

**Biofunktionalisierung von kommerziellen dentalen  
Implantatoberflächen durch extrazelluläre Peptide mit  
biologischer Signalfunktion**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Brenner, Andreas**

**2015**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. T. Walker

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Fragestellung / Ziel der Arbeit .....	7
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1. Titanproben .....	10
2.2. Zellkulturen .....	11
2.2.1. Ablösen und Umsetzen von Zellen .....	13
2.3. Stoffwechselaktivität und Proliferation .....	14
2.3.1. XTT-Test .....	14
2.3.2. Versuchsdurchführung XTT-Test .....	15
2.3.3. BrdU-Test .....	15
2.3.4. Versuchsdurchführung BrdU-Test .....	16
2.4. Adhäsion und Ausbreitung .....	17
2.4.1. Versuchsdurchführung Kristallviolett färbung .....	17
2.5. Verwendete Peptide und Fibronectin .....	18
2.5.1. Protein- / Peptidkopplung .....	19
2.5.2. Versuchsdurchführung Protein- / Peptidkopplung .....	20
2.5.3. Fibronectin-Nachweis .....	21
2.5.4. Versuchsdurchführung Fibronectin-Nachweis .....	21
2.5.5. Peptid-Nachweis .....	22
2.5.6. Versuchsdurchführung Peptid-Nachweis .....	22
2.6. PCR .....	24
2.6.1. Versuchsdurchführung RNA-Extraktion .....	24
2.6.2. Versuchsdurchführung quantitative RT-PCR .....	25
2.6.3. Osteogene Marker .....	27
2.7. Datenanalyse / Statistik / Berechnungen .....	28

2.7.1. Kristallviolett färbung / BrdU-Test / XTT-Test .....	29
2.7.2. RT-PCR .....	29
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1. Vorversuche.....	30
3.1.1. Osteoblastenwachstum auf verwendeten Titanoberflächen .....	30
3.1.2. Nachweis der Fibronektinkopplung.....	32
3.1.3. Ergebnis Fibronektinkopplung .....	32
3.1.4. Nachweis der Peptidkopplung .....	34
3.1.5. Ergebnis Peptidkopplung.....	34
3.1.6. Initiale Anheftung auf rauher Titanoberfläche .....	35
3.1.7. Initiale Anheftung auf unterschiedlichen Titanoberflächen.....	38
3.1.8. Ergebnis initiale Anheftung .....	40
3.1.9. Einfluss von Biomolekülen auf Osteoblasten.....	41
3.1.10. Ergebnis / Einfluss von Biomolekülen auf Osteoblasten.....	43
3.1.11. Fazit Vorversuche.....	44
3.2. Hauptversuche.....	44
3.2.1. Hauptversuch 3 / Proliferation.....	46
3.2.2. Ergebnisse Hauptversuch 3 / Proliferation.....	50
3.3 . RT-PCR Vorversuche .....	52
3.3.1. Auswahl der osteogenen Marker .....	52
3.3.2. RNA-Extraktion auf Titanplättchen.....	53
3.4. RT-PCR .....	54
3.4.1. Ergebnisse RT-PCR .....	60
3.4.1.1. Osteogene Marker auf Oberflächen mit nicht induzierten Zellen .....	60
3.4.1.2. Osteogene Marker auf Oberflächen mit induzierten Zellen .....	61
3.4.1.3. Induktion auf den unterschiedlich modifizierten Versuchsoberflächen .....	61
3.4.2. Zusammenfassung Genexpression / -induktion.....	62

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>65</b>
4.1. Diskussion von Material und Methode .....	67
4.1.1. Titanoberflächen .....	67
4.1.2. Zellkulturmodelle.....	68
4.1.3. Messung der initialen Anheftung und der Zellbedeckung .....	70
4.1.4. Messung von Stoffwechselaktivität und Proliferation .....	70
4.1.5. Nachweis der Protein- und Peptidkopplung.....	71
4.2. Diskussion der Ergebnisse .....	72
4.2.1. Osteoblastenwachstum auf verschiedenen Camlog Titanoberflächen .....	73
4.2.2. Einfluss von biologisch modifizierten Oberflächen auf die Zellbesiedelung / Initiale Anheftung .....	74
4.2.3. Überprüfung der Kopplungseffizienz der Biomoleküle anhand des Einflusses von FN, RGD1 und RGD2 auf die Stoffwechselaktivität von SAOS-2 Osteoblasten.....	75
4.2.4. Fördernde Wirkung der ausgewählten Peptide P1 bis P6 sowie FN auf die Proliferation von humanen Stammzellen im Langzeitversuch von 42 Tagen .....	76
4.2.5. Einfluss der Oberflächenmodifikationen auf die Genexpression von Stammzellen / Osteogene Differenzierung.....	77
4.3. Schlussfolgerung und Ausblick.....	79
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>95</b>
7.1 Danksagung.....	95
7.2 Lebenslauf .....	96

## Abkürzungsverzeichnis

### Allgemeine Abkürzungen

Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Aluminiumoxid
AP	Alkalische Phosphatase
BrdU	Brom-desoxy-Uridin
BSP	Bone Sialoprotein
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Coll1a1	Collagen 1a1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzym Linked Immuno-Sorbent Assay
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FN	Fibronectin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOPTS	3-Glycidylxypropyltrimethyl-oxysilan
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HV	Hauptversuch
Igf-2	Insuline-like growth factor 2
Ma	Oberfläche Nr. 1 / Camlog-Machined
Ma-Ana	Oberfläche Nr. 4 / Camlog-Machined mit Anatas-Beschichtung
MDB	Membran Desalting Buffer
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumcarbonatpuffer
Nano	Oberfläche Nr. 3 / Camlog-Nano
OCN	Osteocalcin
OF	Oberfläche
OPN	Osteopontin
OSN	Osteonectin
Osx	Osterix

## Abkürzungen

---

PBS <sup>-</sup>	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEEK	Polyetheretherketon
Per	Periostin
Pro-Ana	Oberfläche Nr. 5 / Camlog-Promote mit Anatas-Beschichtung
Pro	Oberfläche Nr. 2 / Camlog-Promote
PS	Polystyrol
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SLA	Sandblasted and acid-etched
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
Ti	Titan
TRITC	Tetramethylrhodamine-5 (und 6)-isothiocyanate
VN	Vitronektin
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

### **Statistische Abkürzungen**

MW	Mittelwert
OD	Optische Dichte
SD	Standardabweichung
t	t-Wert; Teststatistik bei Mittelwertvergleichen

## 1. Einleitung

Implantate dienen der Lagerung von festsitzendem sowie herausnehmbarem Zahnersatz und sind mittlerweile ein fester Bestandteil der Zahnmedizinischen Prothetik. Zahnverlust ist ein Problem, das zu einem großen Teil ältere Menschen betrifft. Aufgrund des demografischen Wandels werden heute immer mehr Implantate benötigt. Dies spiegelt sich auch in der Zahl der gesetzten Implantate wieder, welche seit den letzten zwei Jahrzehnten stetig steigt. Heutzutage werden, laut der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGI) und dem Bundesverband der implantologisch tätigen Zahnärzte in Europa e. V. (BDIZ EDI), in Deutschland bereits mehr als eine Million der künstlichen Zahnwurzeln jährlich gesetzt (Döring 2012; Staehle 2012).

Implantate finden selbstverständlich nicht nur in der Zahnmedizin Anwendung, sondern kommen auch insbesondere in der Allgemeinmedizin sehr vielseitig zum Einsatz. Der vermehrte Bedarf und die vielseitige Anwendung von Implantaten in den heutigen medizinischen Fachgebieten bewirkt somit natürlich auch ein hohes wissenschaftliches Interesse.

Stetig wird versucht, durch Forschung und Weiterentwicklung die Implantologie sowie das Implantat an sich zu verbessern. Das wesentliche Ziel ist es, einen besseren Kontakt zwischen dem umliegenden Gewebe, d. h. des (Kiefer-) Knochens, sowie des Weichgewebes und dem Implantat zu gewährleisten und somit auch die Zeit des Einheilens auf ein Minimum zu reduzieren. Hierfür ist es unerlässlich sich mit der Implantatoberfläche und auch deren Gestaltung und Beschaffenheit auseinander zu setzen.

Um die Osseointegration, d. h. den Kontakt zwischen Knochen und Implantat, zu verbessern, wird durch die unterschiedlichsten Verfahren versucht, die Implantatoberfläche dahingehend zu modifizieren und zu verändern.

Bei den heute gängigen Methoden handelt es sich um technische bzw. werkstofftechnische Verfahren, bei denen die Veränderungen der Oberfläche durch mechanische und/oder chemische Bearbeitung erzielt wird.

Die sogenannte Biofunktionalisierung stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Implantatoberfläche zu modifizieren. Hierbei werden unter Anwendung verschiedenster Methoden biologische Moleküle oder Signalsequenzen an die entsprechenden Oberflächen gekoppelt. Die Biofunktionalisierung besitzt ein hohes Potenzial, befindet sich aber derzeit noch in der Entwicklung. Somit sind derart modifizierte Oberflächen zurzeit noch nicht kommerziell erhältlich.

Das heute gängigste Material in der dentalen Implantologie ist Titan (Ti), welches sich u. a. durch seine hohe Biokompatibilität und Funktionalität auszeichnet. Titan gilt als biologisch besonders verträglich, da es keine allergischen Reaktionen auslöst. Außerdem ist eine sehr dichte Anlagerung von Knochengewebe an Titan möglich. Nach erfolgter bzw. erfolgreicher Implantation erhöht sich mit der Zeit die Knochendichte um das inserierte Implantat und es entsteht ein kraftschlüssiger Verbund mit dem Knochen (= Osseointegration) (Albrektsson et al. 1981; Albrektsson et al. 1987). Das wissenschaftliche Hauptaugenmerk liegt derzeit auf der Verbesserung und Weiterentwicklung von Titan und dessen Oberfläche.

Die Verfahren zur Modifikation von Oberflächen können in subtraktive und additive eingeteilt werden. Bei den subtraktiven Verfahren wird sozusagen ein Teil der Oberfläche abgetragen. Dies ist beispielsweise bei der Säureätzung oder dem Sandstrahlen der Fall. Bei den additiven Methoden wird Material auf die Oberfläche auf- bzw. angetragen. Zu den additiven Methoden zählt z. B. die Beschichtung mit Hydroxylapatit, die anodische Oxidation und auch das Plasmaspraying.

Bei den werkstofftechnischen Verfahren bzw. den mechanischen und chemischen Methoden wird die Implantatoberfläche so modifiziert, dass u. a. eine gewisse Rauigkeit und Oberflächenstruktur entsteht. Hierdurch soll die Oberflächenmorphologie so verändert werden, dass für die Zellen des Zielgewebes die Zellanheftung erleichtert und somit der Heilungsprozess

beschleunigt wird (Pilliar 1998; Le Guéhenec et al. 2007; Suzuki et al. 1997; Nordin et al. 2004).

Zu den mechanischen Methoden zählen beispielsweise das Sandstrahlen und spanende Verfahren wie Fräsen, Drehen und Schleifen. Zu den chemischen Methoden gehört u. a. das Ätzen oder Anodisieren (Le Guéhenec et al. 2007; Pilliar 1998). Selbstverständlich gibt es auch Kombinationen verschiedener Verfahren. Dies ist zum Beispiel bei der SLA-Oberfläche (= sandblasted and acid-etched) der Fall. Durch diese Art der Oberfläche kann ebenfalls ein besserer bzw. höherer Kontakt zwischen Knochen und Implantat entstehen und auch die Knochenanlagerung an dieser Oberfläche ist besser als bei unbearbeiteten Implantatoberflächen (Cochran et al. 1998; Suzuki et al. 1997; Bornstein et al. 2003; Cochran et al. 2007).

Es hat sich gezeigt, dass die Oberflächenrauigkeit bei Implantaten eine enorme Rolle spielt. Von ihr hängen Osseointegration und auch die biomechanische Fixation ab. Ebenso ist die mechanische Stabilität gegenüber glatten Oberflächen deutlich besser, was vor allem an der intensiveren Verzahnung von Knochen und Implantat aufgrund der Oberflächenvergrößerung und vorteilhafteren Struktur liegt (Hansson 1999; Le Guéhenec et al. 2007; Pilliar 1998).

Zu den Methoden, die zur Förderung der Osseointegration geeignet sind, zählen die Säureätztechnik, das Anodisieren, das Plasma-Spraying sowie das Bestrahlen mit Keramikpartikeln.

Durch die Säureätztechnik entstehen unter Anwendung starker Säuren Poren. Mittels dieser Technik wird eine verbesserte Osseointegration erzielt (Pilliar 1998). Dual säuregeätzte Oberflächen erzielen hierbei deutlich bessere Knochen-Implantat-Kontakte gegenüber maschinell bearbeiteten Oberflächen und auch die Verankerung bzw. Adhäsion von Zellen kann so verbessert werden (Le Guéhenec et al. 2007).

Durch das Anodisieren entsteht eine Oxidschicht, welche Mikro-/ Nanoporen auf der Titanoberfläche erzeugt (Sul et al. 2001; Sul 2003). Die entstandenen Poren verbessern die Verzahnung zwischen den Zellen und dem Implantat. Gleichzeitig wird durch das Anodisieren eine Verbesserung bzw. Steigerung der biomechanischen Haftung erzielt. Somit führt das Anodisieren biomechanisch wie auch histologisch zu besseren Ergebnissen, als un- bzw. maschinell bearbeitete Vergleichsoberflächen (Le Guéhenec et al. 2007).

Beim Plasma-Spraying wird Titanpulver in einen Plasma-Brenner injiziert und auf die Implantatoberfläche aufgebracht. Dort kondensieren und fusionieren die Partikel und es entsteht ein rauer Film. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass von Oberflächen, die mit dieser Methode hergestellt werden, metallische Partikel im Zielgewebe freigesetzt werden können (Pilliar 1998; Le Guéhenec et al. 2007). Eine weitere Methode zur Erlangung einer rauen Oberfläche ist das Bestrahlen von Implantatoberflächen mit Keramikpartikeln, das sogenannte grit-blasting. Hierbei werden Keramikpartikel unter Anwendung von Druckluft mit hoher Geschwindigkeit über eine Düse auf die entsprechende Oberfläche gestrahlt. Hierdurch können unterschiedliche Rauigkeiten erzielt werden, die von der Größe der verwendeten Keramikpartikeln abhängen. Es können verschiedene Partikel zur Anwendung kommen, wie z. B. Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) oder Kalziumphosphatpartikel. Insbesondere durch die Verwendung von  $\text{TiO}_2$  ist es möglich, die marginale Knochenzellichte und somit auch die biomechanische Verankerung gegenüber unbearbeiteten Oberflächen zu erhöhen (Rasmusson et al. 2001; Le Guéhenec et al. 2007; Cooper et al. 1999; Rasmusson et al. 2005).

Im Folgenden sollen weitere förderliche chemische Verfahren erwähnt werden. Es handelt sich hierbei u. a. um die Beschichtung von Oberflächen mit Kalziumphosphat/Hydroxylapatit. Durch dieses Verfahren konnte eine Oberflächenbenetzung des Implantates mit Präzipitaten und einer Apatitschicht erzielt werden. Dies führte zu einer besseren Heilung bedingt durch die Freisetzung von Kalziumphosphat in die periimplantäre Region (De Jonge et al. 2008; Le Guéhenec et al. 2007; Piattelli et al. 2002).

Auch die Behandlung von Titanoberflächen mit Fluoriden bzw. das Eintauchen in fluoridhaltige Lösungen hat sich als förderlich erwiesen. Hierbei wird die Regulation von Transkriptionsfaktoren beeinflusst, was Auswirkungen auf die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten hat. Eine begünstigte zelluläre Differenzierung fördert die Osteogenese bzw. die Osseointegration (Berglundh et al. 2007; Isa et al. 2006; Le Guéhennec et al. 2007).

Chemische Modifikationen sind jedoch auch kritisch zu betrachten, da sich die entsprechende chemische Zusammensetzung wie auch die Ladung auf der Titanoberfläche negativ auf die Proteinadsorption und das Zellattachment auswirken kann (Le Guéhennec et al. 2007).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der nicht außer acht gelassen werden soll, ist die Hydrophilie. Laut einiger Autoren sind hydrophile Oberflächen wünschenswerter als hydrophobe (Lang et al. 2011; Le Guéhennec et al. 2007). Es gibt Hinweise, dass diese hydrophilen Oberflächen hinsichtlich ihrer Interaktion mit Zellen, Geweben und biologischen Flüssigkeiten besser bzw. vorteilhafter sind als hydrophobe Oberflächen. Dies konnte u. a. durch Studien mit chemisch veränderten SLA-Oberflächen gezeigt werden (Oates et al. 2007; Ganeles et al. 2008; Bornstein et al. 2010). Die hydrophilen SLA-Oberflächen konnten die Knochenzellendifferenzierung sowie die Proteinproduktion stimulieren und erzielten somit einen besseren Kontakt zum Knochen (Buser et al. 2004; Cochran et al. 2002; Schwarz et al. 2007).

Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch die Biofunktionalisierung der künstlichen Zahnwurzeln. Hierbei wird die Oberfläche z. B. durch Peptide oder Proteine sozusagen maskiert und als körpereigen gekennzeichnet, sodass eine Ähnlichkeit zu dem zu ersetzenden Gewebe entsteht. Durch diese sogenannte Biofunktionalisierung ist es möglich, die Interaktion zwischen Gewebe und Implantat gezielt zu beeinflussen. Dazu wird der Implantatwerkstoff z. B. mit Komponenten aus der extrazellulären Matrix (ECM) beschichtet, um eine bessere und schnellere Osseointegration zu erreichen. Dies kann z. B. durch Dip-coating, d. h. das Eintauchen des Implantats in eine Lösung aus Proteinen,

oder durch kovalente Ankopplung dieser Proteine unter Nutzung von funktionellen Gruppen erreicht werden (De Jonge et al. 2008).

Wissenschaftliche Untersuchungen haben gezeigt, dass durch kovalentes Koppeln der Betrag von gekoppeltem Fibronectin (FN) gegenüber einer standard Dip-coating Methode nahezu verdoppelt werden kann (Scheideler et al. 2007). Ebenso konnte die Menge des gekoppelten Peptids erheblich erhöht werden (Iucci et al. 2007; Sathe 2003).

Mit der sogenannten Biofunktionalisierung von Implantaten konnten bereits erste Erfolge erzielt werden. So kann durch Beschichtung mit dem Bone Sialoprotein (BSP), Kollagen, Vitronectin (VN) und Fibronectin die Anheftung von Osteoblasten verbessert bzw. beschleunigt werden (Hilbig et al. 2007; De Jonge et al. 2008; Kilpadi et al. 2004; García et al. 2005; Iucci et al. 2007; Huang H et al. 2003). Des Weiteren kann durch die Biofunktionalisierung der Implantatoberfläche eine schnellere Osseointegration bzw. das Knochenwachstum gefördert (García et al. 2005; Iucci et al. 2007; Huang H et al. 2003) und ebenso eine höhere marginale Knochendichte erreicht werden (Lutz et al. 2010; Pechtl 2010).

Auch durch die Modifikation mit funktionellen Signalsequenzen, wie z. B. der RGD-Sequenz aus dem Fibronectin ist es möglich, den Heilungsprozess und die funktionelle Integration in den Kieferknochen sowie die Zellhaftung und die Mineralisierung zu beschleunigen und zu verbessern (Petrie et al. 2008; De Jonge et al. 2008; García et al. 2005; Huang H et al. 2003; Khatayevich 2010; Cavalcanti-Adam et al. 2002). Selbigen Effekt bzw. ähnliche Ergebnisse erzielten auch Oberflächen, die mit dem GFOGER Peptid, einem Kollagen imitierenden Peptid, beschichtet waren. Dies führte zu einer besseren Osseointegration (Reyes et al. 2007). Und auch mit dem Peptid P-15, einer synthetisch hergestellten Aminosäuresequenz, konnte bereits eine Steigerung der Knochendichte erzielt werden (Pechtl 2010).

Spezielle Membranproteine mit Rezeptorfunktion, die sogenannten Integrine, sind am Kontakt zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix beteiligt. Sie können Reaktionen steuern und sind an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. Diese Heterodimere binden intra- und extrazelluläre Proteine. Die hierbei wichtigsten extrazellulären Bindungspartner sind die Proteine Laminin und Fibronectin, welche ihrerseits mit verschiedenen Kollagentypen, Heparansulfat, Proteoglykanen und Entaktinen interagieren. Die Bindungspartner Laminin und Fibronectin enthalten beide die wichtige RGD-Domäne welche an das Integrin bindet (Welsch 2003). Die für die Bindung wichtige RGD-Sequenz macht sich auch die Wissenschaft zu nutze und stellt mit dieser die Verbindung von Zellen zu Proteinen und Peptiden her (Kilpadi et al. 2004; Schaffner et al. 2003; Iucci et al. 2007).

Es hat sich gezeigt, dass bioaktive Beschichtungen, die die Integrinbindungsspezifität fördern, zu einer besseren Heilung führen können (Petrie et al. 2008) und dass Oberflächenmodifikationen mit Peptiden oder Proteinen aus der extrazellulären Matrix in der Lage sind, die Knochenregeneration zu stimulieren (Morra 2006; Seol et al. 2006).

### **1.1. Fragestellung / Ziel der Arbeit**

Es kann davon ausgegangen werden, dass mit den Möglichkeiten der technischen Verfahren zur Oberflächenmodifikation keine substantiellen Verbesserungen mehr zu erwarten sind. Da aus technischer Sicht das Potential ausgeschöpft zu sein scheint, soll die Biofunktionalisierung von Implantaten Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

Das heißt, um ein schnelles und sozusagen stabiles Einheilen und somit eine frühere Mineralisierung zu gewährleisten, soll versucht werden, die Interaktion bzw. Schnittstelle zwischen Implantat und umliegendem Gewebe dahingehend zu beeinflussen. Dies soll durch die Kopplung von Proteinen aus der extrazellulären Matrix bzw. bestimmter Peptidsequenzen erreicht werden, welche die Zellanheftung und nachgeschaltet die Differenzierung, die Bildung

von extrazellulärer Matrix sowie die Mineralisation fördern, was zu einer Optimierung der Einheilung beiträgt.

Knochenmatrix besteht zu ca. 35 % aus organischem Material (v. a. Kollagenfasern, Knochenproteinen und Proteoglykanen) und zu ca. 65 % aus anorganischen Salzen. Das Kollagen (= glykosyliertes Protein) macht den Großteil der organischen Bestandteile aus (Welsch 2003).

Des Weiteren sind Knochen von der Knochenhaut, dem sogenannten Periost, umgeben. Das zellreiche Periost enthält u. a. Stammzellen, Nerven sowie Blutgefäße und ist in der Lage neues Knochengewebe zu bilden. Hierbei sind mesenchymale Knochenzellenstammzellen, die Präosteoblasten und die Osteoprogenitorzellen des Periosts hervorzuheben, die bei der Einheilung von Implantaten von Bedeutung sind (Welsch 2003).

Bei der Einheilungssequenz und Osseointegration werden zuerst osteogene Stammzellen rekrutiert, die zur Implantatoberfläche wandern. Dort angekommen adhären die Stammzellen, breiten sich entsprechend aus, proliferieren und differenzieren sich zu Knochenmatrix synthetisierenden Zellen. Im Anschluss werden Proteine sezerniert. Durch die abschließende Mineralisation dieser Proteine entsteht neuer Knochen.

Inhalt und Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Implantatoberflächen mit Signalsequenzen zu versehen, die die beschriebenen Abläufe beschleunigen bzw. intensivieren. Diese Förderung soll bewirken, dass das Implantat schneller fest einheilt.

Hierzu sollen Peptid-Sequenzen, die eine Signalfunktion aufweisen, kovalent an unterschiedlich beschaffene kommerzielle Titanoberflächen gekoppelt werden. Das Hauptaugenmerk soll hierbei auf der Kopplung von Peptiden liegen, da diese im Vergleich zu Proteinen als vorteilhafter zu betrachten sind. Dies liegt zum einen daran, dass Peptide aufgrund der geringeren Anzahl der verknüpften Aminosäuren und der fehlenden Tertiärstruktur einfach zu synthetisieren und stabiler sind. Zum anderen kann gezielter mit den gewünschten Signalsequenzen gearbeitet werden als dies bei den erheblich längeren

Proteinen der Fall ist, wodurch unter Umständen eine bessere und stärkere Wirkung zu erwarten ist. Zu guter Letzt sind Peptide kostengünstiger.

Um die biologische Wirkung der ausgewählten Signalsequenzen und die Effektivität des Kopplungsprozesses zu testen, sollen im weiteren Verlauf Osteoblasten bzw. Stammzellen aus dem Kieferperiost auf den modifizierten Oberflächen angesiedelt werden, welche über Integrine (Membranproteine mit Rezeptorfunktion) an die entsprechenden Sequenzen binden sollen. Im Anschluss werden die Zellen ausgezählt bzw. quantitativ beurteilt und hinsichtlich der Anheftung auf den verschiedenen Oberflächen bewertet. Außerdem sollen oben beschriebene Vorgänge wie die Proliferation der Zellen und auch deren Stoffwechsel, z. B. die Sekretion von Kollagen sowie die Expression von Genen bewertet werden, sodass im nächsten Schritt die verschiedenen Peptide mittels der gewonnenen Ergebnisse untereinander verglichen werden können um ihre Eignung im Bezug auf die Biofunktionalisierung von Implantaten auszuloten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Titanproben

Es wurden Proben eingesetzt, die einer kommerziell erhältlichen Implantatoberfläche entsprechen, sowie Proben mit experimentellen Oberflächen. Diese Titanplättchen wurden bei der Firma Camlog (CAMLOG Biotechnologies AG, Basel) hergestellt. Die Plättchen besitzen einen Durchmesser von 10 mm bei einer Höhe von 1 mm und somit eine Oberfläche von 1,884 cm<sup>2</sup>. Es wurde jedoch nur die Oberseite der Titanplättchen bearbeitet. Die Oberseite eines Plättchens hat eine Fläche von 0,785 cm<sup>2</sup>. Da jedoch nicht auszuschließen ist, dass auch die Mantelfläche (0,314 cm<sup>2</sup>) der zylinderförmigen Proben mitbearbeitet und modifiziert wurde, liegt die tatsächliche Oberfläche zwischen 0,785 cm<sup>2</sup> und 1,099 cm<sup>2</sup>. Ein Vorbereiten der entsprechenden Proben war nicht von Nöten, da diese bereits steril geliefert wurden. Es handelte sich um fünf unterschiedlich beschaffene Oberflächen.

#### Oberfläche Nr. 1

Machined (Ma): Hierbei handelt es sich um eine rein maschinell gefertigte Oberfläche. Die Oberflächenbeschaffenheit rührt von der Fertigungsmethode her, in diesem Fall hervorgerufen durch das Drehen. Somit entspricht die Oberflächenstruktur dem glatten, gedrehten Halsbereich der Camlog-Implantate.

#### Oberfläche Nr. 2

Promote (Pro): Diese mikrostrukturierte raue Oberfläche wurde sandgestrahlt und säuregeätzt. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass es sich hierbei um die derzeit aktuelle Implantatoberfläche des Herstellers Camlog handelt und bei den firmeneigenen Implantatsystemen Camlog und Conelog zur Anwendung kommt. Laut Hersteller trägt diese Oberfläche zur raschen Osseointegration bei.

### Oberfläche Nr. 3

Camlog-Nano (Nano): Es handelt sich um eine experimentelle Modifikation der Promote-Oberfläche. Auf die oben beschriebene Säureätzung folgt eine Alkaliätzung. Mit der alkalischen Behandlung wird über der vorhandenen Promote-Topographie eine charakteristische Nanostruktur erzeugt. Die anschließende Neutralisation erfolgt mit einer Salzlösung. Anschließend werden die Proben an partikelarmer Luft bei Raumtemperatur getrocknet.

### Oberfläche Nr. 4

Machined mit Anatas-Beschichtung (Ma-Ana): Diese Oberfläche ist eine experimentelle Modifikation der Oberfläche Nr. 1, wobei hier zusätzlich eine Anatas-Beschichtung aufgebracht wurde. Hierbei handelt es sich um ein Titanoxid, das eine Erhöhung der Oberflächenenergie bewirkt und eine Nanostrukturierung erzeugt.

### Oberfläche Nr. 5

Promote mit Anatas-Beschichtung (Pro-Ana): Experimentelle Modifikation der Oberfläche Nr. 2 mit zusätzlicher Anatas-Beschichtung.

## **2.2. Zellkulturen**

Aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit der humanen Stammzellen wurde für die Vorversuche eine humane Zell-Linie eingesetzt. Bei diesen Knochenzellen handelte es sich um SAOS-2 Osteoblasten (DSMZ GmbH, D-38124 Braunschweig), die aus einer Human Osteogenic Sarcoma Zelllinie (DSMZ Nr. ACC 243) stammen. Als Zellkulturmedium diente McCOY's 5A Medium (PAA Laboratories GmbH, At-Pasching, Kat.Nr. E15-022), dem außerdem 15 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Die Proben in den folgenden Versuchen wurden mit diesen Zellen in jeweils 500 µl Medium angeimpft.

