oberflächen. Jedoch konnte bei der unspezifischen rhBMP-2-Adsorption im Laufe der Zeit - durch Verbesserung der rhBMP-2-Präparation und der radioaktiven Markierungsmethode - bei gut reproduzierbaren Werten die Schwankungsbreite auf nur noch 10 % reduziert werden. Ferner stellt sich die Frage, ob das unspezifisch bzw. hydrophil adsorbierte Protein eine ähnliche Freisetzung zeigt und vergleichbar hohe biologische Aktivität mit dem Zielgewebe *in vivo* aufweist wie das gezielt immobilisierte Protein. Die Klärung dieser Frage erfordert in Zukunft weitere Experimente.

Aus den Adsorption- und Desorptionsexperimenten mit Ubiquitin wurde die Hypothese einer multivalenten Adsorption auf einer APS-modifizierten Metalloberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen bestätigt (s. Kapitel 5.2.1 und 5.2.2). Um hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der funktionalisierten Metalloberfläche und dem rhBMP-2-Molekül zu untersuchen, wurden auch hier Plättchen mit diversen Alkylsilanen, die über unterschiedliche Liganden verfügen, modifiziert (s. Tabelle 4.15). Die mit Chromschwefelsäure behandelten Titanplättchen (Ti-CSS) weisen Beladungen auf, die um Faktor 2 – 5 höher sind als die Beladungen bei den unbehandelten Plättchen (HNO₃). Die Beladung ist auf der mit Hexyltrichlorsilan modifizierten Oberfläche mit 220 ng/cm² am höchsten, was ein Hinweis für eine mögliche Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Kettenlänge der hydrophoben Hexylresten darstellt, wie sie auch von Jennissen [Jennissen, 1981] für den Fall der Hexyl-Sepharose beschrieben wurde.

Die Beladungsmengen auf den Ti-CSS-Oberflächen weisen vergleichbare Werte aus, unabhängig davon, ob mit Propyltrichlorsilan (PTC), Propyltrimethoxysilan (PTM) oder Aminopropyltriethoxysilan (APS) modifiziert wurde. Diese drei Silane haben die Gemeinsamkeit, dass sie alle über einen Propylrest verfügen. Es ist daraus zu folgern, dass sobald gleiche Mengen Protein adsorbiert werden, die positive Ladung des APS für die Adsorption nicht nötig ist, und es ausschließlich auf die hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Propylrest ankommt. Hierfür ist ein deutlicher Beleg, dass bei Variation der Kettenlänge des hydrophoben Restes am Silan von C3 auf C6, die Oberflächenbeladung steigt. Dieser

Befund stimmt sehr gut mit dem Modell der Zunahme der Stärke der Proteinbindung mit steigender Alkyl-Kettenlänge überein, das in der hydrophoben Interaktions-Chromatographie untersucht wurde [Er-EI et al., 1972; Jennissen, 2000a]. Eine weitere Verlängerung der C-Kette am Silan führt zur Abnahme der adsorbierten rhBMP-2-Menge. Bei längeren Alkylketten beobachtet man den Effekt einer Faltung der Kette mit der Folge, dass sie selbst an der Oberfläche binden ohne den Proteinmolekülen freie Bindungsstellen zur Verfügung zu stellen.

Bei den Titan-Osteopromote-Plättchen (Altatec) handelt es sich um eine sandgestrahlte und dadurch bedingt vergrößerte Oberfläche. Hier wurden die Konzentrationen der BMP-2-Inkubationslösungen 0.25 und 0.6 mg/ml untersucht (s. Tabelle 4.16). Die Beladung nimmt ebenfalls mit steigender Konzentration zu. Die immobilisierten Mengen an rhBMP-2 liegen auf der sandgestrahlten Osteopromote-Oberfläche um Faktor 2 höher als die Mengen auf elektropoliertem Titan, was wahrscheinlich eine Folge der Oberflächenvergrößerung ist. Bei einer Konzentration der Inkubationslösung von 0.6 mg/ml können bis zu $5.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ rhBMP-2 auf der CSS-APS-CDI-Oberfläche immobilisiert werden.

Die Immobilisierung von rhBMP-2 auf Titanplasmaspray-beschichteten und mit Chromschwefelsäure behandelten (CSS) Titanlegierungsplättchen mit einer Konzentration der Inkubationslösung von 0.25 mg/ml lieferte Beladungswerte von $5.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf der CSS-APS- und $8.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf der CSS-APS-CDI-Oberfläche (s. Tabelle 4.17). Diese Beladungswerte, die um Faktor zwanzig höher liegen als die immobilisierten Mengen auf elektropoliertem Titan, lassen sich auf die Topologie der Titanplasmaspray-beschichteten Oberfläche zurückführen, wobei die reale Oberfläche zwanzigfach größer ist als die geometrische Oberfläche. Das konnte durch CLSM-Messungen dokumentiert werden (s. Kapitel 4.1.2).

Bei der Cobaltchrommolybdän-Legierung erhält man mit $0.6 - 2.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ unerwartet hohe Werte für die unspezifische Adsorption auf den unbehandelten Metallplättchen bei den Konzentrationen der rhBMP-2-Inkubationslösungen 0.25 und 0.6 mg/ml (s. Tabelle 4.18). Mit steigender Konzentration der Inkubationslösung kann eine Zunahme der Beladung bis auf $5010 \text{ ng}/\text{cm}^2$ beobachtet werden. Im Gegensatz zur Titanoberfläche liegen sowohl die kovalent (auf CoCrMo-HNO₃-APS-CDI) als auch die nicht-kovalent (auf CoCrMo-HNO₃-APS)

immobilisierten rhBMP-2-Mengen höher als bei den analog modifizierten, aber CSS-behandelten Plättchen.

5.2.4 Freisetzung von rhBMP-2

Die Desorptionsexperimente von rhBMP-2 von unterschiedlichen Metalloberflächen, die als Implantatwerkstoffe dienen, wurden zur Differenzierung zwischen kovalent und nicht-kovalent immobilisierten Proteinmengen auf der modifizierten Metalloberfläche durchgeführt. In gleicher Weise wie die Vorexperimente mit dem Modellprotein Ubiquitin wurde auch die Freisetzung des rhBMP-2 von der Metalloberfläche untersucht (s. Kapitel 5.2.2).

Zunächst wurde die spontane Desorption des immobilisierten rhBMP-2 auf elektropoliertem Titan im physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4 untersucht.

In Abbildung 4.14 wird die Desorption von rhBMP-2 von elektropoliertem Titan-CSS-APS und Titan-CSS-APS-CDI durch 2, 20 und 200 ml physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4 dargestellt. Hier sollte gezeigt werden, dass die Desorptionsreaktion bis zum Gleichgewicht abläuft ohne dass eine Rückreaktion (Readsorption) auftritt. Aus der 65-d-kinetischen Untersuchung lässt sich durch die stete Abnahme der rhBMP-2-Beladungsmenge erkennen, dass unabhängig von dem Volumen des Desorptionspuffers keine Readsorption von rhBMP-2 auf der Titanoberfläche stattfindet. Das bedeutet, dass die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 der im Kapitel 4.2.2.3 beschriebenen Reaktionsgleichung (25) nicht berücksichtigt werden müssen, sondern nur die apparenten Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{1,app}$ und $k_{2,app}$. Die Halbwertszeiten sind für die drei unterschiedlichen Volumina des Desorptionspuffers vergleichbar groß. Der tägliche bzw. zweitägliche Pufferwechsel führt nicht zur Einstellung eines Gleichgewichtes, es wird kein Plateau erreicht.

Die kinetische Untersuchung ließ sich einem Zweiphasen-Zerfallsmodell anpassen. Dabei liegen die Halbwertszeiten für die schnelle Anfangsphase zwischen 0.2 und 0.7 d und für die folgende langsamere Phase zwischen 31 und 40 d. Für die Anfangsphase wurden Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten von $10 \times 10^{-6} - 40 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ermittelt und für die zweite, langsamere Phase $0.20 \times 10^{-6} - 0.26 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Zwischen diesen beiden Phasen liegt

ein Faktor von 50 – 150 in der Desorptionsgeschwindigkeit. Auch Uludag et al. [Uludag et al., 1999] zeigten die Freisetzung von BMP-2 von unterschiedlichen Trägermaterialien in einem ektopischen Modell in Ratten nach einem biphasischen Zerfallsmodell. Es wurden für die Anfangsphase Halbwertszeiten zwischen 0.004 – 6 d je nach Trägermaterial für das BMP-2 ermittelt. Für die zweite Phase der Freisetzung zeigen die Halbwertszeiten mit 2.8 – 17.3 d ebenfalls eine Abhängigkeit vom Trägermaterial. In einer anderen Studie wurde Fibronectin auf kollagenbeschichteter Ti6Al4V-Titanlegierung mit der Konzentration 10 µg/ml adsorbiert [Bierbaum et al., 2003]. Nach 4 d wurden 20 % der adsorbierten Menge in PBS-Puffer desorbiert. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml war die initiale Beladungsmenge um ca. 50 % höher, jedoch wurde die zusätzliche Beladungsmenge innerhalb der ersten 2 d desorbiert. Diese Experimente zeigen, dass die Desorption von Fibronectin eine Funktion der verwendeten Inkubationslösungs-Konzentration ist.

Die spontane Desorption von rhBMP-2 in PBS-Puffer zeigt geringere Unterschiede als erwartet in den Halbwertszeiten zwischen der APS- und der APS-CDI-modifizierten Oberfläche (s. Abbildung 4.14). Für das kovalent gebundene Protein darf eine wesentlich langsamere Desorption erwartet werden als für das nicht-kovalent immobilisierte Protein. Die Hypothese, dass es mit der Zeit zu einem Bindungsbruch der Si-C-Bindung kommen kann, die eventuell eine gleichmäßige Entfernung des Proteins von den beiden APS- und APS-CDI-Oberflächen verursachen könnte, ist wegen der hohen Stabilität dieser Bindung unwahrscheinlich. Die Bindungsenthalpie der Si-C-Bindung beträgt 285 kJ mol^{-1} [Aylward/Findlay, 1981]. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass das beobachtete Desorptionsverhalten nicht allein durch die beiden identifizierten Proteinspezies bestimmt wird, sondern dass darüber hinaus eine weitere, hinsichtlich des Bindungsmodus sich unterscheidende Spezies existiert. Die Zuordnung einer solchen Spezies würde die Möglichkeit einer weiteren Verfeinerung des Modells bieten.

Nachdem bereits die spontane Desorption des rhBMP-2 in physiologischem PBS-Puffer bei pH 7.4 als Zweiphasenzerfall charakterisiert wurde, soll im Folgenden nun die Verdrängung des rhBMP-2 in Alkylaminlösungen bei pH 7.4 behandelt werden, um wie bei Ubiquitin den kovalent vom nicht-kovalent immobilisierten Proteinanteil von der Mischpopulation auf der APS-CDI-Oberfläche zu differenzieren (s. Kapitel 5.2.2). Die Bestätigung der Hypothese eines Adsorptionsmechanismus, bei dem ionische Wechselwirkungen keine, oder nur eine

untergeordnete Rolle spielen, wurde bereits bei der Immobilisierung von rhBMP-2 auf alkylsilanierten Metalloberflächen im Kapitel 5.2.3 besprochen.

Auch in diesem Fall wird ein Zweiphasen-Zerfallsmodell als Hypothese herangezogen. Der Vergleich der Halbwertszeiten, die sich bei der Verdrängung in 2 M Ethyl-, 2 M Butyl-, 1 M Hexyl-, 2 M Hexyl-, 2 M Heptyl- und 2 M Octylaminlösung ergeben, zeigt, dass, die Halbwertszeiten der schnellen Anfangsphase mit 0.02 – 0.05 d für alle Alkylaminlösungen in der gleichen Größenordnung liegen (s. Tabelle 4.21). In der zweiten, langsameren Phase werden die kleinsten Halbwertszeiten erhalten, wenn 2 M Hexyl-, Heptyl- und Octylaminlösung verwendet werden. Bei der Verdrängung mit 2 M Heptylamin erreicht nach 8 d Messzeit die Endbeladung des nicht-kovalent immobilisierten BMP-2 auf der APS-Oberfläche 28 %, während die Proteinmenge auf der APS-CDI-Oberfläche nach der gleichen Verdrängungszeit 62 % beträgt. Nach Subtraktion des nicht-kovalenten BMP-2-Anteils von der APS-CDI-Oberfläche, lässt sich schließen, dass 34 % der immobilisierten BMP-2-Menge auf der APS-CDI-Oberfläche kovalent gebunden ist. Zum Vergleich: Der entsprechende Wert für Ubiquitin lag bei 33 %. Ähnlich niedrige Halbwertszeiten für die schnelle Phase werden bei der Verdrängung durch Octyl- und Hexylaminlösung erhalten. Messungen zeigten, dass die biologische Aktivität des rhBMP-2 nach 2 d-Behandlung mit einer 2 M Heptylaminlösung erhalten blieb. Hier ist wie bereits im Kapitel 5.2.2 für Ubiquitin gezeigt wurde, eine Abhängigkeit der Verdrängung des BMP-2 von der Kohlenstoffkettenlänge der Alkylaminlösung erkennbar. Das zeigt, dass die Proteinmoleküle tatsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen von der Oberfläche abgelöst werden, um dann durch Alkylaminmoleküle ersetzt zu werden.

