



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Motilität und Adhäsion von Osteoblasten und
Osteoklasten an β -TCP“

verfasst von

Marlene Illetschko

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, Mai 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann, der mir im Rahmen der Diplomarbeit einen kleinen aber sehr aufregenden Einblick in die „Welt der wissenschaftlichen Forschung“ gegeben hat und mich gelehrt hat, was es heißt wissenschaftlich zu arbeiten.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Frau Barbara Berger, Herrn Peter Höflich und Frau Yvonne Haslinger für die Unterstützung und das nette Arbeitsklima bedanken. Das Team ist mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und hat wesentlich zum Erfolg meiner Diplomarbeit beigetragen.

Zum guten Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken. Ihre jahrelange Unterstützung hat mir geholfen, meinen Weg durch das Pharmaziestudium zu meistern. Sie waren in diesen Zeiten mein Fels in der Brandung und haben mir nicht nur Mut zugesprochen, sondern mich auch mit weisen Ratschlägen versorgt.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	2
Inhaltsverzeichnis	3
Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Knochenstoffwechsel	8
1.1.1 Zellen des Knochenstoffwechsels	9
1.1.1.1 Osteoblasten	10
1.1.1.2 Osteoklasten	11
1.1.1.3 Osteocyten/Bone lining cells.....	13
1.1.2 Störungen im Knochenstoffwechsel.....	14
1.1.2.1 Knochenerkrankungen(z.B.Osteoporose)/Knochenbrüche	14
1.3 Knochenersatzmaterialien /Arten.....	20
1.3.1 Autografts	21
1.3.2 Allografts	22
1.3.3 Xenografts	23
1.3.4 Alloplastische/synthetische Materialien.....	24
1.4 Biomaterialien.....	25
Tissue Engineering	27
1.4.1 Biomaterialien- Vertreter	29
1.4.1.1 Metalle	30
1.4.1.2 Kalziumphosphat-Keramiken/Biokeramiken.....	30
1.4.1.2.1 TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$].....	31
1.4.1.2.2.HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).....	33
1.4.1.3 Polymere	35
1.5 Zelladhäsionsproteine	36
1.5.1 Integrine.....	38
1.5.2 FAK (Focal Adhesion Kinase)	41
1.5.3 Paxillin.....	44
1.6 Ziel der Diplomarbeit.....	46
2 Materialien und Methoden	47
2.1 Materialien.....	47
2.1.1 Ausrüstung.....	47

2.1.2 Lösungen und Substanzen	49
2.1.3 Kulturmedien	51
2.1.4 Zellen	51
2.1.4.1 Osteoblasten	51
2.1.4.2 Osteoklasten	51
2.2. Methoden	52
2.2.1 Herstellung der β -TCP-discs, Knochenplättchen und Deckgläser	52
2.2.1.1 β -TCP-discs	52
2.2.1.2 Knochenplättchen	52
2.2.1.3 Deckgläser	53
2.2.2 Vorinkubation der Testpräparate.....	53
2.2.3 Gewinnung von Osteoblasten aus Mäusecalvarien	53
2.2.4 Gewinnung von Osteoklasten aus Kaninchen- Extremitäten.....	54
2.2.5 Aussaat von Osteoblasten und Osteoklasten	54
2.2.6 Zellfixierung.....	55
2.2.7 Färbung	55
2.2.7.1 Zytoskelett (Aktinring)-Färbung mit Alexa Fluor Phalloidin.....	55
2.2.7.2 Zellkern (DNA)-Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	55
2.2.7.3 Protein-Färbung mit Adhäsionsprotein Paxillin /FAK/ Integrin α_2 / Integrin β_1	56
2.2.8 Einbettung von β -TCP discs/ Knochenplättchen/ Deckgläsern.....	56
2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie	56
2.2.10 AFM-Rasterelektronenmikroskop	57
3 Resultate.....	59
3.1 Osteoblasten aus Mäusecalvarien	59
3.1.1 Motilität, Adhäsion von Osteoblasten auf β -TCP mittels Fluoreszenzmikroskopie	59
3.2 Osteoklasten aus Kaninchenknochen.....	68
3.2.1 Motilität und Adhäsion von Osteoklasten auf β -TCP mittels Fluoreszenzmikroskop	68
3.3 Untersuchung des Oberflächenprofils von β -TCP discs mittels AFM (Rasterelektronenmikroskop).....	72
4 Zusammenfassung	74
5 Summary	77
6 Diskussion	78
7 Abbildungsverzeichnis.....	83

8. Curriculum Vitae.....	85
9 Literaturverzeichnis.....	86

Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen

AFM	Rasterelektronenmikroskop
BRU	bone remodeling unit
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	Bovine Albumin Serum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-hydrochlorid
D N A	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH 70%/96%	Ethylalkohol 70%/96%
FGF	fibroblast growth factor
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum
HLA	human leucocyte antigen
HA	Hydroxylapatit
HCL	Salzsäure
dH ₂ O	bidestilliertes Wasser
IGF	Insulin like growth factor
LAF	Laminar Air Flow
MSC	Mesenchymale Stammzellen
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
αMEM	Eagle's Minimum Essential Medium,alpha Modifikation

NF- κ B	nuclear factor kappa B
NaOH	Natronlauge
NaCL	Natriumchlorid
NGS	natural goat serum
NaN ₃	Natriumazid
OPG	Osteoprotegerin
OCP	Oktakalziumphosphat
PCR	polymerase chain reactions
PMMA	Poly-Methyl-Methacrylat
PDGF	platelet-derived growth factor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PAX	Paxillin
RGD	Arginin Glycin Asparagin
RANKL	receptor for activation of NF- κ B ligand
S1P	Sphingosine-1-phosphat
TCP	Trikalziumphosphat
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase
β -TCP	beta Trikalziumphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Knochenstoffwechsel

Die menschliche Rüstung, das Skelett, welches zum einen als Schutzschild der inneren Organe zum anderen gemeinsam mit den Muskeln als Stütz-, und Bewegungsapparat eine tragende Rolle spielt, ist ein System aus starken Hebeln, stabilen Platten und genial konstruierten Gelenken. Neben den schon erwähnten Schutz-, und Fortbewegungsfunktionen hat es auch Einfluss bei der Homöostase des Mineralien- und des Säuren- und Basen-Haushalts, wobei letzteres für die Aufrechterhaltung des Calcium- und Phosphor-Spiegels zuständig ist. (Dempster, 2006) Um diese Aufgaben und Funktionen fortlaufend erfüllen zu können, müssen im Skelett permanente Abbau-, Erneuerungs- und Aufbauprozesse, das sogenannte „Remodeling“, vollzogen werden, welche nicht nur für die Knochenfunktion, sondern auch für die Knochenstruktur jedes einzelnen Individuums bedeutend sind.

(Kular et al., 2012)

Aus diesem kurzen Kontext lässt sich somit schließen, dass der Knochen keine trockene Materie darstellt, sondern eine hoch spezialisierte Form von Bindegewebe ist, welches auf der einen Seite leichter als Stahl, auf der anderen Seite gegen Druck doppelt so widerstandsfähig wie Granit ist. Den zentralen Kern dieses Maschenwerkes aus Steifheit, Härte und Elastizität stellt die extrazelluläre Matrix dar, welche auf der einen Seite aus organischen und auf der anderen Seite aus anorganischen Elementen, hauptsächlich Hydroxylapatit, zusammengesetzt ist.

Morphologisch unterscheidet man 2 Knochenformen, den kortikalen (kompakten) Knochen und den spongiösen (weichen) Knochen, welche sowohl in ihrer Funktion, Dichte als auch Struktur relativ verschieden sind. Die kortikale Form, welche 80% der Knochenstruktur in Anspruch nimmt, besteht aus dicht aneinander gelagerten Kollagenfasern, die sowohl senkrecht als auch waagrecht verlaufen und ein mechanisch stabiles und schützendes Grundgerüst darstellen. Der Aufbau des spongiösen (trabekulären) Knochens

ist das genaue Gegenteil. Lockere Anordnungen, eine hohe Konzentration an Blutgefäßen und eine poröse Matrix, deren Poren mikroskopisch sichtbar gemacht werden können, erlauben keineswegs protektive, sondern ausschließlich metabolische Funktionen.(Ratner et al., 1998) In Summe ist zu sagen, dass der Knochen bis zu einem gewissen Grad beanspruchbar ist und kleinere Fehler beheben, nicht aber gegen die „Stürme der Zeit“ auf Dauer standhalten kann. Soll heißen, um seinen Aufgaben so lang wie nur möglich nachgehen zu können, muss das Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau und die einzelnen Prozesse auf zellulärer Ebene erhalten bleiben. Im oben erwähnten Remodeling dürfen keine Fehler geschehen, welche unter anderem zum Verlust der Knochenmasse, Festigkeit und Form und zu daraus folgenden Erkrankungsbildern, wie Osteoporose, führen könnten. Das Ganze ist mit einem Bankkonto vergleichbar:Ist der Stand am „Knochenkonto“ gut, kann man über die Jahre unbeschwert und sorglos abheben, das heißt, der Knochen wird seiner geregelten Funktion nachgehen können. Liegt allerdings ein Fehler im System vor oder kommt es zum Verlust von Guthaben, so muss man mit einem Bankrott, welcher zum Beispiel mit einem Knochenbruch gleichzusetzen ist, rechnen.

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Zelltypen besprochen, welche eine tragende Rolle beim Knochenstoffwechsel spielen und es wird ein kurzer Einblick in die Phasen des remodelings gewährt.

1.1.1 Zellen des Knochenstoffwechsels

Eine kleine Einheit aus verschiedenen Zelltypen ist tagtäglich für den Erhalt, Reparatur und die Form des Knochens zuständig. Man fasst sie auch unter der Bezeichnung „BRU-bone remodeling unit“ zusammen. Die BRU umfasst Osteoklasten, Osteoblasten, Osteocyten und bone lining cells. Ihnen kommen unterschiedliche Aufgaben zuteil, welche zum Remodeling gezählt werden.

Unter dem Begriff „Remodeling“ fasst man alle Prozesse, die den Knochenumbau betreffen, zusammen, um eine Anpassung der Knochenform

und –stärke an die unterschiedlichen mechanischen Bedingungen zu ermöglichen. (Martin, 2000) Über ein mechanisches Signal werden Osteoklasten-Vorläuferzellen, auch Präosteoblasten genannt, stimuliert und reifen zu aktiven Osteoklasten heran, welche mit der Resorption an der Knochenoberfläche beginnen. Während dieses Vorganges sezernieren sie bestimmte Botenstoffe, welche wiederum Auslöser für die Aktivierung von Osteoblasten sind (genauerer siehe unter den Abschnitten 1.1.1.1-1.1.1.2) Nach Beendigung des Resorptionsvorganges und anschließender Apoptose der Osteoklasten, reifen die Osteoblasten heran und starten mit der Mineralisation und Knochenneubildung, welche die größte Zeitspanne in Anspruch nimmt.

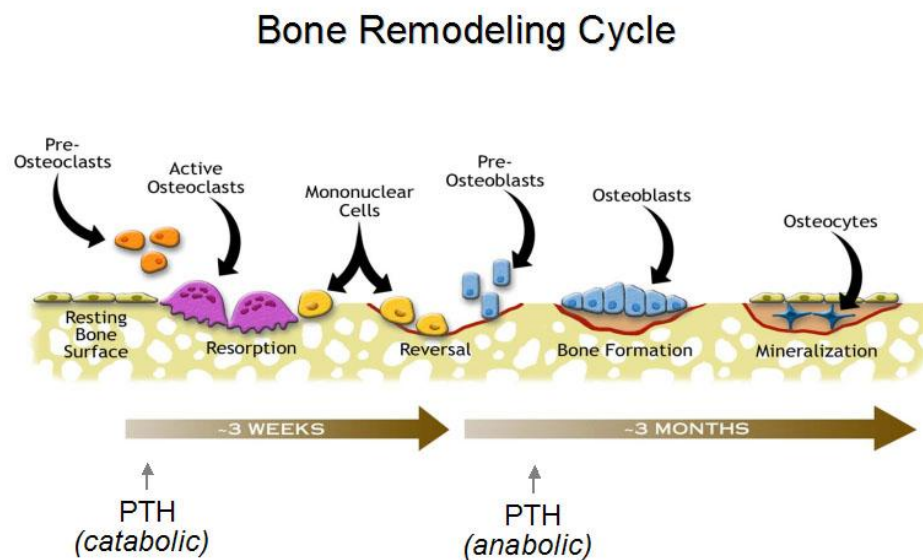


Abbildung 1: Schematische Darstellung des bone-remodellings mit beteiligten Zellen (Murugan et al., 2005)

1.1.1.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind jene Zelltypen, welche für den Knochenaufbau zuständig sind. Sie entspringen mesenchymalen Stammzellen (MSC, mesenchymal stem cells) aus dem Knochenmark oder Periosteum, welche zu Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteocyten und „bone lining cells“ differenzieren. Osteoblasten sezernieren neben dem Kollagen Typ I (Hauptbestandteil der Knochenmatrix) auch noch weitere nicht kollagene Proteine, nämlich Osteocalcin und die für die

Mineralisation der Knochenmatrix wichtige alkalische Phosphatase. (Ratner et al., 1998) Sie sind für die Bildung des Osteoids (unmineralisierte Interzellulärsubstanz der Knochenmatrix) zuständig, in welche sich während der Mineralisation Calcium und Phosphat in Form des Hydroxyapatits einlagern. Ihre Aufgaben und Tätigkeiten werden über Rezeptor-Liganden Bindungen mit unter anderem BMP, Parathormon und Östrogenen reguliert. (Kular et al., 2012) Neben ihrer Hauptfunktion als Knochenaufbauende-Zellen, sind die Osteoblasten auch an der Ausdifferenzierung von Osteoklasten beteiligt. Sie sezernieren unter anderem Faktoren wie M-CSF, RANKL und OPG, welche für die Reifung, Aktivierung und Funktion der Osteoklasten essentiell sind. Daneben können sie durch Abgabe von Kollagen Typ I und Osteocalcin als chemotaktische Sensoren, die Wanderung der Osteoklasten an der Knochenoberfläche überwachen. (Kular et al., 2012)

1.1.1.2 Osteoklasten

Die knochenabbauenden Zellen, sogenannten Osteoklasten, können morphologisch sehr gut von Osteoblasten unterschieden werden. Sie besitzen mehrere Zellkerne, während bei Osteoblasten nur ein Zellkern vorzufinden ist. Ihren Ursprung haben sie im Knochenmark, wo sie aus mononukleären Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen-Familie entspringen. Dieser Vorgang wird auch als „Osteoklastogenese“ bezeichnet. Neben Cathepsin K produzieren sie die für die Resorptionsprozesse essentielle Tartrat resistente saure Phosphatase (TRAP)

Reife Osteoklasten sind an den sogenannten Howship-Lakunen lokalisiert. Mit Hilfe von Podosomen sind sie in der Lage zur entsprechenden Resorptionslakune zu wandern und am „ruffled border“, dem Ort der Knochenresorption, ihrer Tätigkeit nachzugehen. In dieser Phase besitzen die Osteoklasten ein charakteristisches Aussehen. Neben einer stark gefalteten Zellmembran ist eine unter dem Mikroskop intensiv gefärbte „sealing zone“ zu erkennen. Die „sealing zone“ dient auf der einen Seite zum Abschirmen des sauren, an der Resorption beteiligten, Milieus vom Rest der Zelle und auf der anderen Seite ist es jener Bereich, an dem sich der Osteoklast mit

Adhäsionsproteinen, wie den Integrinen, an der Knochenoberfläche anhaftet. (Kular et al., 2012) (Tondravi et al., 1996)

Damit der Osteoklast seine Tätigkeit als knochenabbauende Zelle ausüben kann, müssen Preosteoklasten durch bestimmte Faktoren, welche unter anderem von Osteoblasten, Knochenmarkszellen, T-Lymphozyten sezerniert werden, aktiviert werden und durch Differenzierungsprozesse zu ihrer reifen Form heranwachsen. Zwei dieser wesentlichen „Aktivierungsfaktoren“ sind M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und RANKL (receptor for activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) ligand). M-CSF ist auf der einen Seite für das Heranreifen von Makrophagen und auf der anderen Seite für die Proliferation der Osteoklasten über Bindung an den Rezeptor c-fms an der Zelloberfläche zuständig. RANKL löst nach Fusion mit dem Rezeptor RANK, welcher ebenfalls auf der Osteoklastenoberfläche vorzufinden ist, eine Signalkaskade aus, welche schlussendlich über Aktivierung von NF- κ B die Gentranskription im Nukleus startet und zur Fusion von Preosteoklasten zu einer multizellulären Einheit und daraus differenzierender reifer Osteoklasten führt.

Wie auch die Osteoblasten, sind auch die Osteoklasten in der Lage, das Heranreifen und die Funktion der Osteoblasten zu steuern. Neben Faktoren wie S1P (Sphingosine 1-phosphate), welche für das Heranreifen und Wachstum der Osteoblasten als auch Ausschüttung von RANKL zuständig sind, und Ephrin B2, welches über eine Rezeptor-Liganden Bindung mit EphB4 die Osteoblastendifferenzierung und Knochenneubildung startet, bis hin zu BMP (bone morphogenetic proteins), IGFs (insulin like growth factors) und TGF β (transforming growth factor beta), können die Zellen auch direkt über Zell-Zell-Kontakte miteinander in Verbindung treten und so die Funktionsabläufe des jeweiligen anderen beeinflussen.

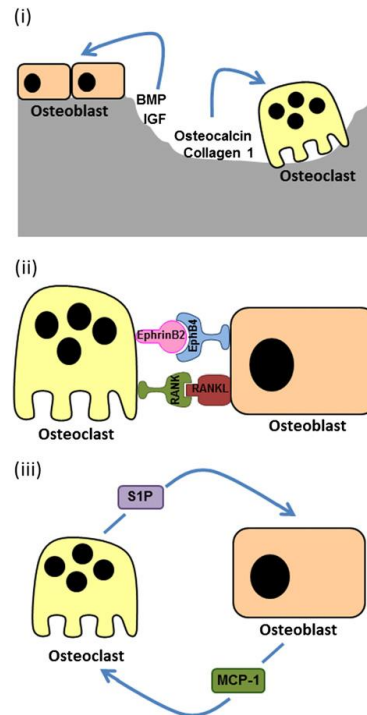


Abbildung 2: Wege der Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten: (I) Abgabe von Faktoren wie BMP, IGF; (II) Zell-Zell-Kontakte; (III) Regulation der Aktivierung von Osteoblasten über Faktoren, welche von Osteoklasten sezerniert werden. (Kular et al., 2012)

Somit ist festzuhalten, dass für einen optimalen Knochenstoffwechsel ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau und in weiterer Folge ein optimales Gleichgewicht zwischen der Anzahl an Osteoblasten- und Osteoklasten herrschen muss, um einen gesunden Knochenbau gewährleisten zu können.