Bei den in den Hauptversuchen (HV) verwendeten Zellen handelte es sich um Stammzellen aus dem menschlichen Kieferperiost. Diese Zellen stammen aus dem Molekularbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. An dieser Stelle sei auf die Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen hingewiesen, die obiger Abteilung zu Forschungszwecken vorliegt (Nr. 194/2008BO2). Nach der Biopsie durch die Chirurgie erfolgte ein Verdauungsschritt unter Anwendung von "XI collagenase" (Sigma, D-Steinheim, 1500 U/ml) für 90 Minuten und die Stammzellen wurden im Anschluss in Zellkulturflaschen kultiviert.

Als Zellkulturmedium diente in diesem Fall DMEM/F-12 (Life Technologies GmbH, D-64293 Darmstadt, REF 31331-028), dem 10 % FCS, 1 % Fungizide sowie 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Für Induktionszwecke erfolgte eine Modifikation des Mediums. Hierzu wurde diesem pro 1 ml jeweils 1 µl Vitamin C (100 µM in DMEM/F-12), 0,4 µl Dexamethason (4 µM in Ethanol) sowie 10 µl β-Glycerophosphate (10 mM in DMEM/F-12) zugegeben. Die verwendeten Zellen waren von 4 verschiedenen Spendern. Die Proben in den folgenden Versuchen wurden mit diesen Zellen in jeweils 1.000 µl Medium angeimpft. Für die entsprechenden Versuche wurde die Menge an Medium unmittelbar vor Versuchsbeginn entsprechend reduziert.

Beide Zellarten wurden mit 10 ml Medium und einer Zellzahl von  $8 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  in Zellkulturflaschen (Corning Incorporated, NY 14831 USA, Zellkulturflasche, 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, Kat.Nr. 430641) angeimpft und inkubiert. Die Wachstumsphase erfolgte im Inkubator (Heraeus Brutschrank, CO<sub>2</sub>-Auto-Zero, Typ B5061 EK-CO<sub>2</sub>) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Während dieser Phase wie auch in den entsprechenden Versuchen erfolgte alle 3 bis 4 Tage ein Mediumwechsel. Bei einer erreichten Zellbesiedelung von ca. 80 bis 90 % wurden die Zellen für die entsprechenden Versuche entnommen sowie in neuen Zellkulturflaschen weiter kultiviert.

### **2.2.1. Ablösen und Umsetzen von Zellen**

Nach erfolgter Wachstumsphase wurde als erstes das Medium aus der Zellkulturflasche mittels einer Pipette entfernt. Im Anschluss wurde einmal mit 5 ml PBS<sup>-</sup> (Life Technologies GmbH, REF 14190-094) gespült und dieses sofort wieder entfernt. Es wurden erneut 5 ml PBS<sup>-</sup> zugegeben. Es erfolgte eine Einwirkdauer von 5 min. bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Einwirkdauer wurde das PBS<sup>-</sup> wieder entfernt und es folgte die Zugabe von 1,5 ml Trypsin (0,05 % in PBS<sup>-</sup>)/EDTA (0,02 % in PBS<sup>-</sup>). Die Zellen wurden mit dem Trypsin/EDTA 5 min. im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 5 min. wurde mit dem Mikroskop (Olympus CK 2, No. 601663) geprüft, ob alle Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst wurden. Notfalls wurde versucht durch leichtes Klopfen der Kulturflasche die restlichen Zellen vollends zu lösen. Es wurden 5 ml Medium zugegeben und der Boden der Kulturflasche abgespült. Durch Auf- und Abpipettieren wurde versucht die Zellen zu vereinzeln. Der Inhalt der Zellkulturflasche wurde in ein 15 ml Bluecap bzw. Polypropylen Röhrchen (Greiner Bio-one GmbH, Art.-Nr. 188261) überführt. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauerkammer. Die für den entsprechenden Versuch benötigte Zellzahl wurde eingestellt und die Proben angeimpft. Anschließend wurden die restlichen Zellen in einer neuen Kulturflasche weiter kultiviert.

## 2.3. Stoffwechselaktivität und Proliferation

Um die Stoffwechselaktivität und die Proliferation der SAOS-2 Osteoblasten auf den verwendeten Titanproben zu ermitteln und quantifizieren, wurden folgende Messmethoden und Verfahren angewandt:

Anmerkung:

*An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass strikt nach den entsprechenden Herstelleranleitungen der aufgelisteten Versuchskits vorgegangen wurde. Es werden jedoch mögliche Abweichungen oder nicht definierte Vorgehensweisen dargelegt.*

### 2.3.1. XTT-Test

Der XTT-Test misst die Stoffwechselaktivität der Zellen und ist somit auch ein Maß für deren Proliferation. Das Messprinzip beruht auf der Bildung eines Farbstoffs. Dieser wird durch mitochondriale Dehydrogenasen gebildet. Hierbei wird durch metabolisch aktive Zellen das gelbe Tetrazolium Salz XTT gespalten und es entsteht orangener Formazan-Farbstoff. Die Menge des innerhalb eines bestimmten Zeitraums gebildeten Farbstoffs kann quantifiziert, d. h. im ELISA-Reader photometrisch ermittelt werden.

Eine erhöhte Zellzahl geht mit einem Anstieg der mitochondrialen Dehydrogenasen einher, was wiederum eine erhöhte Bildung von orangenem Farbstoff bewirkt. Somit ist indirekt mit diesem Test auch eine Bestimmung der Wachstumsrate möglich.

Der XTT-Test wurde mit einem Zellproliferationskit durchgeführt (Cell Proliferation Kit II, Roche, REF 11 465 015 001). Dieser besteht aus:

- Reagenz 1: XTT Labeling Reagent
- Reagenz 2: Electron Coupling Reagent

### **2.3.2. Versuchsdurchführung XTT-Test**

Vor Testbeginn wurde der XTT-Test Kit portioniert. Hierbei wurden vom Reagenz 1 (XTT Labeling Reagent) je 2,5 ml und vom Reagenz 2 (Electron Coupling Reagent) je 50 µl in entsprechende Reagenzgefäße portioniert und bei -20°C eingefroren. Kurz vor dem Gebrauch wurden die portionierten Reagenzien aufgetaut und miteinander vermischt.

Vor Zugabe der vermischten Reagenzien wurden die Titanplättchen, wie auch das entsprechende Medium in saubere bzw. unbenutzte Wells (Corning Incorporated, 48-Well-Zellkulturplatten, Kat.Nr. 3548) versetzt. Somit wurde gewährleistet, dass nur Zellen auf den verwendeten Titanproben im Test gemessen werden und nicht auch die Stoffwechselaktivität der Zellen, die am Rand bzw. an den Wänden der Wells anhaften in die Testergebnisse mit einfließt. Im Anschluss wurden je 250 µl vom portionierten Testgemisch zu den bereits vorhandenen 500 µl Medium zugegeben.

Nach vierstündiger Einwirk- bzw. Reaktionszeit bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator erfolgte die photometrische Messung. Hierbei wurden 250 µl aus 750 µl im ELISA-Reader (SLT Labinstruments GmbH, ELISA EAR 340 ATTC, Mod.: B016.925) bei einer Messwellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm vermessen.

### **2.3.3. BrdU-Test**

Der BrdU-Test dient der Quantifizierung der Zellproliferation. Hierbei werden alle im Testzeitraum gebildeten Zellen markiert. Dies geschieht mittels eines Markers, eines sozusagen „falschen“ DNA-Bausteins (Bromdesoxy-Uridin; BrdU). Jener Marker wird während eines bestimmten Zeitintervalls (Markierungszeitraum) dem Zellkulturmedium zugesetzt. Innerhalb dieses Markierungszeitraums wird er an Stelle von Thymidin in die DNA aller neugebildeten Zellen eingebaut. Im Anschluss werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Durch Löcher in der Zellmembran wird ein Zugang für gegen BrdU gerichtete enzymgekoppelte Antikörper (Anti-BrdU-POD) geschaffen.

Nach anschließender Zugabe von Substrat erfolgt eine Peroxidase-Farbreaktion. Die entstandene Farbe, bzw. die Extinktion kann nun photometrisch mit Hilfe des ELISA-Readers gemessen werden. Sie ist proportional zur Menge an neu gebildeter DNA und ergibt somit eine direkte Quantifizierung der Proliferation während des Markierungszeitraums.

Der BrdU-Test wurde ebenfalls mit einem Zellproliferationskit (Cell Proliferation ELISA/BrdU (colorimetric), Roche, REF 11 647 229 001) durchgeführt. Dieser besteht aus:

- Reagenz 1: BrdU Labeling Reagent
- Reagenz 2: Fix Denat
- Reagenz 3: Anti-BrdU-POD
- Reagenz 4: Antibody Dilution Solution
- Reagenz 5: Washing Buffer
- Reagenz 6: Substrate Solution

### **2.3.4. Versuchsdurchführung BrdU-Test**

Im ersten Schritt erfolgte die Zugabe von 50 µl BrdU Labeling Solution (BrdU Labeling Reagent 1:100 in Mc Coy's Kulturmedium) pro Well. Jedes Well enthielt zu diesem Zeitpunkt bereits 500 µl Zellkulturmedium. Es erfolgte eine 24-stündige Wachstumsphase im Inkubator (37°C und 5 % CO<sub>2</sub>). Nach Ablauf der 24 Stunden wurden alle Wells bzw. das darin enthaltene Medium mit BrdU labeling mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Im Anschluss wurden je 400 µl Fix Denat pro Well hinzugefügt, um die Zellen zu fixieren und denaturieren. Es folgte eine 30-minütige Einwirkzeit bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde das zugeführte Fix Denat wieder abgesaugt und 150 µl Anti-BrdU-POD Working Solution (Anti-BrdU-POD Stock Solution 1:100 mit Antibody Dilution Solution) pro Well hinzugefügt, mit einer Reaktionszeit von einer Stunde im Inkubator. Nach anschließendem Absaugen des Anti-BrdU wurden alle Wells dreimal mit 600 µl Washing Solution (Washing Buffer 1:10 mit

destilliertem Wasser) gewaschen. Daraufhin wurden pro Well 250 µl Substrat zugegeben. Nach 5-minütiger Reaktionszeit wurde mit je 62 µl einer 1 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) die Reaktion auf dem Orbitalschüttler (IKA-Labortechnik, AS 501.5 digital) bei ca. 300 rpm abgestoppt. Die anschließende Messung der Extinktion im ELISA-Reader erfolgte innerhalb von 5 Minuten. Es wurden je 200 µl von 250 µl bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 550 nm vermessen.

### **2.4. Adhäsion und Ausbreitung**

Um die erzielte Zelldichte auf den Titanproben sichtbar zu machen wurden die Zellen mittels Kristallviolett (Sigma-Aldrich GmbH, REF HT90132-1L) gefärbt. Es handelt sich dabei um einen violetten Triphenylmethanfarbstoff, der zum Anfärben von Bakterien und Zellen verwendet werden kann. Hierbei werden die Proteine einer Zelle gefärbt, was eine Photodokumentation ermöglicht. Durch Eluieren des Farbstoffes und photometrische Messung bei 550 nm kann das Zellwachstum quantifiziert werden.

#### **2.4.1. Versuchsdurchführung Kristallviolett färbung**

Nach der entsprechenden Wachstumsphase der Zellen in den jeweiligen Versuchen wurde das Kulturmedium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die entsprechenden Wells mit den enthaltenen Titanproben je einmal mit 400 µl Hanks Salt Solution (Biochrom AG, Berlin, Cat No.: L2035) gewaschen. Daraufhin erfolgte das Fixieren der Zellen mit je 400 µl 3 % Paraformaldehyd (in PBS<sup>-</sup>) mit einer Einwirkdauer von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Einwirkdauer folgte das Absaugen der Lösung. Danach fand der eigentliche Färbeprozess statt. Dies geschah durch Zugabe von 0,5 % Kristallviolett in 20 % Methanol Lösung zu je 200 µl pro Well für 15 Minuten. Danach wurde mit jeweils 250 µl PBS<sup>-</sup> solange gewaschen, bis in der Waschlösung keine Farbe mehr sichtbar war (ca. fünf Waschdurchgänge). Im nächsten Schritt erfolgte die Bewertung der Proben unter dem Mikroskop (WILD Photomikroskop M400)

sowie die Photodokumentation (Canon EOS 550 D), wozu die Proben jeweils einzeln in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Petrischale überführt wurden. Nach beendeter Dokumentation wurden die Proben zurück in eine 48-Wellplatte überführt und die Farbe durch Zugabe von je 200 µl Methanol für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler eluiert. Von der entstandenen Farblösung wurden je 150 µl im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm vermessen.

### **2.5. Verwendete Peptide und Fibronektin**

Die in den Versuchen angewendeten Peptide Nr. 1 bis Nr. 6 stammen von der Firma EMC microcollections GmbH, D-72070 Tübingen. Es handelt sich hierbei um die folgenden Aminosäure-Sequenzen, deren ursprüngliches Vorkommen im Folgenden mit aufgeführt wird.

Peptid Nr. 1 (P1) = FAKLAARLYRKAC/Antithrombin 3

Peptid Nr. 2 (P2) = GRGDSC/Cell-Matrix Interaction Domain

Peptid Nr. 3 (P3) = GGGGRGDSPC/Cell-Matrix Interaction Domain

Peptid Nr. 4 (P4) = DGEAC/Type 1 Collagen

Peptid Nr. 5 (P5) = CGGNGEPRGDTYRAY/Bone Sialoprotein

Peptid Nr. 6 (P6) = EEEEEEEPRGDTC/Cell-Matrix Interaction Domain

Fibronektin (FN) = 2355 Aminosäuren / Protein

Für die Vorversuche wurde "Fibronectin from bovine plasma" verwendet (Sigma-Aldrich GmbH, Bestell-Nr.: F-1141).

Für die Hauptversuche "Fibronectin from human Plasma" (Sigma-Aldrich GmbH, Bestell-Nr.: F0895-5MG).

In den Vorversuchen wurde zur Etablierung des Kopplungsverfahrens ein kommerziell erhältliches RGD-Peptid eingesetzt:

RGD-Sequenz = universelle Anheftungssequenz von ECM-Proteinen

Aminosäuresequenz / Arg-Gly-Asp

(Sigma-Aldrich GmbH, Bestell-Nr.: A-8052).

RGD1 = RGD-Sequenz mit Kopplungspuffer  $\text{PBS}^-$

RGD2 = RGD-Sequenz mit Kopplungspuffer  $\text{NaHCO}_3$

Alle von der Firma EMC für die Studie synthetisierten Peptide enthalten eine für den Kopplungsvorgang einsetzbare freie Thiolgruppe (-SH) des Cysteins (C). Im Falle von FN und RGD stehen primäre Amine bzw. freie Aminogruppen für die angestrebte Kopplung zur Verfügung.

Für die geplante kovalente Kopplung empfehlen sich zwei unterschiedliche Puffersysteme. Hierbei handelt es sich um den Phosphatpuffer ( $\text{PBS}^-$ ; pH 7,5) und den Natriumcarbonatpuffer ( $\text{NaHCO}_3$ ; pH 9,6). Für Thiolgruppen eignet sich  $\text{PBS}^-$ , wohingegen  $\text{NaHCO}_3$  für Thiol- sowie Aminogruppen verwendet werden kann. Anhand von RGD sollen die beiden verschiedenen Puffersysteme im Folgenden miteinander verglichen werden (siehe Vorversuche).

### **2.5.1. Protein- / Peptidkopplung**

Die verwendeten Titanproben wurden mit den entsprechenden Proteinen bzw. Peptiden mit Hilfe eines photoaktivierbaren Linkers (Photocoupling) beschichtet. Hierbei wurden die verwendeten Peptidsequenzen bzw. Proteine kovalent mit den Titanoberflächen verbunden. Vor dem eigentlichen Photocoupling erfolgte die Silikatisierung der Oberflächen. Im Anschluss folgte das Silanisieren mit 3-Glycidyloxypropyltrimethyl-oxysilan (= GOPTS; Sigma-Aldrich GmbH, REF 440167-100ML). Mittels Antrachinon (EXIQON, EQ-0078-01, 20g/L), einem Photoimmobilizer, erfolgte schließlich das Photocoupling, was die kovalente Bindung von Proteinen auf der Oberfläche ermöglicht.

Das Silikatisieren erfolgte unter Anwendung eines „Mini-Silicoaters“ (Silano-Pen der Firma Bredent, Nr. 320 00 470).

### **2.5.2. Versuchsdurchführung Protein- / Peptidkopplung**

Die Modifizierung der Oberflächen lässt sich in drei Schritte untergliedern. Hierbei handelt es sich um das Silikatisieren, das Silanisieren und die eigentliche Proteinkopplung.

Das Silikatisieren erfolgte mit dem Silano-Pen. Hierzu wurde jede Titanprobe fünf Sekunden mit der Flamme behandelt, wozu der Silano-Pen mit kreisenden Bewegungen geführt wurde. Danach wurden die nun aktivierten Proben in eine Petrischale überführt.

Im nächsten Schritt erfolgte das Silanisieren. Dazu wurde auf die gereinigten und aktivierten Plättchen bzw. deren Oberfläche je 50 µl GOPTS aufgetropft und das Becherglas mit dem entsprechenden Deckel verschlossen. Es folgte eine einstündige Reaktionszeit bei Raumtemperatur, woraufhin das GOPTS unter Verwendung der Wasserstrahlpumpe seitlich abgesaugt wurde. Daraufhin wurden die Plättchen mit Aceton (Merck KGaA, D-64271 Darmstadt, Bestellnummer 1000142511, Wassergehalt  $\leq 0,05$  %) gespült, wozu das Becherglas mit dem Aceton geflutet wurde. Im Anschluss erfolgte eine kurze Trockenphase. Nach erfolgtem Trocknen wurden die Proben in eine 48-Wellplatte überführt.

Vor der eigentlichen Proteinkopplung wurden je 180 µl Anthrachinon (1,6 mg/l in destilliertem Wasser) auf die Proben aufgetropft und die Proben mit dem aufgetropften Photoimmobilizer unter der UV-Bank (Appligene onco', Typ T.Tamer) mit zwei UV-Lampen der Leistung 15 W (Philips ultraviolett 15 W G15-T8) mit einer Wellenlänge von 254 nm in einem Abstand von 13,7 cm 60 Minuten bestrahlt. Nach Ablauf des Bestrahlungszeitraums wurde die Lösung abgesaugt und die Proben weiterverarbeitet. Es folgte das Applizieren der entsprechenden Peptide. Hierzu wurden 100 µl der Protein-/Peptidlösung (0,16 µg/µl Protein bzw. Peptid in pyrogenfreiem Wasser (Fresenius Kabi GmbH, Wasser für Injektionszwecke/Ampuwa, Ch.B. 14FA1009) aufgetropft.

Dies entspricht einer Konzentration von ca. 4,8 µg/cm<sup>2</sup>. Die Titanproben lagerten hierbei in 48-well-Platten und die zu koppelnde Oberfläche war mit der Protein-/Peptidlösung bedeckt. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 1 Stunde im Brutschrank. Anschließend wurden die Proben getrocknet, in neue 48-Wellplatten überführt und im Kühlschrank für die anschließenden Versuche aufbewahrt.

### **2.5.3. Fibronektin-Nachweis**

Die erfolgreiche Kopplung von Fibronektin an die Titanoberflächen wurde mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes (TRITC = Tetramethylrhodamine-5 (und 6)-isothiocyanate) nachgewiesen. Dazu wurde ein gegen die „Cell Binding Domain“ gerichteter Erstantikörper (Millipore, MAB 1937) und ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper (Sigma, T 5393-1ML) eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

### **2.5.4. Versuchsdurchführung Fibronektin-Nachweis**

Die Proben wurden für den FN-Nachweis in eine 48-Wellplatte überführt und pro Well je 400 µl Ziegenserum (5 % in PBS<sup>-</sup>) zugegeben. Anschließend folgte eine 15-minütige Reaktionszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln. Daraufhin wurde mit 500 µl je dreimal gespült. Anschließend wurden je 100 µl der Erstantikörperlösung (Verhältnis 1:500/Lösung in 5 % Ziegenserum + 1 % BSA in PBS<sup>-</sup>) zugegeben, 45 Minuten inkubiert und dann dreimal mit je 600 µl PBS<sup>-</sup> gespült.

Daraufhin folgte die Zugabe von 100 µl des Zweitantikörpers (Verhältnis 1:2000 /Lösung in 5 % Ziegenserum + 1 % BSA in PBS<sup>-</sup>) pro Well mit einer weiteren Inkubationszeit von 45 Minuten. Es wurde wieder dreimal gespült mit je 600 µl PBS<sup>-</sup>. Die gefärbten Proben wurden entnommen, mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Nikon 137556, OPTIPHOT-2) ausgewertet und die Ergebnisse mit der Kamera (Objektiv/Tokina AT-X Pro 52) dokumentiert.

### 2.5.5. Peptid-Nachweis

Der Nachweis der gekoppelten Peptide erfolgte mit einem sogenannten FITC Antibody Labeling Kit (Thermo Scientific, Number 53027). Hierbei wird ein Fluoreszenzfarbstoff (FITC = fluorescein isothiocyanate) an das entsprechende Peptid gekoppelt.

Der Fluoreszenzfarbstoff kann an Amino-, Sulfhydryl-, Imidazol-, Tyrosyl- und Carbonylgruppen von Proteinen und Peptiden gekoppelt werden. Die angesprochenen Gruppen sind u. a. Bestandteil der folgenden Aminosäuren:

Imidazolgruppe	= Histidin (H)
Sulfhydrylgruppe	= Cystein (C)
Tyrosylgruppe	= Tyrosin (Y)
Carbonylgruppe	= Asparagin (N), Glutamin (Q)
Aminogruppe	= Asparagin (N), Glutamin (Q), Histidin (H), Lysin (K), Arginin (R), N-Ende aller verwendeten Peptide

Der Nachweis erfolgte mit dem Peptid P1 stellvertretend für alle angewendeten Peptide, da dieses Peptid die meisten freien Bindungsstellen besitzt.

Im Versuchskit waren alle nötigen Reagenzien und Materialien bereits enthalten. Es handelte sich um 3 Fläschchen FITC, 1 ml Borat Puffer (0,67 M), 5 ml Purification Resin, 6 Spin Columns und 12 Microcentrifuge Collection Tubes.

### 2.5.6. Versuchsdurchführung Peptid-Nachweis

#### Schritt 1: Protein Preparation

Als erstes wurde der Labeling Puffer hergestellt. Hierzu wurden 75 µl des im Kit enthaltenen Borat Puffers in 925 µl PBS<sup>-</sup> verdünnt. Im Folgenden wurde 1 mg Peptid in 0,5 ml des hergestellten Labeling Puffers gelöst (= 2 mg/ml Peptid in

Labeling Puffer). Danach wurden 40 µl Borat Puffer zu 0,5 ml der Proteinlösung zugegeben.

### Schritt 2: Protein Labeling

Zuerst wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurden 0,5 ml des oben vorbereiteten Peptids in ein Fläschchen FITC gegeben, zehnmal auf- und abpipettiert, bis sich der Farbstoff gelöst hatte und gevortext. Als Nächstes kam das Fläschchen in die Zentrifuge (Heraeus SEPATECH, Biofuge 15, Fabr.-Nr.: 236384). Es wurde 30 Sekunden bei 1.000 g zentrifugiert. Das Peptid-FITC-Gemisch wurde im Folgenden für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

### Schritt 3: Protein Purification

Hierzu wurden zwei Spin Columns in Microcentrifuge Collection Tubes gesetzt. Das Purification Resin wurde gemischt bzw. gevortext und jeweils 400 µl davon in beide Spin Columns gegeben. Es wurde 45 Sekunden mit 1000 g zentrifugiert um die Storage Solution zu entfernen. Die gebrauchten Collection Tubes wurden verworfen und die beiden Spin Columns in neue Collection Tubes umgesetzt. Es folgte die Zugabe von 250 µl des gelabelten Peptids aus Schritt 2 in jedes der beiden Spin Columns. Das Peptid-FITC-Gemisch wurde durch Auf- und Abpipettieren und Vortexen mit dem Purification Resin vermischt. Im Anschluss wurde 45 Sekunden mit 1000 g zentrifugiert. Das sozusagen nun reine und gelabelte Peptid beider Columns wurde vereinigt und im Kühlschrank bei 4°C zwischengelagert.

Als Nächstes wurde das gelabelte Peptid appliziert bzw. an die Titanproben gekoppelt. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Proben mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgewertet und die Ergebnisse mit der Digitalkamera festgehalten.

## 2.6. PCR

Um den Einfluss der Peptidbeschichtungen auf die osteogene Differenzierung zu quantifizieren, wurde die Expression verschiedener osteogener Marker mittels RT-PCR untersucht. Die Durchführung gliederte sich in zwei Schritte, deren Durchführung im Folgenden erläutert werden soll. Es handelte sich hierbei um die RNA-Extraktion und die eigentliche quantitative RT-PCR.

### 2.6.1. Versuchsdurchführung RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin RNA XS – Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, REF 740902), der bereits sämtliche nötige Reagenzien enthält. Als erstes erfolgte die Zellyse. Hierzu wurde zu den Proben in jedes Well 102 µl Lysis Puffer RA1 + TCEP zugegeben. Die 48-Well-Zellkulturplatten standen hierbei auf Eis. Es folgte das Abkratzen der Zellen mittels eines Zellschabers. Im Anschluss wurde das Lysat von je drei Parallelproben vereinigt und je 5 µl Carrier RNA Working Solution zugefügt. Die Lösung wurde gevortext und gespinnt.

Zur DNA-/RNA-Fällung wurde pro Probe 300 µl 70 % Ethanol zugegeben und mit Hilfe einer Insulinspritze mehrmals (ca. fünfmal) auf- und abpipettiert. Um die Bindung der Nukleinsäure an die Säulchen-Membran zu erreichen, wurde das präzipitierte Lysat in ein blaues NucleoSpin RNA XS Säulchen pipettiert und für 30 Sekunden bei 18°C und 11.000 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 R). Die Säulchen wurden in ein frisches Collection Tube überführt.

Um die Membran zu entsalzen und zu trocknen wurden je 100 µl Membrane Desalting Buffer (MDB) hinzugefügt und wieder bei 11.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Mit dem Ziel die DNA zu verdauen wurden je 25 µl DNase Reaction Mixture auf die Membran pipettiert, die Säulchen geschlossen und 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt erfolgte das Waschen und Trocknen der Membran. Es wurden zuerst 100 µl RA2 Puffer zugegeben, 2 Minuten bei Raumtemperatur in-

kubiert und im Anschluss mit 11.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Hiernach wurden die Säulchen in frische Collection Tubes gesetzt, 400 µl RA3 Puffer zugegeben und wieder für 30 Sekunden zentrifugiert. Danach wurden noch mal 200 µl RA3 Puffer zugegeben und für 2 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Die nun trockenen Säulchen wurden in 1,5 ml Eppendorf Cups überführt.

Um die RNA zu eluieren wurden 10 µl RNase freies Wasser auf die Säulchen pipettiert und bei 11.000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der RNA-Menge. Hierzu wurden jeweils 1,4 µl RNA der entsprechenden Probe zu je 68,6 µl RNase freiem Wasser in eine Messküvette gegeben (Gesamtvolumen 70 µl; Faktor 1:50) und gemischt. Es folgt das Vermessen der Lösungen im Photometer (GeneQuant, Amersham Biosciences, Ser. Nr. 96056) bei 260 nm. Als Referenz diente eine Messküvette mit 70 µl RNase freiem Wasser. Nach dem Vermessen der jeweiligen Proben wurde die RNA-Konzentration unter Berücksichtigung des Faktors 1:50 berechnet. Es folgte die Lagerung der RNA bei -70°C.

### **2.6.2. Versuchsdurchführung quantitative RT-PCR**

Nach dem Auftauen der Proben wurden die nötigen Verdünnungen hergestellt. Es war ein Gesamtvolumen 5 µl erforderlich, welches sich aus der Zugabe von 15 ng RNA (unter Berücksichtigung der oben gemessenen und berechneten Konzentration) in nukleasefreies Wasser ergab. Zu diesen 5 µl wurden wiederum 5 µl RT-Mix zugegeben. Diese 5 µl setzten sich aus 4 µl T-Script Buffer und 1 µl T-Script Enzyme zusammen. Die Lösung wurde gevortext und zentrifugiert. Dieses Gemisch wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert (Eppendorf Mastercycler personal, No. 5332 55015). Die Reaktion wurde durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C für 5 Minuten mit anschließendem Abkühlen auf 22°C gestoppt.

Als Nächstes wurden 10 µl des Ligation Mix zu obiger Lösung zugegeben. Die 10 µl Ligation Mix setzten sich aus 6 µl Ligation Buffer, 2 µl Ligation Reagent, 1 µl Ligation Enzyme 1 sowie 1 µl Ligation Enzyme 2 zusammen. Es folgte ein Inkubationszeitraum von 2 Stunden bei 22°C.

Zu der Ligationsreaktion wurden je 30 µl des Amplification Mix zugegeben. Diese 30 µl bestanden aus 29 µl REPLI-g Midi Reaction Buffer und 1 µl REPLI-g Midi DNA Polymerase. Es wurde 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C für 5 Minuten gestoppt. Die cDNA wurde 1:250 mit PCR-Wasser verdünnt (1 µl cDNA + 250 µl PCR-Wasser).

