

Aus dem Arbeitsbereich Zellbiologie des Zentrums für Medizinische Forschung  
der Universitätsmedizin Rostock

Leiter: Prof. Dr. J. Barbara Nebe

**Interaktionen von humanen Osteoblasten mit  
geometrisch strukturierten Implantatoberflächen –  
Zellarchitektur und Signaltransduktion**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften (Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

**vorgelegt von:**

Susanne Stähle

aus Rostock

geboren am 22.10.1981 in Rostock

---

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Prof. Dr. agr. habil. J. G. Barbara Nebe

Arbeitsbereich Zellbiologie, Zentrum für Medizinische Forschung,  
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. Dipl.-Ing. Rainer Bader

Forschungslabor, Orthopädische Klinik u. Poliklinik,  
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Patrick Elter

Fachbereich KMUB, Technische Hochschule Mittelhessen –  
University of Applied Sciences

**Datum der Einreichung:** 04. April 2014

**Datum der Verteidigung:** 30. September 2014

---

**Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet**

## Zusammenfassung

Detaillierte Erkenntnisse über das komplexe zelluläre Verhalten der Zellen an der Grenzfläche zum Biomaterial sind entscheidend für die Weiterentwicklung biofunktionaler Implantatoberflächen hinsichtlich der Verbesserung ihrer Akzeptanz und Integration. Die Zell-Material-Interaktion ist von topographischen und chemischen Oberflächeneigenschaften des Materials abhängig, wobei der Einfluss beider Komponenten auf Zellen nicht vollständig geklärt ist. Die Osteoblasten, die für den Knochenaufbau verantwortlich sind, können ihre Umgebung sensitiv erfassen und interagieren über Adhäsionsrezeptoren (Integrine) mit der extrazellulären Matrix an der Grenzfläche zur Biomaterialoberfläche. Die transmembranen Integrine sind intrazellulär über lokalisierte Adapterproteine (z. B. Vinkulin) mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Das Aktinzytoskelett ist verantwortlich für Zellmorphologie und Zellmigration, sowie essentiell bei der Übertragung von externen Signalen und Kräften in die Zelle. Diese Wechselwirkung beeinflusst die Signaltransduktion, u. a. die Mobilisierung von wichtigen sekundären Botenstoffen – Kalziumionen, und damit die Zellfunktion (z. B. Synthese von extrazellulären Matrixproteinen). Zur Aufklärung der Interaktion von humanen Osteoblasten der Zelllinie MG-63 mit einer geometrischen Oberflächentopographie wurden definierte Mikropfostenstrukturen (Höhe x Breite x Länge: 5 x 5 x 5 µm) aus Titan-beschichtetem Silizium untersucht. Des Weiteren wurden folgende chemische Modifikationen generiert: reines Silizium, Beschichtung mit Gold, Kollagen-Typ I bzw. plasmapolymerisiertem Allylamin. Die Analysen der Zell-Material-Interaktionen zeigten, dass die mikrostrukturierte Pfostenoberfläche die Zellarchitektur – Morphologie und Aktinzytoskelett – in einer direkten Topographie-abhängigen Art beeinflusst. Die Organisation des Aktinzytoskeletts in kurzen Fragmenten innerhalb der Zelldimension auf den Mikropfosten ist unabhängig von den o. g. chemischen Oberflächenmodifikationen und den variierten Zellkulturbedingungen (entgegen Gravitation, ohne Serumzusatz). Das Topographie-induzierte fragmentierte Aktinzytoskelett resultiert in einer reduzierten intrazellulären Kalziumionenkonzentration sowie in einer verminderten Fähigkeit der Zellen zur intrazellulären Kalziummobilisierung nach Stimulation mit ATP. Während weitere Faktoren in der Signaltransduktion, wie die Expression von spannungsabhängigen Kalziumkanälen ( $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$  und  $Ca_v3.3$ ) und aktivierten Signalproteinen (z. B. MAP-Kinase), topographisch unabhängige Prozesse sind. Der Einfluss der Mikrotopographie auf die intrazelluläre Kalziummobilisierung liefert neue Erkenntnisse darüber, wie externe Signale in die Zelle weitergeleitet werden und ist daher ein wichtiger Beitrag in der medizinischen Grundlagenforschung, sowie für die weitere Entwicklung innovativer Biomaterialien in der Medizin.

**Schlagwörter:** Mikropfostenstruktur, Osteoblasten, Zellarchitektur, Morphologie, Aktinzytoskelett; Signaltransduktion, Signalproteine, Kalziumkanäle, Kalziummobilisierung

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.	Biomaterialien .....	1
2.	Der Knochen.....	2
2.1.	Anatomie des Knochens .....	2
2.2.	Knochenzellen .....	4
3.	Zell-Material-Interaktion .....	5
3.1.	Extrazelluläre Matrix .....	6
3.2.	Zelluläre Adhäsionsstrukturen.....	7
3.2.1.	Aktinzytoskelett.....	9
3.3.	Signaltransduktion .....	11
3.3.1.	Intrazelluläre Kalziumionen .....	13
3.3.2.	Signalproteine.....	17
4.	Stand der Forschung und Motivation .....	21
<b>II.</b>	<b>Ziele.....</b>	<b>23</b>
<b>III.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
1.	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte .....	24
2.	Materialoberflächen.....	24
3.	Humane Osteoblasten und Zellkultur .....	27
4.	Rasterelektronenmikroskopische Analyse.....	28
4.1.	Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie .....	29
4.2.	Präparation der Osteoblasten .....	29
5.	Zytometrische Methoden .....	30
5.1.	Laser Scanning Zytometrie.....	31
5.2.	Durchflusszytometrie .....	33
5.3.	Analyse des Aktinzytoskeletts.....	35
5.3.1.	Zeitabhängige Aktinorganisation .....	35
5.3.2.	Modifikationen der Kultivierung zur Analyse des Aktins .....	35
5.4.	Expression der Kalziumkanäle .....	37
5.5.	Analyse der Kalziummobilisierung.....	39
5.6.	Analyse der Kalziummessung .....	44
6.	Proteinexpression .....	45
6.1.	Prinzip des Bio-Plex® Systems.....	45
6.2.	Bio-Plex® Phosphoprotein-Assay.....	46

7.	Statistische Auswertung .....	48
<b>IV.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
1.	Charakterisierung der Materialien .....	49
1.1.	Oberflächencharakterisierung.....	49
1.2.	Phänotypische Charakterisierung der humanen Osteoblasten.....	50
2.	Zellarchitektur .....	51
2.1.	Zellmorphologie .....	51
2.2.	Aktinzytoskelett.....	54
2.2.1.	Zeitabhängige Organisation des Aktinzytoskeletts .....	55
2.2.2.	Externe Einflüsse auf die Ausprägung des Aktinzytoskeletts .....	59
3.	Signaltransduktion .....	61
3.1.	Signalwege .....	61
3.2.	Expression der Kalziumkanäle .....	65
3.3.	Kalziummobilisierung .....	71
3.4.	Kalziummessung .....	76
<b>V.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
	Zellarchitektur .....	80
	Signaltransduktion.....	88
	Kalziummobilisierung.....	92
<b>VI.</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>98</b>
	<b>Anhang A: Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
	<b>Anhang B: Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
	<b>Anhang C: Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
	<b>Anhang D: Lösungen, Puffer und Medien.....</b>	<b>106</b>
1.	D.1 Medien & Zellkulturzusätze .....	106
2.	D.2 Reagenzien für Zytometrische Analysen.....	106
3.	D.3 Reagenzien für Proteinexpression .....	108
4.	D.4 Verbrauchsmaterialien.....	109
5.	D.5 Laborgeräte .....	110
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>126</b>
	<b>Publikationen und Präsentationen .....</b>	<b>127</b>

# I. Einleitung

## 1. Biomaterialien

Der Begriff Biomaterial umfasst unterschiedliche Materialien und Werkstoffe mit diversen Anwendungen und Anforderungen. Die Gemeinsamkeit aller Biomaterialien ist die Tatsache, dass die körperfremden Materialien in den unmittelbaren Kontakt mit einer biologischen Umgebung (1), wie Gewebe und Blut, in chemische, physikalische und biologische Wechselwirkungen treten. Die Biomaterialien werden verwendet um die Funktion eines komplizierten Systems, allein oder teilweise, durch die Kontrolle der Wechselwirkung mit der biologischen Umgebung zu fördern, zu stabilisieren oder zu ersetzen. Daher sind die Biomaterialien hauptsächlich in der therapeutischen oder diagnostischen Anwendung in der Medizin beispielsweise als Zahnfüllungen, Stents, Endoprothesen und Organersatz vertreten (2). Die Biomaterialien werden zum einen als permanente Implantate im Körper oder zum anderen als temporäre Unterstützung des Gewebes verwendet. Die Materialklassen lassen sich je nach ihrer Abbaubarkeit *in vivo*, Stabilität oder Funktion einteilen in nichtlebende organische (biologische) Materialien, wie Herzklappen und das Protein Kollagen, und in anorganische (synthetische) Materialien, wie Metalle, Polymere und Keramiken, oder sind Kombination verschiedener Werkstoffe (Komposite). Die klinische Herausforderung und wichtigste Anforderung die ein Biomaterial erfüllen muss, ist in Zusammenhang mit dem direkten Kontakt des Materials mit dem umliegenden Gewebe begründet. Die Biomaterialien sollen biokompatibel (3), also biologisch und chemisch inert sein, um keine negativen Prozesse wie Entzündungsreaktionen, allergische Reaktionen oder im worst case Abstoßungsreaktionen im Körper hervorzurufen (4). Sie sollen sowohl die funktionelle Ähnlichkeit zu körpereigenen Strukturen wie auch eine biologische Verträglichkeit im Körper haben. Darüber hinaus müssen Biomaterialien mechanische als auch physikalische Erfordernisse entsprechen. Die Bedeutung von medizinischen Biomaterialien nimmt immer weiter zu. Heutzutage ist für die medizinische Anwendung auch die Interaktion und Stimulation mit den umgebenden Zellen des Gewebes gewünscht. Das heißt eine Geweberegeneration ermöglichen dort wo das Potential zur eigenen Regeneration fehlt (5). Für die Integration eines Knochenersatzmaterials in den Körper ist die schnelle Akzeptanz durch das umgebende Gewebe entscheidend. Die Biomaterialien sollen einem Infektionsrisiko entgegenwirken. Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Osseointegration ist abhängig vom „race for the surface“ zwischen

den Zellen und den Bakterien (6). Weiterhin ist die Erhöhung der Standfestigkeit des Werkstoffes essentiell, insbesondere bei permanenten Implantaten. Die Grenzfläche zwischen Biomaterial und Zelle ist dabei wichtig für die Förderung der Zelladhäsion, des Spreadings, der Migration, der Proliferation und der Differenzierung der Zellen. Die Interaktionen der Biomaterialien mit dem umgebenden Gewebe kann zum einen durch die Biodegradierbarkeit erreicht werden. Dass heißt die Zellen resorbieren das Material und ersetzen es durch gewebeeigene Substanz. Zum anderen durch die Biofunktionalisierung der Materialien und damit durch eine aktive Beeinflussung der umliegenden Zellen. Die Funktionalisierung eines Biomaterials kann mittels chemischer als auch topographischer Oberflächeneigenschaften erzielt werden (7).

### **Biomaterialien im Knochen**

Der eigene Körper kann große Knochendefekte, beispielsweise verursacht durch Tumoren oder Unfällen nicht selbst reparieren. Es werden jährlich immer mehr Erstimplantate eingesetzt und aufgrund der hohen Lebenserwartung steigende Revisionsoperationen durchgeführt (8). Zunehmend synthetische Biomaterialien werden als Knochenersatz in den großen Defekten zur Wiederherstellung verlorener Funktionen eingesetzt. In nicht lasttragenden Bereichen des Knochens werden Kalziumphosphate, Polymere oder biomimetische<sup>1</sup> Kollagen-Hydroxylapatit-Komposite verwendet. Diese Werkstoffe können aufgrund ihrer mangelnden Stabilität nicht in den belasteten Bereichen wie beispielsweise im Gelenkersatz eingesetzt werden. Aufgrund der erhöhten mechanischen Festigkeit stellen Metalle wie Titan und seine Legierungen geeignete Werkstoffe im orthopädischen Bereich dar. Die an der Atmosphäre gebildete native nm-dicke Titanoxidschicht, das ausgezeichnete Korrosionsbeständigkeit und die mechanischen Bulkigenschaften des Titans sind wichtige Faktoren für seine Biokompatibilität (9; 10). Die Möglichkeiten zum topographischen Oberflächendesign sind bei metallischen Biomaterialien gegeben, denn die Funktionalisierung und damit die Wechselwirkung zwischen Biomaterial und Zellen sind entscheidend für den klinischen Erfolg von Implantaten.

## **2. Der Knochen**

### **2.1. Anatomie des Knochens**

Das Skelett der Wirbeltiere besteht aus mehr als 200 Knochen, gibt den inneren Organen Schutz und ist für die Stabilität und den Körperbau verantwortlich (11). Die

---

<sup>1</sup> dem Knochen in Struktur und Zusammensetzung nachempfundenen

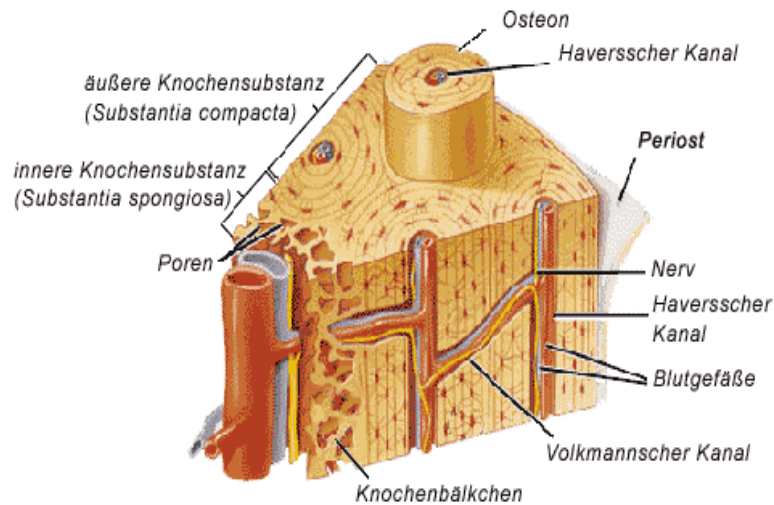


Knochen, die Gelenke, die Muskulatur und die Bänder bilden zusammen den Bewegungsapparat. Der Knochen ist ein hochorganisiertes, metabolisch aktives Gewebe, beispielsweise ein Speicher für Mineralstoffe wie Kalzium und Phosphat. Der Knochen bildet sich aus embryonalem Bindegewebe und besteht aus balkenförmig angeordneten kollagenen Eiweißfasern (Lamellen) und Kalken, die für eine mechanische Belastbarkeit sorgen. Die äußere massive Knochensubstanz (*Substantia compacta*) ist von einer derben Knochenhaut, den sogenannten Periost umhüllt. Das Periost besteht aus einer fibrösen Schicht, sowie aus einer Schicht mit osteogenem Potential aus der neuer Knochen entsteht. Durch das Periost ziehen Blutgefäße und Nerven ins Knocheninnere. Die *Substantia compacta* sind konzentrisch um ein Osteon beziehungsweise Blutgefäß angeordnete Lamellen aus mineralisierten Fasern zwischen denen Knochenzellen, die Osteozyten, sitzen. Das Osteon ist die Grundeinheit der *Substantia compacta*, mit 6-7 Knochenlamellen und einem zentralen Havers'schen Kanal. Im Inneren des Havers'schen Kanals befinden sich kleine Blutgefäße, sowie Nervenfasern. Er dient zur Nährstoffversorgung und Reizübertragung. Untereinander sind die Havers'schen Kanäle beziehungsweise Osteone über den querliegenden Volkmann-Kanal verbunden, der ebenfalls Blutgefäße enthält. Die innere Knochensubstanz, die *Substantia spongiosa*, besteht aus flächigen und parallel zur Oberfläche angeordneten Trabekeln (Abbildung 1). Die Spongiosa ist ein schwammartiges mit Poren versehenes dreidimensionales Gerüst und damit leichter bei gleicher Stabilität. Sie unterliegt einem ständigen Umbau, um sich den gegebenen Belastungssituationen anzupassen. Im inneren liegt das Knochenmark (11), der Ort der Hämatopoiese.

Nach ihrer Form und Funktion unterscheidet man verschiedene Knochen. Beispielsweise besitzt der Röhrenknochen (Arm- und Beinknochen) einen röhrenförmigen Schaft, mit einem mit Knochenmark gefüllten Markraum in der Mitte und 2 verdickte Enden. Dagegen sind die kurzen Knochen (wie Handwurzelknochen) würfelförmig mit einer dünnen Außenschicht und in dem Mark der platten Knochen (Schädel oder Rippe) werden die Blutzellen gebildet.

Das Knochengewebe mit den Osteonen besteht aus ~65 % anorganischen Substanzen wie Kalziumphosphatverbindungen, vor allem Hydroxylapatit, die für die Festigkeit sorgen. Zu ~35 % besteht es aus organischen Substanzen, davon zu ~90 % aus Kollagen (97 % Kollagen Typ-I), die für die Elastizität verantwortlich sind. Die Synthese der Kollagenfibrillen erfolgt im rauen endoplasmatischen Retikulum, die dann extrazellulär zu Fasern in einem Muster mit 67 nm Lücken zusammengesetzt werden, in die sich das Hydroxylapatit einlagern kann. Die restlichen ~10 % an organischen Substanzen

machen Proteoglykane und Glykoproteine wie Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin und Bone-Sialoprotein aus, die die Kollagenmatrix bilden (12).



**Abbildung 1:** Aufbau des Röhrenknochens. (Abbildung nach [www.dr-gabriele-lampert.de](http://www.dr-gabriele-lampert.de)).

## **2.2. Knochenzellen**

Im Körper findet ständig ein Knochenumbau statt, an dem 3 Knochenzelltypen beteiligt sind. Dieser Umbau unterliegt einem empfindlichen physiologischen Gleichgewicht, bei dem sich die Knochenzellen gegenseitig regulieren und steuern (13). Zuerst rekrutieren Prä-Osteoklasten, die sich aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes entwickeln, an den Knochen und verschmelzen zu mehrkernigen aktiv knochenabbauenden **Osteoklasten**. Sie sind größer als die Osteoblasten und enthalten in ihren Vakuolen und Lysosomen säureartige Enzyme wie Milchsäure, Zitronensäure und Chlorwasserstoff. Damit resorbieren die Osteoklasten den mineralisierten Knochen (14). Sowohl die Rekrutierung der Prä-Osteoklasten an den Knochen, als auch Inhibierung der aktiven Osteoklasten wird durch freigesetzte Mediatoren der Osteoblasten reguliert (15). Am Ende des Abbaus werden Osteoblasten an die entstandenen Hohlräumen, den sogenannten Resorptionslakunen, gelockt. Die knochenbildenden **Osteoblasten** entwickeln sich aus den mesenchymalen Stammzellen (15). Für die Osteogenese lagern sich die Osteoblasten schichtartig an die Lakunen an und synthetisieren beziehungsweise sezernieren die neue fibrilläre kollagene Knochenmatrix, eine weiche noch nicht mineralisierte homogene Grundsubstanz – das Osteoid. Durch die Einlagerung von Kalziumionen und Phosphaten erfolgt die Mineralisierung des Osteoids. Ausdifferenzierte Osteoblasten, die im Zuge der Osteogenese eingemauert werden, bilden den größten Anteil an Knochenzellen – **die Osteozyten** (15). Die Osteozyten sind essentiell für den Erhalt des Knochens. Sie

weisen aber nur eine reduzierte Syntheseleistung auf. Der Resorptionsprozess der Osteoklasten dauert etwa 3 Wochen. Der gegensätzliche Prozess, der Aufbau des Knochens durch die Osteoblasten dauert dagegen bis zu 4 Monaten (16). Der Regenerationsprozess des Knochens ermöglicht eine ständige Erneuerung, Reparatur und Anpassung an eine geänderte Belastung.

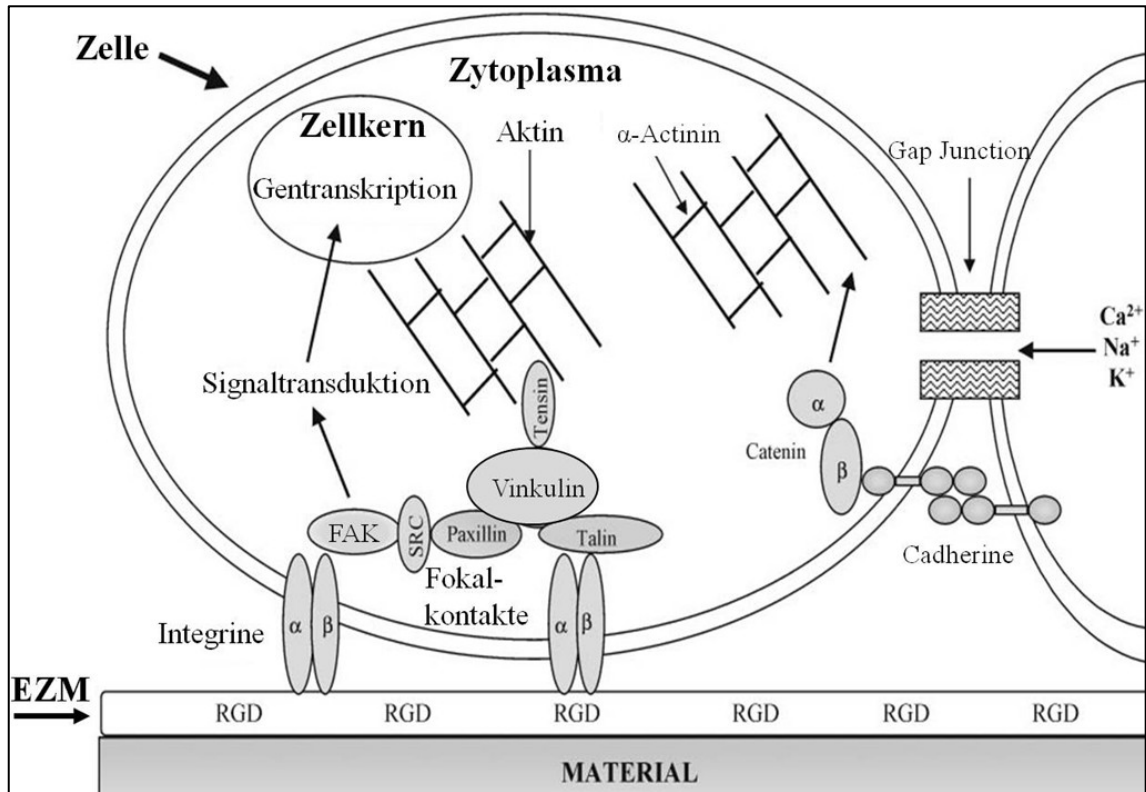
### **3. Zell-Material-Interaktion**

Die biologische Wechselwirkung einer Zelle an der Grenzfläche zu einer Materialoberfläche ist entscheidend für eine erfolgreiche Osseointegration des Implantates (17). Die adhärenen Zellen in Geweben sind durch Zell-Zellverbindungen verankert und stehen mit der extrazellulären Matrix (EZM) in struktureller und funktioneller Verbindung (18). Dadurch wird ein Austausch von Informationen und Nährstoffen gewährleistet. Der wichtigste initiale Prozess in der Zell-Material-Interaktion ist die zelluläre Adhäsion, die mechanische Verankerung einer Zelle an die Materialoberfläche (19). Die Zelladhäsion umfasst verschiedene Phasen.

Zum einen die schnelle Anheftungsphase: Die Zellen reagieren nicht mit der blanken Materialoberfläche, sondern mit den sie umgebenden biologischen extrazellulären Matrixproteinen aus dem Medium, Serum oder Blut. Doch die Biomaterialien können mittels ihrer Oberflächeneigenschaften, ob Topographie, Chemie oder Energie, und damit aufgrund ihrer mechanischen als auch elektrischen Wechselwirkungen, die Adsorption der Proteine in der EZM an der Grenzfläche des Biomaterials verändern (20). Die nun modifizierten kurzfristigen Ereignisse wie physikalisch-chemischen Verbindungen zwischen Zellen und Biomaterialien mit beispielsweise ionischen Kräften, van der Waals-Kräften sind charakterisiert für die ersten passiven Bindungen an die Materialoberfläche (21).

Zum anderen die längere aktive rezeptorvermittelte Adhäsionsphase: In dieser Phase erfolgt die Wechselwirkung von verschiedenen zellulären Adhäsionsstrukturen und Molekülen (19). Die Adhäsion und das folgende Spreading einer Zelle an der Materialoberfläche/EZM werden über transmembrane Oberflächenrezeptoren wie Integrine vermittelt. An den zytoplasmatischen Part der Integrinrezeptoren binden weitere Moleküle des Fokalkontaktes. Diese Phase ist charakterisiert durch einen aktiven Prozess der Aktin-Polymerisation (22). In einem zellulären Komplex ist das Aktinzytoskelett mit den Integrinen in einer funktionellen Einheit miteinander verbunden. Aufgrund der Wechselwirkung wird eine feste Verankerung der Zelle mit der Materialoberfläche induziert (19). Des Weiteren sind die Zellen in der Lage topographische und chemische Signale aufzunehmen. Diese Signale werden innerhalb

der Zelle über die zellulären Strukturen und Signalkaskaden in den Zellkern weitergeleitet. Dadurch wird die Zellphysiologie als Antwort auf die äußeren Faktoren moduliert. Das betrifft den Erhalt der Gewebestruktur, die Proliferation, die Migration, die Differenzierung und das Überleben der Zelle (19; 23) (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schema der Zell-Material-Interaktion mit den für die Adhäsion eines Osteoblasten an ein Biomaterial notwendigen Adhäsionsstrukturen. FAK: Fokale Adhäsionskinase. (Abbildung nach Anselme, K (19)).

### **3.1. Extrazelluläre Matrix**

Jede Zelle ist von einer Zellmembran aus Lipiden und Proteinen umhüllt. Außerhalb der Zellmembran sind die Zellen von einer komplexen extrazellulären Matrix (EZM) umgeben (18). Die EZM wird von Zellen selbst in den Extrazellulärraum sezerniert, umgebaut und abgebaut. Zum Beispiel sezernieren im Knochen die Osteoblasten ihre eigene EZM. Diese extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Netzwerk und setzt sich aus einer Gesamtheit von Makromolekülen, wie faserförmigen Glykoproteinen und Polysacchariden, zusammen. Mit 90 % ist der Hauptbestandteil der EZM das Strukturprotein Kollagen (97 % Kollagen-Typ I). Das Verbindungsprotein Fibronectin und die Proteoglykane wie Glykosaminoglykane (GAG) sind weitere Komponenten der EZM (24). Einige der Proteine haben chemotaktische oder adhäsive Eigenschaften,

insbesondere weil diese Liganden eine (RGD)-Sequenz<sup>2</sup> besitzen, die spezifisch für die Fixierung von Rezeptoren wie Integrine ist (19; 25) (Abbildung 3). Die extrazelluläre Matrix bildet ein Gerüst zwischen den Zellen für die optimale Zelladhäsion und dient als Strukturelement zur Elastizität, Formgebung und mechanischen Unterstützung (26). Des Weiteren beeinflusst sie zellphysiologische Prozesse wie das Spreading, die Migration, die Proliferation und die Genexpression einer jeden Zelle (27). Die extrazelluläre Matrix ist ein Reservoir für Signalmoleküle wie Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und sorgt für den Signalaustausch der Zelle mit ihrer Umgebung, wodurch sie einen Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion ausübt (18).

### **3.2. Zelluläre Adhäsionsstrukturen**

Für die dynamische Interaktion der Zellen mit der Umgebung sind die Adhäsionsstrukturen im Fokalkontakt verantwortlich (28; 29; 30). Aufgrund dieser Wechselwirkung erfolgt die Regulation der strukturellen Komponenten (31) und die Transduktion der für die zelluläre Adhäsion und Migration benötigten Signale (32; 33). Transmembrane Rezeptorproteine wie Integrine verbinden den extrazellulären mit dem intrazellulären Raum. Die Integrinrezeptoren sind intrazellulär mit Adapterproteinen gekoppelt. Die Adapterproteine stellen eine Verbindung zwischen den Aktinfilamenten und den Rezeptoren her (19; 25; 34) (Abbildung 3). Diese zellulären Strukturen sind für die Verankerung der Zelle an der Materialoberfläche verantwortlich und regulieren eine Vielzahl von zellphysiologischen Prozessen wie Zelladhäsion, Proliferation, Wachstum und Signaltransduktion (19; 23; 28; 30; 35; 36) (Abbildung 2).

Die Adhäsionsrezeptoren sorgen für den ersten Kontakt mit der EZM an der Grenzfläche zur Biomaterialoberfläche und sind durch ihre Fähigkeit charakterisiert mit einem spezifischen Liganden zusammenzuwirken (28). Diese Liganden können auf der Membran von benachbarten Zellen oder in der EZM angeordnet vorliegen (19). Sie verbinden den extra- mit dem intrazellulären Raum durch Regulierung der Anordnung von zytoskelettal assoziierten Proteinen im adhäsiven Fokalkontakt (32) und lösen Signalkaskaden aus (37). Sie wirken als bidirektionaler Wandler von Signalen und mechanischen Kräften (28; 38). Die transmembranen Adhäsionsrezeptoren sind Glykoproteine, die in 4 Familien zusammengefasst werden können: die Selektine, die Immunglobulin-Superfamilie, die Cadherine und die Integrine (39; 40). In den Osteoblasten spielen die Cadherine und die Integrine eine entscheidende Rolle bei der Zelladhäsion (19).

---

<sup>2</sup> RGD-Peptide bestehen aus 3 Aminosäuresequenz: Arginin, Glycin & Asparaginsäure

Die Cadherine sind Transmembran-Glykoproteine, die über intrazelluläre Proteine wie  $\alpha$ -Actinin mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind und somit eine Zell-Zell-Adhäsion vermitteln (19; 24) (Abbildung 2). Weitere Zell-Zell-Kontakte, wie Gap Junction-Kanäle werden von den Proteinen namens Connexin (Cx), wie in den Osteoblasten Cx43, gebildet (19). Diese Adhärenzverbindungen bieten Verankerung mit den umgebenden Zellen und ermöglichen die interzelluläre Kommunikation durch den direkten Austausch von gelösten sekundären Botenstoffe und Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{IP}_3^3$  (19; 41) (Abbildung 2).

Die Integrinrezeptoren sind Heterodimere und bestehen aus einer nicht-kovalent miteinander verbundenen größeren  $\alpha$ - und einer kleineren  $\beta$ -Kette (35). Bekannt sind 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten die ca. 24 verschiedene Kombinationen bilden (42). Jede Untereinheit besteht aus einer großen extrazellulären transmembranen Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Die extrazellulären Domänen der beiden Untereinheiten bestimmen die Spezifität der Bindung an den RGD-Sequenzen der extrazellulären Matrixproteine (43) (Abbildung 3). Beispielsweise mit den Integrindomänen  $\alpha_2\beta_1$  erfolgt die Bindung von Kollagen-Typ I oder an den Integrinuntereinheiten  $\alpha_5\beta_1$  bindet das Fibronektin (19; 28; 38). Die Erkennung der RGD-Peptidsequenz in den EZM-Proteinen erfolgt über die  $\beta$ -Integrinuntereinheit und die Bindung zwischen den Liganden und den Integrinen erfordert in der  $\alpha$ -Integrinuntereinheit Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (44).

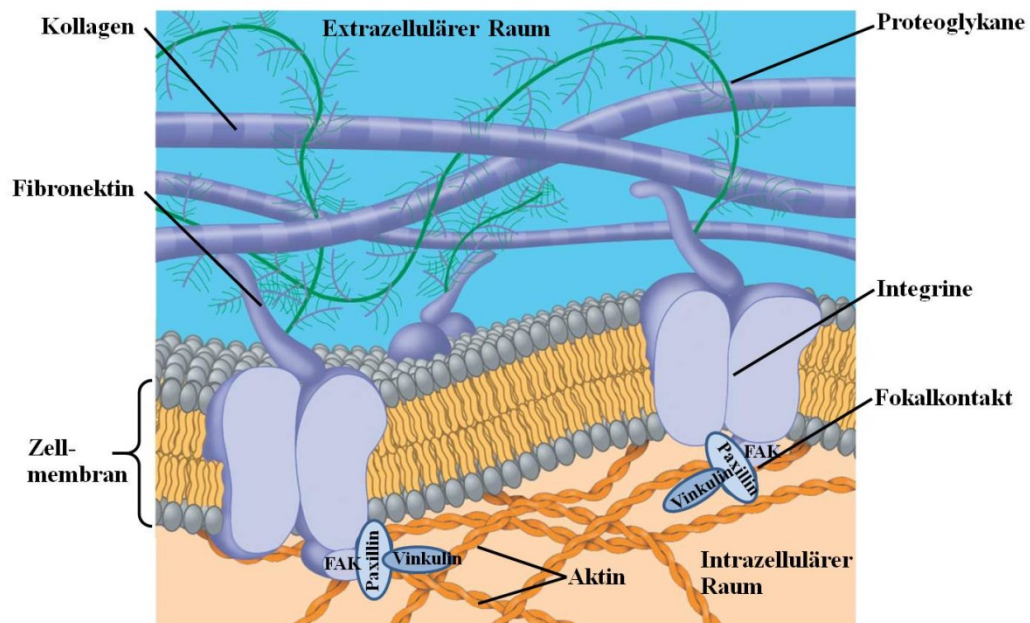
Die inaktiven Integrine sind an der gesamten Zelloberfläche diffus verteilt. Infolge einer Integrinaktivierung durch Bindung an ein Matrixprotein wird die Regulation der Dynamik und Organisation der verschiedenen Untereinheiten an der Zelloberfläche beeinflusst. Bei der Aktivierung der Integrine geht es von einer gebeugten in eine aufrechte Konformation über (24). Die Integrinaktivierung erzeugt eine starke Affinität für andere zytoskelettale Komponenten im Fokalkontakt (45).

Die fibrillären Adapterproteine interagieren zum einen direkt mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrinrezeptoren wie Talin (46) und  $\alpha$ -Actinin (28), zum anderen sind sie lokal miteinander assoziiert wie beispielsweise Vinkulin und Paxillin. Diese Adapterproteine ermöglichen aufgrund der Quervernetzung mit Bindungspartnern wie Integrinen, zytoskelettalen Proteine, Proteinkinasen und Signalmolekülen den Aufbau des Fokalkontaktes (47). Damit sind die dynamischen Adapterproteine an der Signalübertragung beteiligt (32; 43; 48; 49). Zusammen mit der ko-Lokalisation und Aktivierung von verschiedenen Molekülen wie der fokale Adhäsionskinase (FAK) bilden sie die Grundlage für die physikalische Verbindung zwischen den

---

<sup>3</sup> Inositoltrisphosphat

Integrinrezeptoren und dem Aktinzytoskelett (31; 35; 43; 50) (Abbildung 3). In Folge wird die biochemische und strukturelle Organisation des Aktinzytoskeletts beeinflusst (32; 47; 51; 52).



**Abbildung 3:** Schema der Verankerung von Zellen mit der extrazellulären Matrix. FAK: Fokale Adhäsionskinase. (Abbildung nach Campell et al., Fig. 6-30a (25)).

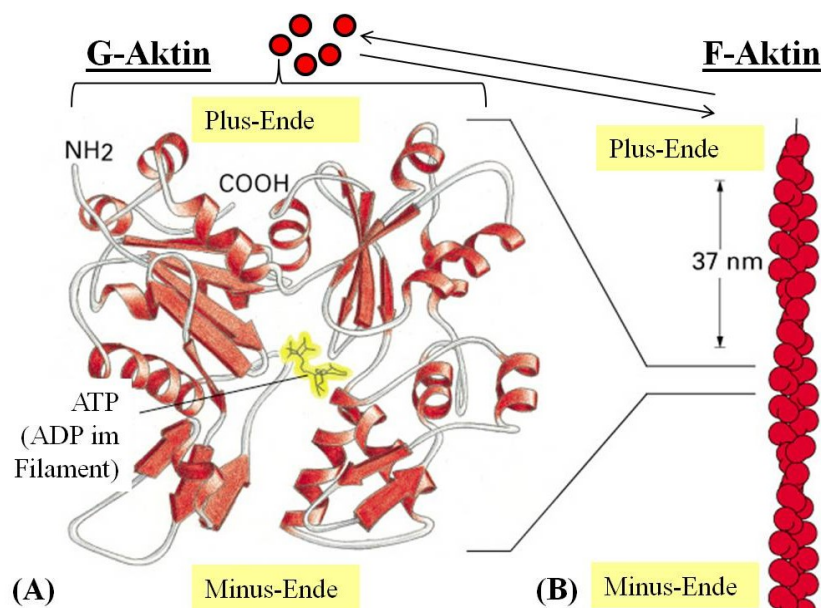
### **3.2.1. Aktinzytoskelett**

Das intrazelluläre Zytoskelett bildet ein Netzwerk, das aus 3 Zellstrukturproteinen aufgebaut ist: den Intermediärfilamenten, den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten. Das Aktinzytoskelett beeinflusst sowohl das morphologische als auch das funktionelle Verhalten der Zelle. Es sorgt für die mechanische Stabilität der Zellform und bestimmt damit die Morphologie (53; 54). Aufgrund der zytoskelettalen Dynamik, stabilisieren zelluläre Strukturen sich durch Druck und Spannung selbst, wodurch das Zellspreeding und die Migration beeinflusst werden (55). Das Aktinzytoskelett ist darüber hinaus essentiell für die Adhäsion und für den Zellkontakt-Aufbau, sowie für geordnete Bewegungsabläufe im Zytoplasma wie die Signaltransduktion und die Fortbewegung (32; 38; 49; 53; 54; 56; 57).

Durch Polymerisation, unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP), werden aus einzelnen globulären Aktinmonomeren (G-Protein) doppelsträngige helikale Filamente, sogenannte filamentöse Aktinfilamente gebildet (F-Aktin) (18; 58) (Abbildung 4), die einen Durchmesser von 5-10 nm und eine Gesamtlänge von mehreren  $\mu\text{m}$  besitzen können. Die Filamente bilden sich zu Aktinbündeln oder einem Netzwerk aus (26). Lange F-Aktinbündel unterstützen den Aufbau von Filopodien, die fingerartige Vorsprünge der Zellmembran darstellen. Sind die F-Aktine in der Form eines Gitters

zusammengesetzt, so bilden sie Lamellipodien, blattartigen Vorsprünge, aus (19). Bei der Entstehung dieser zellulärer Fortsätze erfolgt an den Aktinfilamenten am vorderen Part, dem Plus-Ende, durch Anlagerung von G-Aktin die Montage eines Netzwerkes aus F-Aktin und am hinteren Part des Aktins, dem Minus-Ende, erfolgt wieder die Depolymerisation in G-Aktine (Abbildung 4). Diese Abhandlung wird als Tretmühlenmechanismus bezeichnet (26).

Das Aktinzytoskelett besteht hauptsächlich aus langen, dichten Aktinbündeln, sogenannten Stressfasern (59). Diese Stressfasern durchspannen den Zellkörper und enden mit mindestens einer Seite an der Zellmembran in den Fokalkontakten. Die Regulation der Dynamik und der räumlichen Organisation des Aktins unterliegt einer ständigen zellulären Kontrolle von beteiligten aktin-bindenden Proteinen. Diese Modulatoren sind beispielsweise ARP2/3 (48; 58), für die Verzweigungen verantwortlich;  $\alpha$ -Actinin für die Ausbildung kortikaler Stressfasern und Stabilität, Profilin für den Aufbau des Aktins oder der Gegenspieler Cofilin für den Abbau des Aktins (53; 60).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Aktins. (A) Struktur des monomeren G-Aktins in deren Zentrum ein Nukleotid (ATP/ADP<sup>4</sup>) gebunden ist. (B) Anordnung der Monomere in einem Filament (F-Aktin) in einer doppelsträngigen  $\alpha$ -Helix. (Abbildung nach Alberts, Fig. 16-7 (18)).

Aufgrund der Kreuzvernetzung zu der zytoplasmatischen Domänen der Integrine werden an dem Aktinzytoskelett Rezeptoren sowie Signalmoleküle immobilisiert, um miteinander zu reagieren. Das Aktinzytoskelett steht über die Kernmembran in Verbindung mit dem Zellkern, so dass Signale ins Zellinnere transduziert und in Folge

<sup>4</sup> ATP: Adenosintriphosphat; ADP: Adenosindiphosphat



zellphysiologische Prozesse als funktionelle Antwort der Zelle moduliert werden (38). Damit wirkt das Aktinzytoskelett als Transmitter von externen Signalen und mechanischen Kräften und ist aktiv an der Signaltransduktion beteiligt (32; 61; 62; 63; 64).

### **3.3. Signaltransduktion**

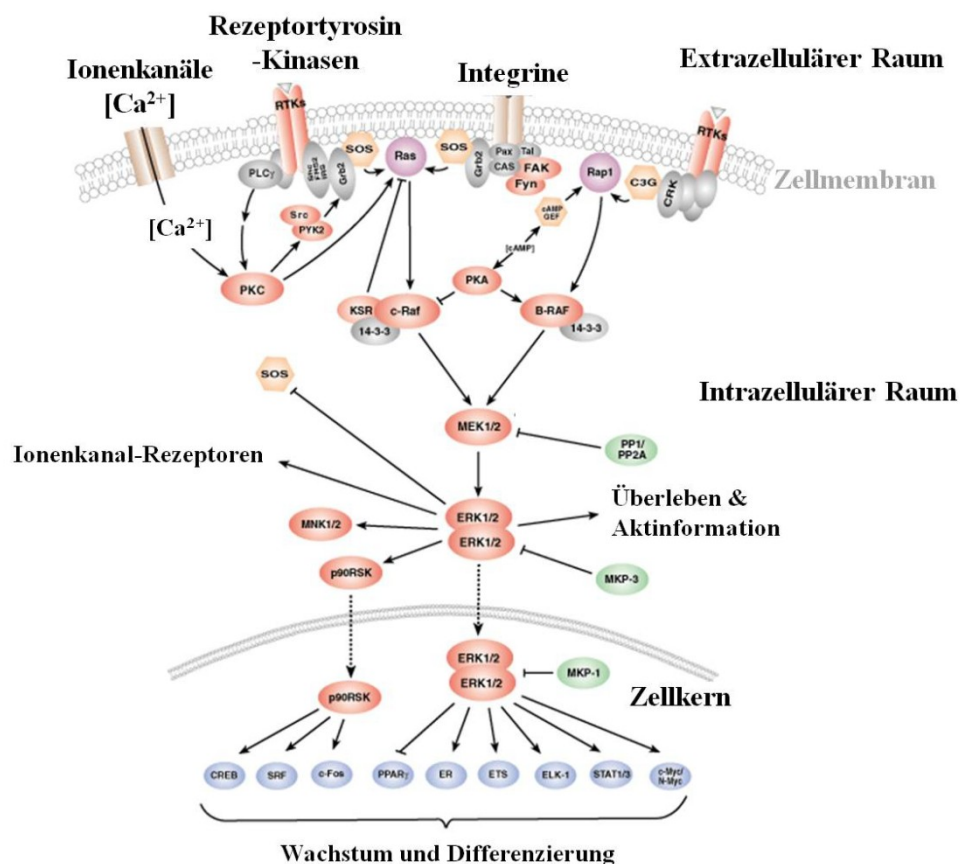
Um zelluläre Funktionen zu koordinieren und zu regulieren müssen Zellen miteinander kommunizieren. Die Kommunikation beruht auf dem Prozess der Signaltransduktion, ein zellulärer, biochemischer und physiologischer Ablauf bei denen die Zelle auf äußere Reize reagiert, diese umwandelt und ins Zellinnere vermittelt (18). Die Signaltransduktion ist essentiell für die Verarbeitung von externen als auch internen Reizen und reguliert aufgrund ihrer biochemischen Ereignisse (32; 35; 61; 65) unter anderem das Wachstum (66), die Zellproliferation (67), das Überleben (33) und die Genexpression (40; 68) (Abbildung 2).

Eine besondere Rolle kommt hier der Mechanotransduktion zu. Es werden externe Kräfte und Spannungen in die Zelle übermittelt (49; 69). Am Anfang erfolgt die Erkennung eines Signals aus der Umgebung, beispielsweise aus der EZM, durch die Bindung eines Liganden an dem Rezeptor (28) und in Folge seine Konformationsänderung (70). So entstehen an den intrazelluläre Rezeptordomänen Andockstellen für beispielsweise Kinasen oder Adapterproteine (71). Da die Integrine, die als Mechanorezeptoren agieren (61; 70), keine enzymatischen Eigenschaften besitzen ist die Voraussetzung für die Signalübertragung die physikalisch Verbindung über die Adapterproteine des Fokalkontaktes wie  $\alpha$ -Actinin mit dem Aktinzytoskelett (43; 72; 73). Die Integrine sind in der Lage externe Signale direkt an das Aktinzytoskelett zu transduzieren (29; 43). Das Aktinzytoskelett dient als Gerüst (74) für weitere zytoskelettale Proteine, sowie für die ko-Lokalisation und Aktivierung von Signalproteinen wie die fokale Adhäsionskinase (FAK), Tyrosinkinasen, Ionenkanäle, Phospholipase C und MAP-Kinase (mitogen-activated protein-Kinase) (60; 75; 76; 77). Dabei spielen diverse sekundäre Botenstoffe wie Kalziumionen und Signalmoleküle eine entscheidende Rolle (32). Somit ist das Aktinzytoskelett der Ort, an dem mechanische Signale in chemische Signale umgewandelt werden (63; 78). In der sogenannten zellulären „outside-in“ Signalübertragung (32; 36; 79; 80) werden dann über eine Abfolge von Veränderungen in einer Kaskade die externen Signale ins Zellinnere bis in den Zellkern übertragen (31; 64) (Abbildung 5).

Die Integrinrezeptoren besitzen einen bidirektionalen Charakter: Zum einen als Sensor in das Zellinnere „outside-in“ und zum anderen als Effektor wieder aus der Zelle heraus

„inside-out“ (28; 36). Das Aktinzytoskelett beeinflusst dabei die Affinität, das Expressionsmuster und die Spezifität der Integrinrezeptoren. Diese dynamische Wechselwirkung sorgt für eine verstärkte Integrinaktivität (33). Bei diesen Prozessen kann das ursprüngliche Signal deutlich verstärkt werden, dann spricht man von Signalamplifikation (18; 33).

Weitere Zelloberflächenmoleküle die bei der Transduktion von Signalen mitwirken, sind die spannungs- oder ligandengesteuerte Ionenkanäle, die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Gap Junction-Kanäle (81) oder die katalytischen Enzym-gekoppelten Rezeptoren wie die Rezeptor Tyrosinkinasen, die den MAP Kinase-Weg oder den PI3 Kinase/Akt-Weg aktivieren (18).



**Abbildung 5:** Schema der Signaltransduktion über Integrinrezeptoren. ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinases (MAPK); FAK: Fokale Adhäsionskinase; MAPK: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase; MEK1: MAPK/ERK Kinase 1, MAPKK; Pax: Paxillin; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; Raf: Rat fibrosarcoma; Ras: rat sarcoma. (Abbildung nach [http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular\\_immunology/mapk\\_erk\\_growth.gif](http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/mapk_erk_growth.gif)).

### **3.3.1. Intrazelluläre Kalziumionen**

In den Zellen sind die intrazellulären Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) bedeutende sekundäre Botenstoffe (Second messenger) und damit ein zentraler Mediator in der Signaltransduktion (82; 83). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dienen der Weiterleitung eines von außen kommenden Signals, das die Membran nicht passieren kann, und aktivieren eine Vielzahl verschiedener Signalwege über die Wechselwirkung mit speziellen Ca-bindenden Proteinen wie Calmodulin (18). Damit dienen diese Ionen der Regelung von physiologischen Zellprozessen wie dem Wachstum, der Proliferation (84), dem Überleben (82; 85), der Differenzierung, der Endozytose (86; 87), der Gentranskription und der Expression von extrazellulären Matrixproteinen (75; 88; 89; 90). Über den Kalzium-Signalweg werden Erregbarkeit, Kontraktion (18) oder der Metabolismus (91) gesteuert. Die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spielen ebenfalls eine wichtige biochemische Rolle in der Regulierung der Zytoskelettkomponenten (92). Sie beeinflussen die Assoziation von aktivierten Proteinen am Zytoskelett wie  $\alpha$ -Actinin (93) und die Immobilisierung der Integrine mit dem Aktinzytoskelett durch Rezeptor-Crosslinking (62; 63). Damit werden sie benötigt für das dynamische Verhalten des Aktinzytoskeletts, welches wichtig für die Zellstruktur, das Wachstum (94) und der Signaltransduktion mit anderen Signalwegen ist (61; 81).

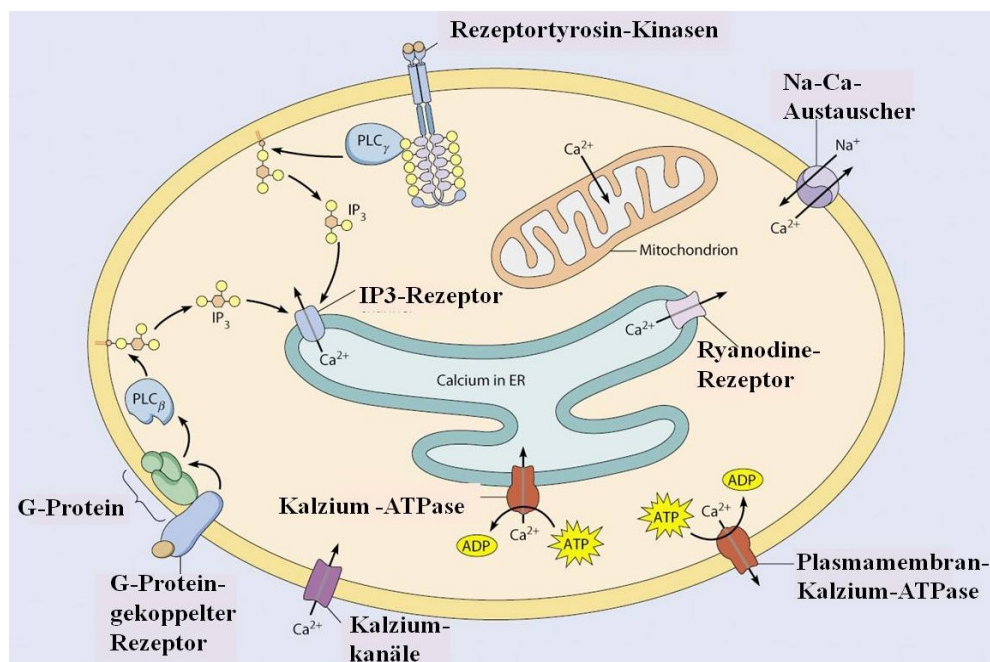
Die basale Konzentration von intrazellulären freien Kalziumionen im Zytoplasma ist gering ( $10^{-7}$  M) verglichen zu der im Extrazellularraum und in dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ( $10^{-3}$  M) (18). Die vorübergehende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgt als Antwort auf einen Signalreiz und dient der Signalübertragung. Der kurzzeitige repetitive Anstieg der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Zytoplasma wird induziert durch eine Vielzahl von externen Faktoren wie Membrandepolarisation, extrazellulären Agonisten und ATP-Moleküle oder auch durch intrazelluläre sekundäre Botenstoffe wie  $\text{IP}_3^5$  (95).