1.1.1.3 Osteocyten/Bone lining cells

Nach Beendigung des Mineralisationsvorganges sind aktive Osteoblasten in der Lage, sich in die neu gebildete Knochenmatrix einzubetten und als Osteocyten weiter zu bestehen. Diese Zellen sind wesentlich kleiner als die aktiven reifen Osteoblasten und haben auch morphologisch betrachtet weniger cytoplasmatische Organellen aufzuweisen. In den Lacunen der Knochenmatrix liegen die Osteocyten getrennt voneinander vor und sind in der Lage über Phyllopoden miteinander aber auch mit anderen Zellen wie reifen Osteoblasten in Kontakt zu treten. Sie stellen eine Art Netzwerk dar, welches Signale und

Stimuli aus der Peripherie ins Zentrum des Knochens leiten kann. Als Mechanosensoren nehmen die Osteocyten Mikroschäden im Knochen wahr, lagern sich in der Nähe der betroffenen Stelle an und aktivieren über verschiedene Signalkaskaden die Osteoklasten, welche wiederum mit dem Remodeling beginnen. (Kular et al., 2012)

Eine weitere Differenzierungsform der Osteoblasten stellen die Knochenbelegzellen dar. Dabei handelt es sich um abgeflachte, inaktivierte Zellen, welche entlang der Knochenoberfläche zu finden sind. Sie sind nicht am Knochenumbau beteiligt, lediglich am Transport von Mineralien in bzw. aus dem Knochengewebe und an der Aktivierung von Osteoklasten über die Ausschüttung von speziellen Proteinen. (Murugan et al., 2005)

Wie alle anderen Organe wird auch der Knochen mit Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Blutgefäßsystem versorgt. Es spielt eine essentielle Rolle beim Remodeling und trägt zum Erhalt der Dichte und Knochenstruktur bei. Eine geringe Knochendurchblutung und dem zu Folge geringe Versorgung der Zellen mit Sauerstoff, führt zur einer herabgesetzten Knochenheilung und zum Verlust an Knochenmasse. (Kular et al., 2012)

1.1.2 Störungen im Knochenstoffwechsel

1.1.2.1 Knochenerkrankungen

(z.B.Osteoporose)/Knochenbrüche

Es gibt in der Tierwelt ein Lebewesen, den Axolotl, das in der Lage ist, seine Gliedmaßen, Organe oder Teile des Gehirns wieder herzustellen. Nach einer Verwundung ist der Stoffwechsel des Axolotls in der Lage, das betroffene Areal zur Wundheilung und zur vollständigen Erneuerung anzuregen.

In gewisser Weise ist auch unser Knochenstoffwechsel zu solchen Leistungen fähig. Kleine Schäden in der Knochenstruktur können ohne Narbenbildung

behaben und die betroffene Stelle als solche wieder in derselben Art und Weise belastet werden wie zuvor.

Es ist jedoch festzuhalten, dass die Abläufe in der Wundheilung des Knochens sich von jenen im Remodeling und in der Osteogenese (Knochenentstehung, Knochenbildung) unterscheiden. Die Osteogenese läuft während der prä- und postnatalen Entwicklung ab und beinhaltet Prozesse, die für die Bildung und die Resorption des Knochens essentiell sind, um eine normale Knochenarchitektur zu gewährleisten. Anders die Abläufe während des Remodelings, welche wie bereits erwähnt, für den Erhalt der biochemischen und metabolischen Funktionen des Knochens zuständig, als auch für die Reparatur von Mikroschäden, die im Laufe der Zeit im Knochengerüst anfallen, verantwortlich sind. (Kular et al., 2012) (Jee, 2001) (Tondravi et al., 1996)

Neben kleinen Traumen können auch diverse andere Faktoren (Mangel an Wachstumsfaktoren, Hormone, physikalische Einflüsse) die zelluläre Balance und in weiterer Folge das Remodeling sowie Abläufe im Knochenstoffwechsel stören und Erkrankungen, wie Osteoporose, Osteopetrose oder Morbus Paget hervorrufen. Bei der Osteoporose, einer der häufigsten Knochenerkrankungen des 21. Jahrhunderts, ist oftmals mit einer Reduktion der Knochenmasse und daraus resultierender Verminderung der Mikroarchitektur zu rechnen. Das Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten ist gestört und ein geregelter Knochenabbau, -umbau und Knochenaufbau nicht mehr ausführbar. Ein von Osteoporose betroffener Knochen ist im Bezug auf seine Wundheilung nicht mit jenem nach einem Trauma zu vergleichen. Der Knochen ist nicht mehr in der Lage, seiner Funktion als Schutz- und Stützorgan nachzugehen, bedeutungslose Stürze können zum Bruch des Knochens führen. Eine Selbstheilung ist nicht mehr möglich. Die anfangs stabile Struktur droht in sich zusammenzubrechen -ein Prozess, der sich über Jahre hinzieht und aufgrund des anfangs symptomfreien Verlaufs zu spät diagnostiziert wird. In Fachkreisen fällt auch oftmals die Bezeichnung „silent disease“, wobei nicht die Krankheit per se die größte Problematik darstellt, sondern die aus ihr resultierten Knochendefekte, allen voran Knochenbrüche. Oftmals werden diese auch als „low trauma fractures“ definiert, da sie bereits nach harmlosen Stürzen auftreten

können. Hüft-, Rückenwirbel-, und Oberschenkelhalsbereich stellen jene Areale dar, welche am häufigsten in Mitleidenschaft gezogen werden 2001 definierte die NIH (National Institutes of Health) Consensus Development Panel on Osteoporosis dieses Erkrankungsbild folgendermaßen: „...a skeletal disorder characterized by compromised bone strength predisposing a person to an increased risk of fracture. Bone strength primarily reflects the integration of bone density and bone quality.“ (Imel et al., 2014)



Abbildung 3: Witwenbuckel: Der sogenannte “Witwenbuckel” ist ein charakteristisches Merkmal fortgeschrittener Osteoporose. (Quelle: Pharmazeutische Zeitung, Ausgabe 27/2010, pharmazeutische-zeitung.de)

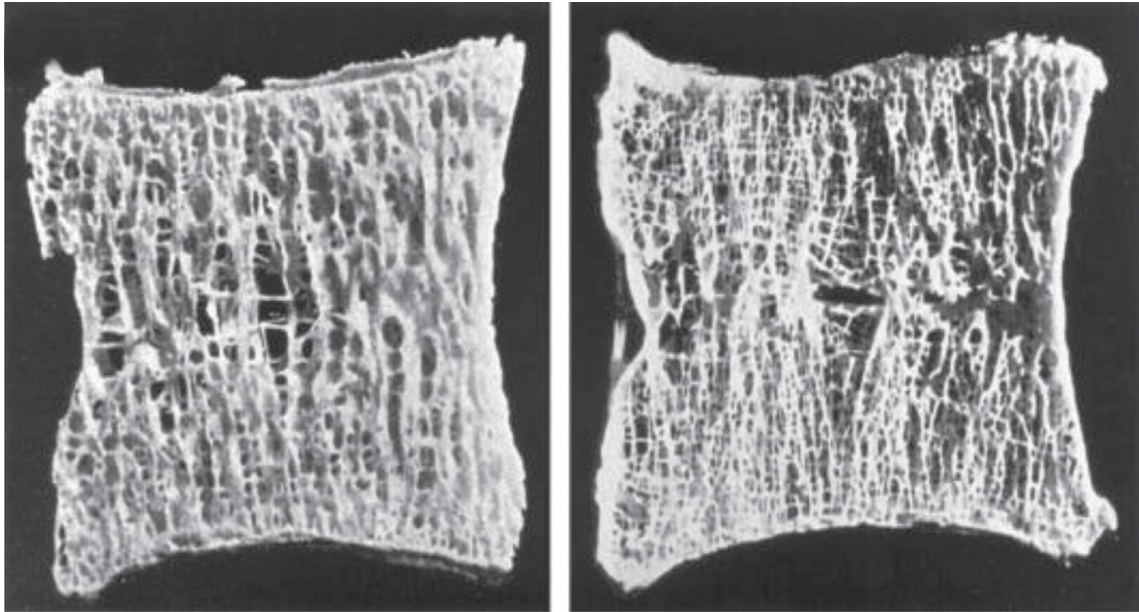


Abbildung 4: Osteoporose-Knochenverlust: Verlust der spongiösen Knochenmasse im Rückenwirbel; 50% des Rückenwirbels besteht aus kortikalen Knochen; rechtes Bild: Verlust der vorderen kortikalen Knochenschicht (Imel et al., 2014)

Nicht jede Fraktur ist aber das Resultat einer vorangegangenen Grunderkrankung wie Osteoporose. Eine Unterbrechung der Kontinuität eines Knochens aufgrund von unterschiedlichen Gewalteinwirkungen, direkter (Sturz) oder indirekter (Operation) Art, stellt eine der häufigsten Knochenläsionen dar, wobei zwischen rigider stabilisierter und nicht rigider stabilisierter Form im Bezug auf die Frakturheilung unterschieden werden muss. Bei der erst genannten primären Form spricht man von Kontakt- und Spaltheilung, besser bezeichnet als „primary contact healing“ oder „primary gap healing“, wobei die betroffenen Fragmente in direktem Kontakt stehen oder teils durch Spalten getrennt sind. Es kommt zur Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten, Bildung von „Tunneln“ und Einsprossung von Gefäßen, aus welchen ein normaler kortikaler Knochen am Ende hervorgeht, welcher wieder in der üblichen Art und Weise belastet werden kann. (Einhorn, 1998) (Greenbaum MA et al., 1993)

Anders die sekundäre Wundheilung, welche in 4 Phasen eingeteilt wird:

- 1.Entzündungsreaktion (1.-7.Tag)
- 2.Granulation (2 Wochen)
- 3.Kallusbildung (4-16 Wochen)
- 4.Remodeling (mehrere Monate-Jahre)-Bildung von primären und sekundären Knochen

(ad 1.) Unmittelbar nach einer Fraktur wird der betroffene Raum zwischen den Knochenfragmenten mit Blut gefüllt. Es kommt zur Bildung eines Hämatoms, wobei das angrenzende verletzte Gewebe und die in ihm befindlichen Blutgefäße aufgrund des geringen Sauerstoffgehaltes und geringen pH-Wertes absterben und nekrotisch werden. Zellen des Immunsystems, hauptsächlich Makrophagen, Leukozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und Chondrozyten, beginnen mit Abtransport des nekrotischen Gewebes. Thrombozyten und Leukozyten sezernieren Wachstumsfaktoren wie TGF- β , PDGF, FGF(fibroblast growth factor, welche die Proliferation, Differenzierung und Angiogenese steuern, während Makrophagen eine Reihe von inflammatorischen Cytokinen, wie Interleukin (IL)1, (IL)6 und TNF- α , ausschütten, die für die Aktivierung von Chondro-/Osteoprogenitor-Zellen zuständig sind. (Steen et al., 2011)

(ad 2.) Nach ungefähr 2 Wochen kommt es zur Umwandlung des Hämatoms zum Granulationsgewebe. Fibroblasten wandern in das verletzte Gewebe ein und starten mit der Bildung von Kollagen, während Endothelzellen das entsprechende Kapillarendothel bilden. (Kenley RA et al., 1993)

(ad 3.) Im Anschluss kommt es zur Verfestigung des Granulationsgewebes, dem sogenannten Kallus, und zur Bildung eines Deckknochens. Chondrozyten wandern in den vaskularisierten Bereich des Kallus ein und bauen eine Matrix aus Knorpelgewebe auf, welche im weiteren Verlauf mineralisiert wird. Osteoprogenitor-Zellen werden über Blutgefäße eingeschleust und können zu Osteoblasten ausdifferenzieren, welche sich an die mineralisierte Matrix anlagern, Kollagen Typ I sezernieren und so zur Bildung des Osteoids

beitragen. Die Umwandlung des Deckknochens zum Geflechtknochen hat begonnen.

(ad 4.) Nach mehreren Monaten oder Jahren werden die Chondrozyten apoptotisch und die Matrix mit Hilfe von Osteoklasten resorbiert. In Folge wird aus dem Geflechtknochen ein Lamellenknochen und die Wundheilung ist beendet. Aufgrund des Remodelings kann der Knochen an Stärke und Festigkeit gewinnen und seiner ursprünglichen Funktion wieder nachgehen. (Frost HM, 1989) (Steen et al., 2011)



Abbildung 5: Prozesse der sekundären Wundheilung:Prozesse der sekundären Wundheilung: (linkes Bild):Kallusbildung bei Femurfraktur; (mittleres Bild):verzögerte Knochenbruchheilung; (rechtes Bild):Zustand der Fraktur nach 3 Jahren, leichte Unregelmäßigkeiten der Kortikalis (Traumafolge) Quelle: Bohndorfer, Imhof, Fischer, Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke, (ISBN3131109823) © 2006 Georg Thieme VerlagKG

Die Prozesse der Wundheilung sind Voraussetzung für den Erhalt und den Wiederaufbau unseres Knochens. Doch manchmal ist eine vollständige Regeneration nicht mehr möglich. Falls mit einer zu erwartenden Heilungsstörung zu rechnen ist, sollte der Defekt mittels Knochenersatzmaterialien/Knochenaufbaumaterialien behoben werden. Diese können autogener, allogener, xenogener oder alloplastischer/synthetischer Natur sein. Das Grundziel ist die *Restitutio ad integrum*.

1.3 Knochenersatzmaterialien/Arten

Knochenersatzmaterialien stellen eine sehr häufige Behandlungsmethode im klinischen Alltag dar. Neben ihren mechanischen und strukturellen Fähigkeiten, helfen sie auch das knöcherne Skelett mit all seinen funktionellen und ästhetischen Aspekten wieder aufzubauen, unter Berücksichtigung des Erhalts des ortsständigen Knochens und dessen Funktionen. Die Bezeichnung „Ersatzmaterial“ trifft es somit nicht ganz, denn sie ersetzen nicht nur das

betroffene Areal im Knochen, sondern tragen auch zu dessen Regeneration bei, welche bis zur vollständigen Knochenneubildung reichen kann.

Bei der Auswahl der Knochenersatzmaterialien sind verschiedene Faktoren zu beachten, die Einfluss auf das Wohl des Empfängers als auch auf den Knochenstoffwechsel haben. Neben ausreichender Verfügbarkeit, Stabilisierung des Defekts und geringem Infektionsrisiko, spielen Osteokonduktivität, Osteoinduktivität, Osteostimulation, Biokompatibilität und Osteointegration eine entscheidende Rolle. (Murugan et al., 2005)

osteokonduktiv: Fähigkeit des Einwachsens von Kapillaren und Knochenzellen in das defekte Areal und Ausübung der physiologischen Funktionen

osteoinduktiv: Umwandlung undifferenzierter mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoprogenitor-Zellen und Osteoblasten, Stimulation der Knochenregeneration, Osteogenese folgt, Auslösende Faktoren u.a. BMP, IGF

osteointegrativ: Inkorporation des Implantats mit dem Wirtsknochen

osteostimulativ: Anregung des Knochenstoffwechsels und der beteiligten Zellen, besonders Osteoblasten

osteogenetisch: Fähigkeit der Proliferation von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten durch Stimulation oder über auslösende Faktoren wie BMP

biokompatibel: optimale Verträglichkeit, kein Auftreten von Immunreaktionen, keine toxischen oder kanzerogenen Eigenschaften

Bei Erfüllung all dieser Faktoren kann entschieden werden, welche Form des Knochenersatzmaterials verwendet wird.

Die bis dato am häufigsten eingesetzten Materialien sind sogenannten „Autografts“ bzw. „Allografts“:

1.3.1 Autografts

Autotransplantationen sind Verfahren, bei denen Organe, Gewebe oder auch Proteine von einem Bereich im menschlichen Organismus in einen anderen

Bereich transplantiert werden. Bei Empfänger und Spender handelt es sich um dasselbe Individuum. (Murugan et al., 2005) Das Risiko einer Abstoßungsreaktion wird minimiert, da es sich um keinen Fremdkörper im eigentlichen Sinne handelt, und der Heilungsprozess schreitet in großen Schritten voran, weshalb Autografts zu den „Gold-Standard“ Verfahren im Bezug auf die Knochenrekonstruktion gezählt werden. Neben Segmenttransport von Knochensegmenten können auch Zellen aus dem Knochenmark entnommen und als solche in das defekte Areal eingebracht werden. Autografts erfüllen sowohl die osteoinduktiven, osteokonduktiven als auch biokompatiblen Kriterien eines Knochenersatzmaterials und sind aufgrund der Beladung mit Osteoprogenitor-Zellen osteogenetisch. (Kenley RA et al., 1993) Wesentliche Nachteile bei der Anwendung von autologen Transplantaten sind neben der geringen Verfügbarkeit (quantitative Einschränkungen), Kosten, erhöhtes Schmerzempfinden beim Patienten, auch Komplikationen während der Entnahme. So kann es zu Weichteilinfektionen, Wund- und Knochenheilungsstörungen sowie Nachblutungen kommen, welche die Regenerationszeit und Krankenhausaufenthalte extrem verlängert. (Nkene et al., 2004) (Kenley RA et al., 1993) Der Einsatz von Autografts hängt im Wesentlichen auch von der Größe und Art der Verletzung ab. Folglich wird oftmals auf Allografts umgestiegen.

1.3.2 Allografts

Von Allografts oder Allotransplantation ist die Rede, wenn das transplantierte Gewebe nicht vom Empfänger selbst, sondern von einem genetisch nicht identischen Individuum derselben Spezies stammt. (Murugan et al., 2005) Vorteilhaft bei dieser Methode ist die Tatsache, dass es zu keiner quantitativen Einschränkung kommt und die Genesung des Empfängers aufgrund des Wegfallens eines zusätzlichen operativen Eingriffes wesentlich verkürzt wird. Dennoch können solche Transplantate beim Empfänger zu einem gesteigerten Infektionsrisiko führen, da das Risiko für die Übertragung von pathogenen Keimen wie Viren erhöht ist. Um dem entgegen zu wirken, werden neben

Sterilisationsverfahren, Autoklavierung oder Bestrahlung, diverse Screening-Verfahren, serologische Tests als auch PCR(Polymerase-Chain-Reactions) am Spendergewebe durchgeführt, da Aufzeichnungen belegen, dass es aufgrund von Resistenzen mancher Virusstämme gegenüber Sterilisationsverfahren bereits zur Übertragung von HIV-1 oder Hepatitis C Viren durch den Einsatz von Allografts kam. Diese Übertragungswahrscheinlichkeit soll durch den Einsatz von PCR-Tests reduziert und vermieden werden. Ein gewisses Restrisiko bleibt dennoch bestehen. (Fages et al., 1998) Auch die Gefahr einer Abstoßung des Fremdgewebes seitens des Empfängers ist gegeben. Knochenzellen besitzen an ihrer Oberfläche sogenannte Histokompatibilitäts-Antigene, welche an unbehandelten Transplantaten zu einer Immunreaktion führen können. Knochenmarkszellen sind an ihrer Oberfläche reich an HLA (Human Leucocyte Antigen), welche vom Immunsystem des Empfängers als Fremdkörper erkannt werden und ebenfalls eine Immunreaktion auslösen. All diese Faktoren können zur verringerter Knochenheilung beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass das Entfernen solcher HLA die Osteointegration des Transplantates wesentlich steigerte. (Fages et al., 1998) Somit sind Allografts osteokonduktiv, aber aufgrund eingesetzter Sterilisations-, und Reinigungsverfahren haben sie an osteoinduktiven und osteogenetischen Eigenschaften eingebüßt.