Der LightCycler-Adapter wurde aus dem Kühlschrank entnommen und die Kapillaren in diesen überführt. In die 27 Kapillaren wurden die Standards S1-S4, 11-mal GAPDH Mix, elfmal der Proben-Mix für den entsprechenden osteogenen Marker sowie eine Negativkontrolle pipettiert. Im Anschluss wurden je 2 µl cDNA der Proben zu den Kapillaren mit GAPDH und dem jeweiligen Gen hinzu pipettiert (= Gesamtvolumen 20 µl). Die Kapillaren wurden verschlossen und bei 8°C und  $1,4 \times 1.000$  rpm 1 Minute lang zentrifugiert und im Anschluss in den LightCycler (Roche LightCycler 1.5, Ser.Nr. 1409017) überführt und die RT-PCR gestartet. Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte in ca. 35 bis 38 Zyklen.

Es waren zur Auswertung der Hauptversuche 10 Runs im LightCycler nötig. Hierbei handelte es sich um die fünf ausgewählten Marker für die Hauptversuche. Außerdem war jeweils ein gesonderter Durchlauf für die induzierten und nicht induzierten Proben nötig. Als Referenz bzw. Vergleich diente GAPDH.

### Bestandteile der einzelnen Reagenzien bzw. Lösungen

S1 = Gen-DNA von GAPDH mit bestimmter Kopienzahl pro µl

S2 = 18 µl Standard Stabilisator + 2 µl S1

S3 = 18 µl Standard Stabilisator + 2 µl S2

S4 = 18 µl Standard Stabilisator + 2 µl S3

Standard S1 = 10 µl Standard Mix + 10 µl S1

Standard S2 = 10 µl Standard Mix + 10 µl S2

Standard S3 = 10 µl Standard Mix + 10 µl S3

Standard S4 = 10 µl Standard Mix + 10 µl S4

Standard Mix = 30 µl PCR Wasser, 10 µl Primermix, 10 µl SYBR Green

GAPDH Mix = 14 µl PCR Wasser, 2 µl Primermix/GAPDH, 2 µl SYBR Green

Proben Mix = 14 µl PCR Wasser, 2 µl Primermix/Primer x, 2 µl SYBR Green

Negativkontr. = 10 µl Standard Mix, 10 µl PCR Wasser

### Bezugsquellen / Hersteller

Sämtliche oben aufgeführte Reagenzien/Lösungen stammen von der Firma Roche Diagnostics Deutschland GmbH. Ausgenommen hiervon ist der Standard Stabilisator sowie die Gen-DNA von GAPDH (S1). Diese Versuchsreagenzien stammen von der Firma Search-LC GmbH; D-69120 Heidelberg.

### **2.6.3. Osteogene Marker**

Alle nachgewiesenen osteogenen Marker werden im Folgenden aufgeführt. Die hierfür nötigen Primer stammen von der Firma Search-LC GmbH.

AP = Alkalische Phosphatase  
OSN = Osteonectin  
Osx = Osterix  
OCN = Osteocalcin  
OPN = Osteopontin  
Igf-2 = Insulin-like growth factor 2  
Coll1a1 = Collagen 1a1  
Per = Periostin

## 2.7. Datenanalyse / Statistik / Berechnungen

Die für die einzelnen Proben ermittelten Extinktionen wurden in Excel-Datenblätter importiert und weiter prozessiert. Für die zusammenfassende Darstellung wurden Mittelwerte (MW) sowie die Standardabweichung (SD) aus der entsprechenden Anzahl der Parallelproben errechnet.

Zur Darstellung der Messwerte in % wurden die Einzelwerte durch den Mittelwert der unmodifizierten Plättchen (= Referenz unmodifiziert) dividiert und danach mit 100 multipliziert. Im Anschluss erfolgte für die Prozentwerte die Berechnung der Mittelwerte sowie der Standardabweichung nach obigem Schema.

Die zusammenfassenden Darstellungen (Grafiken) enthalten für die entsprechende Oberfläche die gemittelten Werte aus den jeweiligen Einzelwerten. Die Anzahl der unabhängigen Experimente sowie die genaue Anzahl der Parallelproben sind im Ergebnisteil unter den jeweiligen Versuchen aufgeführt.

Unter der Annahme, dass die Messwerte normal verteilt sind, wurde die statistische Signifikanz geprüft. Hierzu wurde der Student-t-Test (Zweistichproben t-Test: unterschiedliche Varianzen) angewendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von 95 % festgelegt.

Die Ergebnisse wurden in Form von Balken- und Liniendiagrammen dargestellt. Die Diagramme geben die Mittelwerte und im Falle der Balkendiagramme auch die zugehörigen Standardabweichungen wieder.

Für die statistische Auswertung der einzelnen Tests und Versuche lagen die im Folgenden aufgeführten Besonderheiten zu Grunde.

### **2.7.1. Kristallviolett färbung / BrdU-Test / XTT-Test**

Bei diesen Versuchen wurden zusätzliche Kontrollen zur Ermittlung der unspezifischen Hintergrundfärbung (HG) mitgeführt. Es handelte sich hierbei um Medium in gesonderten Wells ohne Zellen und ohne Titanplättchen.

Der Mittelwert dieser Hintergrundkontrollen wurde von den Ursprungswerten abgezogen. Daraufhin erfolgte die Berechnung der Prozentwerte sowie der Mittelwerte und Standardabweichungen.

In den Hauptversuchen wurden jeweils drei dieser Hintergrundkontrollen mitgeführt. Bei dem verwendeten Medium handelte es sich um Induktionsmedium.

### **2.7.2. RT-PCR**

Aus den Ursprungswerten der RT-PCR wurde zuerst der nötige Quotient gebildet. Hierzu wurde die Expression des jeweiligen Gens durch die Expression der Referenz GAPDH ("Housekeeping Gene") dividiert und anschließend mit dem Faktor 1.000 multipliziert. Dieser Schritt erfolgte für die induzierten wie auch für die nicht induzierten Proben. Es handelte sich um Einzelwerte, die dementsprechend auch in den Grafiken so aufgeführt werden.

Um den Induktionsfaktor zu bestimmen wurden die obigen Werte der Genexpression verwendet. Es folgte die Bildung des Quotienten aus den Werten der Genexpression der induzierten Proben dividiert durch die Genexpression der nicht induzierten Proben.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Vorversuche

Ziel der Vorversuche war es, das Verhalten von Osteoblasten (SAOS-2) hinsichtlich deren Wachstum, Adhäsion und Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation auf den verschiedenen Implantatoberflächen zu bewerten, sowie einen sicheren und erfolgreichen Peptidkopplungsvorgang zu gewährleisten. Ein Weiteres war es, eine gewisse Routine bei den entsprechenden Versuchen, Methoden und Vorgehensweisen zu gewinnen.

**Anmerkung:**

*Um ein flüssiges Lesen der vorliegenden Dissertation zu ermöglichen wird im Text streckenweise darauf verzichtet, den Bezug zu den verwendeten Zellen herzustellen. Das heißt, es ist ggf. lediglich von den entsprechenden Oberflächen, den verwendeten Peptiden oder Modifikationen die Rede. Mit sämtlichen Aussagen und Formulierungen sind jedoch **immer** die Zellkulturen und das Verhalten bzw. der Einfluss auf diese gemeint.*

#### 3.1.1. Osteoblastenwachstum auf verwendeten Titanoberflächen

Zu Beginn der Vorversuche wurde das Osteoblastenwachstum auf den verschiedenen Titanplättchen (Oberflächen Nr. 1 bis Nr. 5) verglichen. Hierzu wurden die entsprechenden Proben mit 30.000 Zellen angeimpft und nach einer viertägigen Wachstumsphase die Zellbesiedelung der SAOS-2 Osteoblasten ausgewertet. Um die Unterschiede sichtbar zu machen kam die Kristallviolett-färbung zum Einsatz. Es wurden jeweils drei Parallelproben mitgeführt. Stellvertretend für die entsprechenden Parallelproben wird im Folgenden je eine dieser Proben beispielhaft aufgeführt (siehe S. 31, Abb. 1).

# Ergebnisse

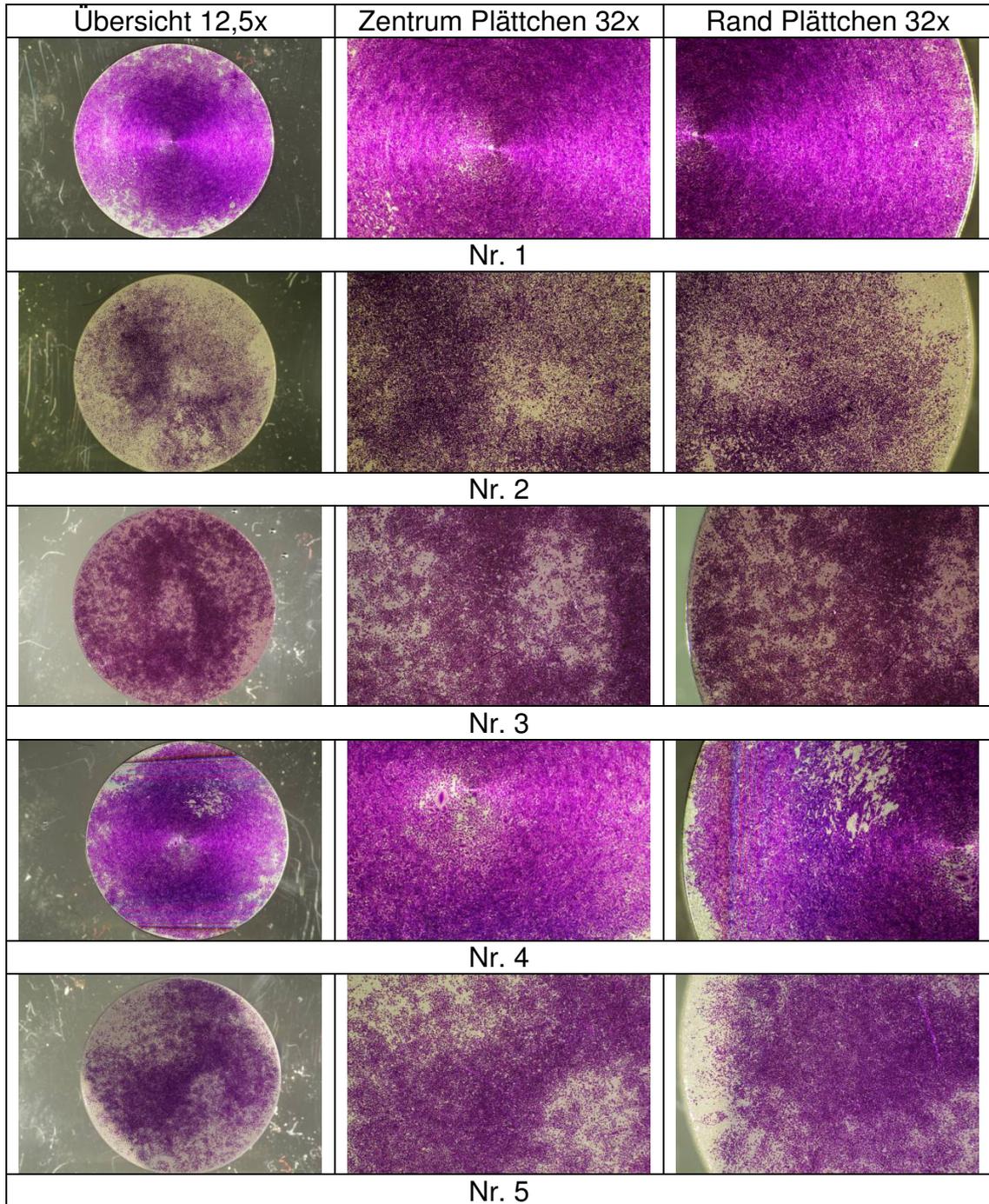


Abb. 1: Kristallviolettffärbung, Camlog Oberflächen Nr.1 bis Nr.5, SAOS-2 Osteoblasten, 30.000 Zellen angeimpft, vier Tage Wachstum.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die zu verwendenden Oberflächen für die weiteren Vorversuche ausgewählt. Hierbei fiel die Wahl auf die hinsichtlich der Zellbesiedelung schlechten Oberflächen um zu prüfen, ob eine Beeinflussung bzw. Verbesserung dieser durch die jeweiligen Modifikationen zu erzielen ist.

### **3.1.2. Nachweis der Fibronektinkopplung**

Im nächsten Schritt erfolgte der Nachweis der Fibronektin-Kopplung auf allen zur Verfügung stehenden Ti-Oberflächen um sicherzustellen, dass die angewendete Coating-Methode auf glatten wie auch auf rauen Titanoberflächen erfolgreich ist. Dies erfolgte mittels eines Antikörpernachweises, bei dem der Fluoreszenzfarbstoff TRITC zum Einsatz kam um das an das Titan gekoppelte FN sichtbar zu machen bzw. anzufärben (siehe Material und Methoden S. 21).

Abb. 2 auf S. 33 zeigt exemplarische Aufnahmen der Antikörperfärbung. Es werden jeweils zentrale und periphere Bereiche der fünf verwendeten Titanoberflächen aufgeführt.

### **3.1.3. Ergebnis Fibronektinkopplung**

Auf allen Oberflächen war unter dem Fluoreszenzmikroskop eine deutlich ausgeprägte rote Fluoreszenzmarkierung zu erkennen (siehe S. 33, Abb. 2). Die FN-Kopplung war somit erfolgreich.

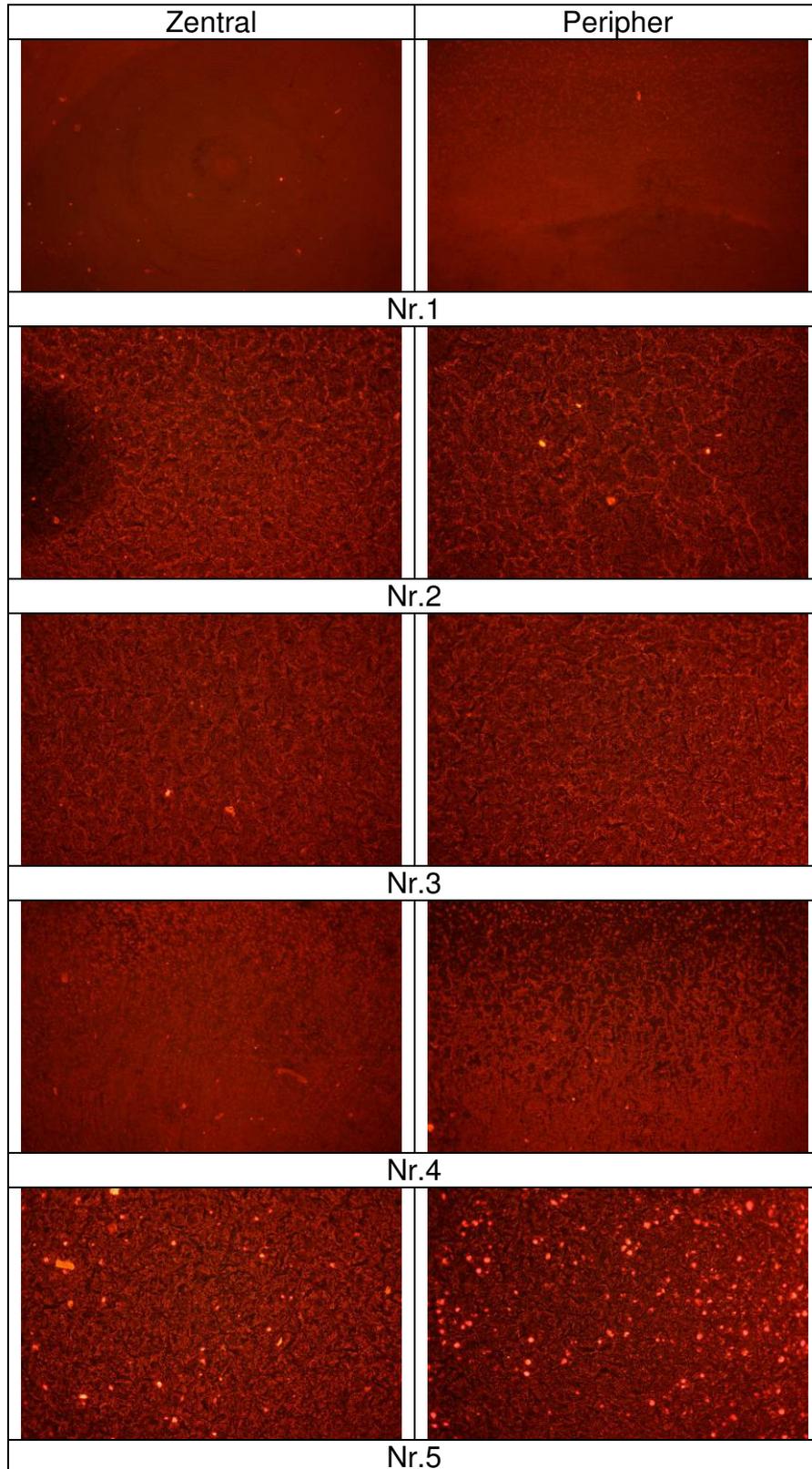


Abb. 2: Antikörperfärbung, Fluoreszenzfarbstoff TRITC auf FN gekoppelten Camlog Oberflächen Nr.1 bis Nr.5, 20-fache Vergrößerung.

### **3.1.4. Nachweis der Peptidkopplung**

Da für die Peptide keine Antikörper verfügbar waren, musste für den Nachweis einer erfolgreichen Kopplung eine andere Nachweismethode eingesetzt werden. Dazu wurde ein Fluoreszenzmarker unmittelbar an das Peptid gekoppelt. Dies erfolgte anhand des sogenannten FITC-Labelings. Der Nachweis wurde mit dem Peptid P1 stellvertretend für alle angewendeten Peptide durchgeführt, da dieses die meisten freien Bindungsstellen besitzt (siehe Material und Methoden S. 22). Als Oberfläche diente die in den Hauptversuchen verwendete Oberfläche Nr. 2 (Camlog-Promote). Es wurden für die unterschiedlichen Inkubationszeiträume, sowie für die Referenz ohne gekoppeltes Peptid, jeweils drei Parallelproben mitgeführt. Die Inkubationszeiträume betragen 15 Minuten und 1 Stunde.

Abb. 3 auf Seite 35 zeigt exemplarische Aufnahmen des Peptidnachweises unterschiedlicher Inkubationszeiträume auf der Camlog Promote-Oberfläche.

### **3.1.5. Ergebnis Peptidkopplung**

Die Peptidkopplung war erfolgreich. Dieses Ergebnis ist deutlich am Vergleich zur Referenzoberfläche sichtbar (siehe S. 35, Abb. 3 c). Ebenso war die gekoppelte Menge an Peptid auf der gesamten Oberfläche der Titanplättchen, d.h. zentral und peripher, gleichmäßig verteilt (siehe S. 35, Abb. 3 a, b). Deutliche Unterschiede sind auch anhand der Gegenüberstellung der beiden Inkubationszeiträume zu erkennen. Die unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbare Färbung der Oberfläche war bei dem einstündigen Inkubationszeitraum deutlich intensiver als nach 15-minütiger Inkubation (siehe S. 35, Abb. 3 d). Diese Ergebnisse bestätigten die angewandte Verfahrensweise zur Peptidkopplung.

Ziel der folgenden Vorversuche war es herauszufinden, ob die Beschichtung mit verschiedenen Peptiden hinsichtlich der initialen Anheftung der Zellen (1 Std. Adhäsion) sowie der Proliferation und Stoffwechselaktivität nach längerem Versuchszeitraum (zwei Tage), eine fördernde Wirkung haben.

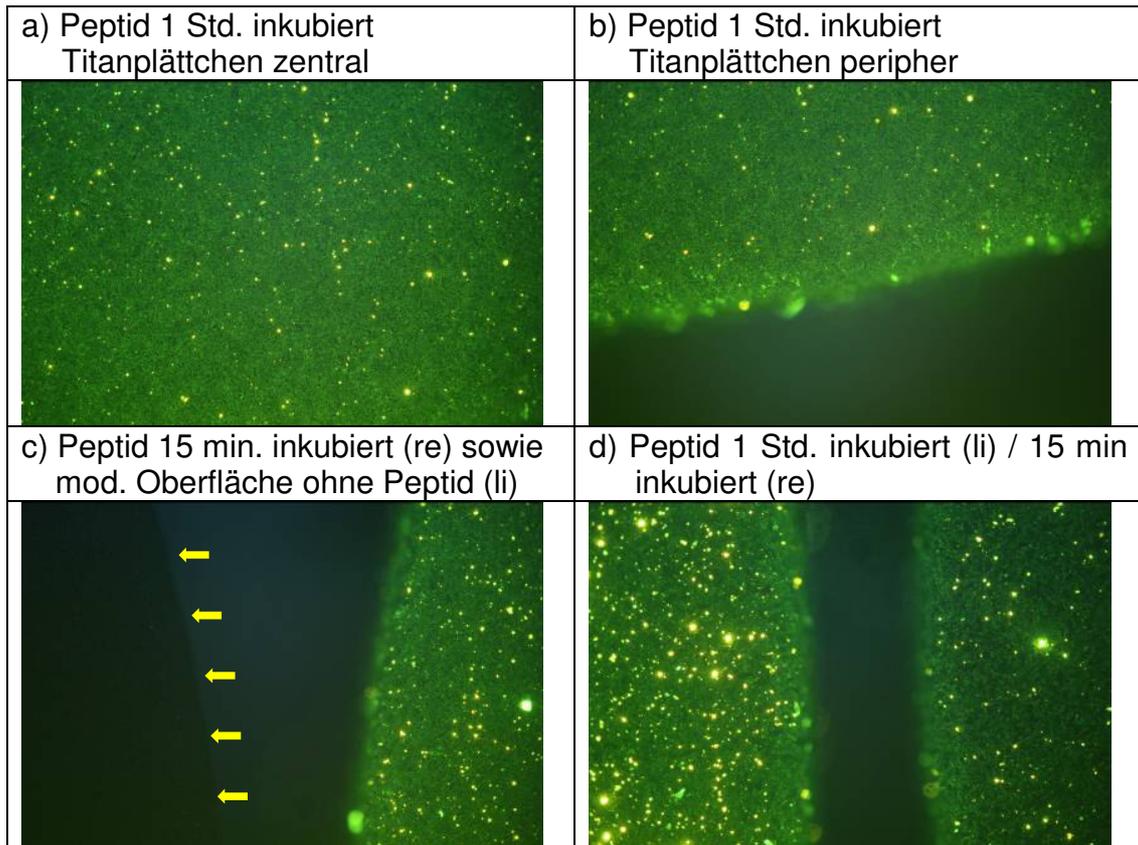


Abb. 3: Peptidnachweis/FITC-Labeling, Oberfläche Camlog Promote, unterschiedliche Inkubationszeiträume sowie ungelabelte Referenzoberfläche, 20-fache Vergrößerung.

### 3.1.6. Initiale Anheftung auf rauer Titanoberfläche

In diesem Versuch kam die Oberfläche Camlog Promote (Nr. 2) zum Einsatz. Diese wurde mit 90.000 Zellen angeimpft und die initiale Anheftung nach einer Stunde mittels der Kristallviolett-färbung bewertet. Hierbei waren die Oberflächen mit FN, RGD 1 und RGD 2 gecoatet. Außerdem wurden als Referenz Zellen auf dem Wellboden (PS) sowie auf unmodifizierten Plättchen mitgeführt. Für jede Oberflächenmodifikation waren zwei Parallelproben Bestandteil des Versuchs.

Abb. 4 auf S. 36 zeigt exemplarische Aufnahmen der jeweiligen Zellbelegung auf den verschiedenen Proben. Die quantitative Auswertung nach Elution des Kristallviolett-farbstoffs ist in Abb. 5 auf S. 37 zusammengefasst.

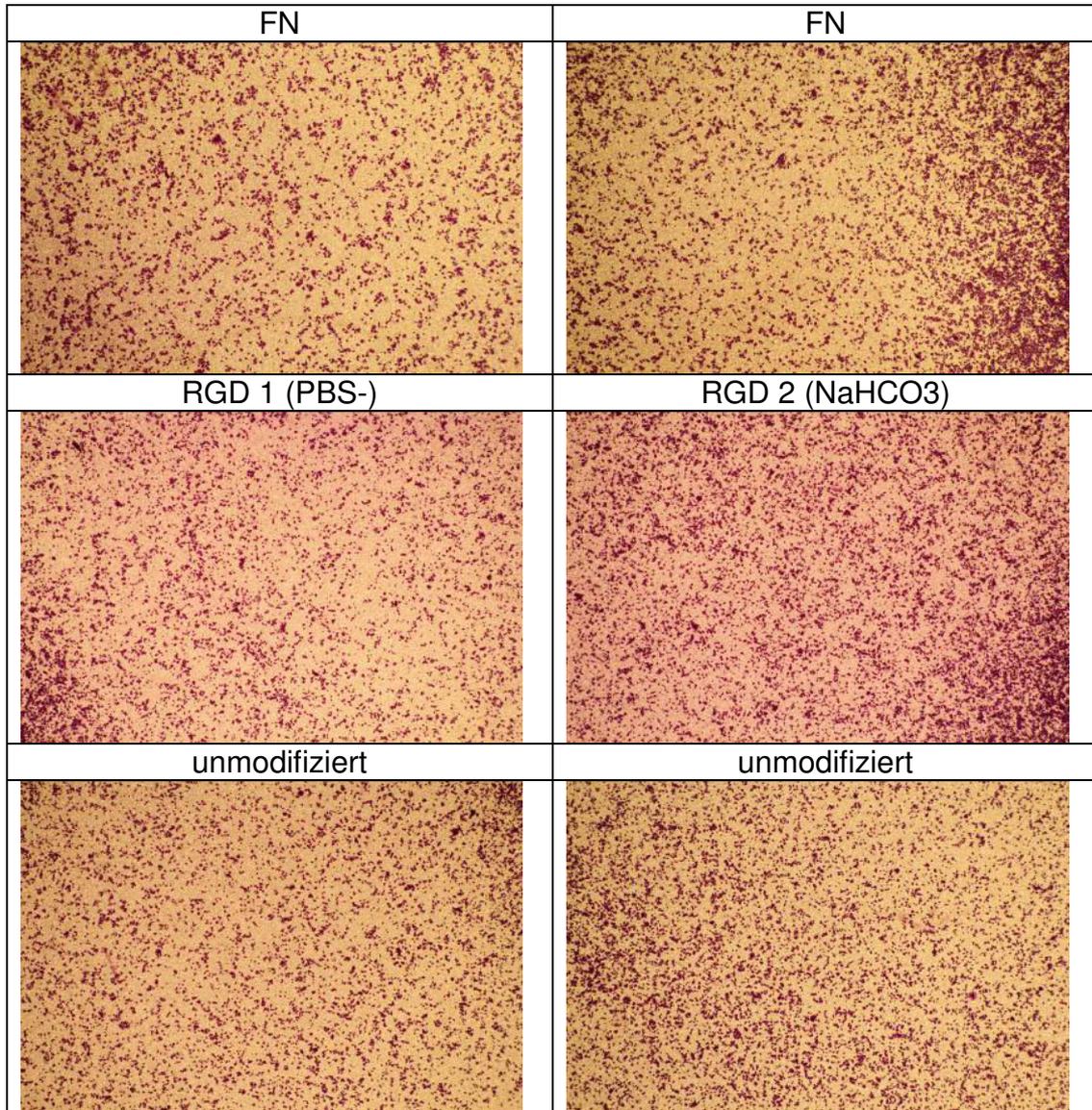


Abb. 4: Kristallviolett färbung, Oberfläche Camlog-Promote, SAOS-2 Osteoblasten, 90.000 Zellen angeimpft, initiale Anheftung nach einer Stunde, 32-fache Vergrößerung.

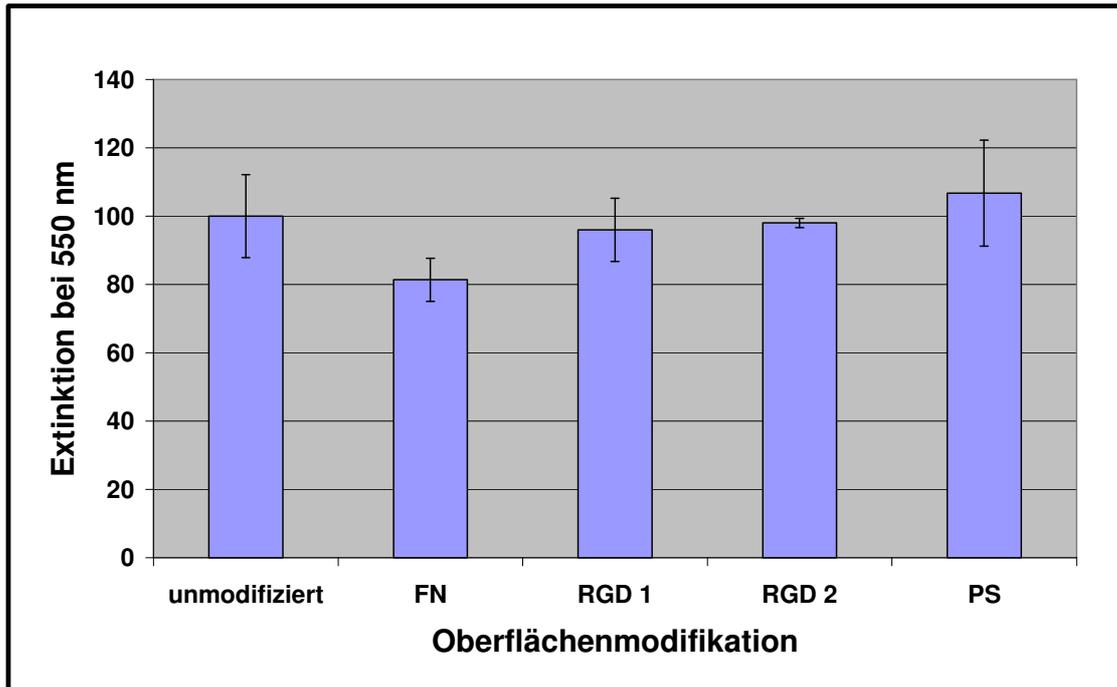


Abb. 5: Kristallviolett/Färbung/Optische Dichte, Oberfläche Camlog-Promote, SAOS-2 Osteoblasten, 90.000 Zellen angeimpft, initiale Anheftung nach einer Stunde, Werte in % bezogen auf unmodifizierte Referenz, Mittelwerte mit Standardabweichung.