Die Regulation der intrazellulären Kalziummobilisierung erfolgt durch eine Bandbreite von Proteinen wie Rezeptoren, beispielsweise Integrine (63; 75; 96), spannungs-, speicher- und ligandengesteuerte Kalziumkanäle (97) oder auch offene Zellkontakte wie Gap Junctions (98; 99) (Abbildung 2). Diese Rezeptoren und Kanäle sind in der Zellmembran oder in der Membran von zellulären Organellen, wie beispielsweise dem Sarko-/ Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Kalzium-Speicher) oder dem Mitochondrium (temporärer Kalzium-Puffer), lokalisiert (86; 95; 100; 101; 102) (Abbildung 6). Öffnet ein Signal vorübergehend Kanäle in der Zellmembran oder in der Membran des ER strömen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Richtung ihrer elektrochemischen

---

<sup>5</sup> Inositoltriphosphat

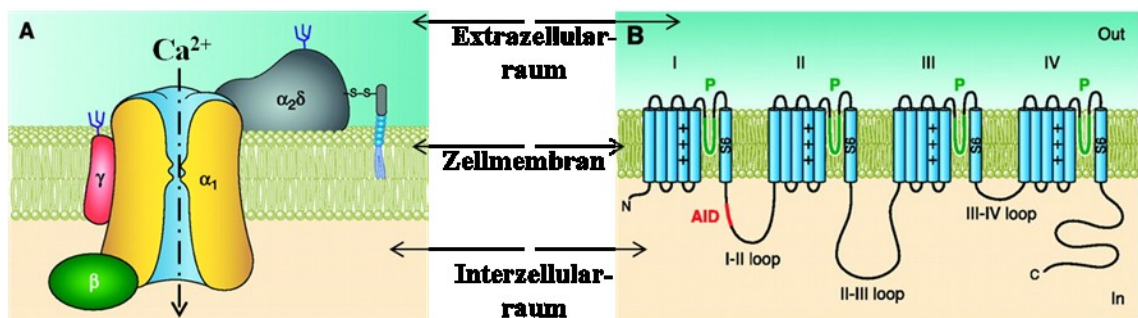
Gradienten ins Zytoplasma. Die freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden dann an den zellulären Ca-bindenden Proteinen gebunden. Ca-bindende Proteine lassen sich in 2 funktionelle Gruppen einteilen: Kalzium-Sensoren (z. B. Calmodulin (CaM) und Troponin C) und Kalzium-Puffer (z. B. Mitochondrium) (95; 103).  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen üben an Kalzium-Sensoren wie Calmodulin eine allosterisch regulatorische Wirkung aus (Konformationsänderung), wodurch das CaM die Aktivität einer Vielzahl von Zielproteinen verändert (18). So ist die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Troponin C ein direkter Mediator der Zellkontraktion (18). Intrazelluläre Stimuli wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind damit selbst Bestandteile von Signaltransduktions-Kaskaden. Die Konzentration und Mobilität der intrazellulären Kalzium-Homöostase wird in der Zelle streng reguliert. Um die geringe intrazelluläre Kalziumkonzentration aufrecht zu erhalten, werden die intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über Transportmoleküle, wie Natrium-Kalzium-Austauscher, die Zellmembran-Kalzium-ATPase sowie verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Ionenkanäle und Pumpen (104) wieder aus dem Zytoplasma einerseits in den Extrazellularraum oder andererseits zurück in das ER oder in die Mitochondrien gepumpt (95) (Abbildung 6). Der räumlich-zeitliche Ablauf der Kalziummobilisierung (wie Amplitude, Frequenz und Dauer) sind wichtig für die intrazelluläre Funktion (85).



**Abbildung 6:** Schema der Kalziumhomöostase in den Zellen. PLC: Phospholipase C; IP3: Inositoltriphosphat. (Abbildung nach [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/14\\_12.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/14_12.jpg)).

Die **spannungsabhängigen Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_v$ 's)** öffnen sich durch eine Depolarisation der Plasmamembran und bewirken den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (105). Innerhalb von Bruchteilen einer Millisekunde inaktivieren und schließen sich diese

Anhand ihrer elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften lassen sich die  $\text{Ca}_v$ 's klassifizieren (112). Die High-voltage-activated (HVA)-Kanäle benötigen zum Öffnen eine starke Depolarisation. Sie besitzen daher eine höhere Leitfähigkeit und inaktivieren langsam. Eine Gruppe davon sind die L-Typ-Kalziumkanäle (large & long-lasting) mit ihren Typen  $\text{Ca}_v1.1$ ,  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  oder  $\text{Ca}_v1.4$  je nach ihrer  $\alpha1$ -Untereinheit. Weitere Typen der HVA-Kanäle sind neuronalen Ursprungs, wie P-/Q-Typ (in Purkinje Zellen), N-Typ (Neuronal) und R-Typ (Residual) (113). Die Low-voltage-activated (LVA)-Kanäle lassen sich durch niedrige Depolarisation öffnen. Sie besitzen eine niedrigere Leitfähigkeit und gehen schnell in den inaktiven Zustand zurück, daher werden sie auch als T-Typ-Kalziumkanal (tiny & transient) bezeichnet. T-Typ-Kalziumkanäle können eine von drei verschiedenen  $\alpha1$ -Subeinheiten umfassen:  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  oder  $\text{Ca}_v3.3$  (105; 107).



**Abbildung 7:** Schema des Aufbaus eines spannungsabhängigen Kalziumkanals ( $\text{Ca}_v$ ): (A) molekulare Organisation und Zusammensetzung der  $\text{Ca}_v$  aus den 5 Untereinheiten ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ); (B) Topologie der Hauptuntereinheit  $\alpha 1$ . Das  $\text{Ca}_v\alpha 1$  ist ein 190 - 250 kDa großes Protein und enthält zwischen dem Amino- (N) und dem Carboxy-Terminus (C) 4 homologe Wiederholungen (I-IV) welche durch zytoplasmatische Schleifen (Loops) verbunden sind. Jede Wiederholung, mit seinen 6 Transmembransegmenten (S1-S6), enthält zwischen dem Segment S5 und S6 die porenbildenden Schleife (P). Die Segmente 6 (S6) bilden die Kanalpore und die Segmente S4 (+++, positiv geladene Aminosäuren) bilden einen Teil des Spannungssensors. (Abbildungen nach Buraei et al. (108)).

Die spannungsabhängigen Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_v$ ) werden nicht nur allein vom veränderten Membranpotential aktiviert, sondern auch durch die Wechselwirkung der Integrine mit dem Aktinzytoskelett (114; 115). So moduliert beispielsweise das Aktinzytoskelett die L-Typ-Kalziumkanäle in den Osteoblasten (88). Diese Kalziumkanäle in der Zellmembran sind mit dem Aktinzytoskelett über das Gerüstprotein AHNAK 1 verankert (97; 116).

Die Aktivierung der  $\text{Ca}_v$ 's und damit die erhöhte intrazelluläre Kalziummobilisierung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Übertragung von externen Signalen (89). Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Homöostase, bei der Regulation von Enzymaktivitäten und bei diversen Zellfunktionen wie beispielsweise der Adhäsion, der Proliferation und dem Überleben. Dabei unterstützen speziell die L-Typ-Kanäle die Proliferation der Osteoblasten und T-Typ-Kanäle die differenzierten Zellfunktionen beim Knochenumbau (117). Damit sind sie entscheidend bei der Knochenentwicklung (118; 119), für einen gesteigerten Knochenaufbau (120) und einen verringerten Knochenabbau (121).

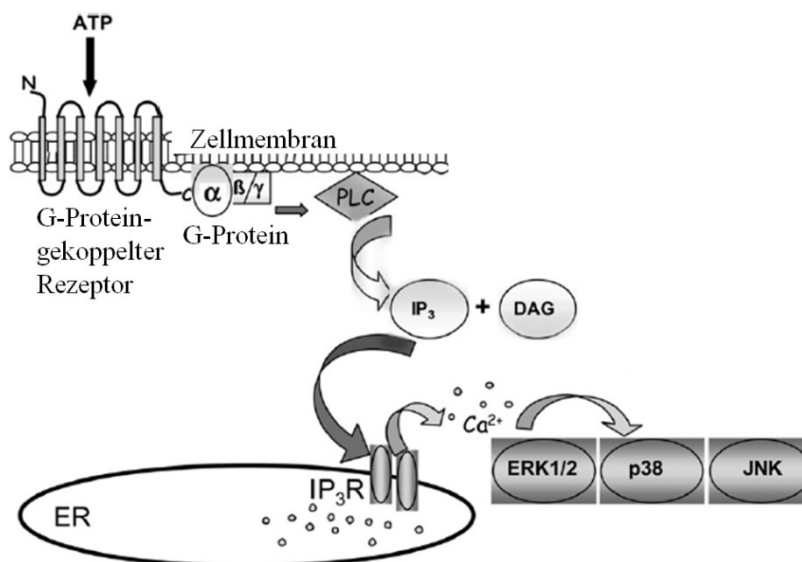
Darüber hinaus erfolgt über ligandengesteuerte Ionenkanäle wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Integrinrezeptoren (Abbildung 5), sowie Rezeptortyrosin-Kinasen (RTK) in der Zellmembran die Erhöhung der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Durch die Bindung eines extrazellulären Signalmoleküls wie ATP (61) an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor erfolgt seine autokrine Aktivierung (99). Aufgrund der folgenden Konformationsänderung des intrazellulären, an der Membran gekoppelten G-Proteins, wie beispielsweise Ras<sup>6</sup> (26), werden zum einen Ionenkanäle in der Zellmembran geöffnet, die einen externen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle bewirken. Zum anderen wird der Phospholipase C-Weg aktiviert und damit die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern (122). Bei diesem Weg katalysiert die Phospholipase C an der Membran die Spaltung von Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu zwei bedeutende intrazelluläre sekundäre Botenstoffe: Inositol-3, 4, 5-triphosphat (PIP<sub>3</sub> oder IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) (18; 26; 99; 123) (Abbildung 8).

Der sekundäre Botenstoff IP<sub>3</sub> diffundiert an die Membran des endoplasmatischen Retikulums, bindet und öffnet  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, die sogenannten IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (18; 26; 99; 123) (Abbildung 6 & Abbildung 8). Das ER ist ein verzweigtes Membrannetzwerk, dessen Membran direkt in die Zellkernhülle übergeht. Es ist die Produktionsstätte der Lipide und Transmembranproteine und fungiert als intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (18). Aufgrund der Aktivierung der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren werden intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins

---

<sup>6</sup> Rat sarcoma

Zytoplasma freigesetzt wo diese selbst oder über Ca-bindende Proteine eine Wirkung ausüben können und damit die Signalübertragung vermitteln. Die nachfolgenden Signalwege können unter anderem das Aktinzytoskelett, die Zelladhäsion, -ausbreitung und -bewegungen beeinflussen (124). Wiederum werden, durch die Freisetzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER, Pumpen wie die Kalzium-ATPase geöffnet, die den Rückstrom der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den Speicher ermöglichen (125) (Abbildung 6). Das in der Membran verankerte Diacylglycerin (DAG) wirkt unterstützend auf die Aktivierung der Proteinkinase C. Nach Aktivierung, durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, phosphoryliert die Kinase weitere intrazelluläre Signalmoleküle (18), wie beispielsweise Signalproteine des verbundenen MAPK- sowie des AKT-Signalweges (101; 126). Damit sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Auslöser anderer zellulärer Events, wie die Aktivierung von Signalmolekülen (18).



**Abbildung 8:** Schema des Phospholipase C-Weges in der Zelle. ATP: Adenosintriphosphat; DAG: Diacylglycerin; ER: Endoplasmatisches Retikulum; ERK1/2, p38, JNK: MAP-Kinasen; IP3: Inositoltriphosphat; PLC: Phospholipase C. (Abbildung nach Scodelaro Bilbao et al., Fig. 9 (123)).

### **3.3.2. Signalproteine**

Die Signalmoleküle stellen zwischen Rezeptoren und Zellkern eine physikalische Verbindung her und dienen der Kommunikation. Bei den initialisierten Signaltransduktionswegen (downstream) werden die Signalmoleküle intrazellulär über kurze oder weite Distanzen via Kaskaden hintereinandergeschalteter Proteinkinasen phosphoryliert und aktiviert (127). Der Prozess der Signalübertragung wird häufig erst durch eine Akkumulation in einem Kompartiment oder durch Bindung an Reaktionspartner wie das Gerüst aus zytoskelettalen Proteinen induziert (outside-in) (36; 64; 65; 74; 78; 128) und führt weiterhin zur Kalziummobilisierung (32; 35; 61; 96).

Ebenso steuern die Ionenkanäle indirekt, durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, den MAPK- und den AKT-Signalweg (61; 75).

Die Modifikation der Konformation der Signalmoleküle erfolgt durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, eine direkte Protein-Protein-Interaktion oder die reversible Phosphorylierung (129) an den Seitenketten des Aminosäurerestes Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr). Die Übertragung der Phosphatgruppen wird durch Proteinkinasen unter ATP katalysiert und kann durch Phosphatasen reversibel gemacht werden (130). Dabei besitzen Proteine unter anderem mehrere verschiedene regulierte Phosphorylierungsstellen, so dass ein Protein unterschiedliche Aufgaben erfüllen kann (131). Neben der Signalregulation, der Signalamplifikation kann es auch zur Verteilung der Signale (Crosstalk) kommen, wodurch parallel mehrere Prozesse beeinflusst werden können. Die konvergierenden Signalwege sind sehr komplex und bilden ein großes Netzwerk (132). Durch die Translokation von aktivierten Proteinen in den Zellkern wird die Genexpression aktiviert oder supprimiert (18; 19) (Abbildung 2). Die Signalwege modulieren final physiologische Zellprozesse, wie die Proliferation, die Zellbewegung, das Wachstum oder die Apoptose (43; 69; 133) und bewirken eine Reorganisation des Aktins (18).

Folgend werden nur einige wichtige Wege der Signaltransduktion dargestellt.

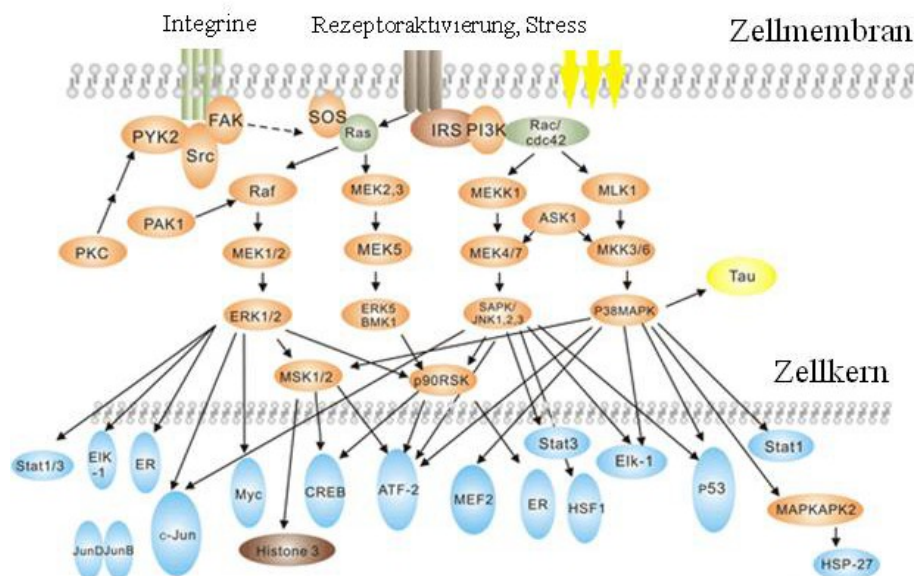
#### MAPK-Signalweg:

Die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) sind Ser/Thr-Proteinkinasen und kommunizieren durch Zugabe von Phosphatgruppen an benachbarte Proteine. Die MAP-Kinasen werden über verschiedene Rezeptoren wie Rezeptortyrosin-Kinasen, Integrine (134) und Cadherine, Kalziumkanäle oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert (81). Des Weiteren aktivieren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen, wie Proteinkinase C (135; 136), und das G-Protein Ras ebenfalls diesen Signalweg (101). Die MAPK-Signalwege verlaufen 3-stufig: die MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert eine MAPK-Kinase (MAPKK) durch Übertragung einer Phosphatgruppe, diese wiederum aktiviert in Folge über eine duale Phosphorylierung die MAPK (137; 138) (Abbildung 9).

Durch die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren, wird das Ras (G-Proteine) aktiviert (139). Ras wirkt als Aktivator der Serin/Threoninkinase Raf (rapidly growing fibrosarcoma), eine MAPKKK. Diese kann dann die dual spezifische MAPKK MEK1 (MAPK/ERK-Kinase 1) durch Serinphosphorylierung aktivieren. Das MEK1 aktiviert via Tyrosin- und Threoninphosphorylierung ERK1/2 (Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase 1/2) (26). Das ERK ist nur im doppelt phosphorylierten Zustand aktiv (140). Es sind neben ERK noch 2 weitere MAPK bekannt. Die p38-MAPK und JNK die bei Entzündungsreaktionen und Stress



(Chemikalien, osmotischer Druck) zur Regulierung der Apoptose fungieren (141; 142). Die MAPK können in den Zellkern translozieren und regulieren final durch Bindung an Transkriptionsfaktoren, wie ELK-1 (143) oder STAT<sup>7</sup>, die Genexpression und sind somit essentiell für das Wachstum und die Differenzierung (18; 26; 33) (Abbildung 9). Des Weiteren können alle MAP-Kinasen des Signalweges sich mit weiteren Signalwegen vernetzen. So führt beispielsweise die Aktivierung der p38-MAPK zur Phosphorylierung von Modulatoren der Aktinzytoskeletts-Polymerisation wie HSP27<sup>8</sup> und damit zum Zytoskelettumbau (144). Des Weiteren stimuliert ERK durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktor RUNX2 den Aktinumbau und den Knochenaufbau (145).



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des MAP-Kinase-Signalweges. ERK: Extracellular-signal Regulated Kinase (MAP-Kinase); FAK: Fokale Adhäsionskinase; MAP-Kinase: Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase; MEK1/2: MAPK/ERK Kinase 1, MAPKK; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen; PKC: Proteinkinase C; Raf: rat fibrosarcoma; Ras: rat sarcoma; STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription. (Abbildung nach [http://www.clini-sciences.com/lire/113-en-MAPK\\_Pathway.html](http://www.clini-sciences.com/lire/113-en-MAPK_Pathway.html)).

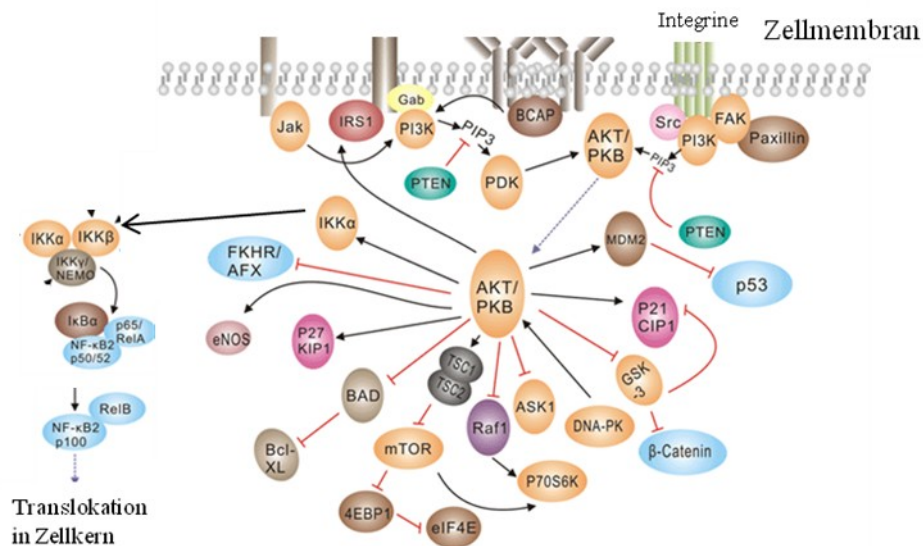
#### AKT-Signalweg:

Die Ser/Thr-Proteinkinase AKT (AKT1/2/3), auch bekannt unter Proteinkinase B (PKB $\alpha/\beta/\gamma$ ), überträgt Phosphatgruppen auf andere Proteine und spielt daher eine regulatorische Rolle in diversen Zellprozessen wie Zellwachstum, Zellzyklus und damit Proliferation, Stressfaserbildung und Zellmigration (146), sowie bei zellulären Überlebensprozessen (18; 26; 147). Der AKT-Signalweg wird beispielsweise über

<sup>7</sup> vom englischen: signal transducers and activators of transcription

<sup>8</sup> heat shock protein 27

Rezeptoren wie Rezeptortyrosin-Kinase (RTK), Integrine, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder andere Stimuli wie p38-MAPK (148) oder durch PI3K (Phosphoinosit 3-kinase), die einen Kalziumeinstrom über IP3 induzieren (30), aktiviert (126). Es erfolgt eine aktivierende Phosphorylierungen andere Kinasen, wie ERK oder GSK3 $\alpha/\beta$ , und damit die Translokation von der Zellmembran in andere Kompartimente. Die Synthase Kinase-3 (GSK-3) ist eine Ser/Thr-Proteinkinase und kann selektiv durch Phosphorylierung von Serin oder Threonin andere Proteine aktivieren und führt zumeist zur deren Inhibierung (149) (Abbildung 10). Die via AKT phosphorylierte Kinase GSK-3 $\beta$  wird deaktiviert. Damit fungiert AKT als ein Aktivator der Signalwege die normalerweise durch GSK inhibiert sind und ist damit ein Hauptmediator des Überlebens über direkte Inhibierung von pro-apoptotischen Signalen (133).



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung des AKT- und NFκB-Signalweges. AKT/PKB: Proteinkinase B; FAK: Fokale Adhäsionskinase; IκB: Inhibitor von κB; IKK: IκB Kinase; NFκB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen. (Abbildung nach [http://www.clinisciences.com/fourn/sab/schemas/Akt\\_Pathway.gif](http://www.clinisciences.com/fourn/sab/schemas/Akt_Pathway.gif) und <http://www.-clinisciences.com/lire/116-en-NF-kappa B Pathway.html>).

### Inflammatorischer Signalweg:

Der Transkriptionsfaktor NFκB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) liegt im Zytoplasma zusammen mit dem IκB (Inhibitor von κB, α/β/ε) vor. IκB maskiert beziehungsweise blockiert das NFκB, so dass es inaktiv ist. Beispielsweise durch Stress, Zytokine, Diacylglycerin (DAG) (150) aber auch Signalmoleküle anderer Signalwege, wie MAPK (151) oder AKT (152), wird der NFκB-IκB-Komplex via dem IκB-Kinase (IKK)-Enzymkomplex phosphoryliert, wodurch ein proteasomaler Abbau des inhibitorischen IκBα erfolgt. Dieses führt final dazu, dass das nun freie und aktive NFκB in den Zellkern transloziert und die Expression von mindestens 150 Genen, von

denen einige anti-apoptotisch sind, aktiviert (153) (Abbildung 10). Dies ist bedeutend für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes, denn seine Wirkung ist kritisch für die Entstehung von Entzündungen (26). Das I $\kappa$ B wird schnell resynthetisiert und kann so seine inhibitorische Kontrolle von NF $\kappa$ B wieder aufnehmen.

#### 4. Stand der Forschung und Motivation

Heutige Biomaterialien müssen nicht nur inert und biokompatibel sein, sondern auch eine durch Topographie und/oder Chemie bioaktive Oberfläche aufweisen, die die Regeneration der Gewebe fördert, stimuliert und steuert (154). Für die Akzeptanz und die Integration von Werkstoffen im Körper spielen die primären Mechanismen der Zelladhäsion an den Biomaterialoberflächen eine entscheidende Rolle (155).

Bisherige *in vitro*-Studien zeigten, dass die Topographie im Mikro- bis Nanometerbereich allein einen Einfluss auf die Zelladhäsion (19; 156), das Zellwachstum und auf die Organisation von Zellstrukturen hat (157) und damit das Zellverhalten (158), wie die Morphologie (159), die Migration, das Wachstum, das Überleben (160), die Proliferation, die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen (161) und die Differenzierung bestimmt (7; 162; 163; 164; 165; 166).

So konnte nicht nur in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass isotrope raue stochastische Oberflächen die Adhäsion erhöhen, das Spreading aufgrund scharfer Kanten beeinträchtigen und die Proliferation reduzieren (167; 168; 169; 170). Des Weiteren zeigten stark raue Oberflächen einen unmittelbaren Einfluss auf die Expression von Integrin-Untereinheiten und auf die Organisation des Aktinzytoskeletts, sowie einen Zusammenhang zwischen den Zellstrukturen und der Zellfunktion (171). Die Zellen sind also in der Lage, die Oberflächenstrukturen in ihrer Umgebung wahrzunehmen.

Lüthen et al. fanden auf maschinieren anisotropen Oberflächen eine Ausrichtung des Zellkörpers und zellulärer Strukturen, sowie die Veränderung der Zellfunktion, eine reduzierte Expression von Kollagen-Typ 1 und BSP2<sup>9</sup>, sowie eine verminderte Fähigkeit zur Mineralisierung (169). Den Einfluss der Topographie auf die Mineralisierung der Zellen konnten auch weitere Studien zeigen (144; 172; 173).

Die veränderte Konformation der zellulären Strukturen vermittelt folgend die Signaltransduktionsprozesse, über Veränderung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle (174) und/oder Änderung der Aktivierung von intrazellulären

---

<sup>9</sup> BoneSialoProtein2

Signalwegen (128; 175; 176), sowie der intrazelluläre Kalziummobilisierung (75; 96). So konnte der Prozess der Mechanotransduktion in zellbiologischen Ansätzen mit einem mechanischen Reiz in den Zellen nachgewiesen werden (61; 69).

*In vivo* zeigt sich, dass die Rauheit eines Implantates die Geweberegeneration und Heilung steuert und somit späteren Implantaterfolg verspricht (177).

Obwohl sich die Kenntnisse über Zell-Material-Interaktionen vertieft haben, gibt es noch interdisziplinären Forschungsbedarf in Bezug auf die komplexen Zusammenhänge molekularer Mechanismen der Zelladhäsion und der Organisation der zellulären Strukturen, welche Signaltransduktion kontrollieren, um eine biologische Antwort in Zellen zu induzieren.

Bisher konnte die Korrelation der komplexen zellulären Reaktionen in Abhängigkeit externer Einflussfaktoren der stochastisch strukturierten Materialoberflächen mit ihren verschiedenen Oberflächencharakteristiken, wie Strukturgröße, Formen und Raueiten, nicht genau erfasst werden.

Zur Aufklärung des Einflusses einer Materialtopographie auf die zellulären Mechanismen ist ein Ansatz mit der Reduzierung der Materialcharakteristika auf ein definiert geometrisches Oberflächenelement hilfreich. In diesem Modellsystem können die zeitabhängigen zellulären Prozesse, wie die Zelladhäsion, die Ausprägung und Dynamik des Aktinzytoskeletts, sowie die intrazelluläre Signalübertragung, nach Initialkontakt in ihrer Einzelheit genau aufgeklärt werden. Des Weiteren können durch systematische Variation der Struktur, in ihrer Dimension und Form, zelluläre Parameter ermittelt werden, die charakteristisch und stetig auf Topographieänderung der Materialoberfläche reagieren.

Dieser Aspekt liefert in der medizinische Grundlagenforschung neue Erkenntnisse über die Interaktion von Osteoblasten mit einer Biomaterialoberfläche und trägt zur zielgerichteten Weiterentwicklung von biofunktionalisierten Implantaten bei.

## II. Ziele

Die zellbiologischen *in vitro*-Untersuchungen zur Zell-Material-Interaktion beziehen sich auf eine Fragestellung in der medizinischen Grundlagenforschung. Im Fokus dieser Promotionsarbeit steht der Einfluss einer geometrisch mikrostrukturierten Pfostenoberfläche auf das zelluläre Verhalten der humanen Osteoblasten, wie die Zellarchitektur und die Signaltransduktion.

Ein Aspekt dieser Promotionsarbeit ist die phänotypische Charakterisierung der Osteoblasten bezüglich der Morphologie und der Aktinzytoskelett-Organisation an der Materialgrenzfläche. Des Weiteren sollen Erkenntnisse über die Ursache der resultierenden Organisation des Aktins gewonnen werden.

Da das Aktinzytoskelett essentiell für die Vermittlung von Signalen in der Zelle und damit für die Steuerung der Zellfunktion ist, besteht ein wesentliches Ziel dieser Promotionsarbeit in der Analyse biorelevanter Marker für die Signaltransduktion. Dabei liegt der Fokus auf der zeitabhängigen Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen, der Expression von membranösen Kalziumkanälen sowie der Bestimmung der intrazellulären Kalziummobilisierung in Abhängigkeit der Topographie.

Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen, die bisher unzureichend bekannte Weiterleitung externer topographischer Signale in die Zellen besser zu verstehen und zukünftig die zielgerichtete Weiterentwicklung von optimalen Implantatoberflächen für den klinischen Erfolg zu unterstützen.

### III. Material und Methoden

In zellbiologischen *in vitro* Analysen wurde die Interaktion von Osteoblasten mit definierter Mikrostruktur innerhalb der ersten 24 Stunden analysiert.

Die zellbiologischen Methoden zur Analyse der Zell-Material-Interaktionen beinhalteten rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mit dem Feldemission-Rasterelektronenmikroskop (FE-SEM SUPRA25, Carl Zeiss) zur Beurteilung der Morphologie. Mittels der Laser Scanning Mikroskopie (LSM410 und LSM780, Carl Zeiss) wurde die Organisation des Aktinzytoskeletts, sowie die Lokalisation von Kalziumkanälen analysiert. Die Analyse der Mobilisierung der intrazellulären Kalziumionen mittels Kalzium-Imaging erfolgte am Konfokalmikroskop LSM780 und die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration mittels Durchflusszytometrie. Die Expression von phosphorylierten Signalproteinen wurde mit Hilfe des Bio-Plex® Systems (Bio Rad) durchgeführt.

#### 1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Die im Anhang aufgeführten Chemikalien, sowie die aufgelisteten Antikörper wurden im Reinheitsgrad *pro analysi* von den jeweiligen Firmen bezogen. Das destillierte Wasser (*A. dest.*<sup>10</sup>) wurde aus der hauseigenen Anlage entnommen. Angaben zu den Firmen der verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte sind im Anhang (Anhang D1-5) aufgeführt. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank mit vertikalen Luftströmungen durchgeführt, die benötigten Gerätschaften und Verbrauchsmaterialien vor Gebrauch entsprechend autoklaviert oder mit 70 % Ethanol sterilisiert und Zellkulturzusätze steril filtriert.

#### 2. Materialoberflächen

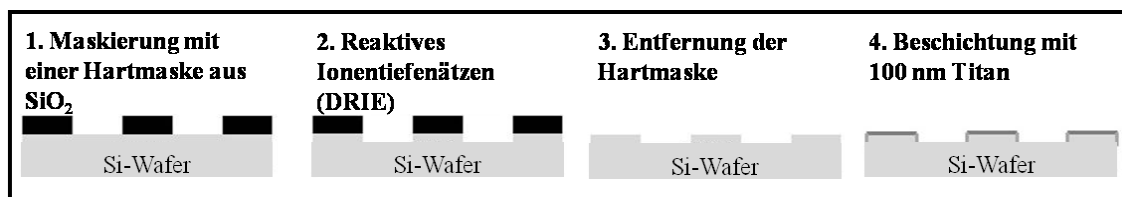
Für die zellbiologische Charakterisierung der Zell-Material-Interaktionen wurde eine definiert strukturierte Oberfläche mit einer regelmäßigen geometrischen Struktur im Mikrometerbereich als Modellsystem eingesetzt. Das definierte Strukturelement beinhaltete ein Array aus kantigen Pfosten, die an der Technischen Universität Chemnitz (ZfM<sup>11</sup>) hergestellt wurden. Die Prüfkörper mit quadratischen Profilen

---

<sup>10</sup> vom lateinischen: *Aqua destillatum*

<sup>11</sup> Zentrum für Mikrotechnologie (ZfM)

entstanden mittels reaktiven Ionentieftätzens (DRIE<sup>12</sup>) in Silizium (Si). Für den Prozess des DRIE wurde der Silizium-Wafer mit einer Hartmaske aus Siliziumdioxid (SiO<sub>2</sub>) maskiert. Damit wurden die Bereiche abgedeckt, die nicht geätzt werden sollten. Dann folgte ein zweistufiges Trockenätzverfahren bei dem sich Ätz- und Passivierungsschritte abwechselten. Beim eigentlichen Ätzprozess wurde Schwefelhexafluorid (SF<sub>6</sub>) in Hochfrequenzplasma mit Argon eingeleitet. Die chemische isotrope Ätzreaktion und der physikalische anisotrope Materialabtrag entstanden aus dem erzeugten reaktiven Gas zusammen mit der Beschleunigung der Ionen in einem elektrischen Feld. Diese Ätzreaktion wurde abgestoppt und ein Gasmisch in dem Plasmareaktor eingeleitet. Es bildete sich eine Polymer-Passivierungsschicht auf der gesamten Oberfläche aus, welche die Anisotropie des Ätzprozesses erhöhte. Der zweistufige Trockenätzprozess wurde solange wiederholt bis die gewünschte Strukturtiefe von 5 µm erreicht war. Am Ende wurden die Maskenreste entfernt und die entstandenen kantigen Strukturen mit 100 nm Titan beschichtet (178; 179) (Abbildung 11).



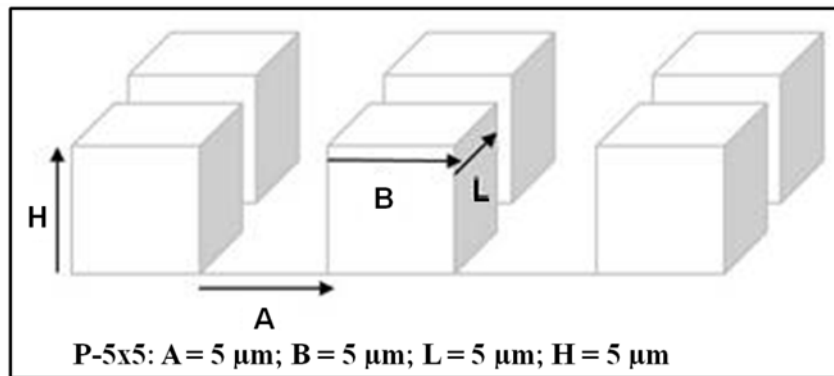
**Abbildung 11:** Schema des Produktionsprozesses: nach der Maskierung des Silizium-Wafers (Si-Wafer) folgte das reaktive Ionenätzen (DRIE). Von den so entstanden Strukturen wurde die Maske wieder abgespült und final die Beschichtung mit 100 nm Titan vorgenommen.

Damit wurden strukturierte Titanoberflächen (Si-Ti) simuliert. Die quadratischen Mikrostrukturen mit einer Anordnung von gleich weiten kubischen Pfosten mit vertikalen Seitenwänden hatten die Dimension mit einer Breite, Länge, Abstand und Tiefe von je 5 µm (P-5x5) (Abbildung 12). Als Kontrollproben dienten glatte Silizium-Wafer mit einer abschließenden 100 nm Titanschicht (Ref) (179).

Die Probenkörper konnten nur einmal verwendet werden, da sich herausstellte, dass der erforderliche Waschprozess noch Zellreste auf den Oberflächen hinterließ oder die Mikrostrukturen zerstörte. Die verwendeten Prüfkörper mit einer Dimension von 10 x 10 mm<sup>2</sup> wurden vor den experimentellen Ansätzen für 10 min mit 70 % vergälltem Ethanol behandelt und abschließend mit einer Phosphat gepufferten Salzlösung (PBS<sup>13</sup>) gespült.

<sup>12</sup> vom englischen: deep reactive ion etching

<sup>13</sup> vom englischen: phosphate buffered saline



**Abbildung 12:** Abmessungen der verwendeten Mikropostenstruktur (P-5x5). (A = Abstand, B = Breite, L = Länge, H = Höhe).

Für die Analyse des Aktinzytoskeletts wurde die Oberfläche modifiziert. Aus dem Zentrum für Mikrotechnologie kamen ebenfalls reine Silizium-Prüfkörper ohne abschließenden Prozess der Titanbeschichtung. Somit waren die Prüfkörper aus reinem Silizium (Si). Diese Silizium-Prüfkörper wurden unter anderem zur weiteren Modifikation im Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik<sup>14</sup> mit 100 nm Gold besputtert (Au).

Eine weitere Modifikation der Prüfkörper wurde am Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V.<sup>15</sup> (INP) durch Frau Dr. B. Finke vorgenommen. Die herkömmlichen Si-Ti Oberflächen wurden mittels Mikrowellen Niederdruckplasmaentladung mit dem Präkursor Allylamin unter Abscheidung eines Nanofilms (Schichtdicke ~50 nm) aus plasmapolymerisiertem Allylamin<sup>16</sup> (PPAAm) beschichtet. Dieser Prozess lief im Plasmareaktor V55G (Plasma Finish, Schwedt, V = 60 l) in zwei Stufen ab. Im ersten Schritt erfolgte die Reinigung und Dekontamination der Si-Ti Oberfläche in einem gepulsten Sauerstoff / Argon-Plasma (500 W, 50 Pa, 100 ml O<sub>2</sub> / 25 ml Ar, 10 ms on/90 ms off Puls, 30 s eff), gefolgt im zweiten Schritt – ohne Brechen des Vakuums - von der Plasmapolymerisation mittels Allylamin (500 W, 50 Pa, 300 ms on/1700 ms off Puls, 72 s eff.) (180; 181).

Eine weitere Modifikation der Oberfläche erfolgte im Labor unter der Sterilbank - die Beschichtung der Si-Ti-Probenkörper mit Kollagen (Col). Dafür wurden die Oberflächen im Vorfeld mit 70 %igem Ethanol gereinigt und anschließend in eine 4-well Platte gelegt. Auf den Oberflächen wurde ein Tropfen (100 µl) einer Kollagen-Typ I-Lösung (rat tail, 200 µg/ml) aufgebracht. Nachdem die

<sup>14</sup> Die Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Universität Rostock, Prof. Beck

<sup>15</sup> Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V., INP Greifswald

<sup>16</sup> Plasmapolymerisierte Allylamin (PPAAm) beschichtetet Proben: 30 s eff. O<sub>2</sub> Plasma (10 mson/90 ms off) (500 W, 50 Pa) + 480 s brutto PPAAm (300/1700 ms)



Kollagenbeschichtung über Nacht eingetrocknet war, wurden die Prüfkörper abschließend mit PBS gespült (182).

### 3. Humane Osteoblasten und Zellkultur

Für die *in vitro*-zellbiologischen Untersuchungen in einem Nährmedium wurde die immortalisierte Osteoblasten-Zelllinie MG-63 der Firma ATCC®<sup>17</sup> verwendet. Die Zelllinie stammt aus einem Tumor des Osteoblastengewebes (Osteosarkom) eines 14-jährigen männlichen Kaukasiers. Beschrieben wurde sie erstmals von Billiau et al. (183). MG-63 Zellen weisen funktionelle Eigenschaften eines frühen Osteoblastenstadiums auf. In Kultur wuchsen die Zellen zu einem adhärennten Zellrasen heran und zeigten eine polygonale Morphologie mit langen Ausläufern. Die Zelllinie MG-63 wird in der medizinischen Grundlagenforschung aufgrund seiner fortgesetzten Zellteilung, seinem einfachen Zugriff und der Wiederholbarkeit eingesetzt (184). Diese MG-63 Zelllinie ist für die zellbiologische *in vitro* Grundlagenforschung gut geeignet, da sie dem Phänotyp primärer Osteoblasten sehr ähnelt und die Muster der Genexpression, sowie Formen der Adhäsion und Signalübertragungswegen anzeigen (167; 169; 185; 186). Des Weiteren zeigen sie eine ähnliche Sensitivität hinsichtlich topographischer Charakteristika wie primäre humane Osteoblasten (167; 169) und stellen demzufolge eine sehr geeignete Zelllinie für die Fragestellung der Zell-Material-Interaktion dar (184; 185; 186). In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation sowie in der Expression der für die Adhäsion bedeutenden Integrinrezeptoren in der Passagenbreite von 5-30 auftraten. Daher wurden nur diese Passagenbreite für die jeweilige Versuchsansätze verwendet.

Die Zellkultivierung der MG-63 erfolgte in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) komplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Gentamycin, sowie 0,02 % Plasmocin bei 37 °C und einer befeuchteten Atmosphäre (85 % relative Luftfeuchte) mit 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank (179; 187). Das Zellkulturmedium mit seinen Zusätzen wird im Folgenden als Komplettmedium bezeichnet. Zum Auftauen der kryokonservierten MG-63 Zellen wurde das Komplettmedium in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche unter der Sterilbank vorgelegt. Die Zellen wurden rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in die vorgefertigte Zellkulturflasche überführt. Über Nacht konnten sich die Zellen absetzen. Nach 20 - 24 h fand ein kompletter Mediumwechsel statt, um das toxische Dimethylsulfoxid

---

<sup>17</sup> ATCC (American Type Culture Collection, LGC Promechem, Wesel), CRL-1427, Passage 88

(DMSO) und tote Zellen zu entfernen. Nach 3 Tagen hatte sich eine Monolayer-Zellschicht auf den Zellkulturflaschenboden gebildet, so dass die Zellen passagiert werden mussten. Für die Passage und für die Versuchsaussaaten wurde der Zellrasen mit PBS gespült. Um die Zellen von der Kulturflasche zu lösen und damit in Suspension zu bringen, erfolgte die Zugabe von Trypsin-EDTA<sup>18</sup> und einer anschließenden 5-minütigen Inkubation im Brutschrank (Trypsinierung). Das Trypsin ist eine Protease und spaltet die Proteine an den Stellen der Aminosäuren Arginin und Lysin, wodurch Adhäsionsproteine gehemmt werden (18). Das EDTA bindet zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , die zellbindende Membranproteine stabilisieren. Diese Reaktion wurde mit dem jeweiligen Komplettmedium abgestoppt. Das im Komplettmedium enthaltene FKS ist ein Protease-Inhibitor und hemmt die Wirkung von Trypsin-EDTA (188). Bevor die Zellen für die Versuche auf den unterschiedlichen Oberflächen ausgesät wurden, wuchsen sie zu einem sub-konfluenten Zellrasen heran. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Axiovert25, Carl Zeiss) kontrolliert. Befanden sich die Zellen in der gewünschten Dichte erfolgte die Trypsinierung und die Bestimmung der Zellanzahl mit dem Casy®. Für die Bestimmung der Anzahl von vitalen Zellen wurden aus der Zellsuspension 100 µl entnommen und in 10 ml Casy®-Tone Puffer verdünnt. Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl der Zellen} = Z \cdot V_f^{19}$$

Im Allgemeinen erfolgte die Aussaat auf den mikrostrukturierten und glatten Prüfkörpern in 4-well NUNC-Platten oder in 24-well Platten. Die Zelldichte betrug im Allgemeinen  $\sim 3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Die Zellen blieben für die Zeiträume 10 min, 30 min, 1 h, 3 h und 24 h je nach detaillierter Fragestellung auf den Oberflächen.

#### 4. Rasterelektronenmikroskopische Analyse

Die Rasterelektronenmikroskopie ist ein weit verbreitetes Verfahren, u. a. zur Abbildung der Topographie von Prüfkörpern, mit einer hohen Schärfentiefe und Ortsauflösung.

Die Analyse der Morphologie der humanen Osteoblasten in Abhängigkeit von den Oberflächen wurde nach 30 min, 3 h und 24 h mit Unterstützung des Feldemissions- und Rasterelektronenmikroskops durchgeführt.

---

<sup>18</sup> Ethylendiamintetraacetat

<sup>19</sup> Z = Anzahl der vitalen Zellen, V<sub>f</sub> = Verdünnungsfaktor

#### **4.1. Prinzip der Rasterelektronenmikroskopie**

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops ist durch die Wellenlänge des Lichtes begrenzt. Da schnelle Elektronen eine geringere Wellenlänge als sichtbares Licht<sup>20</sup> besitzen, wird bei der Rasterelektronenmikroskopie eine höhere Auflösung erzeugt. Das Rasterelektronenmikroskop (REM) besteht aus einer Hochvakuumkammer mit Elektronenstrahlquelle und Detektoren, sowie einer Steuereinheit. Das REM tastet mittels eines feingebündelten Elektronenstrahls<sup>21</sup> die Oberfläche Punkt für Punkt ab. Dabei werden an jedem Punkt auf der Oberfläche Signale, wie rückgestreute Elektronen oder Sekundärelektronen<sup>22</sup> synchron im Sekundärelektronendetektor (SE) gesammelt. Aus der Gesamtheit der abgerasterten Punkte wird ein Bild am PC zusammengesetzt (18). Die Aufnahmen erreichen eine 5-fache bis 200.000-fache Vergrößerung und sind nur in schwarz-weiß möglich. Die Charakterisierung der Mikrostrukturen, sowie die Auswertung der Morphologie der Osteoblasten auf den Strukturen erfolgte mit dem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (FE-SEM<sup>23</sup>, SUPRA™25, Carl Zeiss) aus der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Universität Rostock. Das Besondere des FE-SEM's ist die Verwendung der Technik der Feldemission zur Elektronenstrahlerzeugung. Dabei werden in einer Vakuumkammer Elektronen durch eine Feldemissionsquelle erzeugt und bei hohen Feldstärken herausgelöst (Feldemission, „getunnelt“) und beschleunigt. Das FE-SEM erreicht damit bei niedriger Beschleunigungsspannung eine höhere Auflösung. Für die Beurteilung der Struktur und Form von Osteoblasten auf den gebrochenen Oberflächen (Z-Aufnahmen) wurde das Rasterelektronenmikroskop DSM 960A (Carl Zeiss), aus dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universitätsmedizin Rostock, verwendet.

#### **4.2. Präparation der Osteoblasten**

Änderungen in der Morphologie von MG-63 Zellen nach 30 min, 3 h und 24 h auf der Mikropfostenstruktur sollen in Relation zur glatten Kontrolle betrachtet werden. Zur Vorbereitung für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Proben kritisch Punkt getrocknet. Dafür wurden die Zellen nach entsprechender Kultivierung einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 % Glutardialdehyd (GA) fixiert. Im nächsten Schritt wurde das GA mit einem 0,1 %-igem Natriumphosphat-Puffer

---

<sup>20</sup> Photonen

<sup>21</sup> Primärelektronenstrahl

<sup>22</sup> Sekundärelektronenstrahl

<sup>23</sup> vom englischen: field emission scanning electron microscope

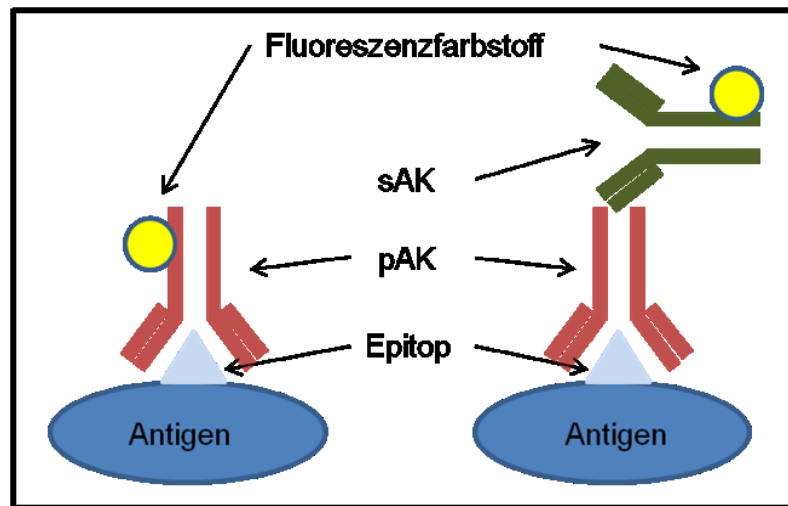
heraus gespült. Um das Wasser aus den Proben zu entziehen, erfolgte die Behandlung der Proben durch eine aufsteigende Azeton Konzentrationsreihe: 30 % 5 min, 50 % 5 min, 75 % 10 min, 90 % 15 min, 100 % zweimal 10 min und dann die Trocknung mit CO<sub>2</sub> unter Verwendung des kritischen Punkttrockners. Die Prüfkörper wurden abschließend auf eine leitfähige, doppelseitig klebende Folie gesetzt und konnten auf diesem Abstandhalter am FE-SEM untersucht werden (179; 187).

Für die Z-Schnitt Aufnahmen der Zellen an der horizontalen Bruchkante wurde das REM DSM 960A verwendet. Dieses Rasterelektronenmikroskop arbeitet mit einer höheren Beschleunigungsspannung, wodurch die Zellen zu elektrischen Isolatoren werden, die den Elektronenstrahl nicht ableiten. In Folge laden sich die Zellen auf und es entstehen überblendete Bildartefakte. Daher mussten die Zellen mit einer Leitschicht aus Gold künstlich leitfähig gemacht werden. Die Proben wurden zu diesem Zwecke im Vakuum mittels Sputter-Coater nach der kritisch Punkttrocknung und Brechung in flüssigen Stickstoff gleichmäßig mit Gold beschichtet (Schichtdicke 15 – 50 nm) und abschließend hochkant auf den Abstandshalter gesetzt (187).

## 5. Zytometrische Methoden

Für die Charakterisierung der Zell-Material-Interaktionen wurden zwei auf Laserbasis funktionierende Systeme verwendet: zum einen das Durchflusszytometer und zum anderen das konfokale Laser-Raster-Mikroskop. Beide Messgeräte analysieren Zellen und ihre zellulären Bestandteile über Fluoreszenzlicht- und Streulichteigenschaften.

Bei der Immunfluoreszenz können generell mit Hilfe von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern gezielt zelluläre Strukturen durch Licht bestimmter Wellenlänge (Laser) angeregt und damit identifiziert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorophore) der Antikörper absorbieren Lichtenergie über einen bestimmten Wellenlängenbereich. Diese spontane Emission von Licht, die beim Übergang eines Elektrons von einem höheren (Anregung) in das ursprüngliche Energieniveau erfolgt, wird als Fluoreszenz bezeichnet. Farbe und Intensität des emittierten Lichtes sind die charakteristischen Eigenschaften des Fluorophors. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper binden spezifisch an entsprechende Zielstrukturen - Epitope, charakteristische Regionen der Oberfläche eines Antigens. Bei der direkten Immunfluoreszenz binden spezifische fluoreszenzmarkierte Primärantikörper an das Antigen (Abbildung 13, links). Bei der indirekten Immunfluoreszenzmethode bindet ein unmarkierter Primärantikörper (pAK) an das Antigen und anschließend wird ein zweiter, fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (sAK), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt (Abbildung 13, rechts).



**Abbildung 13:** Schema des Prinzips der Immunfluoreszenzfärbungen mit ihrer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion: (links) die direkte Immunfluoreszenz und (rechts) die indirekte Immunfluoreszenz.

### **5.1. Laser Scanning Zytometrie**

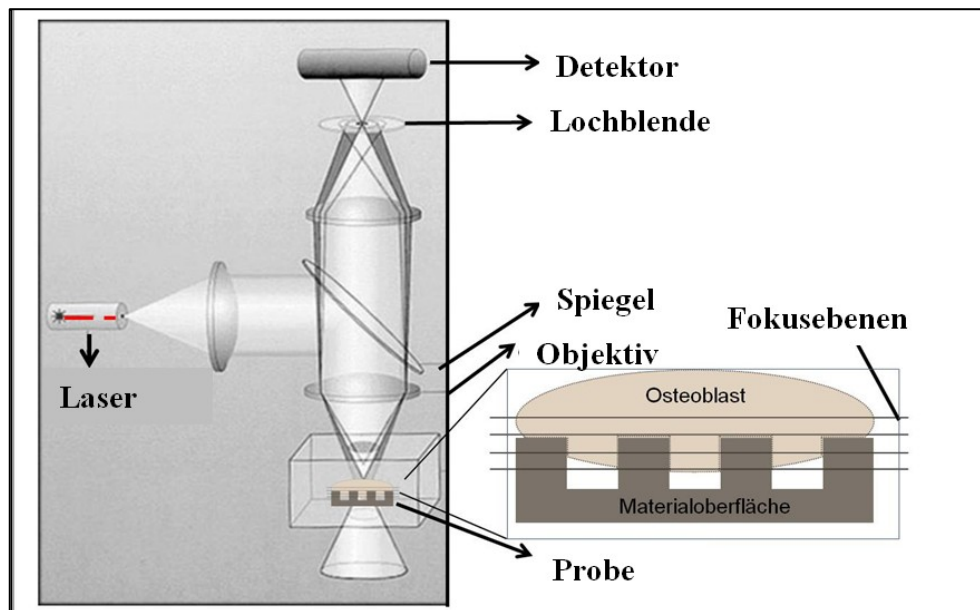
Zur Analyse der räumlichen Organisation von zellulären Zellstrukturen stellte das konfokale Laser-Raster-Mikroskop (LSM<sup>24</sup>) ein geeignetes Instrument dar.

#### Prinzip:

Der Vorzug der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie liegt in der Option, dass das von dem Präparat reflektierte oder emittierte Licht nur in einer Fokusebene abgebildet wird. Das ober- und unterhalb der Fokusebene erzeugte Licht wird dagegen mit Hilfe einer variablen Lochblende, dem Pinhole, vor dem Strahldetektor unterdrückt (189). Aus diesem Grund werden scharfe, hochauflösende optische Abbildungen des zu untersuchenden Präparates erstellt. Ein bewegliches Spiegelsystem erlaubt zusätzlich optische Schnitte z. B. in xy- oder xz-Ebene durch das Präparat mit definiertem Abstand zu legen. Damit lässt sich ein dreidimensionaler Bildstapel (Z-Stapel) generieren. Ein fokussierter Laserstrahl rastert das Präparat Punkt für Punkt ab und ermöglicht somit eine zusätzliche Streulichtreduzierung von benachbarten Bereichen. Das im Fokus liegende Bild gewinnt dadurch an mehr Schärfe und Kontrast. Zu keinem Zeitpunkt entsteht im Mikroskop ein vollständiges Bild. Die Detektoren (Photomultiplier (PMT)) nehmen die erzeugte Fluoreszenzlichtintensitäten, welche nacheinander an den Stellen des abzubildenden Bereiches gemessen wurde, auf. Die PMT wandeln das Fluoreszenzlicht am PC in elektrische Signale um und konstruieren so ein gesamtes Bild (Abbildung 14).