1.3.3 Xenografts

Die Prozesse der Xenotransplantation beinhalten das Übertragen von Geweben und/oder lebend- und funktionstüchtigen Zell(-verbänden)en zwischen zwei verschiedenen Spezies. Neben Knochentransplantationen kommen vor allem Herzklappen von Schweinen des Öfteren zum Einsatz, da sie im Bezug auf ihre physiologische Komponente besser den Anforderungen im menschlichen Organismus entsprechen. Das Problem der spezifischen Immunreaktion ist genauso wie bei Allotransplantationen gegeben, folglich dürfen xenogene Knochentransplantate nur nach vorangegangener Sterilisation und Entproteinisierung verwendet werden. (Murugan et al., 2005)

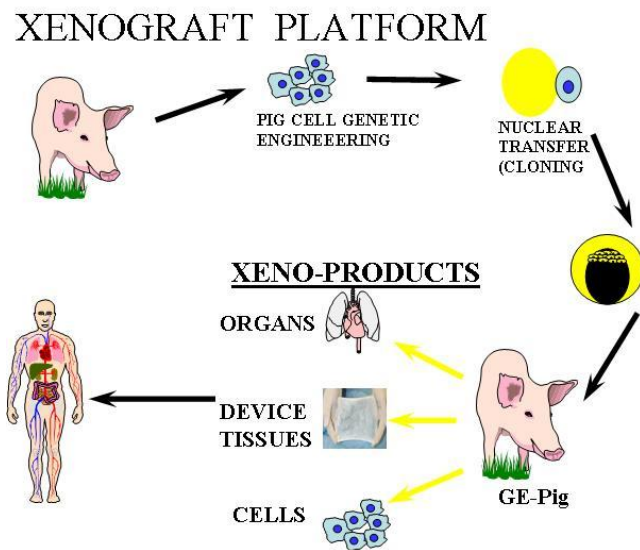


Abbildung 6: Xenotransplantation:(Quelle: revivacor.com; Revivacor Technologie, 2010)

1.3.4 Alloplastische/synthetische Materialien

Zur Unterstützung der Knochendefektheilung sind neben autogenen, allogenen und xenogenen Materialien vor allem auch alloplastische oder synthetische Vertreter, sogenannte Biomaterialien, von großem Interesse. Neben Senkung der Kosten und Morbidität des Patienten, sind sie auch in größeren Mengen verfügbar und das Risiko für die Übertragung von pathogenen Keimen wird minimiert. (Murugan et al., 2005)

1.4 Biomaterialien

Um den Begriff „Biomaterial“ besser verständlich zu machen, möchte ich einige Definitionen aus der Literatur zitieren, welche die eigentliche Bedeutung eines Biomaterials wiedergeben und welche Rolle jenem in der Defektheilung zugesprochen wird. Dazu schreibt Min Wang einleitend:

Zitat (1)*

„A biomaterial is a synthetic material used to replace part of a living system or to function in intimate contact with living tissue.“ (Ratner et al., 1996)

Zitat (2)*

„In 1986, the Consensus Conference of the European Society für Biomaterials defined a biomaterial as „a nonviable material used in a medical device, intended to interact with biological systems.“ (Williams, 1987a)

Zitat (3)*

„The Clemson University Advisory Board for Biomaterials defined a biomaterial as „a systemically and pharmacologically inert substance designed for implantation within or incorporation with living systems.“ (Donglu, 2004)

Zitat (4)*

„Any substance (other than drugs) or combination of substances synthetic or natural in origin, which can be used for any period of time, as a whole or as a part of a system which treats, augments, or replaces any tissue, organ or function of the body.“ (Hulbert et al., 1987; Helmus and Tweden, 1995)

(*Quellenangaben: Shi Donglu „Biomaterials and tissue engineering“, Seite 1 (Donglu, 2004)

Somit kann man sagen, dass Biomaterialien synthetisch hergestellte oder gewonnene bzw. nicht lebende natürliche Materialien sind, die sowohl in der

Lebensmittelindustrie als auch in der Medizin, und hier vor allem im oder am menschlichen Organismus bzw. auf dem Gebiet des „tissue-Engineerings“, eine entscheidende Rolle spielen. Sie sind in der Lage, ein verletztes Areal zu stabilisieren oder zu ersetzen und stehen in direktem Kontakt mit dem biologischen System und dessen Komponenten.

Der Einsatz von Biomaterialien reicht geschichtlich sehr weit zurück. So konnte bereits bei den Römern und Azteken die Anwendung von Gold oder Perlmutter als Zahnersatz festgestellt werden. Im Jahre 1937 wurde Gold durch das wesentlich billigere und reichlich vorhandene PMMA (Poly-methyl-methacrylat) ersetzt. Die wesentlich interessantere Geschichte der Biomaterialien begann jedoch erst ab dem Jahr 1958: Ideen über die Entwicklung von künstlichen Organen, wie Herzklappen, entstanden. Im Jahr 1960 gelang die erste erfolgreiche Hüftoperation, indem eine Kombination aus PMMA, Polyethylen und Stahl als Hüftersatz genutzt wurden. (Ratner et al., 1998)

Mit der Entwicklung von Biomaterialien versucht man eine möglichst rasche und vor allem effektive Regeneration und Wiederherstellung des entsprechenden Gewebes, in unserem Falle des Knochens, zu erzielen, mit dem Hintergedanken, die Nachteile, welche bei Allo-, Auto-, und Xenotransplantationen auftreten, zu unterbinden. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Biomaterialien einem anderen Herstellungsprozess unterliegen als der Knochen. Damit sie den Anforderungen im menschlichen Organismus, insbesondere dem Knochenstoffwechsel, entsprechen können, müssen sie möglichst nahe an dessen Struktur, Aufbau, Zusammensetzung und Funktion herankommen. Das heißt, ein optimales Biomaterial ist sowohl osteoinduktiv, osteokonduktiv, osteogenetisch als auch biokompatibel. Vor allem die Biokompatibilität spielt in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle, denn das Biomaterial soll nicht nur optimale Verträglichkeit aufweisen, sondern auch längerfristig keine Auswirkung auf das angrenzende Gewebe haben. (Murugan et al., 2005) Des Weiteren sollte es genügend mechanische Stabilität, Härte und Elastizität besitzen, um den entsprechenden

Anforderungen im Organismus stand zu halten. So sollte eine Hüftprothese stabil und fest genug sein, um nicht bei der geringsten Beanspruchung zu versagen. Ein Sehnenersatz hingegen sollte flexibel und dehnbar sein. (Ratner et al., 1998) Biomaterialien haben ein großes Anwendungsspektrum, nicht nur wie bereits erwähnt im medizinischen Bereich in Form von Implantaten oder Prothesen, welche zum Beispiel nach einem Knochenbruch oder dauerhaft unter anderem als Zahn-, oder Herzklappenersatz zum Einsatz kommen, sondern auch in der Zellkultur, wo sie als sogenannte „scaffolds“ (Unterlage, Stützstruktur) im Rahmen des „tissue Engineerings“ für das Anhaften, Wachstum und Differenzierung von Zellen dienen sollen. Zukunftsmäßig ist auch der Einsatz solcher als „biochips“ vorstellbar.

Tissue Engineering

Tissue Engineering oder Gewebezüchtung/Gewebekonstruktion ist ein Verfahren, welches von Charles Josef Vacanti, Charles Patrick, Antonios Mikos und Larry McIntire Mitte der 80iger Jahre gegründet wurde. Es umfasst die künstliche Herstellung von biologischem Gewebe durch die Kultivierung von Zellen auf entsprechenden scaffolds. Das daraus resultierte Gewebekonstrukt wird als Implantat genutzt. Ziel ist die Wiederherstellung des betroffenen Areal durch die Aktivierung der zum Erliegen kommenden Regenerationsvorgänge.

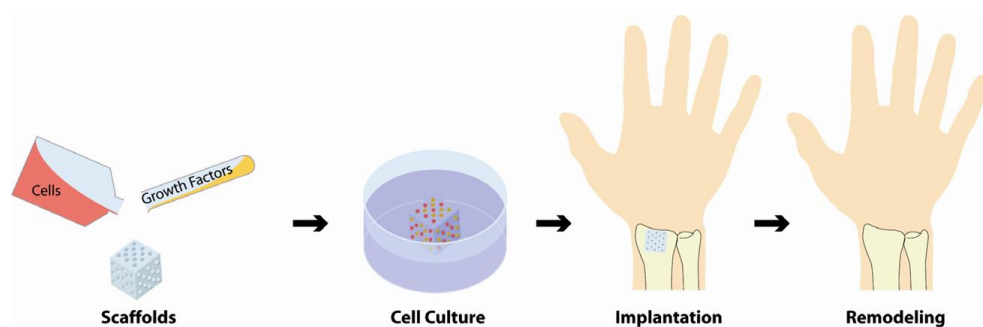


Abbildung 7: Tissue Engineering: Von der Zellkultivierung bis hin zum Einbringen des neu gebildeten Gewebes, in diesem Fall des Knorpels, in das betroffene Areal (Drosse et al., 2008)

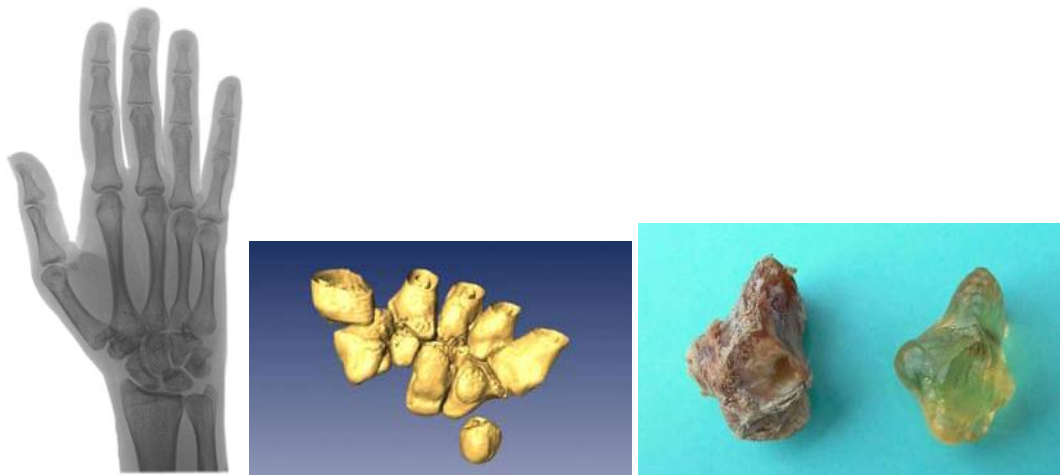


Abbildung 8: 3D-Implantate:Herstellung von 3D-Implantaten als Einsatz in der Knochenrekonstruktion/-heilung:CT-Einstellungen des betroffenen Handgelenks, mittels Stereolithografie wird ein Knochenmodell erstellt. (Drosse et al., 2008)

Für erfolgreiche Abläufe im Tissue Engineering benötigt man neben den scaffolds auch entwicklungsfähige Zellen, welche aus einem entsprechenden Wirtsorganismus, in idealen Fällen und um Immunreaktionen zu vermeiden vom Patienten selbst, isoliert werden. Während der Expansion versucht man, möglichst viele der isolierten Zellen zu erhalten und *in vitro* zu vermehren, um eine ausreichende Menge für den jeweiligen Bedarf zur Verfügung zu haben. Dabei kann es sich um zum Beispiel Chondrozyten, Fibroblasten oder Nervenzellen handeln. Die Expansion ist ein heikler Prozess, denn einige der isolierten Zellen verhalten sich *in vitro* anders als in ihrem physiologischem Milieu. So lassen sich Nervenzellen nur schwer vermehren während Chondrozyten auf die Produktion von Kollagen Typ II umschalten. (Donglu, 2004) Große Bedeutung als unversiegbare Zellquelle haben mesenchymale Stammzellen eingenommen: Sie sind für therapeutische Ansätze quantitativ leicht verfügbar, da sie aus den unterschiedlichsten Geweben wie Fettgewebe, Knochenmark oder Muskeln isoliert und unter entsprechenden Bedingungen *in vitro* kultiviert werden können. Über Differenzierungsprozesse können aus ihnen unter anderem Zellen des Herzmuskels oder des Knochens generiert werden (Drosse et al., 2008) In optimalen Fällen und um, wie bereits erwähnt, Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, werden aus autologen, also vom Patienten stammenden Zellen, künstliche Gewebe hergestellt und im verletzten Areal eingefügt. Tissue Engineering umfasst viele Facetten, welche nicht alle in

dieser Arbeit diskutiert werden können. Wesentlich mehr Interesse muss auf die scaffolds gerichtet werden, also jene Biomaterialien, welche im Rahmen des Tissue Engineerings und im medizinischen Bereich zum Einsatz kommen. Die wichtigsten Vertreter werden im folgenden Abschnitt besprochen:

1.4.1 Biomaterialien-Vertreter

Es gibt eine Reihe von Substanzen bzw. Wirkstoffen, welche als Biomaterialien Anwendung finden. Dabei handelt es sich nicht um eine einheitliche Stoffklasse, sondern um Materialien, welche in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften relativ unterschiedlich sind. Zu den drei großen Hauptvertretern zählen Metalle, Keramiken und Polymere. (Bose et al., 2013) Die Art der Anwendung hängt sehr stark von der jeweiligen Situation und Notwendigkeit ab: Zum einen können sie dauerhaft mit dem biologischen System in Kontakt treten, zum Beispiel als Hüftersatz oder Stent, zum anderen können sie auch als längerfristige Stütze zur rascheren Genesung wie beispielsweise bei einer Fraktur herangezogen werden. (Ratner et al., 1998)

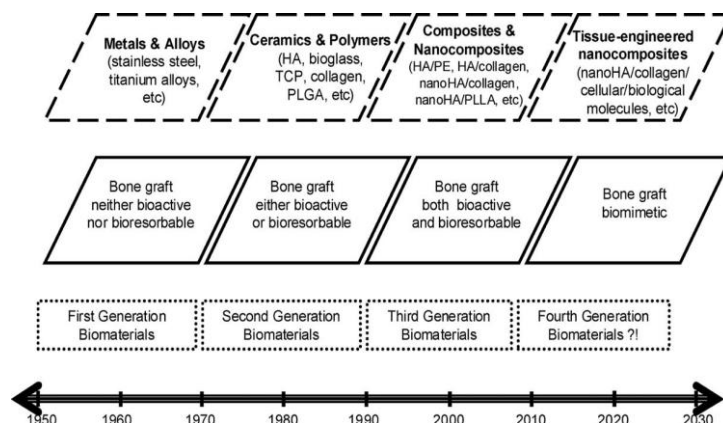


Abbildung 9: Entwicklung von Biomaterialien (Murugan et al., 2005)

1.4.1.1 Metalle

Zu den ältesten Biomaterialien, welche bereits seit 1900 in der klinischen Orthopädie zum Einsatz kommen, gehört die Gruppe der Metalle, allen voran Edelmetalle wie Titan, Gold, Platin und Stahl. Charakteristisch für diese Gruppe ist sowohl ihre chemische Beständigkeit als auch ihre mechanische Festigkeit. Untersuchungen zeigten, dass die elastische Komponente dieser Materialien um einiges stärker war, als jene des Knochens, weshalb Metalle optimal als Zahn-, oder Knochenersatz fungieren können, da sie in der Lage sind, großen Druckausübungen Stand zu halten. Von der physikalischen Seite aus betrachtet, sind Metalle elektrisch und thermisch leitende Substanzen, was ihnen wiederum eine gut verformbare Eigenschaft verleiht (Bose et al., 2013) Metalle sind zwar biokompatibel, eine Osteointegration mit dem angrenzenden Gewebe ist aber aufgrund ihrer glatten Oberfläche nicht möglich. Um diesen Nachteil zu korrigieren, werden Metallimplantate immer häufiger mit HA-Legierungen überzogen. (Murugan et al., 2005) Eine weitere Konsequenz ist, dass Metalle nicht biologisch abbaubar sind, es wird stets ein „Fremdkörper“ im Organismus sein.

1.4.1.2 Kalziumphosphat-Keramiken/Biokeramiken

Die zweite Generation von Biomaterialien umfasst Keramiken und Polymere. Kalziumphosphat-Keramiken, oder auch Biokeramiken genannt, sind schon seit über 30 Jahren in Gebrauch und werden auch noch heute intensiv erforscht. Der Grund ist relativ einfach zu erklären: Kalziumphosphat-Keramiken besitzen eine große Ähnlichkeit auf chemischer und kristallographischer Ebene zum natürlich vorkommenden Knochenmineral, dem Apatit. Im Zuge des Remodelings werden sie auf natürliche Weise abgebaut und ihre Abbauprodukte, nämlich Calcium und Phosphat-Ionen, metabolisiert. Es kommt zu keiner Ablagerung im Urin, Serum oder Organen wie Leber, Herz oder Lunge. (Barrère et al., 2006, Yang et al., 2010) Neben bioaktiven Vertretern wie HA und bioaktivem Glas, bioinerten Vertretern wie Aluminium und Zirkonia finden vor allem auch bioresorbierbare Vertreter wie TCP häufigen Einsatz.

(Murugan et al., 2005) Allesamt weisen sie gute Biokompatibilität und Bioaktivität auf, besitzen osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften, ohne toxische oder kanzerogene Nebeneffekte, und können quantitativ uneingeschränkt zum Einsatz kommen. Zusätzlich können sie aufgrund ihrer Porosität eine Art „Filtereffekt“ entwickeln, mit dessen Hilfe sie wichtige Proteine, wie BMP, oder Wachstumsfaktoren aus dem Blutkreislauf einsammeln, welche wiederum für die Aktivierung der Knorpel-, oder Knochenneubildung (auch im Bereich des Tissue Engineerings) essentiell sind. (Horowitz et al., 2009) Während Aluminium und Zirkonia, welche aufgrund ihrer bioinerten Eigenschaften keine Interaktion mit den Reaktionsabläufen im menschlichen Organismus ausüben, überwiegend bei Oberschenkelhals-knochendelikten Verwendung finden, können HA, TCP und Bioaktive Gläser als Knochenersatzmaterialien oder Legierungen an metallischen Trägern (zum Beispiel als Hüftprothesen) genutzt werden. (Murugan et al., 2005) Durch die TCP-oder HA-Legierung kann das metallische Implantat besser in das verletzte Areal integriert werden und die Knochenneubildung findet rascher statt. Eine weitere Möglichkeit bestünde auch darin, dass gut lösliche TCP mit dem schlecht löslichen HA zu kombinieren, also ein 2-Phasen Keramik zu bilden, um sowohl Kontrolle über die Knochenneubildung als auch über die Resorption des Biomaterials zu haben. (Barrère et al., 2006) Neuen Erkenntnissen zufolge ist der Einbau von gewissen Substanzen wie Zink oder Silikaten in die Biokeramik für die Proliferation und Adhäsion von Osteoblasten von großem Nutzen, während andere Stoffe wie Carbonat den gegenteiligen Effekt ausüben.

1.4.1.2.1 TCP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]

TCP wird sehr gerne in Verbindung mit Knochenneubildungen herangezogen, da es starke bioresorbierbare und biokompatible Eigenschaften aufweist. Es stellt eine Art Gerüst für das Knochengewebe dar, an welches während der Resorption des TCPs neu gebildeter Knochen anwächst. Materialien wie TCP machen den osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften eines Biomaterials alle Ehre, denn TCP bietet eine optimale Oberfläche für die

Adhäsion und Anhaftung von Osteoblasten, welche mit der Knochenneubildung starten und folglich eine effektive Heilung des betroffenen Areals sichern. Calcium als wesentlicher Bestandteil in den Keramiken erweist sich als ein bedeutender Faktor während der Mineralisation. (Horowitz et al., 2009) TCP ist nicht gleich TCP, soll heißen, dass man aufgrund der Form und Ausrichtung der Kristalle im Gerüst zwischen α , β , γ und super- α -TCP unterscheiden muss. Super- α und γ -TCP erhält man bei Temperaturen weit über 1500°C. (Duncan et al., 2014) Aus diesem Grund finden hauptsächlich α -und β -TCP als Biokeramiken Einsatz. α TCP, welches monokline Kristallstrukturen besitzt, ist seltener in Gebrauch, da es im Vergleich zu β -TCP (rhomboedales Kristallgerüst) eine geringere Dichte aufweist und in wässrigen biologischen Milieus leicht zu HA-Partikel hydrolysiert wird, welche sich wiederum im lymphatischen Systemen ablagern. (Barrère et al., 2006, Yang et al., 2010) Gegenüber HA weist β -TCP bessere bioabbaubare Eigenschaften auf, da es sich rascher im physiologischen Milieu auflöst während HA nur sehr langsam von Makrophagen abgebaut wird.