Eine Verdrängung von rhBMP-2 von der Titanoberfläche wurde mit einer hochkonzentrierten Rinderserumalbuminlösung untersucht. Die Untersuchung des Einflusses von Serumalbumin ist deswegen so wichtig, weil es ca. 50 % des im Blutplasma vorkommenden Proteins ausmacht. Bei einer Serumalbumin-Konzentration in ähnlicher Höhe wie im Körper von Säugetieren (ca. 70 mg/ml) sollte das rhBMP-2 durch das Albumin von der Oberfläche der Titanimplantate verdrängt werden können. Die Halbwertszeiten dieser Protein-Protein-Verdrängung, (s. Tabelle 4.26) wurden einem biphasischen Zerfallsmodell angepasst und liegen für elektropoliertes Titan bei 0.2 d für die schnelle Anfangsphase, während sie für die langsame Phase bei 19 d auf der APS-Oberfläche bzw. 30 d auf der APS-CDI-Oberfläche liegen. Da die Freisetzung des rhBMP-2 durch Serumalbumin (70 mg/ml) schneller ist als die

spontane Desorption im physiologischen Phosphat-Puffer aber langsamer als die Verdrängung durch homologe Alkylaminlösungen (2 M), darf angenommen werden, dass unter physiologischen Bedingungen Verdrängungsprozesse, in denen rhBMP-2 und Serumproteine um Bindungsstellen auf der Oberfläche konkurrieren, für die Desorption verantwortlich sind.

Die kovalente Kopplung von Ethanolamin auf der mit CDI aktivierten Ti-CSS-APS-Oberfläche ermöglicht lediglich eine nicht-kovalente Immobilisierung von rhBMP-2. Diese Oberfläche trägt keine Ladungen, so dass ein Ionenaustausch nicht möglich ist. Die APS-Oberfläche ist bei pH 7.4 positiv geladen, rhBMP-2 kann bei pH < 8.2 eine positive Ladung tragen. Daher darf elektrostatische Repulsion unterstellt werden, die eine rhBMP-2-Adsorption durch Ionenaustausch unwahrscheinlich macht. Die Proteinverdrängung in 2 M Octylamin lieferte für die mit Ethanolamin gekoppelten APS-CDI-Oberfläche Halbwertszeiten von 0.03 d für die schnelle Phase und 11 d für die langsamere Phase. Diese stimmen sehr gut mit den Halbwertszeiten der nicht-kovalenten Bindung von rhBMP-2 auf Ti-CSS-APS überein. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass rhBMP-2 auf der APS-Oberfläche durch hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Propylrest des Silans immobilisiert wird.

Analog zum elektropolierten Titan wird die spontane Desorption des rhBMP-2 von der Osteopromote Titanoberfläche, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurde, in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) in einer 7 d-kinetischen Untersuchung durchgeführt. Die Desorptionskinetik wird einem Zweiphasen-Zerfallsmodell angepasst (s. Abbildung 4.15) und liefert für die Anfangsphase Halbwertszeiten von 0.01 und 0.02 d und für die langsamere Endphase Halbwertszeiten von 32 d für das nicht-kovalent (auf CSS-APS-Oberfläche) und 54 d für das kovalent immobilisierte (auf CSS-APS-CDI-Oberfläche) rhBMP-2 (s. Tabelle 4.22).

Auch für die Titanplasmaspray-beschichtete Titanlegierung, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurde, wurde die spontane Desorption von rhBMP-2 in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 (PBS) im Rahmen einer 11 d-kinetischen Untersuchung charakterisiert. Die Anpassung nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell (s. Abbildung 4.16) liefert für die Anfangsphase Halbwertszeiten von 0.2 d und für die zweite langsamere Phase Halbwertszeiten von 34 d für

das kovalent (auf CSS-APS-CDI) und 25 d für das nicht-kovalent (auf CSS-APS) immobilisierte rhBMP-2 (s. Tabelle 4.23).

Zuletzt wurde der zeitliche Verlauf der spontanen Desorption des rhBMP-2 von einer Cobaltchrommolybdän-Legierung, die mit Chromschwefelsäure behandelt wurde, im physiologischen Phosphat-Puffer (PBS) bei pH 7.4 in einem 64 d-kinetischen Experiment verfolgt. Die Anpassung nach einem Zweiphasen-Zerfallsmodell liefert für die Anfangsphase Halbwertszeiten von 0.01 d für beide Oberflächen und für die zweite, langsame Phase Halbwertszeiten von 86 d für die APS-CDI-Oberfläche und 46 d für das nicht-kovalent adsorbierte Protein auf der APS-Oberfläche (s. Abbildung 4.17). Diese Halbwertszeiten belegen eine hohe Bindungsaffinität von rhBMP-2 zur modifizierten Cobaltchrommolybdän-Legierungsoberfläche. Durch Vergleich der Halbwertszeiten, die sich aus der Verdrängung in 2 M Hexyl-, Heptyl- und Octylaminlösung ergeben, liegen die Halbwertszeiten der schnellen Anfangsphase bei allen drei Alkylaminen zwischen 0.02 – 0.08 d sowohl für das nicht-kovalent als auch für das kovalent gebundene rhBMP-2. In der langsamen Phase liegen die Halbwertszeiten der Verdrängung durch die drei Hexyl-, Heptyl- und Octylaminlösungen mit 6 – 7 d für das nicht-kovalent und 17 – 19 d für das kovalent gebundene Protein höher als die Halbwertszeiten bei Titan (s. Tabelle 4.25).

Die Halbwertszeiten der spontanen Desorption liegen in der schnellen Phase für Titan je nach Oberflächenbeschaffenheit unter 1 d und in der langsameren Phase zwischen 30 und 54 d. Beim Vergleich zwischen elektropolierter Titan-, Osteopromote Titan- und Titanplasmaspray-beschichteter Titanoberfläche zeigt die Osteopromote-Oberfläche die längsten Halbwertszeiten bei der Desorption von rhBMP-2. Bei der Cobaltchrommolybdänlegierung liegen die Halbwertszeiten mit 46 und 86 d höher als bei Titan. Die hohe Affinität des Proteins für die Cobaltchrommolybdän-Oberfläche könnte auf der unterschiedlichen Zusammensetzung dieser Legierung beruhen, die durch ihre physikalischen und topographischen Eigenschaften eine andere Wechselwirkung mit dem Protein eingehen kann.

Es konnte aus den kinetischen Untersuchungen eine schnelle Anfangs- und eine langsamere Endphase der Desorptionsgeschwindigkeit abgeleitet werden. Die Ergebnisse der Desorption im physiologischen Puffer bei pH 7.4 (PBS) weisen darauf hin, dass rhBMP-2 in Form einer

lockeren und einer fester gebundenen Spezies auf der Oberfläche immobilisiert und freigesetzt werden kann (s. Kapitel 4.2.2.3, Gleichung 25). Daher wird ein zweistufiger, konsekutiver Mechanismus [Jennissen et al., 1982; Jennissen & Zumbink, 2004] für die Desorption vorgeschlagen.

Anhand eines rechnerischen Beispiels lässt sich eine Verbindung zwischen der Oberflächenkonzentration an Alkylresten und der Anzahl immobilisierter Proteinmoleküle erstellen. Die Oberflächenkonzentration beträgt 1 nmol/cm^2 , wie sich aus der Bestimmung der Aminogruppenanzahl nach APS Modifikation nach der Bolton-Hunter-Methode ergeben hat [Chatzinikolaidou et al., 2002]. Diese Oberflächenkonzentration entspricht 60 Alkylresten pro 10 nm^2 . Aus diesem Wert lässt sich ein mittlerer Abstand von ca. $0.4 - 0.5 \text{ nm}$ zwischen den Alkylresten ermitteln. Das BMP-2 Molekül hat die Dimensionen $2.5 \times 3.5 \times 7 \text{ nm}$ [Laub et al., 2001] und daraus kann ein maximal flächenbelegender „Adsorptions-footprint“ von ca. 20 nm^2 berechnet werden. Wenn statt 20 ein realistischer Wert des „Adsorptions-footprint“ von 10 nm^2 genommen wird, könnte ein adsorbiertes BMP-2 Molekül ca. 60 Alkylreste auf der Metalloberfläche abdecken ohne Berücksichtigung der Orientierung. Eine spontane Wechselwirkung von 10 – 20 % dieser Alkylreste mit den hydrophoben Taschen des BMP-2 Moleküls könnte die hohe Affinität erklären. Unter der oben genannten Hypothese des „Adsorptions-footprint“ von 10 nm^2 wird errechnet, dass eine maximale Belegung der geometrischen Metalloberfläche mit einer Protein-Monolage von ca. 500 ng/cm^2 theoretisch möglich wäre. Dieser Beladungswert wurde oft experimentell bestätigt. Bei Fällen, in denen höhere Beladungen ermittelt werden konnten, ist es möglich, dass es zu einer intermolekularen Wechselwirkung zwischen Proteinmolekülen kommt.

Im Falle des kovalent gebundenen rhBMP-2-Moleküls auf einer mit Carbonyldiimidazol (CDI) aktivierten Metalloberfläche werden die ϵ -Aminogruppen der Lysinreste für die Bindung in Betracht gezogen. Jede Monomer-Polypeptidkette von rhBMP-2 enthält 9 Lysinreste, von denen allerdings nur die sich auf der Oberfläche des Proteins befindlichen für die Bindung zugänglich sind (s. Kapitel 2.1.3).

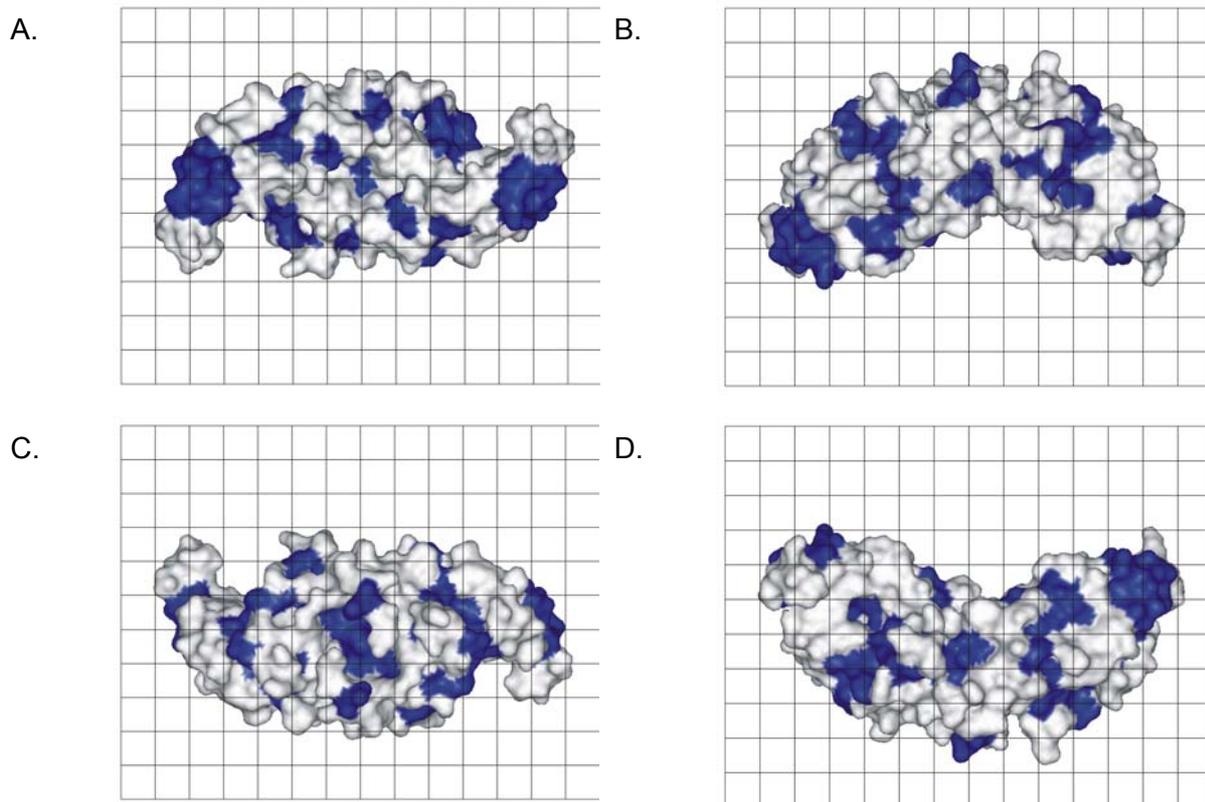


Abbildung 5.1: Verteilung der hydrophoben Areale (blau) auf der Oberfläche des BMP-2 Moleküls. Die Solvent-zugängliche Oberfläche vom humanen BMP-2 wurde unter Verwendung des Programms WeblabViever 4.0 (Molecular Simulations Inc., San Diego, USA) verwendet. Der Probenradius betrug 1.4 Å (0.14 nm). Die Maschenbreite des gezeigten Gitters beträgt 0.5 nm. Das Molekülmodell wird - beginnend mit der Position (A) - um 90 ° entlang der x-Achse rotiert [Chatzinikolaidou et al., 2002].