<sup>24</sup> vom englischen: laser scanning microscope

Ein weiterer Vorteil des LSM besteht in der simultanen Aufnahme von verschiedenen Fluorophoren auf mehreren Kanälen.



**Abbildung 14:** Prinzip des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops. Der Laserstrahl wird über ein bewegliches Spiegelsystem horizontal oder vertikal über die Probe geleitet. Das reflektierte oder emittierte Licht der Probe aus einer einzigen Fokusebene wird gesammelt. Die Lochblende vor dem Detektor sorgt dafür, dass kein Licht aus anderen Ebenen erfasst wird. Deshalb ist das Pinhole konfokal zur Fokusebene angeordnet (Abbildung nach Zeiss (2001): "LSM510 META Laser Scanning Microscopes Operating Manual, Rel. 3.0 Carl Zeiss GmbH.").

Zwei konfokale Laser-Raster-Mikroskope wurden verwendet:

Die konfokalmikroskopische Untersuchung zur Verteilung der Aktinzytoskelett-Organisation erfolgte mit dem LSM410 (Carl Zeiss). Mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert100 (Carl Zeiss) mit motorisiertem Z-Hub wird auch die inverse Mikroskopie in das LSM Prinzip mit einbezogen. Das LSM410 hat mehrere Anregungslaser: einen externen Dioden-Laser, der Licht mit 488 nm aussendet und interne Helium-Neon-Laser, die die Wellenlängen 543 nm und 633 nm emittieren. Um die Zellen in einer optischen Ebene zu scannen, wurde ein Carl Zeiss 63x Öl-Immersion Objektiv Plan-Neofluor (1.25 oil/0.17) verwendet. Die Bilder mit einer Größe von 512 x 512 Pixel wurden mit der LSM-Software 3.98 (Carl Zeiss) ausgewertet.

Mit dem Laser Scanning System 780 (Carl Zeiss) wurde die Verteilung von Kalziumkanälen, sowie die Mobilisierung der intrazellulären Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in Osteoblasten in Abhängigkeit von der definierten Mikrostruktur untersucht. Auch bei diesem System wird mittels Fluoreszenzmikroskop Observer Z1 (Carl Zeiss) die inverse Mikroskopie integriert. Ausgestattet ist das Gerät mit einem hochempfindlichen

32 Kanal-GaAsP<sup>25</sup>-Detektor, zwei PMT's<sup>26</sup> und 7 Laserlinien (UV-VIS<sup>27</sup>). Zusätzlich ist noch ein externer Argon Laser (488 nm) angeschlossen. Mit der innovativen ZEN2011 (black edition) Software von Carl Zeiss werden Bilder mit erhöhter Scangeschwindigkeit (bis zu 8 Bilder/s) und verbesserter Bildqualität (bis 6144 x 6144 Pixel) abgebildet. Das LSM780 ist zusätzlich mit einem Inkubationssystem (Temperatur- und CO<sub>2</sub>-Anschluß) ausgestattet, das Untersuchungen im Bereich des Live-Cell-Imaging ermöglicht. Die verwendeten Objektive sind ein 63x-Plan Apochromat (1,40 oil/DIC M27/AA 0,19 mm/0,17 mm Deckglas-Dicke), sowie ein 40-faches Wasserobjektiv C-Apochromat (1,2 W Korr/M27/AA 0,28 bei Deckglasdicke von 0,14-0,19 mm).

## **5.2. Durchflusszytometrie**

Mit der Durchflusszytometrie können in kurzer Zeit simultan mehrere zellbiologische Parameter über eine große Zellpopulation quantitativ erfasst werden. Unter Verwendung optischer und elektronischer Sensormethoden des Durchflusszytometers (FACS<sup>28</sup>) werden verschiedene zytologische, biochemische und funktionelle Eigenschaften aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension erkannt (190). Die Durchflusszytometrie ist damit geeignet auf Basis objektiver Fluoreszenzdaten quantitative Aussagen von individuellen Zellen und ihrer zellulären Bestandteile zu treffen (63).

### **Prinzip:**

Mittels einer Stahlkapillare werden die Zellen einer Suspension aus einem speziellen FACS-Rundröhrchen durch Überdruck in die Messküvette angesaugt. Beim Eintritt in die Messkammer werden diese Zellen durch die umgebende Trägerflüssigkeit perlschnurartig vereinzelt und stark beschleunigt. Diesen Prozess nennt man hydrodynamische Fokussierung. In dieser Weise erfolgt die Auftrennung und Aneinanderreihung der Zellen, die so sequentiell an einem fokussierten Laserstrahl vorbeigeführt werden (Sensormodul). Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Gestalt und spezifischen Färbung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter PMT-Detektoren gemessen werden. Das Sensormodul kann die Zellen mit dem Streulicht eines einfallenden Laserstrahls physikalisch definieren. Die Richtung der Lichtstreuung wird dabei verändert (Abbildung 15): In der Vorwärtsrichtung

---

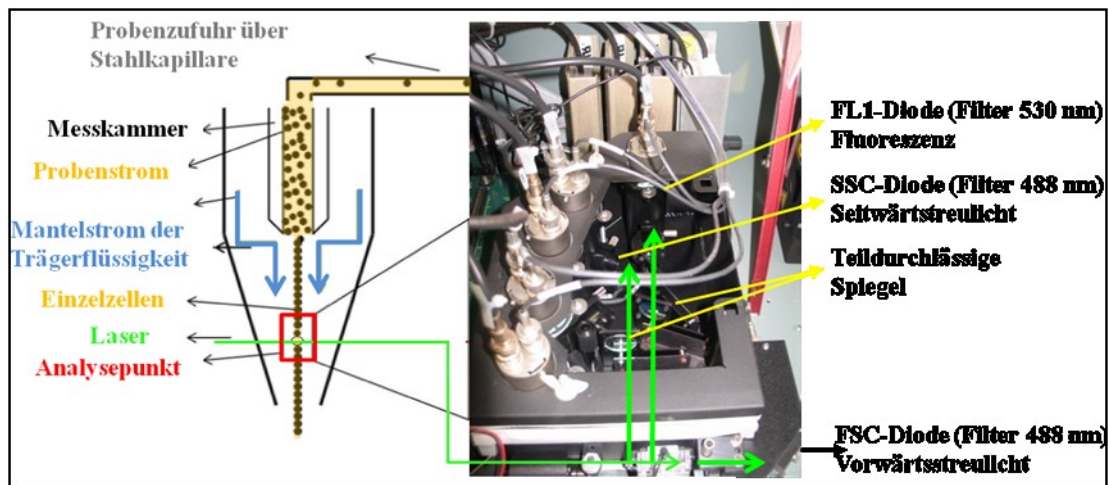
<sup>25</sup> vom englischen: gallium arsenide phosphide

<sup>26</sup> Photomultiplier

<sup>27</sup> UV: ultraviolettes-, VIS: sichtbares (vom englischen; visible) Licht

<sup>28</sup> vom englischen: fluorescence activated cell sorting

(Vorwärtsstreulicht, FSC<sup>29</sup>) kann die Größe der Zellen ermittelt werden. In der Seitwärtsrichtung, 90 ° zum einfallenden Lichtstrahl (Seitwärtsstreulicht, SSC<sup>30</sup>), wird die Granularität und Form der Zellen bestimmt. Des Weiteren erfasst das Sensormodul mittels eines Lasers die Emission von optischen Signalen einer fluoreszierenden Zelle (Abbildung 15). Ermittelte Fluoreszenzintensität lassen relative Quantifizierung der Expression u. a. von Proteinen und DNA zu. Die ausgesendeten Signale der Zelle werden durch spezielle Lichtfilter und –spiegel aufgetrennt und über verschiedene Detektoren empfangen. Die gemessenen Daten werden in ein elektronisches Signal umgewandelt und können mittels spezieller Software am PC quantifiziert werden (191).



**Abbildung 15:** Schema der Durchflusszytometrie: Einzelzell-Suspension wird vom FACS akquiriert. Die Zellen werden aneinandergereiht und können so am Sensormodul mit Hilfe von Laserlicht nacheinander einzeln quantifiziert werden. Vorwärtsstreulicht ermittelt die Zellgröße, Seitwärtsstreulicht die Granularität der Zellen und mit der Erfassung der Emission von Fluorophoren können Eigenschaften auf Proteinebene der Zelle bestimmt werden.

Mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur der Firma BD Biosciences wurde die Expression von spannungsabhängigen Kalziumkanälen nach 24 h, sowie die intrazelluläre Kalziumkonzentration in den Osteoblasten bestimmt. Das FACSCalibur ist unter anderem mit einem Argon-Ionen-Laser ausgestattet, der Fluorophore bei 488 nm anregen kann (zweiter Laser: Diodenlaser, 635 nm). Das FACSCalibur ist mit einer Analyse- und Akquisition Software CellQuest Pro Version 4.0.1. am Macintosh-PC prädestiniert für unsere Untersuchungen. Die Anzahl der gemessenen Zellen pro Kanal können linear oder logarithmisch verstärkt in einem Dot-Plot oder Histogramm dargestellt werden.

<sup>29</sup> vom englischen: forward light scatter

<sup>30</sup> vom englischen: side scatter



### **5.3. Analyse des Aktinzytoskeletts**

Ein wichtiges Merkmal für die zelluläre Untersuchung in Bezug auf die Zell-Material-Interaktion ist die Architektur des Aktinzytoskeletts von Osteoblasten.

#### **5.3.1. Zeitabhängige Aktinorganisation**

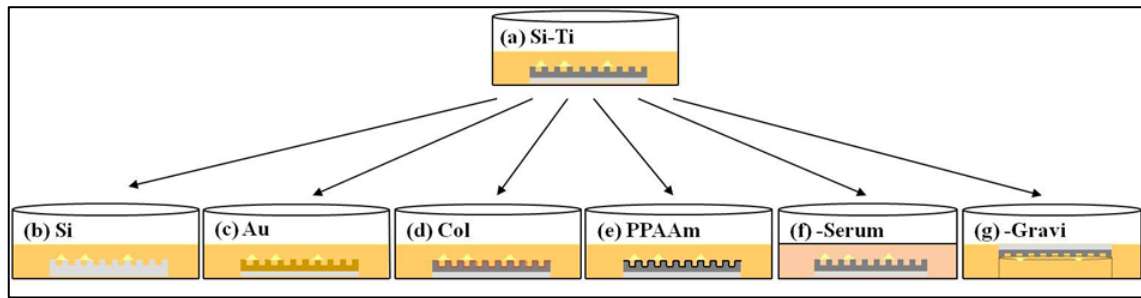
In den zellbiologischen Experimenten wurde die Ausprägung der Aktinfilamente in den MG-63 Zellen auf den Mikropfosten zeitabhängig nach 30 min, 3 h und 24 h untersucht. Für den Nachweis des filamentösen Aktins (F-Aktin) wurden die Osteoblasten mit einer Dichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf die Materialoberflächen ausgesät und für die entsprechenden Zeitpunkte kultiviert. Der Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) markierte Farbstoff Phalloidin ist ein Knollenblätterpilz-Toxin und lagert sich eng an die Aktinfilamente an und verhindert so den Abbau dieser Filamente. Damit der Farbstoff an die intrazellulären Filamente binden konnte, wurden die Zellen vorher 10 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und 10 min mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Nach einer halbstündigen Inkubation des Phalloidin-TRITC lichtgeschützt bei Raumtemperatur, sowie zwei Waschschritten mit PBS wurden die Präparate mit einem doppelseitigen Klebeband auf den Objektträgern befestigt. Alle Proben für das LSM wurden abschließend mit Fluoroshield eingebettet. Fluoroshield ist ein wässriges Eindeckmittel für die Erhaltung der Fluoreszenz der Zellen welches ein schnelles Ausbleichen von Fluorophoren verhindert. Zum Aushärten des Einbettmediums wurden die Präparate über Nacht lichtgeschützt und gekühlt aufbewahrt. Der Fluoreszenzfarbstoff TRITC und damit die Organisation der Aktinfilamente war bei einer Anregung von 543 nm und einer Emission von 570 nm im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop LSM410 nachweisbar (179; 187).

#### **5.3.2. Modifikationen der Kultivierung zur Analyse des Aktins**

Zur vertieften Analyse unter dem Aspekt, welchen Einfluss chemische Modifikationen der Oberfläche auf die Organisation des Aktinzytoskeletts haben, wurden die Pfosten- und Referenzoberflächen chemisch modifiziert (siehe Abschnitt 2, Abbildung 16):

Neben den herkömmlichen Silizium-Titan Arrays (Si-Ti) als Ausgangspunkt wurden Silizium Prüfkörper (Si) und Silizium Prüfkörper mit einer 100 nm Goldschicht (Au) verwendet. Zudem wurden die konventionellen Silizium-Titan Arrays mit einer zusätzlichen Kollagen-Typ 1 Beschichtung (rat tail) (Col) oder alternativ mit einer Plasmapolymerschicht aus Allylamin (PPAAm) einbezogen. Zusätzlich erfolgten Abänderungen der Kultivierungsbedingungen: die Kultivierung ohne fetales

Kälberserum (-Serum), sowie die Inkubation umgedreht auf Abstandshalter flexiPERM® und so entgegen der Schwerkraft (-Gravi) (182; 192) (Abbildung 16).



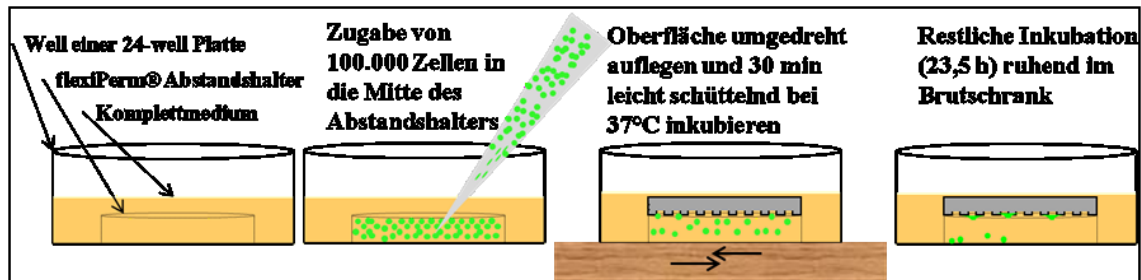
**Abbildung 16:** Kultivierung von humanen Osteoblasten für 24 Stunden (a) auf Silizium-Titan (Si-Ti) Arrays in Komplettmedium, (b) auf reinen Silizium-Proben (Si), (c) auf Silizium-Proben mit Goldschicht (Au), (d) auf Si-Ti mit Kollagen I-Beschichtung (Col), (e) auf Si-Ti mit einer zusätzliche Plasmapolymerschicht (PPAAm), (f) auf Si-Ti in Medium ohne Serum (-Serum) und (g) auf Si-Ti entgegen der Schwerkraft (-Gravi).

#### Vorarbeiten:

Die Kultivierung entgegen der Schwerkraft stellte sich als eine diffizile Angelegenheit dar, da die Prüfkörper mit Zellen umgedreht kultiviert werden sollten. Ein wichtiger Faktor war die Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche im umgedrehten Zustand für 24 h. Bei den ersten Ansätzen wurden die Prüfkörper wie gebräuchlich in die 4-well Platten gesetzt und mit einer Zelldichte von  $\sim 3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> besiedelt. Es folgte eine kurze Absenk- und Adhäsionsphase der Zellen von 30 min ruhend im Brutschrank bei 37 °C. Im Anschluss erfolgte die Drehung und Lagerung der Prüfkörper mit den Zellen auf einem Abstandshalter von flexiPERM®. Der Abstandshalter flexiPERM® war ein Zellkulturkammersystem aus Silikon mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Höhe von 8 mm. Dieser wiederverwendbare Abstandshalter wurde nach einer Reinigung mit 70 % Ethanol in eine 24-well Platte gesetzt und mit Komplettmedium aufgefüllt. Auf diesen Abstandshalter wurde nach der Absenkphase die besiedelte Seite der Proben nach unten gelegt, so dass ab diesem Zeitpunkt die Zellen für 24 h entgegen der Schwerkraft kultivierten. Bei weiteren Ansätzen wurden im Folgenden die Absenk- und Adhäsionsphase verkürzt: 30 min - 0 min. Es stellte sich aber heraus, dass ohne eine ruhende Absenkphase keine Zellen auf den Oberflächen adhärten. Deshalb erfolgten die nächsten Ansätze mit dynamischer Lagerung, unterschiedlichen Aussaatdichten und diversen Inkubationszeiträumen. Am Ende hat sich die Methode bewährt, die Zellen in einer hohen Aussaatdichte von  $\sim 100.000$  Zellen direkt in die Mitte des flexiPERM®-Abstandshalter zu pipettieren und den Prüfkörper umgedreht, mit der strukturierten Seite nach unten, auf den Abstandshalter zu legen. Damit die Zellen an die Oberflächen adhärten konnten wurde dieser komplette Ansatz für

30 min leicht schwenkend auf einem Schüttler bei 40 rpm und 37 °C inkubiert, bevor die Kultivierung für die restliche Zeit von 23,5 h ruhend im Brutschrank erfolgte (Abbildung 17). Mit dieser Methode konnte gewährleistet werden, dass die Zellen von Anfang an entgegen der Gravitation kultiviert wurden.

Zur Markierung der Aktinfilamente wurden die Präparate nach Fixation und Permeabilisierung 30 min mit TRITC konjugiertem Phalloidin markiert.



**Abbildung 17:** Schema der Kultivierung entgegen der Gravitation.

#### **5.4. Expression der Kalziumkanäle**

Um den Einfluss von Mikropfosten auf die Osteoblasten zu charakterisieren wurde die Expression wichtiger zellulärer Strukturen für die Signaltransduktion untersucht. Die verschiedenen L- und T-Typ-Kalziumkanäle ( $Ca_v$ ) wurden nach 24 h mittels konfokaler Mikroskopie und relativ quantitativ im Durchflusszytometer analysiert. Der indirekte Immunfluoreszenznachweis erfolgte für die L-Typ Kalziumkanäle  $Ca_v1.2$  und  $Ca_v1.3$ , sowie für die T-Typ Kalziumkanäle  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$ ,  $Ca_v3.3$ .

Laser Scanning Zytometrie: Die zelluläre Lokalisation der verschiedenen L- und T-Typ-Kalziumkanäle in der Osteoblasten wurde auf der Mikrostruktur vergleichend zur glatten Referenz mit dem LSM780 untersucht. Für diese Ansätze wurden die Zellen für 24 h auf den Oberflächen kultiviert. Für den Zugang der Antikörper an die Kalziumkanäle wurden die Zellen wie folgt vorbehandelt: erst die Fixation mit 4 % PFA für 10 min und anschließend die Permeabilisierung für 15 min mit 0,1 % Triton X 100. Um freie Bindungsstellen abzusättigen erfolgt eine Inkubation mit einer Blockierlösung aus 2 % BSA (30 min) (Reduzierung von unspezifischen Bindungen). Die anschließende zweistündige Inkubation der primären Antikörper (spezifische Epitope für die jeweiligen  $Ca_v$ 's, siehe Anhang) erfolgte mit einer Verdünnung von 1:100 in PBS bei 4 °C. Zusätzlich wurde das Immunglobulin G (IgG, 1:10) als unspezifische Kontrolle mitgeführt. Nach zwei Waschschritten wurde mit Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 (Goat Anti-Rabbit IgG für Kalziumkanäle, Rabbit Anti-Mouse IgG für das Immunglobulin G) inkubiert (1:200 in PBS, 30 min, lichtgeschützt). Für den Nachweis am LSM780 wurden die Proben auf Objektträger mit doppelseitigem

Klebeband und dem Einbettmedium Fluoroshield gebracht. Die Anregung der Fluorophore erfolgte bei 488 nm und die Emission bei 515 nm (193). Um die Lokalisation des L-Typ Kalziumkanals  $Ca_v1.2$  (bzw. seines nachzuweisenden Epitops) in den Zellen auf der planaren Oberfläche genauer zu bestimmen, wurde nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 zusätzlich noch der Farbstoff Hoechst 33342 (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride, Kernfärbung) eingesetzt. Die Inkubation mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (1:2000 in PBS) betrug 15 min. Nach Waschschritten und Einbettung der Probe konnte in einem weiteren Kanal am LSM780 bei einer Anregung von 346 nm die Fluoreszenz bei 460 nm emittiert werden. Zur Bestimmung der Kolo-kalisation der beiden Farbstoffe (Alexa Fluor 488, Hoechst 33342) wurde die Funktion „Coloc“ (Zen2012 (blue edition), Carl Zeiss) herangezogen.

Durchflusszytometrie: Zur Untersuchung der quantitativen Expression von verschiedenen spannungsabhängigen Kalziumkanälen wurden die Zelllinie MG-63 für 24 h auf der Mikropfostenoberfläche beziehungsweise der glatten Referenz kultiviert. Mittels Trypsinierung wurden die adhären-ten Zellen auf den entsprechenden Oberflächen in Suspension gebracht. Die Aufteilung auf die FACS-Rundröhrchen erfolgte je nach nachzuweisendem Kalziumkanal und Oberfläche. Waschschr-itten erfolgten zwischen einzelnen Präparationsschritten durch Zugabe von PBS und Zentrifugation für 5 min bei 1414 rpm. Die suspendierten Zellen wurden 10 min mit 4 % PFA fixiert und 15 min mit 0,1 % Triton-X100 permeabilisiert, damit der Primärantikörper intrazellulär an die entsprechenden Antigene binden konnte. Der jeweilige Primärantikörper (1:100) wurde für 60 min bei Raumtemperatur und anschließend der Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (1:200) für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Als Isotypkontrolle wurden Zellen nur mit dem sekundären Antikörper behandelt. Abschließend wurden die Zellen in 300 µl FACS-PBS aufgenommen und bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Die Proben wurden am FACSCalibur mit dem Argon-Laser bei 488 nm in dem Programm CellQuest Pro 4.0.1. gemessen und ausgewertet (193). Die Ergebnisse werden als quantitativer Wert der Fluoreszenzintensität (relativer mean channel) abzüglich der Isotypkontrolle dargestellt.

### **5.5. Analyse der Kalziummobilisierung**

Die Mobilisierung der intrazellulären Kalziumionen in MG-63 Osteoblasten wurde mittels der Kalzium-Imaging-Technik am LSM780 analysiert. Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Zellen kann mit dem Kalziumindikator Fluo-3/AM<sup>31</sup> im aktiven Zustand bestimmt werden. Der Farbstoff Fluo-3/AM (194) ist ein membrangängiger Kalziumindikator, der im Zytoplasma bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung eine Zunahme der Fluoreszenz (Anregung/Emission 506/526 nm) aufweist und damit die räumliche Dynamik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalisierung darstellt. Das Acetoxymethylester (AM) verleiht dem Farbstoff Fluo-3 die Möglichkeit, durch passive Diffusion in die Zelle einzudringen. In der Zelle vorkommende endogene Esterasen spalten das AM ab, wodurch ein Austritt des Farbstoffes aus der Zelle verhindert wird. Die Kalziummobilisierung in den MG-63 Zellen wurde auf den Mikropfosten vergleichend mit der planaren Referenz zum einen initial nach einer kurzen Adhäsionsphase (Kalzium-Imaging suspendierter Zellen) untersucht. Zum anderen erfolgte die Analyse der Kalzium-Mobilisierung nach 24 h Kultur (Kalzium-Imaging adhärenter Zellen). Bei dem Kalzium-Imaging adhärenter Zellen wurde durch die Zugabe von Adenosintriphosphat (ATP) ein Stimulus gesetzt, der zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führte (75), die dann zusätzlich analysiert werden konnte.

#### **Vorarbeiten:**

Die Durchführung der Kalzium-Imaging-Technik bedurfte vieler Vorversuche. Es wurden verschiedene Puffersysteme und Medien (PBS, DMEM), sowie verschiedene Konzentrationen des Farbstoffs ausgetestet, um ein Kalziumsignal am Konfokalmikroskop zu erhalten. Der Nachweis freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den Zellen mittels LSM war durch die Beladung mit dem Kalziumindikator Fluo3/AM in DMEM mit/ohne Serum oder in Puffersystemen wie PBS nicht möglich. Nur durch die Beladung in einem hypotonischem Puffersystem, bei dem durch die osmotische Lyse der Indikator Fluo-3/AM in die Zelle diffundiert, konnte eine intrazelluläre Kalziumdynamik am Konfokalmikroskop detektiert werden. Da ein inverses Fluoreszenzmikroskop in das LSM-Prinzip mit einbezogen wurde, war es erforderlich die Oberflächen umgedreht, mit dem Zellrasen nach unten, in die IBIDI  $\mu$ -Schale hineinzulegen. Bei den inversen Mikroskopen ist das Objektiv unter dem Objektivtische angebracht und daher wird das Präparat von unten betrachtet. Diese inverse Lage der Prüfkörper mit Zellen stellte beim Live-Cell-Imaging am LSM780, vor allen bei dem Ansatz des suspendierten Kalzium-Imaging, ein Problem dar. Die besiedelten Prüfkörper wurden nach der

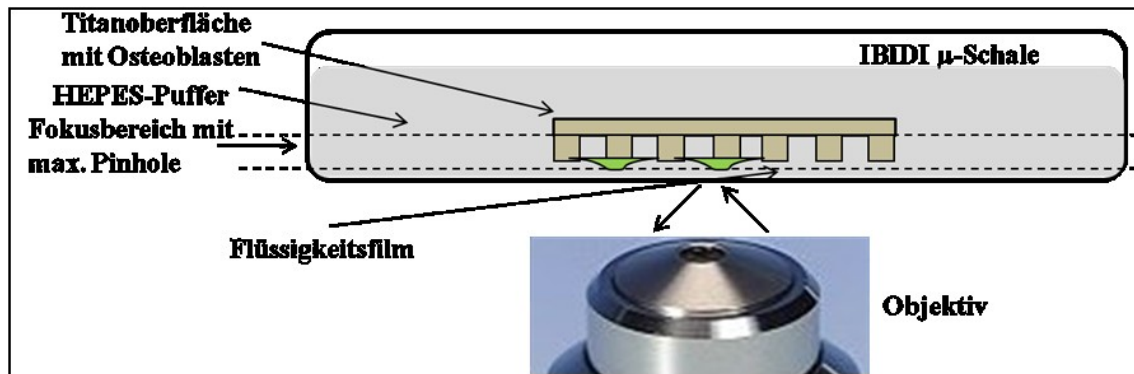
---

<sup>31</sup> 1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraaceticacid, acetomethyl ester

Beladung mit dem Kalziumindikator umgedreht in eine IBIDI  $\mu$ -Schale hineingelegt. Anders als beim Ansatz entgegen der Gravitation zur Analyse des Aktinzytoskeletts (siehe Abschnitt 5.3.2.) mussten die Zellen nun im ruhenden Zustand in der Lage sein an der Oberfläche zu adhären. Aus den Vorarbeiten der Versuche entgegen der Gravitation war bekannt, dass die Zellen mindesten eine Anheftungsphase von 10 min benötigen, um auch entgegen der Schwerkraft zu adhären.

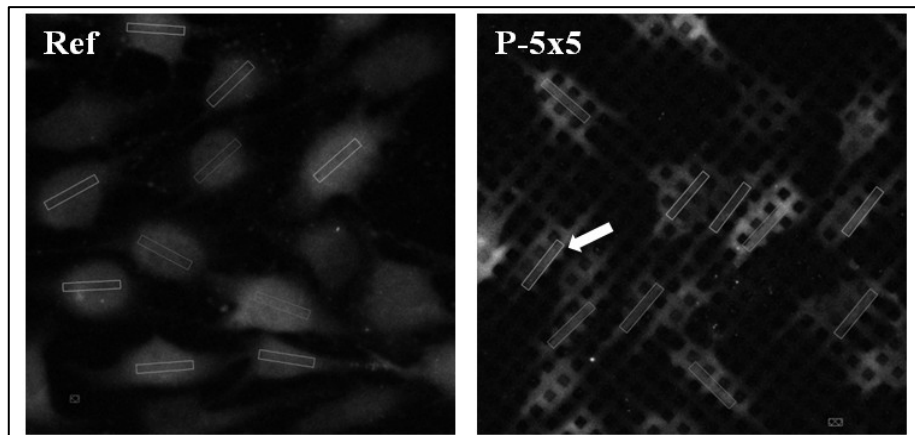
Die IBIDI-Petrischale ist mit ihrem dünnen Boden für hochauflösende Mikroskopie-Techniken, wie Fluoreszenzmikroskopie, gut geeignet. Es stellte sich anfangs die Frage, ob die Prüfkörper in die Schalen mit oder ohne einen Abstandshalter gelegt werden sollten. Größere Abstandshalter wie flexiPerm® oder Silikonringe vergrößerten den Raum zwischen Objektiv und Präparat, wodurch ein Mikroskopieren nicht mehr möglich war. Dünne Spacer wie Folien aus Polypropylen zeigten eine starke Eigenfluoreszenz. Final wurden die Oberflächen umgedreht ohne ein Spacer in die IBIDI-Schale gelegt. Durch den Flüssigkeitsfilm zwischen dem Präparat und der IBIDI-Schale lag die Oberfläche mit den Zellen nicht direkt auf dem Glasboden auf und so konnte auch das Reagenz Adenosintriphosphat (ATP) unter dem Präparat die Zellen erreichen und stimulieren.

Für die Analyse der Kalziummobilisierung eignete sich das konfokale Mikroskop LSM780 besonders gut, da es mit einem Inkubationssystem ausgestattet ist. Dadurch konnten die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden. Die Analyse am konfokalen Mikroskop mit der Software ZEN2011 (black edition) wurde verfeinert, indem das Pinhole maximal geöffnet wurde. Aufnahmen von einzelnen Ebenen führten dazu, dass die Kalziumdynamik ober- und unterhalb dieser Ebene nicht erfasst wurde. Die Rekonstruktion eines Z-Stapels (Aufnahmen mehrerer Fokusebenen) und damit die Analyse der Kalziumsignale in der gesamten Zelle nahm pro Aufnahme in der Zeitserie (ein Zyklus) zu viel Zeit in Anspruch, wobei mögliche schnelle Kalziumsignale verloren gehen können. Mit der Einstellung des maximalen Pinholes konnte die Kalziummobilisierung in der gesamten Zelle in kurzen Abständen (á 2 s) in einer Zeitserie analysiert werden (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Schema des Kalzium-Imaging: Die besiedelten Oberflächen wurden mit dem Zellrasen nach unten in eine IBIDI  $\mu$ -Schale, gefüllt mit Pufferlösung, gesetzt. Der Flüssigkeitsfilm zwischen Glasboden und Präparat verhinderte die direkte Auflage. Die Mobilisierung der Kalziumionen in den Osteoblasten auf den Oberflächen wurde am LSM780 (Carl Zeiss) mit dem 40xObjektiv und maximalem Pinhole analysiert.

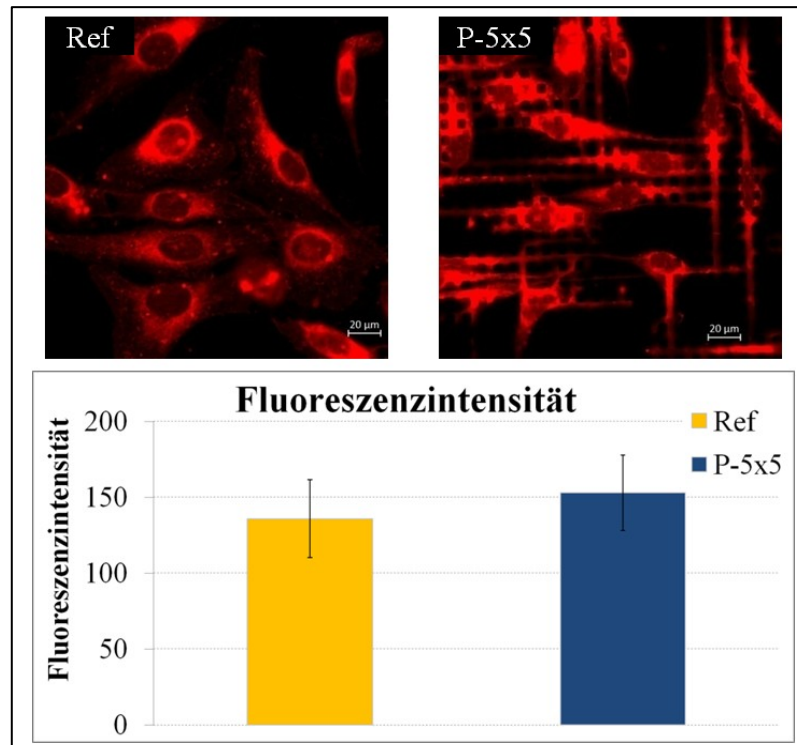
Für die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität wurde die Software Zen2012 (blue edition) mit der Funktion „Mean ROI“ herangezogen. Nach anfänglichen Analysen des gesamten Bildausschnittes oder von Einzelzellen, wurde final nur ein definierter Bereich der Zelle quantifiziert (Abbildung 19, Pfeil). Die Position der definierten Bereiche wurde in den Osteoblasten auf der Mikropostenstruktur so gewählt, dass nur zwischen den Pfosten, die ein durchgehendes Kalziumsignal aufweisen, ausgewertet wurde (Pfeil). So konnte verhindert werden dass die dunkleren Bereiche (bei maximalen Pinhole), durch die Reflexion der Pfosten verursacht, nicht mit in die Quantifizierung einbezogen wurden. Nach Einstellung dieses definierten ROI's/Zelle für 10 Zellen pro Aufnahme (Zyklus) konnte die mittlere Fluoreszenzintensität abzüglich des Hintergrundes quantifiziert werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Exemplarische Beispiele der konfokalmikroskopischen Aufnahmen mit den gesetzten definierten Bereichen (Pfeil) zur Auswertung der einzelnen Zeitserieneinzelaufnahmen: (links) Referenzoberfläche (Ref) und (rechts) die Mikroposten (P-5x5). (LSM780, Carl Zeiss; 40x Wasserobjektiv, Carl Zeiss; Zen2012 (blue edition) mit der Funktion „Mean ROI“, Carl Zeiss).

Aufgrund der gestreuten Rückstrahlung des emittierten Lichts an den Ecken und Kanten der Pfostenoberfläche im konfokalen Mikroskop war die Vermutung, dass es zu einem Verlust von Fluoreszenzsignalen kommen könnte. Um die stabile Fluoreszenzintensität auf den Oberflächen nachzuweisen, wurden 24 h kultivierte PKH-26 gefärbte Osteoblasten auf den Mikrostrukturen nach der gleichen Prozedur gescannt (Abbildung 20) – mit dem 40x-Objektiv und maximalem Pinhole (Abbildung 18). Für die PKH-26 Färbung wurden  $\sim 1 \times 10^6$  suspendierten Osteoblasten mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff PKH-26, der sich in die Membran einbaut, für 5 min bei 37 °C markiert, die Zellen mit einer Dichte von  $\sim 3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> für 24 h auf den Oberflächen kultiviert, mit 4 % PFA fixiert und abschließend eingebettet. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie (LSM780) wurde der Fluoreszenzfarbstoff bei 550 nm angeregt. Die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensitäten der definierten Bereiche erfolgte, wie bei der Auswertung der Kalziummobilisierung, mit der Software ZEN2012 (blue edition), Funktion „Mean ROI“ (Abbildung 20). Wie in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen in der Abbildung 20 (oben) ersichtlich, kann kein Intensitätsverlust auf den Pfosten nachgewiesen werden. Auch die quantitative Auswertung (Abbildung 20, unten) mit der ZEN-Software zeigt keine signifikante Beeinträchtigung der mittleren Fluoreszenzintensität auf der Mikropostenstruktur (P-5x5) im Vergleich zur planaren Referenz (Ref). Damit kann ein Verlust an Fluoreszenzintensität aufgrund der Pfostenecken und –kanten bei den Aufnahmen am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop ausgeschlossen werden.





**Abbildung 20:** Methodenvalidierung zur Analyse der Fluoreszenzintensität mittels PKH-26 Zellmembran-gefärbter MG-63 Osteoblasten. Die Aufnahmen als auch die quantitativen Daten zeigen, dass keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Struktur nachweisbar sind. (oben) konfokalmikroskopische Aufnahmen PKH-26 gefärbter Osteoblasten auf der Referenzoberfläche (Ref) und auf der mikrostrukturierten Oberfläche (P-5x5) (LSM780, Carl Zeiss, Bar = 20 µm, rot = PKH-26 markierte Zellmembran). (unten) Analyse der Fluoreszenzintensitäten (Software Zen2012 (blue edition), Funktion „Mean ROI“, Carl Zeiss; MW ± SD; n = 15 aus n = 5 Aufnahmen, Kruskal-Wallis-Test, nicht signifikant).

#### Kalzium-Imaging von suspendierten Zellen:

Der Einfluss der Mikropfostentopographie auf die Kalziumfreisetzung in den ersten Minuten und Stunden der Zelladhäsion erfolgte vergleichend auch auf der glatten Referenz. Dafür wurden zunächst die Zellen nach einem Waschschrift (PBS) mit Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1414 rpm wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 1414 rpm) wurde das Pellet in 2 ml HEPES-Puffer-II (hypotonisch) aufgenommen. Die in HEPES-Puffer resuspendierten Zellen wurden mit 10 µl der Kalziumindikator-Stammlösung Fluo-3/AM ( $\cong 5 \mu\text{M}$ ) beladen. Die Inkubation der Färbereaktion erfolgte für 40 min bei 69 rpm und 37 °C auf dem Schüttler. In der Zwischenzeit wurde die IBIDI-Schale vorbereitet: die Prüfkörper wurden mit der strukturierten Seite nach oben in die Schalen gelegt und 2 ml HEPES-Puffer-I hinzugegeben. 500.000 suspendierte Fluo3/AM-beladene Zellen wurden nach der Inkubation auf die jeweilige Oberfläche in der vorbereiteten

IBIDI-Schale ausgesät. Nach einer 10-minütigen Anheftungsphase wurde der besiedelte Prüfkörper in der IBIDI-Schale umgedreht (Zellrasen nach unten). Die Analyse erfolgt am konfokalen Mikroskop LSM780 mit dem 40x C-Apochromat (1,2 W Korr M27) Objektiv und bei 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Begasung und einer konstanten Temperatur von 37 °C (nach ~ 20 min Adhäsion der Osteoblasten auf den jeweiligen Oberflächen). Ein 488 nm Argon-Ionen-Laser wurde zur Anregung verwendet und die Emission wurde bei 515 nm detektiert. Es wurden mit der Software ZEN2011 (black edition) Zeitreihen (240 Aufnahmen/Zyklen á 2,5 s) aufgenommen. Mittels der Zen2012 (blue edition)-Software und dem Modus "Mean ROI" konnte die mittlere Fluoreszenzintensität der freigesetzten Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Basalkonzentration) für definierte Bereiche von 10 Zellen pro Aufnahme quantifiziert werden (Abbildung 19).

#### Kalzium-Imaging von adhärennten Zellen:

Für die Analyse der intrazellulären Kalziummobilisierung wurden die Zellen mit einer Dichte von  $\sim 8 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den mikrostrukturierten und den glatten Prüfkörpern ausgesät und für 24 h kultiviert. Nach drei Waschschritten mit PBS erfolgte die Zugabe von einem schwach hypotonischen Gemisch aus HEPES-Puffer-I & II (1:1). Die Zellen wurden folgend mit 5  $\mu$ M des Kalziumindikators Fluo-3/AM (75) ( $\pm 10 \mu$ l) beladen. Nach einer Inkubationszeit von 40 min im Brutschrank wurden die Prüfkörper in einer IBIDI  $\mu$ -Schale mit HEPES-Puffer-I (2 ml) platziert. Das globale Kalzium-Signal wurde mit Hilfe des LSM780 mit dem 40x C-Apochromat (1,2 W Korr M27) Objektiv analysiert. Die Zellen wurden dabei bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Die Anregung mit dem Argonlaser erfolgte bei 488 nm. Mit der Zen2011 (black edition)-Software (Carl Zeiss) und dem Modus "time series" wurde ein Ausschnitt (512 x 512 Pixel) mit mehr als 20 Zellen analysiert. Die Zeitserie betrug 240 Aufnahmen/Zyklen á 2 Sekunden. Nach dem 90ten Zyklus (180 s) erfolgte die Stimulation mit 10  $\mu$ M ATP zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumfreisetzung (195). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten, resultierend aus freigesetzten Ca<sup>2+</sup>-Ionen, wurde mit der Zen2012 (blue edition)-Software und dem Modus "Mean ROI" für 10 definierte Bereiche der Zellen pro Aufnahme bestimmt (Abbildung 19). Der Anstieg der Fluoreszenzintensität bestimmt die Kalziumdynamik in den Zellen.

### **5.6. Analyse der Kalziummessung**

Um die intrazelluläre basale Kalziumkonzentration in den adhärennten Osteoblasten auf den Oberflächen zu bestätigen, erfolgte eine Kalziummessung am Durchflusszytometer FACSCalibur. Für diesen Ansatz wurden  $\sim 8 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den mikrostrukturierten und den glatten Oberflächen ausgesät, für 24 h kultiviert und

anschließend trypsiniert. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min, 1414 rpm). Das Pellet wurde in 1 ml HEPES-Puffer-I resuspendiert. Um die Zellen für die Kalziummessung zu beladen, wurden zu den in HEPES-Puffer suspendierten Zellen 5  $\mu$ l Fluo3/AM ( $\cong$  5  $\mu$ M) zugegeben. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 37 °C leicht schwenkend auf dem Schüttler wurde die Kalziumkonzentration in den entsprechenden Zellsuspensionen sofort am FACSCalibur quantifiziert. Die Messung und Auswertung am Durchflusszytometer erfolgte mit dem Argon-Laser und der Software CellQuest Pro 4.0.1. Die Ergebnisse werden als quantitativer Wert (relativer mean channel) der Fluoreszenzintensität dargestellt.

## 6. Proteinexpression

Zur zeitabhängigen Analyse (10 min, 30 min, 1 h, 3 h und 24 h) phosphorylierter Signalproteine des MAPK- (MEK1, ERK1/2, p38-MAPK<sup>32</sup>), des AKT- (AKT, GSK3 $\alpha/\beta$ <sup>33</sup>) und des inflammatorischen Signalweges (IkB- $\alpha$ <sup>34</sup>) in den Osteoblasten in Abhängigkeit von einer definierten Mikropostenstruktur wurde das Bio-Plex® System eingesetzt. Aufgrund der geringen Proteinmengen, angesichts der Aussaat auf den kleinen Materialoberflächen, hat sich die Methode außerordentlich bewährt. Es können simultan mehrere verschiedene phosphorylierte Proteine mit einer relativ kleinen Proteinkonzentration von etwa 500  $\mu$ g/ml nachgewiesen und quantifiziert werden.

### 6.1. Prinzip des Bio-Plex® Systems

Das Bio-Plex® System ist eine Luminex xMAP™-Technologie, eine auf Bead basierte Multiplex-Analyse. Beim Bio-Plex Assay wird ein Antikörper gegen das Zielprotein gerichtet. Dieser Antikörper ist kovalent an  $\sim$ 5,5  $\mu$ m große Beads aus Polystyrol gebunden. Diese Beads sind zu verschiedenen Verhältnissen mit zwei Fluorophoren gefüllt, welche eine Variation in den emittierten Spektren erzeugen und somit eine Differenzierung in 100 verschiedene Elemente ermöglichen. Diese Beads tragen eine für das Protein spezifische rote Farbkodierung. Durch Zugabe eines zweiten Detektionsantikörpers, der an ein weiteres Epitop des Zielproteins bindet, kann der fluoreszierende Reporter (Streptavidin-Pycoerythen (PE)) koppeln, welcher spezifisch für die quantitative Phosphorylierung ist. Die Detektion erfolgt in der Analysestation

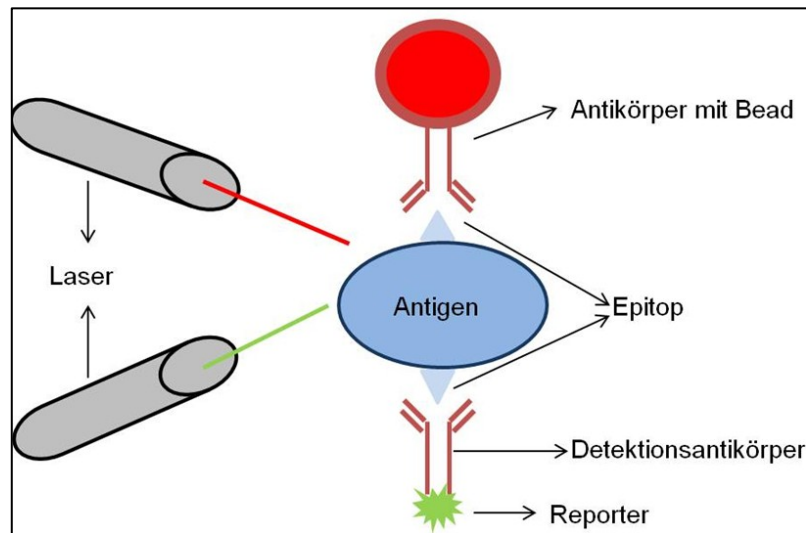
---

<sup>32</sup> MAPK: Mitogen-aktivierte Protein-Kinase; MEK1: MAPK/ERK Kinase 1; ERK: Extracellular-signal Regulated Kinase

<sup>33</sup> AKT: Proteinkinase B; GSK: Glykogen Synthase Kinase 3

<sup>34</sup> Inhibitor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells-alpha

des Bio-Plex 200-Systems, welches aus einer Durchflusszelle und zwei Lasern besteht. Die Fluorophore werden nun durch die zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt. Durch die Anregung der Beads mit dem ersten Laser bei 635 nm kann das jeweilige Protein identifiziert werden. Über den zweiten Laser bei 523 nm wird der grüne Farbstoff angeregt und so kann die Intensität des emittierten Lichtes bestimmt werden, die proportional zur Menge des Zielproteins ist (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Prinzip des Bio-Plex-Phosphoprotein-Assays. Die verwendeten rot fluoreszierenden Beads sind an einem Antikörper gekoppelt, welcher im ersten Schritt an das Zielprotein bindet. Anschließend bindet ein zweiter Detektionsantikörper an ein weiteres Epitop des Proteins, an dem der grün fluoreszierende Reporter koppeln kann. Die Detektion erfolgt über ein System aus 2 Lasern (635 nm und 523 nm).

Zur Untersuchung der Phosphorylierung von Signalproteinen wurde das Bio-Plex 200 Array-System von Bio-Rad verwendet. Das Multiplex-Array System ist ausgestattet mit einem Reader bestehend aus zwei Lasern, einer Mikroplatten-Plattform und einer Probennadel. Die Auswertung am PC wurde mit der Software Bio-Plex® Manager™ 4.1.1. vorgenommen. Die für die Durchführung notwendigen Lösungen und Materialien stammten aus dem Bio-Plex-Phosphoprotein Kit der Firma Bio-Rad.

## **6.2. Bio-Plex® Phosphoprotein-Assay**

Die Herstellung von Proteinlysaten der Zelllinie MG-63 erfolgte nach Aussaat von  $\sim 4 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und einer Inkubation für die Zeiträume 10 min, 30 min, 1 h, 3 h und 24 h auf den Oberflächen. Nach der Kultivierung wurden die Probenkörper umgedreht mit der zu lysierenden Zellseite nach unten in 100 µl kalten Lysepuffer für 30 min schwenkend auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit dem

Zellschaber von den Oberflächen entfernt und in Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurden die Zelllysate im Eppendorf-Gefäß mit Ultraschall behandelt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 4 °C (1414 rpm) wurden die Proteinlysate bei -20 °C gelagert. Identische Gesamtproteinkonzentrationen wurden für die Expressionsanalyse eingesetzt. Mit Hilfe einer Coomassie<sup>35</sup>-Färbung des Polyacrylamid-Gel nach der SDS<sup>36</sup>-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), bei der die Proteine nach der Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden, konnte die gleichmäßige Beladung mit Proteinen gesichert werden.

Im ersten Schritt des Bio-Plex Phosphoprotein-Assays erfolgte die Vorbereitung der speziellen 96-well Mikrotiterplatte. Diese speziellen Mikrotiterplatten besitzen als Boden eine Teflonmembran mit einer Porengröße von ~1,2 µm, damit die Lösungen aus den Wells während der Waschschrte von unten mit Vakuum abgesaugt werden können, aber die Beads erhalten bleiben. Die Benetzung der Membran der 96-well Mikrotiterplatte erfolgte in einem Waschschrte bestehend aus Spülung mit Waschpuffer und anschließendem Absaugen mittels Vakuum. Die Suspension der mit Antikörper gekoppelten Beads wurde durch kurzes vortexen homogenisiert und 50 µl in jedes Well gegeben. Nachdem die Wells mit Vakuum abgesaugt wurden, schlossen sich zwei Waschschrte an. Nach der Zugabe von 25 µl Assaypuffer wurden die Zelllysate gemischt und in jedes Well 25 µl hinzugefügt. Als Kontrollen wurden von Bio-Rad mitgelieferte speziell behandelte Zelllysate (z. B. unbehandelte oder UV-behandelte HeLa Zellen) mitgeführt, welche einen hohen Anteil der zu untersuchenden phosphorylierten Proteine aufwiesen. Die Wells ohne Zugabe von Lysaten stellten Leerwerte dar, um unspezifische Färbung der Puffer zu ermitteln. Die Zelllysate wurden zusammen mit den gekoppelten Beads 15 – 18 h inkubiert. Nach Bindung der Beads an das entsprechende Zielprotein wurde eine Reihe von Waschungen durchgeführt, um ungebundene Proteine zu eliminieren. Im Anschluss wurden die vorbereiteten Detektionsantikörper zugegeben und die Proben für mindestens 30 min inkubiert. Nach drei Waschschrten erfolgte eine 10-minütige Inkubation lichtgeschützt von jeweils 50 µl der Streptavidin PE-Suspension. Danach wurden drei Waschschrte mit je 100 µl Resuspensionspuffer durchgeführt und die Proben abschließend in 125 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Die Messung der Proteine erfolgte mit dem Bio-Plex-System mit Hilfe der Bio-Plex Manager™ 4.1.1 Software, die die Fluoreszenzsignale für jedes Bead/Protein gleichzeitig verarbeitet und die relative Mean Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt (196). Die MFI der ermittelten phosphorylierten

---

<sup>35</sup> Triphenylmethanfarbstoff: Coomassie Brilliant Blue G-250

<sup>36</sup> vom englischen: sodium dodecyl sulfate

Signalproteine wurden abzüglich des Leerwertes (Ansatz ohne Proteinlysate) berechnet. Die ermittelten Daten wurden anschließend in ein Microsoft EXCEL<sup>37</sup> Datenblatt transferiert.

## 7. Statistische Auswertung

Bei den zellbiologischen Ansätzen wurde immer auf adäquate Kontrollen geachtet, um die zellulären Reaktionen und damit die Interaktion der Zellen mit dem Biomaterial *in vitro* richtig einschätzen zu können. Die glatten Kontrolloberflächen bestanden aus dem gleichen chemischen Ausgangsmaterial ohne physikalische Mikrotopographie. Die Experimente wurden jeweils unabhängig mindestens dreimal wiederholt und ergaben gleichwertige Ergebnisse. Bei jedem Versuchsansatz wurde eine andere Passage der Osteoblasten verwendet. Für die Datenauswertung wurde Microsoft Office EXCEL 2007, sowie das Statistikprogramm SPSS Version 15.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet.

Aus den Versuchswerten wurden in EXCEL Mittelwert mit Standardabweichung (SD) oder Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet.

Vor der Durchführung der parametrischen Testverfahren in SPSS wurden die Werte auf Normalverteilung mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Anpassungstest (K-S Test) überprüft. Lag eine Normalverteilung  $p > 0,1$  zwischen den Gruppen vor konnten weitere parametrische Tests durchgeführt werden (197). Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte wurde die parametrische Testmethoden T-Test für ungepaarte oder für gepaarte Stichproben verwendet. Bei einer unbekannten Verteilung und unabhängigen Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $*p < 0,05$  angenommen.

Im anschließenden Ergebnisteil wird für jeden Versuch jeweils der Stichprobenumfang (n), Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) oder Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und das ermittelte Signifikanzniveau (p) mit dem dazugehörigen Testverfahren angegeben.