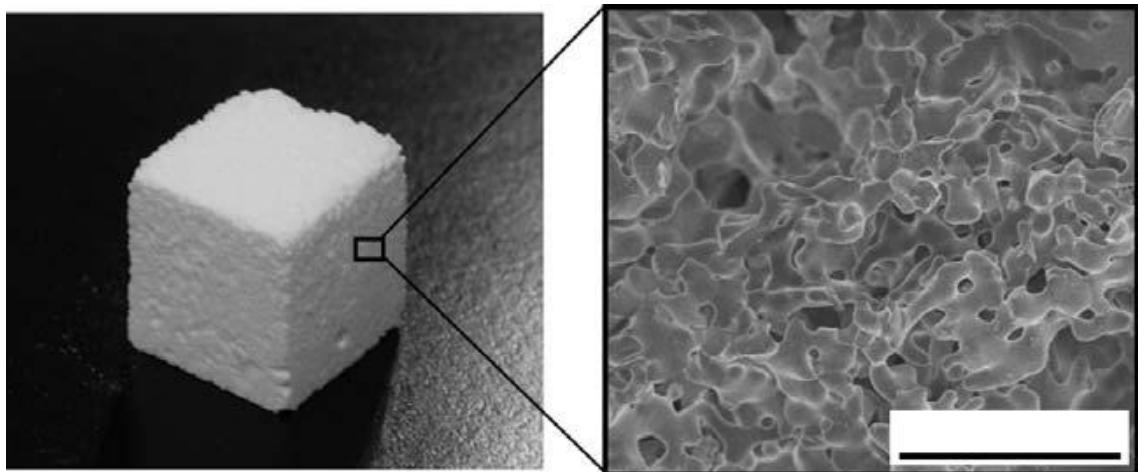


Abbildung 10: alpha TCP: Aussehen und Mikrostruktur von α -TCP (Ohtsuki et al., 2009)

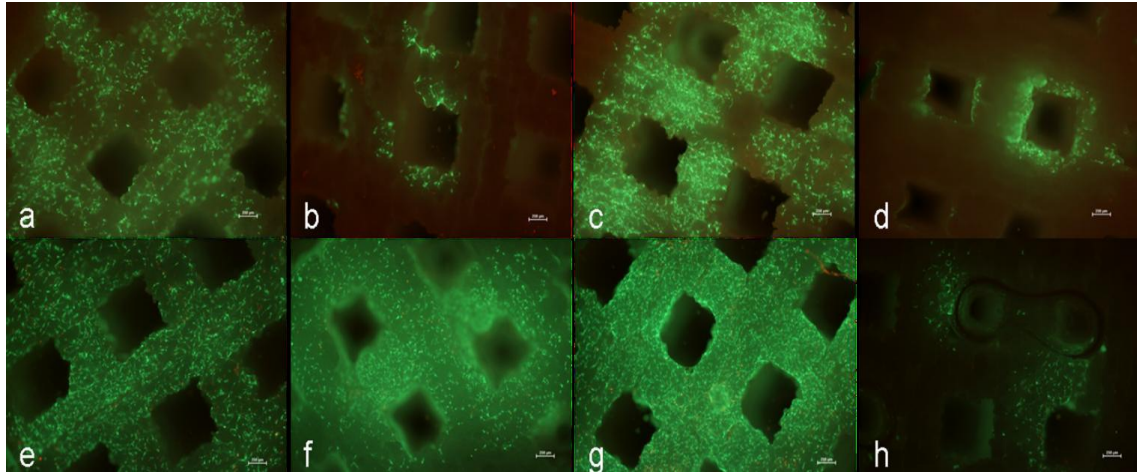


Abbildung 11: Wanderung von humanen primären Osteoblasten an unterschiedlichen Ebenen von 3D-TCP scaffolds nach einem Tag (a-d) und nach acht Tagen (e-f); lebenden Zellen=grün, toten Zellen=rot (Jonitz et al., 2011)

1.4.1.2.2.HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

HA, eine auf Kalziumphosphat basierende Biokeramik, wird aufgrund seiner chemischen strukturellen Ähnlichkeit (unter anderem gleiche Menge an Carbonat-Substituenten) mit dem Knochenmineral Apatit ebenfalls als bone graft eingesetzt. HA wird aus natürlichen oder synthetischen Quellen gewonnen und besitzt wie TCP osteokonduktive, osteoinduktive und biokompatible Qualitäten. Während der Defektheilung kann es eine starke Bindung mit dem angrenzenden Gewebe eingehen und somit eine gewisse Festigkeit und Stabilität vermitteln, weshalb es auch breite Anwendungsspektren für HA gibt: Knochenersatzmaterialien, „drug delivery systems“, Zahnersatz, etc. Das erste synthetische HA wurde im Jahr 1851 von den Forschern Ray und Ward bei Knochendefekten an Hunden, Katzen und Affen getestet. (Murugan et al., 2005) Wesentliches Augenmerk wird auf die Oberflächenstruktur, im speziellen auf die Porengröße gerichtet, denn diese ist entscheidend für die Adhäsion von Osteoblasten und Osteoklasten, deren Differenzierung und Proliferation, Osteointegration und für die Entstehung neuen Gewebes. Porengrößen im μm Bereich ($>1\mu\text{m}$) sind von großem Nutzen, da Poren über $100\mu\text{m}$ ein optimales Gerüst für das Einwachsen von Zellen und Kapillaren und die Bildung neuen Knochengewebes darstellten. Wichtig ist neben der optimalen Porengröße

auch, dass die Poren untereinander in Kontakt stehen, um die Bildung neuen Gewebes zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde IP-CHA entwickelt, welches eine Porengröße von 150µm und eine Porosität von über 75% aufweist. Diese Konstellation erlaubt sowohl das Einwachsen von Zellen und Kapillaren und somit die Entstehung neuen Gewebes als auch die Nutzung als scaffold gemeinsam mit BMP im Rahmen des Tissue Engineerings. (Hideki et al., 2009)

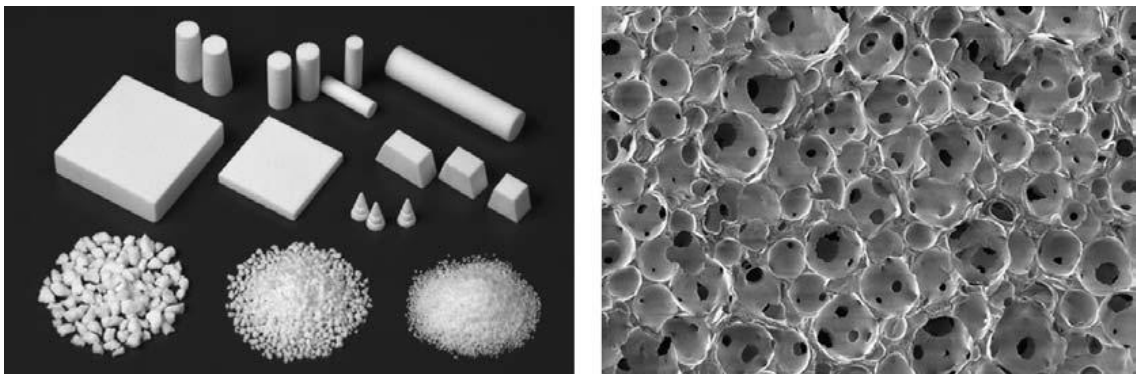


Abbildung 12: IP-CHA (interconnected porous HA): Linkes Bild: makroskopische Darstellung; rechtes Bild: mikroskopische Betrachtung: Poren mit einer Größe von 100-200 µm pro Durchmesser werden durch dünne Wände getrennt und stehen über Kanäle miteinander in Verbindung. (Hideki et al., 2009)

Starkes Interesse zieht auch HA mit einer Porengröße im nm Bereich (10-100nm) auf sich, welche dem Ganzen aufgrund ihrer physikalisch-chemischen, mechanischen und biologischen Eigenschaften eine größere Ähnlichkeit mit der Struktur des Knochens verleihen, relativ stabil sind und keinem frühzeitigen Zerfall und Phagozytose unterliegen. Adhäsion, Differenzierung, Wachstum von Zellen, insbesondere Osteoblasten, ist auf HA im nanomolarem Bereich besser als auf jenem im µm Bereich. Der Grund könnte im wesentlich rauerem Oberflächenprofil liegen, welches eine bessere Anhaftung der Zellen ermöglicht. (Smith et al., 2006) Ein weiterer ist, dass HA-Poren mit nanomolarem Durchmesser als eine Art Matrix fungieren können, um Proteine wie BMP, welches für die Knochenbildung zuständig ist, in das defekte Areal zu transportieren. (Murugan et al., 2005)

Leider wird HA aufgrund der schlecht bioresorbierbaren Eigenschaften oftmals von TCP in den Hintergrund gedrängt.

1.4.1.3 Polymere

Bei den polymeren Biomaterialien unterscheidet man synthetische und natürliche Formen, welche relativ einfach gewonnen bzw. fabriziert werden können. Sie besitzen gewisse physikalische Eigenschaften, welche große Ähnlichkeit zu jenen aus dem weichen Körpergewebe aufweisen, können chemisch modifiziert werden und sind zum Teil biologisch abbaubar. Aus diesem Grund werden sie bevorzugt als „scaffolds“ oder Implantate eingesetzt. (Donglu, 2004)

Natürliche Polymere, wie Kollagen, Alginat oder Gelatine sollen als strukturelle Abbilder der ECM (extrazellulären Matrix) dienen. Sie sind biokompatibel, biodegradabel, und können mit Zellen in Kontakt treten. Jedoch besitzen sie nur geringe mechanische Stabilität, weshalb sie oftmals mit anderen Polymeren oder Keramiken kombiniert werden müssen, Weiteres können sie auch aufgrund ihres zum Teil tierischen Ursprunges spezifische Immunreaktionen auslösen, welche bis zu Abstoßungsreaktionen führen können.

Kollagen, ein von der FDA (United States of Food and Drug Administration) zugelassenes Biomaterial, hat unter den Vertretern der natürlichen Polymere den häufigsten Einsatz. Kollagen kommt im menschlichen Gewebe in großen Mengen und Formen vor, von den Osteoblasten wird Kollagen Typ I synthetisiert. Es vermittelt Flexibilität, Stärke, ist biologisch abbaubar, biokompatibel, osteokonduktiv und nicht toxisch. Um einen Abbau durch Kollagenasen zu verhindern oder um eine Immunreaktion bei tierisch gewonnenem Kollagen zu unterbinden, wird dieses chemisch modifiziert (zum Beispiel: Helix cross-linking) (Murugan et al., 2005)

Synthetische Polymere wie Poly(α -hydroxy acid), Polyactive, Poly(propylene fumarate) werden hauptsächlich als scaffolds oder „tissue substitutes“ genutzt. Ihr Einsatz als Knochenersatzmaterialien hat sowohl positive als auch negative Aspekte: Zum einen können sie in großen Mengen produziert werden, zum anderen können während ihres Metabolismus toxische Abbauprodukte hervortreten, welche wiederum im Organismus zu einer entzündlichen Immunreaktion führen könnten.

1.5 Zelladhäsionsproteine

Das Einfügen eines Biomaterials in ein defektes Körperareal oder in ein entsprechendes Kulturmedium verläuft nicht reaktionslos. Sobald die Oberfläche des „Fremdkörpers“ mit dem physiologischen Milieu in Kontakt tritt, reagiert jenes, da Immunreaktionen, Heilungsprozesse, Koagulation, Gewebebildung, etc. stattfinden. Diese Reaktionen sind essentiell für den Erfolg oder auch Misserfolg eines implantierten Materials und im weiteren Sinn für die Regeneration und Wiederherstellung des betroffenen Areals. Damit solche Reaktionen überhaupt stattfinden können, müssen diese von den Zellen, welche über den Blutstrom oder das angrenzende Gewebe an das Biomaterial herantransportiert werden, über Signalkaskaden ausgelöst werden. Dies bedarf eines Informationsaustausches zwischen den Zellen und der Oberfläche des Biomaterials, welcher mit Hilfe von Proteinen bewerkstelligt wird.

Im Zuge der Zelladhäsion kann man 2 Phasen unterscheiden: die sogenannte „attachment phase“ und die „adhesion phase“. Das „cellular attachment“ läuft relativ rasch ab und stellt den ersten kurzen Kontakt zwischen Zellen und Substrat dar. Die Adhäsion ist dagegen ein Prozess, an welchem 3 wichtige Typen von Proteinen beteiligt sind: EZM-Proteine, Zellmembranproteine und Proteine des Zytoskelettes. (Siebers et al., 2004) Die EZM des Knochens besteht aus anorganischen (Osteocalcin, Osteonektin, etc.) und organischen (Kollagen Typ I, Kollagen Typ V) Proteinen, welche eine tragende Rolle bei der Zelladhäsion spielen und zum größten Teil auch von den Zellen selbst produziert werden. Die Proteine weisen chemotaktische Domänen auf, sogenannte RGD-Sequenzen (Arginin, Glycin, Asparaginsäure). Wenn ein Biomaterial in ein biologisches System eingebracht wird, lagern sich unter entsprechenden Voraussetzungen Proteine mit solch einer Sequenz an dessen Oberfläche an und bilden einen Proteinfilm aus. Die Zellen erkennen die RGD-Sequenz und gehen mit der Substratoberfläche einen sogenannten „focal contact“ oder „adhesion plaques“ ein, indem spezifische Rezeptorproteine (u.a. Integrine) an die RGD-Sequenz andocken und sich zu Clustern vereinigen. (Anselme, 2000) Innerhalb dieses Fokalkontaktes ist der Abstand zwischen Zelle und Substratoberfläche gerade mal 10-15nm. (Donglu, 2004) Nach dem

Clustering werden Proteine des Zytoskelettes wie Paxillin oder Talin aktiviert, welche den Signaltransfer zwischen Aktinfilamenten und Zellmembrangebundenen Rezeptorproteinen koordinieren. („outside-in signaling“) (Siebers et al., 2004) FAK, Src und weitere Proteine des Zytoskelettes leiten die gewonnene Information über Signalkaskaden zum Zellkern weiter. (Anselme, 2000) Im Bereich der Fokalkontakte wird das Aktin-Cytoskelett der Zelle an das Substrat gebunden. Die Zelle hat somit einen ersten Eindruck über ihre neue Umgebung erhalten und kann auf die gewonnenen Informationen nun in Form von Proliferation, Ausschüttung von Transkriptionsfaktoren, Genexpression, Zellmotilität bis hin zur Umorganisation des Cytoskelettes reagieren. (Anselme, 2000)

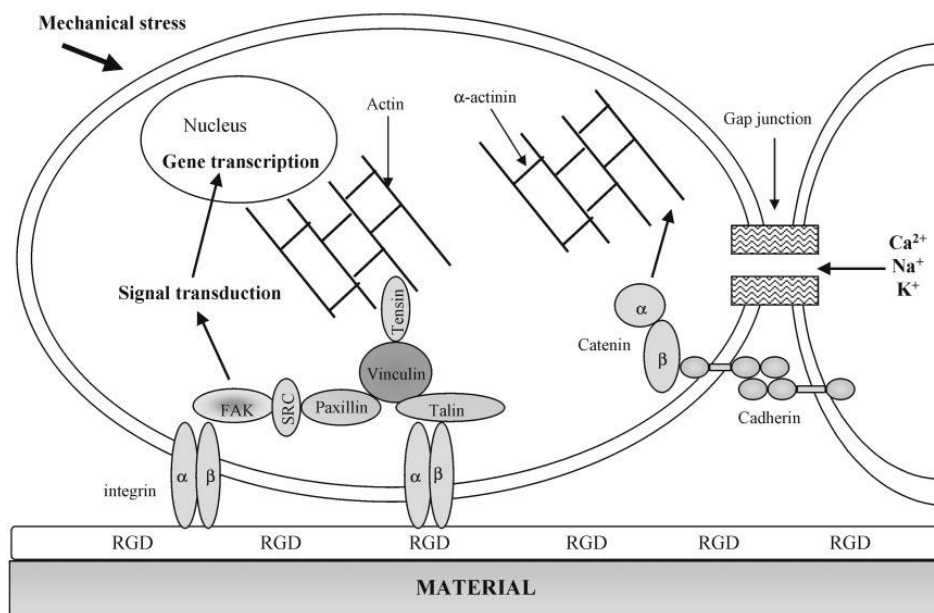


Abbildung 13: Adhäsion von Zellen an Biomaterialien unter dem Einfluss bestimmter Proteine (Anselme, 2000)

Eine wesentliche Voraussetzung für einen erfolgreichen Zell-Substrat-Kontakt ist neben der physikalisch/chemischen Zusammensetzung und des Oberflächenprofils, die bereits mehrfach erwähnte Biokompatibilität des Biomaterials. Sie ist ausschlaggebend für Qualität der Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung.

1.5.1 Integrine

Integrine sind Heterodimere, die aus zwei miteinander nicht kovalent verbundenen Polypeptidketten, α und β , zusammensetzt sind, wobei die Untereinheiten in verschiedenen Isoformen vorliegen. (Anselme, 2000) Bis jetzt sind über 18 α und 8 β -Untereinheiten bekannt, aus welchen sich 24 verschiedene Integrine aufbauen lassen, welche aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede eine Vielzahl an Ligand-Rezeptor Bindungen eingehen können. Jede dieser Untereinheiten besteht aus einer langen extrazellulären Domäne, einer hydrophoben Region und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne. Integrine fungieren als Koordinatoren zwischen den extra-, und den intrazellulären Kompartimenten. Sie erkennen über ihre extrazelluläre Domäne spezifische Aminosäuresequenzen (RGD-Sequenz) von Proteinen an Substraten bzw. EZM-Oberfläche, gehen mit jenen Rezeptor-Liganden Bindungen ein, lösen ein Signal aus und leiten jenes über ihre cytoplasmatische Domäne, welche an spezifische Komponenten des Zytoskelettes bindet, ins Innere der Zelle weiter, wo es entsprechend der jeweiligen Information zur Veränderung der Organisation des Cytoskelettes und des Zellverhaltens (Adhäsion, Proliferation, Zellmigration, Differenzierung oder Apoptose) kommen kann.

Osteoblasten und Osteoklasten können an der Oberfläche ihrer Membran unterschiedliche Integrin-Subunits exprimieren, welche zum Teil wesentlich an der Zelladhäsion beteiligt sind. Bei Osteoblasten findet man häufig $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ Untereinheiten, während bei Osteoklasten hauptsächlich $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 2 \beta 1$ Integrine für deren Adhäsion von Bedeutung sind. (Duong et al., 2000) Sollte die Verbindung zwischen den genannten Integrinen und der EZM oder des Substrates nicht vorhanden oder unter anderem aufgrund spezifischer Antikörper-Bindungen gestört sein, kann dies Einfluss auf das Verhalten und die Differenzierung von Zellen haben, welche bis zur Blockade der Genexpression reichen kann. (Siebers et al., 2004) Dem zufolge muss sowohl die Zusammensetzung, Oberfläche als auch das „coating“ (Überzug) des Biomaterials entsprechend aufeinander abgestimmt sein, um

eine optimale Proteinadsorption, Integrin-Interaktion und Zelladhäsion zu gewährleisten.