5.3 Biologische Aktivität von rhBMP-2 *in vitro*

5.3.1 Toxizitätstestung von rhBMP-2

Das in *E. coli* gentechnisch hergestellte rhBMP-2 findet aufgrund seines knocheninduzierenden Potentials breite Anwendung in Tierexperimenten. Die Prüfung der Gentoxizität ist eine notwendige Qualitätskontrolle, denn die gentechnische Herstellung und Aufreinigung schließt nicht aus, dass in solchen Präparationen möglicherweise geringe Mengen an toxischen Substanzen im rekombinanten Protein verblieben sind. Darüberhinaus kann das Protein während der Renaturierungsphase eine falsche Konformation annehmen, die ebenfalls Zelltoxizität auslösen kann. Letztere wäre auf Kreuzreaktionen mit dem verkehrten Rezeptor oder direkte toxische Effekte nach einer Endozytose zurückzuführen. Es sei in diesem Zusammenhang angemerkt, dass die Relevanz der unveränderten Proteinkonformation in der Vergangenheit sehr deutlich durch die Krise der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) zu Tage trat: Auslöser der BSE ist eine pathologische Konformation des Prionproteins [Dobson, 2003].

Die Gentoxizität wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Dopp, AG Prof. Dr. A. W. Rettenmeier im Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Universitätsklinikum Essen untersucht. Die Zellen zweier unterschiedlicher Säugetier-Zelllinien wurden in 3 – 300 nM (7.8×10^{-5} - 7.8×10^{-3} mg/ml) rhBMP-2 inkubiert und die Mikrokerne ausgezählt. Der Mikrokerntest ist eine klassische Methode, um Gentoxizität in Populationen der Zellteilung zu untersuchen [Heddle, 1973; Schmid, 1975]. Insgesamt wurden ca. 25000 Zellkerne der Zelllinie V79 chinesischer Hamsterzellen und 40000 Zellkerne der humanen Amnionflüssigkeit fibroblastenähnliche Zelllinie (amniotic fluid fibroblast-like, abgekürzt: AFFL) bezüglich der Häufigkeit der Mikrokerne überprüft. Der *in vitro* Mikrokerntest ist im Bereich der Toxikologie zur Überprüfung der Effekte physikalischer oder chemischer Reagenzien bezüglich der DNA Schädigung etabliert [Dopp et al., 1995; Dopp et al., 1997].

Im Fall der V79 chinesischen Hamsterzellen wurde keine Zunahme der gezählten Mikrokerne erhalten. Im Gegensatz dazu steht eine starke Zunahme der Anzahl der Mikrokerne in der mit Cisplatin behandelten Positivkontrolle. Evaluationskriterien eines *in vitro* Mikrokerntests mit

V79 Hamsterzellen wurden von Frieauff et al. definiert [Frieauff et al., 1998]. Nach dieser Definition wird eine zu untersuchende Probe als positiv gentoxisch bezeichnet, wenn die Häufigkeit der Mikrokerne $\geq 10 \text{ ‰}$ ist (d.h. ≥ 10 Mikrokerne / 1000 Zellen) und eine Zunahme im Vergleich zum entsprechenden löslichen Kontrollwert von mindestens 6 ‰ vorliegt. Abbildung 4.19 zeigt, dass die Frequenz der Mikrokerne nach Inkubation in $3 - 300 \text{ nM}$ rhBMP-2 zwischen $4.4 - 5.7$ (Mittelwerte) und damit unterhalb des 10 ‰ -Wertes nach dem Kriterium von Frieauff liegt. Damit liegt keine signifikante Zunahme der Mikrokernelanzahl im Vergleich zur löslichen Kontrolle und somit kein gentoxischer Effekt vor. Aus allen oben genannten Untersuchungen folgt, dass das gentechnisch hergestellte rhBMP-2 laut Kriterien von Frieauff et al. in V79 Zellen keine Gentoxizität aufweist.

Bezüglich der Anzahl der V79-Zellteilungen wurde eine geringe und nicht signifikante Zunahme von ca. 12 ‰ in den rhBMP-2 Konzentrationen 3 und 30 nM beobachtet. Bei 300 nM rhBMP-2 wurden die Kontrollwerte erreicht. Cisplatin führt zur Reduzierung der Zellteilung um ca. 11 ‰ . Offensichtlich führt rhBMP-2 nicht zu einer signifikanten Zunahme der Zellteilung. Es ist bekannt, dass rhBMP-2 Effekte in der Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung von Knochen-Vorläuferzellen zeigt [Reddi, 1995b]. Aus diesem Grund ist es nicht unerwartet, dass rhBMP-2 einen Einfluß auf die Proliferation von V79 Zellen aufweist, der sich als Zunahme der Mitosen bemerkbar macht.

Bei den humanen AFFL Zellen hat ihre Inkubation mit $3 - 300 \text{ nM}$ rhBMP-2 zu keiner Zunahme in der Induktion der Mikrokern-Bildung geführt. Im Gegensatz dazu wurde die Anzahl der Mikrokerne der mit Cisplatin exponierten Zellen um 200 ‰ erhöht. Für die AFFL Zellen sind keine Evaluationskriterien über die Anzahl der Mikrokerne bekannt [Kirsch-Volders et al., 2000]. Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Werten der V79 Zellen.

Die Anzahl der AFFL-Zellteilung hat bei den rhBMP-2-haltigen Proben im Gegensatz zu den V79 Zellen um $8 - 35 \text{ ‰}$ und in der Positivkontrolle um 60 ‰ abgenommen. Diese Beobachtung ist im Hinblick auf eine von Nakaoka mit Ratten durchgeführten Studie [Nakaoka et al., 1997] nicht überraschend, wobei rhBMP-2 die Proliferation bestimmter Zellen wie z.B. glatter Muskelzellen inhibiert.

5.3.2 Biologische Aktivität vom löslichen rhBMP-2

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der MC3T3-E1 Osteoblastenzelllinie wurde mit den reinsten rhBMP-2 Fraktionen nach ihrer chromatographischen Aufreinigung ermittelt. Nachdem konfluent gewachsene Zellen 3 d lang mit Lösungen unterschiedlicher rhBMP-2 Konzentration inkubiert wurden, wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase photometrisch gemessen. Die Expression der alkalischen Phosphatase ist unter anderem ein Marker für die Differenzierung von Osteoblasten und Knochenmetabolismus [Aubin et al., 1995]. Knochenspezifische alkalische Phosphatase reflektiert die Bildung der organischen Matrix im Knochen [Christenson, 1997].

Die Daten wurden nichtlinear einer hyperbolischen Sättigungskurve mit $r^2 = 0.9916$ angepasst (s. Abbildung 4.21). Der gemessene Konzentrationsbereich lag zwischen 0 und 30 nM rhBMP-2. Die Halbsättigungskonstante ($K_{0.5}$) beträgt 17 nM (0.4 µg/ml) rhBMP-2 mit einer Standardabweichung von 3 nM. Die maximale OD liegt unter 3. Bei einer rhBMP-2 Konzentration von 5 nM (130 ng/ml) (s. Tabelle 4.28) wird eine hohe alkalische Phosphatase-Aktivität bei einer OD von 2 erreicht, die sehr gut vergleichbar mit der Positivkontrolle ist. Eine alkalische Phosphatase-Induktion wurde schon bei geringeren Konzentrationen von 0.6 nM rhBMP-2 (16 ng/ml) gemessen. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den folgenden experimentellen Daten überein. In einer Zeit-Dosis-Kurve wurde gezeigt [Takuwa et al., 1991], dass der stimulatorische Effekt von BMP-2 auf MC3T3-E1-Zellen bei Konzentrationen von 20 ng/ml beobachtet wird und mit steigenden BMP-2-Dosen bis zu 200 ng/ml zunimmt. Dieser Vorgang erfordert mehr als 24 h. Zellen die mit BMP-2 inkubiert wurden zeigen eine steigende alkalische Phosphatase-Aktivität nach 48 h und diese hohe Aktivität bleibt auf diesem Niveau mindestens für die nächsten 24 h.

Die erhaltenen Daten für die Konzentrations-Wirkungs-Kurve können für das Zellkulturmedium und für höhere Konzentrationen an rhBMP-2 einer Hyperbel angepasst werden, trotz der Tatsache, dass zwei Rezeptortypen von rhBMP-2 in der Bindung kooperieren [Liu et al., 1995]. In einer Studie von Wiemann et al. [Wiemann et al., 2001] liegen die erforderlichen rhBMP-2-Konzentrationen für eine halbmaximale Sättigung $K_{0.5}$ zwischen 30 – 100 nM (0.8 – 2.5 µg/ml) und die Zellantwort erreicht ein Plateau bei 300 – 1000 nM. Das zeigt, dass bei höheren rhBMP-2-Konzentrationen keine weiteren biologischen Effekte erwartet werden können. Damit bleibt es unverständlich, warum in klinischen

Anwendungen BMP-2 in Konzentrationen > 1.0 mg/ml eingesetzt wird, wenn schon ein kleiner Bruchteil dieser Dosis genügt, um eine maximale Rezeptorantwort zu erhalten. Hohe BMP-2-Dosen beinhalten nicht zuletzt aus den bereits oben genannten Gründen das Risiko eines toxischen Effekts auf den Zellen.

In einer Dosis-Wirkungs-Kurve zeigten Wiemann et al. [Wiemann et al., 2002], dass die Halbsättigungskonstante ($K_{0.5}$) der alkalischen Phosphatase-Aktivität nach 3-tägiger Inkubation von MC3T3-E1-Zellen in steigenden rhBMP-2-Konzentrationen von 15 – 2000 ng/ml, 16 nM beträgt. Dieser Wert stimmt sehr gut mit der ermittelten Halbsättigungskonstante von 17 nM überein.

Die Induktion der alkalischen Phosphatase in der murinen MC3T3-E1 Osteoblastenzelllinie kann für reine und unreine Fraktionen von rhBMP-2 angewandt werden. Die Eignung dieser Methode konnte in Übereinstimmung mit anderen Studien in diesem Bereich gezeigt werden [Chung et al., 1999b; Hazama et al., 1995; Takuwa et al., 1991]. BMP-2 bewirkt eine erhöhte alkalische Phosphatase-Aktivität bei frühen Passagen der MC3T3-E1-Osteoblastenzelllinie, die bei späteren Passagen abnimmt [Chung et al., 1999b].

Bei der Bindung eines Effektors wie in diesem Falle rhBMP-2 an seinen Rezeptor soll zwischen drei Ereignissen differenziert werden: der Bindungsfunktion, der Zustandsfunktion und den zellulären Effekten, die auf den Änderungen des Rezeptorzustandes beruhen [Wiemann et al., 2001]. Bei der Bindung von rhBMP-2 gibt es zuerst eine Kooperativität von zwei Rezeptortypen in der Bindung. Dann folgt eine Signaltransduktions-Kaskade, in der Adaptorproteine wie Smad1 und Smad5 beteiligt sind. Weiterhin wird das Signal im Zellkern überführt, wobei die Transkription beginnt und Translation mit Ansammlung der alkalischen Phosphatase im Zytosol stattfinden. Als erste Annäherung kann in einem schnellen Schritt die Bindung von rhBMP-2 an seinen Rezeptor vorausgesetzt werden, dann folgt eine langsame Signaltransduktions-Kaskade und anschließend eine noch langsamere Synthese der alkalischen Phosphatase. Aus der Tatsache, dass drei Tage nach Bindung von rhBMP-2 an seinen Rezeptor eine hyperbolische Abhängigkeit der alkalischen Phosphatase-Aktivität von der rhBMP-2-Konzentration beobachtet wird, lässt sich schließen, dass es im Falle von BMP-2 eine enge Kopplung der oben beschriebenen Ereignisse gibt. Diese „Beharrlichkeit“ des BMP-2 Rezeptorsystems auf eine hyperbolische Funktion ähnlich einer klassischen Langmuirschen Bindungsisotherme der Zustandsfunktion scheint sowohl das allosterische als auch das multivalente Rezeptormodell auszuschließen.

5.3.3 Biologische Aktivität von immobilisiertem rhBMP-2 an Metalloberflächen

Der Nachweis der biologischen Aktivität der rhBMP-2-beschichteten Metallplättchen erfolgte in der Osteoblastenzelllinie MC3T3-E1 durch Induktion des grünfluoreszierenden Substrates für die alkalische Phosphatase mittels Epifluoreszenz.

Die Expression der alkalischen Phosphatase ist unter anderem ein Marker für die Differenzierung von Osteoblasten und Knochenmetabolismus [Aubin et al., 1995; Christenson, 1997]. Die hochauflösende, fluoreszenzbasierende Methode zur Lokalisierung endogener alkalischen Phosphatase beruht auf der Verwendung eines Substrates, des ELF-97 Phosphats, das ein intensiv grünfluoreszierendes Präzipitat auf der Seite der enzymatischen Aktivität ergibt [Cox & Singer, 1999].