---

<sup>37</sup> Microsoft Office 2003-2007, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

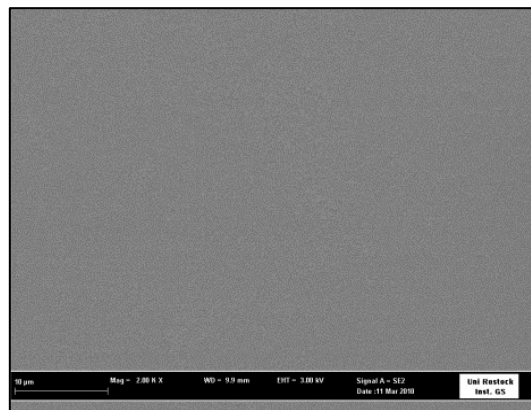
## IV. Ergebnisse

### 1. Charakterisierung der Materialien

#### 1.1. Oberflächencharakterisierung

Analysiert wurde das biologische Verhalten der Osteoblasten wachsend auf einer regelmäßigen kubischen Topographie im Mikrometerbereich im Vergleich zu einer glatten Referenzoberfläche. Die Begutachtung der titanbeschichteten Oberflächen erfolgte unter standardisierten Bedingungen am FE-SEM SUPRA25 (Carl Zeiss) durch Frau Dipl.-Ing. R. Lange<sup>38</sup>. Es wurden Aufnahmen in primär 2.000- und 10.000-facher Vergrößerung in einem 30°-Winkel angefertigt (Abbildungsmaßstäbe sind eingezeichnet).

Die Abbildung 22 zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der planaren Referenzoberfläche (Ref) bei der eine relativ glatte Oberfläche mit gleichmäßiger Titanbeschichtung am FE-SEM ersichtlich ist.



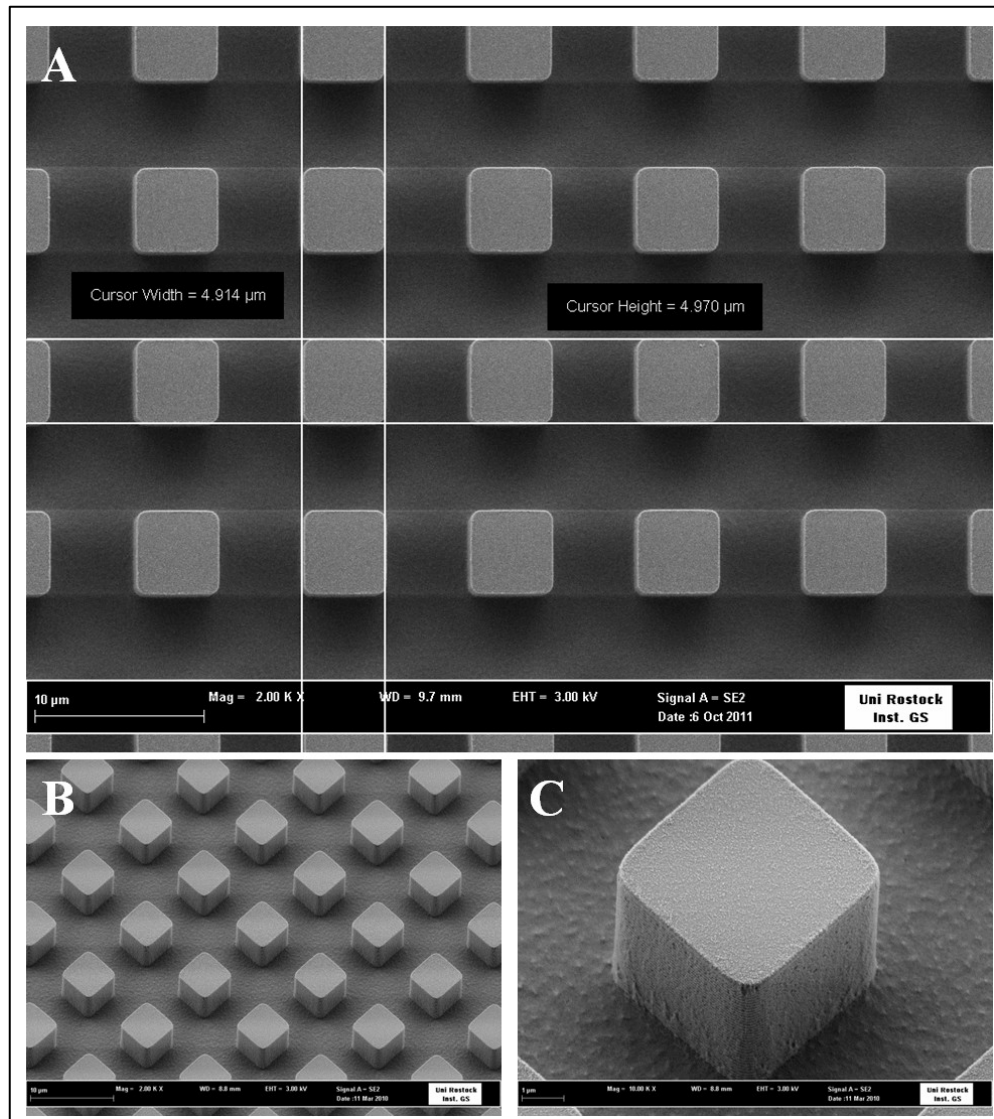
**Abbildung 22:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der glatten Referenzstruktur (Ref). (Vergrößerung 2.000x, Bar = 10 µm) (FE-SEM SUPRA25, Carl Zeiss).

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der definierten Mikropfostenstruktur mit einem Abstand, einer Breite, einer Länge und einer Höhe von 5 µm (P-5x5) (Abbildung 23 A-C) zeigen eine Anordnung von gleich weit entfernten quadratischen Pfosten mit vertikalen Seitenwänden auf der Oberfläche. In der Abbildung 23 (A) wurden die Pfosten ausgemessen und eine Länge von 4,970 µm, sowie Breite von 4,914 µm quantifiziert. Die Abmessungen der resultierenden Strukturen stimmen mit

---

<sup>38</sup> aus der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik

den gewünschten Dimensionen von  $5\text{ }\mu\text{m}$  überein. In der Nahaufnahme eines Mikropostens (Abbildung 23 (C)) sind scharfe Kanten und leicht abgerundete Ecken, sowie die steilen Seitenwände gut ersichtlich.



**Abbildung 23:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Mikropostenprofils (P-5x5): (A) Übersicht mit Abmessungen zur Analyse der Dimensionen (Vergrößerung 2.000x, Bar =  $10\text{ }\mu\text{m}$ ); (B) räumliche Übersicht (Vergrößerung 2.000x, Bar =  $10\text{ }\mu\text{m}$ ,  $30^\circ$ ); (C) Nahaufnahme einer einzelnen Pfostenstruktur. (Vergrößerung 10.000x, Bar =  $1\text{ }\mu\text{m}$ ,  $30^\circ$ ) (FE-SEM SUPRA25, Carl Zeiss).

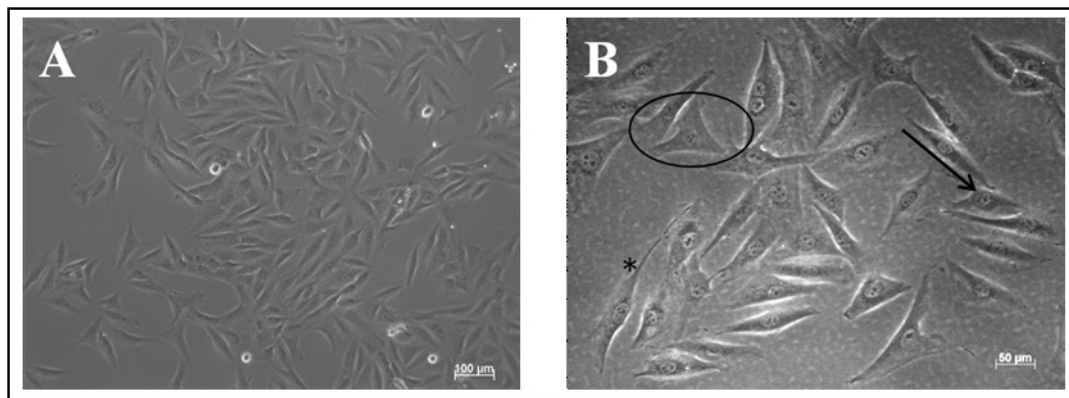
## 1.2. Phänotypische Charakterisierung der humanen Osteoblasten

Mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Axiovert25, Carl Zeiss) wurden das Wachstum und der Phänotyp der adhärennten MG-63 Osteoblasten in den Zellkulturflaschen charakterisiert. Es wurden Aufnahmen mit der AxioCam und der



SoftwareAxioVision<sup>39</sup> in 10- und 20-facher Vergrößerung angefertigt (Abbildungsmaßstäbe sind eingezeichnet).

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 24 ist ersichtlich, dass die MG-63 Zellen eine für Osteoblasten-Monolagekulturen typische polygonale Morphologie aufweisen. Die Zellen haben eine spindelförmige (Abbildung 24 (B Pfeil)) bis trianguläre (Abbildung 24 (B Oval)) Form von ca. 50-100 µm an deren Enden sich längliche Ausläufer (Abbildung 24 (B \*)) ausbilden. Der Zellkern der Osteoblasten liegt zentral und weist einen im Verhältnis zur Gesamtzellgröße großen Zellkern auf (Abbildung 24 (B)). Die Übersichtsaufnahme in Abbildung 24 (A) zeigt die Osteoblasten in einem subkonfluenten Zustand, bei dem der Zell-Zellverband an einigen Stellen noch Lücken aufweist. In diesem Zustand erfolgte die Aussaat für die zellbiologischen Versuche.



**Abbildung 24:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen subkonfluenter humaner Osteoblasten MG-63 in Kultur: (A) Übersichtsaufnahme (10x-Objektiv, Bar = 100 µm), (B) Detailaufnahme mit länglichen Zellen (Pfeil), triangulären Zellen (Oval) und Zellausläufern (\*). (20x-Objektiv, Bar = 50 µm, Axiovert 25, Carl Zeiss).

## 2. Zellarchitektur

### 2.1. Zellmorphologie

Zur Untersuchung der Zell-Material-Interaktion erlauben die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eine detaillierte Darstellung und Analyse der Veränderung der Morphologie, Form und Gestalt, der Osteoblasten auf den Mikropfosten im Vergleich zur glatten Referenzoberfläche. Die untersuchten Präparate wurden unter standardisierten Bedingungen in Kooperation mit Herrn Dipl.-Phys.

---

<sup>39</sup> Axio40V 4.8.2 SP2 (2006-2012), MicroImaging GmbH Carl Zeiss, Oberkochen

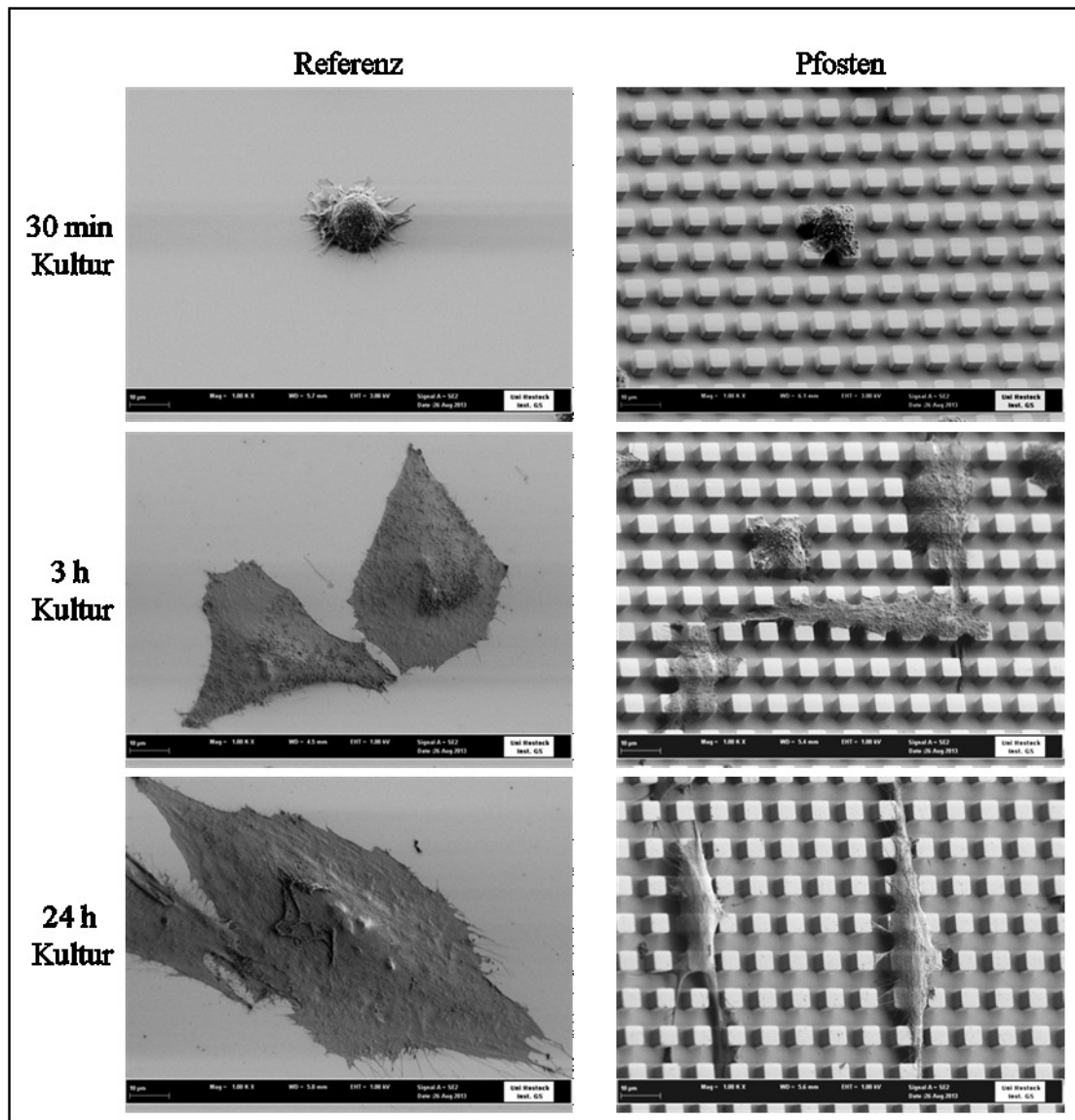
Andreas Körtge<sup>40</sup> am FE-SEM SUPRA25 (Carl Zeiss) betrachtet. Es wurden morphologische Aufnahmen in primär 500-, 1.000- und 5.000-facher Vergrößerung mit 1 kV und gekippt im 30 °-Winkel angefertigt (Abbildungsmaßstäbe sind eingezeichnet). Die FE-SEM Bilder zeigen Unterschiede in der Zellmorphologie von adhärenenten MG-63 Osteoblasten auf der geometrisch strukturierten Titanoberfläche im Vergleich zu der planaren Titanreferenz. In der Abbildung 25 ist die angepasste Zellmorphologie auf den Mikropfostenstrukturen (rechte Spalte) nach 30 min, 3 h und 24 h Zellkultur vergleichend zur planaren Referenzoberfläche (linke Spalte) dargestellt.

Kurz nach der Besiedelung der Materialoberfläche beginnen die Zellen sich auszubreiten und bilden flache Ausläufer (Lamellipodien), um einen Kontakt mit der Oberfläche herzustellen. Nach einem Kultivierungszeitraum von 30 min (Abbildung 25, erste Reihe) sind erste Veränderungen in der Morphologie der Osteoblasten in Abhängigkeit von der Topographie erkennbar. Die Zellen auf der glatten Referenzoberfläche sind etwas ausgebreiteter und bilden viele flache Ausläufer, sowie kleine längliche fadenförmige Ausstülpungen (Filopodien) aus. Auf den Pfosten hingegen erscheint die Zelle kleiner und kugelig in ihrem Phänotyp und adhäriert mit den kleinen flachen Zellausläufern nur oberhalb der Pfostenstruktur.

Diese anfänglichen morphologischen Differenzen werden nach 3 h Kultur (Abbildung 25, zweite Reihe) noch deutlicher. Die Zellkörper der Osteoblasten auf der Referenzoberfläche sind groß und sehr flach, während die Osteoblasten auf der Mikropfostenstruktur einen kleineren Zellkörper ausbilden und vereinzelt noch einen kugeligen Phänotyp aufweisen. Außerdem ist ersichtlich, dass die Osteoblasten oberhalb der Mikropfostenstruktur adhären und sich daran ausrichten, sowie strecken. Diese Unterschiede in der Zellmorphologie sind auch nach 24 h Kultivierung noch vorhanden (Abbildung 25, dritte Reihe). Auf der planaren Referenzoberfläche ist ein abgeflachter ausgebreiteter Phänotyp ohne bevorzugte Ausrichtung nachweisbar. Der komplette Zellkörper adhäriert auf der unterliegenden Titanoberfläche. Im Gegensatz dazu kann beobachtet werden, dass die Zellen auf der Pfostenstruktur ihre Morphologie und Zelldimension der Struktur anpassen. Die Zellen weisen wesentlich kleinere Zellkörper auf, die sich ausschließlich auf den Mikrostrukturen befinden. Des Weiteren ist eine gestreckte Zellmorphologie mit langen zellulären Ausläufern mit einer Orientierung entlang der Struktur erkennbar (Kontaktführung).

---

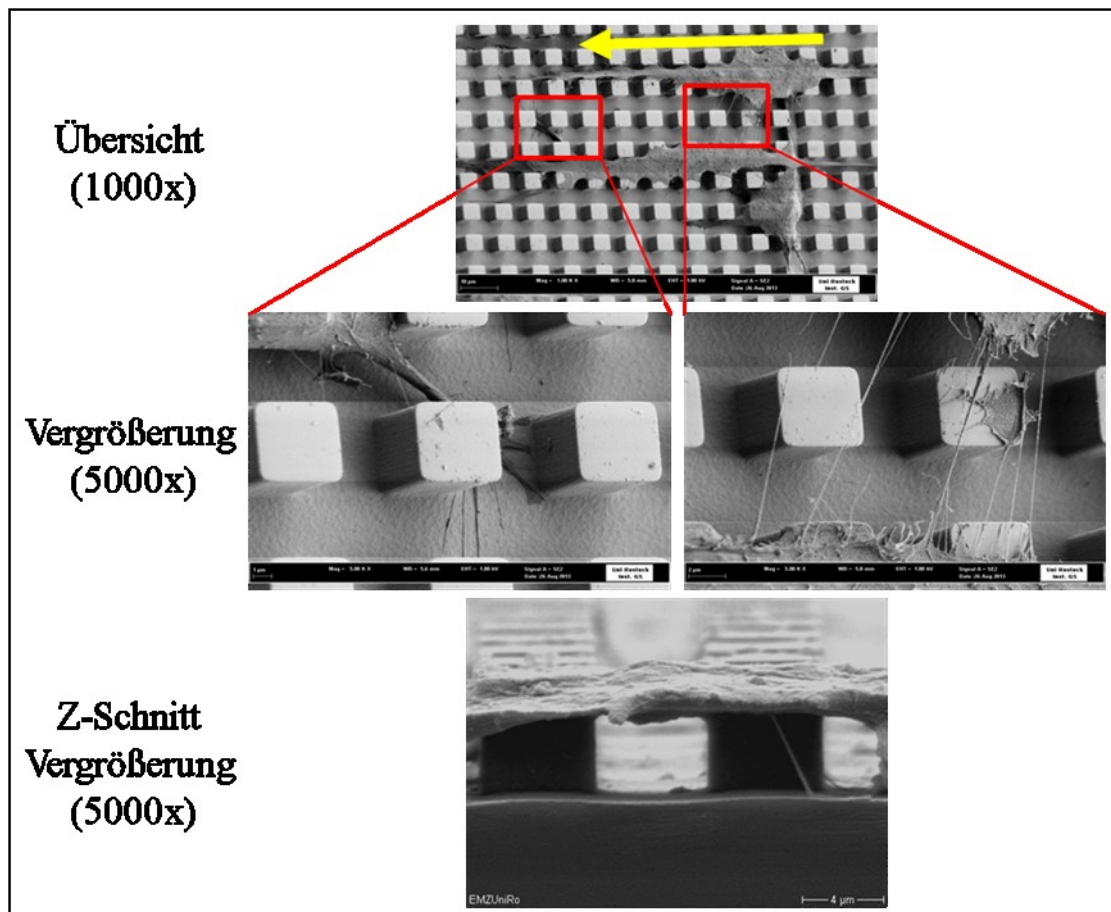
<sup>40</sup> Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, welisa-Stipendiat



**Abbildung 25:** FE-SEM Aufnahmen von MG-63 Osteoblasten auf den Oberflächen: die glatte Referenz (linke Spalte) und die Mikropfostenstruktur (rechte Spalte). Im Laufe der Kultivierung: (erste Reihe) nach 30 min, (zweite Reihe) nach 3 h und (dritte Reihe) nach 24 h wird deutlich, dass die Zellen auf der glatten Oberflächen flach auf der Oberfläche aufliegen. Die Zellen auf der Mikrostruktur adhären langgestreckt auf den Pfosten und nur die Ausläufer stellen Kontakt zu dem Untergrund her. (Vergrößerung 1.000x, Bar = 10 µm, 30°, FE-SEM SUPRA25, Carl Zeiss).

Detailliertere Aufnahmen der Osteoblasten auf der quadratischen Mikrostruktur nach 24 h sind in der Abbildung 26 dargestellt. In der obersten rasterelektronmikroskopischen Übersichtsaufnahme wird deutlich, dass die Zelladhäsion nur auf den Plateaus der Pfosten stattfindet. Des Weiteren ist die topographisch induzierte Zellausrichtung zu erkennen. Die Osteoblasten passen ihre Morphologie der Mikrostruktur an und richten sich in Abhängigkeit von der Oberflächengeometrie aus. Die Streckung und Orientierung der Osteoblasten entlang

der Pfostenstruktur in einem 45 °- und 90 °-Winkel ist ersichtlich (Pfeil) (178). In den detaillierten Aufnahmen in der Abbildung 26 (zweite Reihe) sind die Zellausläufer stark vergrößert dargestellt. Die Filopodien können sich über die Strukturen ausstrecken und überbrücken so die Zwischenräume der Pfosten. Einige der Filopodien legen sich auf oder an die Pfostenecken und -kanten (rechts), während andere Filopodien wiederum bis auf den Boden reichen (links). In der Z-Schnitt Aufnahme am REM DSM 960 (Abbildung 26, dritte Reihe) zeigt sich deutlich, dass die Osteoblasten oberhalb der Mikrostrukturen liegen. Der Zellkörper liegt auf den Pfosten auf und überspannt die Täler. Nur die Zellausläufer an den Enden erreichen den Boden.



**Abbildung 26:** Detaillierte rasterelektronmikroskopische Aufnahmen von Osteoblasten auf der definierten Mikropfostenstruktur nach 24 h. In der Übersicht ist die Ausrichtung der Zellen entlang der Mikrostrukturen ersichtlich (Pfeil). Beachte, dass nur die Filopodien der Osteoblasten den Untergrund erreichen. (Oben: Bar = 10 µm, mittig: Bar = 1 µm, FE-SEM SUPRA25, Carl Zeiss, 30°; unten: Bar = 4 µm, REM DSM 960A, Carl Zeiss).

## **2.2. Aktinzytoskelett**

Der Nachweis des intrazellulären filamentösen Aktins (F-Aktin) erfolgte in den Osteoblasten auf der Mikropfostenstruktur und vergleichend auf der glatten Referenzoberfläche am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. Für die konfokal-

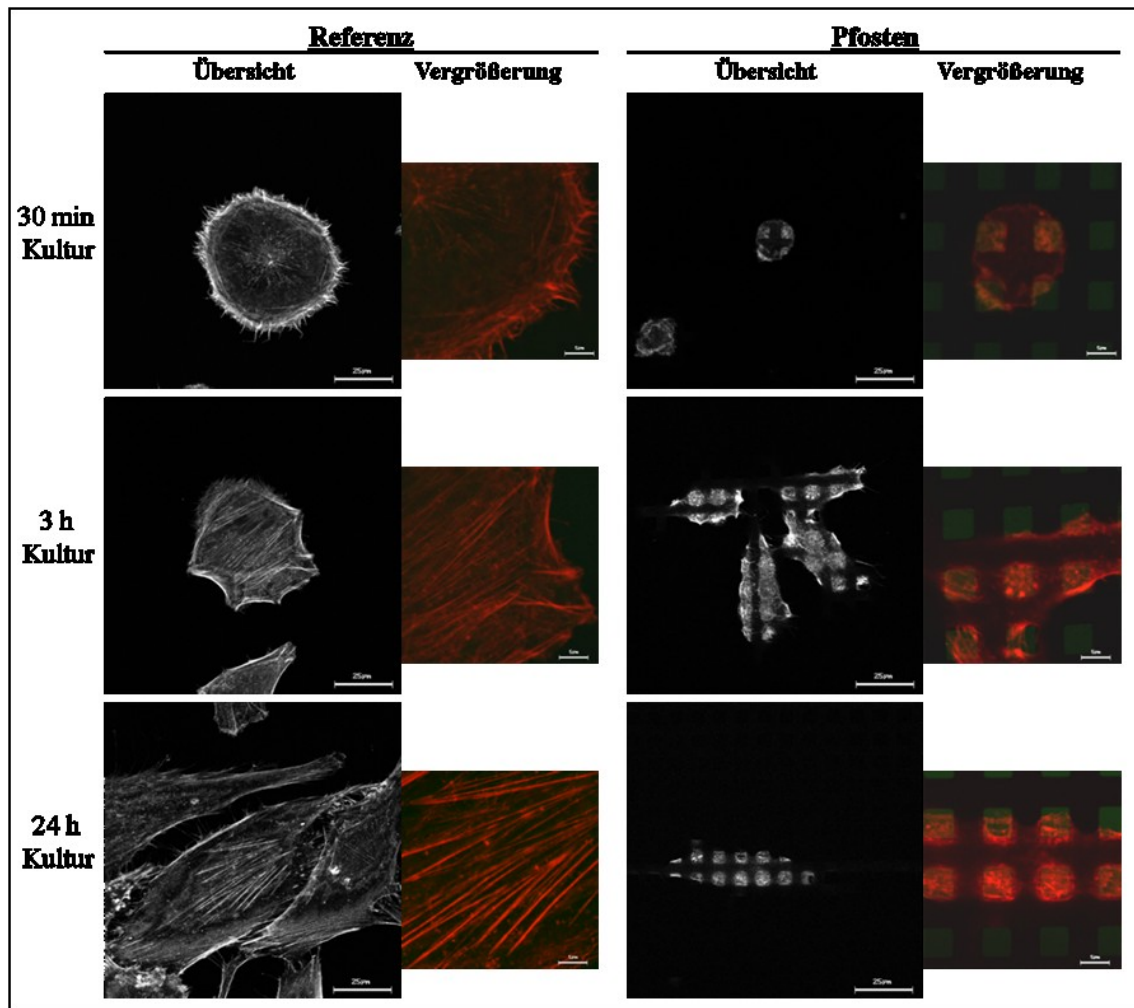
mikroskopischen Aufnahmen wurden Übersichtsaufnahmen, sowie Vergrößerungen mit einem 6- oder 8-fachen Zoom mit dem 63x-Ölobjektiv angefertigt. Um die Lage der Aktinfilamente genauer zu bestimmen, wurden Bilder im Reflexionsmodus mit 2 Lasern generiert: zum einen das Aktinzytoskelett mit dem Helium-Neon Laser bei 543 nm in rot und zum anderen die unterliegende reflektierende Struktur mit dem Argonlaser bei 488 nm in grün (zugeordnete Falschfarbe).

### **2.2.1. Zeitabhängige Organisation des Aktinzytoskeletts**

Um den Zeitpunkt zu erfassen, an dem die Ausbildung der Aktinfilamente nach Adhärenz der Zellen auf den Oberflächen beginnt, wurden die MG-63 Osteoblasten zeitabhängig nach 30 min, 3 h und 24 h untersucht.

In den konfokalmikroskopischen Bildern der Abbildung 27 (erste Reihe) ist die Ausbildung des Aktinzytoskeletts in den Osteoblasten nach 30 min Kultivierung dargestellt. In den noch abgerundeten Zellen auf den planaren Referenzoberflächen sind sowohl dicke, in der Peripherie angeordnete, kortikale Filamente, als auch dünne kleine Aktinfilamente im Zentrum des Zellkörpers nachweisbar. Im Gegensatz dazu beginnt sich bereits nach 30 min auf der Mikrostruktur das Aktinzytoskelett auf dem Pfostenplateau und an den Kanten in den noch kugeligen Osteoblasten zu formieren. Ebenso ist eine submembranöse Ring ähnliche Aktinstruktur zu erkennen.

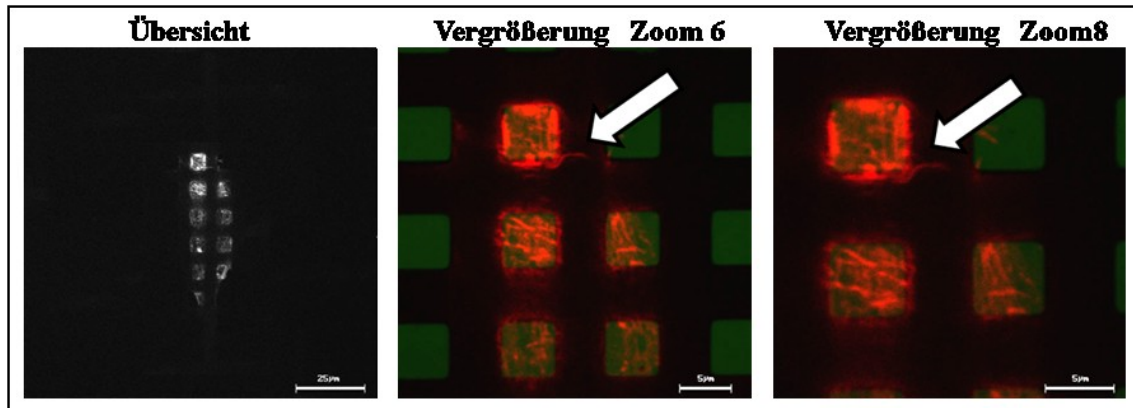
Die zeitabhängige Ausbildung des Aktinzytoskeletts nach 3 h ist in der Abbildung 27 (zweite Reihe) dargestellt. Auf der glatten Referenzoberfläche sind für die Osteoblasten typische lange Aktin-Stressfasern, die in dem gesamten Zellkörper homogen vorliegen, nachweisbar. Auf der mikrostrukturierten Pfostenoberfläche hingegen akkumuliert sich das Aktin in Form von kurzen Filamenten auf und um die Pfostenstruktur. Nach 24 h (Abbildung 27, dritte Reihe) bildet sich in den Osteoblasten auf der glatten Referenz ein Netzwerk aus starken und langen Stressfasern aus, das typischerweise den gesamten Zellkörper durchspannt. Dagegen wird das Aktin auf den Mikrostrukturen unregelmäßig und in extrem kurzen Filamenten innerhalb der Zelldimension auf den Pfosten sowie an den Kanten und Ecken entwickelt. Zudem ist ein kleinerer Zellkörper ersichtlich, wie auch im Abschnitt 2.1., Zellmorphologie, gezeigt.



**Abbildung 27:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von intrazellulären Aktinfilamenten in Osteoblasten auf glatten Referenzoberflächen (links) vs. mikrostrukturierten Pfostenoberflächen (rechts): nach 30 min, 3 h und 24 h Zellkultur in Kompletmedium. Das Aktinzytoskelett auf der Referenzoberfläche ist nach 3 h durch lange Stressfasern gekennzeichnet, die die komplette Zelle durchspannen. Im Gegensatz dazu organisiert sich das Aktin ab einer Kultivierungszeit von 30 min in kurzen Fragmenten auf und um die Pfostenstrukturen. (Übersichtsaufnahmen, Bar = 25  $\mu\text{m}$ ; Zoom 6x-Vergrößerungen, Bar = 5  $\mu\text{m}$ , rot = TRITC-markiertes Aktin,) (LSM410, Carl Zeiss; 63x Öl-Immersionsobjektiv, Carl Zeiss).

Durch den Einfluss der Mikropfostenstrukturen kommt es zu einer dramatischen Veränderung in der Aktinformation. Die Immunfluoreszenzfärbung des F-Aktins nach 24 h zur Beurteilung des Aktinzytoskeletts unter Struktureinfluss ist in Abbildung 28 in unterschiedlichen Vergrößerungen noch einmal zur Verdeutlichung dargestellt. In den konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich deutlich, dass die Osteoblasten auf der Mikrostruktur nicht mehr in der Lage sind, das Aktinzytoskelett in langen Stressfasern auszubilden. Die Re-Organisation des Zytoskeletts mit einer starken Anreicherung von fragmentierten Aktinfilamenten erfolgt auf dem Pfosten und an den Kanten, welche die unterliegende Pfostenstrukturierung reflektiert. In den beiden Vergrößerungen sind die kurzen Aktinfragmente, die sich irregulär lokal auf dem Plateau und an den Kanten der

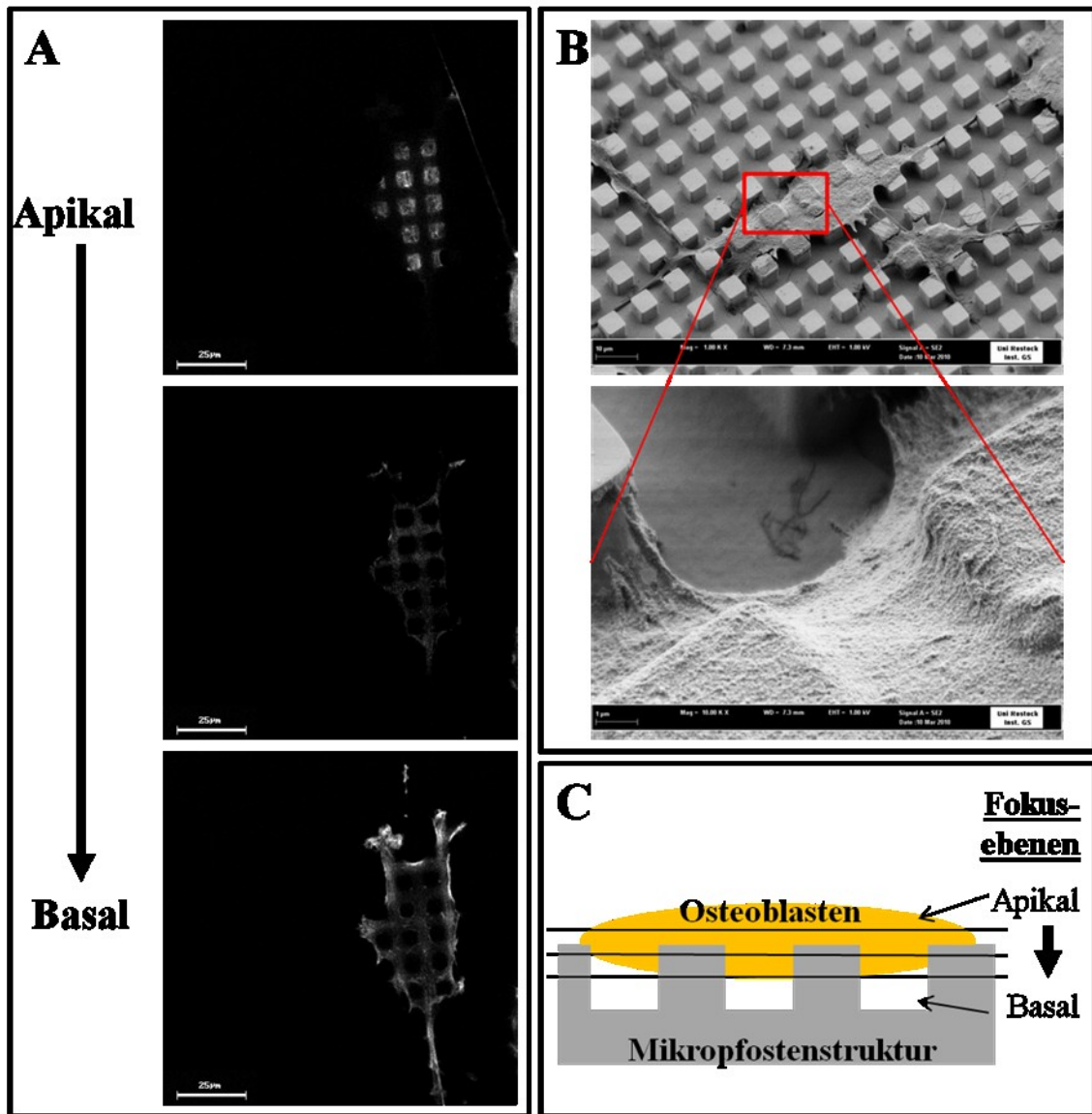
Pfosten akkumulieren, deutlich nachweisbar (Pfeil). Das Aktin scheint die unterliegende Oberflächentopographie nachzugestalten („Mimikry“).



**Abbildung 28:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von intrazellulären Aktinfilament-Strukturen in MG-63 nach 24 h mit DMEM und 10 % FCS auf 5x5 µm-Pfostenstrukturen. Das Aktinzytoskelett ist lokal konzentriert in kurzen Filamenten auf der Pfostenstruktur (Pfeil) innerhalb der Zelldimension angeordnet („Mimikry“). (Übersichtsaufnahmen, Bar = 25 µm; Zoom 6x- und Zoom 8x-Vergrößerungen, Bar = 5 µm, rot = TRITC-markiertes Aktin, grün = Reflexion der Oberflächenstruktur; LSM410, Carl Zeiss; 63x Öl-Immersionsobjektiv, Carl Zeiss).

Zur Validierung der angepassten Organisation des Aktinzytoskeletts in kurzen Filamenten nur auf dem Pfostenplateau wurden mehrere horizontale Schnitte (Z-Stapel) durch die Zelle angefertigt, um zu beweisen, dass nicht nur durch die Konfokalebene des LSM bedingt die Aktinfilamente so kurz erscheinen. In der Abbildung 29 (A) veranschaulichen exemplarische Querschnitte die Verteilung des F-Aktins in der Zelle von der oberen (apikal) bis zur unteren (basal) Ebene (Abbildung 29 (C)). Die exemplarischen Aufnahmen zeigen, dass in der apikalen Ebene über den Pfosten die Ausbildung des Aktinzytoskeletts in kurzen Filamenten vorzufinden ist. In der medianen Ebene sind keine Aktinfasern nachweisbar. In der basalen Aufnahme sind längliche kortikale Aktinfasern am Rand und in den Filopodien ersichtlich. In den rasterelektronmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 29 (B)) ist ersichtlich, dass diese Zellareale zwischen den Pfostenbereichen etwas durchhängen. Innerhalb der Zelldimension adaptiert das Aktinzytoskelett der Osteoblasten („Mimikry“), durch Fragmentierung der Filamente in kurze Fasern, die darunterliegende Pfostenstruktur.





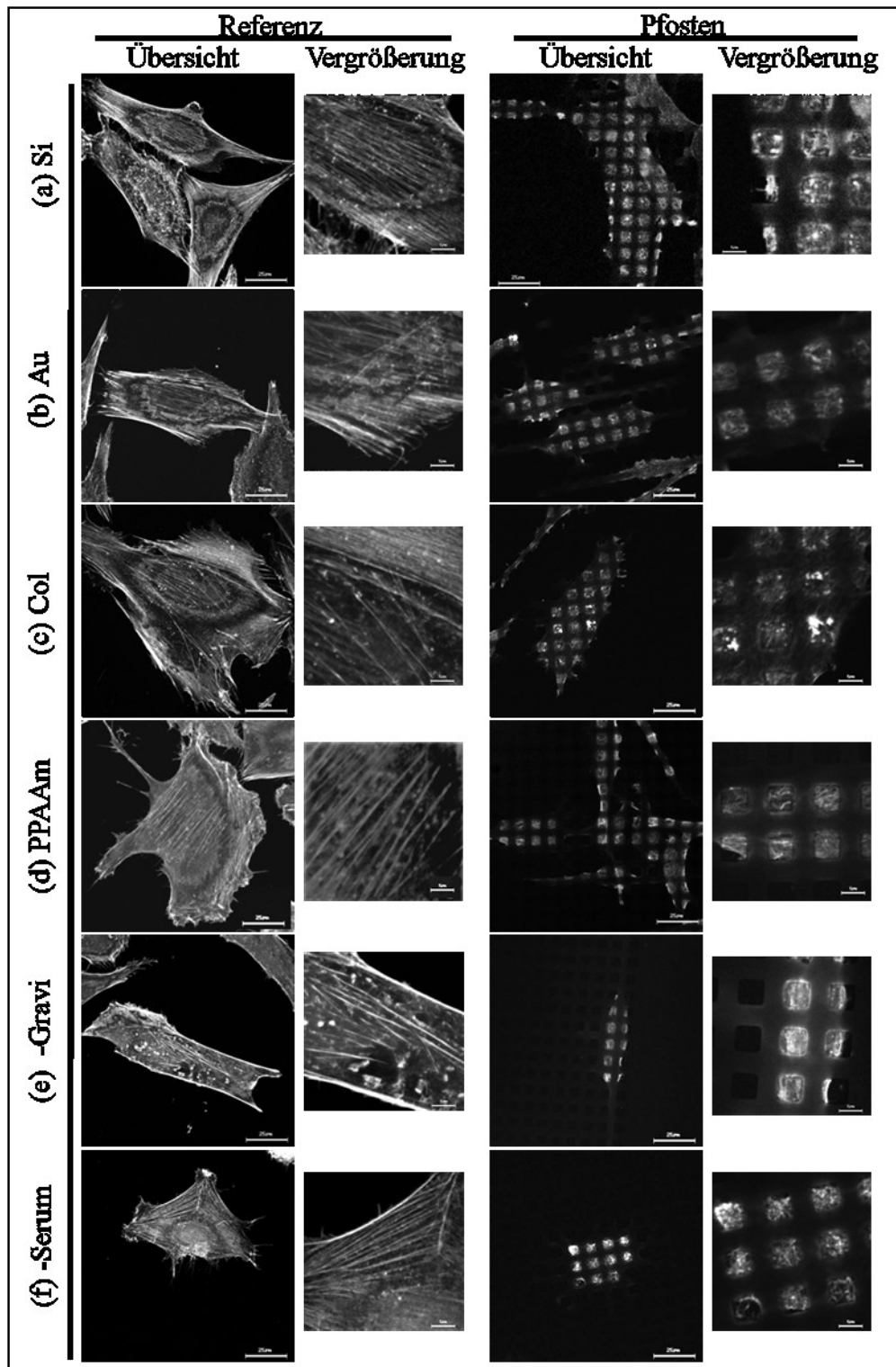
**Abbildung 29:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines Z-Stapels der Aktinfilamente der Osteoblasten auf Mikropfostenstrukturen nach 24 Kultur im Komplettmedium (A). Erst in der basalen Ebene findet man kortikales Aktin in der Randzone, welches auch längere Filamente bilden kann. Diese Zellbereiche sind nicht mehr im Pfostenbereich, wie im FE-SEM ersichtlich (B). (A: LSM-Übersichtsaufnahmen, Bar = 25 µm, LSM410, Carl Zeiss; 63x Öl-Immersionsobjektiv, Carl Zeiss; B: FE-SEM-Aufnahmen, Vergrößerung 1.000x, Bar = 10 µm (oben), Vergrößerung 5.000x, Bar = 1 µm (unten), FE-SEM SUPRA25, Carl Zeiss, 30°; C: Schema der Fokusebenen).



### **2.2.2. Externe Einflüsse auf die Ausprägung des Aktinzytoskeletts**

Für die weitere Analyse der Aktinzytoskelett Re-Organisation nach 24-stündiger Kultivierung auf Mikropostenstrukturen wurden mögliche externe zellbiologische als auch physiko-chemische Einflussparameter modifiziert: reines Silizium, (Si) goldbeschichtete Oberfläche (Au), Si-Ti Oberfläche mit Kollagen-Typ I-Beschichtung (Col), Si-Ti Oberfläche mit plasmapolymersiertem Allylamin (PPAAm) sowie Kultivierung entgegen der Schwerkraft (d.h. mit dem Zellrasen nach unten) (-Gravi) und Kultur ohne das Fibronektin enthaltende Serum (-Serum) (siehe auch Abbildung 16).

In Abbildung 30 sind die konfokalmikroskopischen Aufnahmen des Aktinzytoskeletts der Osteoblasten dargestellt, die zum einen auf der glatten Referenzoberfläche (links) und zum anderen auf der Mikropostenstruktur (rechts) unter den diversen Modifikationen adhärirten. In den Immunfluoreszenzanalysen wird ersichtlich, dass auf der Mikrostruktur die Organisation des filamentösen Aktins in den MG-63 Zellen in allen Modifikationen beeinflusst ist. Auf der glatten Referenzoberfläche bilden die Zellen ein gut definiertes Aktinnetzwerk mit langen zelldurchspannenden Stressfasern aus. Dagegen erfolgt auf der Mikrostruktur die Ausbildung des Aktins der Osteoblasten in Anpassung an die Topographie, in Form von kurzen Fragmenten auf und um den Pfosten.



**Abbildung 30:** Organisation des Aktinzytoskeletts von Osteoblasten nach 24 h auf chemisch funktionalisierten Mikropfosten sowie unter modifizierten Kultivierungsbedingungen: (a) auf Si-Oberflächen, (b) Si-Prüfkörper mit 100 nm Gold, (c) Si-Ti mit einer Kollagen I-Beschichtung versus (d) mit einer PPAAm-Beschichtung, (e) entgegen der Schwerkraft kultiviert und (f) ohne Serum kultiviert. Bei allen Modifikationen ist die Fragmentierung des Aktinzytoskeletts auf den Pfosten deutlich nachweisbar und somit nicht von der Oberflächenchemie und nicht von der Gravitation abhängig. (Übersichtsaufnahmen, Bar = 25 µm; Zoom 6x-Vergrößerungen, Bar = 5 µm; LSM410, Carl Zeiss; 63x Öl-Immersionsobjektiv, Carl Zeiss).

### 3. Signaltransduktion

#### 3.1. Signalwege

Die Untersuchungen zur Zell-Material-Interaktion beinhalteten Analysen biochemischer Events bei der Signaltransduktion. Zur zeitabhängigen Untersuchung phosphorylierter Signalproteine des MAPK<sup>41</sup>-, des AKT<sup>42</sup>-, sowie des inflammatorischen Signalweges wurde das Bio-Plex System eingesetzt. Die quantitative Auswertung der aktivierten Proteine nach 10 min, 30 min, 1 h, 3 h und 24 h in den humanen Osteoblasten wurde mit der Software Bio-Plex® Manager™ 4.1.1. vorgenommen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus 6 unabhängigen Versuchen wurde abzüglich MFI des Leerwertes berechnet.

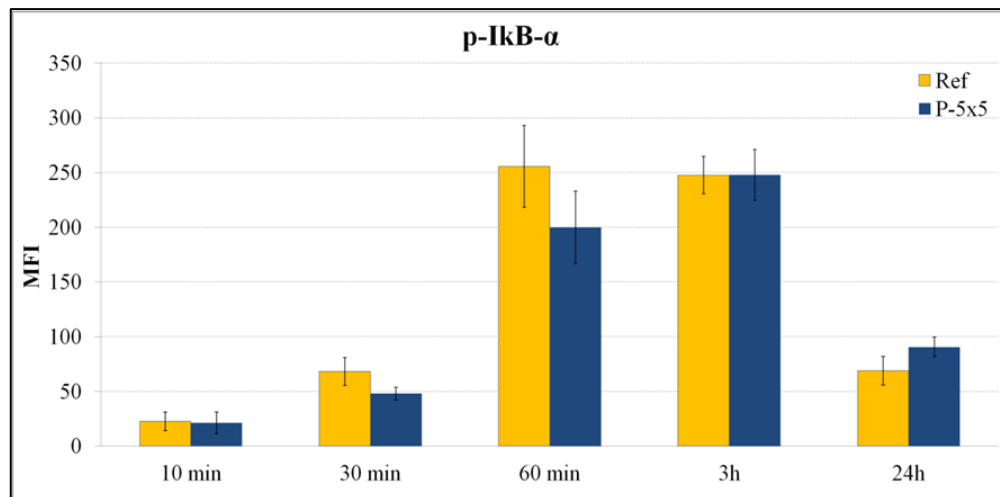
In der Abbildung 31 ist die zeitabhängige Expression des phosphorylierten IκB<sup>43</sup>-α (Ser<sup>32</sup>/Ser<sup>36</sup>), ein Signalprotein des inflammatorischen Signalweges, dargestellt. In Bezug auf den Struktureinfluss ist kein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Das Niveau aktivierter Proteine ist auf beiden Oberflächen über die Zeit ähnlich. Eine zeitliche Dynamik der phosphorylierten Proteine ist dafür auf beiden Oberflächen gleichermaßen zu beobachten. Es zeigt sich in dem Zeitraum von 1 h – 3 h ein Anstieg an exprimierten phosphorylierten Proteinen. Nach 24 h sinkt das Niveau aktivierter Proteinen wieder ab.

---

<sup>41</sup> Mitogen-aktivierte Protein-Kinase

<sup>42</sup> Serin/Threoninkinasen, auch bekannt als Proteinkinase B

<sup>43</sup> nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

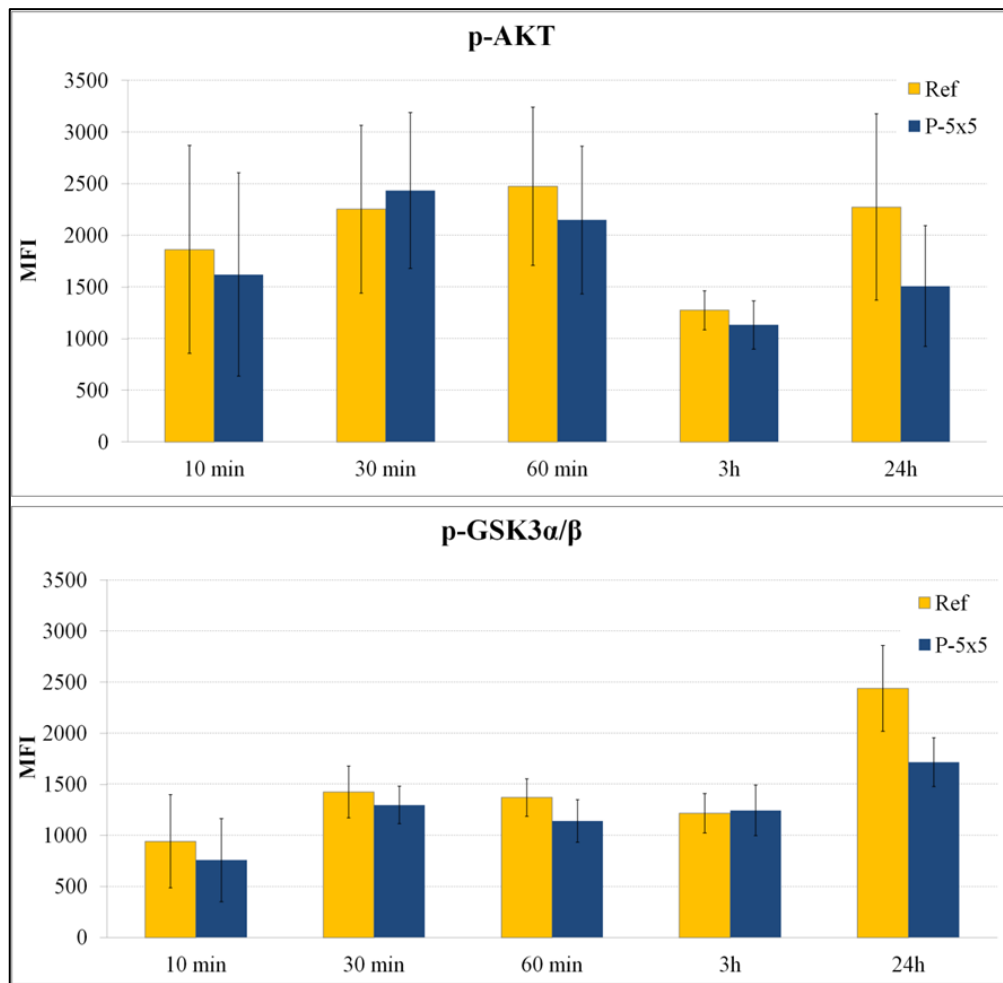


**Abbildung 31:** Zeitabhängige Phosphorylierung von IkB- $\alpha$  (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor,  $\alpha$ ) in MG-63 Zellen auf der strukturierten P5x5-Oberfläche (P-5x5, blau) und der planaren Referenzoberfläche (Ref, gelb). In der Phosphorylierung des Signalproteins ist eine zeitliche Dynamik, aber kein Einfluss der Struktur nachweisbar. (Mittlere Fluoreszenzintensität = MFI, MW  $\pm$  SEM, n = 6, gepaarter T-Test, nicht signifikant; Bio-Plex 200 Array-System).