Bei der Zusammensetzung des Materials ist darauf zu achten, wie stark der ausgebildete Proteinfilm ausgeprägt ist. Meistens sind die Unterschiede nur minimal. So konnte gezeigt werden, dass Titan und HA zwar dieselben Proteine aus dem Serum adsorbieren, jedoch essentielle Proteine der EZM wie Vitronectin oder Fibronectin keine Adsorptionsvermögen an Titan besitzen. Diese und weitere Unterschiede in der Proteinadsorption spiegeln sich sowohl in der Integrin-Expression als auch in der Zellantwort wieder. (Siebers et al., 2004)

Von großer Bedeutung ist wie bereits mehrfach erwähnt die Topographie des Biomaterials. Raue versus glatte Oberflächen weisen Unterschiede in der Zelladhäsion, Proteinadsorption, ECM- und Cytoskelettorganisation als auch in den „focal contacts“ auf. Letzteres genannte ist an rauen Oberflächen besser zu erkennen als an glatten, meist an den Extremitäten der Zellen, über welche sie mit den Substraten in direktem Kontakt stehen. Auf der anderen Seite kann man auf glatten Oberflächen eine bessere Organisation der ECM erkennen, focal contacts sind hingegen relativ rar. (Siebers et al., 2004) Auch die Größe der Partikel darf in diesem Zusammenhang nicht außer Acht gelassen werden, da das aus ihnen entstandene Oberflächenprofil entscheidend für die Zellmorphologie ist. Hierbei werden Partikeln mit einer Korngröße <100nm bevorzugt, da diese nicht nur eine große Ähnlichkeit zur Topografie der Knochenstruktur aufweisen, sondern neben der erhöhten Proteinadsorption auch ein erhöhtes Anhaften von Zellen wie Osteoblasten begünstigen. Zusammengefasst heisst dies, dass Makroporosität wichtigen Einfluss auf das Einwachsen von Zellen in die Poren des Biomaterials hat, während Mikroporosität bedeutend für das Anhaften der Zellen ist. (Bignon et al., 2003)

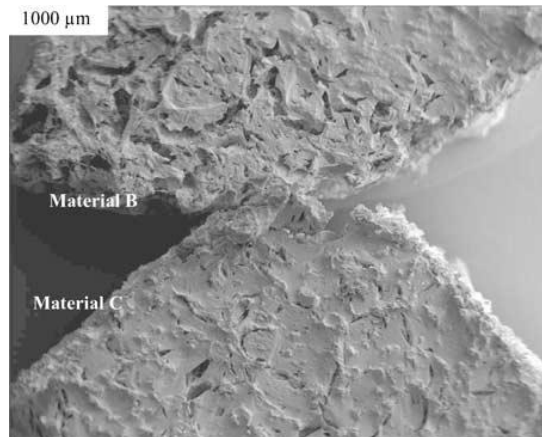


Abbildung 14: SEM-Aufnahme: SEM (Scanning Electron Microscope)-Aufnahme eines Knochenersatzmaterials nach 21-tägiger Kultivierung mit Osteoblasten: gesamte Oberfläche mit Zellen besiedelt. (Bignon et al., 2003)

Beim „coating“ muss auf die passende Legierung gesetzt werden. Oftmals können Substrate mit ECM-Proteinen überzogen werden, welche zu einer Steigerung in der Integrin-Expression und des Zellverhaltens führen. Auf der anderen Seite findet man auch RGD-Überzüge vor, da diese als Erkennungspunkt und Bindungsanker für Integrine dienen. Dennoch ist der Einsatz von RGD-coatings nicht immer vorteilhaft, da nicht alle ECM-Proteine eine RGD-Bindungsstelle besitzen bzw. Integrine, welche die RGD-Sequenz binden, benötigen die Anwesenheit von anderen Peptiden, um eine erfolgreiche Interaktion mit jenen eingehen zu können. Oftmals werden die Proteine für das coating chemisch modifiziert, was zu einem Verlust ihrer ursprünglichen Aktivität führen kann und sich in einer anderen Funktion als im physiologischen Milieu widerspiegelt. (Siebers et al., 2004)

Somit ist festzuhalten, dass die Qualität der Adhäsion einen bedeutenden Einfluss auf die Morphologie der Zelle hat und den ersten Schritt in einer Reihe von Reaktionsprozessen innerhalb der Zelle darstellt, welche sich später in Form von Proliferation, Wachstum, Motilität und Differenzierung der Zelle äußern.

1.5.2 FAK (Focal Adhesion Kinase)

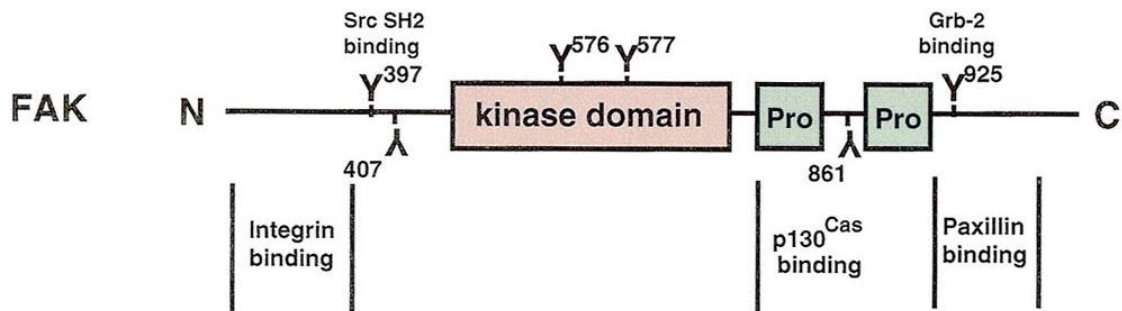


Abbildung 15: Struktureller Aufbau von FAK mit Integrin- und Paxillin- Bindungsstellen an N- und C-terminalen Enden (Duong et al., 2000)

FAK (Fokale AdhäsionsKinase) ist eine cytoplasmatische Tyrosinkinase, welche zum ersten Mal unter der Bezeichnung „pp120“ von Guan et al., 1991 als ein 120 kDa-Protein beschrieben wurde. (Analyse der Expression und Modifikation von Proteintyrosinkinasen der FAK (Focal Adhesion Kinase)-Familie in Osteoblasten Zellen der Ratte (*Rattus norvegicus*) und des Menschen (*Homo sapiens*), Schröder, 2003) Es ist zusammen mit Integrinen an Fokalkontakten lokalisiert, welche eine Verbindungsfläche zwischen der EZM und dem Zytoskelett der Zelle darstellen. Im Jahr 1992 wurde FAK von Steve Hanks, Jun-Lin Guan und Michael Schaller als ein Substrat des viralen Src-Onkogen identifiziert, das in normalen Zellen als Tyrosin-phosphoryliertes Protein an Fokalkontakten beteiligt ist. (Mitra et al., 2005) Zur Wiederholung: Fokalkontakte sind jene Bereiche, bei welchen Signalproteine der EZM und Proteine des Zytoskelettes über ein Integrin vermitteltes Signal verknüpft werden. Mit Hilfe dieser gewonnen Information ist die Zelle in der Lage zu wandern, sich auszubreiten oder Adhäsionen mit der Oberfläche eines Substrates einzugehen. (Schlaepfer et al., 2004)

Von der strukturellen Seite aus betrachtet, besitzt FAK eine zentrale Kinasedomäne, welche von einem C- und einem N-terminalen Bereich flankiert ist. (Duong et al., 2000) Während die N-terminale Region über ihre phosphorylierten Tyrosinreste Transmembranproteine bindet, kann die C-terminale Domäne, welche reich an Prolin-Sequenzen ist, hohe

Bindungsaffinität zu SH3-Domänen anderer Moleküle wie p130cas, ein multifunktionales Adaptermolekül, und über ihre FAT (Focale Adhesion Targeting)-Sequenz hohe Bindungsaffinität zu Paxillin und Talin vorweisen. (Hildebrand et al., 1993) Paxillin steht in direktem Kontakt mit der cytoplasmatischen Domäne der Integrine und mit Vinculin, einem weiteren fokalen Adhäsionsprotein, und agiert als eine Art „docking partner“ zwischen FAK und dem Fokalkomplex. Nach Anheftung an die Oberfläche eines Substrates bzw. an die EZM und darauffolgenden Integrin-Clustering, wird FAK an Position 397 autophosphoryliert und bindet in diesem phosphorylierten Zustand an weitere Moleküle mit SH2-Domäne wie c-Src und löst eine Signalkaskade aus, welche über Aktivierung von Ras, ERK2 und MAP-Kinase zur Entstehung von Signalen zur Proliferation oder Migration der Zelle führen kann. Die Tyrosinreste 576/577 an der zentralen Kinasedomäne werden in weiterer Folge ebenfalls phosphoryliert und sind für die vollständige katalytische Aktivität von FAK zuständig. (Mitra et al., 2005, Parsons, 2003)

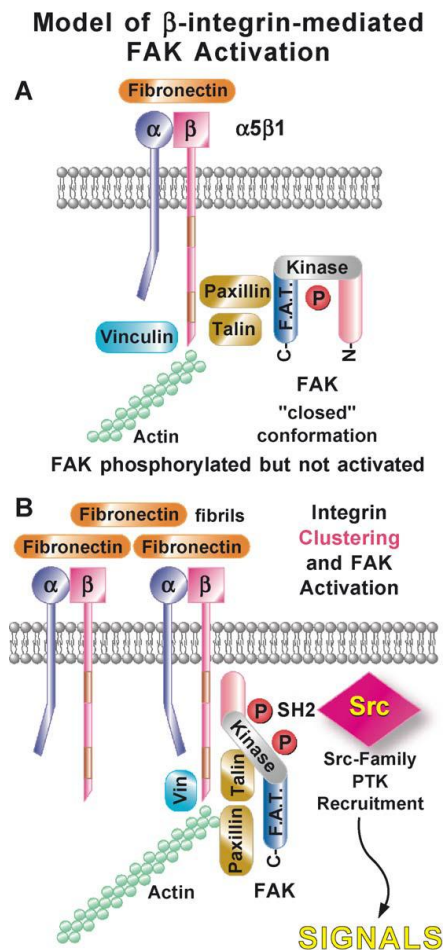


Abbildung 16: Integrin vermittelte FAK-Aktivierung (Schlaepfer et al., 2004)

FAK spielt eine bedeutende Rolle bei der Zellmigration, welche einen koordinierten Prozess zwischen raschen Änderungen innerhalb der Aktinfilamente (FAK phosphoryliert und aktiviert α -Actinin, ein Protein das zwischen den Fokalkontakten und den Aktinfilamenten interagiert) des Zytoskelettes und einen Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionskontakten darstellt. Ohne die Anwesenheit von FAK können Zellen kein optimales Migrationsverhalten aufweisen und reagieren nur sehr schwach auf chemotaktische Signale. (Ilic et al., 1995) Somit kann FAK neben seiner Rolle als Signalkaskademolekül auch als Adapter/Scaffold Protein fungieren und über seine Aktivierung der Zelle ermöglichen, dass sie angemessen auf die externen Stimuli durch zum Beispiel Änderung des Zytoskelettes reagiert. (Schlaepfer et al., 2004)

1.5.3 Paxillin

Neben FAK und Integrine findet man an den Fokalkontakten ein weiteres wichtiges Protein vor, nämlich Paxillin (Latein „paxillus“ =Keil, Pflock): Es handelt sich dabei um ein Adaptermolekül welches bei Osteoblasten an den Enden der Aktinfilamente, bei Osteoklasten an den Podosomen (Podosomen sind „dot-like“ Aktin reiche Strukturen) lokalisiert ist und im Zuge der Signaltransduktion neben FAK und Integrinen eine bedeutende Rolle bei der Zelladhäsion und Zellmigration spielt. (Turner et al., 1990) Es wurde im Jahr 1990 von Keith Burridge in Hühnerembryofibroblasten entdeckt und ist aus einer C- und einer N-terminalen Region aufgebaut. (Hildebrand et al., 1995) Die C-terminale Region besteht aus LIM-Domänen, welche Paxillin über die Bindung an die cytoplasmatische Region der β -Integrine mit Fokalkontakten in Verbindung bringt. Primär fungiert Paxillin als eine Art Schaltstelle oder Adapterregion/Scaffold-Protein, welches eine Reihe von „docking-sites“ also Plattformen an der Plasmamembran für weitere Signalproteine wie FAK oder Src zur Verfügung stellt. Nach Bindung von FAK an die „docking-site“, wird jenes phosphoryliert und aktiviert und die im Abschnitt 1.5.2 ausgelöste Signalkaskade beginnt. Wichtig ist während dieser Reaktionsabläufe die Phosphorylierung von Tyrosin reichen Sequenzen (Y31, Y118) am N-Terminus des Paxillins über FAK (Mitra et al., 2005), welche Effektormoleküle wie Crk aktivieren, die für die Übertragung externer Signale ins Innere der Zelle von Nöten sind. (Turner et al., 1990) Neben FAK kann Paxillin noch eine Reihe weiterer wichtiger Proteine, wie Vinculin und Actopaxin binden, welche zur Änderung der Organisation des Zytoskelettes beitragen, was wiederum für die Zellmotilität wichtig ist.

Zellen wie Osteoblasten und Osteoklasten können über verschiedene Arten von Adhäsionsstrukturen an ein Substrat adhärieren: Podosomen, Invadopodien, fokale Komplexe, etc. Während Osteoblasten fokale Komplexe ausbilden, also sich über Enden von Stressfasern aus Aktin mit dem Substrat verankern, bewerkstelligen Osteoklasten diese Anheftung über Podosomen. Podosomen sind füßchenartige Protrusionen der Plasmamembran. Sie stellen Aktin-reiche Adhäsionsstrukturen dar, die in hämatopoietischen Stammzellen wie

Makrophagen, Dendriten oder Osteoklasten vorkommen, aber auch anderen Zellen wie Endothelzellen (Mureau et al., 2003), glatten Muskelzellen (Gimona et al., 2003) oder Src-transformierten Fibroblasten (Tarone et al., 1985; Marchisio et al., 1987; Gavazzi et al., 1989; Ochoa et al., 2000; Abram et al., 2003) zuzuschreiben sind. Sie weisen einige Unterschiede im Vergleich zu anderen Adhäsionsstrukturen auf: Podosomen bestehen auf der einen Seite aus einem Aktin-regulierenden Strang aus Proteinen wie Arp2/3, Cortactin (Bowden et al., 1999, Linder et al., 2000) oder WASP (Wiskott-Aldrich-syndrome- proteine) (Linder et al., 1999, Mizutani et al., 2002) und auf der anderen Seite aus einem multimolekularen Komplex, welcher aus Integrin-Rezeptoren und Integrin-bindenden Proteinen wie Paxillin zusammengesetzt ist. (Bowden et al., 1999; Pfaff and Jurdic, 2001) (Badowski et al., 2008). Sie koordinieren über die Bindung von extrazellulären Integrinen und intrazellulären Aktin-regulierenden Proteinen den Informationsaustausch zwischen Zelle und Substrat. (Tarone et al., 1985) Podosomen besitzen eine viel höhere Dynamik im Vergleich zu fokalen Adhäsionskontakten und können bereits nach 1 Stunde einen Kontakt mit dem Substrat ausbilden, während dieser Vorgang bei der fokalen Adhäsion meist bis zu 3 Stunden in Anspruch nimmt. Osteoklasten weisen zwei Aktinzytoskelettstrukturen auf: Auf der einen Seite findet man in der Nähe des Zellkerns die sogenannte „sealing zone“, innerhalb welcher der enzymatische Abbau der Knochenmasse stattfindet, auf der anderen Seite entlang der Zellperipherie ist ein Ring aus Podosomen lokalisiert. Die „sealing-zone“ bildet sich nicht aus den Podosomen, sondern erst während der Ruhephase des Osteoklasten, wenn dieser mit der Resorption startet. Solange Osteoklasten in Bewegung sind, kommen Podosomenringe zum Vorschein. (Jurdic et al., 2006) (Saltel et al., 2004)

1.6 Ziel der Diplomarbeit

Das Thema „Tissue Engineering“ und der Einsatz von Biomaterialien nach Knochendefekten haben in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen und viele neue Erkenntnisse im zellulären und medizinischen Bereich mit sich gebracht. Es wurde und wird viel geforscht, um nach schweren Erkrankungen, wie zum Beispiel Knochenfrakturen, die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern. Dennoch bleiben immer noch einige Fragen offen, die bearbeitet und für welche eine Lösung gefunden werden muss.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Verhalten der Knochenzellen auf β -TCP zu erforschen. Die Substanz wurde bereits materialtechnisch charakterisiert. Unser Interesse richtet sich auf die Reaktion von kultivierten Zellen, welche auf dem β -TCP gezüchtet wurden. Neben der Frage, ob die Zellen in der Lage sind, sich auf dem entsprechenden Material anzuhafte und zu proliferieren, steht vor allem die Untersuchung der adaptierten Morphologie der Zellen im Vordergrund. Ist das Verhalten der Zellen auf β -TCP ähnlich wie in ihrem natürlichen Milieu, dem Knochen? Weisen sie morphologische Unterschiede auf oder sind sie nicht in der Lage, auf β -TCP unter den entsprechenden Bedingungen zu wachsen? Zur Kontrolle werden dieselben Zellenlinien auch auf Deckgläsern und auf Knochenstückchen kultiviert und die Ergebnisse mit jenen aus der „ β -TCP-Testreihe“ anhand fluoreszenzmikroskopischer Verfahren verglichen.

Des Weiteren wird auch die Oberfläche der β -TCP-discs mittels AFM-Mikroskopie erforscht, da eruiert werden sollte, ob ähnliche Bedingungen wie im Knochen vorliegen, das heißt, ob das entsprechende Oberflächenprofil ein Ähnliches ist, wie jenes am Knochen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Ausrüstung

Computer	MacPro, Apple Computer
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX 51
Rasterelektronenmikroskop	TU Wien
Tablettenpresse/ Presswerkzeug	Department Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien
Kamera	Olympus XM10
Lichtmikroskop	Nikon TMS
Analysenwaage	Sartorius
Eppendorf- Gefäße	Firma Eppendorf
Kulturplatten (12er well)	Firma Greiner
Kulturplatten (24er well)	Firma Greiner
Magnetrührer	Ikamag RCT
Mikropipetten	Labsystems
Petrischalen	Sterilin
ph-Meter	Firma Inula Metrohm 713 ph Meter
Pipetboy	Integra Biosciences
sterile Kunststoffpipette	Costar
sterile Pipetten	Brand
Transferpipette	Sterilin
Inkubatoren	Firma Kendro HERA cell 240
Inkubierschrank	Heraeus instruments BFL 3032
Knochensäge Isomet	Firma Buehler Isomet low speed saw
Sägeblatt	Firma Buehler Diamond wafering, blade/series 15
Trockenschrank	
Ultraschallbad	Elma Transsonic 570
Vortexmischer	Firma Bender & Hobein AG Vortex

Eismaschine	AF 103, Scotsman Ice-Systems
Laminar Air Flow (Sterile Werkbank)	Firma Ehret
Waage	Sartorius
Wasserbad	Firma Aigner GFL 1086
Zentrifuge	Hermle Z 323K
Zentrifugenröhrchen	Firma Greiner

2.1.2 Lösungen und Substanzen

Aceton	Riedel-de Haen, Germany
Alexa Fluor 488	Invitrogen
Alexa Fluor 546	Invitrogen
Alkohol 96%	Sigma
Alkohol 70%	Sigma
BSA 0,1% (Albumin Bovine Serum)	Albumin Fraktion ROTH
Collagenase	Sigma- Aldrich Handels GmbH
DMSO	Sigma- Aldrich Handels GmbH
DAPI-Stocklösung	Sigma
Dispase	Sigma- Aldrich Handels GmbH
EDTA	Sigma- Aldrich Handels GmbH
FCS (Fetales Kälberserum)	Sigma
Formaldehyd 3,7%	Sigma
Flüssiger Stickstoff	Vienna University of Technology
FAK (Cell Adhesion) Sampler Kit	BD Transduction Laboratories, Schwechat (Vienna), Catalog# S86080
FAK	BD Transduction Laboratories, Schwechat (Vienna), Catalog# 05-182
HCL (Salzsäure) 1M	Fluka
Integrin α_2	BD Transduction Laboratories, Schwechat (Vienna) Catalog# 51-9002113
Integrin β_1	BD Transduction Laboratories, Schwechat (Vienna), Catalog# 141720
α -MEM	Firma Gibco
NaOH	Sigma
NaCL	Sigma-Aldrich Handels GmbH
NGS (Natural Goat Serum)	Sigma
NaN ₃ 500x	Sigma

P/S (Penicillin/Streptomycin)	Firma Gibco
PBS (Phosphate buffered saline)	Eigenherstellung
Paxillin (Cell Adhesion) Sampler Kit	BD Transduction Laboratories, Schwechat (Vienna), Catalog# S86080
Paxillin	BD Transduction Laboratories, Schwechat (Vienna), Catalog# P13520
Saponin	Sigma
Trypsin	Life-Technologies, Austria

2.1.3 Kulturmedien

Für die Anzucht der jeweiligen Zellen, wird ein entsprechendes Kulturmedium, nämlich MEM, welches für ein großes Spektrum von Säugetierzellen geeignet ist, bereitgestellt. Um eine optimale Proliferation der Zellen zu gewährleisten, wird das Kulturmedium mit hitzeinaktiviertem FCS versetzt, welches unter anderem Wachstumsfaktoren beinhaltet und für die jeweilige Endkonzentration von 10% und 5% verantwortlich ist.