Die biologische Aktivität des kovalent und nicht-kovalent immobilisierten rhBMP-2 auf Titanplasma-spray-beschichteten Titanlegierungs- (s. Abbildung 4.23), elektropolierten Titan- (s. Abbildung 4.24) und Cobaltchrommolybdän-Legierungsplättchen (s. Abbildung 4.25) konnte in einem direkten Vergleich mit den Kontrollplättchen, die kein rhBMP-2 tragen, gezeigt werden. An diesen rhBMP-2 immobilisierten Metalloberflächen erhält man eine signifikante Grünfluoreszenz, die durch die Reaktion des Substrates mit der alkalischen Phosphatase zustande kommt und für eine hohe biologische Aktivität charakteristisch ist.

Unabhängig von der Visualisierung der alkalischen Phosphatase-Reaktion wurde das Wachstum der MC3T3-E1-Zellen gleichzeitig durch eine Zellkernfärbung verfolgt, um bei den Negativkontrollen eine mangelnde Grünfluoreszenz wegen fehlender Zellenanzahl auszuschließen. Aus dem gleichen Grund wurde zusätzlich in den meisten Fällen eine Fluoreszenzfärbung des Zytoskeletts durchgeführt. Tatsächlich zeigen nur die mit rhBMP-2 immobilisierten Proben eine alkalische Phosphatase-Aktivität. Als Positivkontrolle dienten Metallplättchen mit angewachsenen MC3T3-E1-Zellen und Zugabe von löslichem rhBMP-2. Diese führten ebenfalls zu einer starken Grünfluoreszenz, bedingt durch die alkalische Phosphatase-Induktion in den Zellen. In diesem Fall war es essentiell, die Frage abzuklären, ob chemisch immobilisiertes rhBMP-2 einen gleich starken Effekt auf die Zellen ausübt wie das lösliche rhBMP-2.

Sowohl die mit 3-Aminopropyltriethoxysilan modifizierte, als auch die mit 1,1'-Carbonyldiimidazol aktivierte Titanoberfläche weisen im direkten Vergleich zu den Kontrollen ohne rhBMP-2 eine deutlich detektierbare Fluoreszenz auf (s. Abbildungen im Kapitel 4.3.3).

5.4 Biokompatibilität und Osteointegration von immobilisiertem rhBMP-2 *in vivo*

Bei den Implantaten für das Periostlappenexperiment in Kaninchen, das in Zusammenarbeit mit Dr. G. Voggenreiter, AG Prof. Dr. S. Assenmacher, Unfallklinik, im Universitätsklinikum Essen entstand, handelte es sich um rechteckige Titanplättchen, die chemisch unmodifiziert waren oder mit Chromschwefelsäure behandelt und chemisch modifiziert wurden. Vor der Implantation in die Tibia erwachsener Kaninchen wurden sie mit einem eigenen Knochenhautstreifen (Perioststreifen) umwickelt [Voggenreiter et al., 2001]. Hierbei handelte es sich um ein Modell für ektopische Knochenbildung.

In zahlreichen tierexperimentellen Studien, unter anderem in Unterkieferdefekten in Kaninchen wurde gezeigt, dass rhBMP-2 zur ektopischen Knochenbildung führt [Wang, 1993; Wozney, 1995]. BMP-2 eignete sich, um größere Knochendefekte in verschiedenen orthopädischen Tiermodellen und bei Knochenverlust aufgrund peridontaler Erkrankungen zu heilen.

Die Probenkörper wurden 4 Wochen nach Implantation entfernt und histologisch untersucht. Unter dem konventionellen Lichtmikroskop war kein histologischer Nachweis für eine Entzündungs- oder Makrophagenzellreaktion erbringbar (s. Abbildung 4.26). Die Implantate wurden mit einem Perioststreifen und einer dünnen Schicht von Kollagenbindegewebe mit spindelförmigen Zellen und wenigen Blutgefäßen umwickelt. Es wurden keine Unterschiede bezüglich der Gewebereaktion zwischen den verschiedenen Kontrollimplantaten erhalten. Keine lokale oder allgemeine (z.B. Fieber, Schock) immunoinflammatorische Reaktionen konnten bei den Untersuchungen beobachtet werden. Das zeigt, dass in allen 12 Fällen der Implantatprobenkörper sowohl Toxizitäts- bzw. Entzündungsausschluss als auch Sterilität gewährleistet wurden. Zusätzlich zeigte die Applikation sowohl des löslichen als auch des chemisch immobilisierten rhBMP-2 hervorragende Biokompatibilität.

Der wichtigste Befund in diesem Experiment war der Nachweis, dass immobilisiertes rhBMP-2 auf Implantatoberflächen seine biologische Aktivität beibehält. Im Periostlappenexperiment in Kaninchen handelte es sich um ein Modell ektopischer Knochenbildung, wobei die reine Menge des neu gebildeten Knochens abgeschätzt wird unabhängig von der Regenerierungskapazität des umgebenden Knochens. Die Implantation von Probenkörpern

in Muskeln ermöglicht die Untersuchung des eigentlichen osteoinduktiven Potentials eines Knochenersatzes oder Implantates [Voggenreiter et al., 2001]. In Kombination mit BMP-2 werden Proliferation und Differenzierung von Mesenchymal-Progenitorzellen auf der feinen Periostschicht und eine Differenzierung der Osteoblasten-Zelllinie initiiert. Das führt zur enchondralen Knochenbildung.

Die Applikation von löslichem rhBMP-2 führte in 8 von 8 Fällen und beim chemisch immobilisierten rhBMP-2 in 6 von 8 Fällen zu einer Knochenneubildung (s. Tabelle 4.29). In 2 von 8 Fällen des flüssig applizierten rhBMP-2 wurde eine fibröse Kapselbildung erhalten (s. Abbildung 4.27), dagegen zeigten alle 6 von 6 knocheninduzierende rhBMP-2-beschichtete Implantate einen direkten Kontakt zu dem neu gebildeten Knochengewebe (wie in Abbildung 4.28). Die Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass das lösliche rhBMP-2 nach Applikation in der Periosttasche eventuell durch Diffusion, Abbau oder Bindung an andere Strukturen und Proteine verloren geht. In diesem Fall ist es denkbar, dass die biologische Aktivität des löslichen rhBMP-2 erniedrigt wird. Die Ergebnisse zeigen, dass die Menge und Qualität des induzierten Knochens sowohl beim löslichen als auch beim immobilisierten rhBMP-2 nahezu identisch sind.

Tatsächlich führen 25 % der Fälle mit instilliertem rhBMP-2, selbst in kleinen Mengen von 1 µg rhBMP-2 appliziert, zur Gefahr der Bildung einer fibrösen Grenzschicht. Dieses Risiko scheint beim immobilisierten rhBMP-2 aufgrund der zunehmenden Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat stark minimiert zu sein.

In einem „push-out“ Experiment in Femurkondylen von Hunden konnte die mechanische Fixierung und die Knochenbildung nach 6 Wochen gezeigt werden [Lind et al., 2000]. Osteogenes Protein 1 (OP-1, BMP-7) in Kombination mit einer Kollagenmatrix wies eine viel höhere Knochenbildung in einem 3 mm-Spalt als Kollagen ohne OP-1 auf. Die Knochenbildung war dreimal höher bei den Kollagen / OP-1-Implantaten im Vergleich zu den leeren Kontrollen. Kein Unterschied wurde zwischen den Kollagen / OP-1-Implantaten und dem unbehandelten Kollagen beobachtet.

Adsorbiertes rhBMP-2 kann vom Implantat langsam freigesetzt werden und macht damit die Oberfläche chemotaktisch aktiv, um Osteoprogenitorzellen zur Knochenbildung anzuziehen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Oberfläche, die gleichzeitig kovalent und nicht-kovalent immobilisiertes rhBMP-2 trägt (chemotaktisch-juxtakrin), ebenfalls sehr biokompatibel ist und

sich als geeignet für verbesserte Knocheninduktion in einem Periostlappen-Heilungsmodell erweist.

Nach dem Periostlappenexperiment in Kaninchen wurde die biologische Aktivität, d.h. das osteoinduktive Potential von rhBMP-2, in einem Spaltüberbrückungsverfahren im distalen Femurkondylus im Schaf untersucht. Hier handelte es sich um Titanplasmaspray-beschichtete Titanimplantate, die im Femurkondylus eines Schafes eingesetzt wurden und nach 9 Wochen Einwirkungszeit explantiert wurden. Diese Pilotstudie ergab, dass eine starke Knocheninduktion unmittelbar um die mit rhBMP-2-beschichteten Implantate erhalten wurde. Im Vergleich dazu zeigt ein Kontrollimplantat ohne rhBMP-2 nur eine sehr geringe Knochenneubildung. Querschnitte von Knochenimplantaten nach Entfernung vom Schafoberschenkelknochen zeigen eine starke Induktion von spongiösem bzw. kompaktem Knochen an Titanimplantaten mit adsorptiv bzw. kovalent immobilisiertem rhBMP-2 (s. Abbildung 4.29). Die Titanimplantate, die mit rhBMP-2 beschichtet wurden, zeigen eine vollständige Osteointegration [Jennissen, 2002; Jennissen et al., 2000].

In einem Spaltüberbrückungsverfahren wurde ursprünglich ein Spalt von 1 mm initiiert, der mit neu gebildetem Knochengewebe überbrückt werden sollte. Ein Querschnitt eines mit Brushit (Dikalziumphosphat Dihydrat, $\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) beschichteten Titanprobenkörpers weist nach vierwöchiger Implantation einen Spalt von 300-400 μm um den Implantatzylinderkörper auf. Im Gegensatz dazu zeigt ein Titanplasmaspray-beschichteter Titanprobenkörper, der mit Chromschwefelsäure (CSS) geätzt, mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) modifiziert und mit rhBMP-2 biologisiert wurde (Ti-CSS-APS-rhBMP-2) eine komplette Überbrückung des ursprünglichen Spaltes mit neuem Knochengewebe um das Implantat herum (s. Abbildung 4.30). Eine komplette Osteointegration bedingt durch den direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat und vollständige Überbrückung des Spaltes erfolgte innerhalb von 9 Wochen.

Hier konnte das Modell der Herstellung einer chemotaktisch-juxtakrinen Oberfläche Anwendung finden [Jennissen, 2000b; Jennissen et al., 1999]. Zuerst lockt die modifizierte Oberfläche das Ziel d.h. die Knochenzellen an und in einem weiteren Schritt werden die Zellen auf eine besondere Weise über einen längeren Zeitraum durch die funktionelle Leistung der Bindung auf der Implantatoberfläche stimuliert. Auf diese Weise kann eine verbesserte Langzeit-Adhäsion zum Implantat erfolgen.

In diesem Fall wird ein rhBMP-2 immobilisiertes mit einem Brushit-beschichtetes Implantat verglichen anstatt mit einem unbeschichteten, inerten Implantat. Das stellt einen besonderen anspruchsvollen Vergleich für die rhBMP-2-beschichtete Oberfläche dar, weil Brushit mit der Zeit zu Apatit umgesetzt wird und diese Brushit-Schicht somit als eine biologisch aktive Oberfläche mit knocheninduzierendem Potential klassifiziert wird [Kumar et al., 1999].

Osteoinduktion durch Freisetzung von rhBMP-2 von thermoreversiblen Polymeren oder als Injektion auf das Zielgewebe in der Applikationsstelle wurde von Uludag et al. beschrieben [Uludag et al., 1999; Uludag et al., 2001]. Es wurde gezeigt, dass rhBMP-2 mit einer höheren Implantatretention zu einer stärkeren Knochenbildung führte. Es sind zwei Komponenten, die die lokale Protein-Pharmakokinetik und damit die osteoinduktive Aktivität des implantierten rhBMP-2 beeinflussen: Das Protein und der Träger (Biomaterial). Im Hinblick auf die letzten Literatur-Studien und die Herstellung chemotaktisch-juxtakriner Oberflächen mit rhBMP-2 und auch die Induktion von spongiösem bzw. kompaktem Knochen tritt die komplexe Natur der Wirkung der biologischen Aktivität des immobilisierten rhBMP-2 vom jeweiligen Trägermaterial in Erscheinung. Die Entwicklung eines Trägers zur kontrollierten Freisetzung von rhBMP-2 mit einer verbesserten Knochen-Regenerationsaktivität ist eine Herausforderung. Beim Vergleich zweier verschiedener Trägermaterialien beschreiben Yamamoto et al. [Yamamoto et al., 2003], dass die alkalische Phosphatase-Aktivität als Nachweis ektopischer Knochenbildung signifikant höher bei BMP-2-haltigen Hydrogelen als bei BMP-2-haltigen Kollagenschwämmen ist.

6 Zusammenfassung

Im Bereich der Biomaterialien und insbesondere der Implantatentwicklung und –herstellung ist die genaue Kenntnis der Wechselwirkungen zwischen Implantatoberfläche und Zielgewebe essentiell. Die Untersuchung der einzelnen Schichten und ablaufenden Prozesse, ausgehend von der Biologisierungsschicht mit Proteinen auf der modifizierten Oxidschicht eines Metallimplantates, bis hin zur Freisetzung des Proteins und zu seiner biologischen Aktivität, dient zum besseren Verständnis der Wirkung im komplexen System nämlich im Organismus. Solche physikalisch-chemischen und biochemischen Untersuchungen lassen sich durch tierexperimentelle Daten für weitere klinische Anwendungen optimal ergänzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Metallimplantatoberflächen aus Reintitan, Titanlegierung, rostfreiem Stahl und Cobaltchrommolybdänlegierung untersucht. Die Implantatherstellung lässt sich in drei Schritten beschreiben: (i) Herstellung einer Grundierungsschicht durch Säureätzen, (ii) Funktionalisierung der Metalloxidschicht durch chemische Modifikation (iii) Herstellung einer Biologisierungsschicht durch Immobilisierung von Proteinmolekülen.