Die zeitabhängige Expression von Phospho-AKT<sup>44</sup> (Ser<sup>473</sup>) und Phospho-GSK3 $\alpha/\beta$  (Ser<sup>21</sup>/Ser<sup>9</sup>)<sup>45</sup>, Signalproteine des AKT-Signalweges, sind in der Abbildung 32 dargestellt. Auch in Bezug auf die Phosphorylierung dieser Signalproteine in Abhängigkeit von einer Mikrostruktur ist kein Einfluss nachweisbar. Nach 30 min wurden die Signalproteine aktiviert, unabhängig davon auf welcher Topographie die Zellen sich befanden. Nach einer Kultivierung von 3 h ist die Menge an phosphorylierten Proteinen wieder leicht rückläufig. Der Phosphorylierungsvorgang des Signalproteins AKT zeigt diese zeitliche Dynamik deutlicher in den ersten Minuten und Stunden. Nach einer 24 h-Kultur der Osteoblasten auf den Oberflächen kann für beide Signalmoleküle gezeigt werden, dass die Menge an phosphorylierten Proteinen wieder deutlich erhöht vorliegt. Somit ist eine biochemische Interaktion der beiden Vertreter des AKT-Signalweges zeitabhängig, aber nicht strukturabhängig nachweisbar.

<sup>44</sup> Serin/Threoninkinasen, auch bekannt als Proteinkinase B

<sup>45</sup> Glykogen Synthase Kinase 3



**Abbildung 32:** Zeitabhängige Phosphorylierung von Signalproteinen des AKT-Signalweges in Osteoblasten auf Mikropfosten (P-5x5, blau) und der glatten Referenzoberfläche (Ref, gelb): (oben) p-AKT (phosphorylierte Proteinkinase B) und (unten) p-GSK3α/β (phosphorylierte Glykogen Synthase Kinase 3). Es ist eine zeitabhängige Dynamik in der Aktivierung der Signalproteine ersichtlich, aber keine Beeinflussung aufgrund der darunterliegenden Struktur. (Mittlere Fluoreszenzintensität = MFI, MW ± SEM, n = 6, gepaarter T-Test, nicht signifikant; Bio-Plex 200 Array-System).

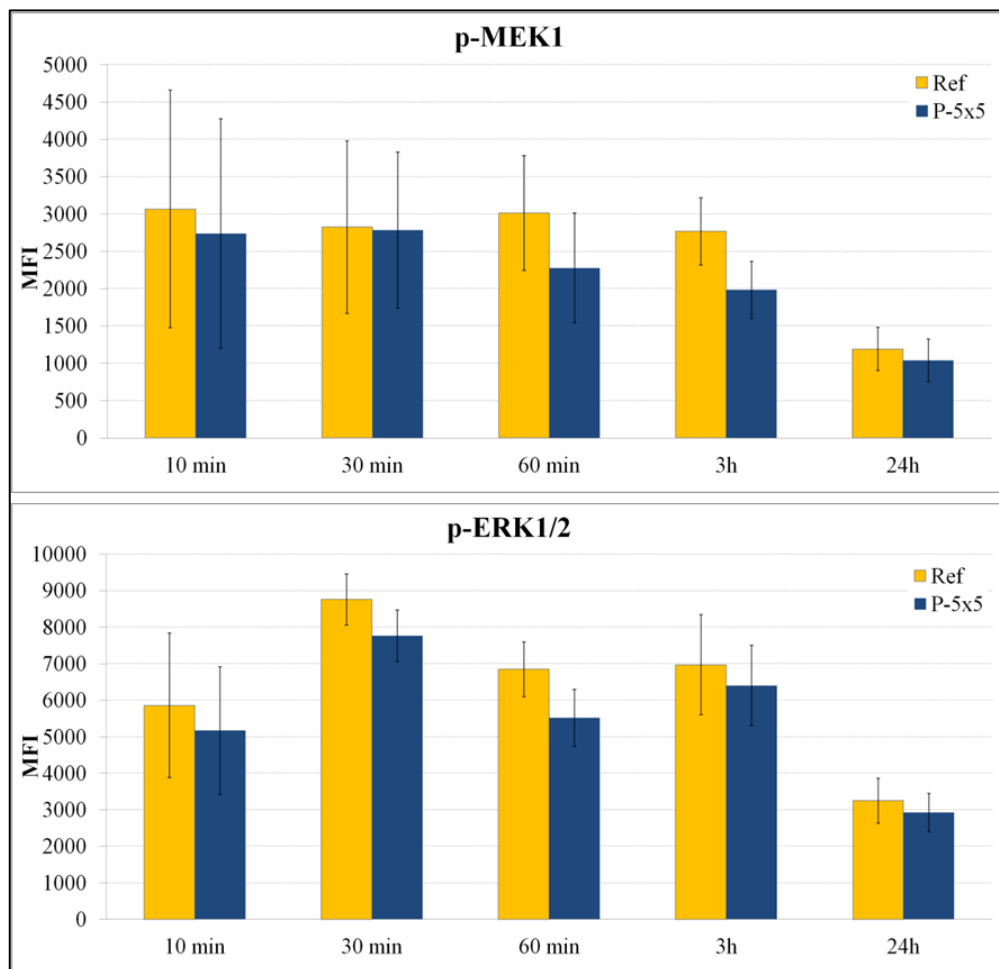
Die Untersuchung zur zeitabhängigen Aktivierung von Signalproteinen des MAPK-Signalweges mit den phosphorylierten Proteinen MEK1 (Ser<sup>217</sup>/Ser<sup>221</sup>)<sup>46</sup>, ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Thr<sup>204</sup>, Thr<sup>185</sup>/Thr<sup>187</sup>)<sup>47</sup> und p38-MAPK (Thr<sup>180</sup>/Thr<sup>182</sup>)<sup>48</sup> ist in Abbildung 33 und Abbildung 34 dargestellt. Auch hier ergeben sich keine veränderten Phosphorylierungsvorgänge aufgrund der Topographie. Ein starker Einfluss auf die Phosphorylierung hingegen hat der Faktor Zeit. Die aktivierte MAP-Kinase-Kinase MEK1 scheint über einen Zeitraum von mindestens 3 h in gleicher Menge vorzuliegen. Erst ab einer 24-stündigen Kultivierung nimmt die Proteinmenge um die Hälfte ab. Die

<sup>46</sup> MAPK/ERK Kinase 1, eine MAPKK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase)

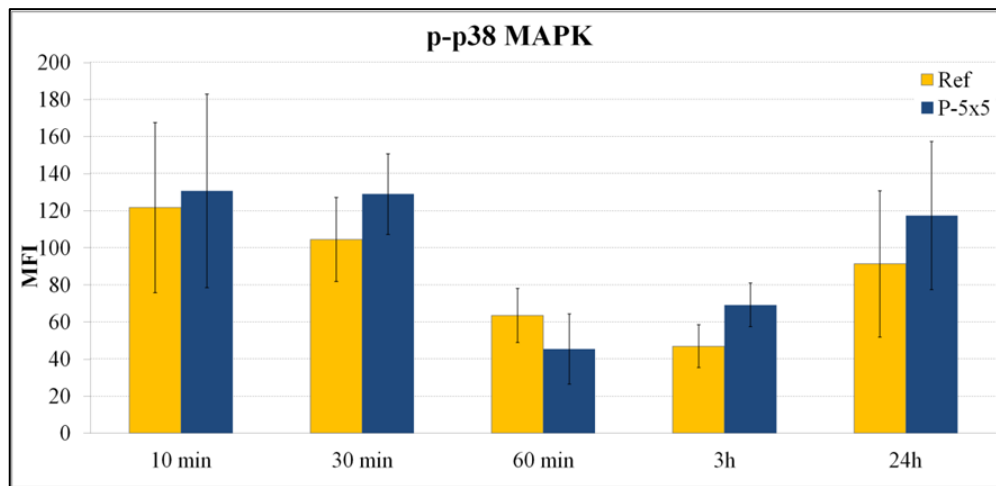
<sup>47</sup> Extracellular-signal Regulated Kinase, eine MAPK (Mitogen-aktivierte-Proteinkinase)

<sup>48</sup> p38-Mitogen-aktivierte-Proteinkinase, aus der Familie der MAPK

MAP-Kinase ERK1/2 wird nach 30 min phosphoryliert und nimmt danach an Proteinmenge kontinuierlich ab. Ein weiterer Vertreter der Familie der MAP-Kinasen, das p38-MAPK (Abbildung 34), zeigt dagegen in seiner Aktivierung ein ganz anderes Expressionsmuster. Eine erhöhte Proteinmenge ist bis zu einer 30 min Kultivierung nachweisbar. Zwischen 1 h und 3 h geht die Menge an aktivierten Proteinen zurück. Eine erhöhte Signalgebung ist ab einem Zeitpunkt von 24 h wieder nachweisbar. Damit zeigen alle 3 Vertreter des MAPK-Signalweges eine unterschiedliche zeitliche Proteindynamik, die jedoch nicht von der Mikrostruktur abhängig ist.



**Abbildung 33:** Zeitabhängige Phosphorylierung von Signalproteinen des MAPK-Signalweges in MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Pfostenoberflächen (P-5x5, blau) und der glatten Referenzoberfläche (Ref, gelb): (oben) p-MEK1 (phosphorylierte MAPK/ERK Kinase 1), (unten) p-ERK1/2 (phosphorylierte Extracellular-signal Regulated Kinase). Eine zeitliche Dynamik aber kein Topographieeinfluss ist erkennbar. (Mittlere Fluoreszenzintensität = MFI, MW  $\pm$  SEM, n = 6, gepaarter T-Test, nicht signifikant; Bio-Plex 200 Array-System).



**Abbildung 34:** Zeitabhängige Phosphorylierung des p38-MAPK (p38-Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) Signalproteins des MAPK-Signalweges in MG-63 Osteoblasten auf mikrostrukturierten Pfostenoberfläche (P-5x5, blau) und der glatten Referenzoberfläche (Ref, gelb). Die phosphorylierten Proteine werden in einer zeitabhängigen Dynamik und unabhängig von der zugrundeliegenden Struktur moduliert. (Mittlere Fluoreszenzintensität = MFI, MW  $\pm$  SEM, n = 6, gepaarter T-Test, nicht signifikant); Bio-Plex 200 Array-System).

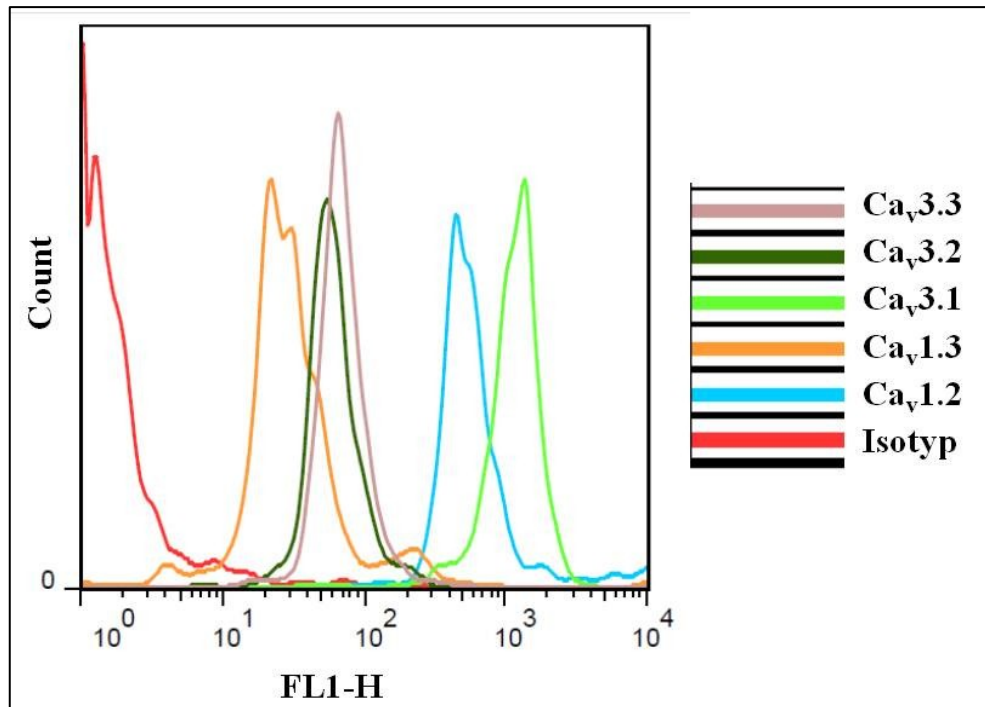
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Phosphorylierung zentraler Signalproteine in einer zeitabhängigen Dynamik aber unabhängig von der zugrundeliegenden Mikrostruktur moduliert wird.

### **3.2. Expression der Kalziumkanäle**

Die Expression und Regulation von weiteren zellulären Strukturen, den spannungsabhängigen Kalziumkanälen des L-Typs  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$ , sowie des T-Typs  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  und  $\text{Ca}_v3.3$  in den Osteoblasten wurden auf den Oberflächen mittels Durchflusszytometrie und Laser Scanning Zytometrie bestimmt.

Am Durchflusszytometer FACSCalibur wurde die Fluoreszenzintensität der markierten Kalziumkanäle mit der Software CellQuest Pro4.0.1 quantitativ erfasst.

In Abbildung 35 ist die generelle Expression von spannungsabhängigen Kalziumkanälen in den Osteoblasten auf der planaren Referenzoberfläche exemplarisch dargestellt. Es konnte eine starke Expression des L-Typ Kalziumkanals  $\text{Ca}_v1.2$  und des T-Typ Kalziumkanals  $\text{Ca}_v3.1$  in einer 24 h-Kultur nachgewiesen werden.

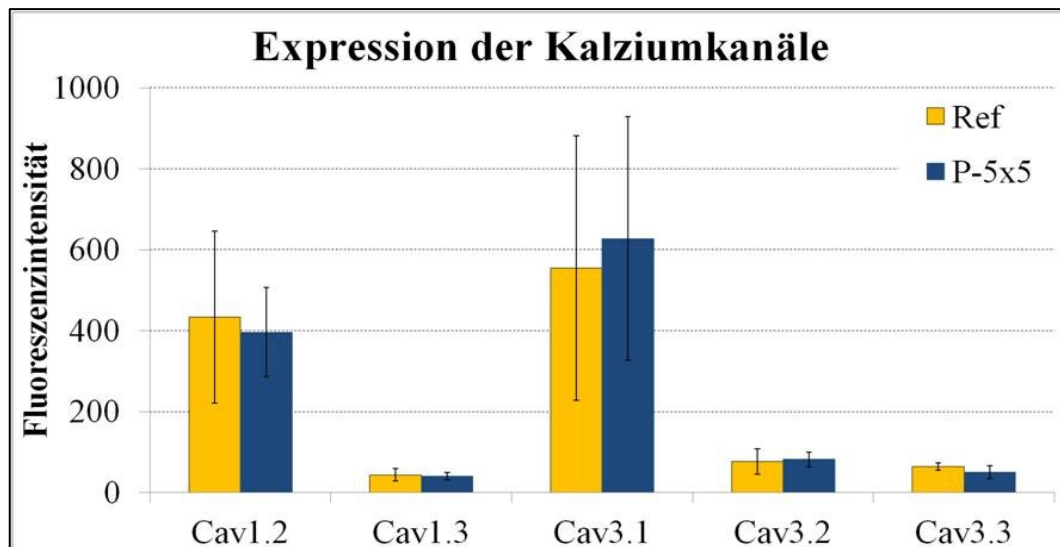


**Abbildung 35:** Histogramm der Fluoreszenzintensität (FL1-H) von spannungsabhängigen Kalziumkanälen ( $\text{Ca}_v$ ) des L-Typs ( $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$ ) und des T-Typs ( $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  und  $\text{Ca}_v3.3$ ) in Osteoblasten auf der planaren Referenz nach 24 h. (FACSCalibur, BD).

Die Abbildung 36 zeigt die Regulation der Expression der spannungsabhängigen Kalziumkanäle in den MG-63 Zellen auf den Mikropfosten (P-5x5) im Vergleich zur glatten Referenz (Ref). Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten abzüglich der mittleren Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle. Die Wiederholung der Versuche erfolgte mit 3 unterschiedlichen Passagen.

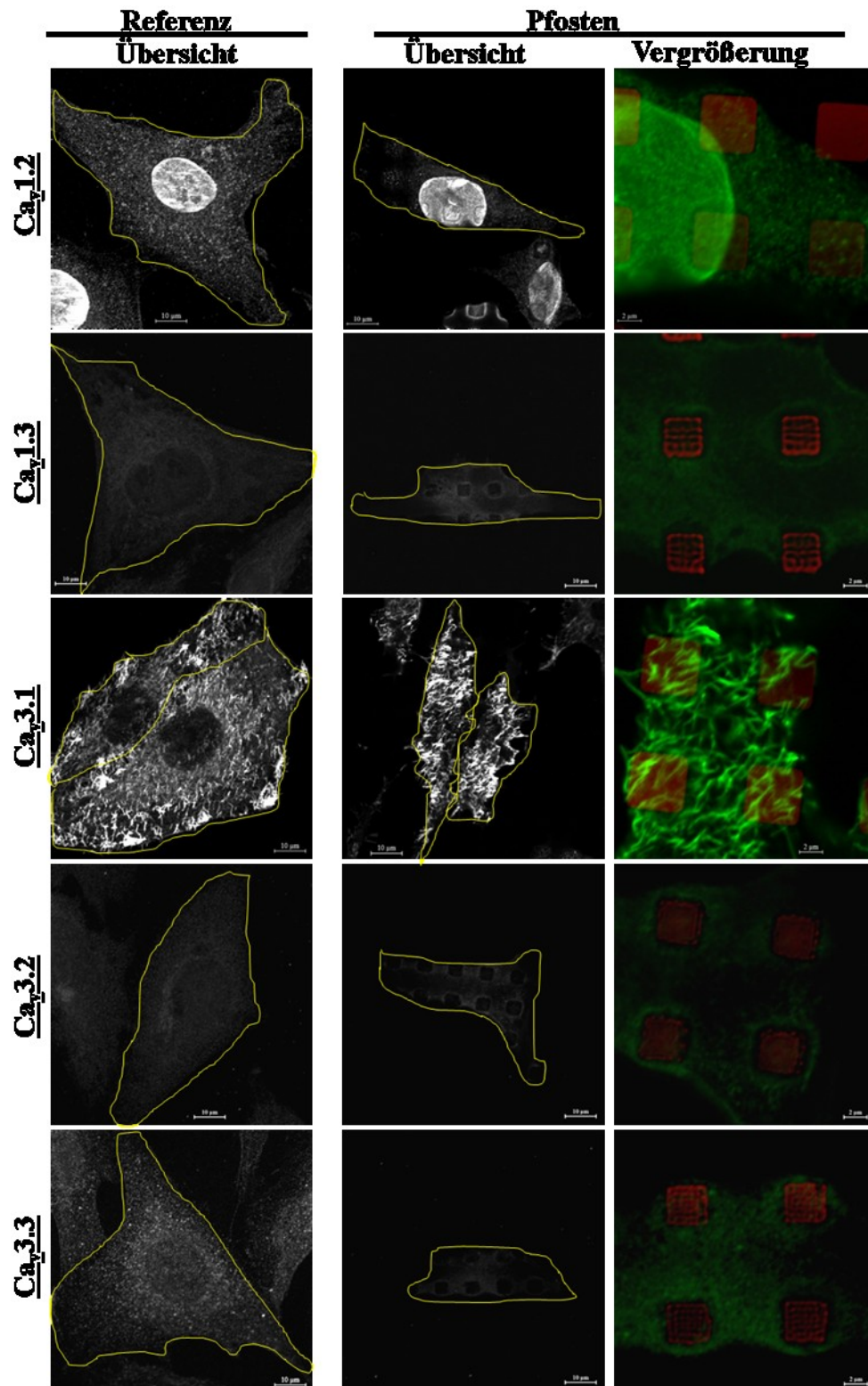
Aus der Grafik ist zu erkennen, dass die Kalziumkanäle  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v3.1$  in den Osteoblasten am stärksten exprimiert vorliegen, unabhängig von der zugrundeliegenden Topographie. Die Topographie hat scheinbar keinen Einfluss auf die Expressionsregulation von spannungsabhängigen Kalziumkanälen in MG-63 Osteoblasten.





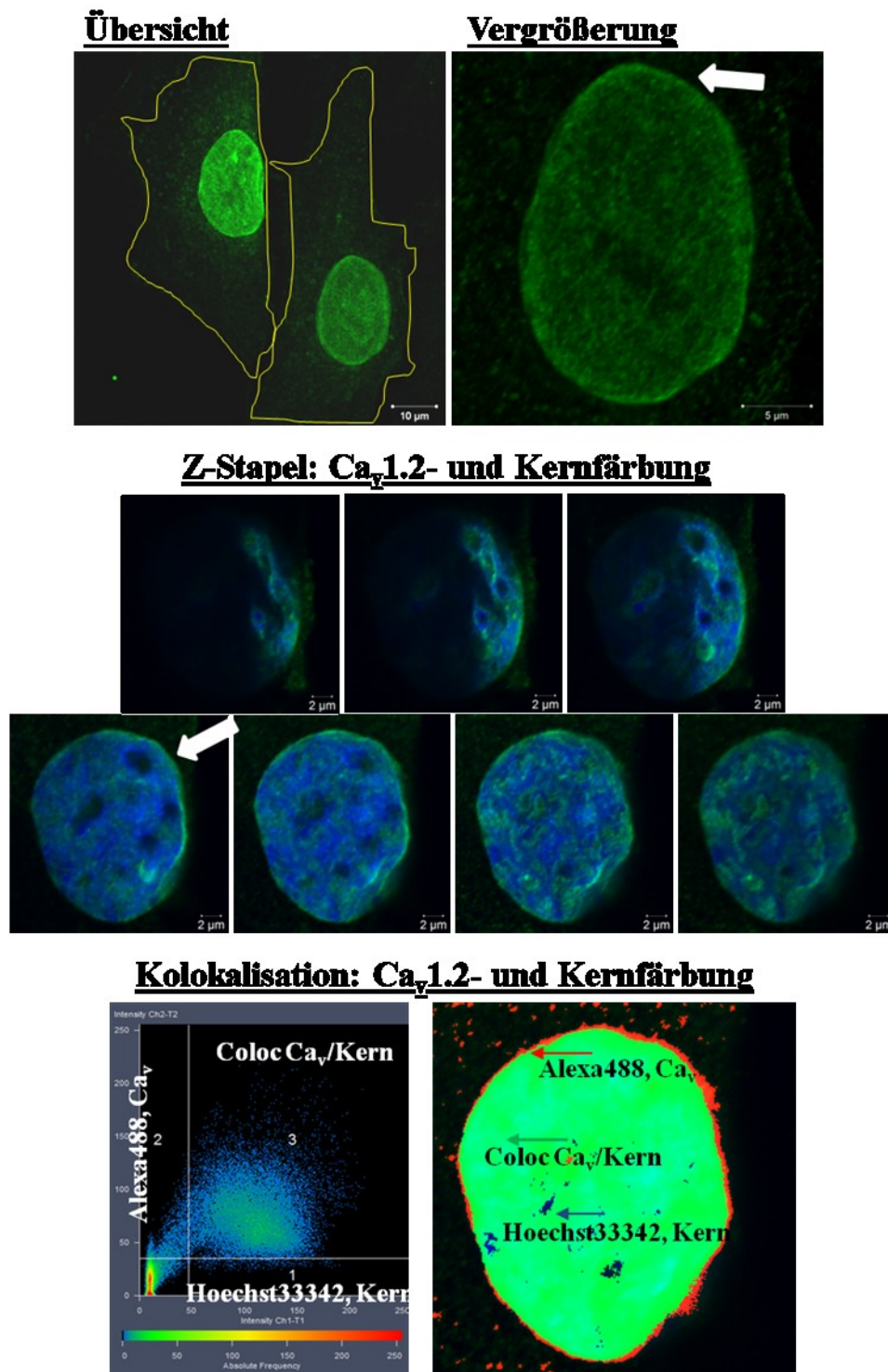
**Abbildung 36:** Durchflusszytometrische Analyse der Expression von spannungsabhängigen Kalziumkanälen des L-Typs  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$ , sowie des T-Typs  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  und  $\text{Ca}_v3.3$  in Osteoblasten auf der Mikrostruktur (P-5x5, blau) vergleichend zu der Referenz (Ref, gelb) nach 24 h. Es ist keine signifikante topographisch induzierte Expressionsregulation der einzelnen Kalziumkanäle nachweisbar. (MW  $\pm$  SEM, n = 3, T-Test, nicht signifikant, FACSCalibur, BD).

Mit der Laser Scanning Zytometrie konnte neben der Expression insbesondere die Lokalisation der spannungsabhängigen Kalziumkanäle  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v1.3$ , sowie  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  und  $\text{Ca}_v3.3$  in den Osteoblasten (Abbildung 37) in Abhängigkeit von der definierten Mikrostruktur (rechte Spalte) vergleichend mit der glatten Referenz (linke Spalte) nach 24 h bestimmt werden. Um die Lage der Kalziumkanäle in Bezug auf die darunter befindliche Topographie zu bestimmen, wurden Aufnahmen im Reflexionsmodus erstellt (Helium-Neon Laser bei 543 nm in der roten Falschfarbe). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 37 zeigen eine starke Expression des L-Typ Kalziumkanals  $\text{Ca}_v1.2$  und des T-Typ Kalziumkanals  $\text{Ca}_v3.1$  in den Osteoblasten, die das durchflusszytometrische Expressionsmuster in den Osteoblasten bestätigen. Der Kalziumkanal  $\text{Ca}_v1.2$  erscheint auf beiden Oberflächen in der Nähe des Zellkerns stark exprimiert und auf der Zelloberfläche gleichmäßig verteilt vorzuliegen. Der Kalziumkanal  $\text{Ca}_v3.1$  liegt in fibrillären Strukturen homogen verteilt in der Zelle sowohl auf den Mikroposten als auch in den Zwischenräumen vor. Die anderen Kalziumkanäle sind sehr schwach in den Zellen exprimiert und daher schlecht in der konfokalen Mikroskopie nachweisbar. Allgemein ist in der gesamten Zelle eine homogene Lokalisation der Kalziumkanäle unabhängig von der Oberflächentopographie ersichtlich. Damit hat die darunterliegende Topographie auch keinen Einfluss auf die Lokalisation von Kalziumkanälen in Osteoblasten.



**Abbildung 37:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von spannungsabhängigen Kalziumkanälen Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3, Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 und Ca<sub>v</sub>3.3 in Osteoblasten (umrandet) auf der Mikropfostenstruktur vergleichend zur Referenz nach 24 h. Die Kalziumkanäle Ca<sub>v</sub>1.2 und Ca<sub>v</sub>3.1 sind in den Zellen am stärksten exprimiert, doch die Lokalisation ist verschieden: Ca<sub>v</sub>1.2 verstärkt in Kernnähe, Ca<sub>v</sub>3.1 auf der gesamten Zelloberfläche. Alle nachgewiesenen Kalziumkanäle sind homogen auf den Oberflächen verteilt und werden in ihrer Lokalisation nicht durch die darunterliegende Topographie beeinflusst. (Übersichtsaufnahmen, Bar = 10 µm; Zoom 6x-Vergrößerungen, Bar = 2 µm, grün = Alexa Fluor 488-markierte Kalziumkanäle, rot = Reflexion der Oberfläche, LSM780, Carl Zeiss; 63x Öl-Immersionsobjektiv, Carl Zeiss).

In der Literatur wird der L-Typ Kalziumkanal  $\text{Ca}_v1.2$  als ein Molekül in der Zellmembran beschrieben (108; 110; 111). In weiterführenden Untersuchungen sollte die Lokalisation des  $\text{Ca}_v1.2$  genauer betrachtet werden (Abbildung 38). Um die Lokalisation des Kalziumkanals in den 24 h adhärenenten Osteoblasten auf den planaren Si-Ti-Oberflächen zu analysieren, wurde zum einen der Kalziumkanal  $\text{Ca}_v1.2$  (pAK:  $\text{Ca}_v1.2$ , Epitop am N-Terminus, sAK: Alexa Fluor 488) und zum anderen der Zellkern (Hoechst 33342, DNA-Farbstoff) markiert. In der Übersicht (Abbildung 38) scheint eine starke Lokalisation des nachgewiesenen Epitops des Kalziumkanals ( $\text{Ca}_v1.2$ ) in Zellkernnähe. Aber in der Vergrößerung ist die Lokalisation des Kanals  $\text{Ca}_v1.2$  zum einen stark in der Peripherie (Pfeil) und zum anderen im Zellkern ersichtlich. Die Nahaufnahmen im Z-Stapel mit zusätzlicher Zellkernfärbung zeigten dann deutlich, dass das Epitop des  $\text{Ca}_v1.2$  im Zellkern und um den Zellkern exprimiert wurde (Pfeil). Mit der Funktion „Coloc“ (Zen2012 (blue edition), Carl Zeiss) konnte dann die Kolokalisation des nachgewiesenen Epitops des Kalziumkanals  $\text{Ca}_v1.2$  im Zellkern (Kolokalisation = grün) nachgewiesen werden. Des Weiteren ist ersichtlich, dass der Kanal  $\text{Ca}_v1.2$  auch in der Peripherie des Zellkerns und auf der Zelle (Zellmembran) ( $\text{Ca}_v1.2$  = rot) exprimiert wurde. Damit scheint das Epitop des Kalziumkanals  $\text{Ca}_v1.2$  nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch im Zellkern lokalisiert vorzuliegen.



**Abbildung 38:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Kalziumkanals Ca<sub>v</sub>1.2 und des Zellkerns in Osteoblasten auf der Referenz nach 24 h. Anhand der Vergrößerung, des Z-Stapels und der Auswertung der Kolokalisation zeigt sich, dass der Kalziumkanal Ca<sub>v</sub>1.2 im Zellkern, in der Peripherie um den Zellkern und homogen auf der Zelle lokalisiert ist. Zur Auswertung der Kolokalisation wurde die Funktion „Coloc“ (ZEN2011(black edition, Carl Zeiss) verwendet: Hoechst 33342-markierte Zellkerne (x-Achse, Areal 1, blau), Alexa Fluor 488-gefärbte Ca<sub>v</sub>1.2 (y-Achse, Areal 2, rot) und die Kolokalisation „Coloc“ Ca<sub>v</sub>/Kern (Areal 3, grün). (Übersicht Bar = 10 µm, Zoom 8x-Vergrößerung Bar = 5 µm, Doppelfluoreszenz Zoom 6x-Vergrößerung

Bar = 2  $\mu\text{m}$ ; LSM780, Carl Zeiss; 63x Öl-Immersionsobjektiv, Carl Zeiss; grün = Alexa Fluor 488-markierte Kalziumkanäle, blau = Hoechst 3342-gefärbte Zellkerne).

### **3.3. Kalziummobilisierung**

Ausgehend von der phänotypischen Charakterisierung der Osteoblasten sollten zur weiteren Charakterisierung der Zell-Material-Interaktion Effekte in der Signaltransduktion, wie die intrazelluläre Kalziumdynamik, mit Hilfe des Kalzium-Imaging am konfokalen Mikroskop LSM780, erfasst werden.

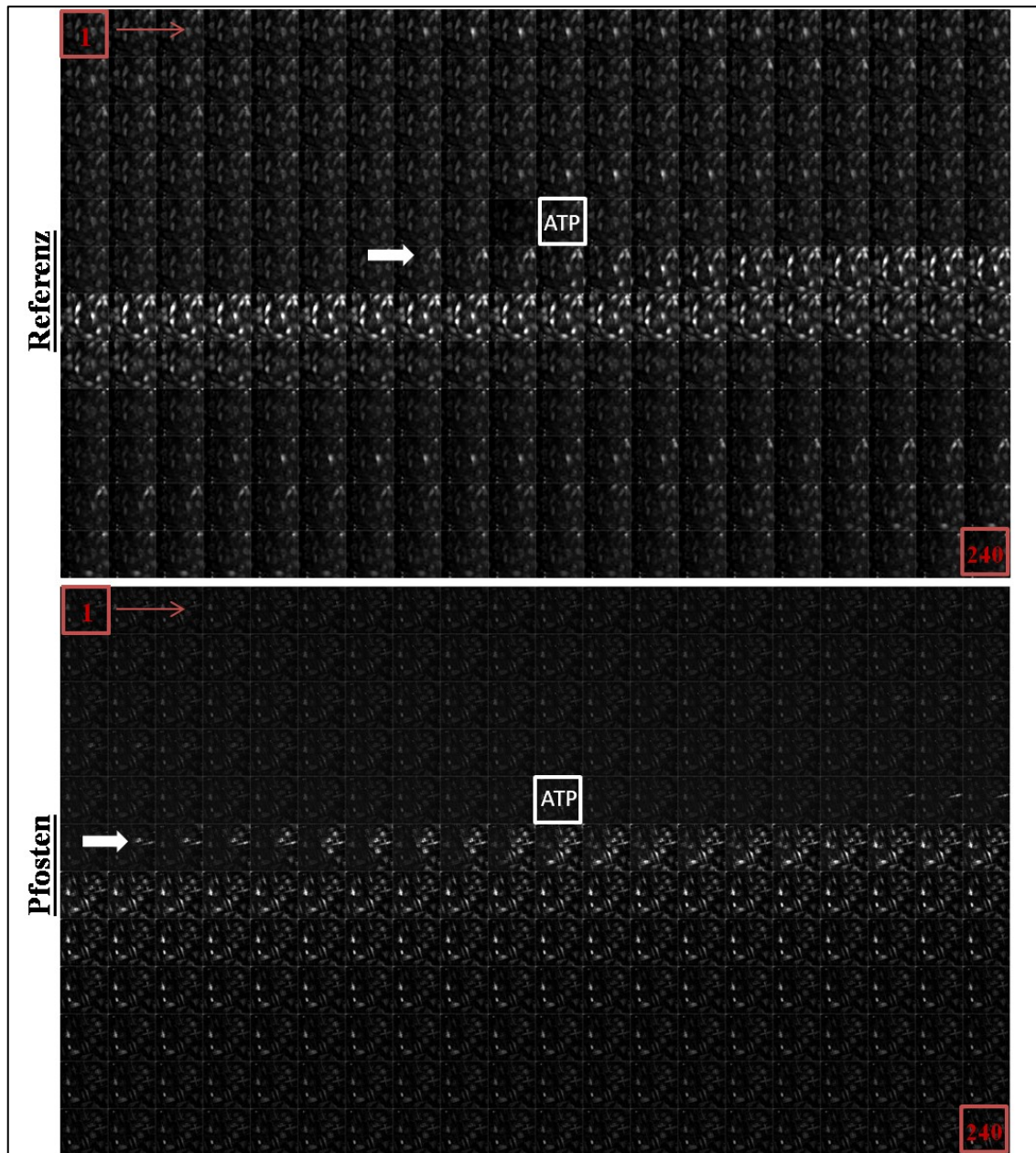
Zum einen wurde die Kalziummobilisierung in Osteoblasten nach einer 24-stündigen Kultivierung auf den mikrostrukturierten und vergleichend auf glatten Oberflächen betrachtet. Zum anderen erfolgte der Nachweis der intrazellulären Kalziummobilisierung in den MG-63 Zellen in den ersten Minuten der Adhäsionsphase auf den entsprechenden Oberflächen. Die konfokalmikroskopischen Analysen der Zeitserien, mit ihren 240 Aufnahmen, wurden mit einem maximalem Pinhole und einem 40x-Wasserobjektiv erstellt.

In der Abbildung 39 sind die exemplarischen Beispiele der Zeitserien (240 Aufnahmen, á 2 s) für das Kalzium-Imaging adhärenter Zellen auf der glatten Referenz (oben) und der Mikropostenstruktur (unten) gezeigt. Markiert wurde der 90te Zyklus (nach 180 s) bei dem die Stimulation mit dem Reagenz ATP erfolgte, um die Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aus dem intrazellulären Kalziumspeicher (Endoplasmatisches Retikulum) freizusetzen (75; 99). In den Osteoblasten auf der Referenz ist bereits zu Beginn der ersten Aufnahme ein Kalziumsignal ersichtlich (basale Kalziumionenkonzentration). Die Osteoblasten kommunizieren schon im Vorfeld der Stimulation mit einer intrazellulären Kalziumdynamik. Bei dieser intrazellulären Kalziumkommunikation können die freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von einer Zelle in die benachbarte Zelle übergehen (Abbildung 40, Pfeile). Es zeigt sich eine sofortige und starke Reaktion der Zellen auf den Stimulus ATP (Abbildung 39, Pfeil), wenn diese Zellen auf der glatten Referenz wachsen. Im Vergleich dazu zeigt sich auf der Mikrostruktur im Vorfeld (basale Kalziumionenkonzentration) deutlich eine schwächere globale Kalziumkommunikation der adhärenter Zellen untereinander. Auch bei der Stimulation mit ATP ist ein deutlich geringeres Kalziumsignal als Antwort ersichtlich (Abbildung 39, Pfeil). Somit ist die Kalziummobilisierung in den Osteoblasten auf der Topographie beeinträchtigt.

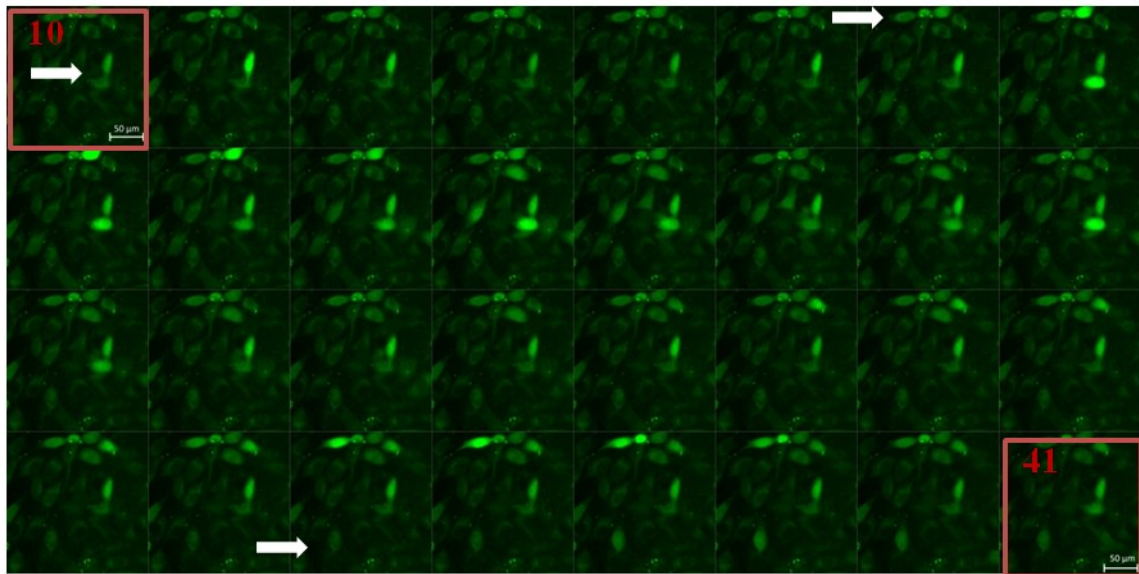
In den Vorversuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine stabile Fluoreszenzintensität bei den Aufnahmen der Zeitserien am konfokalen Mikroskop auf allen Oberflächen quantifiziert wird (Abbildung 20). Das reduzierte Kalziumsignal in den adhärenter Osteoblasten auf den Mikroposten kann daher auf eine veränderte



Zellarchitektur, insbesondere auf das umorganisierte Aktinzytoskelett, zurückgeführt werden.



**Abbildung 39:** Exemplarische Beispiele der konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Zeitserien der Kalziummobilisierung in adhärenenten Osteoblasten nach 24 h Kultur: (oben) auf der planaren Referenz und (unten) auf der mikrostrukturierten Pfoftenoberfläche. Ab dem 90ten Zyklus (nach 180 s) erfolgte die Zugabe von ATP (weißes Kästchen). Die Osteoblasten auf der Referenzoberfläche sind aktiver sowie untereinander kommunikativer und reagieren mit einem starken Kalziumsignal auf ATP (Pfeil). Im Vergleich dazu zeigen die MG-63 Zellen auf den Mikropfoften eine reduzierte zelluläre Kalziumreaktion und weisen nach Stimulation mit ATP eine abgeschwächte Kalziumfreisetzung auf (Pfeil). (Kalziumnachweis Fluo-3/AM, Zeitserien mit 240 Aufnahmen á 2 s, rote Markierung zeigt 1te und 240te Aufnahme, LSM780, Carl Zeiss; 40x Wasserobjektiv, Carl Zeiss).

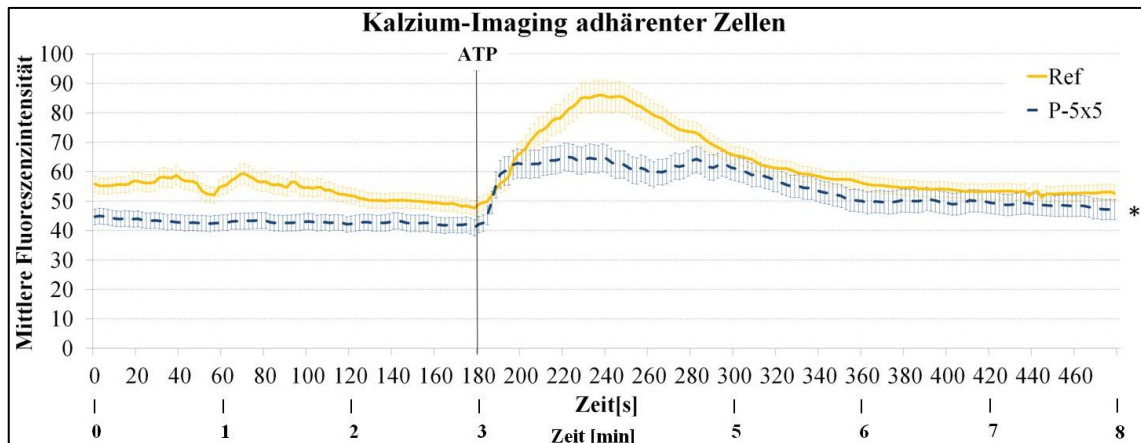


**Abbildung 40:** Exemplarisches Beispiel der konfokalmikroskopischen Aufnahmen aus einer Zeitserie der Kalziummobilisierung in 24 h adhärenenten MG-63 Osteoblasten auf der planaren Referenz vor der Stimulierung mit ATP (Ausschnitt (~60 s): Aufnahme 10 (20 s) bis Aufnahme 41 (82 s)). Bei den Osteoblasten auf der Referenzoberfläche ist im Vorfeld der Stimulation eine Kalziumkommunikation untereinander nachweisbar (Pfeile). Dabei geht das Kalziumsignal der freien Kalziumionen von einer Zelle in die benachbarte Zelle über. (grün: Kalziumnachweis Fluo-3/AM, Zeitserien mit 32 Aufnahmen á 2 s, rote Markierung zeigt 10te und 41te Aufnahme eines exemplarischen Ausschnittes einer Zeitserie, LSM780, Carl Zeiss; Bar = 50 µm, 40x Wasserobjektiv, Carl Zeiss).

In der Grafik der Abbildung 41 sind die quantitativen Fluoreszenzintensitäten der adhärenenten Kalzium-Imaging Methode mit dem 24 h adhärenenten Osteoblasten auf der Mikrostruktur (P-5x5, blaue Linie) vergleichend zur planaren Referenzoberfläche (Ref, gelbe Linie) ersichtlich. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten abzüglich des Hintergrundes die mit der Software ZEN2012 (blue edition) quantifiziert wurden. Die Wiederholungen der einzelnen Versuche erfolgten mit 14 unterschiedlichen MG-63-Passagen. Die Stimulation mit ATP beim 90ten Zyklus (180 s) ist mit einem Pfeil kenntlich gemacht.

Die quantitativen Werte bestätigen die subjektiv bewerteten Zeitserienaufnahmen. Die Fluoreszenzintensitäten in den Osteoblasten auf der glatten Referenzoberfläche weisen schon vor der Stimulation mit ATP auf eine gesteigerte und dynamische Kalziummobilität hin. Mit der ATP-Zugabe ist dann ein starkes Kalzium-Signal in den Osteoblasten auf der Referenz nachweisbar. Nach einer starken Kalziumfreisetzung in den Osteoblasten erreicht die Kalziummobilität zwischen 180 s und 240 s das Maximum und fällt danach kontinuierlich wieder ab. Im Vergleich dazu zeigen die Osteoblasten die auf der Mikrostruktur adhärenierten ein zu jedem Zeitpunkt signifikant reduziertes Kalziumsignal. Es ist in den Osteoblasten auf der Mikropfostenstruktur

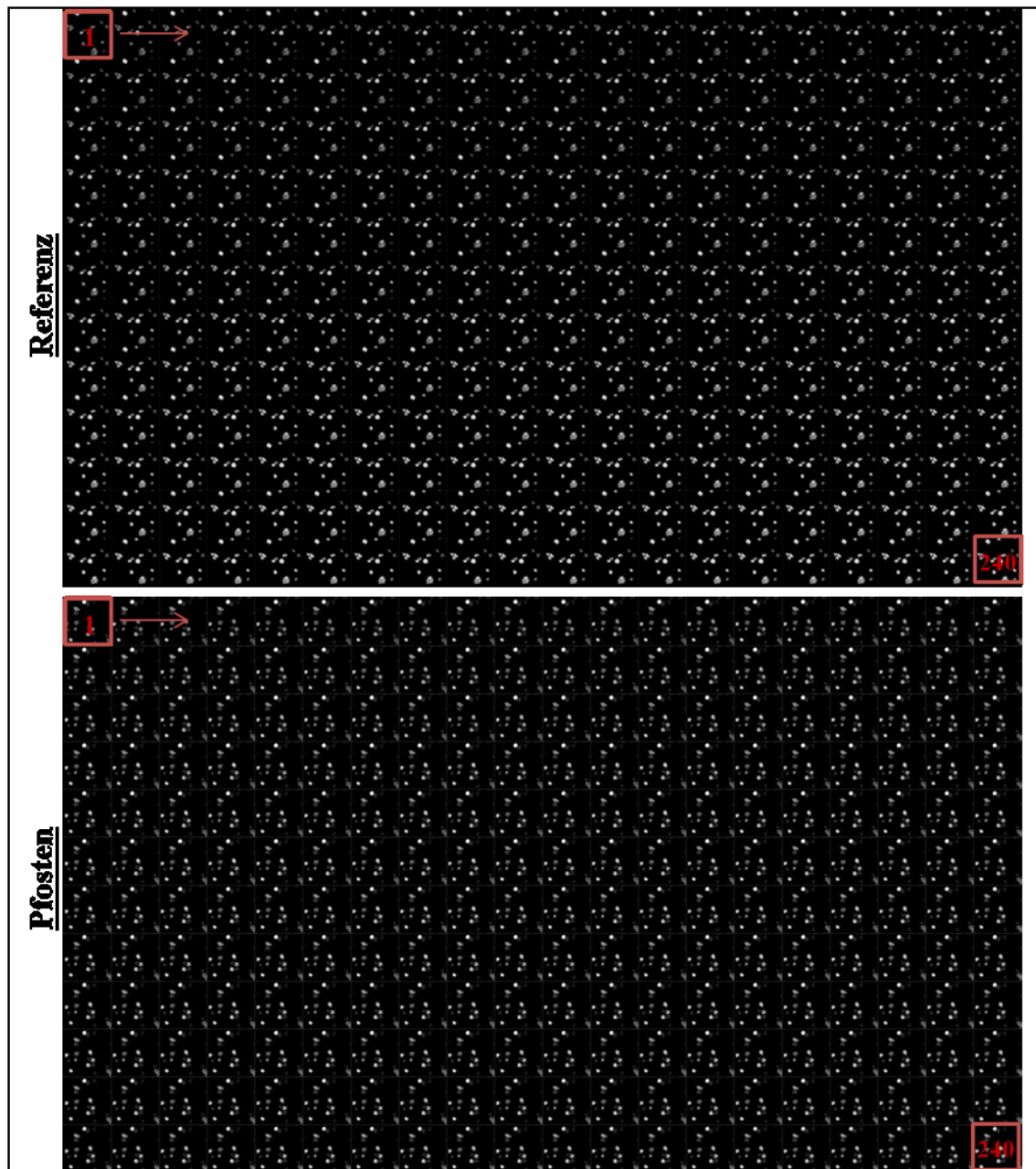
sowohl eine schwache Ausgangsaktivität (basale Kalziumionenkonzentration), als auch ein um die Hälfte reduziertes Kalziumsignal als Antwort auf die ATP-Stimulation mit 2 nacheinander folgenden Peaks zwischen 180 s und 360 s ersichtlich. Es wird eine schnelle (20 s nach ATP-Zugabe) und eine zeitlich verzögerte (100 s nach ATP-Zugabe) intrazelluläre Kalziumfreisetzung quantifiziert. Dies ist ein Hinweis auf eine gestörte Kalziummobilisierung in den Zellen, die durch das Wachstum auf der Mikropfostenstruktur nur ein fragmentarisches Zytoskelett ausprägen.



**Abbildung 41:** Analyse der Kalziummobilisierung (Kalziumsignalintensitäten) der adhärenenten Fluo-3 gefärbten Osteoblasten nach Stimulation mit ATP (ab 180 s, Markierung) auf der mikrostrukturierten Pfostenoberfläche (P-5x5, blaue Linie) im Vergleich zur glatten Referenz (Ref, gelbe Linie). Eine signifikant niedrige und gleichförmige Ausgangsaktivität der Zellen ist auf der Mikropfostenstruktur im Vergleich zur Referenz nachweisbar. Insbesondere zeigen die Osteoblasten auf der Mikrostruktur eine signifikant abgeschwächte Kalziumfreisetzung als Antwort auf ATP-Stimulation. (MW  $\pm$  SEM;  $n = 140$  Zellen aus  $n = 14$  Versuchen, Kruskal-Wallis-Test, zu jedem Zeitpunkt signifikant,  $*p < 0,05$ , Zen2012 (blue edition), Carl Zeiss).

Die Abbildung 42 veranschaulicht exemplarisch die Kalziummobilisierung der Osteoblasten in den ersten Minuten der Adhäsion auf der glatten Referenz im Vergleich zu der Mikrostruktur. Beim der Methode, Kalzium-Imaging suspendierter Zellen, wurden zuerst die Osteoblasten in Suspension mit dem Kalziumindikator Fluo-3/AM beladene und anschließend auf den Oberfläche ausgesät. Nach einer kurzen Adhäsionsphase ( $\sim 20$  min) konnte dann ein globales Kalziumsignal am konfokalen Mikroskop quantifiziert werden. In beiden Zeitserien (240 Aufnahmen  $\times$  2,5 s) sind keine Unterschiede der Kalziumdynamik in den Osteoblasten ersichtlich. Damit zeigen die Osteoblasten während des Adhäsionsprozesses in den ersten 20-30 min auf den Oberflächen keine Beeinflussung durch die Mikrotopographie und weisen außerdem eine gleichbleibende stabile basale Kalziumionenkonzentration auf.

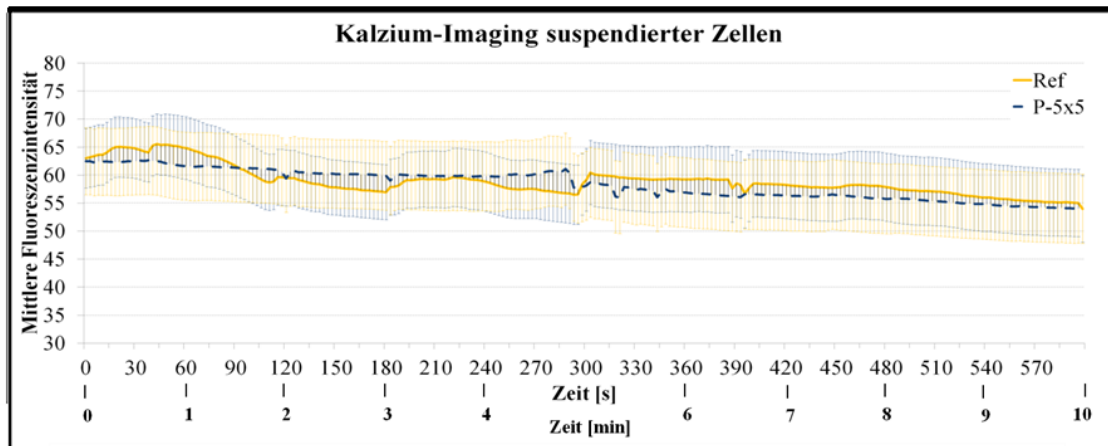




**Abbildung 42:** Exemplarische Beispiele der konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Kalziummobilisierung in MG-63 Zellen während der ersten Minuten der Adhäsion (oben) auf der glatten Referenz und (unten) auf den Mikropfosten. Auf beiden Oberflächen reagieren die Osteoblasten mit einem gleichen basalen Kalziumsignal. (Kalziumnachweis Fluo-3/AM, Zeitserien mit 240 Aufnahmen á 2,5 s, rote Markierung zeigt 1te und 240te Aufnahme, LSM780, Carl Zeiss; 40x Wasserobjektiv, Carl Zeiss).