Um eine Kontamination der angelegten Kultur zu vermeiden, wurde den Medien am Ende eine 1% P/S-Lösung hinzugefügt.

2.1.4 Zellen

2.1.4.1 Osteoblasten

Für die jeweiligen Experimente wurden Osteoblasten verwendet, welche zuvor aus den Calvarien 1 bis 3 Tage alter Mäuse isoliert wurden. Genaueres dazu siehe unter Abschnitt 2.2.2.

2.1.4.2 Osteoklasten

Neben den Osteoblasten wurde auch das Verhalten der Osteoklasten untersucht, welche gesondert von den Osteoblasten gewonnen wurden. Für die Gewinnung der Osteoklasten wurden die Extremitäten weniger Tage alter Kaninchen verwendet. (Abschnitt 2.2.3)

2.2.1 Herstellung der β -TCP-discs, Knochenplättchen und Deckgläser

2.2.1.1 β -TCP-discs

Um den Zellen eine entsprechende Wachstumsoberfläche zu bieten, musste das β -TCP Pulver vorerst zu „disc“ gepresst werden. Für diesen Vorgang wurde 0,350g β -TCP auf einer Analysewaage genau eingewogen und in ein dafür vorgesehenes Presswerkzeug eingefüllt. Nach dem Einspannen in die Presse, wurde das β -TCP Pulver durch Einwirkung des Druckes von 3bar manuell zur disc gepresst.

Da die discs nach dem Pressvorgang noch kein definiertes Oberflächenprofil besaßen, wurden sie „gesintert“. Unter dem Begriff „Sintern“ versteht man das Erhitzen von feinkörnigen Stoffen unter hohem Druck, wobei die Temperaturen unterhalb der Schmelztemperatur der Hauptkomponente bleiben, sodass die Gestalt des Werkstückes nicht verändert wird (Quelle: wikipedia.org). Eine andere Definition wäre: „Sintering particels means heating the material until the surface is molten. The individual particles are bonded together by the fusion of their contact surfaces. The result after cooling is a porous structure of primary particles firmly sintered together.“ (Horowitz et al., 2009) Es kommt zur Verdrängung der Oberflächenenergie des Pulvers und zur Verschmelzung der Partikel untereinander. In unserem Fall wurden die discs bei Temperaturen von 1100, 1125, 1150, 1200, 1250, 1280°C von Mag. G. Zimmer, Baxter Biosciences, gesintert. Dies hatte zur Folge, dass die discs unterschiedliche Oberflächen hatten, nämlich raue bei 1100-1150°C und glatte bei 1200-1280°C.

2.2.1.2 Knochenplättchen

Rinderknochen wurden unter Zuhilfenahme einer Säge in 300-350µm dicke Scheiben geschnitten und anschließend mit einem Messer zerkleinert, sodass sie den Boden einer 48-well-Platte bedeckten. Danach wurden sie in dH₂O eingelegt und 3 Mal je 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um die Knochenplättchen von Staub zu befreien. Zwischen jedem Schritt wurde das

dH₂O gewechselt. Am Ende erfolgte noch ein weiterer Waschschrift im Ultraschallbad mit 70% EtOH. Danach wurden die Knochenplättchen in absolutem EtOH eingelegt, um ein rasches Trocknen zu ermöglichen und anschließend unter dem Laminar aufgelegt. Nach der Trocknungsphase wurden die Plättchen mit UV-Licht 15 Minuten bestrahlt, mit Hilfe eines Bleistiftstriches markiert und danach gewendet und erneut 15 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Danach wurden die Knochenplättchen zu je 4 Stück am Boden der entsprechenden Kulturplatten mit einem Tropfen Silikonfett geklebt. Die markierte Seite wurde zum Grund der Kulturplatte gewendet.

2.2.1.3 Deckgläser

Die für die Experimente eingesetzten Deckgläser wurden über 12 Stunden in EtOH eingelegt und anschließend im Hitzeschränk bei 180°C 2 Stunden getrocknet und steril aufbewahrt.

2.2.2 Vorinkubation der Testpräparate

Bei der Vorinkubation sollten sich die Proteine des FCS an der Oberfläche der Testpräparate absetzen, um bei der Aussaat der Zellen als Haftpunkt/-Anker zu dienen. Für die Kultivierung von Osteoblasten wurden die Deckgläser, Knochenplättchen und β -TCP discs in den vorbereiteten well-Platten mit je 2ml 10% α -MEM versetzt und 1 Stunde im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Aus organisatorischen Gründen betrug die Inkubationszeit bei der Kultivierung der Osteoklasten 48 Stunden.

2.2.3 Gewinnung von Osteoblasten aus Mäusecalvarien

Wie bereits in Abschnitt 2.1.4.1 erwähnt, wurden die Osteoblasten aus Calvarien 1-3 Tage alter Mäusen gewonnen. Bei diesem Prozess wurden die Calvarien isoliert, in Zentrifugenröhren gegeben und mit einer Collagenase/Dispase-Lösung bei 37°C verdaut. Es wurden Fraktionen gesammelt, welche erneut zentrifugiert und im Anschluss mit 10% α -MEM in Petrischalen ausgesät wurden. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden

wurden die Zellen mit einer Trypsinlösung von den Petrischalen gelöst und auf weitere Petrischalen aufgeteilt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen in Einfriermedium, dessen Zusammensetzung DMSO, Medium und FCS war, suspendiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4 Gewinnung von Osteoklasten aus Kaninchen-Extremitäten

Die Gewinnung von Osteoklasten erfolgte aus den Röhrenknochen weniger Tage alter Kaninchen. Die Kaninchen wurden anesthesiert und getötet. Ober- und Unterschenkelknochen wurden mit einem entsprechenden Skalpell zerkleinert und in ein 5% α -MEM versetzten Zentrifugenröhrchen übergeführt und suspendiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde einer bei 600U/min bei 4°C 5 Minuten zentrifugiert, danach der Überstand mit einer Pipette abgesaugt und das entstandene Pellet, in welchem sich die Zellen befanden, resuspendiert. Danach wurde mit 5% α -MEM auf das gewünschte Volumen verdünnt. Die isolierten Osteoklasten wurden danach auf die Testträger aufgetragen und inkubiert. (siehe Abschnitt 2.2.5)

2.2.5 Aussaat von Osteoblasten und Osteoklasten

Die mit Osteoblasten versehenen Kyroröhrchen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, am Wasserbad langsam erwärmt und in ein mit 10% α -MEM versetztes Zentrifugenröhrchen übergeführt. Diese Zellsuspension wurde auf β -TCP discs, Knochenplättchen und Deckgläser aufgeteilt und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ 24 Stunden inkubiert.

Osteoklasten wurden, wie bereits erwähnt, direkt nach der Isolation aus den Kaninchenknochen auf die Testträger ausgesät. Die Zellsuspension wurde zuerst für 3 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, damit konnten sich die Zellen absetzen und nach einem Mediumtausch wurde für weitere 48 Stunden inkubiert.

Erfolgreich war bei beiden Zelltypen die Inkubation, wenn eine Konfluenz über 30% vorzuweisen war. Ein großflächiger Zellrasen konnte durch das Lichtmikroskop beobachtet werden.

2.2.6 Zellfixierung

Nach vollendeter Inkubation mussten die Zellen für die darauffolgenden Färbeverfahren fixiert werden. Um dies zu gewährleisten, wurden die Zellen mit 3.7% Formaldehyd behandelt und mit PBS gewaschen. Zur Vorbeugung vor Kontaminationen wurden die Präparate in eine Mischung aus NaN_3 und PBS eingelegt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.7 Färbung

2.2.7.1 Zytoskelett-(Aktinring)-Färbung mit Alexa Fluor

Phalloidin

Mit dieser Markierung war es möglich, das Zytoskelett bzw. den Aktinring der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop als rotes Gerüst sichtbar zu machen und somit eine qualitative als auch quantitative Aussage über das Wachstum und das Aussehen der Zellen zu machen.

Am Beginn des Färbeprozesses wurden die Präparate mit PBS gewaschen und in Glaströgen mit Aceton 5 Minuten überschichtet. Dieser Vorgang sollte die Membran der Zellen permeabel machen. Danach wurden die Präparate mit Alexa Fluor Phalloidin 488/bzw. Alexa Fluor 546 versetzt und unter Lichtschutz 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Präparate erneut mit PBS und dH_2O gewaschen.

2.2.7.2 Zellkern-(DNA)-Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol-hydrochlorid)

Im Anschluss an die Aktin-Färbung folgte die Färbung der Zellkerne, was wiederum auch unter anderem für die Unterscheidung von Osteoblasten und Osteoklasten von Nutzen war. Hierfür wurden die Präparate in eine DAPI-Lösung (200ul DAPI-Stocklösung 5ug/ml + 10ml PBS+Ca+Mg) eingelegt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dem folgte ein erneuter Waschgang mit PBS und dH_2O .

2.2.7.3 Protein-Färbung mit Adhäsionsprotein

Paxillin/FAK/Integrin- α /Integrin- β

Die Präparate wurde mit einer alkoholischen Reihe, bestehend aus 40-70-80-90-100-90-80-70-40% Alkohol, versetzt, um die Membranen für die Antikörperlösungen permeabel zu machen. Nach Dehydrierung der Zellen wurden Waschvorgänge mit PBS und BSA/Saponin-Lösung durchgeführt und mit NGS für 30 Minuten unter Lichtschutz vorinkubiert. Somit konnten auf den Präparaten geeignete Bedingungen für die Antikörper geschaffen werden. Im Anschluss wurde der Antikörper Paxillin auf die Präparate aufgetragen, für 1 Stunde inkubiert, und wieder mit PBS und BSA-Saponin-Lösung gewaschen. Danach wurde derselbe Vorgang für FAK und Integrine α bzw. β durchgeführt.

2.2.8 Einbettung v. β TCP-discs/Knochenplättchen/Deckgläsern

Zum Schluss wurden die Präparate aus den Kulturplatten entnommen und auf Objektträger übertragen, wobei die unbehandelte Seite, also jene ohne Zellen mit dem Objektträger in Kontakt stand. Neben einem Einbettungsmittel wurden die Präparate mit Deckgläsern versehen, welche zum Schutz vor Verunreinigungen dienen sollten. An den Rändern wurde das Deckglas noch mit Kleber verschlossen, um ein Austrocknen des Einbettungsmediums und somit ein Verdampfen der Farbstoffe zu verhindern. Ausnahme bildeten die Präparate, welche als Deckgläser per se fungierten, diese wurden mit der Zell-beladenen Seite mit dem Objektträger in Kontakt gebracht und mit Kleber an den Rändern verschlossen. Nach Beschriftung wurden die Präparate unter Lichtschutz im Kühlschrank bei 4°C bis zur Analyse gelagert.

2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Um eine qualitative und quantitative Aussage tätigen zu können, wurden die kultivierten und gefärbten Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Das Ziel dahinter war anhand der morphologischen Unterschiede der Zellen, genauere Aussagen über die Qualität der Testsubstanz treffen zu können. Es sollte eruiert werden, ob die Zellen in der Lage waren, sich an der Oberfläche von β -TCP discs im Vergleich zu Knochenplättchen und Deckgläser

zu verankern und Adhäsionsproteine auszubilden. Dabei konnten die mit DAPI (blau) gefärbten Zellkerne, die mit Alexa Fluor Phalloidin (rot) gefärbten Zytoskelette und die grün gefärbten Adhäsionsproteine als Differenzierungscharakteristika herangezogen werden. Mit Hilfe einer geeigneten Kamera, welche am Mikroskop befestigt war, konnten Aufnahmen in unterschiedlichen Dimensionen von den Zellen gemacht werden.

2.2.10 AFM-Rasterelektronenmikroskop

Nachdem die Morphologie der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurde, wurde die Oberflächenbeschaffenheit der β -TCP discs eruiert. Da dieses Messverfahren sehr kostspielig war, konnten nur 2 Tabletten, nämlich jene, welche bei Temperaturen von 1100°C und 1280°C gesintert wurden, zur Begutachtung herangezogen werden. Durch Einsatz eines Pyramidencantilevers aus Siliziumnitrit wurde die Oberfläche der β -TCP discs sorgfältig abgetastet.

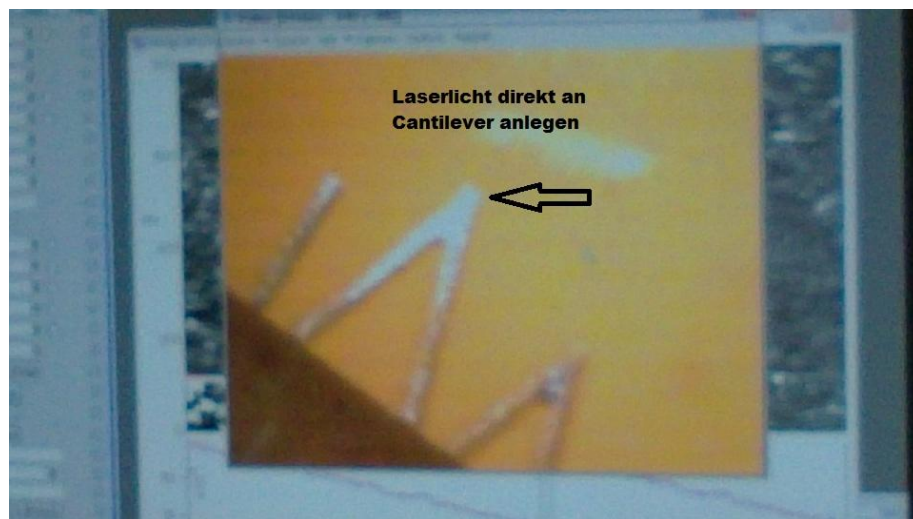


Abbildung 17:Pyramidencantilever aus Siliziumnitrit befestigt an einem Mikrochip. Cantilevers gibt es in verschiedenen Formen und Materialien, was wiederum Vor-, als auch Nachteile hat. So ist Siliziumnitrit wesentlich billiger als zum Beispiel ein Diamant, jedoch weniger präzise in der Erfassung der untersuchenden Substanzoberfläche.

Der Cantilever steht in direktem Kontakt mit einem Prisma, auf welches ein Laserstrahl fällt. Es kommt zur Brechung des Lichtstrahls und zur Erstellung eines Bildes mittels Kamera am Computer, welches Information über die

Beschaffenheit der Oberfläche der β -TCP discs gibt. Neben der Erstellung eines Bildes kommt es auch zur Berechnung zweier Faktoren, nämlich „Area“ und „Section“. Unter Area versteht man den prozentuellen Anteil, bei der die untersuchende Oberfläche über der Idealoberfläche liegt. Die Idealoberfläche wird stets als glatt angesehen. Die Section hingegen ist der Schnittpunkt durch das Bild, die Ausbildung einer Geraden zur Darstellung von „Bergen“ und „Tälern“, eine Art Höhenprofildarstellung.

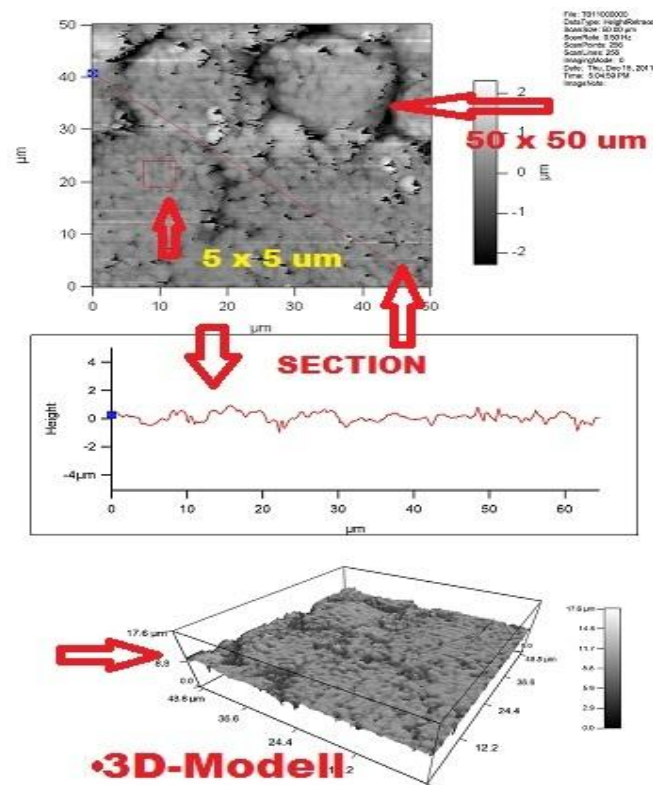


Abbildung 18: Grafische Darstellung des Oberflächenprofils einer β -TCP disc. Neben der Area und Section wurde vom Computer auch noch ein 3D-Modell erschaffen, um eine ungefähre Vorstellung über das „Berg- und Talprofil“ der disc zu erhalten.

3 Resultate

3.1 Osteoblasten aus Mäusecalvarien

3.1.1 Motilität, Adhäsion von Osteoblasten auf β -TCP mittels Fluoreszenzmikroskopie

Mausosteoblasten wurden auf Deckgläsern, Knochenplättchen und β -TCP discs kultiviert, fixiert und mittels Farbstoffen Alexa Fluor Phalloidin und DAPI gefärbt, um Auskunft über deren Verhalten, sprich Motilität, Adhäsion oder Proliferation, an bestimmten Oberflächen zu erhalten. Anschließend wurden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das Augenmerk wurde auf die Ausbildung bzw. Ausrichtung des Zytoskeletts, Größe und Form des Zellkerns sowie die Aktivierung von Proteinen an Fokalkontanten gerichtet. Waren die Zellen in der Lage, an dem ihnen angebotenen Material zu wachsen und proliferieren? Welche Unterschiede im Bezug auf ihre Morphologie konnte man bei den einzelnen Porositätsgraden auf der β -TCP disc feststellen und welche Zell-Biomaterial-Interaktionen waren sichtbar?

Prinzipiell kann man sagen, dass Osteoblasten eine gute Lebensqualität auf β -TCP discs aufwiesen. Dies kann man anhand der Ausbildung ihres Zytoskeletts und des Zellkerns sehr gut nachweisen. Die Aktinfasern des Zytoskelettes an β -TCP sind mit jenen aus der Vergleichsgruppe an Deckgläsern und Knochenplättchen sehr ident. Die Osteoblasten präsentieren sich als längliche Zellen bzw. Zellen mit einem breiten Zytoskelett mit einer großen Anzahl an Aktinfortsätzen, die an die β -TCP disc anhaften. Auch die Größe und Gestalt des Zellkerns weist keine deutlichen Unterschiede innerhalb der Untersuchungsreihen auf. Die Zellen waren in der Lage zu proliferieren, sich auszubreiten, teils in Zellansammlungen sich zu häufen oder sogar in die Poren der Probekörper einzuwachsen. Die unterschiedlichen Porositätsgrade der β -TCP discs hatten auf die Morphologie der Zellen keinen Einfluss.