Die Benetzbarkeit der Oberflächen mit Wasser spielt in biologischen Systemen gerade im Bereich der Biomaterialien eine übergeordnete Rolle. Die verwendeten Metallimplantate wurden mit Chromschwefelsäure behandelt, um den Oberflächen bioadhäsive Eigenschaften zu verleihen. Hierbei sind die physikalisch-chemischen Oberflächenmessungen mit Kontaktwinkeln unter 10° und abwesender oder geringer Hysterese charakteristisch für sehr hydrophile und homogene Eigenschaften. Auch nach Lagerung der Metalle über einen Zeitraum von 50 Tagen in Methanol wurden vergleichbar niedrige Kontaktwinkel unter 10° und abwesender Hysterese gemessen. Das deutet auf die Stabilität der Metalloxidschicht hin. Ferner zeigen die behandelten Oberflächen eine nanostrukturierte passive Oxidschicht mit einer Dicke von 50 – 150 nm bei Titan und 10 – 50 nm bei Stahl. Aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sind „blumenkohlartige“ Oberflächenstrukturen bei Titan und kubisch-polygonale geometrische Strukturen bei Stahl erkennbar. Es handelt sich um eine unzerbrechliche, nicht leicht zu entfernende Oxidschicht, wie sich aus den Rockwell-Experimenten schließen lässt. Tatsächlich zeigen beide untersuchten oxidierten

Titan- und Stahloberflächen eine hohe Adhäsion und Plastizität, die der ursprünglichen Metalloberfläche sehr ähnelt.

Zur Funktionalisierung der metallischen Implantate wurden zwei chemische Modifikationsreaktionen bevorzugt: Zuerst wurden die oxidierten Oberflächen durch kovalente Kopplung des Aminopropyltriethoxysilans (APS) umgesetzt und in einem weiteren Schritt mit dem Kopplungsagens 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviert. Auf diese Weise konnten die Proteinmoleküle entweder mittels hydrophober Wechselwirkungen adsorbiert (auf APS-Oberflächen) oder kovalent gebunden werden (auf APS-CDI-Oberflächen). Im letzteren Fall ist sowohl die adsorbierte als auch die kovalent gebundene Population vorhanden.

Die Immobilisierung des Modellproteins Ubiquitin und des knocheninduzierenden Proteins rhBMP-2 auf chemisch modifizierten Metalloberflächen wurde mittels radioaktiv markierten Proteinen quantifiziert. Ubiquitin wird in größeren Mengen auf Titan immobilisiert als rhBMP-2. Das hängt mit der Zugänglichkeit der reaktiven Gruppen und der Größe des Proteinmoleküls zusammen. Ubiquitin ist ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 8.5 kDa und BMP-2 von 26 kDa. Während 2.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ubiquitin auf elektropolierten, Chromschwefelsäure-behandelten Titanoberflächen adsorbiert und 5.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ kovalent gebunden werden, betragen die entsprechenden Beladungsmengen für rhBMP-2 in vergleichbarer Konzentration der Inkubationslösung 0.25 und 0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. In der Literatur sind keine Messwerte zum Vergleich bezüglich der Quantifizierung dieser immobilisierten Proteinmengen auf Titan vorhanden.

Aus den Desorptionskinetiken lässt sich schließen, dass sowohl Ubiquitin als auch rhBMP-2 sehr hohe Bindungsaffinitäten auf den modifizierten Metalloberflächen zeigen. Die erhaltenen Halbwertszeiten von ca. 30 – 40 d für das adsorbierte und für das kovalent gebundene rhBMP-2 auf Titan entsprechen einer langsamen Freisetzung. Das könnte den Einsatz der rhBMP-2-beschichteten Metalloberflächen als Langzeitimplantate sehr begünstigen.

Der Ausschluß der Toxizität sowohl des löslichen als auch des immobilisierten rhBMP-2 ist ein wichtiges Kriterium für seine Biokompatibilität. Die Toxizitätsprüfung des löslichen rhBMP-2 *in vitro* durch Ermittlung der Anzahl der Mikrokerne und der Zellteilung führte zu dem Schluß, dass rhBMP-2 keine gentoxische Wirkung auf die untersuchten Zellen aufwies. Der Ausschluß der Toxizität der chemisch modifizierten und der rhBMP-2-beschichteten

Titanimplantate erfolgte *in vivo* im Periostlappentest in Kaninchen. Hierbei wurden in keinem der 12 implantierten Probenkörper toxische oder Entzündungsreaktionen beobachtet.

Der Nachweis der biologischen Aktivität des selbsthergestellten und aufgereinigten rhBMP-2 erfolgte *in vitro* und *in vivo*. Bei den *in vitro* Experimenten wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität in der MC3T3-E1 Osteoblasten Zelllinie gemessen. Die erforderlichen rhBMP-2 Konzentrationen für eine halbmaximale Sättigung $K_{0.5}$ liegen bei 17 nM (0.4 µg/ml) und die Zellantwort erreicht bei 100 nM ein Plateau. Das zeigt, dass bei höheren rhBMP-2 Konzentrationen keine weiteren biologischen Effekte erwartet werden können. Für die *in vivo* Versuche wurden der Periostlappentest in Kaninchen und das Spaltüberbrückungsverfahren im Schaf angewandt.

Im Periostlappenexperiment in Kaninchen handelte es sich um ein Modell ektopischer Knochenbildung, wobei die reine Menge des neu gebildeten Knochens abgeschätzt wird unabhängig von der Regenerierungskapazität des umgebenden Knochens. In 2 von 8 Fällen des löslich injizierten rhBMP-2 wurde eine fibröse Kapselbildung festgestellt, dagegen wiesen alle 6 von 6 knocheninduzierende rhBMP-2-beschichtete Implantate einen direkten Kontakt zu dem neu gebildeten Knochengewebe auf. Das lösliche rhBMP-2 kann nach Applikation in der Periosttasche eventuell durch Diffusion, Abbau oder Bindung an andere Strukturen und Proteinen verloren gehen. Die Menge und Qualität des induzierten Knochens ist sowohl beim löslichen als auch beim immobilisierten rhBMP-2 nahezu identisch. Tatsächlich führen 25 % der Fälle mit instilliertem löslichen rhBMP-2, selbst in kleinen Mengen von 1 µg rhBMP-2 zur Gefahr der Bildung einer fibrösen Grenzschicht. Dieses Risiko scheint bei immobilisiertem rhBMP-2 aufgrund der zunehmenden Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat stark minimiert zu sein.

Das osteoinduktive Potential von rhBMP-2 wurde in einem Spaltüberbrückungsverfahren im distalen Femurkondylus im Schaf untersucht. Querschnitte von Knochenimplantaten nach Entfernung vom Schafoberschenkelknochen zeigen nach 9 Wochen eine starke Induktion von spongiösem bzw. kompaktem Knochen an Titanimplantate mit adsorptiv bzw. kovalent immobilisiertem rhBMP-2. Im Vergleich dazu zeigt ein Kontrollimplantat ohne rhBMP-2 nur eine sehr geringe Knochenneubildung. Ein Querschnitt eines mit Brushit ($\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) beschichteten Titanprobenkörpers weist nach vierwöchiger Implantation einen Spalt von 300-400 µm um den Implantatzylinderkörper auf. Im Gegensatz dazu zeigt ein titanplasma-spray-beschichteter Titanprobenkörper, der mit Chromschwefelsäure (CSS) geätzt, mit

Aminopropyltriethoxysilan (APS) modifiziert und mit rhBMP-2 biologisiert wurde (Ti-CSS-APS-rhBMP-2) eine komplette Überbrückung des ursprünglichen Spaltes mit neuem Knochengewebe um das Implantat herum. Hierbei ist eine komplette Osteointegration bedingt durch den direkten Kontakt zwischen Knochen und Implantat und vollständige Überbrückung des Spaltes innerhalb von 9 Wochen erkennbar.

7 Literatur

1. Symbolism and terminology in enzyme kinetics: recommendations 1981. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). *Arch.Biochem.Biophys.* **224** (1983)
2. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Corrections to recommendations 1983. *Eur.J.Biochem.* **213**, 2 (1-4-1993)
3. Adamson, A. W. Chemisorption and catalysis. *Physical Chemistry of Surfaces*, 649-652 (1967)
4. Ahluwalia, A., De Rossi, D., Ristori, C., Schirone, A. & Serra, G. A comparative study of protein immobilization techniques for optical immunosensors. *Biosens.Bioelectron.* **7**, 207-214 (1992)
5. Andrade, J. D., Smith, L. M. & Gregonis The Contact Angle and Interface Energetics. in "Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers" **1**, 249-292 (1985)
6. Atkins,PW, *Physikalische Chemie, 2. korr. Nachdruck der 1. Auflage 1990*(1987), p. 704-726.
7. Aubin, J. E., Liu, F., Malaval, L. & Gupta, A. K. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* **17**, 77S-83S (1995)
8. Aylward/Findlay, *Datensammlung Chemie in SI-Einheiten, 2. neu bearbeitete Auflage*, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1981,(1981), p. 125.
9. Baier, R. E. The role of surface energy in thrombogenesis. *Bull.N.Y.Acad.Med.* **48**, 257-272 (1972)
10. Ball, E., Karlik, C. C., Beall, C. J., Saville, D. L., Sparrow, J. C., Bullard, B. & Fyrberg, E. A. Arthrin, a myofibrillar protein of insect flight muscle, is an actin-ubiquitin conjugate. *Cell* **51**, 221-228 (1987)
11. Barthlott, W. & Neinhuis, C. Purity of the scared lotus, or escape from contamination in biological surface. *Planta* **202**, 1-8 (1997)
12. Bartling, G. J., Brown, H. D. & Chattopadhyay, S. K. *Nature (London)* **243**, 342 (1973)
13. Bastians, H., Topper, L. M., Gorbsky, G. L. & Ruderman, J. V. Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins. *Mol.Biol.Cell* **10**, 3927-3941 (1999)

14. Bessho, K., Kusumoto, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Ogawa, Y., Tani, Y. & Iizuka, T. Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br.J.Oral Maxillofac.Surg.* **37**, 2-5 (1999)
15. Bethell, G. S., Ayers, S., Hancock, W. S. & Hearn, M. T. W. A novel method of activation of cross-linked agaroses with 1,1'-carbonyldiimidazole which gives a matrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups. *Journal of Biological Chemistry* **254**, No. 8, 2572-2574 (1979)
16. Bierbaum, S., Beutner, R., Hanke, T., Scharnweber, D., Hempel, U. & Worch, H. Modification of Ti6Al4V surfaces using collagen I, III, and fibronectin. I. Biochemical and morphological characteristics of the adsorbed matrix. *J.Biomed.Mater.Res.* **67A**, 421-430 (2003)
17. Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G. & Pagano, M. Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell* **115**, 71-82 (2003)
18. Boerio, F. J., Amorgan, L. & Cheng, S. Y. The Structure of γ -Aminopropyltriethoxysilane Films on Iron Mirrors. *J Colloid Interface Sci* **73**, 416-424 (1980)
19. Bolton, A. E. & Hunter, W. M. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. *Biochem J* **133**, 529-539 (1973)
20. Bond, U. & Schlesinger, M. J. Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* **5**, 949-956 (1985)
21. Boyne, P. J., Marx, R. E., Nevins, M., Triplett, G., Lazaro, E., Lilly, L. C., Alder, M. & Nummikoski, P. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int.J.Periodontics.Restorative.Dent.* **17**, 11-25 (1997)
22. Buescher, R. Studienarbeit, "Mechanische Stabilität von chemisch und elektrochemisch modifizierten Oberflächen für medizinische Anwendungen", FB 12 Maschinenwesen, Werkstofftechnik, Universität Essen, Essen, Germany, 1999(1999)
23. Buescher, R., Jennissen, H. P., Chatzinikolaidou, M. & Fischer, A. Characterization of Wet-Chemically Nanostructured Stainless Steel Surfaces. *Mat.Res.Soc.Symp.Proc. Vol.* **676**, 14.1-14.6 (2001)
24. Cantor, C.R., P R Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part 2, Techniques for the Study of Biological Structure and Function*, W.H. Freeman and Company, San Francisco,(1980), p. 433-451.