Es konnte keine Förderung festgestellt werden. Das heißt, im direkten Vergleich mit den Zellen, die als Referenz im Well ohne Plättchen (PS-Boden) mitgeführt wurden, war festzustellen, dass keine Förderung zu erzielen war, da offenbar alle Zellen bereits nach 1 Stunde auf dem Polystyrol der Wells wie auch auf den unmodifizierten Plättchen adhärirt waren. Obige Grafik (Abb. 5) wie auch die entsprechenden Bilder (siehe S. 36, Abb. 4) zeigen, dass alle Plättchen mit nahezu der selben Zellmenge belegt sind. Bezogen auf die unmodifizierte Oberfläche (100 %) konnte durch die gekoppelten Peptide FN (81,39 %), RGD1 (96 %) und RGD2 (98 %) keine Verbesserung der initialen Anheftung erzielt werden. Lediglich die Anheftung der Zellen auf dem PS-Boden (106,73 %) war geringfügig besser als auf den unmodifizierten Plättchen. Die beiden RGD-Varianten waren gleichwertig.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse soll dieser Versuch im Folgenden mit glatten Oberflächen wiederholt werden, da aus den vorherigen Experimenten bekannt ist, dass bei diesen die Adhäsion bzw. die initiale Anheftung schlechter ist als bei rauen Oberflächen.

### **3.1.7. Initiale Anheftung auf unterschiedlichen Titanoberflächen**

Für diesen Versuch wurden die Oberflächen Nr. 1, 2, 4 und 5 verwendet. Hierbei sollte getestet werden, ob Fibronectin im Vergleich zur RGD-Sequenz eine positive bzw. andere oder bessere Wirkung auf die initiale Anheftung hat. Außerdem sollte geprüft werden, ob auf der rauen Promote-Oberfläche, die hinsichtlich der Adhäsion bereits gut ist, noch eine Steigerung möglich ist und ob die zusätzliche Anatas-Beschichtung der beiden Oberflächen (Nr. 1 und Nr. 2) ebenfalls eine positive Wirkung erzielen kann.

Hierzu wurden die Proben mit 90.000 Zellen, derselben Zellzahl wie im obigen Versuch, angeimpft und die Adhäsion nach einer Stunde mittels der Kristallviolett-Färbung ausgewertet. Der Versuch beinhaltete Zellen auf PS-Boden, auf unmodifizierten Plättchen sowie Zellen auf Oberflächen, die mit FN und RGD1 gecoatet waren. Es wurden jeweils vier Parallelproben eingesetzt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der glatten MA Oberfläche sowie der MA Oberfläche mit Anatas-Beschichtung aufgeführt (siehe S. 39, Abb. 6 u. Abb. 7). Exemplarische Aufnahmen der Zellbelegung auf den verschiedenen MA-Oberflächen mit Anatas-Beschichtung zeigt Abb. 8 auf S.40.

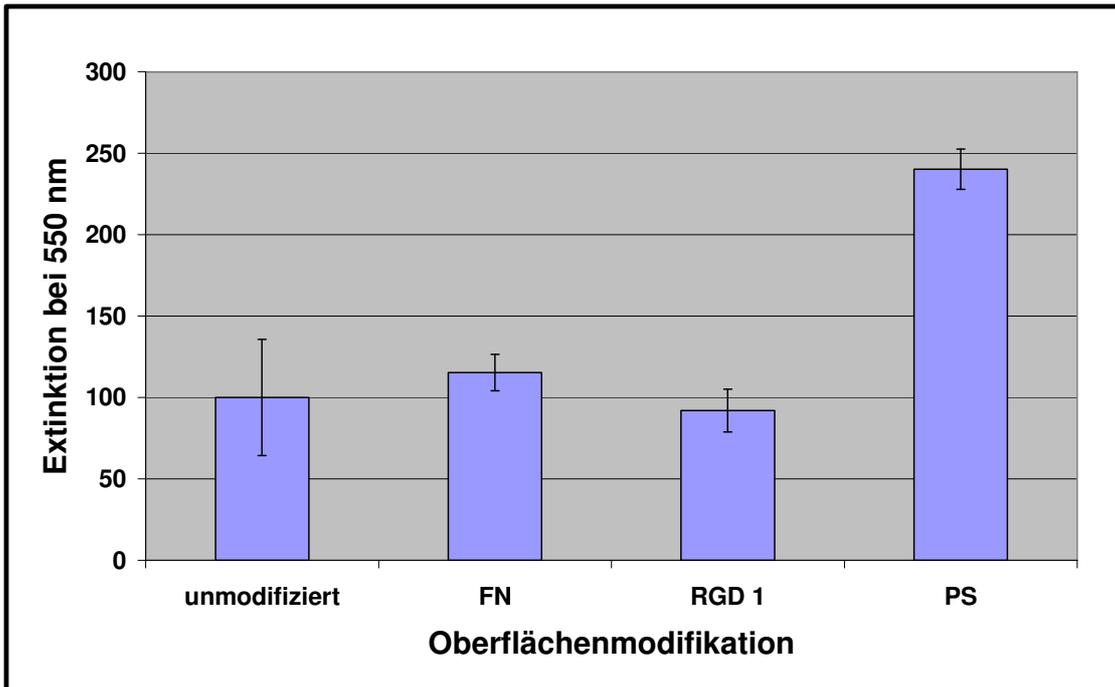


Abb. 6: Kristallviolett-färbung/Optische Dichte, Oberfläche Camlog-machined, SAOS-2 Osteoblasten, 90.000 Zellen angeimpft, initiale Anheftung nach einer Stunde, Werte in % bezogen auf unmodifizierte Referenz, Mittelwerte mit Standardabweichung.

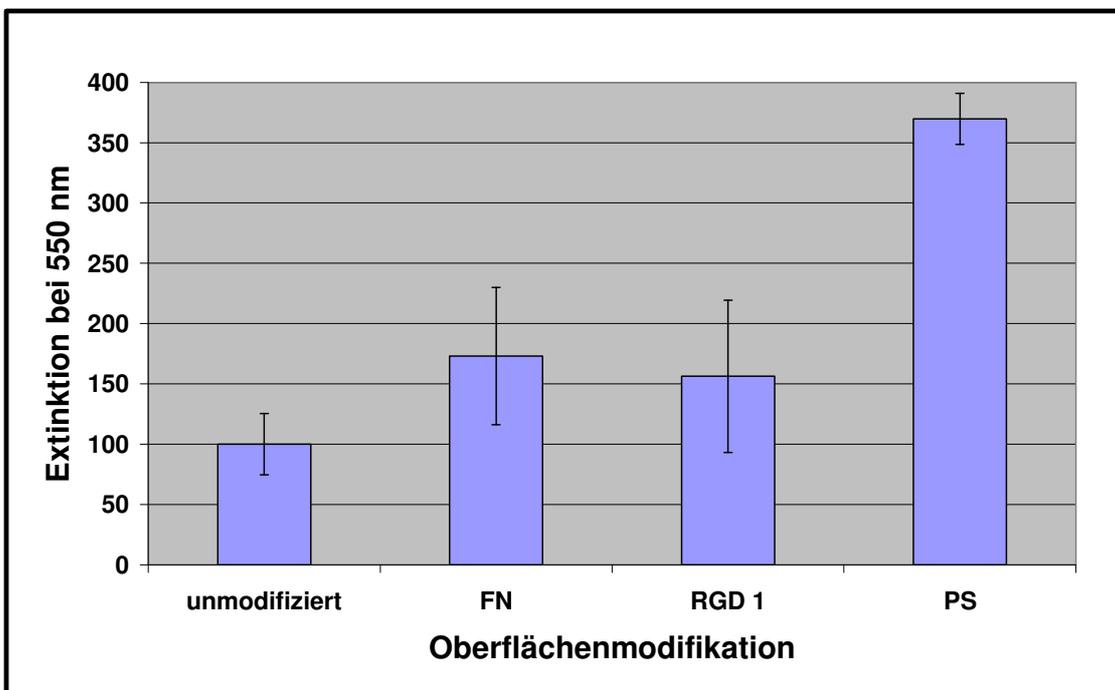


Abb. 7: Kristallviolett-färbung/Optische Dichte, Oberfläche Camlog-machined-Anatas, SAOS-2 Osteoblasten, 90.000 Zellen angeimpft, initiale Anheftung nach einer Stunde, Werte in % bezogen auf unmodifizierte Referenz, Mittelwerte mit Standardabweichung.

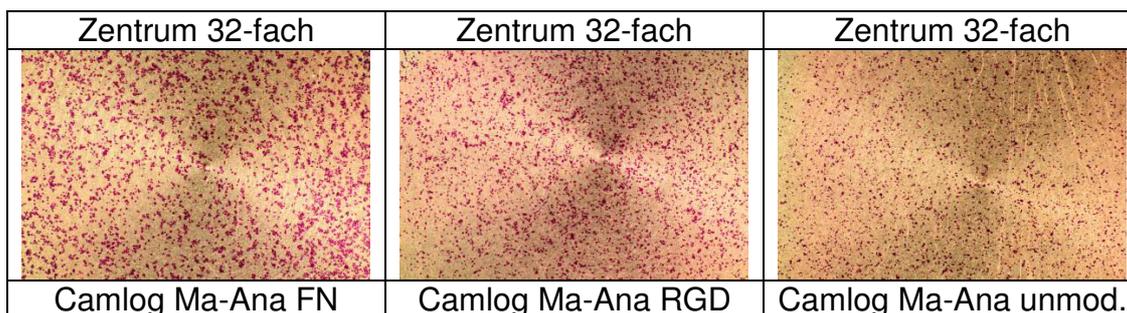


Abb. 8: Kristallviolettffärbung, Oberfläche Camlog-machined-Anatas, SAOS-2 Osteoblasten, 90.000 Zellen angeimpft, initiale Anheftung nach einer Stunde, 32-fache Vergrößerung.

### 3.1.8. Ergebnis initiale Anheftung

Die Anheftung auf der Oberfläche Nr. 1 (machined/S. 39, Abb. 6) ist generell deutlich schlechter als auf der rauhen Promote-Oberfläche. Dies zeigt der Vergleich mit der Referenz PS. Die ermittelten Werte betragen bei der Oberfläche Ma unmodifiziert = 100 %, PS = 240,13 %.

Im Gegensatz dazu wurden beim vorigen Versuch auf der Promote-Oberfläche eine praktisch gleiche Anheftung wie auf dem PS-Boden erzielt (siehe S. 37, Abb. 5). Dort lag die unmodifizierte Promote-Oberfläche bei = 100 % und der PS-Boden bei 106,73 %.

Auf der Oberfläche Ma-Anatas konnte durch die Beschichtung mit den Peptiden eine Förderung um ca. 50 % - 70 % erzielt werden (RGD = 156,26 %; FN = 173,08 %). Das verdeutlicht auch Abb. 8 (s. o.). Optische Unterschiede zwischen FN, RGD und unmodifiziertem Plättchen sind hier klar zu erkennen.

Dies war bei der Oberfläche Ma nicht der Fall. Hier erreichte lediglich die Beschichtung mit FN (115,26 %) eine leichte Verbesserung. Der mit RGD gekoppelten Oberfläche gelang in dieser Testreihe keine Förderung. Diese OF war in Bezug auf die initiale Anheftung mit 91,92 % sogar schlechter als die unmodifizierte Referenzoberfläche mit 100 %.

Auf den Oberflächen Promote und Promote-Anatas konnte durch die Peptidbeschichtung keine Förderung erzielt werden. Es ist anzunehmen, dass bereits auch auf der unmodifizierten Promote wie auch der Promote-Anatas-Oberfläche nach 1 Stunde alle Zellen angeheftet waren. Anhand der optischen Dichte (OD)

konnte bei der Auswertung der Messergebnisse eine wesentlich höhere Zellzahl auf der Promote-Oberfläche  $1,36 = 100\%$  wie auch auf der Promote-Anatas-Oberfläche  $0,96 = 100\%$  festgestellt werden, was die positive Wirkung dieser Oberfläche und deren Beschaffenheit auf die Zelladhäsion belegt, da die Oberflächen MA ( $OD = 0,47 = 100\%$ ) und MA-Anatas ( $OD = 0,38 = 100\%$ ) nicht annähernd derartig hohe Werte erreichten. Es ist hervorzuheben, dass die höchste Zellzahl auf der Camlog Promote Oberfläche zu finden war. Im Vergleich hierzu viel die Zellzahl auf der Promote-Anatas Oberfläche sichtlich geringer aus. Die geringste Zellzahl war auf der Anatas beschichteten MA Oberfläche vorzufinden ( $OD = 0,38 = 100\%$ ). Diese Ergebnisse stellen die Anatas-Beschichtung und deren fördernde Wirkung in Frage.

### **3.1.9. Einfluss von Biomolekülen auf Osteoblasten**

In diesem Versuch sollte der Einfluss unterschiedlicher Biomoleküle, d. h. Beschichtungen auf den Stoffwechsel bzw. die Proliferation von SAOS-2 Osteoblasten beurteilt werden. Dazu wurde eine Oberfläche ausgesucht, auf der die Zellproliferation schlecht ist. Hierzu wurde die Oberfläche Camlog-Nano gewählt, auf der im Gegensatz zu glatten Oberflächen die Proliferation und damit die Zellbedeckung nach längerer Kultivierungsdauer schlechter ist. Es wurde mit 90.000 Zellen angeimpft und eine zweitägige Wachstumsphase mittels des BrdU- und XTT-Tests ausgewertet, sowie anschließend mit der Kristallviolett-Färbung bildlich dokumentiert. Weiteres Augenmerk lag auf den unterschiedlichen Kopplungsmethoden des RGD-Peptids (RGD1 und RGD2), welche zusätzlich vergleichend untersucht werden sollten. Des Weiteren wurde in diesem Experiment die Oberfläche Ma zum Vergleich, sowie vier Parallelproben mitgeführt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse des Proliferationstests (BrdU) sowie der gemessenen Stoffwechselaktivität (XTT) nach zwei Tagen (siehe S. 42, Abb. 9 u. 10). Abb. 11 auf S. 43 zeigt exemplarische Beispiele der Zellbedeckung (Kristallviolett).

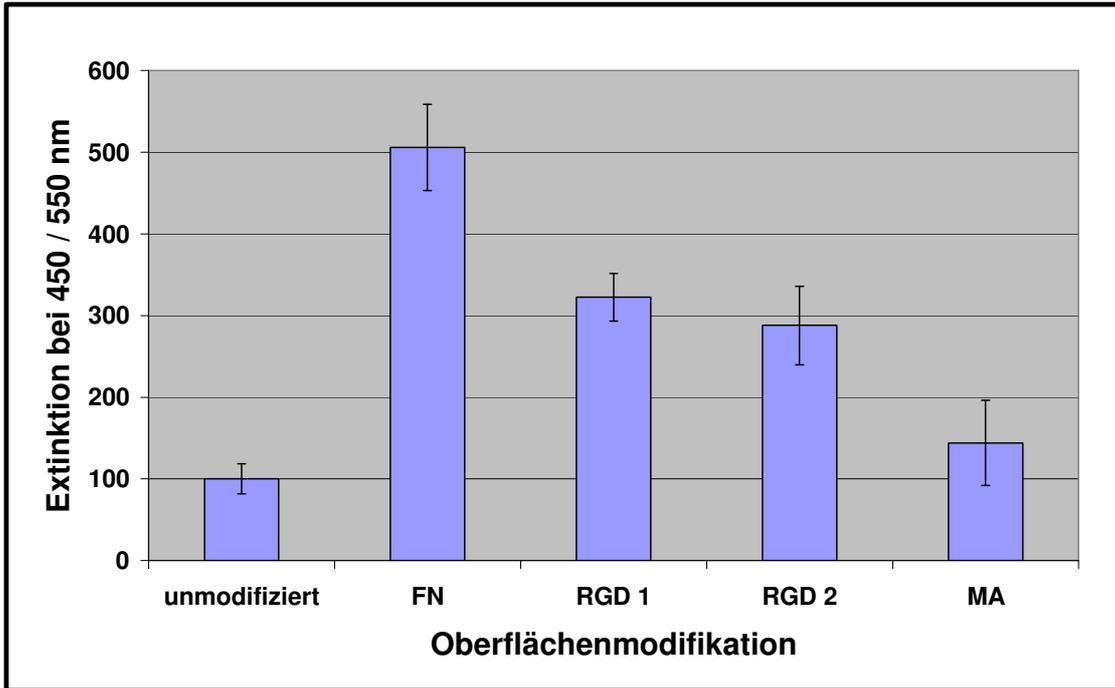


Abb. 9: BrdU-Test, Oberfläche Camlog-Nano mit untersch. Modifikationen sowie Vergleichsoberfläche Camlog machined, SAOS-2 Osteoblasten, 90.000 Zellen angeimpft, Langzeitanheftung zwei Tage, Werte in % bezogen auf unmodifizierte Referenz, Mittelwerte mit Standardabweichung.

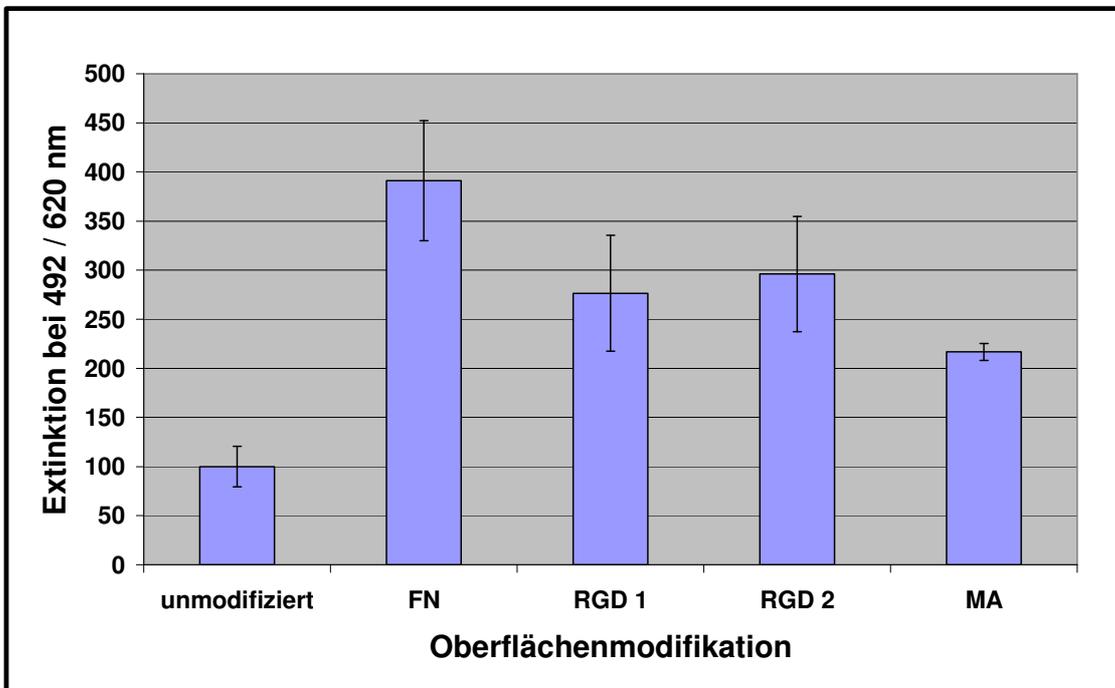


Abb. 10: XTT-Test, Oberfläche Camlog-Nano mit untersch. Modifikationen sowie Vergleichsoberfläche Camlog machined, SAOS-2 Osteoblasten, 90.000 Zellen angeimpft, Langzeitanheftung zwei Tage, Werte in % bezogen auf unmodifizierte Referenz, Mittelwerte mit Standardabweichung.

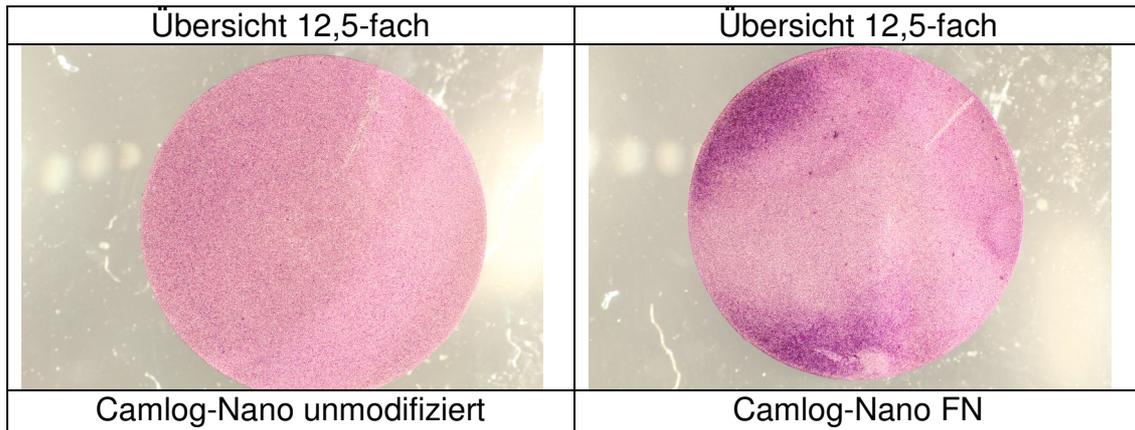


Abb. 11: Kristallviolettffärbung, Oberfläche Camlog-Nano, SAOS-2 Osteoblasten, 90.000 Zellen angeimpft, zwei Tage Wachstum.

### 3.1.10. Ergebnis / Einfluss von Biomolekülen auf Osteoblasten

Es wurde eine drei- bis fünffache Förderung von Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation durch FN und die unterschiedlich gekoppelten Peptide RGD1 und RGD2 erreicht (siehe S. 42, Abb. 9 und Abb. 10). Mit den RGD gecoateten Oberflächen konnte eine deutliche Förderung erzielt werden, wobei die beste Förderung mittels FN erreicht werden konnte (BrdU-Test = 505,861 %; XTT-Test = 391,049 %). Visuelle Unterschiede bzw. die fördernde Wirkung von FN verdeutlicht auch Abb. 11 (s. o.).

Die beiden unterschiedlichen Kopplungsmethoden, welche im Falle des RGD angewandt wurden, waren gleichwertig. Hierbei betrug die Förderung im BrdU/XTT-Test für RGD1 = 322,34 % / 276,42 % und für die RGD2 Modifikation 287,91 %/295,96 %. Somit erzielten beide RGD-Varianten signifikant bessere Ergebnisse als die Vergleichsoberfläche MA (BrdU = 144,01 %; XTT = 216,74 %) und die jeweilige unmodifizierte Oberfläche (= 100 %).

### **3.1.11. Fazit Vorversuche**

Die Vorversuche waren erfolgreich, da eine Förderung des Wachstums, der Adhäsion und der Stoffwechselaktivität bzw. der Proliferation erzielt werden konnte und auch die angestrebte Kopplung der Peptide gelang. Es erfolgte in den Hauptversuchen der Übergang zu den Stammzellen aus dem Kieferperiost und zu den unterschiedlichen synthetisch hergestellten Peptiden.

### **3.2. Hauptversuche**

Bei den folgenden Versuchen wurden ausschließlich humane Stammzellen aus dem Kieferperiost sowie die Camlog-Nano und die kommerzielle Camlog Promote-Oberfläche verwendet. Diese wurden mit den ausgewählten Peptiden P1 bis P6, sowie mit FN beschichtet. Da durch FN in den Vorversuchen fördernde Effekte bei den dort verwendeten SAOS-2 Zellen erzielt werden konnten, sollte dieses als Vergleich zu den ausgewählten Peptiden P1 bis P6 dienen und somit ermittelt werden, ob diese ähnlich gute oder gar bessere Ergebnisse erzielen können.

Es wurden insgesamt vier Hauptversuche (HV) durchgeführt, wobei die Ergebnisse tendenziell sehr ähnlich bzw. vergleichbar waren. Bei den ersten beiden HV wurde die Nano-Oberfläche und bei den HV 3 und 4 die Promote-Oberfläche eingesetzt. Bei allen Versuchen wurde das Zellwachstum über den gesamten Versuchszeitraum indirekt mittels XTT-Test gemessen. Beim HV 4 wurde zusätzlich die Genexpression ausgewählter Markergene mittels RT-PCR bestimmt (siehe Kapitel 3.4.). Im Folgenden soll exemplarisch die Proliferationsmessung des Hauptversuchs Nr. 3 aufgeführt werden.

Bei den Hauptversuchen 1 und 2 wurden sämtliche Wells mit einer Zellzahl von 4.500 Zellen angeimpft. Ab dem 3. Hauptversuch wurde die Zellzahl auf den Titanplättchen erhöht, um den Verlust an der Gesamtzellzahl pro Well, der durch das Umsetzen der Plättchen in eine neue Kulturplatte vor der ersten

Messung bedingt war, auszugleichen. Dieses Umsetzen erfolgte um auszuschließen, dass bei folgenden Tests Zellen, die an den Wänden der Kulturgefäße haften, mit vermessen werden.

Die durch das Umsetzen beschriebenen Verluste wurden durch Messung der Stoffwechselaktivität der in den Wells zurückbleibenden Zellen bestimmt. Diese Messung erfolgte im 2. Hauptversuch mittels des XTT-Tests. Es ergab sich eine Verteilung (XTT-Aktivität) von 57 % auf den Versuchsplättchen und 43 % in den zu Beginn verwendeten Wells. Um diesen Verlust der Zellzahl auszugleichen, wurde ab dem 3. Hauptversuch die Zahl der Zellen entsprechend verändert. Die Plättchen wurden mit 8.000 Zellen angeimpft und die PS-Vergleichswells nach wie vor mit 4.500 Zellen.

Als Kulturgefäß für die durchgeführten Versuche dienten 48-Wellplatten. Die Titanplättchen wurden mit der entsprechenden Zellmenge in 1 ml Medium angeimpft. Es wurden jeweils folgende Oberflächenmodifikationen in den Versuchen mitgeführt:

Tab.1: Oberflächenmodifikationen

<b>Oberfläche</b>	<b>Modifikation</b>
Ref.	unmodifizierte Ti-Plättchen mit Zellen.
Ref. mod.	Ti-Plättchen mit Zellen, die sämtliche Kopplungsschritte durchlaufen haben und mit den dazu nötigen Reagenzien behandelt wurden. Kein Peptid gekoppelt.
FN, P1 - P6	Zellen auf Ti-Plättchen, die mit dem entsprechenden Peptid gekoppelt wurden.
PS	Zellen auf Polysterol bzw. Kulturgefäßboden (48-Wellplatte).
Hintergrund Nr. 1	Medium im Kulturgefäß (48-Wellplatte) ohne Ti-Plättchen und ohne Zellen.
Hintergrund Nr. 2	Medium auf modifizierten Ti-Plättchen ohne Peptid und ohne Zellen.

Für die oben aufgeführten Oberflächenmodifikationen (siehe S. 45, Tab. 1) wurden jeweils 6 Parallelproben mitgeführt. Von diesen 6 Parallelproben wurden jeweils 3 nach einem bestimmten Zeitraum induziert um die Mineralisation der Zellen einzuleiten.

### **3.2.1. Hauptversuch 3 / Proliferation**

Dieser Versuch erstreckte sich über einen Zeitraum von 42 Tagen. Die Zellen wurden insgesamt 29 Tage induziert. Die Induktion erfolgte nach 13 Tagen. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass den Zellen genügend Zeit zur Verfügung stand, um sich anzuheften, auszubreiten und zu proliferieren. Des Weiteren sollte eine gewisse Zelldichte erreicht werden, bevor der Induktionsschritt eingeleitet wurde.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der gemessenen Stoffwechselaktivität (XTT) über einen Versuchszeitraum von 42 Tagen (siehe S. 47, Abb. 12, 13 u. S. 48, Abb. 14). Außerdem werden die Messergebnisse von drei unterschiedlichen Induktionszeiträumen gesondert aufgeführt. In den entsprechenden Grafiken werden Titanproben mit induzierten und nicht induzierten Zellen vergleichend dargestellt (siehe S. 48, Abb. 15 u. S. 49, Abb. 16 u. 17).