Einen wesentlichen Unterschied kann man jedoch im Bezug auf die Orientierung der Zellen und der Zellzahl feststellen. Osteoblasten, welche an Knochenplättchen kultiviert wurden, weisen eine einheitliche Orientierung in

eine Richtung auf. Meist sind die Zellen eher länglich mit einem schmalen Zytoskelett. Anders ist dies bei Osteoblasten an β -TCP und an Deckgläsern:

Die Zellen wachsen quer über die ganze Oberfläche der β -TCP discs und der Deckgläser, teils wie bereits erwähnt sind dichte „Zellrasen“ sichtbar, teils lose einzelne Zellen. Die Verteilung ist an den β -TCP discs in der Mitte und am Rande sehr stark ausgeprägt, bei den Deckgläsern und Knochenplättchen ist die gesamte Fläche mit Zellen besiedelt.

Auch die Zellzahl ist als Unterscheidungsmerkmal vor allem zwischen den β -TCP discs heranzuziehen. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Zellen auf β -TCP discs mit der Mikro- und Makroporosität der Oberfläche der discs in Verbindung steht. So kann man bei makroporösen β -TCP Oberflächen eine viel höhere Zellzahl verzeichnen als bei mikroporösen β -TCP Vertretern. Die Ursache liegt in den unterschiedlichen Porositätsgraden der β -TCP discs. Auf β -TCP discs mit einer Sintertemperatur von 1100, 1125, 1150°C ist ein dichteres Wachstum an Osteoblasten zu erkennen als bei β -TCP discs mit Sintertemperatur von 1200, 1250, 1280°C, wobei bei 1280°C teils auch ein dichtes Zellwachstum festzustellen ist. Der Grund dafür ist nicht geklärt. Es könnte an der strukturellen Veränderung des β -TCPs liegen (Übergang von rhomboedalen β -TCP zu monoklinen α -TCP ab einer gewissen Sintertemperatur über 1125°C) oder Einrisse an der Oberfläche der β -TCP discs ermöglichen ein Anhaften der Zellen in diesem Areal. Makroporöse β -TCP discs besitzen einen hohen Porositätsgrad, wobei die Porengröße meist über 50µm liegt. Anders ist dies im Falle von mikroporösen β -TCP discs. Hier kann man Porengrößen unter 10µm verzeichnen, von rauen Verhältnissen kann nicht mehr die Rede sein. Makroporosität spiegelt die natürlichen Gegebenheiten im Knochen wieder und es ist folglich nicht verwunderlich, dass Osteoblasten diese Verhältnisse bevorzugen. Wenn man nämlich die Zellzahl mit jener aus der Kontrollgruppe am Knochenplättchen vergleicht, dann ist kein Unterschied erkennbar. Die Zelldichte ist bei beiden relativ hoch. Auf die Morphologie der Zellen spielt die Oberflächenarchitektur wie gesagt keinen Einfluss.

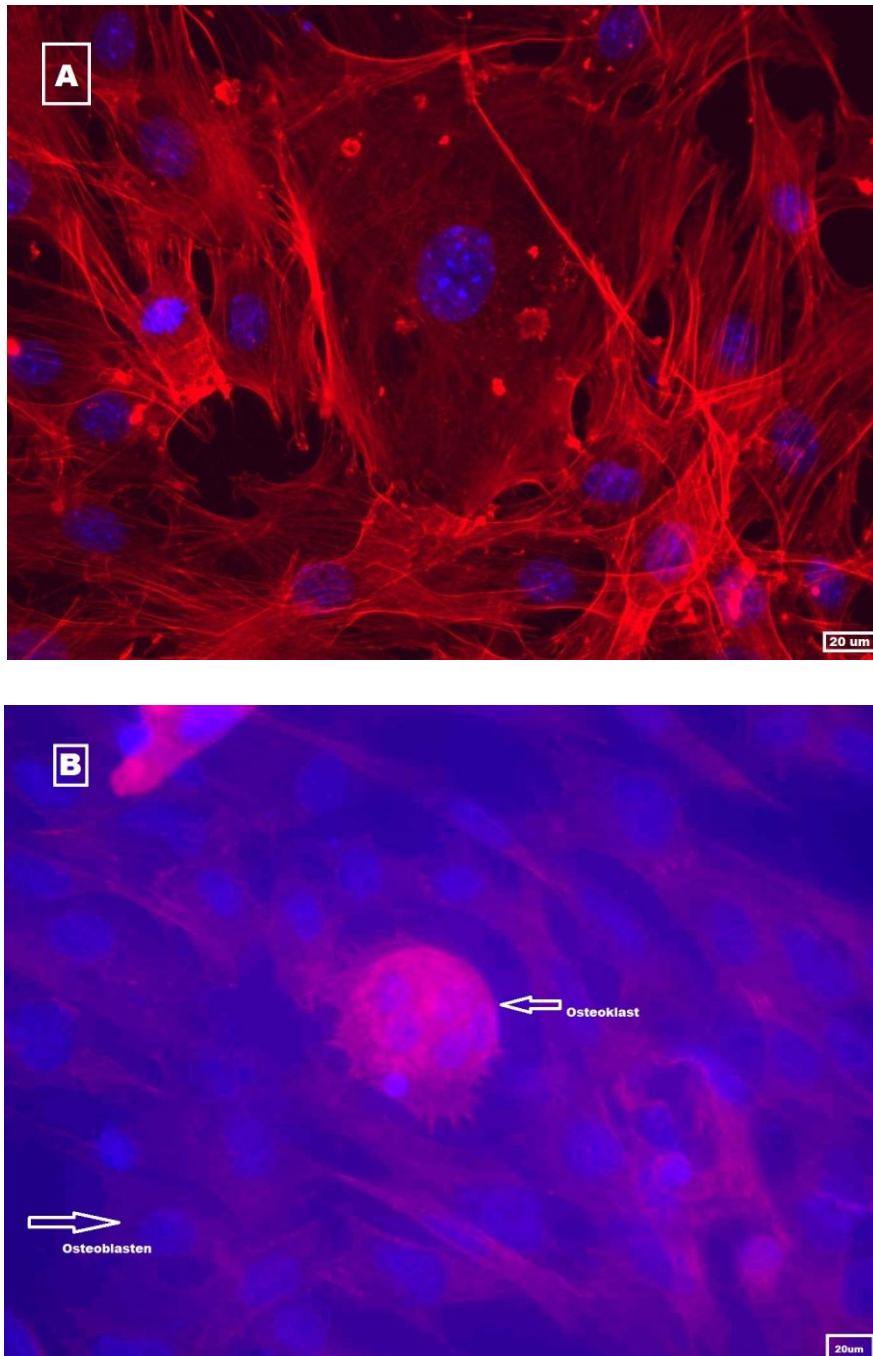


Abbildung 19: Maus-Osteoblasten auf (A) unbeschichtetem Deckglas und auf (B) Knochenplättchen: Die aus Mäusecalvarien gewonnenen Osteoblasten wurden 2 Tage in 12er well Platten kultiviert, anschließend fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin und DAPI angefärbt. (A) Die Zellen am Deckglas und diejenigen am (B) Knochenplättchen unterscheiden sich in der Morphologie nicht voneinander. (Osteoklasten werden in nächsten Abschnitt besprochen). Sie weisen ein dichtes Verteilungsmuster auf und besitzen länglich ausgebildete Aktinfilamente und große runde Zellkerne. Bezüglich der Orientierung kann man bei Osteoblasten am Deckglas eine willkürliche Verteilung erkennen, während jene am Knochen vertikal in eine Richtung ausgerichtet sind.

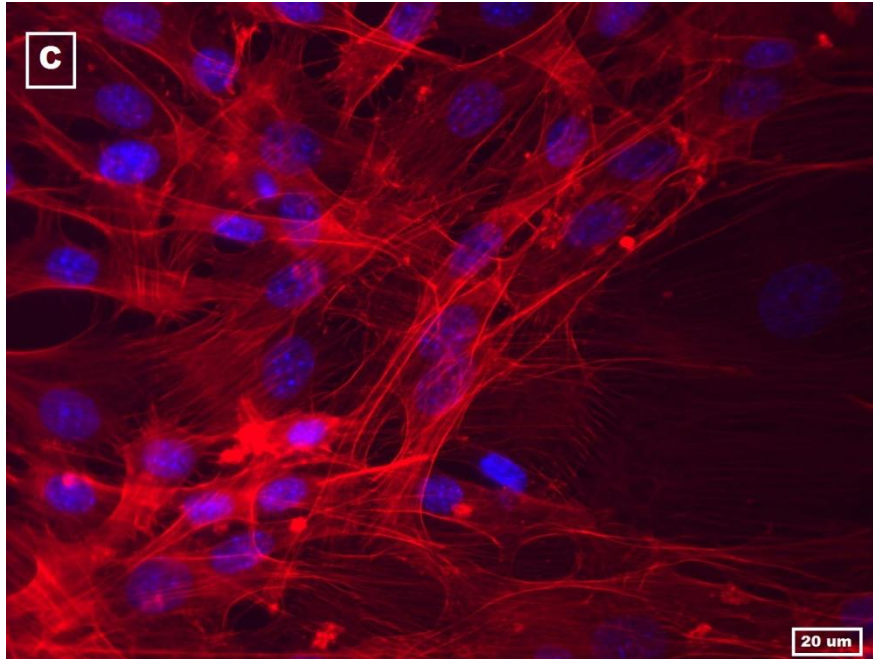


Abbildung 20: Maus-Osteoblasten an β -TCP disc 1125°C: Die aus Mäusecalvarien gewonnen Zellen wurden 2 Tage kultiviert, fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin und DAPI gefärbt. Die Zellen sind auf einer β -TCP disc lebensfähig, dies ist anhand ihrer Morphologie erkennbar: Aktinfilamente des Zytoskeletts (rot) und Zellkerne (blau) weisen auf gesunde Zellen hin. Sie verteilen sich auf der gesamten Oberfläche, teils in deutlichen Zellansammlungen, teils einzeln. Die Zellen stehen untereinander in Kontakt wachsen und orientieren sich im Vergleich zu jenen auf Knochenplättchen willkürlich auf der β -TCP disc.

Nachdem positive Resultate im Bezug auf Morphologie und Motilität der Zellen zu beobachtet waren, wurde die Frage gestellt, ob die Zellen in der Lage waren, Fokalkontakte mit den ihnen angebotenen Substraten auszubilden. Zu diesem Zweck wurden Antikörper eingesetzt, welche drei der beteiligten Adhäsionsproteine an den Fokalkontakten zwischen Zelle und Substrat sichtbar machen sollten. Es handelt sich dabei um Integrine, die erste Kommunikationsbasis zwischen Zelle und Substrat, Paxillin, ein fokales Adhäsionsprotein, und FAK, eine Tyrosinkinase, welche im Zuge der Zell-Substrat Interaktion aktiviert wird und gemeinsam mit Integrine und Paxillin an den Fokalkontakten eine tragende Rolle spielt. Vorweg muss betont werden, dass mittels Fluoreszenzmikroskopie nur Aufnahmen von der gesamten Zelle gemacht werden können, kein Querschnitt durch die Zelle oder Aufnahmen unterhalb der Zelle. Man blickt direkt von oben auf die Zelle und es kommt einem so vor, als ob die oben genannten Adhäsionsproteine innerhalb der

gesamten Zelle, also sowohl extrazellulär als auch zytoplasmatisch, verteilt sein würden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Integrine sind extrazellulär in der Zellmembran verankert und stellen somit die ersten Kontaktpunkte zwischen Zelle und Substratoberfläche dar. Paxillin findet man an den Enden der Aktinfasern im Zytoskelett, während FAK als Membran assoziiertes Protein in allen Bereich der Membran lokalisiert ist, vor allem an den Fokalkontakten, die zwischen Zelle und Substrat liegen, also „unter“ der Zelle.

Die kultivierten Osteoblasten sind in der Lage, sowohl auf β -TCP als auch auf Deckgläsern und Knochenplättchen Fokalkontakte auszubilden und sich über diese Zell-Substrat Kontakte an den Probekörpern zu fixieren. Auch hier weisen die Zellen die morphologischen Charakteristika auf, welche schon vorweg zu Beginn besprochen wurden. Paxillin ist sehr deutlich an den Enden der Aktinfilamente nachweisbar, genauso FAK, welches den gesamten Bereich der Zellmembran ausfüllt. Leider konnte die Integrin-Interaktion nicht deutlich erfasst werden, da man hierfür einen Querschnitt durch die Zellen hätte machen müssen. Dass diese aber vorhanden sind und aktiviert wurden, zeigt die Tatsache, dass sowohl Paxillin als auch FAK nachgewiesen werden konnten, welche erst aktiviert werden, wenn eine Integrin-Verbindung der Zelle mit der Substratoberfläche möglich ist. Es gibt keinen Unterschied bei der Ausbildung der Fokalkontakte an den unterschiedlich porösen Oberflächen der β -TCP discs. Einzig die Farbintensität ist in mikroporösen Bereichen stärker ausgebildet als bei makroporösen Oberflächen. Womöglich ging ein Großteil der Antikörpermengen während der Färbung in den großen Poren der β -TCP discs verloren und führte nicht wie bei β -TCPs mit geringfügiger Porosität zu einer intensiven Färbung.

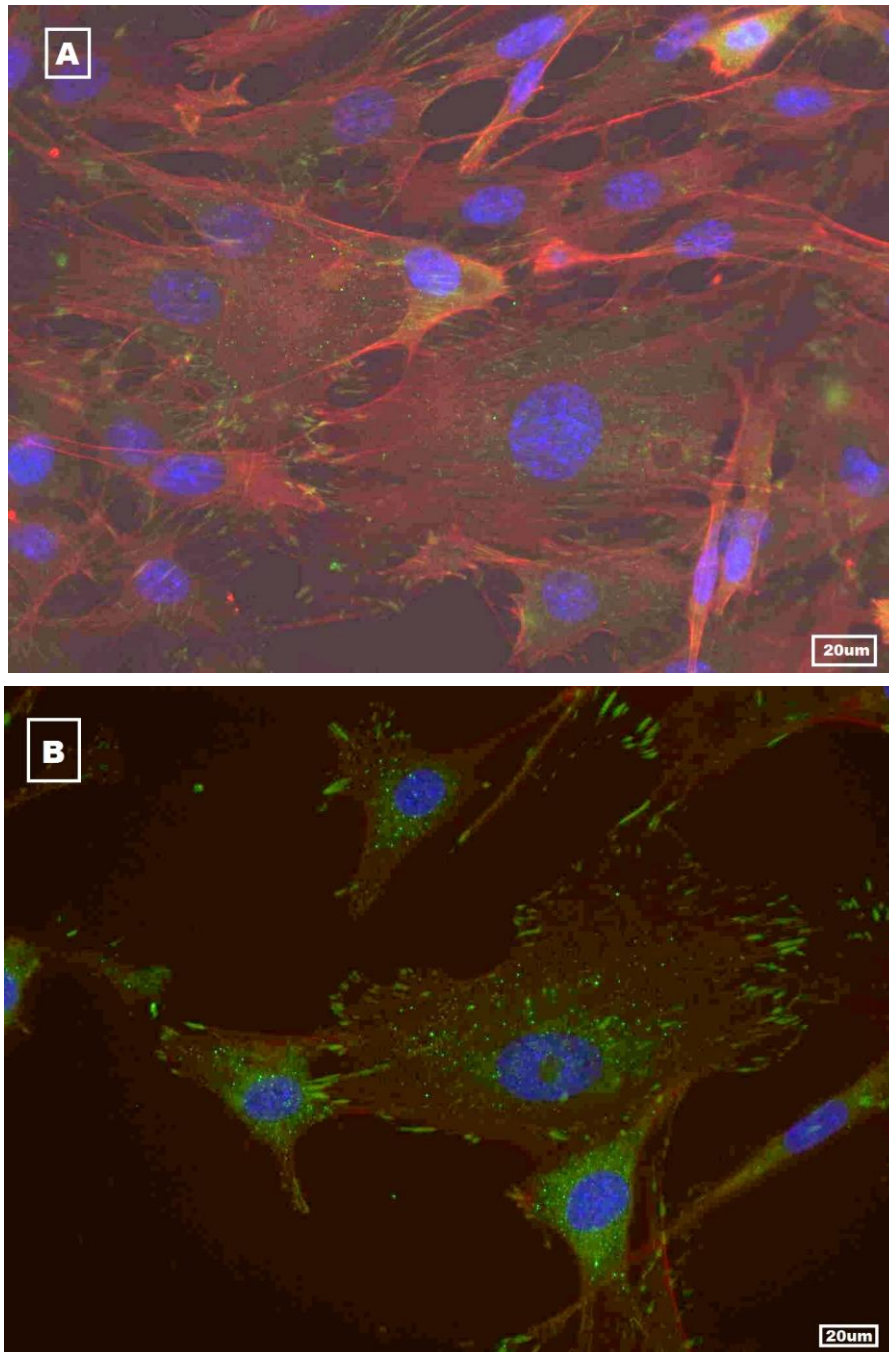


Abbildung 21: Maus-Osteoblasten auf Deckglas (A) und β -TCP disc (B) (1250°C): Die aus Mäusecalvarien gewonnenen Zellen wurden 2 Tage kultiviert, fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin, DAPI und Anti-maus Paxillin gefärbt. Die Zellen sind sowohl am Deckglas als auch am β -TCP lebensfähig und können über Ausbildung von Fokalkontakten an die Oberfläche der Probekörper adhärieren. In den dargestellten Abbildungen (A) und (B) ist das Adhäsionsprotein Paxillin (grün) deutlich an den Enden der Aktinfilamente erkennbar. Aufgrund fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wird der Eindruck erweckt, dass Paxillin auch zytoplasmatisch um den Zellkern lokalisiert sei, was nicht der Fall ist, da es allein in der Membran lokalisiert ist.