25. Carcamo, J., Weis, F. M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J. L., Attisano, L. & Massague, J. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol.Cell Biol.* **14**, 3810-3821 (1994)
26. Chang, H., Brown, C. W. & Matzuk, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr.Rev.* **23**, 787-823 (2002)
27. Chatzinikolaidou, M., Laub, M., Rumpf, H. & Jennissen, H. P. Biocoating of electropolished and ultra-hydrophilic titanium and cobalt chromium molybdenum alloy surfaces with proteins. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **33**, 720-727 (2002)
28. Chatzinikolaidou, M., Zumbink, T. & Jennissen, H. P. Stability of surface-enhanced ultrahydrophilic metals as a basis for bioactive rhBMP-2 surfaces. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **34**, 1106-1112 (2003)
29. Chiang, C. H., Liu, N.-I. & Koenig, J. L. Magic-Angle Crosspolarization Carbon 13 NMR Study of Aminosilane Coupling Agents on Silica Surfaces. *J Colloid Interface Sci* **86**, 26-34 (1982)
30. Christenson, R. H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin.Biochem.* **30**, 573-593 (1997)
31. Chung, C. Y., Iida-Klein, A., Wyatt, L. E., Rudkin, G. H., Ishida, K., Yamaguchi, D. T. & Miller, T. A. Serial passage of MC3T3-E1 cells alters osteoblastic function and responsiveness to transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-2. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **265**, 246-251 (1999a)
32. Chung, C. Y., Iida-Klein, A., Wyatt, L. E., Rudkin, G. H., Ishida, K., Yamaguchi, D. T. & Miller, T. A. Serial passage of MC3T3-E1 cells alters osteoblastic function and responsiveness to transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-2. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **265**, 246-251 (1999b)
33. Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L. & Hershko, A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**, 1365-1368 (1980)
34. Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K. & Rueger, D. C. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7 Induces Healing in a Canine Long-Bone Segmental Defect Model. *Clin Orthop* **301**, 302-312 (1994a)
35. Cook, S. D., Dalton, J. E., Tan, E. H., Whitecloud III, T. S. & Rueger, D. C. In Vivo Evaluation of Recombinant Human Osteogenic Protein (rhOP-1) Implants as a Bone Graft Substitute for Spinal Fusions. *Spine* **19**, 1655-1663 (1994b)

36. Cook, S. D., Dalton, J. E., Tan, E. H., Whitecloud III, T. S. & Rueger, D. C. In Vivo Evaluation of Recombinant Human Osteogenic Protein (rhOP-1) Implants As a Bone Graft Substitute for Spinal Fusions. *Spine* **19**, 1655-1663 (1994c)
37. Cook, S. D., Wolfe, M. W., Salkeld, S. L. & Rueger, D. C. Effect of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on Healing of Segmental Defects in Non-Human Primates. *J Bone Joint Surg (AM)* **77-A**, 734-750 (1995)
38. Corsel, J. W., Willems, G. W., Kop, J. M. M., Cuypers, P. A. & Hermens, W. T. The role of intrinsic binding rate and transport rate in the adsorption of prothrombin, albumin and fibrinogen to phospholipid bilayers. *J Colloid Interface Sci* **111**, 544-554 (1986)
39. Cox, W. G. & Singer, V. L. A high-resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. *J.Histochem.Cytochem.* **47**, 1443-1456 (1999)
40. Cuypers, P. A., Hermens, W. T. & Hemker, H. C. Ellipsometry as a tool to study protein films at liquid-solid interfaces. *Anal Biochem* **84**, 56-67 (1978)
41. Daino, H., Shibayama, H., Machii, T. & Kitani, T. Extracellular ubiquitin regulates the growth of human hematopoietic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **223**, 226-228 (1996)
42. Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y. & Davies, D. R. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* **257**, 369-373 (17-7-1992)
43. Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884-890 (2003)
44. Dopp, E., Saedler, J., Stopper, H., Weiss, D. G. & Schiffmann, D. Mitotic disturbances and micronucleus induction in Syrian hamster embryo fibroblast cells caused by asbestos fibers. *Environ.Health Perspect.* **103**, 268-271 (1995)
45. Dopp, E., Schuler, M., Schiffmann, D. & Eastmond, D. A. Induction of micronuclei, hyperdiploidy and chromosomal breakage affecting the centric/pericentric regions of chromosomes 1 and 9 in human amniotic fluid cells after treatment with asbestos and ceramic fibers. *Mutat.Res.* **377**, 77-87 (1997)
46. Duggirala, S. S., Mehta, R. C. & DeLuca, P. P. Interaction of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with poly(d,l lactide-co-glycolide) microspheres. *Pharm.Dev.Technol.* **1**, 11-19 (1996)
47. Durner, J. & Boeger, P. Ubiquitin in the Prokaryote *Anabaena variabilis*. *J Biol Chem* **270**, 3720-3725 (1995)

48. Er-El, Z., Zaidenzaig, Y. & Shaltiel, S. Hydrocarbon-coated Sepharoses. Use in the Purification of Glycogen Phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun* **49**, 383-390 (1972)
49. Evans, E. A. Self-Decomposition of Radiochemicals. *Review* **16**, 65-70 (1976)
50. Everett, D. H. Adsorption hysteresis. *The Solid-Gas Interface* **2**, 1055-1113 (1967)
51. Fischer, U., Hempel, U., Becker, D., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Worch, H. & Wenzel, K. W. Transforming growth factor beta1 immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity. *Biomaterials* **24**, 2631-2641 (2003)
52. Freiberg, G., Mesezar, A. D., Huang, H., Hong, J. Y. & Liebman, S. W. Characterization of novel rad6/ubc2 ubiquitin-conjugating enzyme mutants in yeast. *Curr.Genet.* **37**, 221-233 (2000)
53. Freundlich, H. ueber die Adsorption in Loesung. *Z Physikal Chem* **57**, 385-470 (1907)
54. Frieauff, W., Potter-Locher, F., Cordier, A. & Suter, W. Automatic analysis of the in vitro micronucleus test on V79 cells. *Mutat.Res.* **413**, 57-68 (1998)
55. Gehrke, P. P. & Jennissen, H. P. ATP-dependent Proteolysis and the Role of Ubiquitin in Rabbit Cardiac Muscle. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **368**, 691-708 (1987)
56. Glotzer, M., Murray, W. & Kirschner, M. W. Cyclin is Degraded by the Ubiquitin Pathway. *Nature* **349**, 132-138 (1991)
57. Goumans, M. J. & Mummery, C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int.J.Dev.Biol.* **44**, 253-265 (2000)
58. Grushka, E. & Kikta, E. J. Chemically bonded stationary phases in chromatography. *Anal.Chem.* **49**, 1004A-1014A(1977)
59. Hansen, J., Ely, K., Horsley, D., Herron, J., Hlady, V. & Andrade, J. D. The adsorption of lysozymes: A model system. *Makromol Chem, Macromol Symp* **17**, 135-154 (1988)
60. Hay, E., Hott, M., Graulet, A. M., Lomri, A. & Marie, P. J. Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J.Cell Biochem.* **72**, 81-93 (1999)
61. Hayward, D. O. & Trapnell, B. M. W. Adsorption Isotherms. in *"Chemisorption"*, 159-193 (1964)

62. Hazama, M., Aono, A., Ueno, N. & Fujisawa, Y. Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **209**, 859-866 (1995)
63. Hearn, M. T. W. *Meth.Enzymol.* **135**, 102 (1987)
64. Heddle, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat.Res.* **18**, 187-190 (1973)
65. Henchoz, S., Chi, Y., Catarin, B., Herskowitz, I., Deshaies, R. J. & Peter, M. Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Far1p in budding yeast. *Genes Dev.* **11**, 3046-3060 (1997)
66. Henrich, S., Cameron, A., Bourenkov, G. P., Kiefersauer, R., Huber, R., Lindberg, I., Bode, W. & Than, M. E. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat.Struct.Biol.* **10**, 520-526 (2003)
67. Hermanson,GT, A K Mallia, P K Smith, *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego, California,(1992), p. 64-65.
68. Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. *J Biol Chem* **258**, 8206-8214 (1983)
69. Hogan, B. L. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **6**, 432-438 (1996)
70. Hong, L., Tabata, Y., Yamamoto, M., Miyamoto, S., Yamada, K., Hashimoto, N. & Ikada, Y. Comparison of bone regeneration in a rabbit skull defect by recombinant human BMP-2 incorporated in biodegradable hydrogel and in solution. *J.Biomater.Sci.Polym.Ed* **9**, 1001-1014 (1998)
71. Horsley, D., Herron, J., Hlady, V. & Andrade, J. D. Fluorescence quenching of adsorbed hen and human lysozymes. *Langmuir* **7**, 218-222 (1991)
72. Huetz, P. H., Ball, V., Voegel, J. C. & Schaaf, P. Exchange Kinetics for a Heterogeneous Protein System on a Solid Surface. *Langmuir* **11**, 3145-31 (1995)
73. Huh, C. & Mason, S. A rigorous theory of ring tensiometry. *Colloid and Polymer Sci* **253**, 566(1975)
74. Ishida, T. & Koenig, J. L. A fourier-transform infrared Spectroscopic Study of the hydrolytic Stability of Silane Coupling Agents on E-Glass Fibers. *J Polym Sci* **18**, 1931-1943 (1980)

75. Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T. K., Kato, M. & Miyazono, K. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J.Biol.Chem.* **275**, 6075-6079 (2000)
76. IUPAC, I. U. B. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. *Eur J Biochem* **138**, 9-37 (1984)
77. Jennissen, H. P. Evidence for Negative Cooperativity in the Adsorption of Phosphorylase b on Hydrophobic Agaroses. *Biochemistry* **15**, 5683-5692 (1976)
78. Jennissen, H. P. Immobilization of residues on agarose gels: Effects on protein adsorption isotherms and chromatographic parameters. *J Chromatogr* **215**, 73-85 (1981)
79. Jennissen, H. P. Zum Mechanismus der Protein Adsorption an hydrophoben Geloberflaechen. in "Aufarbeitung biologischer Medien /Physik.-chem.Grundl., Verlag (1984)
80. Jennissen, H. P. Protein Adsorption Hysteresis. in "Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers" Vol.2, *Protein Adsorption* **2**, 295-320 (1985)
81. Jennissen, H. P. Protein binding to two-dimensional hydrophobic binding-site lattices: Sorption kinetics of phosphorylase b on immobilized butyl residues. *J Colloid Interface Sci* **111**, 570-586 (1986)
82. Jennissen, H. P. General Aspects of Protein Adsorption. *Makromol Chem, Macromol Symp* **17**, 111-134 (1988)
83. Jennissen, H. P. Proteinadsorption auf alkylsubstituierten Oberflaechen. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft fuer Physik.Chemie*, 949-956 (1989)
84. Jennissen, H. P. Ubiquitin and the Enigma of Intracellular Protein Degradation. *Eur J Biochem* **231**, 1-30 (1995)
85. Jennissen, H. P. PCT Patent WO9926674A2, Verfahren zur Immobilisierung von Mediatormolekülen auf anorganischen und metallischen Implantatmaterialien; Prioritätsdatum 24 Nov. 1997. *Europäisches Patentamt München*, 1-29 (1999)
86. Jennissen, H. P. Hydrophobic Interaction Chromatography: the critical hydrophobicity approach. *International Journal of Biochromatography* **5**, 131-163 (2000a)
87. Jennissen, H. P. Verträglichkeit groß geschrieben. *Essener Unikate* **13**, 78-93 (2000b)

88. Jennissen, H. P. Ultra-hydrophile metallische Biomaterialien. *Biomaterialien* **2**, 45-53 (2001)
89. Jennissen, H. P. Accelerated and improved osteointegration of implants biocoated with bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). *Ann.N.Y.Acad.Sci* **961**, 139-142 (2002)
90. Jennissen, H. P. & Botzet, G. Protein binding to two-dimensional hydrophobic binding-site lattices:adsorption hysteresis on immobilized butyl-residues. *Int J Biol Macromol* **1**, 171-179 (1979)
91. Jennissen, H. P., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M., Lichtinger, T. & Müller, R. Modification of Metal Surfaces and Biocoating of Implants with Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). *DVM Bericht* **313**, 127-140 (2000)
92. Jennissen, H. P., Demiroglou, A. & Logemann, E. Studies on the mechanism of protein adsorption on hydrophobic agaroses. In: "*Affinity Chromatography and Related Techniques*", *Analytical Chemistry Symposia Series, Vol 9*, 39-49 (1982)
93. Jennissen, H. P. & Heilmeyer-Jr, L. M. G. General aspects of hydrophobic chromatography. Adsorption and elution characteristics of some skeletal muscle enzymes. *Biochemistry* **14**, 754-760 (1975)
94. Jennissen, H. P. & Zumbrink, T. A novel nanolayer biosensor principle. *Biosens.Bioelectron.* **19**, 987-997 (2004)
95. Jennissen, H. P., Zumbrink, T., Chatzinikolaidou, M. & Steppuhn, J. Biocoating of implants with mediator molecules: Surface enhancement of metals by treatment with chromosulfuric acid. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **30**, 838-845 (1999)
96. Johnson-Jr, R. E. & Dettre, R. H. Wettability and Contact Angles. in *Surface and Colloid Science, Wiley-Interscience, New York* **2**, 85-153 (1969)
97. Kasemo, B. & Lausmaa, J. Biomaterials from a surface science perspective. *Surface Characterization of Biomaterials*, 1-12 (1988)
98. Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A. & Suda, T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J.Cell Biol.* **127**, 1755-1766 (1994)
99. Kawabata, M., Imamura, T. & Miyazono, K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 49-61 (1998)