Die Grafik in der Abbildung 43 zeigt die quantitativen mittleren Fluoreszenzintensitäten (abzüglich Hintergrund) der Fluo-3/AM gefärbten Osteoblasten, die unmittelbar (nach 20 min) auf der P-5x5 Mikrostruktur (blaue Linie) und auf der glatten Referenz (gelbe Linie) anfangen zu adhären. Die Wiederholungen der einzelnen Versuche erfolgten mit 12 verschiedenen Zellpassagen. In der Grafik wird deutlich, dass keine Unterschiede in der basalen Fluoreszenzintensität vorhanden sind. Die Osteoblasten auf

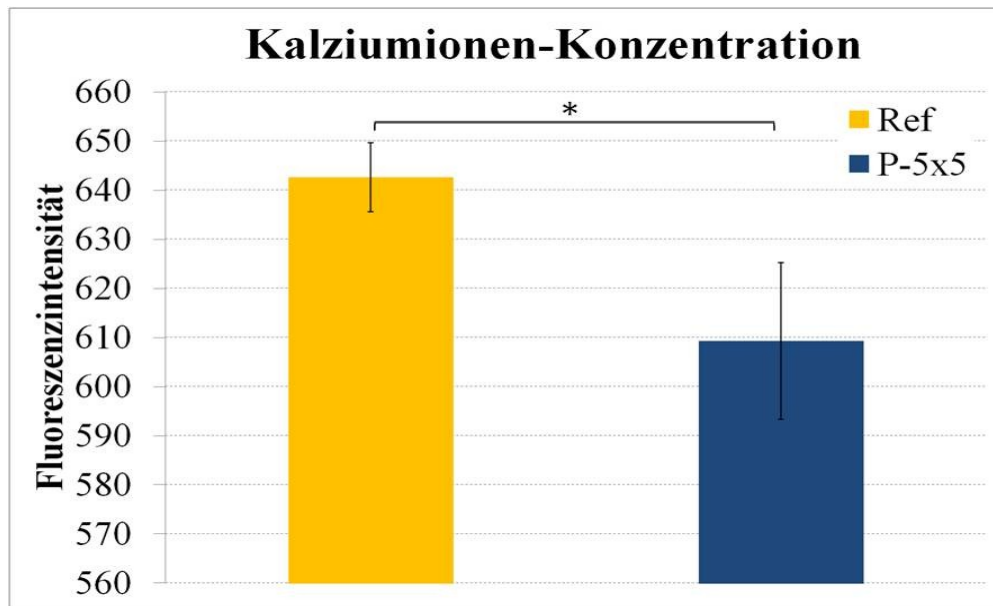
beiden Oberflächen zeigen gleichermaßen ein intrazelluläres Kalziumsignal. Ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Topographie kann zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Damit ist die Mobilisierung der intrazellulären freien Kalziumionen in den Osteoblasten in den ersten Minuten noch nicht von der Topographie beeinflusst.



**Abbildung 43:** Analyse der Kalziummobilisierung (Kalziumsignalintensitäten) der adhären den Fluo-3 gefärbten Osteoblasten auf der mikrostrukturierten Pfostenoberfläche (P-5x5, blaue Linie) im Vergleich zur glatten Referenz (Ref, gelbe Linie). Auf beiden Oberflächen ist das intrazelluläre Kalziumsignal gleich. (MW  $\pm$  SEM; n = 120 Zellen aus n = 12 Versuchen, Kruskal-Wallis-Test, nicht signifikant, Zen2012 (blue edition), Carl Zeiss).

### 3.4. Kalziummessung

Die intrazelluläre basale Kalziumionenkonzentration in den 24 h-adhären ten Osteoblasten auf den Oberflächen wurde am Durchflusszytometer (FACSCalibur) bestimmt. Die Fluoreszenzintensitäten der intrazellulären Kalziumionen wurden relativ quantitativ mit der Software CellQuest Pro4.0.1 ausgewertet. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten aus 6 Ansätzen mit unterschiedlichen Zellpassagen. In der Abbildung 44 ist die basale Kalziumionenkonzentration in den Osteoblasten auf der Mikropfostenstruktur (P-5x5) vergleichend zur planaren Referenz (Ref) ersichtlich. Es konnte im Durchflusszytometer ein signifikant schwächeres Fluoreszenzsignal von Fluo-3/AM-beladenen Zellen auf der Mikrostruktur, im direkten Vergleich zu der planaren Referenz, nachgewiesen werden. Damit bestätigten die durchflusszytometrischen Messungen die Topographie-induzierte reduzierte basale Kalziumionenkonzentration in den Osteoblasten.



**Abbildung 44:** Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären basalen Kalziumionenkonzentration in Osteoblasten auf der Mikrostruktur (P-5x5, blau) vergleichend zu der planaren Referenz (Ref, gelb) nach 24 h. Auf den Oberflächen mit einer Mikropfostentopographie zeigen die Osteoblasten eine signifikant reduzierte basale Kalziumionenkonzentration. (MW  $\pm$  SEM; n = 6, gepaarter T-Test, \*p < 0,05; FACSCalibur, BD).

## V. Diskussion

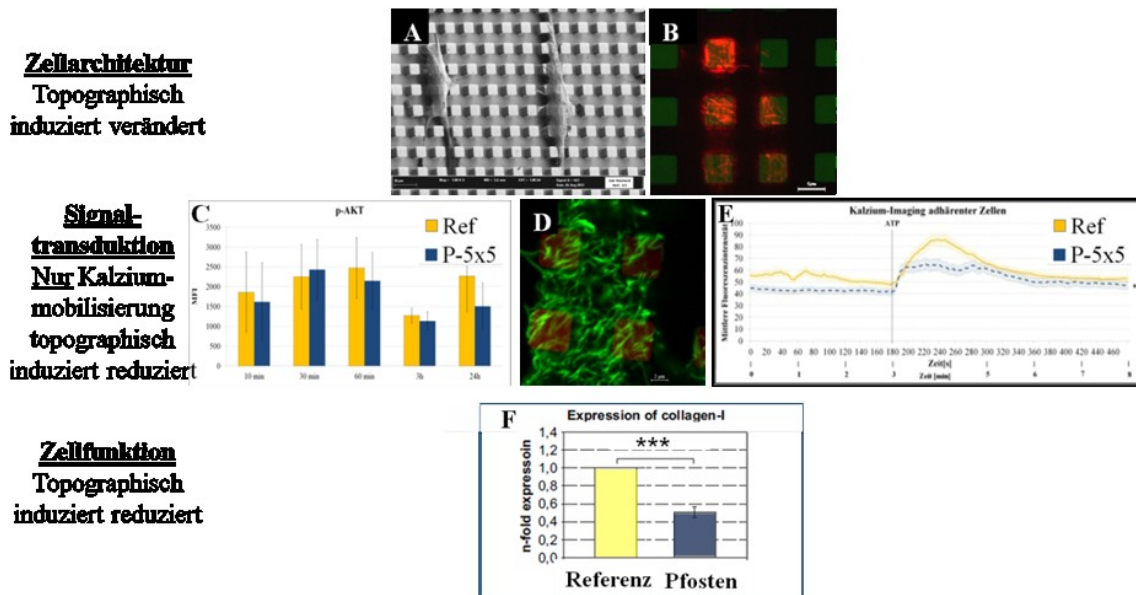
Biomaterialien für medizinische Anwendungen sind körperfremde Werkstoffe, synthetische oder nichtlebende natürliche Materialien, die in den unmittelbaren Kontakt mit einer biologischen Umgebung treten (1; 2). Die Materialien sollen durch die Kontrolle der Wechselwirkung mit dem biologischen Umfeld die Funktion des geschädigten Gewebes fördern, stabilisieren oder ersetzen. Die Biomaterialien für den Knochen sollen nicht nur von den geschädigten Geweben akzeptiert und integriert werden, sondern auch osteokonduktiv, als auch osteoinduktiv wirken, um die volle Funktionsfähigkeit wiederherzustellen (155). Gegenwärtige innovative Werkstoffe werden trotz ihrer beispielsweise chemischen und/oder topographischen Oberflächeneigenschaften nach der Implantation nicht immer vom Körper akzeptiert und damit nicht vollständig integriert. Zur Aufklärung der komplexen Interaktion der Zellen mit dem Biomaterial suchen Mediziner die Kommunikation mit Ingenieuren und Naturwissenschaftlern, um verbesserte Materialien in der regenerativen Medizin zu entwickeln und einzusetzen. In der medizinischen Grundlagenforschung ist es von großem Interesse zu wissen wie die Zellen auf die Einflussfaktoren verschiedenster Materialeigenschaften reagieren und welche komplexen zellphysiologischen Mechanismen moduliert werden.

Die Oberflächeneigenschaften eines Biomaterials wie die Chemie (181; 198; 199) und die Topographie im Mikro- und Nanometerbereich (160; 163; 200; 201; 202; 203) haben einen Einfluss auf die Zellen des umgebenden Gewebes. Die Topographie beeinflusst die Zelladhäsion (19; 156; 165; 204; 205), die Morphologie und die Organisation von Zellstrukturen (170; 206; 207; 208), sowie diverse Zellfunktionen (7; 17; 156; 162; 169; 209).

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Promotionsarbeit beruht auf Erkenntnis von Studien zum Einfluss von stochastisch strukturierten Titanoberflächen auf die zelluläre Adhäsion und ihre Komponenten, wie Integrine und Aktinzytoskelett (7; 165; 169; 171; 172; 210). Die komplexen Zusammenhänge, Ursachen und zugrunde liegenden Mechanismen in der Zell-Material-Interaktion werden in der Literatur aufgrund der Komplexität des Zellverhaltens einerseits und der Diversität der stochastischen Oberflächencharakteristika andererseits noch nicht vollständig beschrieben (211; 212). Zum weiteren Verständnis der Zell-Material-Interaktionen können einfach periodisch definierte Mikrostrukturen helfen, den topographischen Effekt direkt in Zusammenhang mit der resultierenden Zellphysiologie zu betrachten.

In der hier vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Interaktion von humanen Osteoblasten mit einer definiert mikrostrukturierten Titanoberfläche, die eine regelmäßige Pfostengeometrie (Höhe x Breite x Länge: 5 x 5 x 5 µm) besitzt, vergleichend zu einer planaren Referenz untersucht. Ein geeignetes Zellmodell stellte die humane Osteoblasten Zelllinie MG-63 dar (167; 169; 185). Bereits Groen 2013 et al. (186) favorisierten das Zellmodell MG-63 für die Untersuchung auf Biomaterialien, insbesondere zur Beurteilung der Zelladhäsion, Proliferation, Differenzierung und Proteinexpression. Auch eigene Vorarbeiten haben ähnliche Reaktionsmuster von MG-63 und primären Osteoblasten auf maschinierem und korundgestrahltem Titan gezeigt (169).

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Charakterisierung und Analyse des Einflusses der definierten Mikropfostenstruktur auf die Zellarchitektur, auf intrazelluläre Signalwege und insbesondere auf die Fähigkeit der Zellen zur Kalziummobilisierung. Es konnte ein deutlicher Einfluss der titanbeschichteten Mikrostruktur auf die Morphologie und Aktinorganisation in den MG-63 Osteoblasten nachgewiesen werden (179; 187; 213) (Abbildung 45). Die Umorganisation des Aktins in Form von kurzen Fragmenten auf der Mikropfostenstruktur scheint allein ein Topographie-abhängiger Effekt zu sein. Die Ursachen dafür lagen weder in der Materialchemie - Titan vs. Silizium, Anlagerung von Proteinen an den Pfostenkanten (mit oder ohne Fibronectin aus dem Serum) - noch in der 2-dimensionalen Kultivierung mit dem Einfluss der Schwerkraft. So war auf allen Variationen - Oberflächenchemie und Kultivierungsart - die Fragmentierung des Aktinzytoskeletts der Osteoblasten auf den Pfosten deutlich nachweisbar (182; 192). Die Untersuchungen bezüglich aktivierter Signalproteine zeigten erstaunlicherweise keinen topographisch induzierten Einfluss. Die Signalwege unterlagen einer zeitlichen Dynamik, waren ansonsten sehr stabile Prozesse in den MG-63 Osteoblasten (193; 196). Des Weiteren war auch die Expression von spannungsabhängigen Kalziumkanälen topographisch unabhängig. Deutlich nachgewiesen wurde der topographische Einfluss auf die intrazelluläre Kalziummobilisierung durch ATP in den adhärenenten Osteoblasten (Abbildung 45), die signifikant reduziert war. Die Abbildung 45 fasst die wesentlichen Ergebnisse als Basis für die Diskussion zusammen.



**Abbildung 45:** Zusammenfassung der wesentlichen zellulären Reaktionen von MG-63 Osteoblasten: Die Osteoblasten auf der Mikrostruktur (P-5x5) mit dem fragmentierten Aktinzytoskelett zeigen eine reduzierte Kalziummobilisierung im Vergleich zu den Zellen auf der planaren Referenz (Ref). **(A) Morphologie:** 24 h, Bar = 10  $\mu$ m, 30°, FE SEM SUPRA25, Carl Zeiss; **(B) Aktinzytoskelett:** 24 h, Bar = 5  $\mu$ m, rot: TRITC-markiertes Aktin, LSM410, 63x Öl-Immersionsobjektiv; **(C) Signalproteine:** 10 min – 24 h, Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), MW  $\pm$  SEM, n = 6, gepaarter T-Test, nicht signifikant, Bio-Plex 200 Array System; **(D) Kalziumkanal ( $Ca_v3.1$ ):** 24 h, Bar = 5  $\mu$ m, grün: Alexa Fluor 488-markierte  $Ca_v3.1$ , LSM780, 63x-Öl-Immersionsobjektiv; **(E) Kalziummobilisierung:** 24 h, Zeitserien mit 240 Aufnahmen  $\dot{a}$  2 s, MW  $\pm$  SEM; n = 140 Zellen aus n = 14 Versuchen, Kruskal-Wallis-Test, zu jedem Zeitpunkt signifikant, \*p < 0,05, Zen2012 (blue edition); **(F) Zellfunktion:** Nachweis der Expression des Matrixproteins Kollagen, MW  $\pm$  SD, n = 4, gepaarter T-Test, \*\*\*p < 0,001, Abbildung nach Matschegeweski et al. (187).

### Zellarchitektur

Die phänotypische Charakterisierung der Osteoblasten in Abhängigkeit einer Topographie erfolgte auf hohem Niveau mit dem Rasterelektronenmikroskop und dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten morphologische Unterschiede von Osteoblasten auf der Mikropfostenstruktur, deren Phänotyp topographisch induziert kleiner und länglicher erschien. Die Zellarchitektur der Osteoblasten auf der planaren Referenzstruktur entsprach der beschriebenen polygonalen Zellform (169). Der gesamte Zellkörper adhärte an der glatten Oberfläche und wies keine bevorzugte Orientierung auf. Die MG-63 Osteoblasten auf der definierten Mikrostruktur adhärten dagegen unmittelbar auf den Pfosten. Der insgesamt kleinere Zellkörper zeigte eine Topographie-induzierte Kontaktführung mit einer gestreckten Zellform mit langen Zellausläufern in einer

bevorzugten Ausrichtung in einem 45°- oder 90°-Winkel zu den Pfosten (187; 213). In den vorangegangenen Publikationen (178; 179) konnte die induzierte Elongation und Orientierung der Osteoblasten aufgrund der geometrischen Mikrostruktur, deren Abmessungen in der Größenordnung der Zelldimension lagen, qualitativ und quantitativ belegt werden. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass das Spreading der Osteoblasten auf den Mikropfosten im Vergleich zur planaren Referenz signifikant reduziert war (179; 187). Es bestehen Kenntnisse darüber, dass das Spreading der Zellen auf strukturierten Materialien reduziert ist (17; 160; 202; 204). Sjöström et al. (202) stellten die These auf, dass die Höhe der Strukturen ausschlaggebend für eine Streckung der Zellen und infolge das Spreading der Zellen reduziert ist. Die Filopodien der Osteoblasten waren einerseits in der Lage, die Zwischenräume der Pfosten zu passieren und damit den Boden der Probe zu erreichen. Andererseits nahmen sie an den Ecken und Kanten der Mikropfosten, auch in diagonalen Ausrichtung, Kontakt auf. Die Orientierung und Streckung des Zellkörpers entlang der Strukturen ergaben sich aufgrund der Kontaktführung. Diese Ausrichtung der Zellfortsätze könnte auf einen geometrischen Effekt hinweisen, denn die Abstände zwischen den Pfosten sind in der Reihe kürzer als in der Diagonalen. Um den Einfluss der Dimensionierung der geometrischen Elemente auf die Morphologie noch besser erfassen zu können, sind weitere Versuche mit unterschiedlichen Strukturvariationen bezüglich gestaffelter Abmessungen notwendig (214).

Die an die Topographie angepasste Zellmorphologie wurde auch schon früher beschrieben (19; 160; 202; 215; 211; 216; 217; 218). Nebe et al. (7) zeigten morphologische Unterschiede der MG-63 Zellen auf stochastisch strukturierten Oberflächen im Vergleich zur glatten Kontrollgruppe. Auf Oberflächen mit scharfen Ecken und Kanten (korundgestrahlt) waren Osteoblasten in der Lage diese Strukturen zu überspannen und so eine polygonale Zellform mit langen Ausläufern auszubilden. Auf maschinieren Titanstrukturen hingegen war eine langgestreckte Zellmorphologie entlang der Rillen ausgerichtet nachweisbar. Die Ausrichtung und Streckung der Zellform, sowie die Migration von Zellen entlang einer anisotropen Mikrostruktur (Kontaktführung) wurde auch in anderen Publikationen gezeigt (17; 158; 199; 203; 218; 219). Die Kontaktführung ist in Fibroblasten auf Nanograbenstrukturen bis zu einem Schwellenwert von 35 nm noch nachweisbar (220). Die Erkenntnisse der eigenen Studie und der Literatur bezüglich der Streckung von Zellen auf unterschiedlichen Nano- aber auch Mikrostrukturen zeigen deutlich, dass die Topographie einen Einfluss auf die Zellform besitzt.

Die Adhäsion der MG-63 Osteoblasten begrenzt auf den Mikropfosten konnte eindrucksvoll in der Z-Schnitt-Aufnahme am REM bestätigt werden. Da die

Osteoblasten nur oberhalb der Struktur mit kleinen Flächen innerhalb einer Zelldimension adhärten, haben sie dementsprechend auch eine reduzierte Adhäsionsfläche als die Osteoblasten auf der Referenz, die mit dem gesamten Zellkörper auf der Oberfläche lagen. Die beeinträchtigte initiale Adhäsion (5 min) der Osteoblasten auf den Mikropostenstrukturen konnte im Vorfeld nachgewiesen werden (187). Die quantitative Analyse der initialen Adhäsion der MG-63 Osteoblasten nach 5 min zeigte eine signifikante Abnahme auf der mikrostrukturierten Oberfläche gegenüber der glatten Referenz, aber dieser Nachteil war schon nach 10 min marginal (187). Der negative Einfluss einer Materialtopographie auf die Zelladhäsion konnte auch in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (19; 199; 204). Ein Grund für die Beeinträchtigungen der zellulären Adhäsion und der Ausrichtung der Zellen entlang der Strukturen könnte die Modifikation der Proteinadsorption durch die physiko-chemischen Materialeigenschaften, wie z. B. Topographie, sein (171; 217). Die erste biologische Reaktion auf einer Materialoberfläche ist die Adsorption von Proteinen aus den biologischen Fluidkomponenten - Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) aus dem Komplettmedium *in vitro* oder dem Blutplasma/der Knochenmatrix *in vivo*. Die Oberflächentopographie beeinflusst aufgrund ihrer elektrostatischen Wechselwirkung mit den Proteinen unter anderem deren Konformation, Orientierung und Bindung (7; 21; 221). Elter et al. (20; 222; 223) erkannten mittels einer numerischen Kalkulation ein verändertes Adsorptionsverhalten (Entfaltung) von Proteinen, z. B. Fibronectin, lokal in der Nähe der Ecken und Kanten von Nanostrukturen aufgrund eines höheren lokalen elektrischen Feldes und der Größe des umgebenden Flüssigkeitsvolumen. Die lokale Konformation von Proteinen war durch die örtlichen unterschiedlichen Wechselwirkungen von Protein-Protein- und Protein-Substrat-Wechselwirkungen bestimmt. Eine weitere aktuelle Studie belegte, dass die Dimensionierung stochastischer Oberflächenstrukturen (Länge, Breite, Höhe der Strukturen) im Nanometerbereich zu einer erhöhten Adsorptionseigenschaft des extrazellulären Matrixproteins BSA<sup>49</sup> führt. Diese erhöhte Adsorption des Proteins hatte einen positiven Einfluss auf die Zelldichte durch begünstigte Modellierung der Zellaktivität wie der Adhäsion, der Proliferation und der Organisation von Aktin und Vinkulin (224). Panos et al. (225) zeigten einen Zusammenhang zwischen der kristallinen hydrophilen Oberflächen aus Polyurethane<sup>50</sup>, PEG<sup>51</sup> und der erhöhten Adsorption des Fibronectins. Auch Anselme (19) beobachtete, dass eine Titanoberfläche mit erhöhter Oberflächenenergie und Hydrophilie die strukturelle

---

<sup>49</sup> Rinderalbumin (BSA, vom englischen: bovine serum albumin)

<sup>50</sup> Kunststoffe oder Kunstharze

<sup>51</sup> Poly(ethylene glycol)



Konformation der Proteine an der Materialoberfläche positiv beeinflusste und so die Adhäsion der Osteoblasten begünstigte. Hallab et al. (226) fanden heraus, dass Oberflächen mit hydrophobem Charakter die Proteinadsorption verringerten. Allgemein konnten Hallab et al. (226) nachweisen, dass die topographischen als auch chemischen Materialeigenschaften die Benetzbarkeit und Oberflächenenergie des Materials modifizieren können. In der eigenen Publikation von Matschegewski et al. (187) wurde nachgewiesen, dass die mikrostrukturierten Titanoberflächen mit ihrer 5 µm-Dimensionierung eine erhöhte Hydrophobie und eine verringerte Oberflächenenergie im Vergleich zu planaren Referenzoberflächen besaßen. Die erhöhte Hydrophobie und verringerte Oberflächenenergie konnte in Zusammenhang mit der veränderten Zelladhäsion, dem gestreckten Phänotyp und daraus resultierenden reduzierten Funktion der Osteoblasten gesehen werden. Zhao et al. (165) konnten nachweisen, dass eine hohe Oberflächenenergie entscheidend für die positive Zell-Substrat-Interaktion war. Damit ist der physiko-chemische Einfluss einer Topographie sehr entscheidend für die Proteinadsorption an der Oberfläche und daraus resultierend für die Zellantwort wie das Spreading (171; 199; 217) und sollte in nachfolgenden Studien genauer betrachtet und in Zusammenhang mit den zellbiologischen Parametern in einer mathematischen Modellierung ausgewertet werden.

Ein zweiter Aspekt in der Studie der Zell-Material-Interaktion war die Analyse der zeitlichen und räumlichen Organisation des intrazellulären Aktinzytoskeletts der Osteoblasten auf der geometrischen Mikropfostenstruktur im Vergleich zur planaren Referenzoberfläche. Das Aktinzytoskelett ist verantwortlich für das morphologische und funktionelle Verhalten der Zelle beispielsweise die Übertragung von externen Signalen wie die chemischen, physikalischen und topographischen Eigenschaften eines Materials (z. B. Dimensionalität) (53; 227). Die Zellen sind in der Lage ihre physische Umgebung wahrzunehmen und sich auf diese spezifischen Signale durch das Formatieren intrazelluläre Strukturen wie dem Aktin-Zytoskelett anzupassen (227). So zeigten Studien von Nebe et al. (167; 228) nicht nur eine topographisch induzierte Integrin- und Vinkulinexpression, sondern auch den Einfluss der Topographie auf das Aktinzytoskelett. Nebe et al. (7) beobachteten die zeitabhängige Aktinformation auf glatten Oberflächen in lange Stressfasern, auf einer maschinerten Oberfläche entlang der Strukturen und auf einer sehr rauen Oberfläche mit einer irregulären Verteilung. Die Arbeit von Arnold et al. (206) zeigte, dass Nanostrukturen > 73 nm nicht nur die Zelladhäsion und das Spreading beeinflussten, sondern auch die Formation des Fokalkontaktes und der Aktinstressfasern in den Zellen dramatisch reduzierten. So zeigten Saldana und Vilaboa (208), dass Saos-2 Osteoblasten auf Titanpartikeln im

Mikrometerbereich eine Beeinträchtigung in ihrem Zellverhalten, wie Adhäsion, Spreading, Migration und Proliferation aufwiesen und assoziierten die Demontage des Zytoskeletts in reduzierte Stressfasern mit einer Verringerung der Zelladhäsionsfläche. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Promotionsarbeit.

Die mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesene Organisation des Aktinzytoskeletts in den Osteoblasten auf den Oberflächen erbrachte erstaunliche und neue Erkenntnisse. Auf der Referenzoberfläche organisierte sich das Aktinzytoskelett innerhalb von 24 h in ein Netzwerk aus langen, gut definierten Stressfasern, die typischerweise den gesamten Zellkörper durchspannten. Osteoblasten auf der definierten Mikropfostenstruktur zeigten schon nach einer 30-minütigen Kultivierung den topographischen Einfluss auf die Ausprägung des Aktinzytoskeletts. Nach 24 h war das Ausmaß der topographisch induzierten Organisation der Aktinfilamente in den Osteoblasten eindeutig nachweisbar. Das Aktinzytoskelett organisierte sich nicht mehr in typisch lange Stressfasern, sondern konzentrierte sich irregulär nur noch lokal in der Zelle an den Kanten und Ecken der Mikropfosten in kurzen Fragmenten. Die neuentwickelte Software „FilaQuant“<sup>52</sup> ermöglichte eine automatische Auswertung der Filamente (Gesamtlänge, Dispersion, Anzahl) und bestätigte anhand quantitativer Daten die reduzierte und verkürzte Aktinformation in den Zellen auf den Mikropfosten im Vergleich zu Zellen auf der glatten Referenzoberfläche (179; 213).

Dass die beobachtete Akkumulation des Aktins in den Osteoblasten auf den Pfosten nicht auf einen Artefakt der konfokalen Aufnahmetechnik im LSM zurückzuführen ist, konnte eindeutig anhand von mehreren horizontalen Schnitten nachgewiesen werden. Die Z-Schnitte ergaben, dass sich das Aktin in Form der kurzen Filamente nur apikal eindimensional in der Zelle auf der Mikro-Dimension der Pfostenareale begrenzt ausbildete. In der basalen Ebene waren einige kortikale Aktinfasern am Rand und in den Filopodien ersichtlich, aber innerhalb der Zelldimension reflektierte das Aktinzytoskelett die unterliegende Strukturierung („Mimikry“) (187). Die Beeinträchtigung der Aktinorganisation aufgrund einer Oberflächentopographie wurde auch in anderen Studien beschrieben (169; 207; 216; 229). Zinger et al. (170) beobachtete, dass an unterschiedlichen lokalen topographischen Kanten einer rauen Oberfläche die Bildung von lokalen Fokalkontakten mit der Organisation des Aktinzytoskeletts korrelierte und die Adhäsion regelte. Damit scheint die Formation der

---

<sup>52</sup> In Zusammenarbeit des Arbeitsbereiches Zellbiologie und dem Institut für Mathematik (gefördert von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) -Graduiertenkolleg 1505/1 welisa - „Analyse und Simulation elektrischer Wechselwirkungen zwischen Implantaten und Biosystemen“)

Adhäsionsstrukturen abhängig von der Symmetrie der Topographie zu sein und könnte die verringerte Zelladhäsion und das reduzierte Zellspreeding erklären.

Die deutliche Adaptation des Aktinzytoskeletts an eine Oberflächengeometrie – wie hier nur an lokalen Stellen der Mikropfosten innerhalb einer zellulären Domäne - wurde so noch nicht gezeigt und auch nicht erwartet. Es lag näher, dass die Zellen die Aktinfilamente zwischen den quadratischen Pfosten spannen. Kunz et al. (230) zeigten, dass die Zellen in einem 3-D Konstrukt, mit Lochgrößen bis zu 250 µm, durchaus in der Lage waren ihre Filopodien über weitere Strecken ohne Adhärenz zu überspannen und typische Aktinstressfasern auszubilden.

Die in den MG-63 Osteoblasten gezeigte Adaptation des Aktinzytoskeletts an die Mikropfostenstruktur warf die Frage auf, ob die chemische Beschaffenheit der Materialoberfläche oder auch die Zellkulturbedingungen dafür verantwortlich sein könnten. Nur wenige Studien untersuchen den direkten Zusammenhang zwischen den Oberflächeneigenschaften und den biologischen Parametern (231). Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurde in den Osteoblasten die räumliche Re-Organisation des Aktinzytoskeletts nach einer 24-stündiger Kultivierung unter diversen Modifikationen analysiert. Die Variation hinsichtlich der Materialchemie waren Silizium- oder Goldoberflächen, sowie die Oberflächenfunktionalisierung durch plasmapolymersiertes Allylamin (181). Ebenso wurde die Proteinanlagerung an der Oberfläche durch eine Kollagen-Typ 1-Beschichtung, sowie durch die Kultivierung ohne Zusatz von fetalem Kälberserum (ohne EZM-Proteine wie Fibronectin) variiert. Es wurde eine weitere Kultivierungsart verändert - die Kultivierung entgegen der Gravitation.

Webster et al. (232) diskutierten, dass der Einfluss der Topographie dominant gegenüber der Chemie des Materials sei (233; 234). Diese Erkenntnis ist mit dieser Promotionsarbeit übereinstimmend, da in unseren Versuchen auf allen chemisch variierten Oberflächen der gleiche Effekt auf die Re-Organisation des Aktinzytoskeletts der Zelle in kurzen Fragmenten auf den Mikropfostenstrukturen nachgewiesen wurde.

Die chemische Funktionalisierung der Materialoberflächen mittels plasmapolymersiertem Allylamin (PPAAM) fördert die zelluläre Akzeptanz durch die positiven Ladungsträger auf der Oberfläche (180; 181; 207; 235). Die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit zeigten, dass die Topographie einen der Oberflächenchemie übergeordneten Einfluss auf die Organisation der Aktinfilamente in den Osteoblasten besitzt. Auch auf den funktionalisierten Oberflächen (PPAAM) war die Fragmentierung des Aktinzytoskeletts in den Osteoblasten auf den Mikropfostenstrukturen nachweisbar. Einige Forschergruppen, die sich mit dem Vergleich chemischer Komponenten auf das Zellverhalten beschäftigen, gingen nicht auf die Organisation des Aktinzytoskeletts ein. Die Gruppe um Bogner et al. (236)

beschäftigte sich mit der Entwicklung von zellbasierten Biosensormaterialien und untersuchte in diesem Zusammenhang die Biokompatibilität unterschiedlicher Beschichtungen wie Silizium und Gold. Bogner et al. (236) fanden heraus, dass Silizium, abhängig von der Dotierung, die Adhäsion und Proliferation der Zellen reduzierte. Monsees et al. (17) untersuchten die Effekte verschiedener Titanlegierungen und anderer Metalle auf die Zelladhäsion, Zellausrichtung und Zelldifferenzierung und beobachteten, dass Goldoberflächen, mit einem höheren elektrischen Potential, die Migration der Zellen stimulierten.

Die Proteinadsorption an der Grenzfläche zu einem Biomaterial wird in einer Topographie-abhängigen Art und Weise beeinflusst und resultiert in einer modifizierten Zellantwort, wie Begünstigung der Zelladhäsion und Zellausrichtung (20; 166; 198; 223; 237). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine vorangegangene Proteinadsorption an der Materialoberfläche die Ursache für die Fragmentierung des Aktinzytoskeletts in Zellen auf der Mikropfostenstruktur sein könnte und wurde als ein weiterer Aspekt zur Aufklärung untersucht. Das EZM-Protein Kollagen-Typ I fördert die initiale Zelladhäsion, Fokalkontaktformation und Proliferation von Zellen (238; 239; 240; 241) und wurde daher einerseits als eine Modifikation der Oberfläche in Betracht herangezogen. Die Zellen wurden andererseits für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert, um die Anlagerung gelösten Fibronectins, ebenfalls ein Protein der EZM, zu vermeiden. Teixeira et al. (219) beobachteten in menschlichen Hornhaut-Epithelzellen, dass sich die frühe Adhäsion und Ausrichtung der Zellen auf definierten nano- und mikrostrukturierten Oberflächen in serumfreiem Medium reduzierte. In den eigenen Untersuchungen wurde bei beiden Modifikationen der gleiche Effekt - die Topographie-induzierte Re-Organisation des Aktinzytoskeletts in den Osteoblasten - beobachtet. Als Ursache für das fragmentierte Aktinzytoskelett in den Osteoblasten auf der Pfostenstruktur kann somit die Proteinadsorption an den Ecken und Kanten ausgeschlossen werden.

Um den Einfluss der Schwerkraft auf die Organisation der Aktinfilamente auf den Mikropfostenstrukturen auszuschließen, wurden die Osteoblasten entgegen der Gravitation kultiviert. Curtis et al. (242) beobachteten in humanen Makrophagen auf einer nanostrukturierten Oberfläche einen Topographie-induzierten Abdruck/Prägung in der Plasmamembran und eine Adaptation des Aktinzytoskeletts. Curtis et al. (242) postulierten, dass die Topographie-abhängige Anordnung der Membran Ankerpunkte für das Aktinzytoskelett darstellten. Die Möglichkeit der Zellkultivierung mit dem Zellrasen nach unten auf einem Abstandshalter, wurde in langer Vorarbeit selbst entwickelt und erlaubte die sofortige Adhäsion der Zellen entgegen der Gravitation und so den Ausschluss eines Druckeinflusses auf die Zelle bedingt durch die Schwerkraft während einer normalen zweidimensionalen Zellkultur. Einige Studien berichten über den Einfluss der Schwerelosigkeit auf die Anpassung der Zellfunktion, wie in der

Anzahl reduzierte und verkleinerte Fokalkontakte und Aktinstressfasern (243) oder die Desorganisation des Aktinzytoskeletts (244), die in Folge zur Apoptose der Zellen führte (245). Kunz et al. (230) beobachteten, dass MG-63 Zellen in der Lage waren, poröse Strukturen mit ihren Filopodien auch in einer strikten Adhäsion an Oberflächen entgegen der Schwerkraft zu überspannen und fanden dort Aktinfilamente in langen Stressfasern vor. In der vorliegenden Promotionsarbeit war aber trotz Kultivierung entgegen der Gravitation ein fragmentiertes Aktinzytoskelett auf jedem Mikropfosten im Vergleich zu der glatten Referenzoberfläche nachweisbar.

In der gegenwärtigen Literatur wird das Phänomen der topographisch bedingten Organisation des Aktinzytoskeletts innerhalb der Zelldimension nur gezeigt, aber die Ursache nicht aufgeklärt. Die eigene Promotionsarbeit versuchte eine Erklärung für die Topographie-geprägte Aktinorganisation in den Zellen zu geben. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass wichtige externe Einflüsse wie die Materialchemie, die Ablagerung von Proteinen an den Grenzflächen der Ecken und Kanten, sowie die Schwerkraft als Ursachen für die Organisation des Aktins anzusehen sind (192). Allein der topographische Einfluss scheint der Auslöser dieser Umorganisation des Aktinzytoskeletts in den Osteoblasten zu sein (232). Auch in den primären Osteoblasten (HOB, Promocell) konnte das topographisch adaptierte Aktinzytoskelett unter Modifikationen, wie auf Silizium, Gold-, PPAAM-, Kollagen-beschichtete Oberflächen oder die Kultivierung ohne das Serum bzw. entgegen der Schwerkraft, nachgewiesen werden (182).

Da die Beantwortung der Frage bezüglich der topographisch induzierten Re-Organisation des Aktinzytoskeletts nur zum Ausschluss einiger Einflussfaktoren (wie die Materialchemie) führte, müssen andere Zellparameter und Oberflächeneigenschaften der zugrunde liegenden Mechanismen in Betracht gezogen werden. Lokale elektrostatische Wechselwirkungen könnten an den scharfen Kanten der Strukturen dafür verantwortlich sein (21). So wiesen Kabaso et al. (21) in ihren elektrochemischen Untersuchungen nach, dass die elektrostatischen Kräfte an den Kanten von Mikrostrukturen eine starke Adhäsion der Membran bewirkten und daher die Zellphysiologie beeinträchtigt war. Auch Walboomers et al. (246) behaupteten, dass strukturierte Oberflächen einen lokalen mechanischen Reize ausüben, welches zu einer Anpassung des Aktinzytoskeletts führte.

Prof. Alexander Bershadsky sieht auch in zellulären Prozessen wie der Phagozytose Ursachen in der Umorganisation der Aktinfilamente auf der definierten Mikrostruktur (mündliche Mitteilung bei der IBI 2012<sup>53</sup>). Dass Osteoblasten allgemein in der Lage sind den Fremdkörper Titan zu phagozytieren, konnte in der Literatur nachgewiesen

---

<sup>53</sup> 4ten Symposiums „Interface Biology of Implants“

werden (247; 248). Die dynamische Re-Organisation der Aktinfilamente dient nicht nur der Zelladhäsion (59), der Erhaltung der Zellform und Motilität (56), sondern auch der Phagozytose (249).

In dieser Promotionsarbeit konnte eindrucksvoll der Einfluss der Topographie auf die Zellmorphologie und auf die Organisation des Aktinzytoskeletts zeitabhängig schon nach 30-minütiger Kultivierung nachgewiesen werden (179; 213). Das hatte aber auch funktionelle Konsequenzen für die Osteoblasten. So erbrachten eigene vorangegangene Studien einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Zellarchitektur und einem verminderten Proliferationsvermögen, sowie einer Reduktion der Synthese von wichtigen knochenspezifischen Matrixproteinen (Kollagen-Typ 1 und BSP-2) in den Osteoblasten auf der quadratischen Mikropfostenstruktur (187). In vielen zellbiologischen Studien wurde die Sensitivität der Osteoblasten gegenüber der Topographie des Materials nicht nur in Bezug auf die Organisation von Zellstrukturen, sondern auch in Folge auf die zelluläre Funktion wie eine verminderte osteogene Differenzierung (160; 209) sowie eine verminderte Mineralisierung (169; 171) nachgewiesen (158; 173; 176; 228; 250). Es ist bekannt, dass die Aktindynamik und die spätere Umorganisation wichtige Voraussetzungen für die Migration, das Überleben und der Differenzierung sind (19; 53; 160; 169). Im Gegensatz dazu beobachteten Davidson et al. (200; 251), dass in osteoblasten-ähnlichen Zelllinien (z. B. U2OS und SaOs-2) eine Topographie-abhängige morphologische Veränderung des Zellkerns und der Aktinstressfasern erfolgte, die nicht zwangsläufig zur Funktionsveränderung (Proliferation und alkalische Phosphatase Aktivität) der Zellen führte. Gründe für diese unveränderten Zellfunktionen könnten unter anderen die verwendeten unterschiedlichen Zelllinien sein (186).

## **Signaltransduktion**

Die nachweislich topographisch induzierten phänotypischen Veränderungen warfen Fragen bezüglich der Konsequenzen in der Signaltransduktion auf. Es ist bekannt, dass die Zellen für eine veränderte Umgebung sensitiv sind und darauf reagieren, indem sie die externen Signale über transmembrane Integrine aufnehmen (252). Nach Aktivierung der Integrine bildet sich an ihrer zytoplasmatischen Domäne der Fokalkontakt (beispielsweise Adapterproteine wie Vinkulin) aus, welcher die Integrine mit dem Aktinzytoskelett verbindet (50). Folgend dient das Aktin als Konstrukt für weitere zytoskelettale Proteine und Signalmoleküle (50; 60). Aufgrund der Induktion einer Kaskade von Signalmolekülen wie Proteinkinasen (75; 78; 80) oder der intrazellulären Kalziummobilisierung (61; 62; 96) wird das externe Signal in den Zellkern übertragen,

um die Zellfunktion zu regulieren (55; 60; 64; 79; 253; 254; 255). Dabei ermöglicht das Aktinzytoskelett geordnete Bewegungsabläufe im Zytoplasma (z. B. Fortbewegung, Signaltransduktion) und damit die Anpassung an die gegebene Situation (34; 47; 56; 79; 115) wie beispielsweise die veränderte Oberflächentopographie (128). Hamilton und Brunette (176) zeigten, dass die dynamische Änderung des Zytoskeletts ein intrazelluläres Signal war, welches die Zelldifferenzierung kontrollierte.

Ein wichtiger Fokus dieser Zell-Material-Studie war daher die zeitabhängige Analyse der zellulären aktivierten Signalmoleküle in der Signaltransduktion in Abhängigkeit von der definierten Topographie. Die zeitabhängige Expression einer Vielzahl von phosphorylierten Proteinen wie ERK1/2, MEK1, p38-MAPK, AKT, GSK 3a/b, und IκB-α<sup>54</sup> wurde mit Hilfe des Bio-Plex Systems nachgewiesen. Die Antwort der Osteoblasten auf den geometrisch mikrostrukturierten Titanoberflächen hinsichtlich Aktivierung intrazellulärer phosphorylierter Signalproteine war unerwartet. Erstaunlicherweise zeigten alle aktivierten Proteine der Osteoblasten für die schnell ablaufenden intrazellulären Phosphorylierungsprozesse keine Sensitivität gegenüber geometrischen Mikrostrukturen im direkten Vergleich zur glatten Titanoberfläche. Obwohl die Aktinorganisation mit kurzen Fragmenten innerhalb der zellulären Domäne bereits nach einer 30-minütigen Adhäsion auf der Mikrostruktur nachweisbar war, unterlag die Aktivierung aller Signalproteine interessanterweise eher dem Zeitaspekt als der Topographie (193; 196). Eine mögliche Erklärung für diese stabilen Signalwege könnte die nachgewiesene geringe topographische Sensitivität der Integrin-Untereinheiten sein. Untersuchung zur Präsenz von Integrin-Untereinheiten (α2, α3, β1, β3) von adhären MG-63 Osteoblasten nach 24-stündigem Einfluss von definierten geometrischen Mikrostrukturen zeigten, dass auf der Mikropfostenstruktur nur die β3-Integrin-Untereinheit leicht reduziert exprimiert wurde. Da die Integrine als Mechanorezeptoren ausschlaggebend für die folgende Signaltransduktionsprozesse (134; 256) sind, könnte das die topographisch unabhängigen stabilen Signalwege erklären.

Ein starker Einfluss auf die Signaltransduktion war eher der zeitliche Aspekt – nach 10 min wurden viele phosphorylierte Proteine angesteuert, unabhängig davon auf welcher Topographie die Zellen sich befanden. Das Aktivierungsmuster der Signalproteine AKT, ERK und p38-MAPK - Start der Aktivierung bei 30 min und die Dauer des Phosphorylierungsprozesses bis zu 120 min - ist mit der Literatur übereinstimmend (19; 48; 177).

---

<sup>54</sup> ERK (Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase1/2); p38-MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase); MEK1/ERK1; AKT (Ser/Thr-Proteinkinase); GSK-3 (Synthase Kinase-3); IκBα (Inhibitor von κB-α)

Die Topographie-unabhängige Aktivierung des inflammatorischen Signalproteins  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ , das die Apoptose reguliert (26; 101), ist mit den eigenen vorangegangenen Analyse der Apoptose am Durchflusszytometer konform. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen war auf allen Oberflächen ähnlich gering ( $\sim 0,3\%$ ) (179). Dafür wurde aber ein topographischer Einfluss auf die Proliferation der Osteoblasten nachgewiesen. Jedoch zeigten die aktivierten Proteine der AKT- und MAPK-Signalwege, die die Proliferation und Differenzierung regeln (32; 33; 75; 78; 146; 147), keine topographische Beeinflussung. Obwohl bekannt ist, dass durch Stress Signalwege beeinflusst werden (141; 142), konnten wir keine Beeinflussung durch die Topographie feststellen. Hamilton und Brunette (176) dagegen wiesen eine topographisch induzierte Erhöhung des aktivierten ERK1/2 innerhalb der ersten 2 Stunden auf mikrostrukturierten Oberflächen nach.

Viele Studien in Zusammenhang mit der Mechanotransduktion zeigen eine topographische Beeinflussung der dynamischen Zelladhäsionsstrukturen (Integrine und Aktinzytoskelett), die dann diverse Signalwege regulieren können, gehen aber im Folgenden nicht auf aktivierte Signalproteine ein (50; 158; 175; 208; 227; 257). Des Weiteren werden zur allgemeinen Aufklärung der Signaltransduktionsmechanismen nur einzelne Signalproteine untersucht, aber die Komplexität des gesamten Signalnetzwerkes konnte noch nicht überschaut werden. Nur wenige biochemische Signaltransduktions-Studien sind in Zusammenhang mit dem Wachstum der Zellen auf topographischen Oberflächen veröffentlicht wurden (176; 198; 204; 250; 258; 259).

Watari et al. (250) konnten nachweisen, dass in humanen mesenchymalen Stammzellen nachgeschaltete Gene des  $\text{Wnt}^{55}$  und/oder  $\text{BMP}^{56}$  durch eine Topographie nicht beeinträchtigt waren. Somit ist auch in anderen Studien ein topographisch unabhängiger Effekt auf die Signalwege nachgewiesen worden. Zudem zeigen viele Studien nicht direkt den Nachweis der zentralen Proteine, sondern verwandte in der Signalkette vor- oder nachgeschaltete Signalproteine (204; 250; 259). Einige Studien beschäftigen sich zudem mit der Beeinflussung mechanischer Kräfte/Reize auf die Signaltransduktionswege in den Zellen (61; 75; 78; 96; 135; 252). Pommerenke et al. (75) demonstrierten, dass in primären Osteoblasten eine Aktin-Depolymerisierung durch Cytochalasin D zu einer Störung in der Signaltransduktion führte und stellten daher die Hypothese auf, dass ein intaktes Aktinzytoskelett essentiell für die Immobilisierung von aktivierten Proteinen wie MAP-Kinasen bei einer zyklischen Reizung sei. Asparuhova et al. (260) dagegen zeigten, dass die mechanisch-induzierte

---

<sup>55</sup> Zusammensetzung aus Wingless- und Int-1-Liganden

<sup>56</sup> vom englischen: bone morphogenetic protein



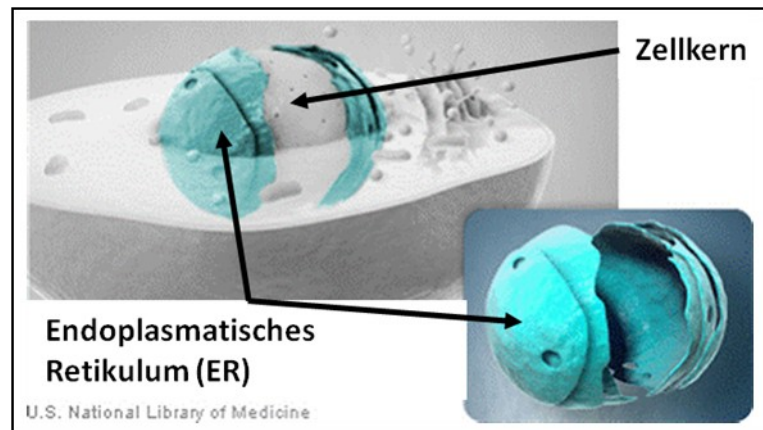
Modellierung des Aktin die Genexpression reguliert, aber unabhängig von einer MAPK-ERK1/2-Aktivierung ist (143; 261). Asparuhova et al. (260) stellten die These auf, dass einige Signalmoleküle wie NF $\kappa$ B oder MAP-K über eine sofortige Signaltransduktion und unabhängig von der Zytoskelettdynamik angesteuert werden, während parallele Signalwege existieren, deren Signalproteine wiederum abhängig von der Aktindynamik sind. Damit können mehrere Signaltransduktionswege in der Zelle in räumlicher und zeitlicher Spezifität durchlaufen werden. Diese Erkenntnis ist mit unseren Ergebnissen übereinstimmend, da die Topographie zwar einen Einfluss auf das Aktinzytoskelett der Zellen ausübt, jedoch nicht auf die Expression der Signalproteine. So dass die These aufgestellt werden kann, dass die Aktivierung der zentralen prominenten Mitglieder der MAPK- und AKT-Signalwege einer stabilen, zeitgesteuerten Regulation unterliegen und unabhängig von der Topographie und damit von der Fragmentierung des Aktinzytoskeletts sind. Jedoch nachfolgende Effektorproteine und Transkriptionsfaktoren die innerhalb der Promotionsarbeit noch nicht identifiziert wurden, aufgrund der konvergierenden Vielfalt/Komplexität der Signalwege einem topographischen Einfluss unterliegen könnten. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war eine erste Übersicht aktivierter Proteine zentraler Signalwege in Abhängigkeit einer Topographie. Weiterführende Experimente zur Expression von aktivierten Signalproteinen könnten Argumente für oder gegen diese These liefern und zur weiteren Aufklärung des Einflusses einer Topographie auf die Aktivierung von Signaltransduktionsprozessen beitragen. Des Weiteren könnten Systembiologen Modelle entwickeln, die interessante Einblicke in die Zeitabhängigkeit intrazellulärer Prozesse nach dem Initialkontakt mit einer Biomaterialoberfläche eröffnen (262).

Zusammenfassend kann kein Einfluss der geometrischen Topographie der Titanoberflächen auf die Aktivierung der Zellsignalproteine gezeigt werden. Im Wesentlichen wird nur eine Wirkung der Zeit auf die Phosphorylierungsprozesse erkannt. Daher bleibt die zentrale Frage offen, wie Osteoblasten den Stimulus der Mikrostrukturen in die Zelle vermitteln, der nachweislich einen negativen Einfluss auf die Zellarchitektur und daraus resultierend auf die Zellfunktion hat. Schwartz et al. (263) zeigten, dass die Effekte einer mikrostrukturierten Oberflächentopographie, wie die verminderte Proliferation, nicht von den Signalproteinen der MAP-Kinasen abhängig waren, sondern von alternativen Signalwegen in den Osteoblasten wie beispielsweise der Phospholipase C-Weg. Dieser ist bekanntermaßen für seine Wirkung auf die intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern (beispielsweise endoplasmatisches Retikulum) essentiell (26; 99; 102; 122; 123). Mechanorezeptoren wie Integrine, Cadherine, Gap Junctions und Kalziumkanäle haben zusammen mit diversen Signaltransduktionswegen einen Einfluss auf die

Zellfunktionen, wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung oder Endozytose (32; 84; 88; 89; 90; 101).