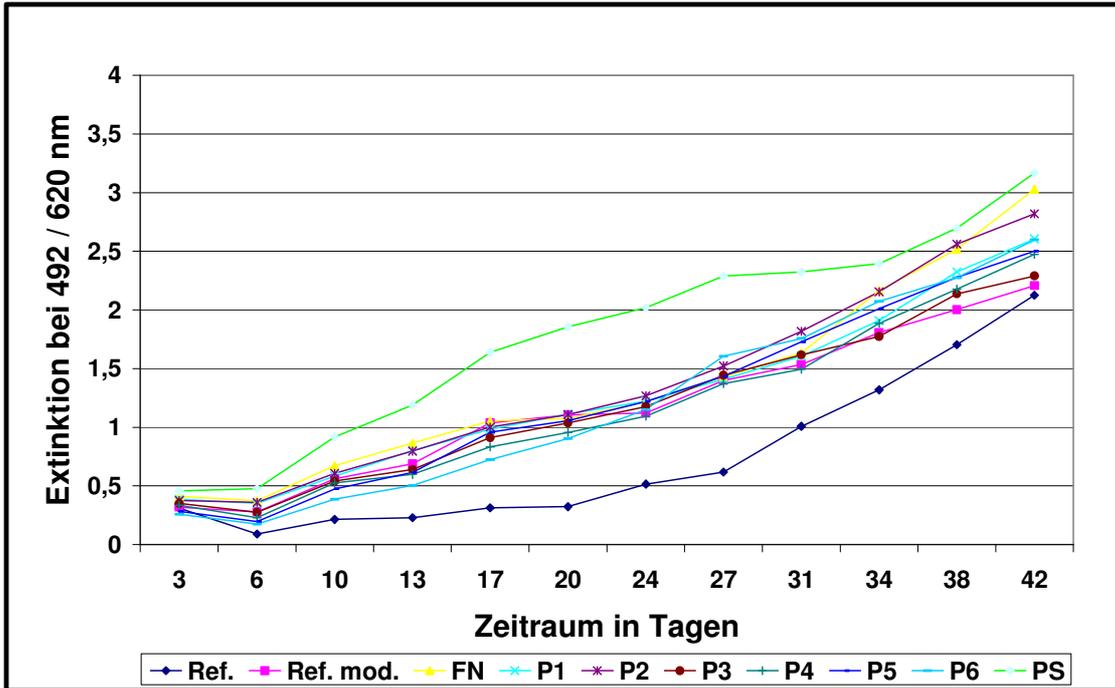


Abb. 12: XTT-Test, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperioost, 4.500 Zellen angeimpft, 42 Tage in Kultur, 29 Tage induziert, Start der Induktion an Tag 13, Gesamtwerte der induzierten und nicht induzierten Zellen. Mittelwert aus je sechs Parallelproben.

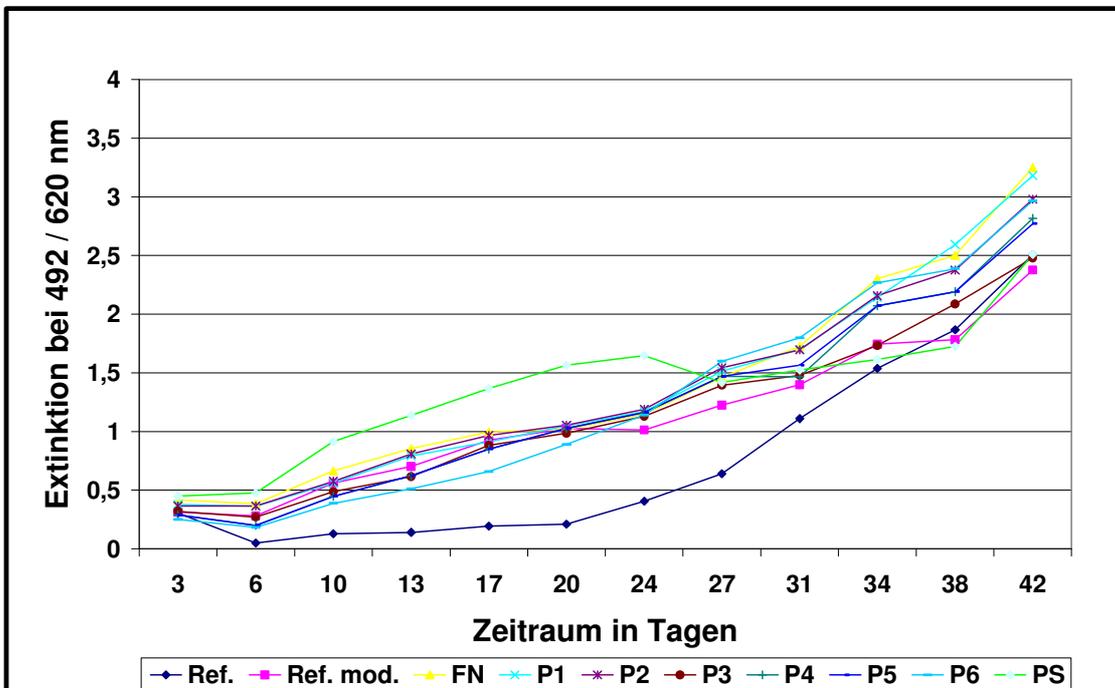


Abb. 13: XTT-Test, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperioost, 4.500 Zellen angeimpft, 42 Tage in Kultur, 29 Tage induziert, Start der Induktion an Tag 13, Gesamtwerte der nicht induzierten Zellen. Mittelwert aus je drei Parallelproben.

## Ergebnisse

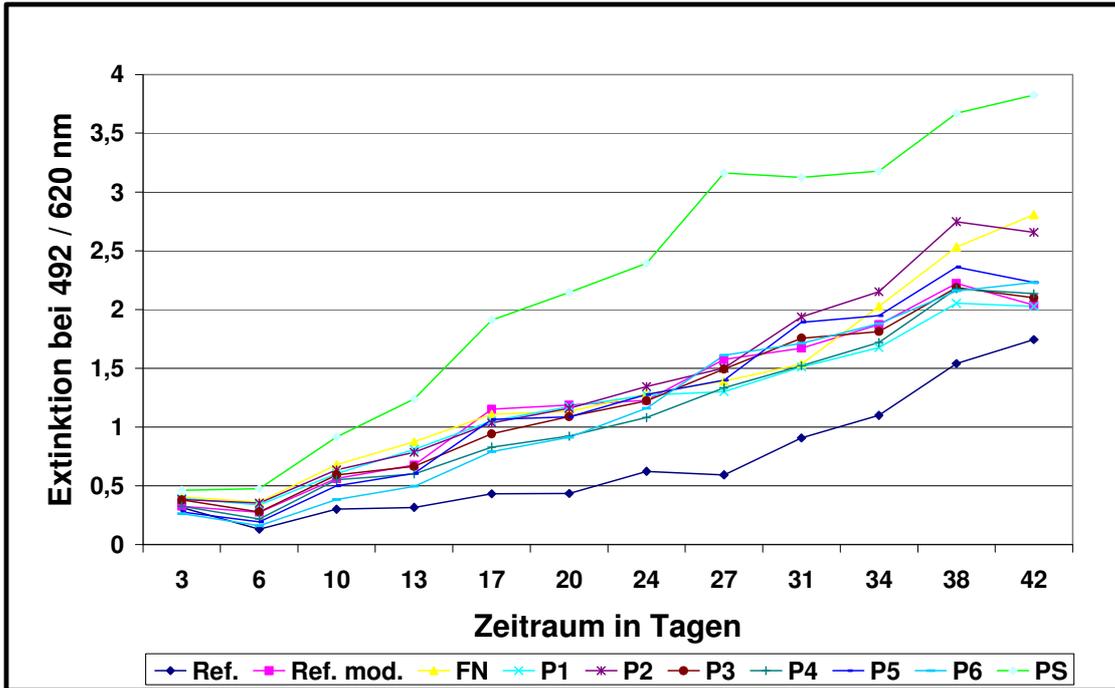


Abb.14: XTT-Test, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperioost, 4.500 Zellen angeimpft, 42 Tage in Kultur, 29 Tage induziert, Start der Induktion an Tag 13, Gesamtwerte der induzierten Zellen. Mittelwert aus je drei Parallelproben.

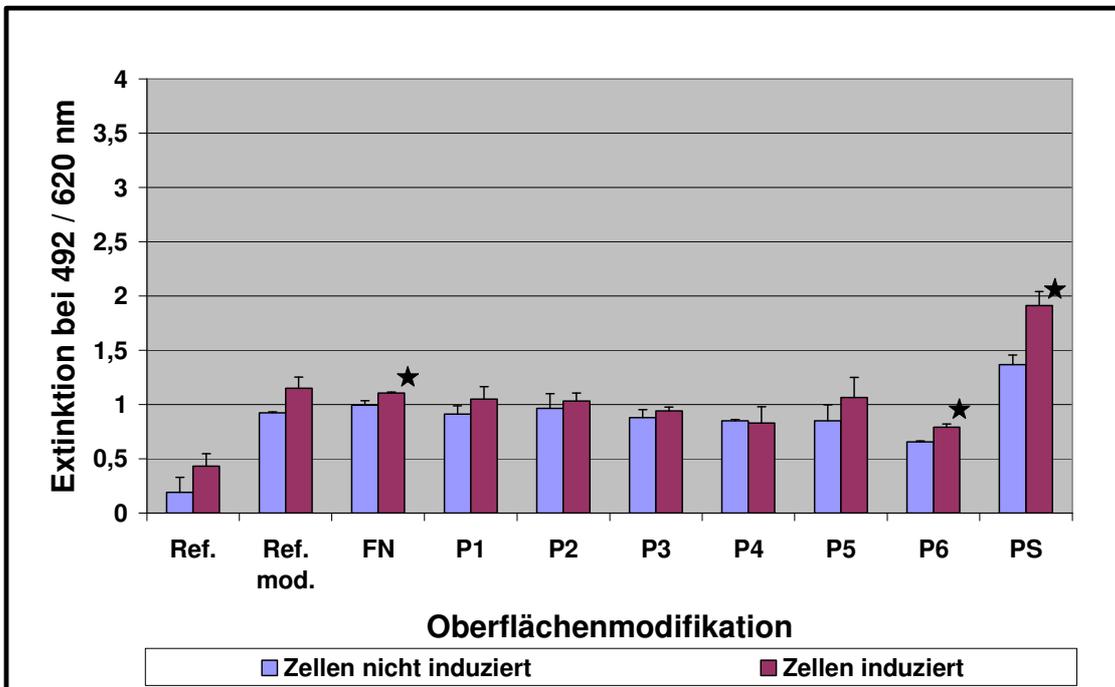


Abb.15: XTT-Test, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperioost, 4.500 Zellen angeimpft, 17 Tage in Kultur, vier Tage induziert, Start der Induktion an Tag 13, Gesamtwerte der nicht induzierten und induzierten Zellen. Mittelwert aus je drei Parallelproben mit Standardabweichung.★ = statistisch signifikant.

## Ergebnisse

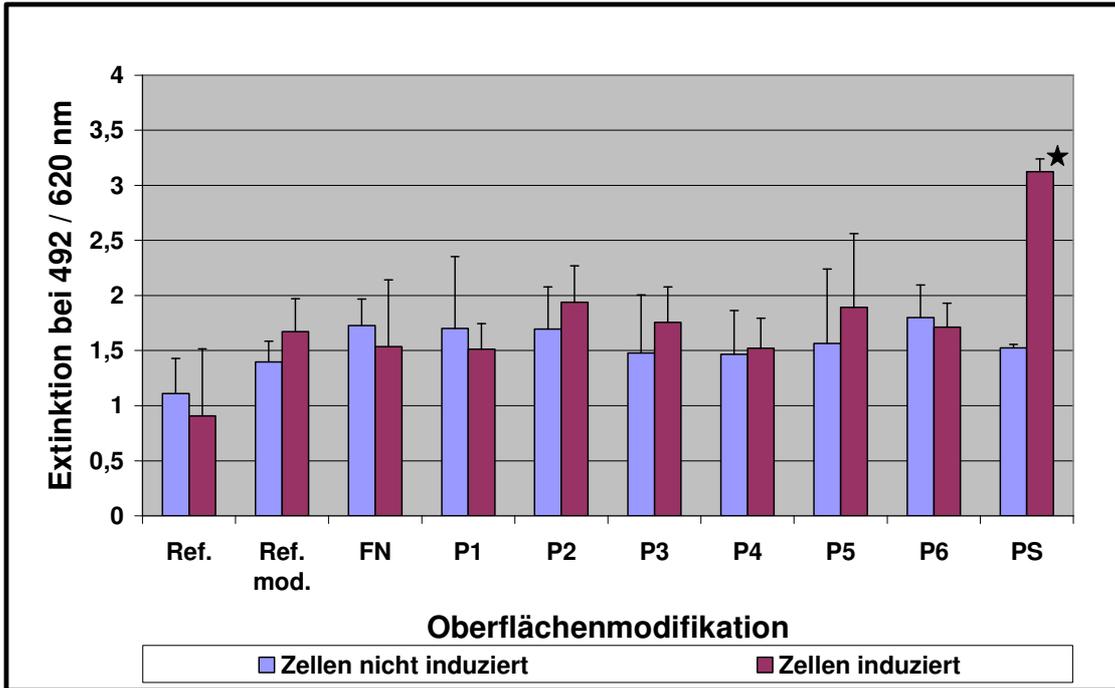


Abb.16: XTT-Test, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperioost, 4.500 Zellen angeimpft, 31 Tage in Kultur, 18 Tage induziert, Start der Induktion an Tag 13, Gesamtwerte der nicht induzierten und induzierten Zellen. Mittelwert aus je drei Parallelproben mit Standardabweichung.★ = statistisch signifikant.

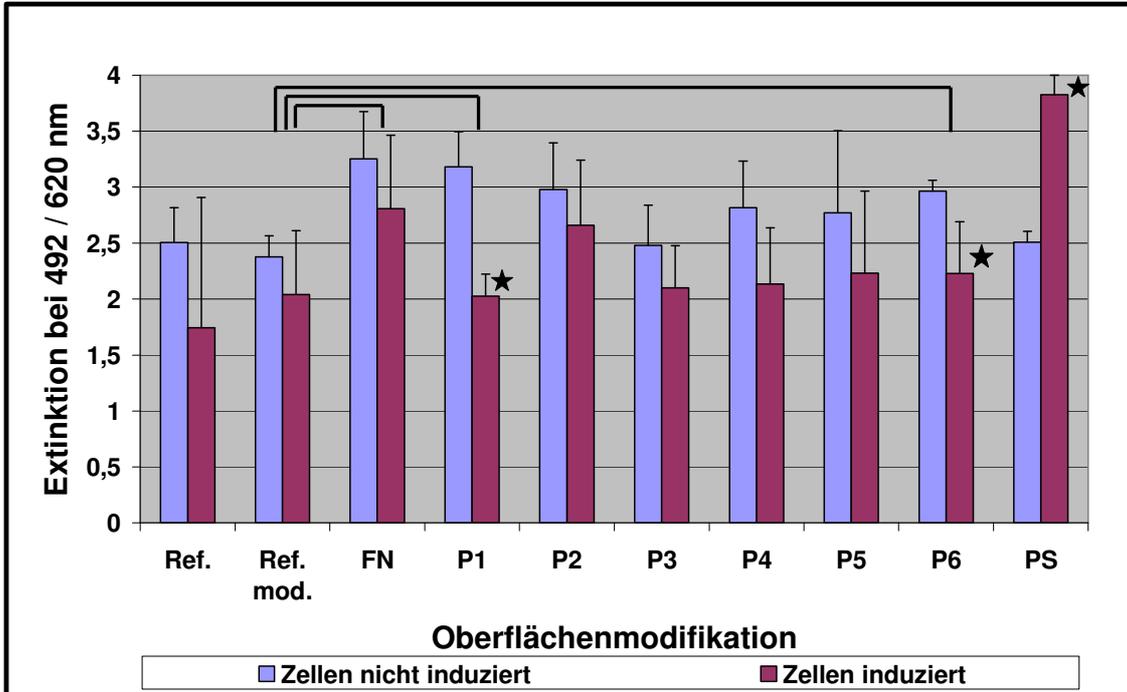


Abb.17: XTT-Test, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperioost, 4.500 Zellen angeimpft, 42 Tage in Kultur, 29 Tage induziert, Start der Induktion an Tag 13, Gesamtwerte der nicht induzierten und induzierten Zellen. Mittelwert aus je drei Parallelproben mit Standardabweichung.★ = statistisch signifikant.  
 [ ] = signifikant erhöht gegenüber Ref. mod.

### **3.2.2. Ergebnisse Hauptversuch 3 / Proliferation**

Die Zellproliferation war auf allen modifizierten Oberflächen im Vergleich zur unmodifizierten Referenzoberfläche gesteigert, was deutlich ab Tag 13 zu erkennen ist (siehe S. 47, Abb. 12, 13 u. S. 48, Abb. 14). Eine Angleichung der Proliferation auf der genannten unmodifizierten Referenzoberfläche erfolgte erst gegen Ende der Versuchslaufzeit. Hierbei konnte eine erheblich schnellere Angleichung bei den nicht induzierten im Vergleich zu den induzierten Zellkulturen festgestellt werden (siehe S. 47, Abb. 13 u. S. 48, Abb. 14). Unter nicht induzierten Kulturbedingungen erreichte die Zellproliferation auf den unmodifizierten Referenzoberflächen bereits am Tag 34 nahezu dasselbe Niveau wie auf den modifizierten Titanoberflächen (siehe S. 47, Abb. 13).

Obwohl sämtliche Oberflächen mit etwa derselben Zellzahl starteten, war die Proliferation auf der PS-Oberfläche ab Tag zehn deutlich höher als auf allen Ti-Oberflächen (siehe S. 47, Abb. 12, 13 u. S. 48, Abb. 14). Es konnten jedoch Unterschiede zwischen den induzierten und nicht induzierten Zellen festgestellt werden. Die nicht induzierten Zellen erreichten auf den Titanoberflächen bereits am Tag 27 das Niveau der PS-Oberfläche (siehe S. 47, Abb. 13), während bei den induzierten Kulturen keine Annäherung erfolgte (siehe S. 48, Abb. 14).

Zum Ende des Versuchszeitraums hin (Tag 34 bis 42) zeigten die Zellen unter Standard-Kulturbedingungen (ohne Induktion) auf allen peptidbeschichteten Oberflächen mit Ausnahme von P3 eine durchgängig höhere Proliferation als auf der PS-Oberfläche.

Nach Induktionsbeginn konnte zunächst generell eine höhere Proliferationsrate auf den induzierten Plättchen beobachtet werden. Das heißt, nach vier Tagen Induktion war die mittlere Proliferation auf allen Oberflächen, mit Ausnahme von P4, höher als auf den nicht induzierten Plättchen (siehe S. 48, Abb. 15). Nach einem Induktionszeitraum von 18 Tagen war dies nur noch auf 60 % der Oberflächen der Fall. Hierbei handelte es sich um folgende Oberflächen-

modifikationen: Ref mod., P2, P3, P4, P5 und PS (siehe S. 49, Abb. 16). Am Ende des Versuchs, nach 29 Tagen Induktion, war die Proliferation auf allen induzierten Ti-Varianten, jedoch nicht auf PS, im Mittel geringer als auf den nicht induzierten Plättchen (siehe S. 49, Abb. 17). Diese Unterschiede waren jedoch lediglich bei den Modifikationen mit den Peptiden P1 und P6 statistisch signifikant.

Bei den nicht induzierten Proben zeigten die Zellen auf allen mit einem Peptid gekoppelten Oberflächen, außer der Oberfläche mit dem Peptid P3, am Ende der Versuchslaufzeit eine stärkere Proliferation als auf den Referenzoberflächen PS, Ref. und Ref. mod.. Die besten Ti-Varianten im Versuch waren die mit FN (OD = 3,25) gekoppelten, gefolgt von den Modifikationen mit den Peptiden P1 (OD = 3,18) sowie P2 (OD = 2,98) und P6 (OD = 2,97) (siehe S. 47, Abb. 13 u. S. 49, Abb. 17).

Die induzierten Proben wiesen bei der Proliferation nicht derart deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Ti-Variationen und den Referenzoberflächen auf (siehe S. 48, Abb. 14). Am besten waren zum Versuchsende hin die Varianten mit FN (OD = 2,81) und dem Peptid P2 (OD = 2,66). Das entspricht annähernd den obigen Ergebnissen aus der Versuchsreihe der nicht induzierten Proben. Dort erzielten ebenfalls die Titanoberflächen mit FN und P2 eine höhere Förderung. Die dort außerdem beobachtete gute Förderung, durch die Oberflächenvarianten mit den Peptiden P1 und P6 konnte jedoch bei den induzierten Proben nicht beobachtet werden. Die mit Abstand beste Proliferation war unter induzierten Bedingungen auf der Referenzoberfläche PS (OD = 3,83) vorzufinden.

Die modifizierte Referenz erzielte ebenfalls eine gegenüber der Ausgangsoberfläche erhöhte Zellproliferation, die über weite Strecken mit der durch die Peptide bzw. FN erreichten Förderung vergleichbar war. Eine signifikant höhere Proliferation durch eine Peptid- bzw. FN-Beschichtung wurde lediglich unter nicht induzierenden Kulturbedingungen zum Ende des Versuchszeitraums beobachtet (siehe S. 49, Abb. 17).

### **3.3. RT-PCR Vorversuche**

Nach den Untersuchungen zur Proliferation sollte der Einfluss der Peptid-Beschichtungen auf die osteogene Differenzierung anhand der Expression verschiedener osteogener Marker mittels RT-PCR untersucht werden.

#### **3.3.1. Auswahl der osteogenen Marker**

In dem ersten der durchgeführten PCR-Vorversuche wurden acht verschiedene Marker in Bezug auf Nachweisbarkeit und Induzierbarkeit getestet. Es handelte sich hierbei um AP, OSN, Osx, OCN, OPN, Igf-2, Coll1a1 und Periostin. Hierzu wurden die verwendeten Stammzellen auf den PS-Boden (Polystyrol) einer 48-Wellplatte mit einer Zellzahl von 4.500 Zellen angeimpft und es erfolgte eine 34-tägige Wachstumsphase. Es wurden jeweils sechs Parallelproben für den entsprechenden Marker mitgeführt, wovon jeweils drei induziert wurden. Die Induktion der Zellen erfolgte am Tag 13, wodurch ein Induktionszeitraum von 21 Tagen erreicht wurde.

Anhand der erzielten Ergebnisse wurden fünf der acht verwendeten osteogenen Marker ausgewählt. Es handelte sich um AP, OSN, Igf-2, Coll1a1 und Periostin. Die Marker Osx, OCN sowie OPN zeigten eine zu geringe Expression und wurden daher in den folgenden PCR-Versuchen nicht mehr verwendet.

Abb. 18 auf S. 53 zeigt die Auswertung der Expression der getesteten acht osteogenen Marker. Die Abbildung gibt die relative Expression, bezogen auf die Referenz GAPDH, wieder. Für jeden Marker sind jeweils die unter Standardbedingungen (ohne Induktion) sowie unter induzierenden Kulturbedingungen ermittelten Werte gegenübergestellt.

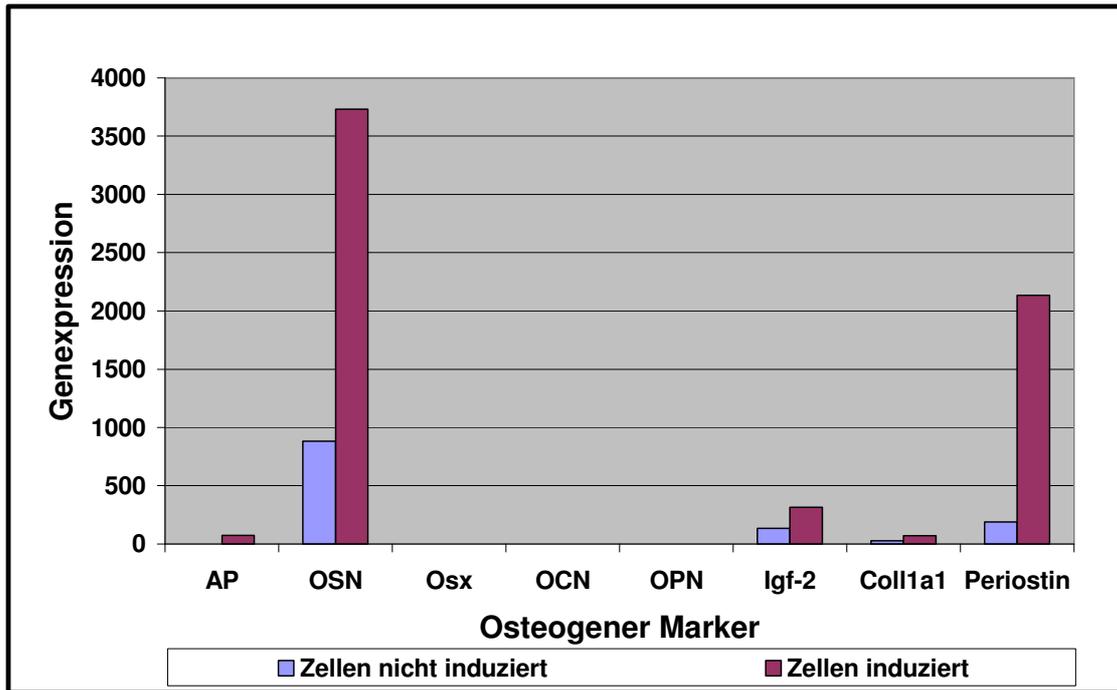


Abb.18: RT-PCR, Vorversuch, Genexpression der acht versch. osteogenen Marker, PS-Boden mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 34 Tage in Kultur, 21 Tage induziert, Quotient aus dem jeweiligen Marker und der Referenz GAPDH (Einzelwerte) jeweils für ind. und nicht ind. Zellen. (Nicht sichtbare Werte = 0 bis  $\leq 0,38$ ).

### 3.3.2. RNA-Extraktion auf Titanplättchen

Im folgenden Vorversuch sollte überprüft werden, ob die RNA-Isolationsmethode mittels Abkratzen genau so gut auf rauen Titanplättchen funktioniert, wie auf dem Polystyrol (PS-Boden) einer 48-Wellplatte und genügend Ausbeute für die folgende RT-PCR liefert. Wie im obigen Vorversuch zur Auswahl der osteogenen Marker wurden hier ebenfalls sechs Parallelproben mitgeführt, wovon wieder drei induziert wurden. Um unter den selben Bedingungen wie in den Hauptversuchen zu arbeiten, wurden die Titanplättchen (Camlog Promote unmodifiziert) mit einer Zellzahl von 8.000 Zellen angeimpft. Ebenso wurden die Plättchen analog zu den Hauptversuchen nach drei Tagen in frische bzw. unbenutzte Wells umgesetzt. Die Proben waren 29 Tage in Kultur und wurden am 10. Tag induziert.

Die isolierte RNA-Menge betrug für die nicht induzierten Plättchen 282,5 ng/ml und für die induzierten Plättchen 155 ng/ml. Die RNA lag nach dem Eluieren in

10 µl RNase freiem Wasser vor. Für die weitere bzw. eigentliche RT-PCR wurden pro run im Light-Cycler 15 ng RNA benötigt. Das heißt, die extrahierte Menge an RNA hätte im Falle der nicht induzierten Proben für ca. 188 Durchläufe ausgereicht. Bei den induzierten Proben wären ungefähr 103 runs möglich gewesen. Die RNA-Isolationsmethode war somit einsetzbar, d. h. es konnte eine ausreichende Menge RNA durch den oben beschriebenen Vorgang des Abkratzens der Zellen von den rauen Titanplättchen erzielt werden.

### **3.4. RT-PCR**

Die RT-PCR wurde im Hauptversuch H4 durchgeführt. In diesem Versuch waren die Zellen 30 Tage in Kultur und wurden insgesamt 20 Tage induziert. Der Versuchsablauf war gleich wie in den zuvor durchgeführten Hauptversuchen (siehe oben). Die PCR fand bewusst nach 20 Tagen Induktion statt, da zu diesem Zeitpunkt durch eine mehr oder weniger ausgeprägte Induktion der ausgewählten Marker eine Bewertung des Differenzierungsverhaltens der Zellen auf den verschiedenen Oberflächenmodifikationen möglich sein sollte.

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse für jeden der fünf ausgewählten Marker in jeweils 2 Grafiken zusammengefasst. Die jeweils obere Grafik gibt die relative Expression, bezogen auf die Referenz GAPDH, wieder. Für jede Oberfläche sind jeweils die unter Standardbedingungen (ohne Induktion) sowie unter induzierten Kulturbedingungen ermittelten Wert gegenübergestellt. Die darunter stehende Grafik gibt jeweils den beim Wechsel zwischen diesen beiden Bedingungen erhaltenen Induktionsfaktor wieder.