100. King, G. N., King, N. & Hughes, F. J. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo. *J.Periodontal Res.* **33**, 226-236 (1998)
101. Kinkel, J. N. & Unger, K. K. Role of Solvent and Base in the Silanization Reaction of Silicas for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr* **316**, 193-200 (1984)
102. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Jr., Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der, Hude W. & Wakata, A. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environ.Mol.Mutagen.* **35**, 167-172 (2000)
103. Kishida, A., Ueno, Y., Fukudome, N., Yashima, E., Maruyama, I. & Akashi, M. Immobilization of human thrombomodulin onto poly(ether urethane urea) for developing antithrombogenic blood-contacting materials. *Biomaterials* **15**, 848-852 (1994a)
104. Kishida, A., Ueno, Y., Maruyama, I. & Akashi, M. Immobilization of human thrombomodulin on biomaterials: evaluation of the activity of immobilized human thrombomodulin. *Biomaterials* **15**, 1170-1174 (1994b)
105. Kumar, M., Xie, J., Chittur, K. & Riley, C. Transformation of modified brushite to hydroxyapatite in aqueous solution: effects of potassium substitution. *Biomaterials* **20**, 1389-1399 (1999)
106. Kwok, D. Y., Li, A. & Neumann, A. W. Low-rate dynamic contact angles on poly(methyl methacrylate/ethyl methacrylate, 30/70) and the determination of solid surface tensions. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **37**, 2039-2051 (15-8-1999)
107. Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J.Mol.Biol.* **157**, 105-132 (1982)
108. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970)
109. Laffargue, P., Hildebrand, H. F., Rtaimate, M., Frayssinet, P., Amoureux, J. P. & Marchandise, X. Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects. *Bone* **25**, 55S-58S (1999)
110. Lakowicz, JR, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2 Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York,(1999), p. 10.
111. Langmuir, I. Monolayers on solids. *J Chem Soc London*, 511-543 (1940)

112. Larsson, C., Thomsen, P., Lausmaa, J., Rodahl, M., Kasemo, B. & Ericson, L. E. Bone response to surface modified titanium implants: studies on electropolished implants with different oxide thicknesses and morphology. *Biomaterials* **15**, 1062-1074 (1994)
113. Laub, M. & Jennissen, H. P. Ubiquitination of Myosin Light Chains. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **372**, 704 (1991)
114. Laub, M. & Jennissen, H. P. 3D-rapid prototyping as a new tool for modelling protein-protein interaction. *Faseb Journal* **17**, A586-A586 (2003)
115. Laub, M., Seul, T., Schmachtenberg, E. & Jennissen, H. P. Molecular modelling of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) by 3D-rapid prototyping. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **32**, 926-930 (2001)
116. Lehrer, S. S. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry* **10**, 3254-3263 (1971)
117. Lind, M., Overgaard, S., Song, Y., Goodman, S. B., Bunger, C. & Soballe, K. Osteogenic protein 1 device stimulates bone healing to hydroxyapatite-coated and titanium implants. *J.Arthroplasty* **15**, 339-346 (2000)
118. Lippert, T. H., Schneider-Zeh, S., Voelter, W., Gehrke, P. & Jennissen, H. P. Ueber die uterusrelaxierenden Eigenschaften von Ubiquitin und Relaxin. *Arch Gynecol Obstet* **242**, 742-725 (1987)
119. Liu, F., Ventura, F., Doody, J. & Massague, J. Human Tzpe II Receptor for Bone Morphogenetic Proteins (BMPs): Extension of the Two Kinase Receptor Model to the BMPs. *Mol Cell Biol* **15**, 3479-3486 (1995)
120. Liu, J. & Hlady, V. Chemical Pattern on Silica Surface Prepared by UV Irradiation of 3-Mercaptopropyltriethoxy Silane Layer: Surface Characterization and Fibrinogen Adsorption, 1-30 (1996)
121. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951)
122. MacDonald, D. E., Markovic, B., Allen, M., Somasundaran, P. & Boskey, A. L. Surface analysis of human plasma fibronectin adsorbed to commercially pure titanium materials. *J.Biomed.Mater.Res.* **41**, 120-130 (1998)
123. Madura, K., Prakash, S. & Prakash, L. Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD6 that encodes a ubiquitin conjugating enzyme, increases in

- response to DNA damage and in meiosis but remains constant during the mitotic cell cycle. *Nucleic Acids Res* **18**, 771-779 (1990)
124. Majetschak, M., Cohn, S. M., Nelson, J. A., Burton, E. H., Obertacke, U. & Proctor, K. G. Effects of exogenous ubiquitin in lethal endotoxemia. *Surgery* **135**, 536-543 (2004)
 125. Martins, M. C., Fonseca, C., Barbosa, M. A. & Ratner, B. D. Albumin adsorption on alkanethiols self-assembled monolayers on gold electrodes studied by chronopotentiometry. *Biomaterials* **24**, 3697-3706 (2003)
 126. Maruoka, Y., Oida, S., Imura, T., Takeda, K., Asahina, I., Enomoto, S. & Sasaki, S. Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. *Biochem.Mol.Biol.Int.* **35**, 957-963 (1995)
 127. Massague J TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochem.* **67**, 753-791 (1998)
 128. May, M. J. & Ghosh, S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol.Today* **19**, 80-88 (1998)
 129. Mayer, R. J. & Doherty, F. J. Ubiquitin. *Essays Biochem* **27**, 37-48 (1992)
 130. McDonald, N. Q. & Hendrickson, W. A. A Structural Superfamily of Growth Factors Containing a Cystein Knot Motif. *Cell* **73**, 421-424 (1993)
 131. Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K. & Ihara, Y. Ubiquitin is Conjugated with Amino-terminally Processed Tau in Paired Helical Filaments. *Neuron* **10**, 1151-1160 (1993)
 132. Nakaoka, T., Gonda, K., Ogita, T., Otawara-Hamamoto, Y., Okabe, F., Kira, Y., Harii, K., Miyazono, K., Takuwa, Y. & Fujita, T. Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2. *J.Clin.Invest* **100**, 2824-2832 (1997)
 133. Nanci, A., Wuest, J. D., Peru, L., Brunet, P., Sharma, V., Zalzal, S. & McKee, M. D. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J.Biomed.Mater.Res.* **40**, 324-335 (1998)
 134. Neumann, E. Molecular Hysteresis and Its Cybernetic Significance. *Angew Chem Int Ed* **12**, 356-369 (1973)
 135. Niederwanger, M. & Urist, M. R. Demineralized bone matrix supplied by bone banks for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2): a substitute for autogeneic bone grafts. *J.Oral Implantol.* **22**, 210-215 (1996)

136. Oda, S., Kinoshita, A., Higuchi, T., Shizuya, T. & Ishikawa, I. Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J.Med.Dent.Sci.* **44**, 53-62 (1997)
137. Ozkaynak, E., Finley, D. & Varshavsky, A. The yeast ubiquitin gene: Head-to tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* **312**, 663-666 (1984)
138. Padgett, R. W., Wozney, J. M. & Gelbart, W. M. Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 2905-2909 (1993)
139. Paul, R. & Anderson, G. W. *J.Org.Chem.* **27**, 2094 (1962)
140. Petzow, G, *Metallographisches Ätzen, 5. völlig neu bearbeitete Auflage* Gebrüder Borntraeger Berlin Stuttgart,(1976c), p. 19.
141. Petzow, G, *Metallographisches Ätzen, 5. völlig neu bearbeitete Auflage* Gebrüder Borntraeger Berlin Stuttgart,(1976b), p. 21.
142. Petzow, G, *Metallographisches Ätzen, 5. völlig neu bearbeitete Auflage* Gebrüder Borntraeger Berlin Stuttgart,(1976a), p. 29-37.
143. Petzow, G, *Metallographisches Ätzen, 5. völlig neu bearbeitete Auflage* Gebrüder Borntraeger Berlin Stuttgart,(1976d), p. 19-22.
144. Radegran, G., Lausmaa, J., Mattsson, L., Rolander, U. & Kasemo, B. Preparation of ultra-thin oxide windows on titanium for TEM analysis. *J.Electron Microsc. Tech.* **19**, 99-106 (1991)
145. Ratner, BD, A S Hoffman, F J Schoen, J E Lemons, *Biomaterials science, An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, Inc.,(1996a), p. 1-50.
146. Ratner, BD, A S Hoffman, F J Schoen, J E Lemons, *Biomaterials science, An Introduction to Materials in Medicine, Chapter 2*, Academic Press, Inc.,(1996b), p. 37-50.
147. Reddi, A. H. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. Maureen Owen Revisited. *Clin Orthop* **Apr**, 115-119 (1995a)
148. Reddi, A. H. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Maureen Owen revisited. *Clin.Orthop.*, 115-119 (1995b)
149. Robenek, H, *Mikroskopie in Forschung und Praxis*, GIT Verlag GmbH, Darmstadt,(1995a), p. 70.

150. Robenek, H., *Mikroskopie in Forschung und Praxis*, GIT Verlag GmbH, Darmstadt, (1995c), p. 68-72.
151. Robenek, H., *Mikroskopie in Forschung und Praxis*, GIT Verlag GmbH, Darmstadt, (1995b), p. 71.
152. Rupp, F., Scheideler, L. & Geis-Gerstorfer, J. Einfluß heterogener Oberflächen auf Kontaktwinkelhysteresen: Dynamische Kontaktwinkelanalytik in der Materialforschung. *Chemie Ingenieur Technik* **73**, 1629-1635 (2001)
153. Ruppert, R., Hoffmann, E. & Sebald, W. Human Bone Morphogenetic Protein 2 Contains a Heparin-Binding Site which Modifies its Biological Activity. *Eur J Biochem* **237**, 295-302 (1996)
154. Saito, N., Okada, T., Toba, S., Miyamoto, S. & Takaoka, K. New synthetic absorbable polymers as BMP carriers: plastic properties of poly-D,L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.* **47**, 104-110 (1999)
155. Sakai, N., Sawada, H. & Yokosawa, H. Extracellular ubiquitin system implicated in fertilization of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation and characterization. *Dev. Biol.* **264**, 299-307 (2003)
156. Sampath, T. K., Rashka, K. E., Doctor, J. S., Tucker, R. F. & Hoffmann, F. M. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**, 6004-6008 (1993)
157. Sampath, T. K. & Reddi, A. H. Dissociative Extraction and Reconstitution of Extracellular Matrix Components involved in Local Bone Differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 7599-7603 (1981)
158. Sanders, A. & Jennissen, H. P. Measurement of Fibrinogen Adsorption Kinetics under Controlled Shear Rates by Interfacial TIRF-Rheometry. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **375**, S87 (1994)
159. Sawada, H. Ascidian sperm lysin system. *Zoolog. Sci.* **19**, 139-151 (2002)
160. Sawase, T., Wennerberg, A., Baba, K., Tsuboi, Y., Sennerby, L., Johansson, C. B. & Albrektsson, T. Application of oxygen ion implantation to titanium surfaces: effects on surface characteristics, corrosion resistance, and bone response. *Clin. Implant. Dent. Relat Res.* **3**, 221-229 (2001)
161. Schakenraad, J. M., Busscher, H. J., Wildevuur, C. R. & Arends, J. The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins. *J. Biomed. Mater. Res.* **20**, 773-784 (1986)

162. Scheufler, C., Sebald, W. & Hulsmeyer, M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J.Mol.Biol.* **287**, 103-115 (1999)
163. Schmid, W. The micronucleus test. *Mutat.Res.* **31**, 9-15 (1975)
164. Sigurdsson, T. J., Fu, E., Tatakis, D. N., Rohrer, M. D. & Wikesjo, U. M. Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration. *Clin.Oral Implants.Res.* **8**, 367-374 (1997)
165. Soballe, K., Hansen, E. S., Brockstedt-Rasmussen, H., Hjortdal, V. E., Juhl, G. I., Pedersen, C. M., Hvid, I. & Bunger, C. Gap healing enhanced by hydroxyapatite coating in dogs. *Clin.Orthop.*, 300-307 (1991)
166. Steinemann, S. G. Titanium--the material of choice? *Periodontol.2000.* **17**, 7-21 (1998)
167. Suba, C., Velich, N., Vida, G., Kovacs, L., Kiss, G. & Szabo, G. [SIMS (secondary ion mass spectroscopy) and XPS (x-ray photoelectron spectroscopy) study of titanium implant surfaces coated with anodic titanium-oxide layer]. *Fogorv.Sz* **96**, 197-203 (2003)
168. Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F. C., Ruderman, J. V. & Hershko, A. The Cyclosome, a large Complex Containing Cyclin-selective ubiquitin Ligase Activity, Targets Cyclins for Destruction at the End of Mitosis. *Mol Biol Cell* **6**, 185-197 (1995)
169. Sudholter, E. J. R., Huis, R., Hays, G. R. & Alma, N. C. M. Solid-State Silicon-29 and Carbon-13 NMR Spectroscopy Using Cross-Polarization and Magic-Angle-Spinning Techniques to Characterize 3-Chloropropyl and 3-Aminopropyl-Modified Silica Gels. *J Colloid Interface Sci* **103**, 554-560 (1985)
170. Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L. Mutation of cysteine-88 in the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 protein abolishes its ubiquitin-conjugating activity and its various biological functions. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 2695-2699 (1990)
171. Sutovsky, P., Terada, Y. & Schatten, G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum.Reprod.* **16**, 250-258 (2001)
172. Takuwa, Y., Ohse, C., Wang, E. A., Wozney, J. M. & Yamashita, K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **174**, 96-101 (1991)
173. Temkin, M. & Pyzhev, V. Kinetics of Ammonia Synthesis on Promoted Iron Catalysts. *Acta Physicochimica URSS* **12**, 327-356 (1940)