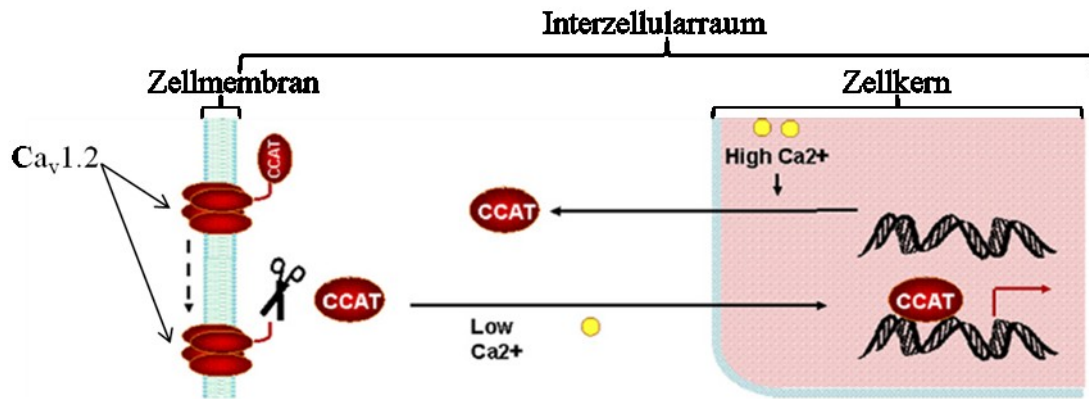
### **Kalziummobilisierung**

Ein weiterer Ansatzpunkt war die Analyse des Einflusses einer definierten Mikrostruktur auf die Kalziummobilisierung in den Osteoblasten. Kalziumionen sind wichtige sekundäre Botenstoffe in vielen regulatorischen Zellprozessen (82; 83; 85; 88; 97; 110). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration wird streng durch beispielsweise spannungsabhängige Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_v$ 's) kontrolliert (86; 95; 97; 100; 102), die eine Integrin-Aktinzytoskelett-Interaktion benötigen (88; 97; 115). Daher war die erste Frage die beantwortet werden musste, ob die Oberflächentopographie die Expression von spannungsabhängigen Kalziumkanälen beeinflusst. Anselme (19) beschreibt, dass die Kalziumkanäle in den Zellen die Antwort auf mechanische Beanspruchung vermitteln. In den Osteoblasten sind wichtige spannungsabhängige Kalziumkanäle sowohl des L-Typs ( $\text{Ca}_v1.2$  und  $-1.3$ ), als auch des T-Typs ( $\text{Ca}_v3.1$ ,  $-3.2$  und  $-3.3$ ) vorhanden. Da in der Literatur immer nur einzelne Kanäle untersucht wurden (117), zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit zum ersten Mal eindrücklich die Expression einer großen Bandbreite spannungsabhängiger Kalziumkanäle in humanen Osteoblasten auf dem Niveau von Kanalsubtypen (193). Die stärkste Expression konnte für die Kanäle  $\text{Ca}_v1.2$  und  $\text{Ca}_v3.1$  dokumentiert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Ergebnis einer anderen Studie die zeigte, dass auf der Basis des mRNA-Expressionsniveaus die beide Kalziumkanäle  $\text{Ca}_v1.2$  (L-Typ) und  $\text{Ca}_v3.1$  (T-Typ) in murinen MC3T3-E1 Prä-Osteoblasten am stärksten exprimiert wurden (117). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigten interessanterweise keine Akkumulation der Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_v$ ) in den Osteoblasten auf der Mikropostenstruktur. Die  $\text{Ca}_v$ 's sind alle homogen innerhalb der Zelldimension verteilt. Besonders auffällig war die Lokalisation des Kalziumkanals  $\text{Ca}_v1.2$  um den Zellkern. Wenig ist über die Lokalisation des Kanals  $\text{Ca}_v1.2$  in der Literatur bekannt. Bergh et al. (117) stellten die These auf, dass dieser Kanal nicht nur in der Zellmembran, sondern auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) exprimiert sein könnte. Da das endoplasmatische Retikulum, ein intrazellulärer Kalziumspeicher, ein von der Kernmembran ausgehendes Kanalsystem ist, könnte die Lokalisation des  $\text{Ca}_v1.2$  in Zellkernnähe dafür sprechen (100; 105) (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Schematische Darstellung von Zellkern und endoplasmatischem Retikulum. (Abbildung nach U. S. National Library of Medicine, <http://www.nlm.nih.gov>).

Anhand einer Doppelfluoreszenzfärbung eines  $\text{Ca}_v1.2\text{-}\alpha 1$ -Epitops, spezifisch für diesen Kalziumkanal, und des Zellkerns (DNA-Färbung) konnte gezeigt werden, dass der Kalziumkanal  $\text{Ca}_v1.2$  in direkter Zellkernnähe lokalisiert war. Mittels der Funktion „Coloc“ am konfokalen Mikroskop LSM780 (Carl Zeiss) konnte dann eindeutig die Kolo-kalisation des Epitops des  $\text{Ca}_v1.2$  und des Zellkerns bestimmt werden. In der Publikation von W. A. Catterall (110) wird beschrieben, dass in Neuronen die C-terminale Domäne des L-Typ Kalziumkanals  $\text{Ca}_v1.2$  abgespalten werden kann und in den Zellkern transloziert, um dort direkt die Transkription zu regulieren (264; 265) (Abbildung 47). Damit ist es im Bereich des Möglichen, dass das nachgewiesene Epitop des  $\text{Ca}_v1.2$  nicht nur auf der Zellmembran, sondern auch im Zellkern lokalisiert vorliegt: im Zellkern nur als ein Fragment welches die Transkription regelt und in der Zellmembran als ganzer Kalziumkanal. Jedoch bindet der spezifische Antikörper des  $\text{Ca}_v1.2$  mutmaßlich am N-Terminus (Firmenangabe). Daher kann die Vermutung aufgestellt werden, dass entweder der Antikörper auch an eine spezifische Sequenz am C-Terminus der  $\alpha 1$ -Untereinheit des  $\text{Ca}_v1.2$  bindet oder in Osteoblasten auch das N-terminus abgespalten werden kann, um im Zellkern als Transkriptionsfaktor Gene zu regulieren.



**Abbildung 47:** Schematische Darstellung eines Signalweges, die die Kalzium-abhängige nukleare Translokation eines C-terminalen Fragments des L-Typ Kalziumkanals (Ca<sub>v</sub>1.2) (CCAT) in den Zellkern zeigt. Das CCAT kann im Zellkern direkt die Transkription aktivieren. (Abbildung nach Chung et al. (264)).

Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben, dass die Mikropostenstruktur die Expression der spannungsabhängigen Kalziumkanäle in den Osteoblasten nicht beeinflusst. Da keine topographische Beeinträchtigung der Kanäle nachgewiesen wurde, könnte das für eine Erklärung der stabilen, topographisch unabhängigen Signalproteine sprechen. Li et al. (88) fanden mittels der Patch-Clamp -Technik heraus, dass ein intaktes Aktinzytoskelett zwar notwendig für intrazelluläre Kalziumdynamik war, aber die Expression der L-Typ Kalziumkanäle nicht abhängig vom Aktin. Li et al. (88) wiesen nach, dass ein fragmentiertes Aktinzytoskelett eher die kinetischen Eigenschaften der Kanäle negativ beeinflusste, aber nicht die Expression. So zeigten auch Chen et al. (266), dass die Flüssigkeit-Scherkraft eine Aktin Re-Organisation verursachte, welche abhängig ist von der IP<sub>3</sub>-vermittelten Kalziumfreisetzung, aber unabhängig vom extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die Kalziumkanäle in der Zellmembran war. Des Weiteren wiesen Duncan et al. (90) nach, dass diese spannungsabhängigen Kanäle eher eine wichtige Rolle bei der Zellantwort auf mechanische Kräfte und Hormonsignale spielten.

In der gegenwärtigen Literatur existieren allgemein nur wenige Informationen über Ionenkanäle in der Zelle (88; 90; 97; 118). Der funktionelle Nachweis diverser Ionenkanäle in Zellen beschränkt sich zumeist auf Natrium- und Kaliumkanäle (267). Speziell der Einfluss einer Topographie auf die Regulation diverser Kalziumkanäle, sowie auf grundlegenden Mechanismen ist nicht bekannt (193).

Somit kann die erste Frage bezüglich der Expression der spannungsabhängigen Kalziumkanäle in Abhängigkeit einer definierten Topographie in dem Sinne beantwortet werden, dass die detektierten spannungsabhängigen Kalziumkanäle in ihrer Expression unabhängig von der darunterliegenden Struktur sind (193). Die zweite Frage

war, ob der Einfluss einer definierten Topographie, die eine Re-Organisation des Aktinzytoskeletts zur Folge hat, auch die intrazelluläre Kalziummobilisierung in den humanen Osteoblasten beeinflusst. Die Regulation der intrazellulären Kalziummobilisierung erfolgt durch eine Bandbreite von Proteinen wie Rezeptoren, beispielsweise Integrine (63; 75; 96), und spannungs-, speicher- und ligandengesteuerte Kalziumkanäle (97; 263; 268). So lassen u. a. auch offene Zellkontakte wie Gap Junctions (98; 99) (Abbildung 2) Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) durch. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen werden aber nicht beschrieben. Nur einige Studien beschrieben den Einfluss mechanischer Stimulierung auf die Kalziummobilisierung (61; 75), die infolge die Osteogenese stimulieren kann (177). So postulierte Anselme (19), dass ein zyklischer Stress die Gap Junction-Kommunikation und damit durch Diffusion von sekundären Botenstoffen wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und  $\text{IP}_3$ <sup>57</sup> diverse Signaltransduktionswege induziert, welche die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern (beispielsweise endoplasmatisches Retikulum) moduliert. Dabei wurde zumeist nachgewiesen, dass die Kalziummobilisierung abhängig von einer intakten Aktinzytoskelett-Organisation war (75; 115; 177). Bei einer Belastung der EZM kommt es zur Verschiebung der Komponenten, die eine Signaltransduktion über das Aktinzytoskelett aufgrund ihrer Verbindung zu Integrinen und Ionenkanälen bewirken (69). So zeigten Pommerenke et al. (75), dass ein fragmentiertes Aktinzytoskelett, induziert durch Cytochalasin D, die Kalziumfreisetzung in den Zellen verhindert. Daher war die These dieser Promotionsarbeit, dass das nachweislich topographisch bedingte fragmentierte Aktinzytoskelett einen Einfluss auf die Kalziumdynamik in den Osteoblasten haben könnte.

Der funktionelle Nachweis der Kalziummobilisierung erfolgte am konfokalen Mikroskop mit dem Kalziumindikator Fluo-3/AM (75; 194; 269). Obwohl sich das Aktinzytoskelett der Zellen nachweislich schon innerhalb der ersten 30 min der Oberfläche mit fragmentierten Filamenten anpasste, konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb der ersten Minuten der Zelladhäsion kein Einfluss einer Topographie auf die Kalziumdynamik vorlag. Sowohl auf der Mikropfostenstruktur, als auch auf der planaren Referenzoberfläche war die intrazelluläre basale Kalziumkonzentration annähernd gleich. Die Osteoblasten zeigten auf beiden Oberflächen eine basale Kalziumkonzentration innerhalb der Aufnahmespannen, die unabhängig von der Topographie war. Nach 24 Stunden war der Einfluss der Mikrostruktur dann deutlich nachweisbar (195). Die Osteoblasten zeigten nach 24 h eine signifikant geringere Kalziumkonzentration auf der Mikropfostenstruktur, während die Osteoblasten auf der

---

<sup>57</sup> Inositol-Triphosphat

planaren Oberfläche nachweislich mehr freie Kalziumionen und eine entsprechende Dynamik zeigten. In den Osteoblasten auf der planaren Oberfläche konnte vor der Stimulation mit ATP (Adenosintriphosphat) beobachtet werden wie ein langsames Kalziumsignal von einer Zelle in die benachbarte überging. Da bekannt ist, dass Zellen über Gap Junctions aufgrund eines direkten Austauschs von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und  $\text{IP}_3$  kommunizieren (19; 41; 99), könnte das die Erklärung für diese Form der langsamen Kalziumdynamik im Vorfeld der Stimulation mit ATP sein. Die Osteoblasten, die auf der mikrostrukturierten Pfostenoberfläche adhärten, zeigten diese Kalziumdynamik im Vorfeld nicht. Um den Einfluss der Topographie auf die Kalziumdynamik genauer zu untersuchen wurden die Zellen mit ATP stimuliert. Die ATP-Stimulation induziert eine schnelle intrazelluläre Freisetzung von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum über den Phospholipase C-Weg (61; 75; 90; 99; 123; 136). Die Stimulation der Osteoblasten mit ATP ergab, dass die Reaktion auf den Pfosten signifikant schwächer als auf der planaren Referenz verläuft.

Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde speziell eine Fluoreszenzintensitäts-Studien am konfokalen Mikroskop durchgeführt, um einen Einfluss der Mikropfosten bei der Rückstreuung der emittierten Signale auszuschließen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mikropfostenstruktur aufgrund seiner Symmetrie und geometrischen Anordnung keine Fluoreszenzverluste bei der Aufnahme am konfokalen Mikroskop verursachte. Zusätzlich wurde auch die relative basale Kalziumkonzentration in den Osteoblasten in Abhängigkeit der Topographie mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Diese durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass der Basalwert an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen topographisch abhängig reduziert vorlag. Der Konzentrationsverlust an freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den adhären Osteoblasten auf der Mikropfostenstruktur bestätigte damit die Untersuchungen am konfokalen Mikroskop.

Des Weiteren bestand die Hypothese, dass die Kalziumionen einen Einfluss auf die Re-Organisation des Aktinzytoskeletts haben. Kalziumionen spielen ebenfalls eine wichtige biochemische Rolle in der Regulierung des dynamischen Verhaltens der Zytoskelettkomponenten (62; 63; 92; 93). In den ersten Minuten der Adhäsion konnte jedoch kein Einfluss der Kalziumdynamik und -konzentration (Kalzium-Imaging suspendierter Zellen) nachgewiesen werden, dafür war aber nach 24 h (Kalzium-Imaging adhärenter Zellen) eine deutliche Reduktion der Kalziumdynamik in den Osteoblasten auf der Mikropfostenstruktur vor und nach der Stimulation mit ATP ersichtlich. Untersuchungen an Enterozyten von Mace et al. (270) unterstützen die eigene These, dass die Inhibition des Kalzium-Freisetzung funktionell mit der Veränderungen des membranständigen Zytoskelett verknüpft ist. Ebenfalls stellten Fukawara et al. (94) die These auf, dass die Bildung des Aktinzytoskeletts sensitiv

gegenüber der Kalziumregulation sei. So stellten auch Ridley et al. (271) fest, dass die für die Zellbewegung benötigte Aktinzytoskelett Re-Organisation in einem hohen Maße vom intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängig ist. Ebenso demonstrierten weitere Studien die Rolle der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der intrazellulären Signaltransduktion, welches benötigt wird zur Aktivierung und Immobilisierung von Signalproteinen (z. B. FAK) an dem Aktinzytoskelett (272). Die dynamischen zytoskelettalen Strukturen sind wichtige Elemente der zellulären Antwort und regulieren verschiedene Signalwege (175). Wang et al. (72) fanden heraus, dass ein mechanischer Reiz das Zytoskelett umorganisierte, wodurch die Mechanotransduktion gleichzeitig an mehreren Orten innerhalb der Zelle vermittelt werden konnte. Sekundäre Botenstoffe, wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, werden in den Signalwegen angesteuert (z. B. Phospholipas C-Weg, Abbildung 8) und üben ebenfalls einen Einfluss auf Signalwege aus (z. B. MAPK-Weg) (136).

Dieser Nachweis des topographischen Einflusses auf die Kalziumfreisetzung ist nach eigenem Erkenntnisstand neu und bestätigt unsere Hypothese, dass die Osteoblasten auf der Mikropfostenstruktur mit einem fragmentierten Zytoskelett eine signifikant geringere Kalziummobilisierung aufweisen. Diese Ergebnisse unterstützen die These, nach welcher Kalziummobilisierung einen Beitrag bei der Vermittlung externer Signale wie eine Oberflächentopographie leistet. Li et al. (88) wiesen nach, dass für eine funktionelle Kalziumdynamik das Aktin notwendig, aber unabhängig von der Expression der spannungsabhängigen Kalziumkanälen in der Zellmembran war (273). Ein spezifischer Nachweis verschiedener Kanaltypen kann durch den Einsatz typischer Inhibitoren wie Mibefradil (T-Typ Kalziumkanalblocker), Thapsigargin (Hemmer der endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) oder Verapamil (Kalziumantagonisten) erreicht werden. Um nicht nur die Expression dieser Kanäle zu untersuchen, sondern auch die funktionelle kinetische Eigenschaft (88), wäre es ebenfalls sinnvoll die Patch-Clamp-Technik anzuwenden. Damit wäre der hier gezeigte Erstnachweis einer Beeinflussung der Kalziummobilisierung in ihren Mechanismen verständlicher und nachvollziehbarer.

Zusammenfassend zeigt diese Promotionsarbeit, dass die topographisch induzierte Zellantwort Ausdruck findet in einer angepassten Zellarchitektur und in einer Reduktion von intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und deren Mobilisierung nach Stimulation mit ATP. Jedoch ist die Expression spannungsabhängiger Kalziumkanäle und aktivierter Proteine von intrazellulären Signalwegen nicht von der Topographie beeinflusst. Damit hat diese Studie einen Neuigkeitswert und kann zu Aufklärung beitragen wie Zellen ein topographisches Signal in die Zellen weiterleiten.

## VI. Schlussfolgerung und Ausblick

Das detaillierte Wissen über den Einfluss der Oberflächentopographie von Biomaterialien auf die Zellphysiologie ist essentiell, um die Integration eines Implantatmaterials in das umgebende Gewebe bewusst regulieren zu können. Die genauen komplexen Mechanismen in Zellen, die an der Grenzfläche zu einem Biomaterial ablaufen, sind aber noch nicht vollständig verstanden. Daher erfolgte in der vorliegenden zellbiologischen Promotionsarbeit die zeitabhängige Analyse der Interaktion von humanen MG-63 Osteoblasten mit einer definierten Mikropfostenstruktur mit dem Fokus auf Zellarchitektur, intrazelluläre Signalwege und Kalziummobilisierung. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigten deutlich, dass die Osteoblasten auf die Mikropfostenstruktur sensitiv reagieren, indem sie ihre Morphologie und die Organisation des Aktinzytoskeletts entsprechend ihrer topographischen Umgebung anpassen. Die Organisation der Aktinfilamente in Form von kurzen Fragmenten auf der Mikropfostenstruktur und nicht mehr in typischen langen Stressfasern scheint allein ein direkter Topographie-abhängiger Effekt zu sein und ist interessanterweise nicht in der Materialchemie, Anlagerung von Proteinen an den Kanten oder *in vitro* Kultivierung mit dem Einfluss der Schwerkraft begründet. Hinsichtlich der Signaltransduktion sind die Ergebnisse der topographisch unabhängigen Aktivierung von zentralen Signalproteinen des AKT- und MAPK-Wegs bemerkenswert. Dennoch war nachweislich eine reduzierte Kalziummobilisierung nach ATP-Stimulation auf der Mikrostruktur ersichtlich in Osteoblasten, die kurze irregulär verteilte Aktinfilamente aufwiesen. Dieser Zusammenhang – Mikrotopographie – Zellarchitektur – Kalziumsignalling – konnte in dieser Promotion erstmals dargestellt werden. Das hier verwendete Modellsystem mit einer geometrischen Mikrostruktur ist gut geeignet zur Aufklärung der zellulären Prozesse an der Biomaterialgrenzfläche. Die Variation der Geometrie und Dimension der Strukturen könnte präzise Effekte einer Topographie aufzeigen und die zellulären Parameter ermitteln, die charakteristisch und stetig auf Topographieänderung der Materialoberfläche reagieren. Zur Validierung der Experimente sollten zukünftig auch primäre humane Osteoblasten-Studien angedacht werden. Des Weiteren könnten Studien mit optischen Techniken wie Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie (TRIFM) zur visuellen Untersuchung der Zell-Material-Interaktion beitragen.

Zur Aufklärung der Komplexität der Zell-Material-Interaktion ist zunehmend die dynamische interdisziplinäre Zusammenarbeit erforderlich, um auch die physikalischen



Kräfte dieser Interaktion oder die elektrostatischen/elektrochemischen Wechselwirkungen der Oberfläche auf das Biosystem zu korrelieren. Informatiker und Systembiologen könnten die biologischen Effekte der intrazellulären zeitabhängigen Regulationsmechanismen in der Signaltransduktion modellieren, um Rückschlüsse auf die Wirkungsweise einzelner Oberflächencharakteristika auf zelluläre Komponenten zu gewinnen. Von großem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Quantifizierung der zellbiologischen Daten, wie z. B. aus konfokalmikroskopischen Bildern, um eine Korrelation der zellbiologischen Parameter mit Parametern aus der Oberflächencharakterisierung zu ermöglichen.

Der in dieser Arbeit gezeigte topographische Einfluss auf zelluläre Strukturen und Zellsignalwege verdeutlicht die Bedeutung der Materialoberflächenbeschaffenheit auf das Biosystem. Daraus können neue Konzeptionen für die Gestaltung von Implantaten abgeleitet werden.

## Anhang A: Abkürzungsverzeichnis

A	Abstand
<i>A.dest.</i>	destilliertes Wasser
AB	Antibiotikum
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskop
AKT	Proteinkinase B
AM	Acetoxymethylester
AMPED	2-Amion-2-methyl-1,3-propandiol
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
B	Breite
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	C-Terminus, Carboxygruppe (–COOH)
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
Ca <sub>v</sub>	spannungsabhängige Kalziumkanäle
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRIE	deep reactive ion etching, reaktives Ionentiepenätzen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting – Durchflusszytometer
FAK	Fokale Adhäsionskinase
F-Aktin	filamentöses Aktin
FE-SEM	Feldemmissions-Rasterelektronenmikroskops
FKS	Fetales Kälberserum
Fluo-3/AM	Kalziumindikator ([2-(2-{2-[Bis(carboxymethyl)amino]-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)phenoxy}ethoxy)-4-methylphenyl](carboxymethyl)amino}acetic acid]
FN	Fibronektin
FSC	forward light scatter, Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GA	Glutardialdehyd
GAG	Glykosaminoglykane
G-Aktin	globuläres Aktin
GSK	Glykogen Synthase Kinase
h	Stunde
H	Höhe
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-buffered-Balanced Salt Solution

HEPES-BSS	HEPES – gepufferte Salzlösung
HOB	humane Osteoblasten
HVA	High-voltage-activated
IgG	Immunglobulin G
IκB	Inhibitory 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kDa	Kilo-Dalton
L	Länge
LSM	Laser-Raster-Mikroskop
L-Typ Ca <sub>v</sub>	Kalziumkanaltyp long & lasting
LVA	Low voltage-activated
MAP-K	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
max	maximal
MEK	MAPK/ERK kinase
MFI	Mean Fluoreszenzintensität (mittlere Fluoreszenzintensität)
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
min	Minute
ml	Millimeter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
N	N—terminales Ende, Aminogruppe (–NH <sub>2</sub> )
Na	Natrium
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
N <sub>GZ</sub>	Anzahl der Gesamtzellen
N <sub>NaZ</sub>	Anzahl nicht-adhärenter Zellen
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
p*	Irrtumswahrscheinlichkeit
p-	Phospho-
P	Passage
pAK	Primärantikörper
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Personal Computer
PFA	Paraformaldehyd
PKB	Proteinkinase B (AKT)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMT	photomultiplier tube, Photovervielfacher
PPAAm	Plasmapolymerisiertes Allylamin
Raf	Ratten Fibrosarcoma
Ras	Ratten Sarcoma
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Aminosäuresequenz aus 3 L-Aminosäuren: Arginin, Glycin, Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
S(x)	Segmente der Proteine

sAK	Sekundärantikörper
SD	Standardfehler
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SE	Sekundärelektronendetektor
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Thr	Threoninkinasen
TNS	Trypsin Neutralization Solution
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyana
T-Typ Ca <sub>v</sub>	Kalziumkanaltyp tiny & transient
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem, unter anderen
UV	Ultraviolett
UV-VIS	ultraviolettes und sichtbares (engl. visible) Licht
Vf	Verdünnungsfaktor
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
Z	Zellzahl
ZAK	Ziege-Anti Kaninchen, Sekundärantikörper
ZAM	Ziege-Anti Maus, Sekundärantikörper
z. B.	Zum Beispiel
Zellen/cm <sup>2</sup>	Zellen pro Quadratzentimeter
ZfM	Zentrum für Mikrotechnologie
%	Prozent

**Probenbezeichnung:**

Ref	glatte Oberfläche aus Silizium mit 100 nm Titan
P-5x5	Pfostenstruktur mit den Abmaßen 5x5x5 µm (LxBxH)
Si	Siliziumoberflächen
Au	Gold-beschichtete Oberflächen
Col	Kollagen-beschichtete Oberflächen
PPAAm	beschichtete Oberflächen mit plasmapolymersierten Allylamin
-Gravi	Oberflächen entgegen der Schwerkraft kultiviert
-FKS	Kultivierung der Oberflächen ohne FKS
Si-Ti	Silizium-Titan-Oberflächen
SiO <sub>2</sub>	Siliziumoxid
Ti	Titan
TiO <sub>2</sub>	Titanoxid

## Anhang B: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Röhrenknochens .....	4
Abbildung 2: Schema der Zell-Material-Interaktion.....	6
Abbildung 3: Schema der Verankerung von Zellen mit der extrazellulären Matrix .....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aktins .....	10
Abbildung 5: Schema der Signaltransduktion über Integrinrezeptoren .....	12
Abbildung 6: Schema der Kalziumhomöostase in den Zellen .....	14
Abbildung 7: Schema des Aufbaus eines spannungsabhängigen Kalziumkanal .....	15
Abbildung 8: Schema des Phospholipase C-Weges in der Zelle .....	17
Abbildung 9: Schematische Darstellung des MAP-Kinase-Signalweges .....	19
Abbildung 10: Schematische Darstellung des AKT- und NF $\kappa$ B-Signalweges .....	20
Abbildung 11: Schema des Produktionsprozesses .....	25
Abbildung 12: Abmessungen der verwendeten Pfostenstruktur (P-5x5).....	26
Abbildung 13: Schema des Prinzips der Immunfluoreszenzfärbungen mit ihrer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion .....	31
Abbildung 14: Prinzip des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops .....	32
Abbildung 15: Schema der Durchflusszytometrie .....	34
Abbildung 16: Kultivierung von humanen Osteoblasten für 24 Stunden .....	36
Abbildung 17: Schema der Kultivierung entgegen der Gravitation.....	37
Abbildung 18: Schema des Kalzium-Imaging .....	41
Abbildung 19: Exemplarische Beispiele der konfokalmikroskopischen Aufnahmen mit den gesetzten definierten Bereichen .....	42
Abbildung 20: Methodvalidierung zur Analyse der Fluoreszenzintensität mittels PKH-26 Zellmembran-gefärbter MG-63 Osteoblasten .....	43
Abbildung 21: Prinzip des Bio-Plex-Phosphoprotein-Assays .....	46
Abbildung 22: Rasterelektronmikroskopische Aufnahme der glatten Referenzstruktur .....	49
Abbildung 23: Rasterelektronmikroskopische Aufnahmen des Mikropfostenprofils (P-5x5).....	50
Abbildung 24: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen subkonfluenten humanen Osteoblasten MG-63 in Kultur .....	51
Abbildung 25: FE-SEM Aufnahmen von MG-63 Osteoblasten auf den Oberflächen.....	53
Abbildung 26: Detaillierte rasterelektronmikroskopische Aufnahmen von Osteoblasten auf der definierten Mikropfostenstruktur nach 24 h .....	54
Abbildung 27: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von intrazellulären Aktinfilamenten .....	56
Abbildung 28: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von intrazellulären Aktinfilament-Strukturen .....	57
Abbildung 29: Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines Z-Stapels der Aktinfilamente.....	58
Abbildung 30: Organisation des Aktinzytoskeletts von Osteoblasten nach 24 h auf chemisch funktionalisierten Mikropfosten sowie unter modifizierten Kultivierungsbedingungen .....	60
Abbildung 31: Zeitabhängige Phosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$ .....	62
Abbildung 32: Zeitabhängige Phosphorylierung von Signalproteinen des AKT-Signalweges .....	63
Abbildung 33: Zeitabhängige Phosphorylierung von Signalproteinen des MAPK-Signalweges .....	64
Abbildung 34: Zeitabhängige Phosphorylierung des p38-MAPK .....	65
Abbildung 35: Histogramm der Fluoreszenzintensität (FL1-H) von spannungsabhängigen T- und L-Typ Kalziumkanälen.....	66

Abbildung 36: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von spannungsabhängigen Kalziumkanälen.....	67
Abbildung 37: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von spannungsabhängigen Kalziumkanälen .....	68
Abbildung 38: Konfokalmikroskopische Aufnahmen des Kalziumkanals $Ca_v1.2$ und des Zellkerns in Osteoblasten auf der Referenz nach 24 h .....	70
Abbildung 39: Exemplarische Beispiele der konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Zeitserien der Kalziummobilisierung in adhärenenten Osteoblasten nach 24 h Kultur .....	72
Abbildung 40: Exemplarisches Beispiel der konfokalmikroskopischen Aufnahmen aus einer Zeitserie der Kalziummobilisierung in 24 h adhärenenten MG-63 Osteoblasten .....	73
Abbildung 41: Analyse der Kalziummobilisierung (Kalziumsignalintensitäten) der adhärenenten Fluo-3 gefärbten Osteoblasten .....	74
Abbildung 42: Exemplarische Beispiele der konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Kalziummobilisierung in MG-63 Zellen während der ersten Minuten der Adhäsion .....	75
Abbildung 43: Analyse der Kalziummobilisierung (Kalziumsignalintensitäten) der adhärierenden Fluo-3 gefärbten Osteoblasten .....	76
Abbildung 44: Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Kalziumkonzentration .....	77
Abbildung 45: Zusammenfassung der wesentlichen zellulären Reaktionen .....	80
Abbildung 46: Schematische Darstellung von Zellkern und enoplasmatischem Retikulum .....	93
Abbildung 47: Schematische Darstellung eines Signalweges (CCAT) .....	94

## Anhang C: Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkulturzusätze mit Angabe der Firmen .....	106
Tabelle 2: Substanzen unter Angabe der entsprechenden Firmen .....	106
Tabelle 3: Zusammensetzung der HEPES-Puffer für das Kalzium-Imaging.....	107
Tabelle 4: Verwendete Antikörper und entsprechende Firmen für die zytometrischen Analysen ....	108
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien für die Proteinanalysen mit Angaben der Firmen .....	108
Tabelle 6: Verwendete phosphorylierte Antikörper für das Bio-Plex-Phosphoprotein-Assay (Bio-Rad) .....	109
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien mit Angabe der entsprechenden Firmen .....	109
Tabelle 8: Verwendete Laborgeräte und entsprechende Firmenangaben .....	110

## Anhang D: Lösungen, Puffer und Medien

### 1. D.1 Medien & Zellkulturzusätze

Tabelle 1: Zellkulturzusätze mit Angabe der Firmen

AMPED (2-Amin-2-methyl-1,3-propandiol [ $>99\%$ ])	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Casy® tone	Schärfer System, Roche Innovatis AG, Basel, CH
Collagen Type I Rat tail 100 mg	BD Biosciences, Erembodegem, BE
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Gibco®, Darmstadt
Dulbecco's PBS (1x) without Ca/Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Ethanol	Zentralapotheke, Universität Rostock
Fetales Kälberserum (FKS) Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Gentamicin 40 mg/ml	Ratiopharm GmbH, Ulm
Glutardialdehyd-Lösung 25 %	MERCK KGAA, Darmstadt
Plasmocin 50-25 mg/ml	Life Technologies GmbH, Gibco®, Darmstadt
Trypsin-EDTA (0,05 %)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A

### 2. D.2 Reagenzien für Zytometrische Analysen

Tabelle 2: Substanzen unter Angabe der entsprechenden Firmen

ATP (Adenosine-5'-triphosphate·Na <sub>2</sub> -salt)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Azeton	J.T. Baker, Deventer, NL
Bovines Serum Albumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
D-Glucose	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MERCK KGAA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Ethanol	Zentralapotheke, Universität Rostock



FACS FLOW	BD Biosciences, Erembodegem, BE
FAST RED VIOLET LB Salt	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Fluoroshield	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
HBSS	Life Technologies GmbH, Darmstadt
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Life Technologies GmbH, Gibco®, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Methanol	MERCK KGAA, Darmstadt
Naphtol AS-MX, phosphate	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd (PFA)	MERCK KGAA, Darmstadt
RNase	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Triton-X 100	MERCK KGAA, Darmstadt

Tabelle 3: Zusammensetzung der HEPES-Puffer für das Kalzium-Imaging

<u>HEPES-Puffer I:</u>	8,01 g NaCl (137 mM)
	0,3728 g KCl (5 mM)
	10 ml HEPES (10 mM)
	0,9 g D-Glucose (5 mM)
	0,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 mM)
	0,15 g CaCl <sub>2</sub> (1 mM)
	0,1 g MgCl <sub>2</sub> (0,5 mM)
	1 g BSA
<u>HEPES-Puffer II (hypotonisch):</u>	0,8001 g NaCl (13,7 mM)
	0,3728 g KCl (0,5 mM)
	10 ml HEPES (10 mM)
	0,9 g D-Glucose (5 mM)
	0,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 mM)

0,15 g CaCl<sub>2</sub> (1 mM)0,1 g MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM)

1 g BSA

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und entsprechende Firmen für die zytometrischen Analysen

<u>Primärantikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Ca <sub>v</sub> 1.2 (Anti-Human Ca <sub>v</sub> 1.2), N-Terminus	Alomone Labs, Jerusalem, IL
Ca <sub>v</sub> 1.3 (Anti-Ca <sub>v</sub> 1.3), Loop (2ter – 3ter Domäne)	Alomone Labs, Jerusalem, IL
Ca <sub>v</sub> 3.1 (Anti-Ca <sub>v</sub> 3.1), N-Terminus	Alomone Labs, Jerusalem, IL
Ca <sub>v</sub> 3.2 (Anti-Ca <sub>v</sub> 3.2), Loopverbindung (D1-D2)	Alomone Labs, Jerusalem, IL
Ca <sub>v</sub> 3.3 (Anti-Ca <sub>v</sub> 3.3), Intrazellulär zwischen TM12-13	Alomone Labs, Jerusalem, IL
IgG (Mouse IgG1 Pure) = Kontrolle	BD, Becton Dickinsons and Company, USA
Fluo-3 (Acetoxymethyl Ester)	Life technologies GmbH, Molecular Probes Darmstadt
Hoechst (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit For general cell membrane labeling	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Phalloidin – TRITC (Aktin)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG	Life Technologies GmbH, Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG	Life Technologies GmbH, Invitrogen, Darmstadt

### 3. D.3 Reagenzien für Proteinexpression

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien für die Proteinanalysen mit Angaben der Firmen

Azeton	J.T. Baker, Deventer, NL
BioPlex® Cell-Lysis Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
BioPlex® Phosphoprotein Assays	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

BioPlex® Phosphoprotein Detection Reagent Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Criterion™TGX Stain-Free™ Precast Gel (4–15 %)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Ethanol	Zentralapotheke, Universität Rostock
Page-Blue™Protein Staining Solution	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Tabelle 6: Verwendete phosphorylierte Antikörper für das Bio-Plex-Phosphoprotein-Assay (Bio-Rad)

Phospho-ERK1/2 (Thr <sup>202</sup> /Thr <sup>204</sup> , Thr <sup>185</sup> /Thr <sup>187</sup> ) Assay – Extracellular-signal Regulated Kinasen
Phospho-p38 MAPK (Thr <sup>180</sup> /Thr <sup>182</sup> ) Assay – p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
Phospho-MEK1 (Ser <sup>217</sup> /Ser <sup>221</sup> ) Assay – MAPK/ERK kinase 1
Phospho-GSK3α/β (Ser <sup>21</sup> /Ser <sup>9</sup> ) Assay – Glykogen Synthase Kinase 3
Phospho-IkappaB-α (Ser <sup>32</sup> /Ser <sup>36</sup> ) Assay – Inhibitory kappaB protein-alpha
Phospho-Akt (Ser <sup>473</sup> ) Assay

#### 4. D.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien mit Angabe der entsprechenden Firmen

Deckgläser: 10 x 10 mm, Dicke: 0,17 mm	Menzel, Braunschweig
FACS Falcon 5 ml (Rundbodenröhrchen)	BD Biosciences, Erembodegem, BE
Filterpapier	Whatman International Ltd., Maidstone, UK
flexiPERM®	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One), Darmstadt, Deutschland
Glasware: Messbecher, Bechergläser	JENAer Glas
IBIDI Schalen (μ-Dish 35 mm, high)	Ibidi LLC, Verona, WI, USA
Kryoröhrchen Cryo.S	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One), Darmstadt
Objektträger, 76x26 mm	Engelbrecht, Edermünde
Pasteurpipetten	Plastibrand, BRAND, Werthheim
Pipettenspitzen: 10 μl, 100 μl, 1000 μl, 5000 μl	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One),

	Darmstadt
Pipette (serologisch): 5 ml, 10 ml, 25 ml	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One), Darmstadt
Röhrchen: 50 ml, 15 ml, 12 ml	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One), Darmstadt
Safe-Lock-Tubes: 2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen: T <sub>25</sub> , T <sub>75</sub>	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One), Darmstadt
Zellkulturplatten: 4-well Nunc	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Zellkulturplatten: 6-well, 12-well, 24-well, 96-well	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One), Darmstadt
Zellkulturschalen: 35 mm, 60 mm	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One), Darmstadt
Zellschaber	Life Technologies GmbH (Greiner Bio-One), Darmstadt

## 5. D.5 Laborgeräte

Tabelle 8: Verwendete Laborgeräte und entsprechende Firmenangaben

Absaugsystem VACUSAFE comfort	INTEGRA Biosciences GmbH, Fermwald
Auflichtmikroskop (invers) Axiovert 25 & 100	Carl Zeiss, Oberkochen
Bio-Plex 200 array System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
CASY® Cell Counter + Analyser System Modell TT	Schärfer System, Roche Innovatis AG, Basel, CH
CO <sub>2</sub> Brutschrank - Serie CB	BINDER GmbH, Tuttlingen
FACSCalibur	BD Biosciences - Becton Dickinson, Erembodegem, BE
Feldemissionsmikroskop (FE-SEM) SUPRA™25	Carl Zeiss, Oberkochen
Heizblock: MHR13	HCL, BioTech, Bovenden
Imager: Universal Hood II	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Kamera AxioCamICc1	Carl Zeiss, Oberkochen
Konfokales Laser-Raster-Fluoreszenz-Mikroskop LSM 410 & LSM780	Carl Zeiss, Oberkochen

Kritisch-PunkttrocknerK850	Emitech, Taunusstein
Kühlschranke	LIEBHERR, Ochsenhausen
Membranpumpe: ME2	Vacuubrand, Wertheim,
Pipetten: 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 200 – 1000 µl, 1000 - 5000 µl	Eppendorf, Hamburg,
Pipettierhelfer: (Accu®Jet pro)	BRAND GmbH + CO KG, Wertheim
Rasterelektronenmikroskop (REM) DSM 960A	Carl Zeiss, Oberkochen
Schüttler: ST 5 CAT	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Schüttler: MTS 2/4 digital	IKA GmbH + CO KG, Staufen
Spektralphotometer: GENESYS 10 Bio UV-Vis	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Sputter Coater SCD 004	BAL-TEC, Macclesfield, UK,
Sterilbank: Safeflow 1.2	Nunc™, Wiesbaden
Ultraschallgerät: Sonifier 250	BRANDSON Ultrasonics, Danbury, CT, USA
Vortex-Mixer: REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kelheim
Wasserbad: Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge: Centrifuge 5417R (mit Kühlung für Tubes)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Centrifuge 5810R (für 10 - 50 ml Röhrchen)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Force 512 (Tischzentrifuge für Tubes ohne Kühlung)	Select BioProducts, Edison NJ, USA
Zentrifuge: Universal 16A	Hettich, Tuttlingen

## Literaturverzeichnis

1. **Epple M, Rueger JM.** Festkörperchemie und Chirurgie. *Nachr Chem tech Lab.* 47, 1999, S. 1405-1410.
2. **Williams DF.** On the nature of biomaterials. *Biomaterials.* 30 (30), Oktober 2009, S. 5897-5909.
3. **Wintermantel E, Ha S (eds.).** *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen.* 3. Auflage. Berlin : Springer-Verlag, 2002. ISBN 3-540-41261-1.
4. **Helmus MH, Gibbons DF and Cebon D.** Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. *Toxicol Pathol.* Vol. 36, Januar 2008, No. 1, S. 70-80.
5. **Griffith LG.** Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Ann NY Acad Sci.* 961, 2002, S. 83-95.
6. **Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Poh C, Wang W.** Titanium with surface-grafted dextran and immobilized bone morphogenetic protein-2 for inhibition of bacterial adhesion and enhancement of osteoblast functions. *Tissue Eng Part A.* 15 (2), Februar 2009, S. 417-426.
7. **Nebe JB, Luethen F and Rychly J.** *Metallic Biomaterial Interactions.* [Hrsg.] Kirkpatrick CJ, Thull R Breme J. s.l. : WILEY-VCH, 2008. S. 215-221. ISBN 978-3-527-31860-5.
8. **Schnabel P, Borelli S.** Höchste Anforderungen genügen. *Deutsches Ärzteblatt.* 108 (48), 2011, S. A2598-2602.
9. **Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM.** The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 13 (1), 2005, S. 77-86.
10. **Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P.** *Titanium in medicine.* Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2001. ISBN 3-540-66936-1.
11. **Weitz, B.** *Atlas der Anatomie - Organsysteme und Strukturen in 439 Abbildungen.* Augsburg : Weltbild Verlag, 1998. ISBN-3-89604-739-6.
12. **Benningerhoff A, Drenckhahn D.** *Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1.* München : Urban & Fischer in Elsevier, 2008. ISBN-978-3-437-42342-0.
13. **Zuo C, Huang Y, Bajis R, Sahih M, Li YP, Dai K, Zhang X.** Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. *Osteoporos Int.* 23 (6), Juni 2012, S. 1653-1663.
14. **van den Barg F.** *Angewandte Physiologie 1: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen.* 3. Auflage. Stuttgart : Thieme Verlag, 2011. ISBN 978-3-13-167583-5.
15. **Schiebler TH, Korf H-W.** *Anatomie.* Berlin : Steinkopff Verlag, 2007. ISBN 978-3-7985-1770-7.
16. **Martin TJ, Natlie AS, Quinn JMW.** *Interactions among Osteoblasts, Osteoclasts, and other cells in bone.* [Hrsg.] Choi Y, Horowitz M, Takayanagi HO Lorenzo JA. s.l. : Academic Press, 2010. ISBN-10: 0-12-375670-7.
17. **Monsees TK, Barth K, Tippelt S, Heidel K, Gorbunov A, Pompe W, Funk RH.** Effects of different titanium alloys and nanosize surface patterning on adhesion, differentiation, and orientation of osteoblast-like cells. *Cells Tissues Organs.* 180 (2), 2005, S. 81-95.
18. **Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie.* s.l. : WILEY-VCH Verlag GmbH, ISBN 3-527-30101-1, 1999.
19. **Anselme K.** Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 21, 2000, S. 667-681.
20. **Elter P, Lange R, Beck U.** Atomic force microscopy studies of the influence of convex and concave nanostructures on the adsorption of fibronectin. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 89, 2012, S. 139-146.

21. **Kabaso D, Gongadze E, Perutková S, Matschegewski C, Kralj-Iglic V, Beck U, van Rienen U, Iglic A.** Mechanics and electrostatics of the interactions between osteoblasts and titanium surface. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 14 (5), Mai 2011, S. 469-482.
22. **McGarth JL.** Cell spreading: the power to simplify. *Curr Biol.* 17 (10), 2007, S. R357-358.
23. **Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B.** Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Transact.* 32, 2004, S. 416-420.
24. **Karp G.** *Molekulare Zellbiologie.* Berlin; Heidelberg : Springer Verlag, 4. Auflage, 2005. ISBN 3-540-23857-3.
25. **Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain AC, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB.** *Biology.* s.l. : Pearson Benjamin Cummings; 8 edition, 2008. ISBN-10: 0805368442.
26. **Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE.** *Molekulare Zellbiologie.* Heidelberg; Berlin : Spektrum Akademischer Verlag; 4. Auflage, 2001. ISBN-3-8274-1077-0.
27. **Lutolf MP, Hubbell JA.** Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 23 (1), 2005, S. 47-55.
28. **Hynes RO.** Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69, 1992, S. 11-25.
29. **Ruoslahti E.** Integrins. *J Clin Invest.* 87, 1991, S. 1-5.
30. **Yamada KM, Pankov R, Cukiermann E.** Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res.* 36, 2003, S. 959-966.
31. **Hynes RO.** The dynamic dialogue between cells and matrices: implication of fibronectin's elasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 1999, S. 2588-2590.
32. **Clark EA, Brugge JS.** Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science.* 268, 1995, S. 233-239.
33. **Chu CL, Reenstra WR, Orlow DL, Svoboda KK.** Erk and PI-3 Kinase Are Necessary for Collagen Binding and Actin Reorganization in Corneal Epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 2000, S. 3374-3382.
34. **Brakebusch C, Fässler R.** The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* 22, 2003, S. 2324-2333.
35. **Juliano RL, Haskill S.** Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 120, 1993, S. 577-585.
36. **Aplin AE, Howe AK, Juliano RL.** Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 1999, S. 737-744.
37. **Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA.** Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials.* 26 (2), 2005, S. 137-146.
38. **Humphries JD, Byron A, Humphries MJ.** Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 119, 2006, S. 3901-3903.
39. **Brown E, Dejana E.** Cell-to-cell contact and extracellular matrix: Editorial overview: Cell-cell and cell-matrix interactions — running, jumping, standing still. *Current Opinion in Cell Biology.* 15, 2003, S. 505-508.
40. **Juliano RL.** Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrin, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members. *Annu rev Pharmacol Toxicol.* 42, 2002, S. 283-323.
41. **Wiemann M, Gramsch B, Schirmacher K.** Loss of Cx43 augments ATP-mediated calcium signals of osteoblast-like cells. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik.* 35 (12), 2004, S. 968-971.
42. **Delon I, Brown NH.** Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 19 (1), 2007, S. 43-50.
43. **Giancotti FG, Ruoslahti E.** Integrin signaling. Review Signal transduction. *Science* 285. 285, 1999, S. 1028-1033.
44. **Garratt AN, Humphries MJ.** Recent insights into ligand binding, activation and signalling by integrin adhesion receptors. *Acta Anat (Basel).* 154 (1), 1995, S. 34-45.

45. **Zamir E, Geiger B.** Molecular complexity and dynamics of cellmatrix adhesions. *J Cell Sci.* 114, 2001, S. 3583-3590.
46. **Calderwood DA, Ginsberg MH.** Talin forges the links between integrins and actin. *Nat Cell Biol.* 5, 2003, S. 694-695.
47. **Dedhar S, Hannigan GE.** Integrin cytoplasmatic interactions and bidirectional transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 8, 1996, S. 657-669.
48. **Legate KR, Wickström SA, Fässler R.** Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23 (4), 2009, S. 397-418.
49. **Ingber DE.** Tensigrety II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J. Cell Sci.* 116, 2003, S. 1397-1408.
50. **Schwarz US, Gardel ML.** United we stand – integrating the actin cytoskeleton and cell–matrix adhesions in cellular mechanotransduction. *J Cell Sci.* 125 (Pt 13), 2012, S. 3051-3060.
51. **Richardson A, Parsons JT.** Signal transduction through integrins: A central role for focal adhesion kinase? *BioEssays.* 17, 1995, S. 229-236.
52. **Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM.** Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature.* 468 (7323), 2010, S. 580-584.
53. **Stricker J, Falzone T, Gardel ML.** Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *J Biomech.* 43 (1), 2010, S. 9-14 .
54. **Aratyn-Schaus Y, Oakes PW, Gardel ML.** Dynamic and structural signatures of lamellar actomyosin force generation. *Mol Biol Cell.* 22 (8), 2011, S. 1330-1339.
55. **Ingber DE.** Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci.* 116, 2003, S. 1157-1173.
56. **Bershadsky AD, Kozlov MM.** Crawling cell locomotion revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (51), 2011, S. 20275-20276.
57. **Desouza M, Gunning PW, Stehn JR.** The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture.* 2 (3), 2012, S. 75-87.
58. **Pantaloni D, Boujemaa R, Didry D, Gounon P, Carlier MF.** The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol.* 2 (7), 2000, S. 385-391.
59. **Small JV, Rottner K, Kaverina I.** Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 11 (1), 1999, S. 54-60.
60. **Zaide-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B.** Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology.* 9 (8), 2007, S. 858-868.
61. **Nebe B, Rychly J, Knopp A, Bohn W.** Mechanical induction of  $\beta$ 1-integrin-mediated calcium signaling in a hepatocyte cell line. *Exp Cell Res.* 218, 1995, S. 479-484.
62. **Nebe B, Bohn W, Sanftleben H, Rychly J.** Induction of linkage between integrins and the cytoskeleton depends on intracellular calcium in an epithelial cell line. *Exp Cell Res.* 229, 1996, S. 100-110.
63. **Nebe B, Bohn W, Pommerenke H, Rychly J.** Flow cytometric detection of the association between cell surface receptors and the cytoskeleton . *Cytometrie* 28. 1997, S. 66-73.
64. **Yamada KM, Miyamoto S.** Intergin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol.* 7, 1995, S. 681-689.
65. **Ingber DE.** Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Ann Med.* 35, 2003, S. 564-577.
66. **Assoian RK, Klein EA.** Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trens Cell Biol.* 8 (7), 2008, S. 347-352.
67. **Stupack DG.** The biology of integrins. *Oncology.* 21 (9 Suppl 3), 2007, S. 6-12.



68. **Berrier AL, Yamada KM.** Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 213 (3), 2007, S. 565-573.
69. **Duncan RL, Turner CH.** Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int.* 57 (5), 1995, S. 344-358.
70. **Ingber DE.** Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol.* 3, 1991, S. 841-848.
71. **Lemmon MA, Schlessinger J.** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 141 (7), 2010, S. 1117-1134.
72. **Wang N, Butler JP, Ingber DE.** Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science.* 260, 1993, S. 1124-1127.
73. **Otey CA, Carpen O.** Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58 (2), 2004, S. 104-111.
74. **Plopper GE, McNamee HP, Dike LE, Bojanowski K, Ingber DE.** Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell.* 6 (10), 1995, S. 1349-1365.
75. **Pommerenke H, Schmidt C, Dürr F, Nebe B, Lüthen F, Muller P, Rychly J.** The mode of mechanical integrin stressing controls intracellular signaling in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 17, 2002, S. 603-611.
76. **Boutahar N, Guignandon A, Vico L, Lafage-Proust MH.** Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation. *J Biol Chem.* 279 (29), 2004, S. 30588-30599.
77. **van der Flier A, Sonnenberg A.** Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305 (3), 2001, S. 285-298.
78. **Schmidt C, Pommerenke H, Dürr F, Nebe B, and Rychly J.** Mechanical Stressing of Integrin Receptors Induces Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Cytoskeletally Anchored Proteins. *J Biol Chem.* 273, 1998, S. 5081-5085.
79. **Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM.** Transmembrane crosstalk between the cellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 2001, S. 793-805.
80. **Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM.** Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.* 131, 1995, S. 791-805.
81. **Thompson WR, Rubin CT, Rubin J.** Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene.* 503 (2), 2012, S. 179-193.
82. **Carafoli E.** Calcium signaling: A tale for all seasons. *PNAS.* 99 (3), 2002, S. 1115-1122.
83. **Bootman MD, Berridge MJ, Roderick HL.** Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol.* 12 (16), 2002, S. 563-565.
84. **Whitaker M.** Calcium microdomains and cell cycle control. *Cell Calcium.* 40 (5-6), 2006, S. 585-592.
85. **Berridge MJ, Bootmann MD, Lipp P.** Calcium - a life and a death signal. *Nature.* 395 (6703), 1998, S. 27130-27136.
86. **Clapham DE.** Calcium Signaling. *Cell.* 131 (6), 2007, S. 1047-1058.
87. **Schreiber R.** Ca<sup>2+</sup> signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation. *J membr Biol.* 205 (3), 2005, S. 129-137.
88. **Li F, Wang W, Gu M, Gyoneva S, Zhang J, Huang S, Traynelis SF, Cai H, Guggino SE, Zhang X.** L-type calcium channel activity in osteoblast cells is regulated by the actin cytoskeleton independent of protein trafficking. *J Bone Miner Metab.* 29 (5), 2011, S. 515-525.
89. **Walker LM, Publicover SJ, Preston MR, Said Ahmed MA, El Haj AJ.** Calcium-channel activation and matrix protein upregulation in bone cells in response to mechanical strain. *J Cell Biochem.* 79 (4), 2000, S. 648-661.
90. **Duncan RL, Akanbi KA, Farach-Carson MC.** Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin Nephrol.* 18 (2), 1998, S. 178-190.