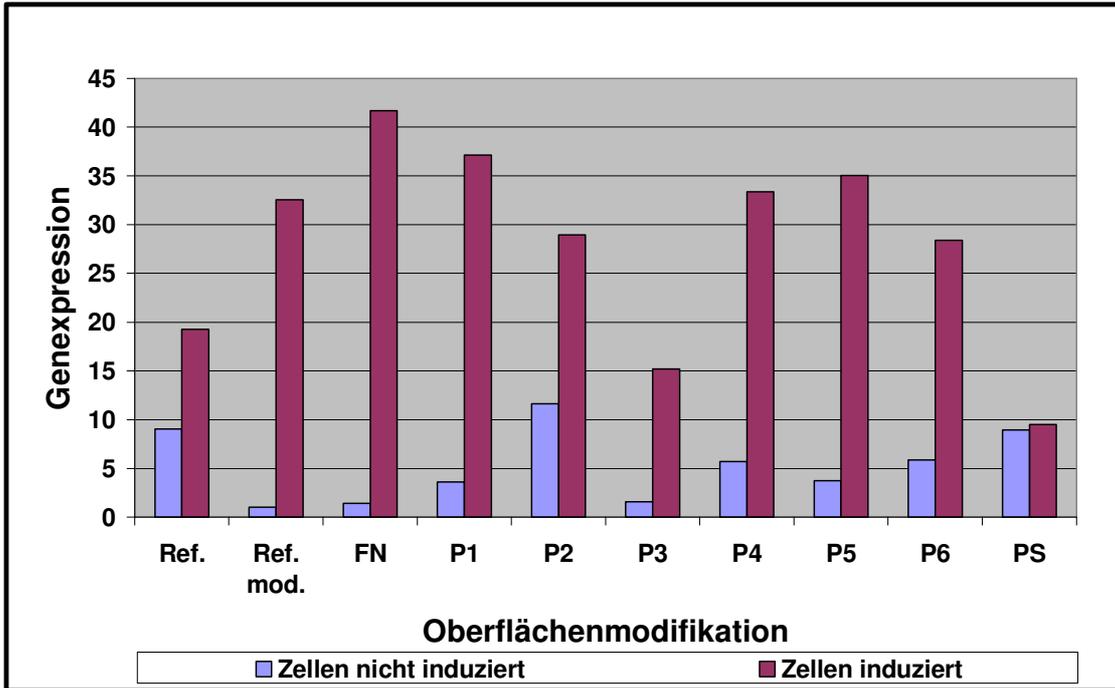


Abb.19: RT-PCR, Genexpression Alkalische Phosphatase (AP), Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus dem Marker AP dividiert durch Referenz GAPDH (Einzelwerte) jeweils für induzierte und nicht induzierte Zellen.

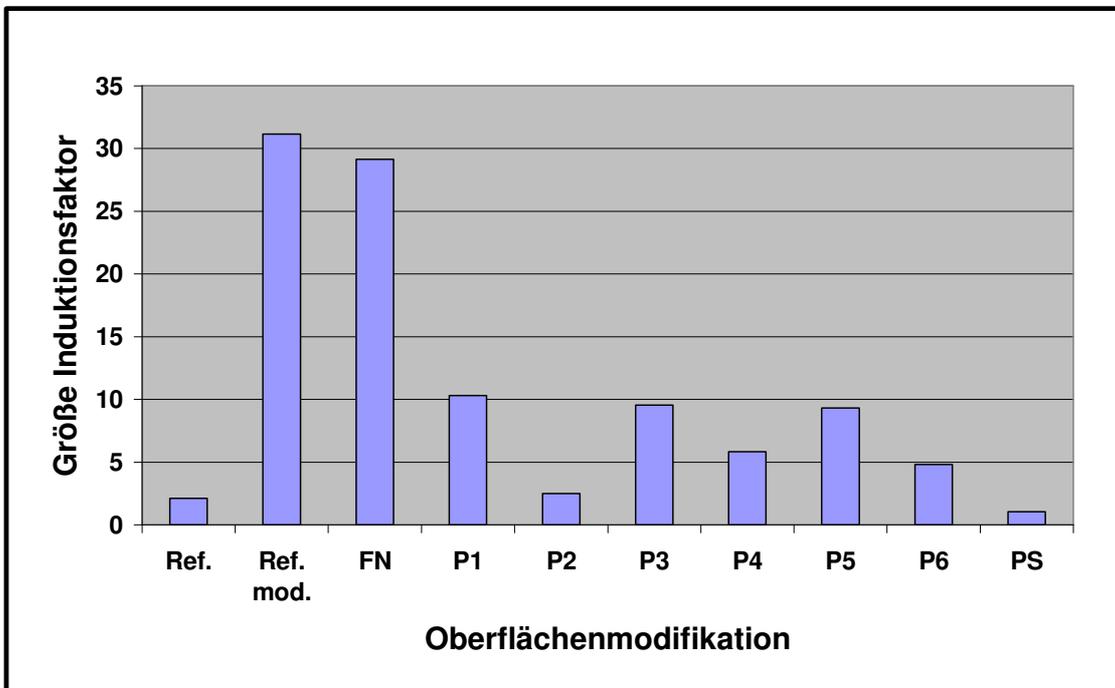


Abb.20: RT-PCR, Induktionsfaktor Alkalische Phosphatase (AP), Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus induzierten zu nicht induzierten Zellen.

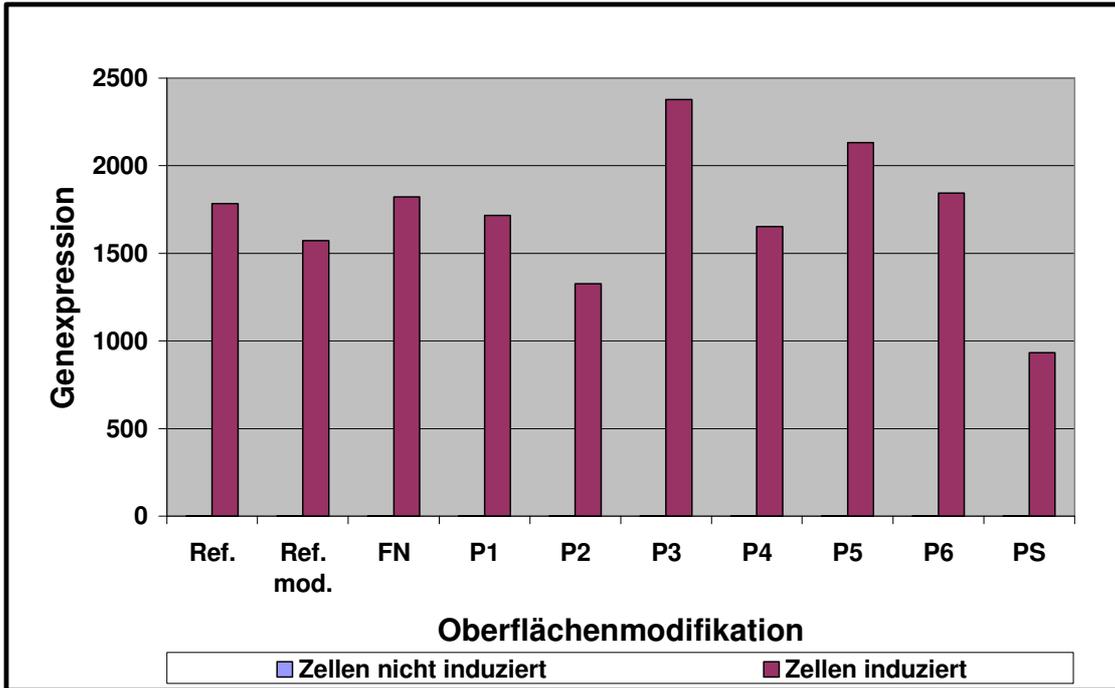


Abb.21: RT-PCR, Genexpression Osteonectin (OSN), Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus dem Marker OSN dividiert durch Referenz GAPDH (Einzelwerte) jeweils für induzierte und nicht induzierte Zellen. (Werte der nicht induzierten Zellen  $\leq 2,14$ ).

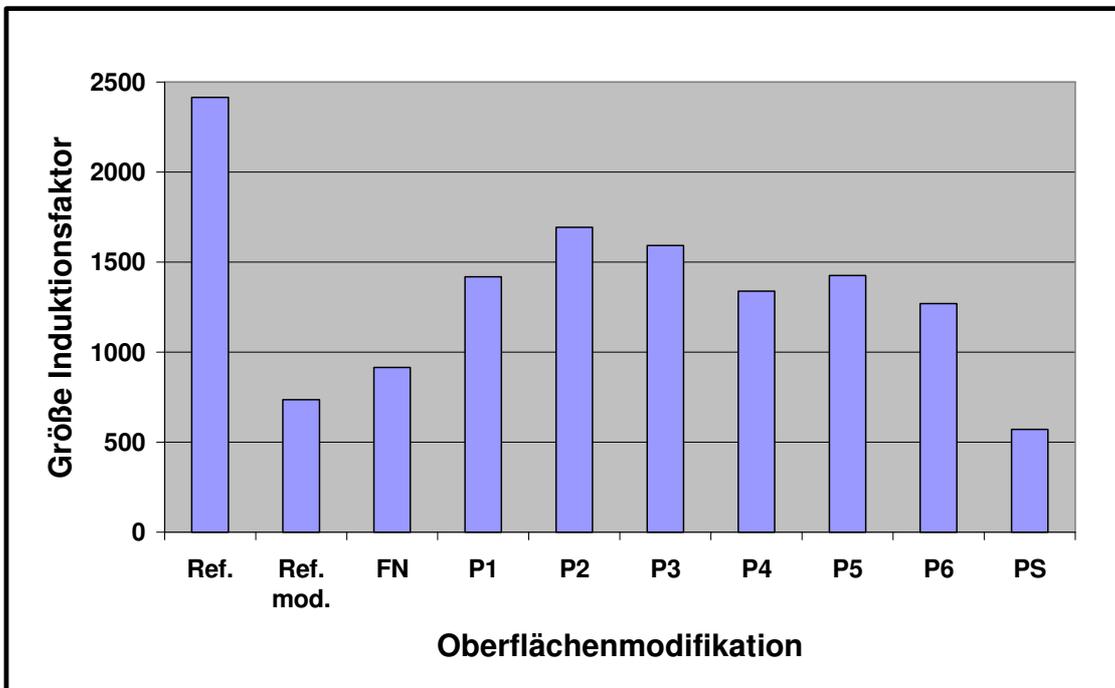


Abb.22: RT-PCR, Induktionsfaktor Osteonectin (OSN), Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus induzierten zu nicht induzierten Zellen.

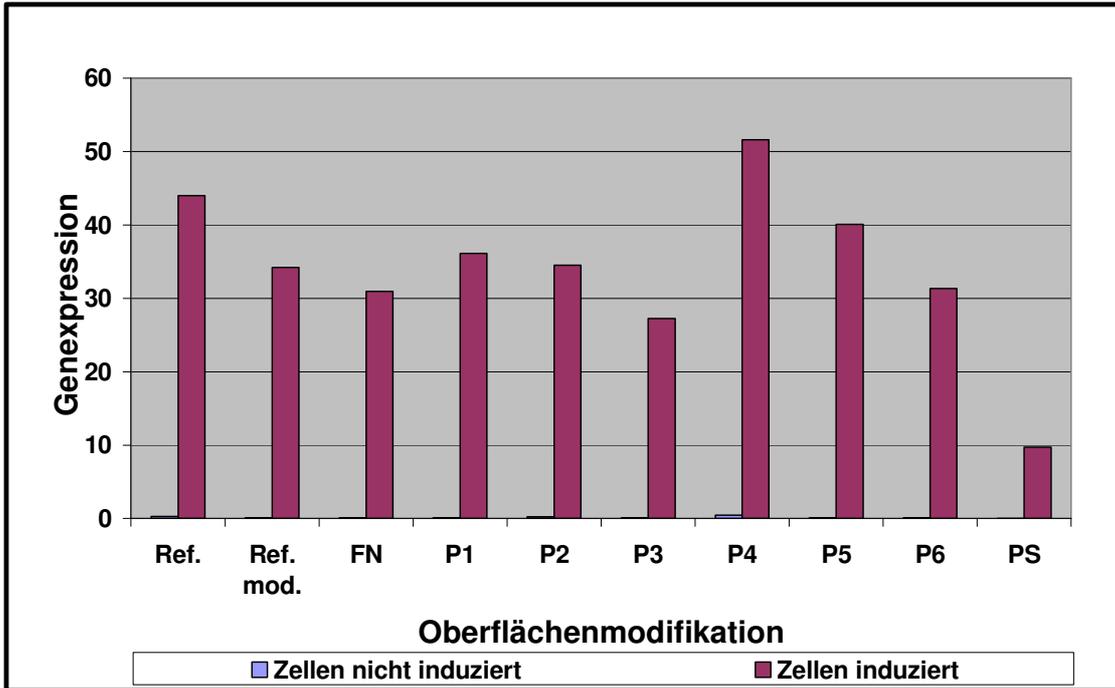


Abb.23: RT-PCR, Genexpression Insulin-like growth factor 2 (Igf-2), Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus dem Marker IGF-2 dividiert durch Referenz GAPDH (Einzelwerte) jeweils für induzierte und nicht induzierte Zellen. (Werte der nicht induzierten Zellen  $\leq 0,47$ ).

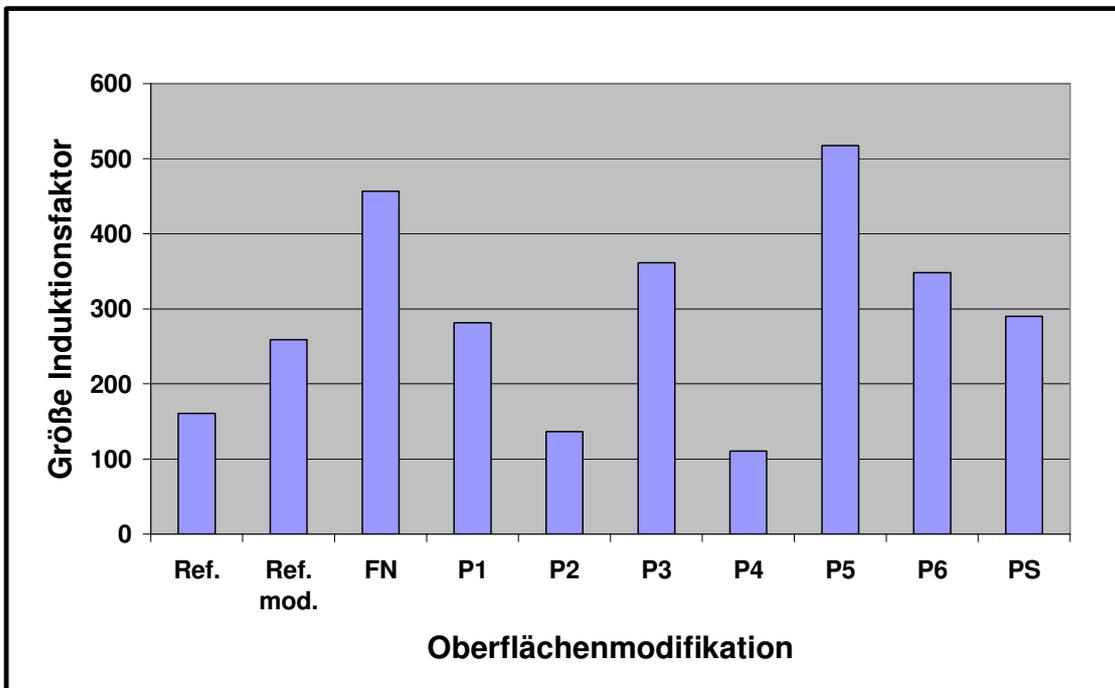


Abb.24: RT-PCR, Induktionsfaktor Igf-2, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus induzierten zu nicht induzierten Zellen.

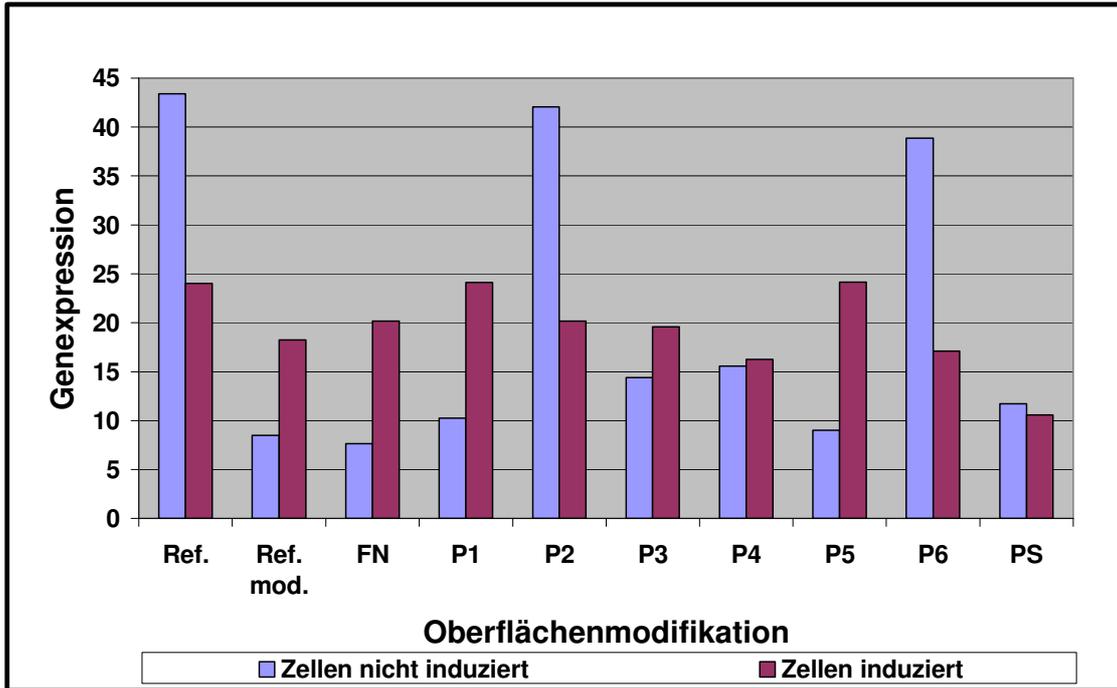


Abb.25: RT-PCR, Genexpression Collagen 1a1 (Coll1a1), Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus dem Marker Coll1a1 dividiert durch Referenz GAPDH (Einzelwerte) jeweils für induzierte und nicht induzierte Zellen.

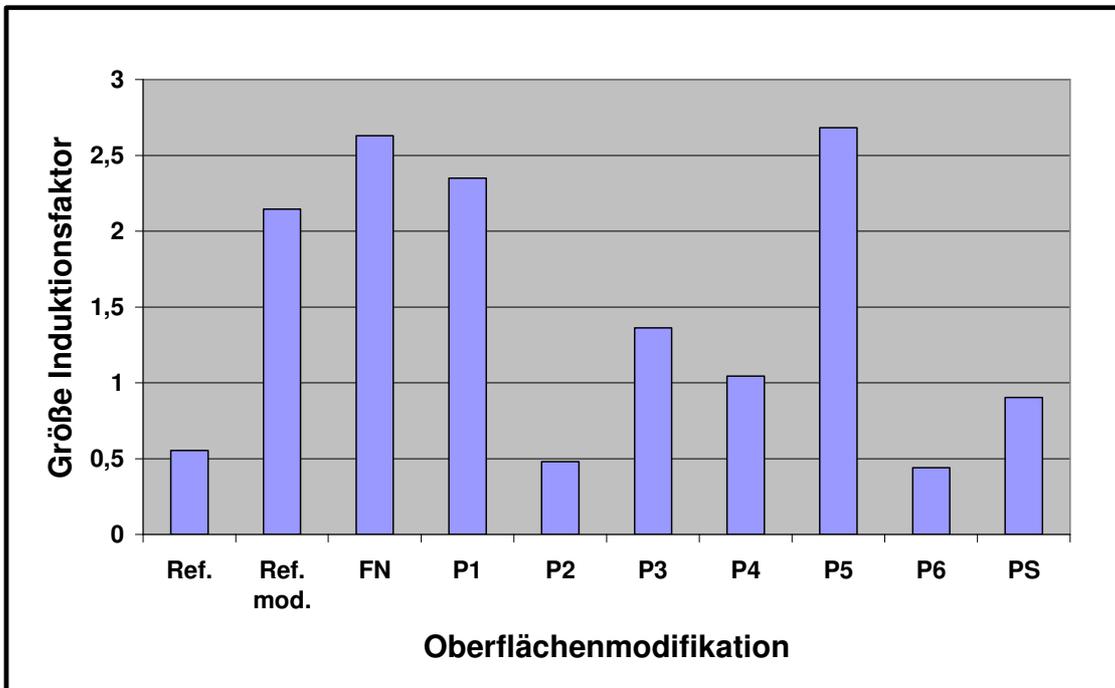


Abb.26: RT-PCR, Induktionsfaktor Coll1a1, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus induzierten zu nicht induzierten Zellen.

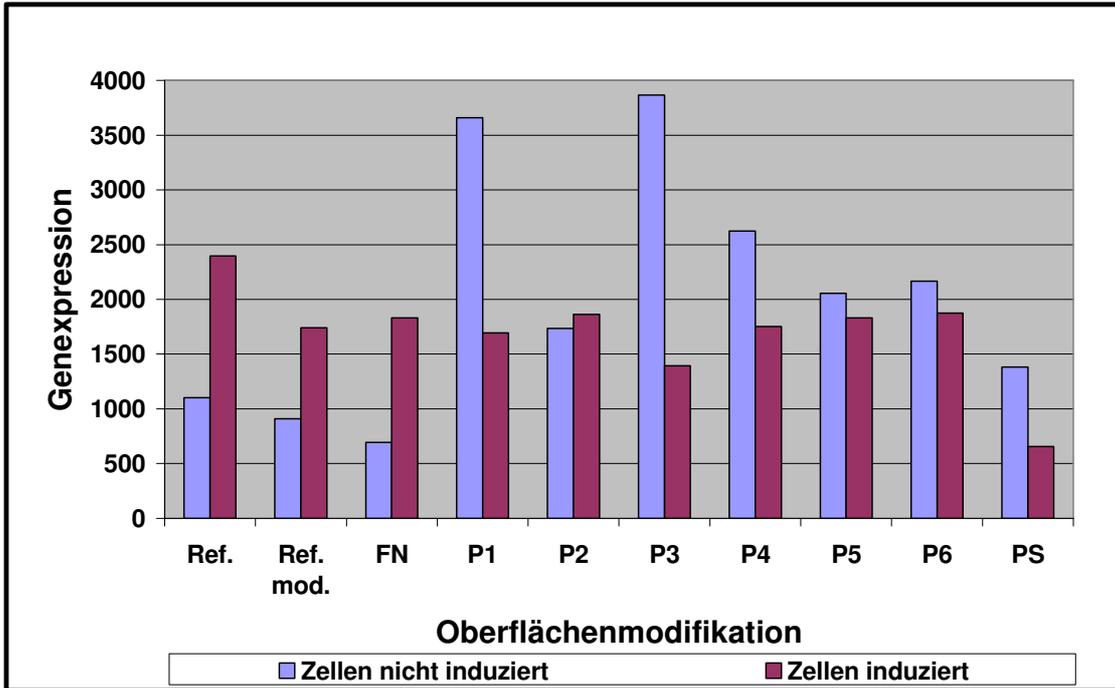


Abb.27: RT-PCR, Genexpression Periostin, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus dem Marker Periostin dividiert durch Referenz GAPDH (Einzelwerte) jeweils für induzierte und nicht induzierte Zellen.

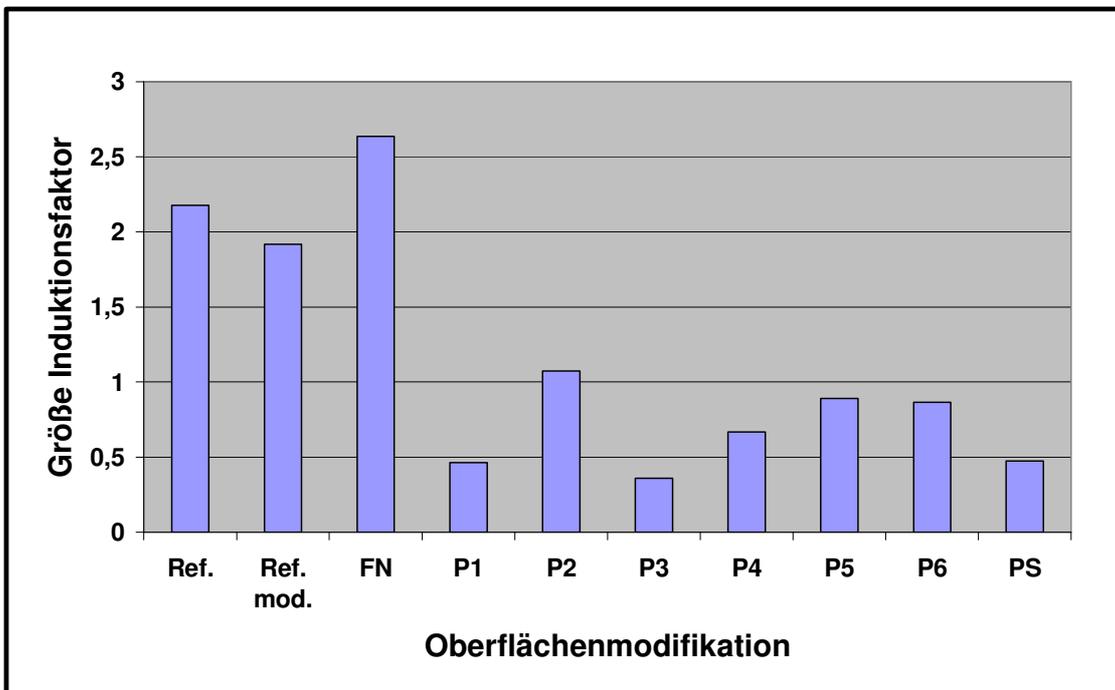


Abb.28: RT-PCR, Induktionsfaktor Periostin, Oberfläche Camlog-Promote mit Stammzellen aus dem Kieferperiost, 4.500 Zellen angeimpft, 30 Tage in Kultur, 20 Tage induziert, Start der Induktion an Tag zehn, Quotient aus induzierten zu nicht induzierten Zellen.

### **3.4.1. Ergebnisse RT-PCR**

#### **3.4.1.1. Osteogene Marker auf Oberflächen mit nicht induzierten Zellen**

Unter nicht induzierenden Bedingungen war der osteogene Marker AP (siehe S. 55, Abb. 19) auf der Oberfläche mit dem gekoppelten Peptid P2 am höchsten exprimiert (11,63), gefolgt von der unmodifizierten Referenzoberfläche (9,05) und PS (8,95).

Im Fall des OSN (siehe S. 56, Abb. 21) waren die Werte auf allen Oberflächen sehr niedrig, jedoch auf der modifizierten Referenz (2,14) sowie auf der Oberfläche mit FN (1,99) deutlich am höchsten.

IGF-2 wurde insgesamt unter nicht induzierenden Bedingungen ebenfalls nur sehr gering exprimiert. Bei diesem Marker (siehe S. 57, Abb. 23) lag die Oberfläche mit P4 (0,47) an der Spitze, gefolgt von der Referenz (0,27) und der Oberfläche mit P2 (0,25).

Die Werte für Coll1a1 (siehe S. 58, Abb. 25) waren auf der Referenz (43,39), P2 (42,06) und auf P6 (38,86) signifikant höher als auf den restlichen Titanoberflächen.

Die Oberflächen mit den gekoppelten Peptiden P3 (3.865,59) und P1 (3.659,34) zeigten beim Periostin (siehe S. 59, Abb. 27) mit Abstand die höchste Expression. Diese war ca. dreimal höher als auf der Referenzoberfläche (1.100,92).

### **3.4.1.2. Osteogene Marker auf Oberflächen mit induzierten Zellen**

Die Expression des Markers AP (siehe S. 55, Abb. 19) war auf der Oberfläche mit FN (41,70) fast doppelt so hoch wie auf der Referenzoberfläche (19,28). Außerdem lagen alle Peptide, außer P3 (15,20), höher als die Referenz.

Die höchsten Werte für OSN (siehe S. 56, Abb. 21) waren auf der Oberfläche P3 (2.377,99), gefolgt von der Oberfläche P5 (2.132,58).

Der osteogene Marker Igf-2 (siehe S. 57, Abb. 23) war auf der Oberfläche mit dem gekoppelten Peptid P4 (51,62) am höchsten. Dies war ebenfalls die einzige Oberflächenmodifikation, die besser war als die Referenz (43,97). Es waren jedoch sämtliche Titanplättchen besser als PS (9,74).

Im Fall des Collagen1a1 (siehe S. 58, Abb. 25) waren die Modifikationen mit P1 (24,12) und P5 (24,14) genau so hoch wie die Referenz (24,03). Es waren ebenfalls alle Werte der Titanoberflächen höher als PS (10,57).

Beim Periostin (siehe S. 59, Abb. 27) waren die Werte aller Oberflächen geringer als die Referenz (2.397,33), wobei der Wert für PS (655,28) wieder am geringsten war.

### **3.4.1.3. Induktion auf den unterschiedlich modifizierten Versuchsoberflächen**

Die höchste Induktion erfolgte bei der AP (siehe S. 55, Abb. 20) auf der modifizierten Referenz (31,15) und auf der Oberfläche mit FN (29,12). Beide Oberflächen erreichten eine fast 15-fache Steigerung zur Referenz (2,13). Die Oberflächen mit den Peptiden P1 (10,31), P3 (9,55) und P5 (9,32) erreichten, bezogen auf die Referenz, eine ca. vier- bis fünffache Steigerung. Von den verschiedenen Peptidenmodifikationen war bei der Oberfläche mit dem Peptid

P2 (2,49) die geringste Induktion vorzufinden. Die allgemein niedrigste Induktion zeigte PS (1,06).