174. ten Dijke, P., Fu, J., Schaap, P. & Roelen, B. A. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J.Bone Joint Surg.Am.* **85-A Suppl 3**, 34-38 (2003)
175. Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y. & Kuboki, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J.Biochem.(Tokyo)* **121**, 317-324 (1997)
176. Uludag, H., D'Augusta, D., Palmer, R., Timony, G. & Wozney, J. Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J.Biomed.Mater.Res.* **46**, 193-202 (1999)
177. Uludag, H., Gao, T., Porter, T. J., Friess, W. & Wozney, J. M. Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. *J.Bone Joint Surg.Am.* **83-A Suppl 1**, S128-S135 (2001)
178. Urist, M. R. Bone: Formation by Autoinduction. *Science* **150**, 893-899 (1965)
179. van Damme, H. S. & Feijen, J. Protein Adsorption at Polymer-Liquid Interfaces Using Series of Polymers with Varying Hydrophilicity, Charge and Chain Mobility. in *"Modern Aspects of Protein Adsorption on Biomaterials"*, 55-61 (1991)
180. Vandenberg, E. T., Bertilsson, L., Liedenberg, B., Uvdal, K., Erlandsson, R., Elwing, H. & Lundstroem, I. Structure of 3-Aminopropyl Triethoxy Silane on Silicon Oxide. *J Colloid Interface Sci* **147**, 103-118 (1991)
181. Velten, D., Biehl, V., Aubertin, F., Valeske, B., Possart, W. & Breme, J. Preparation of TiO₂ layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization. *J.Biomed.Mater.Res.* **59**, 18-28 (2002)
182. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. & et al. The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001)
183. Vierstra, R. D., Langan, S. M. & Haas, A. L. Purification and initial characterization of ubiquitin from the higher plant, *Avena sativa*. *J Biol Chem* **260**, 12015-12021 (1985)
184. Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., Wilkinson, K. D. & Cook, W. J. Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 3582-3585 (1985)
185. Voggenreiter, G., Hartl, K., Assenmacher, S., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M. & Jennissen, H. P. Assessment of the biological activity of chemically immobilized rhBMP-

- 2 on titanium surfaces in vivo. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **32**, 942-948 (2001)
186. Wang, E. A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): therapeutic potential in healing bony defects. *Trends Biotechnol.* **11**, 379-383 (1993)
187. Wang, E. A., Rosen, V., D'Alessandro, J. S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D. I., Hewick, R. M., Kerns, K. M., LaPan, P. & . Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 2220-2224 (1990)
188. Wang, R., Hashimoto, K. & Fujishima, A. Light-induced amphiphilic surfaces. *Nature* **388**, 431-432 (1997)
189. Weber, K. & Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244**, 4406-4412 (1969)
190. Weetall, H. H. Storage Stability of Water-Insoluble Enzymes Covalently Coupled to Organic and Inorganic Carriers. *Biochim Biophys Acta* **212**, 1-7 (1970)
191. Weetall, H. H. & Hersh, L. S. Preparation and Characterization of Glucose Oxidase Covalently Linked to Nickel Oxide. *Biochim Biophys Acta* **206**, 54-60 (1970)
192. Wiemann, M., Jennissen, H. P., Rumpf, H., Winkler, L., Chatzinikolaidou, M., Schmitz, I. & Bingmann, D. A reporter-cell assay for the detection of BMP-2 immobilized on porous and nonporous materials. *J.Biomed.Mater.Res.* **62**, 119-127 (2002)
193. Wiemann, M., Rumpf, H. M., Bingmann, D. & Jennissen, H. P. The binding of rhBMP-2 to the receptors of viable MC3T3-E1 cells and the question of cooperativity. *Mat.-wiss.u.Werkstofftech.* **32**, 936 (2001)
194. Wilhelmy, L. F. *Pogg. Ann.* **119**, 117 (1863)
195. Williams,DF, *Definitions in Biomaterials.Proceedings of a Consensus Congress of the European Society of Biomaterials, Chester, England, March 3-5 1986*, Elsevier, New York,(1986).
196. Winn, S. R., Uludag, H. & Hollinger, J. O. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin.Orthop.*, S95-106 (1999)
197. Wolf, S., Lottspeich, F. & Baumeister, W. Ubiquitin found in the archebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* **326**, 42-44 (1993)
198. Wozney, J. M. The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction. *J.Periodontol.* **66**, 506-510 (1995)

199. Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. & Wang, E. A. Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activites. *Science* **242**, 1528-1534 (1988)
200. Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massague, J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341-347 (1994)
201. Yamamoto, M., Takahashi, Y. & Tabata, Y. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* **24**, 4375-4383 (2003)
202. Young, T, *Miscellaneous Works*, Peacock, P., Band 1, Murray, London, (1855), p. 418.
203. Zellin, G., Hedner, E. & Linde, A. Bone regeneration by a combination of osteopromotive membranes with different BMP preparations: a review. *Connect. Tissue Res.* **35**, 279-284 (1996)
204. Zisman, WA, *Contact Angle, Wettability, and Adhesion*, American Chemical Society, Washington, D.C.. 1964, (1964), p. 2.

Lebenslauf

Familienname Chatzinikolaidou
Vorname Maria
Geburtstag, -ort 10. Mai 1970 in Erbach/Odenwald
Staatsangehörigkeit Griechisch
Familienstand ledig
Anschrift Keplerstr. 95, 45147 Essen
Tel. 0201 / 8742432 (privat) und 0201 / 723 4128 (dienstlich)
E-mail maria.chatzinikolaidou@uni-essen.de

Berufsbildung

Dezember 2003 Beendung des experimentellen Teils und Beginn der Zusammenschrift der vorliegenden Dissertation

seit Januar 2003 Mitarbeiterin eines Forschungs- und Industrieprojektes im Bereich der Herstellung biologisch aktiver Dentalimplantate unter der Anleitung von Prof. Dr. H. P. Jennissen im Institut für Physiologische Chemie, Universität Essen

seit April 2001 Stipendiatin des dreijährigen Graduiertenkollegs der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) mit Thema "Reaktionen im oberflächennahen Bereich"

Juli 1999 Beginn der Promotion unter der Anleitung von Prof. Dr. H. P. Jennissen im Institut für Physiologische Chemie, Abtl. Biochemische Endokrinologie des Universitätsklinikums Essen, in der Universität Essen mit dem Thema "Biologisierung von Metalloberflächen mit Proteinen"

1998 Zusage eines Promotionsstipendiums unter der Anleitung von Prof. Dr. D. O'Hare mit dem Titel „Synthesis and Catalytic Properties of New Organometallic Functionalized Mesoporous Materials“ in University of Oxford, UK, Department of Inorganic Chemistry

1997 Diplomhauptprüfung. Anfertigung der Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Schön im Institut der Anorganischen Chemie der Universität Essen mit dem Titel „Synthese und Modifizierung der mesoporösen Phase MCM-41“. Erlangung des akademischen Grades Dipl.-Chem.

1994 Diplomvorprüfung

1990 Erfolgreiche Teilnahme an der Prüfung zum Nachweis der Deutschen Sprachkenntnisse an der Universität Essen. Zulassung eines Studienplatzes für Chemie D II

Schulbildung

1985-1988 Lyzeum in Thessaloniki, Griechenland

1982-1985 Gymnasium in Thessaloniki, Griechenland

1976-1982 Grundschule in Thessaloniki, Griechenland

Sprachen

Muttersprache: Griechisch
Fremdsprachen: Deutsch, Englisch, Französisch, Spanisch

Publikationsliste

1. Jennissen, H. P., Zumbrink, T., Chatzinikolaidou, M., Steppuhn, J. (1999) Biocoating of Implants with Mediator Molecules: Surface Enhancement of Metals by Treatment with Chromosulfuric Acid. *Materialwiss. Werkstofftech.*, 30, 838-845
2. Jennissen, H. P., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M., Lichtinger, T. K., Müller, R. T., (2000) Modification of Metal Surfaces and Biocoating of Implants with Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). DVM Bericht 313, 127-140
3. Lichtinger, T. K., Müller, R. T., Schürmann, N., Oldenburg, M., Wiemann, M., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M. and Jennissen, H. P. (2001) Osseointegration of Titanium Implants by Addition of Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2). *Materialwiss. Werkstofftech.*, 32, 937-941
4. Buescher, R., Jennissen, H.P., Chatzinikolaidou, M., Fischer, A. (2001) Characterization of Wet-Chemically Nanostructured Stainless Steel Surfaces. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* Vol. 676, pp.Y3.14.1-Y3.14.6. In: Synthesis, Functional Properties and Application of Nanostructures. (H.W.Hahn, R.Tannenbaum, D.L.Feldheim, C.P.Kubiak, R.W.Siegel, eds). MRS (Materials Research Society), Publications Warrendale, Pennsylvania, USA
5. Voggenreiter, G., Hartl, K., Assenmacher, S., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M. and Jennissen, H. P. (2001) Assesment of the Biological Activity of Chemically Immobilized rhBMP-2 on Titanium Surfaces *in vivo*. *Materialwiss. Werkstofftech.*, 32, 942-948
6. Wiemann, M., Jennissen, H. P., Rumpf, H. M., Winkler, L., Chatzinikolaidou, M., Schmitz, I., Bingmann, D. (2002) A Reporter Cell Assay for the Detection of BMP-2 Immobilized on Porous and Non-Porous Materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, 62(1), 119-127
7. Chatzinikolaidou, M., Laub, M., Rumpf, H. M., Jennissen, H. P. (2002) Biocoating of Normal and Ultrahydrophilic Titanium and Cobalt Chromium Molybdenum Alloy Surfaces with Proteins. *Materialwiss. Werkstofftech.*, 33, 720-727
8. Laub, M., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M., Jennissen, H. P. (2002) Modelling of Protein-Protein Interaction of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) by 3D-Rapid Prototyping. *Materialwiss. Werkstofftech.*, 33, 729-737
9. Rumpf, H.M., Dopp, E., Rettenmeier, A.W., Chatzinikolaidou, M., Jennissen, H.P. (2003) Absence of genotoxic effects after exposure of mammalian cells to the recombinant human bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) prepared from E. coli. *Materialwiss. Werkstofftech.*, 34, 1101-1105
10. Chatzinikolaidou, M., Zumbrink, T., Jennissen, H.P. (2003) Stability of Surface enhanced Ultrahydrophilic Metals as a Basis for Bioactive rhBMP-2 Surfaces. *Materialwiss. Werkstofftech.*, 34, 1106-1112

Poster und Vorträge

1. Jennissen, H. P., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M. (2001) Direct Immobilization of Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) on Metal Implants for Enhanced Osseointegration. *FASEB J.*, 15, A68
2. Jennissen, H. P., Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M. (2001) Long-term controlled release of Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) from hydrophobic hydrocarbon-coated metallic surfaces for accelerated and improved osteointegration of implants. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 392A-393A
3. Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H. M., Jennissen, H. P. (2001) Ultra-Hydrophilic Metal Surfaces Displaying an "Inverse Lotus Effect" for Direct Immobilization of Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2). *Biol. Chem.*, 382, S162 (Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, 2001, Bochum)
4. Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H.M., Jennissen H.P. (2001) Ultra-Hydrophilic Metal Surfaces for Biocoating (4th International Essen Symposium on Biomaterials, Essen, 2001)
5. Jennissen, H. P. & Chatzinikolaidou, M. (2002) Ultra-hydrophilic metal surfaces for implant devices which may carry growth factors. *FASEB J.*, 16, A925
6. Chatzinikolaidou, M., Rumpf, H.M., Jennissen, H.P. (2002) Ultra Hydrophilic Metal Surfaces Displaying an „Inverse Lotus Effect“ for Direct Immobilization of Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), (Symposium Molekulare Erkennung, Essen, 2002)
7. Chatzinikolaidou, M. & Jennissen H.P. (2002) Dynamic Contact Angle Stability for Different Metal Surfaces (5th International Essen Symposium on Biomaterials, Essen, 2002)
8. Chatzinikolaidou, M. & Jennissen, H.P., Affinity Technology in the Design of Bioactive Implant Surfaces (2003) (Affinity Technology Congress, 2003, Cambridge, UK)
9. Chatzinikolaidou, M., Jennissen, H.P., Laub, M., Rumpf, H.M. (2003) Surface Immobilized BMP-2 on Implants-A Novel Application. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2.9, 969 (World Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2003, Montréal, Canada)
10. Chatzinikolaidou, M. & Jennissen H.P. (2003) Desorption of Immobilized rhBMP-2 from Metallic Surfaces (6th International Essen Symposium on Biomaterials, Essen, 2003)
11. Chatzinikolaidou, M. & Jennissen H.P. (2004) Release Kinetics of rhBMP-2 from Metal Implant Surfaces (7th International Essen Symposium on Biomaterials, Essen, 2004)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln durchgeführt habe.

Maria Chatzinikolaidou