91. **Tsien RW, Tsien RY.** Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol.* 6, 1990, S. 715-760.
92. **Koolman J, Röhm KH.** *Color Atlas of Biochemistry.* . Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2005. ISBN 1-58890-247-1.
93. **Oertner TG, Matus A.** Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium.* 37 (5), 2005, S. 477-482.
94. **Furukawa R, Maselli A, Thomson SA, Lim RW, Stokes JV, Fechheimer M.** Calcium regulation of actin crosslinking is important for function of the actin cytoskeleton in Dictyostelium. *J Cell Sci.* 116 (Pt 1), 2003, S. 187-196.
95. **Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL.** Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. [Hrsg.] S. 517-529. *Nat rev Mol Cell Biol.* 5 (7), 2003.
96. **Pommerenke H, Schreiber E, Dürr F, Nebe B, Hahnel C, Möller W, Rychly J.** Stimulation of integrin receptors using a magnetic drag force device induces an intracellular free calcium response. *Eur J Cell Biol.* 70 (2), 1996, S. 157-164.
97. **Shao Y, Czymmek KJ, Jones PA, Fomin VP, Akanbi K, Duncan RL, Farach-Carson MC.** Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296 (5):C, 2009, S. 1067-78.
98. **Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S.** Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci.* 12, 2007, S. 1450-1462.
99. **Jørgensen NR, Henriksen Z, Sørensen OH, Eriksen EF, Civitelli R, Steinberg TH.** Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors. *J Biol Chem.* 277 (9), 2002, S. 7574-80.
100. **Berridge MJ.** The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 32 (5-6), 2002, S. 235-249.
101. **Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A.** Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 349 (1), 2006, S. 1-5.
102. **McCue HV, Wardyn JD, Burgoyne RD, Haynes LP.** Generation and characterization of a lysosomally targeted, genetically encoded Ca(2+)-sensor. *Biochem J.* 449 (2), 2013, S. 449-457.
103. **Bers DM.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415 (6868), 2002, S. 198-205.
104. **Syntichaki P, Tavernarakis N.** The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci.* . 4 (8), 2003, S. 672-684.
105. **Simms BA, Zamponi GW.** Trafficking and stability of voltage-gated calcium channels. *Cell Mol Life Sci.* 69 (6), 2012, S. 843-856.
106. **Salter DM, Wallace WH, Robb JE, Caldwell H, Wright MO.** Human bone cell hyperpolarization response to cyclical mechanical strain is mediated by an interleukin-1beta autocrine/paracrine loop. *J Bone Miner Res.* 15 (9), 2000, S. 1746-55.
107. **Talavera K, Nilius B.** Biophysics and structure-function relationship of T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell Calcium.* 40 (2), 2006, S. 97-114.
108. **Buraei Z, Yang J.** The  $\beta$  subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Physiol Rev.* 90(4), 2010, S. 1461-506.
109. **Haase H, Bartel S, Karczewski P, Morano I, Krause EG.** In-vivo phosphorylation of the cardiac L-type calcium channel beta-subunit in response to catecholamines. *Mol Cell Biochem.* 163-164, 1996, S. 99-106.
110. **Catterall WA.** Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* . 3 (8), 2011, S. a003947.
111. **Klugbauer N, Marais E, Hofmann F.** Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr.* 35, 2003, S. 639-647.

112. **Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J.** International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57 (4), 2005, S. 411-425.
113. **Lacinova L.** Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* Suppl 1, 2005, S. 1-78.
114. **Salter DM, Robb JE, Wright MO.** Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction. *J Bone Miner Res.* 12 (7), 1997, S. 1133-1141.
115. **Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, Burr DB, Atkinson S, Hsieh YF, Qiu J, Duncan RL.** Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol.* 275 (6 Pt 1):C, 1998, S. 1591-1601.
116. **Matza D, Badou A, Kobayashi KS, Goldsmith-Pestana K, Masuda Y, Komuro A, McMahon-Pratt D, Marchesi VT, Flavell RA.** A scaffold protein, AHNAK1, is required for calcium signaling during T cell activation. *Immunity.* 28 (1), 2008, S. 64-74 .
117. **Bergh JJ, Shao Y, Puente E, Duncan RL, Farach-Carson MC.** Osteoblast Ca(2+) permeability and voltage-sensitive Ca(2+) channel expression is temporally regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Am J Physiol Cell Physiol.* 290 (3), 2006, S. C822-31.
118. **Shao Y, Alicknavitch M, Farach-Carson MC.** Expression of voltage sensitive calcium channel (VSCC) L-type Cav1.2 (alpha1C) and T-type Cav3.2 (alpha1H) subunits during mouse bone development. *Dev Dyn.* 234 (1), 2005, S. 54-62.
119. **Li J, Duncan RL, Burr DB, Gattone VH, Turner CH.** Parathyroid hormone enhances mechanically induced bone formation, possibly involving L-type voltage-sensitive calcium channels. *Endocrinology.* 144 (4), 2003, S. 1226-1233.
120. **Guggino SE, Lajeunesse D, Wagner JA, Snyder SH.** Bone remodeling signaled by a dihydropyridine- and phenylalkylamine-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (8), 1989, S. 2957-2960.
121. **Ritchie CK, Maercklein PB, Fitzpatrick LA.** Direct effect of calcium channel antagonists on osteoclast function: alterations in bone resorption and intracellular calcium concentrations. *Endocrinology.* 135 (3), 1994, S. 996-1003.
122. **Hamilton SL.** Ryanodine receptors. *Cell Calcium.* 38, 2005, S. 253-260.
123. **Scodelaro Bilbao P, Boland R, Russo de Boland A, Santillán G.** ATP modulation of mitogen activated protein kinases and intracellular Ca2+ in breast cancer (MCF-7) cells. *Arch Biochem Biophys.* 466 (1), 2007, S. 15-23.
124. **Bolsover SR.** Calcium signalling in growth cone migration. *Cell Calcium.* 37 (5), 2005, S. 395-402.
125. **Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, watarai H, Wakamori M, Numaga T, Mori Y, Iino M, Hikida M, Kurosaki T.** Coupling of STIM1 to store-operated Ca2+ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103 (45), 2006, S. 16704-16709.
126. **Berridge MJ.** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361 (6410), 1993, S. 315-325.
127. **Parsons JT.** Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 8 (2), 1996, S. 146-152.
128. **Zambuzzi WF, Coelho PG, Alves GG, Granjeiro JM.** Intracellular signal transduction as a factor in the development of "smart" biomaterials for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* 108 (6), 2011, S. 1246-50, doi: 10.1002/bit.23117.
129. **Cohen PT.** Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci.* 115 (Pt 2), 2002, S. 241-256.
130. **Braconi Quintaje S, Orchard S.** The annotation of both human and mouse kinomes in UniProtKB/Swiss-Prot: one small step in manual annotation, one giant leap for full comprehension of genomes. *Mol Cell Proteomics.* 7 (8), 2008, S. 1409-1419.

131. **Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M.** Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 127 (3), 2006, S. 635-648.
132. **Jordan JD, Landau EM, Iyengar R.** Signaling networks: the origins of cellular multitasking. *Cell*. 103 (2), 2000, S. 193-200.
133. **Manning BD, Cantley LC.** AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 129 (7), 2007, S. 1261-1274.
134. **Aplin AE, Juliano RL.** Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *J Cell Sci*. 112 ( Pt 5), 1999, S. 695-706.
135. **Hipskind RA, Bilbe G.** MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front Biosci*. 3, 1998, S. 804-816.
136. **Liu D, Genetos DC, Shao Y, Geist DJ, Li J, Ke HZ, Turner CH, Duncan RL.** Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca(2+)- and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts. *Bone*. 42 (4), 2008, S. 644-452.
137. **Zhang Y, Dong C.** Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci*. 64 (21), 2007, S. 2771-2789.
138. **Roux PP, Blenis J.** ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68 (2), 2004, S. 320-344.
139. **Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D.** Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Molecular and cellular biology*. 22 (22), 2002, S. 7758-7768.
140. **Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW.** Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*. 343 (6259), 1990, S. 651-653.
141. **Canman CE, Kastan MB.** Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature*. 384 (6606), 1996, S. 213-214.
142. **Cuenda A, Rousseau S.** p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1773 (8), 2007, S. 1358-1375.
143. **Aplin AE, Stewart SA, Assoian RK, Juliano RL.** Integrin-mediated adhesion regulates ERK nuclear translocation and phosphorylation of Elk-1. *J Cell Biol*. 153 (2), 2001, S. 273-282.
144. **Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J.** p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*. 15 (18), 1997, S. 2169-2177.
145. **Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT.** Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol*. 176 (5), 2007, S. 709-718.
146. **Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M.** Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell*. 9 (3), 2005, S. 389-402.
147. **Song G, Ouyang G, Bao S.** The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med*. 9 (1), 2005, S. 59-71.
148. **Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M.** Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science (New York, N.Y.)*. 320 (5876), 2008, S. 667-670.
149. **Joep RS, Johnson GV.** The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*. 29 (2), 2004, S. 95-102.
150. **Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY.** Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through

nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 276 (10), 2001, S. 7614-7620.

151. **Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, Oury C, Bours V.** Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochem Pharmacol*. 73 (12), 2007, S. 1982-1994.

152. **Sakai K, Arao , Shimoyama T, Murofushi K, Sekijima M, Kaji N, Tamura T, Saijo N, Nishio K.** Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB J*. 20 (2), 2006, S. 311-313.

153. **Acobs MD, Harrison SC.** Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell*. 95 (6), 1998, S. 749–758.

154. **McMahon RE, Wang L, Skoracki R, Mathur AB.** Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 101 (2), 2013, S. 387-397.

155. **Wintermantel E, Mayer J, Ruffieux K, Bruinink A, Eckert KL.** Biomaterialien – humane Toleranz und Integration. *Chirurg*. 70, 1999, S. 847-857.

156. **Klein MO, Bijelic A, Ziebart T, Koch F, Kämmerer PW, Wieland M, Konerding MA, Al-Nawas B.** Submicron scale-structured hydrophilic titanium surfaces promote early osteogenic gene response for cell adhesion and cell differentiation. *Clin Implant Dent Relat Res*. 15 (2), 2013, S. 166-175.

157. **Balaban NQ, Schwarz US, Riveline D, Goichberg P, Tzur G, Sabanay I, Mahalu D, Safran S, Bershadsky A, Addadi L, Geiger B.** Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*. 3 (5), 2001, S. 466-472.

158. **Lim JY, Donahue HJ.** Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning. *Tissue Eng*. 13 (8), 2007, S. 1879-1891.

159. **Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Maguer DLe, Maguer ALe, Hardouin P und Hildebrand HF, Iost A, Leroy JM.** The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials*. 21, 2000, S. 1567-1577.

160. **Jäger M, Zilkens C, Zanger K, Krauspe R.** Significance of nano- and microtopography for cell-surface interactions in orthopaedic implants. *J Biomed Biotechnol*. 2007 (8), 2007, S. 69036-69055.

161. **Mendonça DB, Miguez PA, Mendonça G, Yamauchi M, Aragão FJ, Cooper LF.** Titanium surface topography affects collagen biosynthesis of adherent cells. *Bone*. 49 (3), 2011, S. 463-472.

162. **Zink C, Hall H, Brunette DM, Spencer ND.** Orthogonal nanometer-micrometer roughness gradients probe morphological influences on cell behavior. *Biomaterials*. 33 (32), 2012, S. 8055-8061.

163. **Wennerberg A, Albrektsson T.** Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. Suppl 4, 2009, S. 172-184.

164. **Curtis AS, Wilkinson CD.** Reactions of cells to topography. *J Biomater Sci Polym Ed*. 9 (12), 1998, S. 1313-1329.

165. **Zhao G, Raines AL, Wieland M, Schwartz Z, Boyan BD.** Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*. 28 (18), 2007, S. 2821-2829.

166. **Lee MH, Oh N, Lee SW, Leesungbok R, Kim SE, Yun YP, Kang JH.** Factors influencing osteoblast maturation on microgrooved titanium substrata. *Biomaterials*. 31, 2010, S. 3804-3815.

167. **Nebe JG, Luethen F, Lange R, Beck U.** Interface interactions of osteoblasts with structured titanium and the correlation between physicochemical characteristics and cell biological parameters. *Macromol Biosci*. 7 (5), 2007, S. 567-578.

168. **Diener A, Nebe B, Lüthen F, Becker P, Beck U, Neumann HG, Rychly J.** Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials*. 26 (4), 2005, S. 383-392.

169. **Lüthen F, Lange R, Becker P, Rychly J, Beck U, Nebe B.** The influence of surface roughness of titanium on  $\beta$ 1- and  $\beta$ 3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials* 26, 2005, S. 2423-2440.
170. **Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, Hardouin P, Landolt D.** Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials*. 25 (14), 2004, S. 2695-2711.
171. **Lange R, Lüthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe B.** Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biol Engin.* 19, 2002, S. 255-261.
172. **Nebe B, Finke B, Lüthen F, Bergemann C, Schröder K, Rychly J, Liefelth K, Ohl A.** Improved initial osteoblast functions on amino-functionalized titanium surfaces. *Biomol Eng.* 24 (5), 2007, S. 447-454.
173. **Nebe B, Lüthen F, Lange R, Becker P, Beck U, Rychly J.** Topography-induced alteration in adhesion structures affect mineralization in human osteoblasts on titanium. *Mater Science Engin. C* 24, 2004, S. 619-624.
174. **Lyford GL, Strege PR, Shepard A, Ou Y, Ermilov L, Miller SM, Gibbons SJ, Rae JL, Szurszewski JH, Farrugia G.**  $\alpha$ 1(C) (Ca(V)1.2) L-type calcium channel mediates mechanosensitive calcium regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283 (3), 2002, S. C1001-1008.
175. **Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA.** Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature.* 475 (7356), 2011, S. 316-323.
176. **Hamilton DW, Brunette DM.** The effect of substratum topography on osteoblast adhesion mediated signal transduction and phosphorylation. *Biomaterials.* 28 (10), 2007, S. 1806-1819.
177. **Lin Y.** *Osteogenesis*. s.l. : InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0030-3.
178. **Lange R, Elter P, Biala, K, Matschegewski C, Stähle S, Löffler R, Fleischer M, Nebe JB, Kern D, Beck U.** Titanium surfaces structured with the regular geometry - material investigation and cell morphology. *Surf Interface Anal* 42. 2010, S. 497-501.
179. **Matschegewski C, Staehlke S, Birkholz H, Lange R, Beck U, Engel K, Nebe JB.** Automatic actin filament quantification of osteoblasts and their morphometric analysis on microtextured silicon-titanium arrays. *Materials.* 5, 2012, S. 1176-1195.
180. **Rebl H, Finke B, Lange R, Weltmann KD, Nebe JB.** Impact of plasma chemistry versus titanium surface topography on osteoblast orientation. *Acta Biomater.* 2012, Bd. 8, 10, S. 3840-3851.
181. **Finke B, Luethen F, Schroeder K, Mueller PD, Bergemann C, Frant M, Ohl A, Nebe JB.** The effect of positively charged plasma polymerization on initial osteoblastic focal adhesion on titanium surfaces. *Biomaterials.* 2007, Bd. 28, 30, S. 4521-4534.
182. **Nebe JB, Finke B, Koertge A, Rebl H, Staehlke S.** Geometrical Micropillars Combined with Chemical Surface Modifications – Independency of Actin Filament Spatial Distribution in Primary Osteoblasts. *Mater Sci Forum.*, 2014, in press
183. **Billiau A, EDY VG, Heremans H, Van DAmme J, Desmyter J, Georgiades JA, De Somer P.** Human Interferon: Mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother.* 12(1). 1977, S. 11-15.
184. **Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS.** A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A.* 00A, 2013 Aug 24. doi: 10.1002/jbm.a.34937., S. 1-8.
185. **Meyer U, Büchter A, Wiesmann HP, Joos U, Jones DB.** Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *EUr Cell Mater.* 9, 2005, S. 39-49.
186. **Groen N, van de Peppel J, Yuan H, van Leeuwen JP, van Blitterswijk CA, de Boer J.** Bioinformatics-based selection of a model cell type for in vitro biomaterial testing. *Biomaterials.* 34(22), 2013, S. 5552-61.

187. **Matschegewski C, Staehlke S, Loeffler R, Lange R, Chai F, Kern DP, Beck U, Nebe BJ.** Cell architecture-cell function dependencies on titanium arrays with regular geometry. *Biomaterials*. 31 (22), 2010, S. 5729-5740.
188. **Lindl T.** *Zell- und Gewebekultur*. s.l. : Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 5. Auflage, ISBN 3-8274-1194-7, 2002.
189. **Wilson T.** *Confocal Microscopy*. s.l. : Academic Press, London, ISBN-10: 0127572708, 1990. S. 1-64.
190. **Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg.).** *Zelluläre Diagnostik – Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflußzytometrie*. Freiburg : Karger Verlag, Okt 2006. ISBN 3-8055-7928-4.
191. **Raffael A.** Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. *Labor Med* 11. 1999, S. 89-97.
192. **Stählke S, Matschegewski C, Löffler R, Lange R, Beck U, Kern D, Nebe JB.** Analyse der Interaktion von Osteoblasten auf mikrostrukturierten Oberflächen in Bezug auf die Organisation des Aktinzytoskeletts. *BIOmaterialien* 12. no. 1-4, 2011, S. 115.
193. **Staehlke S, Kunz F, Loeffler R, Matschegewski C, Fleischer M, Kern DP, Nebe JB.** Regulation of T-type calcium channels in osteoblasts on micro-structured surface topography. *Advanced Materials Research*. Vol 647, 2013, S. 476-481.
194. **Minta A, Kao JP, Tsien RY.** Fluorescent calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 264, 1989, S. 8171-8178.
195. **Stählke S, Kunz F, Körtge A, Matschegewski C, Nebe JB.** Analyse der intrazellulären Kalzium-Mobilisierung in Osteoblasten auf definierter Mikrostruktur. *BioNanoMaterials*. 14, 2013, S. 81.
196. **Stählke S, Matschegewski C, Löffler R, Lange R, Beck U, Kern D, Nebe JB.** Time dependent analysis of intracellular signaling molecules in osteoblasts on microstructured titanium surfaces. [Hrsg.] Gradingner R. Kirkpatrick CJ Thull R. *BIOmaterialien* 11 (2010). 11, 2010, S. 179.
197. **Krentz H.** *Statistische Analysen mit SPSS in der; Band 2: Schließende statistische Analysen*. s.l. : Shaker Verlag GmbH Aachen, 2. Überarbeitete und aktualisierte Auflage, ISBN 978-3-8322-7841-0, 2008.
198. **Anselme K.** Biomaterials and interface with bone. *Osteoporos Int*. 22, 2011, S. 2037-2042.
199. **Ismail FS, Rohanizadeh R, Atwa S, Mason RS, Ruys AJ, Martin PJ, Bendavid A.** The influence of surface chemistry and topography on the contact guidance of MG63 osteoblast cells. *J Mater Sci Mater Med*. 18 (5), 2007, S. 705-714.
200. **Davidson PM, Özçelik H, Hasirci V, Reiter G, Anselme K.** Microstructured Surfaces Cause Severe but Non-Detrimental Deformation of the Cell Nucleus. *Adv Mater*. 21 (35), 2009, S. 3586-3590.
201. **Wilkinson C.** The use of materials patterned on a nano- an micro-metric scale in cellular engineering. *Mater Science Engin.* C:19 (1-2), 2002, S. 263-269.
202. **Sjöström T, Lalev G, Mansell JP, Su B.** Initial attachment and spreading of MG63 cells on nanopatterned titanium surfaces via through-mask anodization. *Applied Surface Science*. 257 (10), 2011, S. 4552-4558.
203. **Kim DH, Seo CH, Han K, Kwon KW, Levchenko A, Suh KY.** Guided Cell Migration on Microtextured Substrates with Variable Local Density and Anisotropy. *Adv Funct Mater*. 19 (10), 2009, S. 1579-1586.
204. **Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, Wilkinson CD, Dalby MJ.** The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *J Mater Sci Mater Med*. 18 (2), 2007, S. 399-404.
205. **Rahmany MB, Van Dyke M.** Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. *Acta Biomater*. 9 (3), 2013, S. 5431-5437.
206. **Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, Blümmel J, Eck W, Kantelechner M, Kessler H, Spatz JP.** Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem*. 5 (3), 2004, S. 383-388.
207. **Rychly J, Nebe JB.** Cell-material interaction. *BioNanoMaterials*. Heft 3-4,, 2013, Bd. 14, S. 153–160.

208. **Saldaña L, Vilaboa N.** Effects of micrometric titanium particles on osteoblast attachment and cytoskeleton architecture. *Acta Biomater.* 6 (4), 2010, S. 1649-1660.
209. **Kaivosoja E, Suvanto P, Barreto G, Aura S, Soininen A, Franssila S, Kontinen YT.** Cell adhesion and osteogenic differentiation on three-dimensional pillar surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 101 (3), 2013, S. 842-852.
210. **Puckett S, Pareta R, Webster TJ.** Nano rough micron patterned titanium for directing osteoblast morphology and adhesion. *Int J Nanomedicine.* 3 (2), 2008, S. 229-241.
211. **Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Iost A, Hardouin P.** Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *J Biomed Mater Res.* 49 (2), 2000, S. 155-166.
212. **Lange R, Lüthen F, Nebe B, Rychly J, Beck U.** Mathematical correlation between biomaterial and cellular parameters-critical reflection of statistics. *Biomol Eng.* 24 (5), 2007, S. 526-530.
213. **Matschegewski C, Birkholz H, Staehlke S, Loeffler R, Kern PD, Engel K, Nebe JB.** Quantitative analysis of the cellular actin cytoskeleton on geometrically designed surface topography. *Mater Sci For .* 706-709 , 2012, S. 543-548.
214. **Lange R, Elter P, Matschegewski C, Weidmann A, Löffler R, Fleischer M, Nebe JB, Kern D, Beck U.** *Material and cellbiological investigations on structured biomaterial surfaces with regular geometry.* [Hrsg.] Grading R Thull R. S1. München : Verlag Neuer Merkur GmbH, 2009. S. 84. Bd. 10. ISSN 1616-0177.
215. **Lamers E, Walboomers XF, Domanski M, te Riet J, van Delft FC, Luttge R, Winnubst LA, Gardeniers HJ, Jansen JA.** The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials.* 10, 2010, S. 3307-3316.
216. **Mwenifumbo S, Li M, Chen J, Beye A, Soboyejo W.** Cell/surface interactions on laser micro-textured titanium-coated silicon surfaces. *J Mater Sci Mater Med.* 18 (1), 2007, S. 9-23.
217. **Kirbs A, Lange R, Nebe B, Rychly J, Baumann A, Neumann H-G, Beck U.** Methods for the physical and chemical characterization of surfaces of titanium implants. *Mater Sci Eng. C* 23, 2003, S. 425-429.
218. **Brunette DM.** Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exp Cell Res.* 167 (1), 1986, S. 203-217.
219. **Teixeira AI, Abrams GA, Bertics PJ, Murphy CJ, Nealey PF.** Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J Cell Sci.* 116 (Pt10), 2003, S. 1881-1892.
220. **Loesberg WA, te Riet J, van Delft FC, Schön P, Figdor CG, Speller S, van Loon JJ, Walboomers XF, Jansen JA.** The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion. *Biomaterials.* 28 (27), 2007, S. 3944-3951.
221. **Thull R.** Physicochemical principles of tissue material interactions. *Biomol Eng.* 19 (2-6), 2002, S. 43-50.
222. **Elter P, Weihe T, Bühler S, Gimsa J, Beck U.** Low fibronectin concentration overcompensates for reduced initial fibroblasts adhesion to a nanoscale topography: single-cell force spectroscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 95, 2012, S. 82-89.
223. **Elter P, Lange R, Thull R, Beck U.** Protein adsorption on topographically structured surfaces: a mesoscopic computer simulation for the prediction of preferred adsorption sites. *Mater Sci Forum.* 638-642, 2010, S. 542-547.
224. **Nune C, Misra RD, Somani MC, Karjalainen LP.** Dependence of cellular activity at protein adsorbed biointerfaces with nano- to microscale dimensionality. *J Biomed Mater Res .* 2013, S. 1-14.
225. **Panos M, Sen TZ, Ahunbay MG.** Molecular simulation of fibronectin adsorption onto polyurethane surfaces. *Langmuir.* 28 (34), 2012, S. 12619-12628.
226. **Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Moses RL, Jacobs JJ.** Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue Eng.* 7 (1), 2001, S. 55-71.



227. **Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD.** Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 2009, S. 21-33.
228. **Nebe JGB, Luethen F, Lange R, Beck U.** Cellular Activity and Biomaterial's Surface Topography. *Mat Sci Forum Vols.* 539-543, 2007, S. 517-522.
229. **Yang J-Y, Ting Y-C, Lai J-Y, Liu H-L, Fang H-W, Tsai W-B.** Quantitative analysis of osteoblast-like cells (MG63) morphology on nanogrooved substrata with various groove and ridge dimensions. *J Biomed Mater Res A.* 90 (3), 2009, S. 629-640.
230. **Kunz F, Bergemann C, Klinkenberg E-D, Weidmann A, Lange R, Beck U, Nebe JB.** A novel modular device for 3-D bone cell culture and non-destructive cell analysis. *Acta Biomater.* 6, 2010, S. 3798-3807.
231. **Anselme K, Biggerelle M.** Modelling approach in cell/material interactions studies. *Biomaterials.* 27, 2006, S. 1187-1199.
232. **Webster TJ, Siegel RW, Bizios R.** Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials.* 20 (13), 1999, S. 1221-1227.
233. **Anselme K, Noël B, Hardouin P.** Human osteoblast adhesion on titanium alloy, stainless steel, glass and plastic substrates with same surface topography. *J Mater Sci Mater Med.* 10 (12), 1999, S. 815-819.
234. **Tsai WB, Ting YC, Yang JY, Lai JY, Liu HL.** Fibronectin modulates the morphology of osteoblast-like cells (MG-63) on nano-grooved substrates. *J Mater Sci Mater Med.* 20 (6), 2009, S. 1367-1378.
235. **Rebl H, Finke B, Ihrke R, Rothe H, Rychly J, Schroeder K, Nebe JB.** Positively Charged Material Surfaces Generated by Plasma Polymerized Allylamine Enhance Vinculin Mobility in Vital Human Osteoblasts. *Adv Eng Mat.* 12 (8), 2010, S. 356-364.
236. **Bogner E, Dominizi K, Hagl P, Bertagnolli E, Wirth M, Gabor F, Brezna W, Wanzenboeck HD.** Bridging the gap--biocompatibility of microelectronic materials. *Acta Biomater.* 2 (2), 2006, S. 229-237.
237. **Scotchford CA, Ball M, Winkelmann M, Vörös J, Csucs C, Brunette DM, Danuser G, Textor M.** Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-interactions. II: Protein adsorption and early cell interactions. *Biomaterials.* 24 (7), 2003, S. 1147-1158.
238. **Garcia AJ.** Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials.* 26, 2005, S. 7525-7529.
239. **Reyes CD, Petrie TA, García AJ.** Mixed extracellular matrix ligands synergistically modulate integrin adhesion and signaling. *J Cell Physiol.* 217 (2), 2008, S. 450-458.
240. **Geissler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel K.** Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 51 (4), 2000, S. 752-760.
241. **Dupont-Gillain CC, Pamula E, Denis FA, Rouxhet PG.** Nanostructured layers of adsorbed collagen: conditions, mechanisms and applications. *Progr Colloid Polym Sci.* 128, 2004, S. 98-104.
242. **Curtis AS, Dalby MJ, Gadegaard N.** Nanoprinting onto cells. *J R Soc Interface.* 3 (8), 2006, S. 393-398.
243. **Nabavi N, Khandani A, Camirand A, Harrison RE.** Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. *Bone.* 49 (5), 2011, S. 965-974.
244. **Dai Z, Wu F, Chen J, Xu H, Wang H, Guo F, Tan Y, Ding B, Wang J, Wan Y, Li Y.** Actin microfilament mediates osteoblast Cbfa1 responsiveness to BMP2 under simulated microgravity. *PLoS One.* 8 (5), 2013, S. e63661 1-10.
245. **Sarkar D, Nagaya T, Koga K, Nomura Y, Gruener R, Seo H.** Culture in vector-averaged gravity under clinostat rotation results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *J Bone Miner Res.* 15 (3), 2000, S. 489-498.
246. **Walboomers XF, Monaghan W, Curtis AS, Jansen JA.** Attachment of fibroblasts on smooth and microgrooved polystyrene. *J Biomed Mater Res.* 46 (2), 1999, S. 212-220.
247. **Pioletti DP, Takei H, Kwon SY, Wood D, Sung KL.** The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 46 (3), 1999, S. 399-407.

248. **Lohmann CH, Schwartz Z, Köster G, Jahn U, Buchhorn GH, MacDougall MJ, Casasola D, Liu Y, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD.** Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials*. 21 (6), 2000, S. 551-561.
249. **Blain EJ.** Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology. *Int J Exp Pathol*. 90 (1), 2009, S. 1-15.
250. **Watari S, Hayashi K, Wood JA, Russell P, Nealey PF, Murphy CJ, Genetos DC.** Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials*. 33 (1), 2012, S. 128-136.
251. **Davidson PM, Fromigué O, Marie PJ, Hasirci V, Reiter G, Anselme K.** Topographically induced self-deformation of the nuclei of cells: dependence on cell type and proposed mechanisms. *J Mater Sci Mater Med*. 21 (3) (2010), 2010, S. 939-946.
252. **He L, Montell D.** A cellular sense of touch. *Nat Cell Biol*. 14 (9), 2012, S. 902-903 .
253. **Sun Y, Chen CS, Fu J.** Forcing stem cells to behave: a biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annu Rev Biophys*. 41, 2012, S. 519-542.
254. **Wang N, Tytell JD, Ingber DE.** Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(1), 2009, S. 75-82.
255. **Li Q, Kumar A, Makhija E, Shivashankar GV.** The regulation of dynamic mechanical coupling between actin cytoskeleton and nucleus by matrix geometry. *Biomaterials*. 35 (3), 2014, S. 961-969 .
256. **Sinha RK, Tuan RS.** Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone*. 18 (5), 1996, S. 451-457.
257. **Bershadsky A, Kozlov M, Geiger B.** Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. *Curr Opin Cell Biol*. 18 (5), 2006, S. 472-481.
258. **Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, Dunn GR, Appert C, Boyan BD, Schwartz Z.** Role of non-canonical Wnt signaling in osteoblast maturation on microstructured titanium surfaces. *Acta Biomaterialia*. 7 (6), 2011, S. 2740-2750.
259. **Keselowsky BG, Wang L, Schwartz Z, Garcia AJ, Boyan BD.** Integrin alpha(5) controls osteoblastic proliferation and differentiation responses to titanium substrates presenting different roughness characteristics in a roughness independent manner. *J Biomed Mater Res A*. 80 (3), 2007, S. 700-710.
260. **Asparuhova MB, Gelman L, Chiquet M.** Role of the actin cytoskeleton in tuning cellular responses to external mechanical stress. *Scand J Med Sci Sports*. 19 (4), 2009, S. 490-499.
261. **Müller P, Langenbach A, Kaminski A, Rychly J.** Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 8(7), 2013, S. e71283 1-8.
262. **Hu D, Yuan JM.** Time-dependent sensitivity analysis of biological networks: coupled MAPK and PI3K signal transduction. *J Phys Chem A*. 110 (16), 2006, S. 5361-5370.
263. **Schwartz Z, Lohmann CH, Vocke AK, Sylvia VL, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD.** Osteoblast response to titanium surface roughness and 1alpha,25-(OH)(2)D(3) is mediated through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Biomed Mater Res*. 56 (3), 2001, S. 417-426.
264. **Chung HJ, Jan LY.** Channeling to the nucleus. *Neuron*. 52(6), 2006, S. 937-940.
265. **Gomez-Ospina N, Tsuruta F, Barreto-Chang O, Hu L, Dolmetsch R.** The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell*. 127(3), 2006, S. 591-606.
266. **Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, Turner CH, Burr DB, Qiu J, Duncan RL.** Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 278(5), 2000, S. C989-97.

267. **Won S, Lee BC, Park CS.** Functional effects of cytoskeletal components on the lateral movement of individual BKCa channels expressed in live COS-7 cell membrane. *FEBS Lett.* 585 (14), 2011, S. 2323-2330.
268. **Barradas AM, Fernandes HA, Groen N, Chai YC, Schrooten J, van de Peppel J, van Leeuwen JP, van Blitterswijk CA, de Boer J.** A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials.* 33 (11), 2012, S. 3205-3215.
269. **Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD.** Chemical calcium indicators. *Methods.* 46 (3), 2008, S. 143-151.
270. **Mace OJ, Morgan EL, Affleck JA, Lister N, Kellett GL.** Calcium absorption by Cav1.3 induces terminal web myosin II phosphorylation and apical GLUT2 insertion in rat intestine. *J Physiol.* 580 (Pt. 2), 2007, S. 605-616.
271. **Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR.** Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302 (5651), 2003, S. 1704-1709.
272. **Maruthamuthu V, Aratyn-Schaus Y, Gardel ML.** Conserved F-actin dynamics and force transmission at cell adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 22 (5), 2010, S. 583-588.
273. **Tsai JA, Larsson O, Kindmark H.** Spontaneous and stimulated transients in cytoplasmic free Ca(2+) in normal human osteoblast-like cells: aspects of their regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 263 (1), 1999, S. 206-212.

## Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde an der Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Medizinische Forschung, Arbeitsbereich Zellbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Joachim Rychly und Prof. Dr. Barbara Nebe angefertigt.

Allen möchte ich danken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben:

Frau Prof. Dr. Barbara Nebe danke ich vor allem für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die interessante Aufgabenstellung und für die sehr gute fachliche Betreuung und konstruktive Begleitung während dieser Dissertation. Ebenso für die Möglichkeiten die zahlreichen Arbeitsergebnisse auf internationalen und nationalen Kongressen präsentieren zu können.

Frau Prof. Dr. Ursula van Rienen, sowie den weiteren Betreuern des DFG-Graduiertenkollegs *welisa* (Analysis and Simulation of Electrical Interactions of Implants with Bio-Systems) danke ich für die Möglichkeit zur Vollendung meiner Promotionsarbeit.

Frau Dr. Friederike Kunz danke ich für die engagierte Zusammenarbeit und für die Unterstützung bei der Erarbeitung der Methode des Kalzium-Imagings.

Herrn Dipl.-Phys. Andreas Körtge danke ich für die interessante Zusammenarbeit im Rahmen von *welisa*.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Petra Müller für die fachlichen Ideen, anregende Problemlösungen und Ratschläge, sowie für die unterstützenden und aufmunternden Worte. Weiterhin dafür, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei meinen Laborkollegen Frau Dipl.-Ing. (FH) Annelie Peters, Frau Dipl.-Ing. (FH) Petra Seidel, Frau Janine Wetzel, Frau Dr. Claudia Matschegewski, Herrn Dr. Frank Lüthen, Frau Dr. Claudia Bergemann, Frau Dipl.-Biol. Caroline Mörke, Frau Dipl.-Biol. Henrike Rebl, Frau Dr. Nadja Engel-Lutz, Frau Dr. Kathrin Duske und den Kollegen der Nachwuchsgruppe für das gute Laborklima, ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Den Mitarbeitern vom Elektronenmikroskopischen Zentrum: W. Labs, G. Fulda, U. Schulz und Dr. M. Frank danke ich für die hervorragende Probenaufarbeitung und die technische Unterstützung am REM.

Abschließend bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie. Meinem Mann Henning danke ich für die Unterstützung und Geduld. Weiterhin bedanke ich mich für die vielen geschenkten Stunden, in denen meine Sohn Felix bei Papa, Oma und Opa wundervoll untergebracht war, damit ich in Ruhe und voller Konzentration an meiner Promotionsschrift arbeiten konnte.

## Publikationen und Präsentationen

### Publikationen (Journal mit IF):

1. Bittig AT, Matschegewski C, Nebe JB, **Stähle S**, Uhrmacher AM: *Membrane related dynamics and the formation of actin in cells growing on micro-topographies: a spatial computational model*. BMC Systems Biology 8:106 (2014) pp.1-35. **IF:2,85 (2014)**
2. Löffler R, Fleischer M, Matschegewski C, **Stähle S**, Lange R, Nebe JB, Kern DP: *Pyramid Array Substrates for Biomedical Studies*. Journal of Vacuum Science & Technology B 30, 06F901 (2012) (1-5). **IF:1,267 (2012)**
3. Matschegewski C, **Staehele S**, Birkholz H, Lange R, Beck U, Engel K, Nebe JB: *Automatic actin filament quantification of osteoblasts and their morphometric analysis on microtextured silicon-titanium arrays*. Materials 5 (2012) pp.1176-1195. doi:10.3390/ma50711762012. **IF: 2,247 (2012)**
4. Lange R, Elter P, Biala K, Matschegewski C, **Stähle S**, Löffler R, Fleischer M, Nebe JB, Kern D, Beck U: *Titanium surfaces structured with regular geometry – material investigations and cell morphology*. Surface and Interface Analysis 42 (2010) pp.497–501. **IF: 1,220 (2012)**
5. Matschegewski C, **Staehele S**, Loeffler R, Lange R, Chai F, Kern D, Beck U, Nebe JB: *Cell architecture-cell function dependencies on titanium arrays with regular geometry*. Biomaterials 31 (2010) pp.5729-5740. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.073. **IF: 7,604 (2012)**
6. Nebe JB, Jesswein H, Weidmann A, Finke B, Lange R, Beck U, **Staehele S**, Schroeder K: *Osteoblast's sensitivity to topographical and chemical features of titanium*. Mater Sci Forum, Vols. 638-642 (2010) pp.652-657. **IF: 0,399 (2012)**

### Publikationen (ohne IF):

1. Nebe JB, Finke B, Koertge A, Rebl H, **Staehele S**: *Geometrical Micropillars Combined with Chemical Surface Modifications – Independency of Actin Filament Spatial Distribution in Primary Osteoblasts*. Mater Sci Forum Vol. 783-786 (2014) pp.1320-1325.
2. **Staehele S**, Kunz F, Loeffler R, Matschegewski C, Fleischer M, Kern DP, Nebe JB.: *Regulation of T-type calcium channels in osteoblasts on micro-structured surface topography*. Advanced Materials Research (Volume 647), (2013); pp.476-481, DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.647.476.
3. Körtge A, **Stähle S**, Lange R, Birkholz M, Fraschke M, Schulz K, Nebe B & Elter P: *Alignment of MG-63 Osteoblasts on Fibronectin-Coated Phosphorous Doping Lattices in Silicon*. World Academy of Science, Engineering and Technology 73 (2013) pp.801-804.
4. Matschegewski C, Birkholz H, **Staehele S**, Loeffler R, Kern PD, Engel K, Nebe JB: *Quantitative analysis of the cellular actin cytoskeleton on geometrically designed surface topography*. ISBN-13: 978-3-03785-303-0. Mater Sci Forum 706-709 (2012) pp.543-548.
5. Biala K, Lange R, **Stähle S**, Nebe JB, und Beck U: *Physical and electrochemical characterisation of regular microstructured titanium and their influence on cell morphology*. ISSN (Online) 1862-278X, ISSN (Print) 0013-5585, DOI: 10.1515/bmt.2010.712. Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering. 55 (s1), B: Biomaterialien und Biokompatibilität (2010) pp.103-104.

### Abstracts & Poster:

1. Mörke C, **Stähle S**, Nebe JB: *Influence of regular geometric micro-pillared structures on the cell biology of MG-63 osteoblast-like cells*. International Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ) Program & Abstract Book (2014) p.81, Regensburg

2. Nebe JB, Finke B, Koertge A, Rebl H and **Stahlke S**: *Geometrical Micropillars Combined with Chemical Surface Modifications – Independency of Actin Filament Spatial Distribution in Primary Osteoblasts*. THERMEC'2013 (2013) p.448, Las Vegas, USA
3. **Stahlke S**, Kunz, F, Matschegewski C, Nebe JB: *Analyse der intrazellulären Kalzium-Mobilisierung in Osteoblasten auf definierter Mikrostruktur*. Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) ISSN 2193-0651 BIONANO-MATERIALS Vol.14 (2013) p.81, Erlangen  
**➔ DGBM Posterpreis**
4. **Stahlke S**, Mörke C, Kunz F, Körtge A, Nebe JB: *Analyse der Zellarchitektur-Zellfunktions-Beziehung in Osteoblasten auf definierter Mikrostruktur*. F<sup>2</sup> - Forschung trifft Forschung (2013) Universität Rostock (Poster)
5. **Stahlke S**, Kunz F, Nebe JB: *Intracellular calcium mobilization in osteoblasts in dependance on defined surface micro structures*. BioInterface (2013) Minneapolis, USA  
**➔ Ausgewähltes Poster**
6. **Stahlke S**, Kunz F, Loeffler R, Matschegewski C, Fleischer M, Kern DP, Nebe JB: *Intracellular signaling in osteoblasts on regularly structured titanium surfaces*. 6<sup>th</sup> Annual meeting Scandinavian Society for Biomaterials (ScSB) Materials for Tissue Engineerings (2013) Hafjell, Norway  
**➔ Ausgewählter Vortrag**
7. Körtge A, **Stahlke S**, Fraschke M, Schulz K, Birkholz M, Nebe JB und Elter P: *Steuerung der Adhäsion humaner MG-63-Osteoblasten auf Silizium mit Hilfe einer elektronischen Nanostruktur*. Eröffnungssymposium Joint Lab Bioelectronics (2013) TU Berlin
8. **Stahlke S**, Kunz F, Loeffler R, Matschegewski C, Fleischer M, Kern DP, Nebe JB: *Regulation of T-type Calcium Channels in Osteoblasts on Micro-Structured Surface Topography*. International Conference on Biomaterial and bioengineering(ICBB) (2012) Abstract book p.21, Hong Kong, China  
**➔ Ausgewählter Vortrag**
9. Steffen J & **Stahlke S**, Matschegewski C, Kunz F, Löffler R, Nebe JB: *Correlation of calcium channels expression and actin organization - bone cells on microstructures*. Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) ISSN 2193-0651 BIONANO-MATERIALS Vol.13(1-4) (2012) p.219, Hamburg
10. Kunz F, Quade A, Matschegewski C, **Stahlke S**, Birkholz H, Rebl H, Steffen J, Nebe JB: *Actin cytoskeleton mediated cell response of osteoblasts to plasma amino functionalised titanium surfaces*. (Poster) ISBN 978-3-00-038220-8 4th International Symposium "Interface Biology of Implants" (IBI) (2012) p.49, Rostock-Warnemünde
11. Lange R, Löffler R, **Stahlke S**, Elter P, Körtge A, Nebe JB, Kern D, Beck U: *Electrochemical and scanning electron microscopic characterization of biomaterial surfaces with regular geometry dry etched in Titanium*. ISBN: 978-3-00-038220-8, 4th International Symposium Interface Biology of Implants (IBI) (2012) p.51, Rostock-Warnemünde
12. Löffler R, Fleischer M, Kern DP, Matschegewski C, **Stahlke S**, Nebe JB: *Pyramid Array Substrates for Biomedical Studies*. 56th International Conference on Electron, Ion, and Photon Beam Technology and Nanofabrication (EIPBN) (2012), Hawaii, USA
13. Löffler R, Matschegewski C, **Stahlke S**, Nebe JB, Fleischer M, Kern DP: *Pyramid Array Substrates for Biomedical Studies*. Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) ISSN 2193-0651 BIONANO-MATERIALS Vol.13(1-4) (2012) p.74, Hamburg
14. **Stahlke S**, Matschegewski C, Löffler R, Lange R, Beck U, Kern D, Nebe JB: *Analyse der Interaktion von Osteoblasten auf mikrostrukturierten Oberflächen in Bezug auf die Organisation des Aktinzytoskeletts*. Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) ISSN 1616-0177, BIOMaterialien 12, no. 1-4 (2011) p115, Gießen  
**➔ DGBM Posterpreis**
15. Matschegewski C, Birkholz H, **Stahlke S**, Lange R, Beck U, Engel K and Nebe J.B: *Determination of cellular phenotype and actin quantification of osteoblasts on geometrically*

- defined microtextured titanium arrays*. Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) ISSN 1616-0177, BIOMaterialien 12, no. 1-4 (2011) p.113, Gießen
16. Matschegewski C, Birkholz H, **Stahlke S**, Loeffler R, Kern D, Engel K and Nebe J.B: *Quantification of intracellular structures as a tool for the correlation of material vs. cellular parameters*. ISSN: 1862-278, P141-167, doi: 10.1515/bmt.2011.864, Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering 56 (s1):4 (2011) Freiburg
  17. Matschegewski C, Birkholz H, **Stahlke S**, Lange R, Beck U, Engel K and Nebe J.B: *Cell morphometric analysis of osteoblasts on geometrically microstructured titanium surfaces – basic research for orthopedic implants*. World Congress on regenerative medicine (WCRM) (2011), Leipzig
  18. Matschegewski C, **Stahlke S**, Löffler R, Lange R, Birkholz H, Kern DP, Beck U, Engel K and Nebe B: *Quantitative analysis of the cell phenotype on geometrically designed surface topography*. THERMEC'2011, Quebec, Canada.
  19. Körtge A, Lange R, **Stahlke S**, Nebe JB, Beck U: *Characterization and investigation of the settlement behaviour of cells on gas flow sputtered titanium coatings*. Engineering of Functional Interfaces (EnFI) (2011) p.30, Linz
  20. Körtge A, Lembke U, Lange R, **Stahlke S**, Nebe JB, Neumann HG, Beck U: *Surface Analysis of Ti and TiO<sub>2</sub> Coatings made by Gas Flow Sputtering*. 24rd European Conference on Biomaterials (ESB) 715 (2011) p.715, Dublin, Ireland
  21. Lange R, Löffler R, **Stahlke S**, Elter P, Nebe JB, Kern D, Beck U: *Structured titanium surfaces with regular geometry prepared with different technologies and their influence on MG-63 cell morphology*. Microscopy Conference (2011) Nr: L5.P338, Kiel
  22. **Stahlke S**, Matschegewski C, Loeffler R, Lange R, Beck U, Kern D, Nebe JB: *Time dependent analysis of intracellular signaling molecules in osteoblasts on microstructured titanium surfaces*. Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) ISSN 1616-0177, BIOMaterialien 11 (2010) p179, Heiligenstadt
  23. Biala K, Lange R, **Stahlke S**, Nebe JB, Beck U: *Physical and electrochemical characterization of regular microstructured titanium surfaces and their influence on cell morphology behaviour*. 23th European Conference on Biomaterials (ESB) (2010) CD abstract no. 3757, Tampere, Finland
  24. Rebl H, Finke B, Matschegewski C, **Stahlke S**, Lange R, Kern DP, Beck U, Schroeder K, Nebe JB: *Cell architecture on plasmafunctionalized, structured metal surfaces*. ESB (2010) CD abstract no. H 3492, Tampere, Finland
  25. Matschegewski C, **Stahlke S**, Loeffler R, Lange R, Chai F, Kern DP, Beck U, Nebe JB: *Cell architecture—cell function dependencies on micro-arrays with cubic pillar structures*. DGM, Material Science and Engineering, Topic F: Biomat- F3: Interfaces (2010), Darmstadt
  26. Nebe B, Rebl H, Finke B, Matschegewski C, **Stahlke S**, Beck U, Kern D, Weltmann KD and Schröder K: *Plasmachemisch modifizierte Metalloberflächen und ihr Einfluss auf die Zellphysiologie*. Workshop on Metallic Biomaterials abstract Booklet (2010) p.7, Geesthacht
  27. Matschegewski C & **Stahlke S**, Löffler R, Kern D, Beck U, Lange R, Nebe B: *Definiert mikrostrukturierte Tiatoberflächen und deren Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts von humanen Osteoblasten*. Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) ISSN 1616-0177 BIOMaterialien 10 (3/4) (2009) p.129, Tübingen
  28. Jesswein H, Finke B, Lange R, **Stahlke S**, Beck U, Gimsa J, Schröder K, Nebe B: *Time dependent adhesion of vital human osteoblasts on positively charged plasma polymer coated surfaces*. 3<sup>rd</sup> Internarional Symposium “Interface Biology of Implants” (IBI) ISSN 1616 0177 BIOMaterialien 10 (S1) (2009) p.75, Rostock-Warnemünde
  29. Lange R, Elter P, Biala K, Matschegewski C, **Stahlke S**, Löffler R, Fleischer M, Nebe JB, Kern D, Beck U: *Titanium Surfaces Structured with Regular Geometry – Material and Cellular Biological Investigations*. 13th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis (ECASIA) (2009), Antalya, Turkey
  30. Weidmann A, Finke B, Jesswein H, **Zehler S (Stahlke)**, Schroeder K, Nebe B: *Combination of topographical and chemical features on titanium surfaces enhances osteoblast cell response*.

Deutsche Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) ISSN 1616-0177 BIOmaterialien 9 (3/4), (2008) p.180, Hamburg

#### **Vorträge (International):**

1. **Stählike S:** *Intracellular signaling in osteoblasts on regularly structured titanium surfaces.* Scandinavian Society for Biomaterials (ScSB), 13.-15.03.2013, Hafjell, Norway  
→(Ausgewählter Vortrag)
2. **Stählike S:** *Regulation of T-type Calcium Channels in Osteoblasts on Micro-Structured Surface Topography.* International Conference on Biomaterial and Bioengineering (ICBB), 19.-20.12.2012, Hong Kong, China  
→(Ausgewählter Vortrag)

#### **Vorträge (National):**

1. **Stählike S:** *Intracellular calcium ion dynamics in osteoblasts on defined microstructured surface.* 9th welisa Workshop, November 2013, Wustrow
2. **Stählike S:** *Expression of intracellular adhesion components and calcium channels in osteoblasts in dependence on regularly structured interfaces.* Seminar Zellbiologie, 15.08.2013, Rostock
3. **Stählike S/Löffler R:** *Structured Titanium Surfaces for Biomedical Studies.* 8th welisa Workshop, April 2013, Groß Platen
4. **Stählike S:** *Regulation of Calcium Channels in Osteoblasts on Regular Micro-ranged Surface Topography.* 7th welisa Workshop, November 2012 Wustrow
5. **Stählike/Matschegewski/:** *Mimikry bei Zellen - Einfluss der Materialstrukturen.* welisa Interdisziplinäre Ringvorlesung Elektroimpulse & Implantate an Uni Rostock, 01.12.2011, Rostock
6. **Stählike S:** *Untersuchung der Zellfunktion von Knochenzellen auf der mikrostrukturierten Implantatoberfläche.* Eröffnung der Interdisziplinären Ringvorlesung Elektroimpulse & Implantate, Uni Rostock, 27.10.2011, Rostock
7. **Stählike S:** *Investigation of the cell function of osteoblasts on defined microstructured surfaces.* 5th welisa Workshop, Oktober 2011, Groß Breesen
8. **Stählike S:** *Untersuchungen der Zellfunktion von Knochenzellen (Osteoblasten) auf mikrostrukturierten Implantatoberflächen.* Lange Nacht der Wissenschaften, Uni Rostock, 28.04.2011, Rostock
9. **Stählike/Matschegewski/:** *Cell function of osteoblasts on titanium surfaces with regular geometry.* Forschungsseminar der Medizinischen Fakultät der Uni Rostock, 03.12.2009, Rostock
10. **Stählike S:** *Definiert mikrostrukturierte Titanoberflächen und deren Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts von humanen Osteoblasten.* DGBM, November 2009, Tübingen
11. **Stählike/Matschegewski/:** *Analysis of initial adhesion mechanisms of osteoblasts in dependence of chemical, physical and electrical characteristics of implant surfaces.* 2nd welisa Workshop, November 2009, Graal Müritz
12. **Stählike S:** *Zellfunktion von Osteoblasten auf definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen.* Statusseminar Graduiertenkolleg welisa, 02.10.2009, Rostock
13. **Stählike/Matschegewski:** *Analyse initialer Adhäsionsmechanismen von Osteoblasten in Abhängigkeit von definiert mikrostrukturierten Titanoberflächen.* 1st welisa Workshop, März 2009, Rostock

#### **Betreuung von studentischen Arbeiten:**

Romy Zurleit, Bachelor (2010) Thema: Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch Kupfer.



**Weiterbildung:**

- Stimmtraining, Gewaltfreie Kommunikation nach M. B. Rosenberg, Dipl. Päd & Wirtschaftspsych. A. Ozik-Scharf 25.11.2013 & 12.12.2013 , Rostock
- Karriere Training, PCM – Process Communication Model by Dr. T Kahler, Dr. Johanna von Luckwald 10.2013, Rostock
- Englischschulung (B2 Kommunikationsenglisch „scientific use“), S-COOL 09.2012-01.2013, Rostock
- 9th symposium „Materials' Days“ 23.-24.05.2013, Rostock
- 4th International Symposium Interface Biology of Implants (IBI) 09.-11.05.2012, Rostock-Warnemünde
- 5. Sitzung des DGM-Fachausschusses "Biomaterialien" 11.-12.04.2012, Jena
- 7. Materials' Days 06.-07.2011, Rostock
- 3rd *welisa* Workshop 03.-04.06.2010, Poel
- 4. Sitzung des DGM-Fachausschusses "Biomaterialien" 28.-29.4.2010, Jena
- European Bio-Plex® System User Meetings 11.9.2009, Berlin
- 5. Materials' Days „Functional Materials and Nanotechnology“ 09.-10.07.2009, Rostock
- 3rd International Symposium on "Interface Biology of Implants" (IBI) 13.-15.05.2009, Rostock-Warnemünde

**Kooperation mit anderen Universitäten:**

Medical University of Hannover, Department of Otolaryngology, OE6500, Carl-Neuberg-Str.1, D-30625 Hannover: Messungen am Rasterkraftmikroskop (AFM) mit Dipl.-Ing. Pooyan Aliuos (PhD) vom 29.03.-01.04.2010