Bei OSN (siehe S. 56, Abb. 22) war die höchste Induktion auf der Referenzoberfläche zu finden (2.415,10). Die besten mit einem Peptid gekoppelten Oberflächen waren P2 (1.693,91) und P3 (1.593,48). Die Modifikation mit den niedrigsten Werten war FN (914,62). Die niedrigste Induktion war ebenfalls auf PS (571,42) vorzufinden.

Die Induktion beim osteogenen Marker Igf-2 (siehe S. 57, Abb. 24) war bei P5 (517,32) und FN (456,44) am höchsten und ca. dreimal so groß wie bei der Referenz (160,55). Das Peptid mit der geringsten Induktion war P4 (110,60).

Im Falle des Collagen1a1 (siehe S. 58, Abb. 26) war die höchste Induktion bei P5 (2,68), FN (2,63), P1 (2,35) und der mod. Referenz (2,15) zu finden. Die Werte dieser Modifikationen waren somit um das vier- bis fünffache höher als auf der Referenzoberfläche (0,554). Die niedrigsten Werte waren auf den Oberflächen mit den Peptiden P2 (0,48) und P6 (0,44) zu finden.

Die höchste Induktion erfolgte bei dem osteogenen Marker Periostin (siehe S. 59, Abb. 28) auf der Oberfläche mit FN (2,64). Dies war die einzige Oberfläche, die eine höhere Induktion als die Referenz (2,18) erzielen konnte, welche dicht gefolgt von der modifizierten Referenz (1,92) die zweithöchste Induktion aufwies. Die niedrigste Induktion war auf der Oberfläche mit dem Peptid P3 (0,36) zu finden.

### **3.4.2. Zusammenfassung Genexpression / -induktion**

Die mit Abstand höchste Expressionssteigerung wurde beim osteogenen Marker OSN (siehe S. 56, Abb. 22) erreicht. Hierbei lag der Induktionsfaktor zwischen 700 und 1.700 (Ref mod. = 736,59; P2 = 1.693,91). Den höchsten Wert erzielte bei diesem Marker jedoch die Referenzoberfläche mit ca. 2.400

(Ref. = 2.415,10). Absolut am höchsten induziert (siehe S. 56, Abb. 21) war die Oberfläche mit dem Peptid P3 (P3 = 2.377,99).

Die zweithöchste Steigerung war beim Marker Igf-2 (siehe S. 57, Abb. 24) zu beobachten. Hier konnte ein Induktionsfaktor von 110 bis 510 erzielt werden (P4 = 110,60; P5 = 517,32). Absolut am höchsten induziert (siehe S. 57, Abb. 23) wurde hier durch die Oberflächenmodifikation P4 (51,62).

Bei der AP (siehe S. 55, Abb. 20) wurde eine Steigerung um das 30-fache erzielt (Ref. mod. = 31,15; FN = 29,12). Absolut am höchsten (siehe S. 55, Abb. 19) war FN (41,70) und somit um das fast 42-fache höher als GAPDH.

Bei den Markern Collagen1a1 (siehe S. 58, Abb. 26) und Periostin (siehe S. 59, Abb. 28) konnte eine Steigerung um den Faktor 2,6 erreicht werden (Coll1a1 mit P5 = 2,68; Periostin mit FN = 2,64).

Die höchste Steigerung der Expression durch die Induktion zeigte OSN. Hinsichtlich der Genexpression absolut am höchsten war OSN (siehe S. 56, Abb. 21). Hier lagen die Werte der induzierten Zellen um bis zu ca. 2.000 über den nicht induzierten. (OSN P3 nicht ind. = 1,49/ind. = 2.377,99).

Im Gegensatz zum OSN waren beim Periostin (siehe S. 59, Abb. 27) die absoluten Werte bei den nicht induzierten Zellen am höchsten. Sie lagen um bis zu ca. 2.000 über denen der induzierten (P3 nicht ind. = 3865,59/ind. = 1.393,70).

Bei den osteogenen Markern Igf-2 (siehe S. 57, Abb. 24) und Collagen1a1 (siehe S.58, Abb. 26) zeigen jeweils die Oberflächen mit den Peptiden P2 und P4 relativ wenig Induktion. P5 zeigt bei beiden Markern die höchste Induktion von allen Peptiden, gefolgt von FN.

Bei OSN (siehe S. 56, Abb. 22) zeigt die unmodifizierte Referenz hinsichtlich des Induktionsfaktors die höchsten Werte. Auf allen anderen Oberflächen war dieser erheblich geringer.

Bei drei von fünf getesteten Markern (OSN, Igf-2, Coll1a1) bewirkten einzelne Peptide eine vergleichbare oder sogar höhere Induktion der entsprechenden Marker als FN. Lediglich bei AP und Periostin wurde die durch FN erzielbare Induktion nicht annähernd erreicht. Unter den Peptiden zeigten insgesamt P1, P2 und P5 eine ausgeprägte Induktion der verschiedenen Marker.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Peptidsequenzen kovalent an experimentelle sowie kommerzielle Titanoberflächen eines Herstellers gekoppelt. Im Folgenden wurde die Wirkung dieser Signalsequenzen auf SAOS-2 Osteoblasten (in den Vorversuchen) sowie Stammzellen aus dem menschlichen Kieferperiost (in den Hauptversuchen) untersucht. Hierzu wurden Wachstum, Adhäsion sowie Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation und Genexpression der Zellen bewertet.

Hintergrund und Ziel dieser In-vitro-Untersuchung ist es, die Schnittstelle zwischen Implantat und dem umliegenden Gewebe zu beeinflussen bzw. die Zellanheftung sowie Proliferation bzw. Differenzierung zu fördern und zu beschleunigen. Dadurch soll ein schnelles und stabiles Einheilen des Implantates erreicht sowie eine frühere Mineralisation erzielt werden.

In zahlreichen Studien konnte bereits belegt werden, dass Implantatoberflächen, die mit entsprechenden Signalsequenzen beschichtet waren, bestimmte fördernde Effekte erzielten. Dies wird am Beispiel von Fibronectin (FN) deutlich. Bei einer der in FN enthaltenen Signalsequenzen handelt es sich um RGD (= Arginin-Glycin-Asparagin). Von der RGD-Sequenz ist bekannt, dass diese einen positiven Effekt bzw. Einfluss auf die Zelladhäsion sowie die Zellproliferation bzw. das Zellwachstum hat (Ardjomandi et al. 2012; Kantlehner et al. 2000; Schaffner et al. 1999; Cook et al. 1997). Des Weiteren scheint die RGD-Sequenz eine fördernde Wirkung auf die Knochenbildung zu haben (Ferris et al. 1999; Kroese-Deutman et al. 2005; Kantlehner et al. 2000; Petrie et al. 2009; Ardjomandi et al. 2012). In Tierversuchen konnte auf mit RGD gecoateten Implantatoberflächen eine höhere periimplantäre Knochendichte nachgewiesen werden (Elmengaard et al. 2005a; Ferris et al. 1999). Die oben aufgeführten Effekte können eine bessere mechanische Fixation des Implantates im Knochen bewirken (Roessler et al. 2001; Elmengaard et al. 2005a; Elmengaard et al. 2005b). Somit kann man sagen, dass diese

Signalsequenz indirekt zu einer Verbesserung der Osseointegration beiträgt (Ferris et al. 1999; Petrie et al. 2009).

Abgesehen von RGD wurden weitere Signalsequenzen in verschiedenen Biomolekülen beschrieben. Aus der Literatur wurden verschiedene Peptidsequenzen ausgesucht, die eine positive Beeinflussung der Osseointegration erwarten lassen. Mit diesen Peptiden wurden verschiedene, z. T. kommerziell erhältliche Implantatoberflächen funktionalisiert und der Einfluss der zur Funktionalisierung eingesetzten Moleküle auf humane Osteoblasten und Stammzellen untersucht.

In den Vorversuchen wurde zuerst das Zellwachstum einer humanen Osteoblasten-Zelllinie (SAOS-2) auf den verschiedenen Titanoberflächen verglichen. Anschließend erfolgte die Untersuchung des Verhaltens der Zellen hinsichtlich deren Wachstum, Adhäsion Stoffwechselaktivität (Proliferation) und osteogener Differenzierung.

In den durchgeführten Hauptversuchen erfolgte schließlich der Übergang zu den Stammzellen aus dem Kieferperiost und zu den unterschiedlichen synthetisch hergestellten Peptiden. In diesen Versuchen wurde der Einfluss dieser Peptide auf Proliferation und Differenzierung dieser Zellen untersucht.

Ziel der Funktionalisierung war es letztendlich, die Knochenneubildung an der Implantatoberfläche durch körpereigene Stammzellen zu stimulieren und so die Osseointegration von dentalen Implantaten zu optimieren.

Es ist bekannt, dass eine gezielte Induktion der osteogenen Differenzierung von Stammzellen z. B. durch Dexamethason und diverse Zusätze wie 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> und  $\beta$ -Glycerophosphate möglich ist (Leboy et al. 1991; Kasuagi et al. 1991; Rickard et al. 1994; Beresford et al. 1994; Beresford et al. 1992). Ähnlich wurde in vorliegender Arbeit vorgegangen. Hier wurde die Induktion durch ein Gemisch aus Vitamin C, Dexamethason und  $\beta$ -Glycerophosphate eingeleitet.

Im Folgenden werden die wesentlichen Ergebnisse zusammengefasst und hinsichtlich der oben gesetzten Ziele bewertet und diskutiert. Des Weiteren sollen die angewendeten Materialien, Methoden und Versuchsdurchführungen diskutiert werden.

### **4.1. Diskussion von Material und Methode**

Die ausführlichen Beschreibungen, Merkmale sowie Testprinzipien der entsprechenden Messungen und dergleichen sind dem Kapitel 2 „Material und Methoden“ zu entnehmen.

#### **4.1.1. Titanoberflächen**

Es standen fünf verschiedene, technisch hergestellte Titanoberflächen zur Verfügung. Die Oberfläche Nr. 1 (MA) und die Oberfläche Nr. 2 (Pro) entsprachen den aktuell verwendeten Oberflächen von kommerziell erhältlichen Implantaten der Firma Camlog. Bei den restlichen Oberflächen 3, 4 und 5 handelte es sich um experimentelle Modifikationen. Die Hauptversuche wurden mit der klinisch relevanten Promote-Oberfläche (Nr.2) durchgeführt, die im knöchernen Bereich der Camlog-Implantate eingesetzt wird.

Als Prüfkörper kamen runde Titanplättchen zum Einsatz (siehe Material und Methoden S. 10). Diese Titanplättchen besaßen einen Durchmesser von 10 mm bei einer Höhe von 1 mm. Die Prüfkörper wurden bereits steril geliefert, sodass eine entsprechende Vorbehandlung nicht nötig war.

Die Ergebnisse der mit Anatas beschichteten Oberflächen müssen kritisch betrachtet werden, da diese Beschichtung herstellungsbedingt nicht die gesamte Oberfläche bedeckte und somit unbeschichtete Randareale vorhanden waren. Dadurch werden Anatas-Effekte unterrepräsentiert, da in Randbereichen immer die Ausgangsoberfläche vorliegt. Dies spielt jedoch lediglich bei einzelnen Vorversuchen eine Rolle.

Als Referenzoberfläche diente im Langzeitversuch u. a. die Oberfläche PS. Hierbei handelte es sich um den Kulturgefäßboden der 48 Wellsplatten. Die hier gemessenen Werte müssen kritisch betrachtet werden, da die Fläche des ganzen Wells größer ist als die der Titanplättchen. Die Randbereiche der Versuchsplättchen, wie auch der Wellböden, sind anfänglich meist stark besiedelt. Zusätzlich können sich auch Zellen an den Wänden ansiedeln. Durch Umsetzen der Versuchsplättchen in leere Wells vor der Messung werden diese Zellen bei den Titanproben nicht mit gemessen, bei den als Referenz dienenden leeren Wells jedoch schon. Dies könnte u. a. auch die hohen Proliferationsraten in den Hauptversuchen erklären.

Zukünftig könnte hier Abhilfe geschaffen werden, indem Polystyrol-Plättchen zum Einsatz kommen. Diese Plättchen sollten genauso dimensioniert sein wie die entsprechenden Prüfkörper aus Titan. Somit könnten auch die Referenzoberflächen entsprechend in neue Kulturgefäße umgesetzt werden, was zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse führen würde.

### **4.1.2. Zellkulturmodelle**

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine In-vitro-Studie. Studien dieser Art sind u. a. besser zu kontrollieren und die gewünschten Bedingungen lassen sich besser bzw. einfacher beeinflussen und verändern. Durch standardisierte Versuchsbedingungen können so erzielte Ergebnisse besser miteinander verglichen werden. Allerdings lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne Weiteres auf In-vivo-Vorgänge übertragen. Es ist jedoch weder ethisch noch finanziell vertretbar Screening-Untersuchungen oder Methoden-Etablierungen wie in der vorliegenden Arbeit sofort im Tiermodell durchzuführen.

Zur Beantwortung der hier untersuchten Fragestellungen ist das In-vitro-Modell geeigneter, da die Zellreaktionen auf den verschiedenen modifizierten Titanoberflächen besser miteinander zu vergleichen sind.

Aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit von humanen Stammzellen wurden bei den Vorversuchen SAOS-2 Osteoblasten verwendet. Bei diesen Knochenzellen handelt es sich um eine Human Osteogenic Sarcoma Zelllinie. Die erwähnten Osteosarkomzellen kamen bereits vielfach in diversen anderen Studien zur Anwendung (Mayr-Wohlfart et al. 2001; Degasne et al. 1999; Postiglione et al. 2003; Ramaglia et al. 2011; Shapira et al. 2009).

Diese Zelllinie hat den Vorteil, dass sie sozusagen unbegrenzt verfügbar und relativ einfach zu handhaben ist. Jedoch unterscheiden sich diese Osteosarkomzellen natürlich in gewisser Weise von Primärzellkulturen bzw. menschlichen Stammzellen, z. B. hinsichtlich ihrer biologischen Reaktion. Da diese Zelllinie im Verhalten menschlichen Osteoblasten immer noch recht ähnlich ist (Rodan et al. 1987), wurde sie zumindest für die Vorversuche und deren Zielsetzung als geeignet angesehen.

Stammzellen spielen eine wesentliche Rolle im Bereich der regenerativen Medizin (Ringe et al. 2002). Menschliche Stammzellen kommen bei der Gewebekonstruktion bzw. Gewebezüchtung, dem sogenannten Tissue Engineering, bereits häufig zur Anwendung. Auf diesem Gebiet ist der Einsatz von Stammzellen heutzutage weit verbreitet und somit vielfach Gegenstand wissenschaftlicher Studien (Alexander et al. 2008; Mangano et al. 2010; Zhang et al. 2006; Yamada et al. 2004; Kawaguchi et al. 2004; Hasegawa et al. 2006). Für die praktische Anwendung im Bereich der Regeneration von Knochengewebe werden überwiegend mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark eingesetzt (Hayashi et al. 2008).

Eine weitere, häufig eingesetzte Methode ist die Gewinnung von Stammzellen aus dem Beckenkamm. In den hier durchgeführten Hauptversuchen wurden jedoch Stammzellen aus dem menschlichen Kieferperiost verwendet. Diese Zellen stellen hinsichtlich des Zielgewebes eines inserierten Implantates eine Optimierung der In-vitro-Studie dar. Ein weiterer Vorteil dieser Zellen ist, dass diese bei größeren bzw. umfangreicheren intraoralen Eingriffen gewonnen werden können und somit die Zahl der Folgeeingriffe verringert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit kamen in sämtlichen Hauptversuchen Stammzellen von ein und demselben Spender zum Einsatz. Es ist jedoch nicht von der Hand zu weisen, dass dadurch die erzielten Ergebnisse nicht verallgemeinert werden können. Hierzu sind weiter Versuchsreihen mit Stammzellen von verschiedenen Spendern unterschiedlichen Alters und Geschlechts erforderlich, was jedoch den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte.

### **4.1.3. Messung der initialen Anheftung und der Zellbedeckung**

Die Zelldichte auf den Proben wurde durch die Kristallviolett-färbung ermittelt. Diese hat den Vorteil, dass eine visuelle Dokumentation erfolgen kann, da die Zellen optisch sichtbar werden. Des Weiteren kann durch Eluieren des Farbstoffes die optische Dichte bestimmt und die gewonnenen Ergebnisse quantifiziert und statistisch ausgewertet werden. Die Kristallviolett-färbung ist relativ einfach und schnell durchzuführen, hat jedoch den Nachteil, dass sie potentiell gesundheitsgefährdend und umweltschädlich ist und daher erhöhte Vorsicht im Umgang geboten ist. Sie kann, ebenso wie der XTT-Test, zur indirekten Ermittlung der Proliferationsaktivität herangezogen werden. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine rein quantitative Proliferationsmessung, da die Proteine einer Zelle gefärbt werden. Somit beeinflusst neben der Zellzahl auch die Zellgröße das Ergebnis. Ferner sind Kontrollgruppen nötig, da der Hintergrund aufgrund von unspezifischer Farbstoffeinlagerung korrigiert werden muss. In den Versuchen wurden entsprechende Kontrollgruppen für jede Oberfläche mitgeführt.

### **4.1.4. Messung von Stoffwechselaktivität und Proliferation**

Die Stoffwechselaktivität der Zellen wurde mit dem XTT-Test bestimmt. Bei diesem Test erfolgt die Bildung von Formazanfarbstoff durch mitochondriale Dehydrogenasen. Der gebildete Farbstoff korreliert hierbei, unter der Voraussetzung gleicher Stoffwechselaktivität auf allen Oberflächen, mit der

Zellzahl und ermöglicht dadurch auch eine indirekte Bestimmung der Proliferation.

Die Messung der Zellproliferation erfolgte, wo immer möglich, mit dem BrdU-Test. Bei diesem Test wird der Marker (Bromdesoxy-Uridin; BrdU) während eines Markierungszeitraums an Stelle von Thymidin in die DNA aller neu-gebildeten Zellen eingebaut. Es handelt sich somit bei diesem Test um eine echte Proliferationsmessung.

Der BrdU-Test ist jedoch ein Endpunkt-Test, d. h. die Kulturen müssen fixiert werden. Wiederholte Messungen an einer Kultur, wie z. B. in den Hauptversuchen mit einer Dauer von 42 Tagen, sind nicht möglich. Daher wurde bei diesen Versuchsreihen der XTT-Test zur indirekten Proliferationsmessung (s. o.) herangezogen.

### **4.1.5. Nachweis der Protein- und Peptidkopplung**

Da die Menge an gekoppeltem Peptid bzw. Protein sehr gering ist, sind zum Nachweis empfindliche Verfahren nötig. Hierfür geeignet ist z. B. die immunologische Detektion über fluoreszenzmarkierte Antikörper.

Um die erfolgreiche Kopplung des Proteins Fibronectin und der verwendeten Peptide nachzuweisen, kam jeweils ein Fluoreszenzfarbstoff zum Einsatz. Im Falle des Proteins FN handelte es sich hierbei um den Farbstoff TRITC (= Tetramethylrhodamine-5 (und 6)-isothiocyanate). Für den Nachweis wurde ein gegen die „Cell Binding Domain“ gerichteter Erstantikörper und ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper eingesetzt. Einschränkend ist anzumerken, dass mit dieser Methode lediglich ein qualitativer Nachweis der erfolgreichen Kopplung geführt werden kann.

Zum Nachweis der erfolgreichen Peptidkopplung war ein immunologischer Nachweis leider nicht einsetzbar. Es wurden verschiedene gegen FN, sowie gegen die „Cell Binding Domain“ gerichtete Antikörper erfolglos getestet. Zum

Zeitpunkt des Nachweises waren keine gegen die Peptide gerichteten Antikörper erhältlich, daher wurde auf ein anderes Verfahren zurückgegriffen.

Mittels eines Antibody Labeling Kits wurde der Fluoreszenzfarbstoff FITC (= Fluorescein isothiocyanate) an bestimmte funktionelle Gruppen des Peptids P1 (FAKLAARLYRKAC) gekoppelt (siehe Material und Methoden S. 22 bis S. 23). Anschließend wurde das mit dem Fluoreszenzmarker versehene Peptid kovalent an die Versuchsoberfläche gekoppelt.

Mit dieser Methode konnte die erfolgreiche Peptidkopplung nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte mit dem Peptid P1 stellvertretend für alle angewendeten Peptide, da dieses Peptid die meisten für das Labeling nötigen freien Bindungsstellen besitzt.

Es konnte erneut nur ein qualitativer Nachweis erbracht werden. Der Vergleich unterschiedlicher Kopplungszeiten zeigt aber, dass qualitative Unterschiede zu erkennen sind (siehe S. 35, Abb. 3). Es ist jedoch kritisch anzumerken, dass ggf. nicht die gleichen Kopplungsbedingungen vorlagen, da u. U. auch eine Kopplung über reaktive Gruppen am FITC-Molekül erfolgen könnte.

### **4.2. Diskussion der Ergebnisse**

Die jeweiligen Versuchsdurchführungen sowie die gesamten ermittelten Werte sind den entsprechenden Versuchen zu entnehmen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden

- **Osteoblastenwachstum**

Welchen Einfluss haben die verschiedenen technischen Titanoberflächenmodifikationen (gedreht, gestrahlt/geätzt etc.) auf das Osteoblastenwachstum?

- **Zellbesiedelung / Initiale Anheftung**

Kann die Zellbesiedelung auf den verschiedenen Titanoberflächen durch die Modifikation von Oberflächen mit Proteinen und Peptiden beeinflusst oder verbessert werden bzw. welchen Einfluss haben verschiedene mit Protein bzw. Peptiden modifizierte Titanoberflächen auf die initiale Anheftung?

- **Kopplungseffizienz / Einfluss von Biomolekülen**

Kann die für ganze Proteinmoleküle (wie zum Beispiel FN) entwickelte Kopplungstechnik für den Einsatz mit Peptiden adaptiert werden? Wie ist der Einfluss der verwendeten Peptide RGD1 und RGD2 auf die Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation von SAOS-2 Osteoblasten im Vergleich mit dem etablierten Anheftungsfaktor FN?

- **Fördernde Wirkung auf die Proliferation humaner Stammzellen**

Gibt es fördernde Effekte bei den ausgewählten Peptiden P1 bis P6 im Vergleich zu FN, bzw. wie ist der Einfluss der modifizierten Camlog Oberflächen auf die Zellproliferation von Stammzellen in Langzeitversuchen (bis zu 42 Tagen)?

- **Genexpression / Osteogene Induktion**

Wie ist der Einfluss der einzelnen Oberflächenmodifikationen auf die Genexpression während eines 20-tägigen Induktionszeitraumes? Kann eine osteogene Differenzierung der Stammzellen auf der Implantatoberfläche durch die gekoppelten Peptide gefördert werden?

#### **4.2.1. Osteoblastenwachstum auf verschiedenen Camlog Titanoberflächen**

In den Vorversuchen der vorliegenden Arbeit war das Osteoblastenwachstum (Proliferation) bzw. die Zellbedeckung der Prüfkörper nach 48 Stunden auf den verwendeten glatten Oberflächen besser als auf den gestrahlt/geätztten rauen

Oberflächen (siehe Vorversuche S. 31, Abb. 1). Andere wissenschaftliche Untersuchungen mit humanen Osteoblasten haben ebenfalls gezeigt, dass Zellen auf weniger rauen Oberflächen sozusagen enger bzw. dichter wachsen (Anselme et al. 2005). Es ist aber nicht von der Hand zu weisen, dass eine gewisse Oberflächenrauigkeit ein stärkeres Zellattachement mit sich bringt (Bowers et al. 1992; Jayaraman et al. 2004).

Insgesamt haben sich rauere Oberflächen für die Osseointegration von dentalen Implantaten als vorteilhaft erwiesen. Daher wurden in den Hauptversuchen raue Oberflächen verwendet, um eine Förderung der Osteoblastenproliferation auf diesen langsamer besiedelten Oberflächen durch die entsprechenden Beschichtungen zu prüfen.

#### **4.2.2. Einfluss von biologisch modifizierten Oberflächen auf die Zellbesiedelung / Initiale Anheftung**

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Förderung der entsprechenden Oberflächenmodifikationen auf die Zellbesiedelung bzw. die initiale Anheftung getestet. Die Versuche erfolgten auf glatten wie auch auf rauen Oberflächen. Auf den glatten Oberflächen konnte eine deutliche Förderung der Kurzzeitanheftung durch die Modifikation mit FN und RGD erzielt werden (siehe Vorversuche S. 38 bis S. 41). Dies war auf rauen Oberflächen nicht der Fall, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass auf rauen Oberflächen die Anheftung bereits sehr gut ist, sodass keine weitere Förderung mehr möglich zu sein scheint.

Die Ergebnisse decken sich mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten, denn in zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Kurzzeitanheftung/Initiale Anheftung auf rauen Oberflächen besser ist. Das heißt, eine bestimmte Oberflächentopographie kann einen positiven Einfluss auf die Zelladhäsion (Anselme et al. 2005; Bigerelle et al. 2005; Huang HH et al. 2004; Jayaraman et al. 2004) und unter bestimmten Bedingungen auch auf die Proliferation (Jayaraman et al. 2004) ausüben.

Die Ergebnisse sollen anhand der Oberfläche MA-Anatas verdeutlicht werden. Auf dieser Oberfläche konnte durch die Beschichtung mit RGD eine Förderung um 50 % und im Falle der FN-Beschichtung eine Förderung bis zu 70 % erzielt werden.

Die erzielten Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse anderer wissenschaftlicher Arbeiten, in denen mit RGD gecoatete Oberflächen allgemein zur Verbesserung der Zelladhäsion (Hersel et al. 2003; Davis et al. 2002; LeBaron et al. 2000; Ito et al. 1991), der Adhäsion von Osteoblasten (Durrieu et al. 2004) sowie Fibroblasten und Epithelzellen (Zhao et al. 2005) beitrugen.

#### **4.2.3. Überprüfung der Kopplungseffizienz der Biomoleküle anhand des Einflusses von FN, RGD1 und RGD2 auf die Stoffwechselaktivität von SAOS-2 Osteoblasten**

Dass mit RGD gecoatete Oberflächen nicht nur die Anheftung fördern, sondern auch einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation haben, konnte bereits mehrfach wissenschaftlich nachgewiesen werden (Kantlehner et al. 2000; Schaffner et al. 1999). Auch in dieser Arbeit konnte eine deutliche Förderung der Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation von SAOS-2 Osteoblasten durch die verwendeten Biomoleküle erzielt werden (siehe S. 42, Abb. 9 u. 10 sowie S. 43, Abb. 11). Es ist jedoch anzumerken, dass in den durchgeführten Versuchen der vorliegenden Arbeit die Förderung mit FN (bis zu fünffache Förderung) deutlich größer war als mit den beiden verwendeten RGD Varianten (bis zu dreifache Förderung). Dies könnte zum einen daran liegen, dass ggf. die Menge der erfolgreich gekoppelten Peptide geringer war als die des Fibronektins. Zum anderen ist aber auch anzunehmen, dass das menschliche, unveränderte Biomolekül FN durchaus eine stärkere Wirkung auf humane Zellen hat als synthetisch hergestellte Signalsequenzen. Die Kopplungsmethode kann damit jedoch insgesamt als erfolgreich und wirkungsvoll, auch für Peptide, angesehen werden.

#### **4.2.4. Fördernde Wirkung der ausgewählten Peptide P1 bis P6 sowie FN auf die Proliferation von humanen Stammzellen im Langzeitversuch von 42 Tagen**

Alle modifizierten Oberflächen hatten eine fördernde Wirkung auf die Zellproliferation der Stammzellen im Langzeitversuch (siehe S. 47 bis 49, Abb. 12 bis Abb. 17). Die im Schnitt höchste Förderung konnte mit FN sowie mit P2 (**GRGDSC**/Cell-matrix interaction domain) erzielt werden. Ebenfalls gute Ergebnisse wurden mit den Peptiden P1 (**FAKLAARLYRKAC**/aus Antithrombin) und P6 (**EEEEEEPRGDTC**/Cell-matrix interaction domain) erreicht.

Alle Titanoberflächen zeigten jedoch eine geringere Proliferation als die entsprechende Referenzoberfläche PS. Die Proliferation auf dieser Oberfläche war bereits ab Tag Zehn des aufgeführten Langzeitversuchs deutlich höher als auf allen Titanoberflächen (siehe S. 47 bis 48, Abb. 12 bis Abb. 14).

Dies ist nicht verwunderlich, da die PS-Oberfläche (= Polystyrol-Oberfläche) der Zellkulturplatten für die Anzucht von Zellen optimiert ist. Durch die entsprechende Behandlung von Polystyrol (Tissue Culture Treatment) entstehen u. a. Hydroxyl-Gruppen auf der Materialoberfläche, welche für die Zelladhäsion förderlich sind (Curtis et al. 1983). Ein weiterer wichtiger Grund für die vorteilhaften Materialeigenschaften ist, dass an die Oberfläche von TC-Treated Polystyrol Serumproteine adsorbieren können, was das Zellattachement fördert (Steele et al. 1993).

Eine Angleichung der Messwerte der Titanplättchen an die entsprechenden Messwerte der Referenzoberfläche PS erfolgte erst gegen Ende der Versuchslaufzeit. Dies ist u. a. damit zu erklären, dass mit zunehmender Versuchslaufzeit die Zellbesiedelung auf der Referenzoberfläche PS ein gewisses Maximum erreicht und die Zellproliferation zurückgeht, was wiederum den oben erwähnten Angleich ermöglicht.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Referenzoberfläche PS (gesamter Boden eines Wells auf der Zellkulturplatte) größer als jene der

Titanplättchen war, was zu einer erschwerten Vergleichbarkeit der Referenzoberfläche mit den Titanoberflächen führt (siehe Titanoberflächen S. 67 - 68).

Ähnlich ist die schnellere Angleichung der Messwerte bei den nicht induzierten Plättchen bzw. der Unterschied zwischen den entsprechenden induzierten und nicht induzierten Plättchen zu erklären (siehe S. 49, Abb. 17). Durch die Induktion wird die Zellproliferation zunächst kurzzeitig erhöht, dann aber verringert und die Differenzierung in Richtung Knochenaufbau eingeleitet.

Die nach Induktionsbeginn ermittelte höhere Proliferationsrate auf den induzierten Plättchen (siehe S. 48, Abb. 15) ist vermutlich auf die Induktion mit dem Mix aus Dexamethason, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphate zurückzuführen. Dexamethason bewirkt zuerst einen Anstieg der Proliferation, bevor die erwünschte Differenzierung stattfindet (McCulloch et al. 1986).

Die Zellproliferation auf der modifizierten Referenzoberfläche war über weite Strecken vergleichbar mit den biofunktionalisierten, d. h. mit Peptid oder Protein gekoppelten Titanoberflächen (siehe S. 48 bis 49, Abb. 15 bis Abb. 17). Dies könnte u. a. daran liegen, dass die freie elektrophile Kopplungsgruppe des Photoimmobilizers (Antrachinon) eine direkt fördernde Wirkung besitzt oder aber eine verstärkte Adhäsion bestimmter Serumkomponenten bewirkt, welche die Zellproliferation fördern.

#### **4.2.5. Einfluss der Oberflächenmodifikationen auf die Genexpression von Stammzellen / Osteogene Differenzierung**

Die Differenzierung der Zellen kann in mehrere Phasen eingeteilt werden in denen die Expression spezifischer Marker stattfindet. Hierbei handelt es sich um die Proliferationsphase, die Matrixphase und die Mineralisationsphase (Stein et al. 1990; Owen et al. 1990b; Schwartzmann 2012).

Während der Proliferationsphase erfolgt die Expression von Typ I Collagen (Coll1a1) (Stein et al. 1990; Owen et al. 1990b). Direkt nach der Proliferationsphase, d. h. in der frühen Matrixphase, ist mit einem Anstieg der Alkalischen Phosphatase (AP) zu rechnen (Morsczeck 2006; Weinreb et al. 1990; Stein et al. 1990). Der osteogene Marker Osteonectin (OSN) tritt im Verlauf der Matrixphase auf (Jundt et al. 1987) und die Marker Igf-2 und Periostin (Per) sind in der frühen Mineralisationsphase zu finden (Chen et al. 2010; Oshima et al. 2002).

Nach 20 Tagen Induktion wurde die höchste Expressionssteigerung beim osteogenen Marker Osteonectin erreicht. Hier lag der Induktionsfaktor bei 700 - 1.700 (Induktionsfaktor Referenzoberfläche PS = 600, Induktionsfaktor modifizierte Referenzoberfläche ohne Peptid = 700).

Der osteogene Marker OSN wurde gefolgt von Igf-2, AP, Coll1a1 und Periostin (siehe S. 55 bis 59, Abb. 19 bis Abb. 28). Die hohe Expressionssteigerung von OSN lässt darauf schließen, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt des Nachweises der in Matrixphase befunden haben. Aufgrund der geringen Expressionssteigerung der osteogenen Marker AP, Coll1a1 sowie der deutlich höheren Steigerung des Markers Igf-2 kann man darauf schließen, dass es sich hierbei um die späte Matrixphase gehandelt haben muss.

Die größte Förderung war auf den mit FN modifizierten Oberflächen zu finden, gefolgt von den mit P5 (CGGN**GEPRG**DTYRAY/Bone Sialoprotein) und P2 (**GRGD**SC/Cell-Matrix Interaction Domain) gecoateten Titanoberflächen.

Die Induktion ist somit im Prinzip gelungen. Das heißt, die Stammzellen konnten gezielt stimuliert werden auf der Implantatoberfläche extrazelluläre Matrix zu bilden.

In zukünftigen Studien sollte das Augenmerk auf Details der Genexpression gelegt werden. Hierbei wäre es sinnvoll, die Expression der hier getesteten osteogenen Markern zu verschiedenen Induktionszeiten auszuwerten. Somit könnten ggf. Erkenntnisse über die oben beschriebenen Phasen der Differenzierung und den Einfluss modifizierter Oberflächen auf diese gewonnen

werden. Im Anschluss könnte der Fokus auf der Mineralisation liegen. Anhand der Expression von entsprechenden spezifischen osteogenen Markern könnte der Abschluss der Mineralisationsphase belegt und die Mineralisation selbst durch weitere Tests, wie z. B. die Kalzifizierungsmessung mit Alizarin (Gregory et al. 2004; Yu et al. 2004; Gunn et al. 2006), nachgewiesen werden. So könnten etwaige Effekte durch Proteine oder Peptide bestätigt werden.

### **4.3. Schlussfolgerung und Ausblick**

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse aus vorliegender Arbeit kann man sagen, dass das eingesetzte Kopplungsverfahren zur Beschichtung von Implantatoberflächen aus Titan mit extrazellulären Peptiden sich durchaus positiv auf Adhäsion, Proliferation und osteogene Differenzierung von Zellen ausgewirkt hat. Insbesondere Peptide mit enthaltener RGD-Sequenz scheinen besonders vielversprechend zu sein, wobei diese jedoch nicht dieselben hohen Ergebnisse erzielen konnten wie die Oberflächenbeschichtung mit dem Protein FN.

Die vorliegende Arbeit stellt lediglich einen Einstieg in das Thema der Biofunktionalisierung von Titanoberflächen durch kovalente Kopplung von Signalsequenzen dar.

Zukünftige Studien könnten z. B. durch Konzentrationsreihen und andere Spender optimiert werden. In weiteren In-vitro-Versuchen sollte dann geklärt werden, ob derartige Oberflächenmodifikationen ebenso fördernde Effekte auf andere Zellarten haben. Denn z. B. im Halsbereich von inserierten Implantaten kommen keine Osteoblasten sondern andere Zellen wie Keratinozyten und Fibroblasten vor.

Anschließend wären entsprechende In-vivo-Studien durchzuführen, bevor die modifizierten Titanoberflächen zur klinischen Anwendung kommen.

Ebenfalls denkbar wäre es, andere Implantatwerkstoffe mit extrazellulären Peptiden zu coat. Hierbei könnten alloplastische Materialien, wie z. B.

Keramiken (z. B. Zirkondioxid) oder Kunststoffe (z. B. PEEK) auf ihre Eignung getestet werden. Insbesondere der Werkstoff PEEK (= Polyetheretherketon) scheint zukünftig von wissenschaftlichem Interesse zu sein und besitzt hinsichtlich seiner Eignung als Implantatmaterial noch Verbesserungspotential. Auch eine derartige Modifikation von Gewebeträgern, sogenannten Scaffolds, ist denkbar.

## 5. Zusammenfassung

Der Erfolg einer Implantation hängt aus Sicht der Werkstoffkunde betrachtet massiv von der Oberfläche des zu inserierenden Implantates ab. Hierbei sind die wesentlichen Ziele u.a. eine möglichst kurze Einheilphase und eine optimale Osseointegration. Diese Ziele können vor allem durch die Modifikation der Implantatoberflächen positiv beeinflusst werden.

Nach heutigem Stand sind raue, strukturierte Titanimplantate die wohl beste und somit gängigste Implantatvariante. Da bei den technischen Verfahren zur Oberflächenmodifikation voraussichtlich keine substantiellen Verbesserungen mehr zu erwarten sind, verschiebt sich das wissenschaftliche Interesse in Richtung Biofunktionalisierung. Bei dieser Art der Oberflächenmodifizierung wird das Implantat sozusagen als körpereigen gekennzeichnet und dadurch versucht, die Schnittstelle zwischen Implantat und Gewebe zu beeinflussen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, typische aktuelle Implantatoberflächen (gestrahlt/geätzt) durch die Beschichtung mit verschiedenen biologischen Signalsequenzen (Peptide) zu verbessern bzw. zu biofunktionalisieren. Um eine dauerhafte Beschichtung mit diesen Signalsequenzen zu gewährleisten, sollten diese kovalent an die Versuchsoberflächen gekoppelt werden.

Im Folgenden wurde die Wirkung dieser Signalsequenzen auf SAOS-2 Osteoblasten sowie Stammzellen aus dem menschlichen Kieferperiost untersucht. Als Referenz diente das Protein Fibronectin, sowie nicht modifizierte Titanoberflächen und Titanoberflächen die sämtliche Kopplungsschritte durchlaufen haben, an die aber kein Peptid gekoppelt wurde.

Um die Wirkung der Signalsequenzen zu bewerten wurden unterschiedliche Versuche und Tests durchgeführt. Bei den Untersuchungen des Zellwachstums, der initialen Anheftung, sowie der Adhäsion wurde die Kristallviolett färbung angewendet. Die Stoffwechselaktivität wurde anhand des XTT-Tests und die Zellproliferation mit dem BrdU-Test bestimmt. Um die Genexpression verschiedener osteogener Marker nachzuweisen wurde die RT-PCR eingesetzt.

Die durchgeführten Tests zeigten, dass das Osteoblastenwachstum auf glatten (z. B. gedrehten) Oberflächen besser ist als auf gestrahlt/geätzten Oberflächen (Messung nach vier Tagen). Auf glatten Titanoberflächen konnte durch die Beschichtung mit Fibronectin und RGD die initiale Anheftung deutlich verbessert werden (Messung nach einer Stunde). Die Stoffwechselaktivität bzw. Proliferation von SAOS-2 Osteoblasten konnte durch die Modifikation mit Fibronectin und RGD ebenfalls erheblich gesteigert werden (Messung nach zwei Tagen).

Alle verwendeten Peptide hatten ebenfalls eine fördernde Wirkung auf humane Periost-Stammzellen im Langzeitversuch von 42 Tagen, d. h. die Zellproliferation konnte deutlich erhöht werden. Hierbei war die Förderung durch FN am höchsten, gefolgt von P2 (**GRGDSC**).

Neben der Proliferation wurde auch untersucht, ob die osteogene Induktion der Stammzellen durch die Peptide gefördert werden kann. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass die höchste Steigerung der Genexpression bei den Titanoberflächen die mit FN, P5 (**CGNGEPRGDTYRAY**) und P2 beschichtet waren erfolgte (Messung nach 20 Tagen Induktion).

Auffällig war, dass die erzielten Ergebnisse der mit FN beschichteten Titanoberflächen im Schnitt signifikant besser waren als jene der mit Peptid beschichteten Titanoberflächen. Des Weiteren scheinen Peptide, welche die RGD-Sequenz enthalten, besonders vorteilhaft zu sein.

Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die hier etablierte Methode zur Biofunktionalisierung von Titanoberflächen durch kovalente Kopplung von Signalsequenzen eine geeignete Methode zur weiteren klinischen Optimierung von Implantatoberflächen darstellen könnte.

Unter den hier getesteten Signalsequenzen erzielten die Peptide mit der RGD-Sequenz die besten Ergebnisse.

## 6. Literaturverzeichnis

- Albrektsson T, Albrektsson B (1987). Osseointegration of bone implants. A review of an alternative mode of fixation. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 58 (5): 567-577.
- Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J (1981). Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 52 (2): 155-170.
- Alexander D, Hoffmann J, Munz A, Friedrich B, Geis-Gerstorfer J, Reinert S (2008). Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 19 (3): 965-974.
- Anselme K, Bigerelle M (2005). Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. *Acta Biomaterialia* 1 (2): 211-222.
- Ardjomandi N, Klein C, Kohler K, Maurer A, Kalbacher H, Niederländer J, Reinert S, Alexander D (2012). Indirect coating of RGD peptides using a poly-L-lysine spacer enhances jaw periosteal cell adhesion, proliferation, and differentiation into osteogenic tissue. *Journal of Biomedical Materials Research* 100 (8): 2034-2044.
- Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME (1992). Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of Cell Science* 102 (2): 341-351.
- Beresford JN, Joyner CJ, Devlin C, Triffitt JT (1994). The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Archives of Oral Biology* 39 (11): 941-947.
- Berglundh T, Abrahamsson I, Albouy JP, Lindhe J (2007). Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 18 (2): 147-152.

- Bigerelle M, Anselme K (2005). Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *Journal of Biomedical Materials Research* 72 (1): 36-46.
- Bornstein MM, Lussi A, Schmid B, Belser UC, Buser D (2003). Early loading of nonsubmerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: 3-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 18 (5): 659-666.
- Bornstein MM, Wittneben JG, Brägger U, Buser D (2010). Early loading at 21 days of non-submerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: 3-year results of a prospective study in the posterior mandible. *Journal of Periodontology* 81 (6): 809-818.
- Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM (1992). Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 7 (3): 302-310.
- Buser D, Broggin N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG (2004). Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *Journal of Dent Research* 83 (7): 529-533.
- Cavalcanti-Adam EA, Shapiro IM, Composto RJ, Macarak EJ, Adams CS (2002). RGD peptides immobilized on a mechanically deformable surface promote osteoblast differentiation. *Journal of bone and mineral research* 17 (12): 2130-2140.
- Chen L, Jiang W, Huang J, He BC, Zuo GW, Zhang W, Luo Q, Shi Q, Zhang BQ, Wagner ER, Luo J, Tang M, Wietholt C, Luo X, Bi Y, Su Y, Liu B, Kim SH, He CJ, Hu Y, Shen J, Rastegar F, Huang E, Gao Y, Gao JL, Zhou JZ, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, He TC, Deng ZL (2010). Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 25 (11): 2447-2459.
- Cochran D, Oates T, Morton D, Jones A, Buser D, Peters F (2007). Clinical field trial examining an implant with a sand-blasted, acid-etched surface. *Journal of Periodontology* 78 (6): 974-982.

- Cochran DL, Buser D, Bruggenkate CM, Weingart D, Taylor TM, Bernard JP, Peters F, Simpson JP (2002). The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clinical Oral Implants Research* 13 (2): 144-153.
- Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D (1998). Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical Materials Research* 40 (1): 1-11.
- Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R (1997). Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research* 35 (4): 513-523.
- Cooper LF, Masuda T, Whitson SW, Yliheikkilä P, Felton DA (1999). Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 14 (1): 37-47.
- Curtis AS, Forrester JV, McInnes C, Lawrie F (1983). Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *The Journal of Cell Biology* 97 (5): 1500-1506.
- Davis DH, Giannoulis CS, Johnson RW, Desai TA (2002). Immobilization of RGD to < 1 1 1 > silicon surfaces for enhanced cell adhesion and proliferation. *Biomaterials* 23 (19): 4019-4027.
- De Jonge LT, Leeuwenburgh SC, Wolke JG, Jansen JA (2008). Organic-Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces. *Pharmaceutical Research* 25 (10): 2357-2369.
- Degasne I, Baslé MF, Demais V, Huré G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D (1999). Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (SAOS-2) on titanium surfaces. *Calcified Tissue International* 64 (6): 499-507.

- Döring H (2012). Klinisch vergleichende Studie zur Zufriedenheit von Patienten mit implantatgetragener Unterkiefer-Totalprothese im Vergleich zur totalprothetischen Versorgung im zahnlosen Unterkiefer. Medizinische Dissertationsschrift. Universität Erlangen-Nürnberg.
- Durrieu MC, Pallu S, Guillemot F, Bareille R, Amédée J, Baquey CH, Labrugère C, Dard M (2004). Grafting RGD containing peptides onto hydroxyapatite to promote osteoblastic cells adhesion. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 15 (7): 779-786.
- Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K (2005a). In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants. *Biomaterials* 26 (17): 3521-3526.
- Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K (2005b). In vivo effects of RGD-coated titanium implants inserted in two bone-gap models. *Journal of Biomedical Materials Research* 75 (2): 249-255.
- Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM, Gioranni CW, Ehrlich MG, Valentini RF (1999). RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* 20 (23-24): 2323-2331.
- Ganeles J, Zöllner A, Jackowski J, Bruggenkate C, Beagle J, Guerra F (2008). Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. *Clinical Oral Implants Research* 19 (11): 1119-1128.
- García AJ, Reyes CD (2005). Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *Journal of Dental Research* 84 (5): 407-413.
- Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* 329 (1): 77-84.
- Gunn WG, Conley A, Deininger L, Olson SD, Prockop DJ, Gregory CA (2006). A Crosstalk Between Myeloma Cells and Marrow Stromal Cells Stimulates Production of DKK1 and Interleukin-6: A Potential Role in the Development of Lytic Bone Disease and Tumor Progression in Multiple Myeloma. *STEM CELLS* 24 (4): 986–991.

- Hansson S (1999). The implant neck: smooth or provided with retention elements. A biomechanical approach. *Clinical Oral Implants Research* 10 (5): 394-405.
- Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H (2006). Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *Journal of Periodontology* 77 (6): 1003-1007.
- Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H (2008). Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcified Tissue International* 82 (3): 238-247.
- Hersel U, Dahmen C, Kessler H (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24 (24): 4385-4415.
- Hilbig H, Kirsten M, Rupietta R, Graf HL, Thalhammer S, Strasser S, Armbruster FP (2007). Implant surface coatings with bone sialoprotein, collagen, and fibronectin and their effects on cells derived from human maxillar bone. *European Journal of Medical Research* 12 (1): 6-12.
- Huang H, Zhao Y, Liu Z, Zhang Y, Zhang H, Fu T, Ma X (2003). Enhanced osteoblast functions on RGD immobilized surface. *The Journal of Oral Implantology* 29 (2): 73-79.
- Huang HH, Ho CT, Lee TH, Lee TL, Liao KK, Chen FL (2004). Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion. *Biomolecular Engineering* 21 (3-5): 93-97.
- Isa ZM, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford CM (2006). Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 21 (2): 203-211.
- Ito Y, Kajihara M, Imanishi Y (1991). Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell-adhesive peptide. *Journal of Biomedical Materials Research* 25 (11): 1325-1337.

- Iucci G, Dettin M, Battocchio C, Gambaretto R, Di Bello C, Polzonetti G (2007). Novel immobilizations of an adhesion peptide on the TiO<sub>2</sub> surface: An XPS investigation. *Materials Science and Engineering: C* 27 (5-8): 1201–1206.
- Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos Ulrich, Wiesmann HP (2004). Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 25 (4): 625–631.
- Jundt G, Berghauer KH, Termine JD, Schulz A (1987). Osteonectin a differentiation marker of bone cells. *Cell Tissue Research* 248 (2): 409–415.
- Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Hölzemann G, Goodman SL, Kessler H (2000). Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem* : 1 (2): 107-114.
- Kasugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J (1991). Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *Journal of Cellular Physiology* 147 (1): 111–120.
- Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H (2004). Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Periodontology* 75 (9): 1281-1287.
- Khatayevich D, Gungormus M, Yazici H, So C, Cetinel S, Ma H, Jen A, Tamerler C, Sarikaya M (2010). Biofunctionalization of materials for implants using engineered peptides. *Acta Biomaterialia* 6 (12): 4634-4641.
- Kilpadi KL, Sawyer AA, Prince CW, Chang PL, Bellis SL (2004). Primary human marrow stromal cells and SAOS-2 osteosarcoma cells use different mechanisms to adhere to hydroxylapatite. *Journal of Biomedical Materials Research* 68 (2): 273-285.
- Kroese-Deutman HC, Van den Dolder J, Spauwen PH, Jansen JA (2005). Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo. *Tissue Engineering* 11 (11-12): 1867-1875.

- Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD (2011). Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clinical Oral Implants Research* 22 (4): 349-356.
- Le Guéhenec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials* 23 (7): 844-854.
- LeBaron RG, Athanasiou KA (2000). Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials. *Tissue Engineering* 6 (2): 85-103.
- Leboy PS, Beresford JN, Devlin C, Owen ME (1991). Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of Cellular Physiology* 146 (3): 370–378.
- Lutz R, Srour S, Nonhoff J, Weisel T, Damien CJ, Schlegel KA (2010). Biofunctionalization of titanium implants with a biomimetic active peptide (P-15) promotes early osseointegration. *Clinical Oral Implants Research* 21 (7): 726-734.
- Mangano C, De Rosa A, Desiderio V, D'Aquino R, Piattelli A, De Francesco F, Tirino V, Mangano F, Papaccio G (2010). The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials* 31 (13): 3543-3551.
- Mayr-Wohlfart U, Fiedler J, Günther KP, Puhl W, Kessler S (2001). Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SAOS-2) in contact with different bone substitute materials. *Journal of Biomedical Materials Research* 57 (1): 132-139.
- McCulloch CA, Tenenbaum HC (1986). Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *The Anatomical Record* 215 (4): 397-402.
- Morra M (2006). Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. *European Cells & Materials* 12: 1-15.

- Morsczeck C (2006). Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcified Tissue International* 78 (2): 98-102.
- Nordin T, Nilsson R, Frykholm A, Hallman M (2004). A 3-arm study of early loading of rough-surfaced implants in the completely edentulous maxilla and in the edentulous posterior maxilla and mandible: results after 1 year of loading. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 19 (6): 880-886.
- Oates TW, Valderrama P, Bischof M, Nedir R, Jones A, Simpson J, Toutenburg H, Cochran DL (2007). Enhanced implant stability with a chemically modified SLA surface: a randomized pilot study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 22 (5): 755-760.
- Oshima A, Tanabe H, Yan T, Lowe GN, Glackin CA, Kudo A (2002). A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation: transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, twist. *Journal of Cellular Biochemistry* 86 (4): 792-804.
- Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, Shalhoub V, Aronin N, Wright KL, Van Wijnen AJ (1990a). Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (24): 9990-9994.
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990b). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology* 143 (3): 420-430.
- Petrie TA, Raynor JE, Reyes CD, Burns KL, Collard DM, García AJ (2008). The effect of integrin-specific bioactive coatings on tissue healing and implant osseointegration. *Biomaterials* 29 (19): 2849-2857.
- Petrie TA, Reyes CD, Burns KL, García AJ (2009). Simple application of fibronectin-mimetic coating enhances osseointegration of titanium implants. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (8B): 2602-2612.

- Piattelli M, Scarano A, Paolantonio M, Iezzi G, Petrone G, Piattelli A (2002). Bone response to machined and resorbable blast material titanium implants: an experimental study in rabbits. *The Journal of Oral Implantology* 28 (1): 2-8.
- Pilliar RM (1998). Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. *Implant Dentistry* 7 (4): 305-314.
- Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, Montagnani S, Salzano S, Di Meglio F, Sbordone L, Vitale M, Rossi G (2003). Behavior of SAOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *Journal of Dental Research* 82 (9): 692-696.
- Prechtl C (2010). Biofunktionalisierung von Implantatoberflächen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines synthetisch hergestellten Peptids (P-15). Medizinische Dissertationsschrift. Universität Erlangen-Nürnberg.
- Ramaglia L, Postiglione L, Di Spigna G, Capece G, Salzano S, Rossi G (2011). Sandblasted-acid-etched titanium surface influences in vitro the biological behavior of SAOS-2 human osteoblast-like cells. *Dental Materials Journal* 30 (2): 183-192.
- Rasmusson L, Kahnberg KE, Tan A (2001). Effects of implant design and surface on bone regeneration and implant stability: an experimental study in the dog mandible. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 3 (1): 2-8.
- Rasmusson L, Roos J, Bystedt H (2005). A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 7 (1): 36-42.
- Reyes CD, Petrie TA, Burns KL, Schwartz Z, García AJ (2007). Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials* 28 (21): 3228-3235.
- Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I (1994). Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Developmental Biology* 161 (1): 218-228.

- Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M (2002). Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Die Naturwissenschaften* 89 (8): 338-351.
- Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA (1987). Characterization of a human osteosarcoma cell line (SAOS-2) with osteoblastic properties. *Cancer Research* 47 (18): 4961-4966.
- Roessler S, Born R, Scharnweber D, Worch H, Sewing A, Dard M (2001). Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 12 (10-12): 871-877.
- Sathe S (2003). Biofunktionalisierung dentaler Implantatoberflächen durch kovalente Proteinankopplung. Chemische Diplomarbeit. Fachhochschule Gelsenkirchen.
- Schaffner P, Dard MM (2003). Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60 (1): 119-132.
- Schaffner P, Meyer J, Dard M, Wenz R, Nies B, Verrier S, Kessler H, Kantlehner M (1999). Induced tissue integration of bone implants by coating with bone selective RGD-peptides in vitro and in vivo studies. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 10 (12): 837-839.
- Scheideler L, Rupp F, Wendel HP, Sathe S, Geis-Gerstorfer J (2007). Photocoupling of fibronectin to titanium surfaces influences keratinocyte adhesion, pellicle formation and thrombogenicity. *Dental Materials* 23 (4): 469-478.
- Schwartzmann P (2012). In-vitro-Untersuchung des Adhäsions-,Proliferations- und Genexpressionverhaltens von Primärosteoblasten auf verschiedenen Oberflächen in Abhängigkeit von der Stimulation mit PTH 1-34. Medizinische Dissertationsschrift. Universitätsmedizin Berlin.
- Schwarz F, Ferrari D, Hertel M, Mihatovic I, Wieland M, Sager M, Becker J (2007). Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *Journal of Periodontology* 78 (11): 2171-2184.

- Seol YJ, Park YJ, Lee SC, Kim KH, Lee JY, Kim TI, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP (2006). Enhanced osteogenic promotion around dental implants with synthetic binding motif mimicking bone morphogenetic protein (BMP)-2. *Journal of Biomedical Materials Research* 77 (3): 599-607.
- Shapira L, Halabi A (2009). Behavior of two osteoblast-like cell lines cultured on machined or rough titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research* 20 (1): 50-55.
- Staehele HJ (2012). Lückenschluss im Seitenzahnbereich durch direkte Zahnverbreiterungen als Alternative zu prothetischen und implantologischen Eingriffen. *Stomatologie* 109 (7-8): 103–110.
- Steele JG, Dalton BA, Johnson G, Underwood PA (1993). Polystyrene chemistry affects vitronectin activity: an explanation for cell attachment to tissue culture polystyrene but not to unmodified polystyrene. *Journal of Biomedical Materials Research* 27 (7): 927-940.
- Stein GS, Lian JB, Owen TA (1990). Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB Journal* 4 (13): 3111-3123.
- Sul YT (2003). The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidized titanium implant. *Biomaterials* 24 (22): 3893-3907.
- Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Röser K, Wennerberg A, Albrektsson T (2001). Oxidized implants and their influence on the bone response. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 12 (10-12): 1025-1031.
- Suzuki K, Aoki K, Ohya K (1997). Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. *Bone* 21 (6): 507-514.
- Weinreb M, Shinar D, Rodan GA (1990). Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *Journal of Bone and Mineral Research* 5 (8): 831-842.

Welsch U (2003). Lehrbuch Histologie. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.

Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T (2004). Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clinical Oral Implants Research* 15 (5): 589–597.

Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT (2004). Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31): 11203-11208.

Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA (2006). The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials* 27 (33): 5658-5668.

Zhao BH, Tian WM, Feng HL, Lee IS, Cui FZ (2005). Effects of RGD peptide grafting to titanium dental implants on the adhesion of human gingival fibroblasts and epithelial cells. *Current Applied Physics* 5 (5): 407–410.

## **7. Anhang**

### **7.1 Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Geis-Gerstorfer für die Möglichkeit der Promotion am Universitätsklinikum Tübingen.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lutz Scheideler für die erstklassige Betreuung. Seine Unterstützung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten hat wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich Frau Cornelia Füger für die wertvolle Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung im Labor danken.

Frau PD Dr. Dorothea Alexander-Friedrich danke ich für die Möglichkeit zur Versuchsdurchführung in ihrer Abteilung und Frau Melanie Rieger für die Hilfestellung bei den entsprechenden Versuchen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meiner Lebensgefährtin Daniela Iacenda, meiner Familie und allen anderen Mitmenschen die mich stets unterstützt und an mich geglaubt haben. Sie haben die vorliegende Dissertation erst ermöglicht.

## 7.2. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

---

Name: Andreas Brenner  
Geburtsdatum: 04.03.1983  
Geburtsort: Nürtingen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Eltern: Gerhard Brenner  
Daniela Hechenberger geb. Ruoff  
Geschwister: Kathrin (\*85) und Michael (\*88)

### Bildungsweg

---

1989 – 1993 Ludwig-Uhland-Schule Wendlingen  
Grund- und Hauptschule  
1993 – 1999 Johannes-Kepler-Realschule Wendlingen  
Abschluss: Mittlere Reife  
2003 – 2005 Philipp-Matthäus-Hahn-Schule Nürtingen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  
10/2008 Studium der Zahnmedizin an der  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
19.10.09 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
05.10.11 Zahnärztliche Vorprüfung  
27.11.14 Zahnärztliche Prüfung  
2012 Beginn der Promotion am Universitätsklinikum  
Tübingen

**Beruflicher Werdegang**

---

1999 – 2003	Ausbildung zum Mechatroniker bei der ABB Gebäudetechnik AG
01/2003 – 07/2003	Elektro-Monteur bei der ABB Gebäudetechnik AG
2006 – 04/2008	Angestellt als Elektrofachkraft bei B&W Personal GmbH Nürtingen
04/2008 – 09/2008	Angestellt als Montage-Mitarbeiter bei Endress Elektrogerätebau GmbH Bempflingen