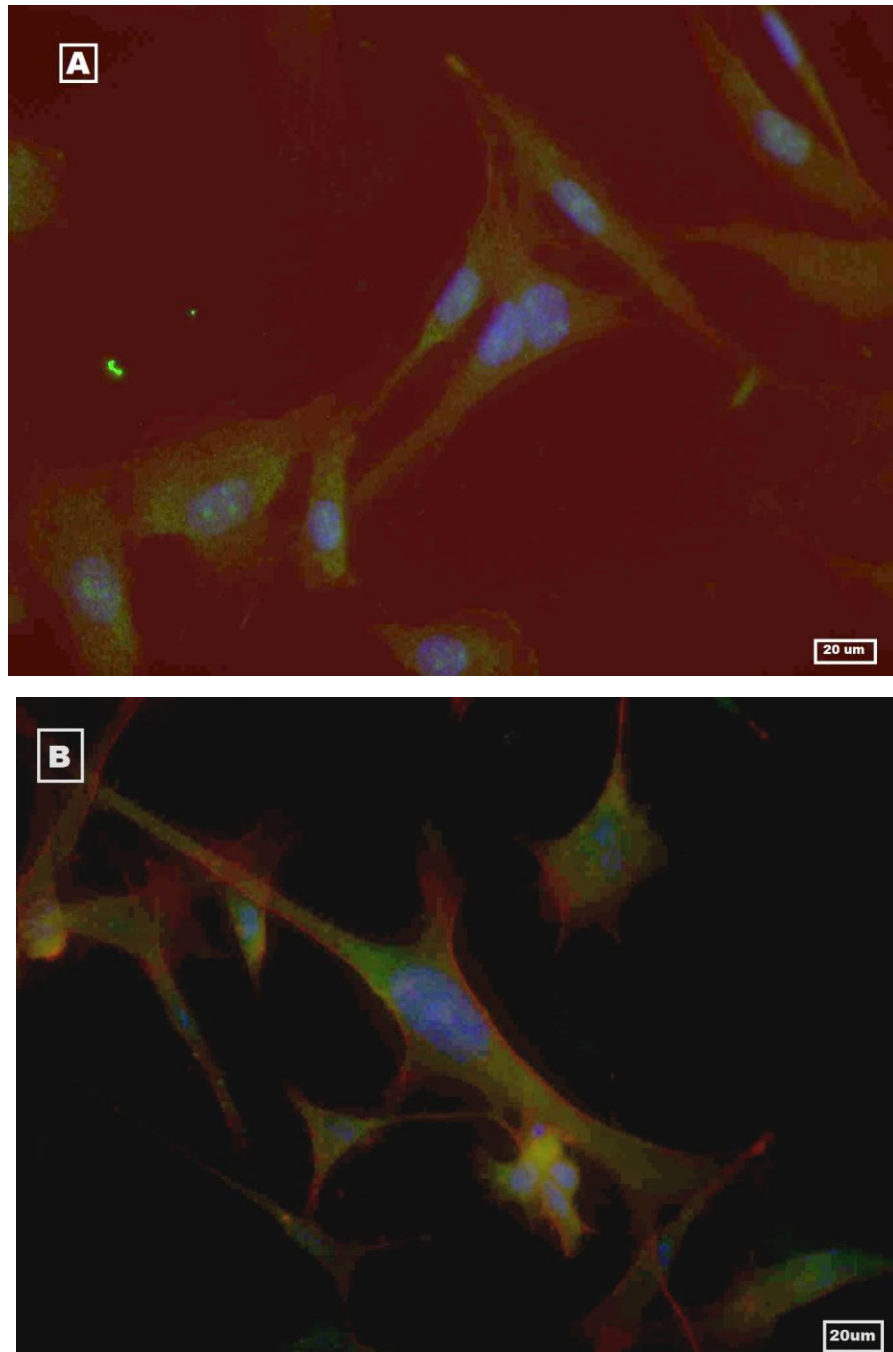


Abbildung 22: Maus-Osteoblasten auf β -TCP disc (A) (1200°C) und β -TCP disc (1250°C) (B): Die aus Mäusecalvarien gewonnenen Zellen wurden 2 Tage kultiviert, fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin, DAPI und Anti-maus FAK gefärbt. Die Zellen sind auf den β -TCP discs lebensfähig, proliferieren und adhärieren an der Oberfläche des β -TCPs. An den mikroporösen β -TCP discs ist eine geringere Besiedelung zu verzeichnen. Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) als membrangebundenes Protein in allen Bereichen der Membran lokalisiert, besonders an den Fokalkontakten, welche unterhalb der Zelle liegen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie erhält man einen Blick durch die Zelle und auf die entsprechenden Fokalkontakte, an welchen FAK beteiligt ist.

Da Osteoblasten eine Vielzahl an Integrin-Subunits an der Oberfläche ihrer Membran exprimieren können, die zum Teil an Zelladhäsionen beteiligt sind, wurden für die vorliegende Arbeit jene Integrine untersucht, welche auch Osteoklasten zur Adhäsion nutzen, da im weiteren Verlauf dieselben Versuche auch an Osteoklasten durchgeführt wurden. Somit wurden Zellen aus der Testreihe und jene der Kontrollgruppe auf das Vorhandensein von Integrin $\alpha 2 \beta 1$ untersucht. Die Ergebnisse fielen durchaus positiv aus, leider war es uns nicht möglich, die Integrin-Interaktion mit der Oberfläche unserer Proben am Fluoreszenzmikroskop festzuhalten, da wir mit dieser Methode keinen Blick auf die Unterseite der Zelle werfen konnten, also jenen Bereich, wo das Vorhandensein von Integrinen an der Zellmembran detektiert werden kann. Integrin-Aufnahmen in der Kontrollgruppe an Knochenplättchen fielen negativ aus, da das ausgewählte Knochenstück zu starke Eigenfluoreszenz aufwies und somit ein Sichtbarmachen der Zellen erschwerte.

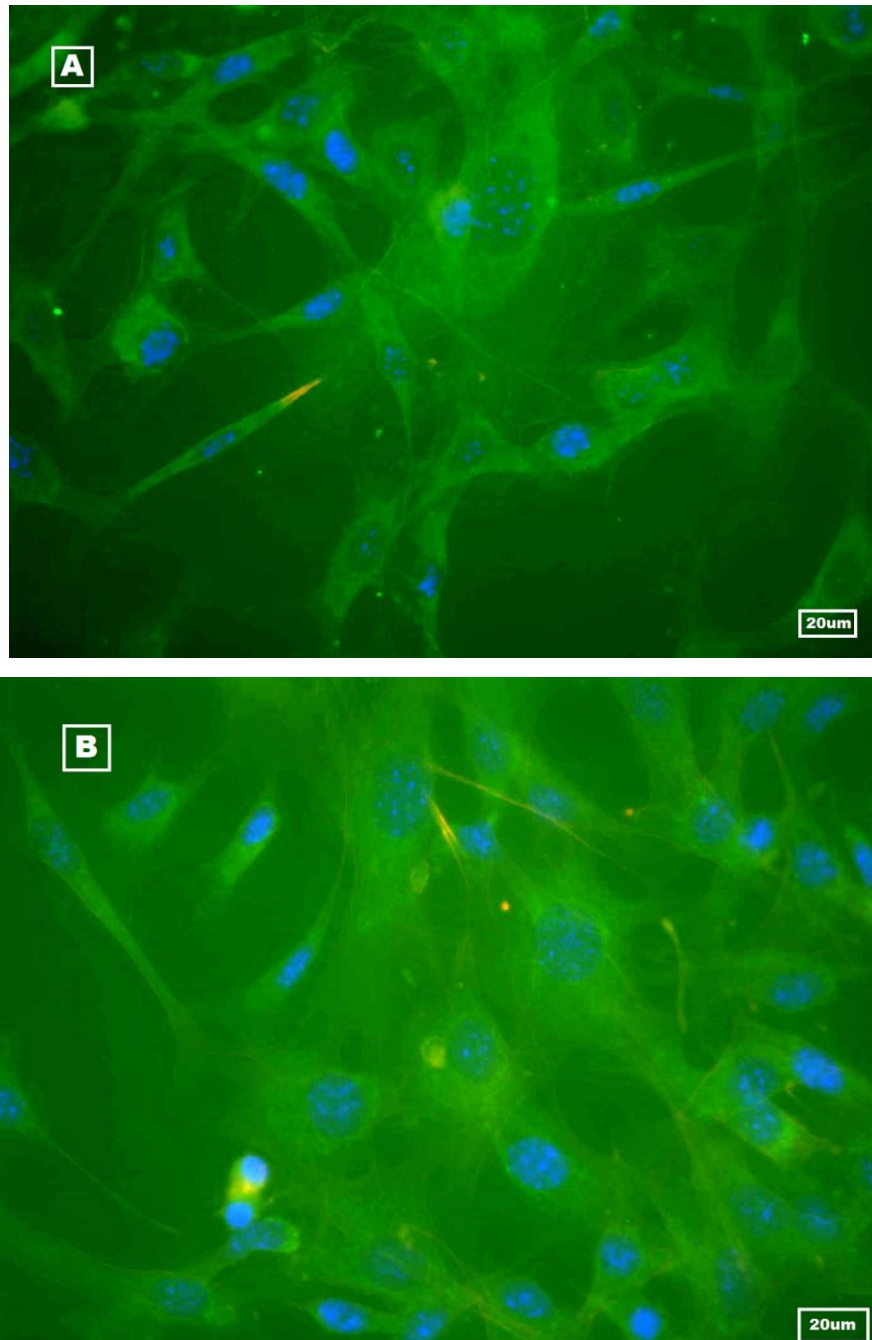


Abbildung 23: Maus-Osteoblasten auf β -TCP discs (1250°C) (A)(B): Die aus Mäusecalvarien gewonnenen Zellen wurden 2 Tage kultiviert, fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin, DAPI und Anti-maus Integrin beta1 (A) und Integrin alpha2 (B) (grün) gefärbt. Die Zellen sind morphologisch normal, bilden Fokalkontakte aus und adhärieren an der β -TCP Oberfläche. Exakte Darstellung der Integrin-Interaktion war nicht möglich. Die Zellen und zum größten Teil auch die β -TCP discs sind gefärbt. Die Vergleichsgruppen am Deckglas und Knochenplättchen zeigten dieselben Resultate.

3.2 Osteoklasten aus Kaninchenknochen

3.2.1 Motilität und Adhäsion von Osteoklasten auf β -TCP

mittels Fluoreszenzmikroskop

Neben der Ergründung des Verhaltens von Osteoblasten an β -TCP discs wurde auch das Verhalten von Osteoklasten an β -TCP Probekörpern anhand einer kurzen Testreihe untersucht. Kaninchenosteoklasten wurden wie die Osteoblasten an Deckgläsern, Knochenplättchen und β -TCP discs kultiviert, fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin, DAPI und den Adhäsionsproteinen Anti-maus Paxillin/FAK/Integrin $\alpha 2\beta 1$ angefärbt. Anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wurde die Morphologie der Osteoklasten auf β -TCP discs im Vergleich zu jenen der Kontrollgruppe auf Deckgläsern und Knochenplättchen untersucht. Waren die Osteoklasten wie zuvor die Osteoblasten in der Lage, sich auf dem Probekörpern anzulagern, proliferieren und adhäreren? Konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Testreihen eruiert werden und spielten Makro-, und Mikroporosität der β -TCP discs eine Rolle bei der Ausbildung von Osteoklasten? Waren die Osteoklasten wie die Osteoblasten in der Lage, Fokalkontakte auszuüben?

Generell kann man sagen, dass Osteoklasten sowohl an den Deckgläsern und Knochenplättchen als auch an den β -TCP discs lebensfähig sind, jedoch in unterschiedlichen morphologischen Erscheinungen. So sind die auf Deckgläsern und β -TCP discs kultivierten Zellen wesentlich größer als jene auf den Knochenplättchen. Allesamt besitzen sie mehrere Zellkerne, die jedoch bei Zellen auf Deckgläsern und β -TCP discs sehr groß sind, während diese bei Osteoklasten auf Knochenplättchen relativ unscheinbar und klein sind. Des Weiteren unterscheiden sich die Osteoklasten an β -TCP Probekörpern, Deckgläsern und Knochenplättchen im Bezug auf die Ausbildung von Aktinringen. Lediglich dünne, feine, deutlich voneinander unterscheidbare Aktinfasern sind an Osteoklasten auf Deckgläsern zu sehen. Auch bei den β -TCP discs mit unterschiedlicher Oberflächenstruktur kommen diese zellulären Abweichungen zum Vorschein. Je rauer und poröser die β -TCP Oberfläche ist, desto seltener findet man bei den Osteoklasten Podosomenringe. Anders jedoch ist die strukturelle Ausbildung der Osteoklasten an glatten β -TCP

Oberflächen, da jene an solchen größtenteils geschlossene Aktinringe vorweisen. Zahlreiche und morphologisch normale Zellen sind auf den Knochenplättchen zu verzeichnen. Die Osteoklasten bilden teils mehrere geschlossene Aktinringe aus, die jenen aus der β -TCP Testreihe sehr ähnlich sind.

Auch die Zellzahl nimmt deutlich ab, je stärker der Übergang von Makro-, zu Mikroporosität zunimmt. Womöglich tritt derselbe Fall in Kraft, wie bei den Osteoblasten: große Poren an der β -TCP Oberfläche bieten mehr Haftvermögen als glatte Oberfläche, oder aber die aus Kaninchen gewonnen Osteoklasten wurden zu kurz kultiviert und es konnten sich keine reifen Osteoklasten ausbilden, sondern lediglich Osteoklasten-Vorläuferzellen.

Osteoklasten können über verschiedene Arten Adhäsionsstrukturen ausbilden, in unseren Testreihen waren dies hauptsächlich Ansätze von Podosomenringen. Das heißt, sie waren zwar in der Lage, an die Testsubstrate zu adhären, da aber die Ausbildung einer sealing zone fehlt, konnten sie nicht ihren üblichen Aufgaben nachgehen. Das Adhäsionsmolekül Paxillin ist deutlich entlang der Aktinfasern zu erkennen, während FAK wie bei den Osteoblasten die gesamte Zelle beansprucht, was wie bereits erwähnt, nicht als zytoplasmatisch gedeutet werden soll.

In Summe kann auch bei den Osteoklasten dasselbe Ergebnis angeführt werden, wie bei den Osteoblasten: je rauer die ihnen angebotene Substratoberfläche ist, desto eher adhären, proliferieren sie und bilden aber keine Aktinringe wie auf Knochenplättchen aus. An glatten Oberflächen nimmt die Anzahl der Zellen deutlich ab und die Ausbildung von Aktinringen tritt deutlicher hervor.

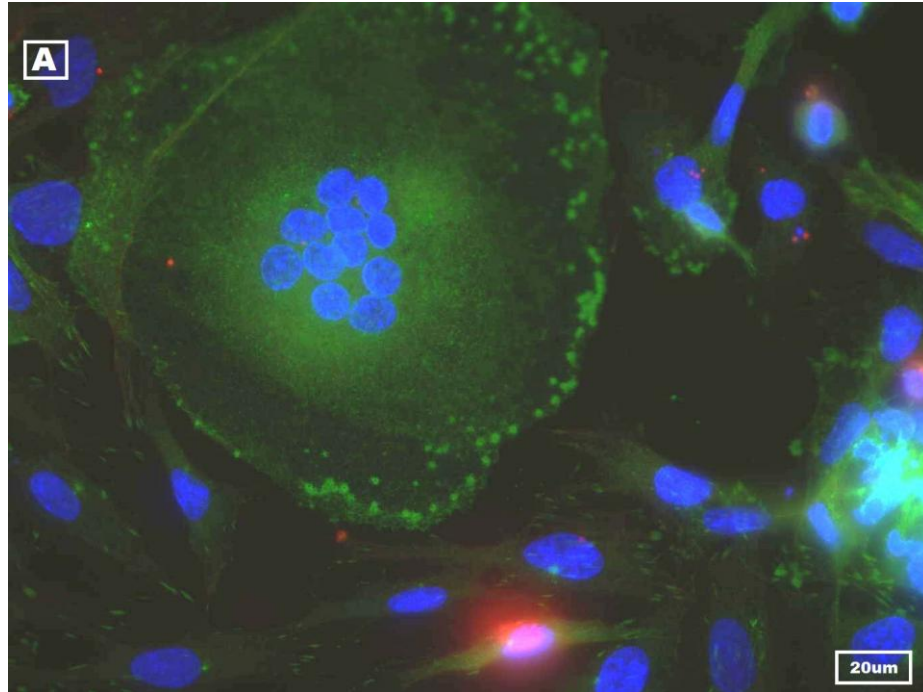


Abbildung 24: Kaninchen-Osteoklast auf (A) Deckglas: Kaninchenosteoklasten wurden 2 Tage kultiviert, fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin, DAPI und Anti-maus Paxillin gefärbt. Osteoklasten sind auf dem Deckglas zwar lebensfähig, weisen keine deutlichen morphologischen Merkmale auf, Aktinringe (grün) sind nicht geschlossen, es handelt sich lediglich um einzelne Aktinfasern.

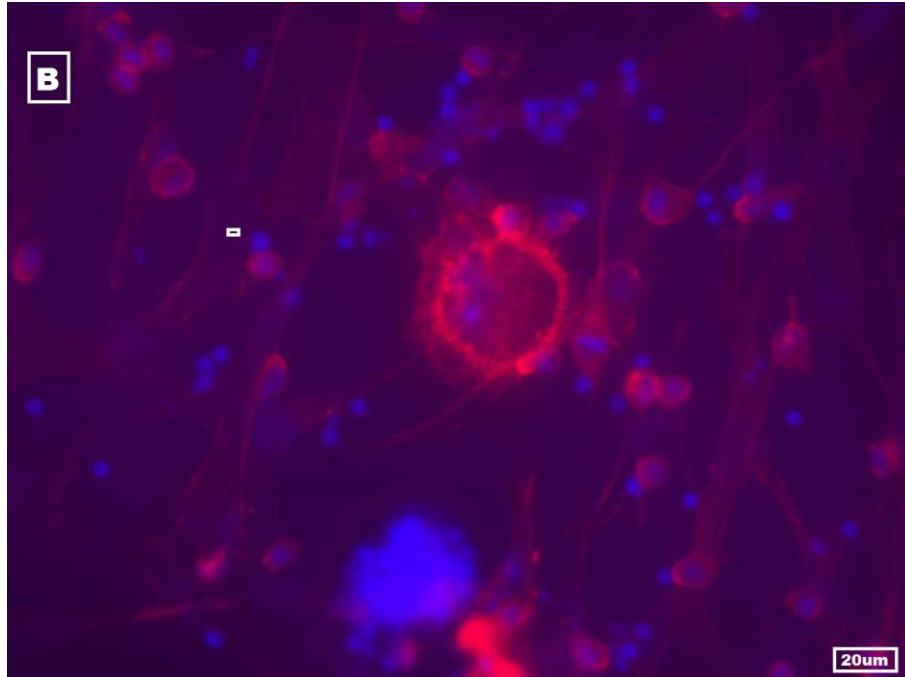


Abbildung 25: Kaninchen-Osteoklasten am Rinderknochen: Kaninchenosteoklasten wurden auf Knochenplättchen kultiviert, fixiert und mittels Alexa Fluor Phalloidin und DAPI gefärbt, um deren morphologische Charakteristika mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Morphologische Charakteristika: dicht geschlossener Aktinring (rot) und mehrere Zellkerne (blau).

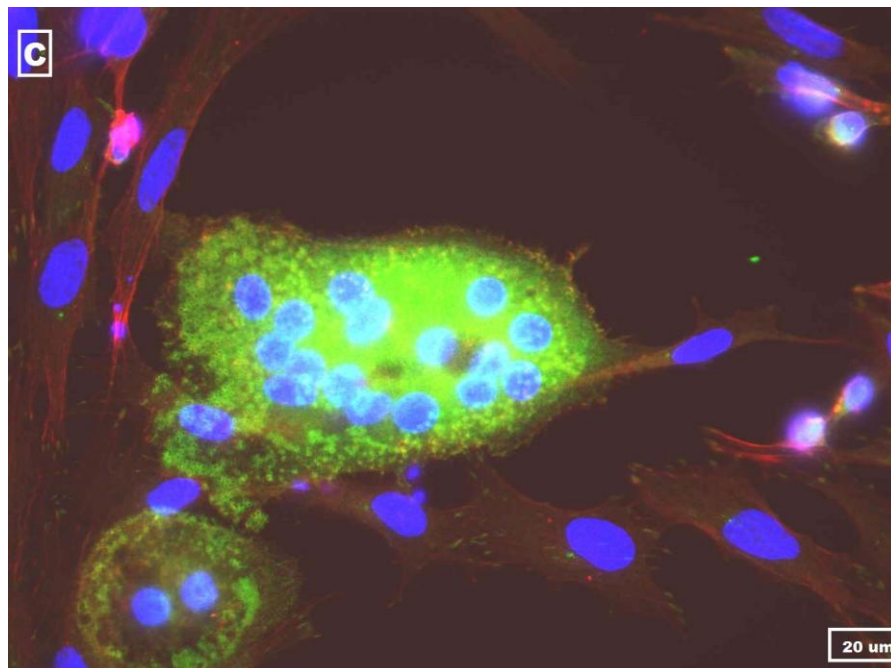


Abbildung 26: Kaninchen-Osteoklast an β -TCP (1200°C): Kaninchenosteoklasten wurden auf β -TCP discs kultiviert, fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin, DAPI und Anti-maus Paxillin gefärbt. Zellen sind normal, Unterscheidungen im Bezug auf Größe und Form gegenüber jenen auf Deckgläsern und Rinderknochen feststellbar. Fokalkontakte werden ausgebildet, beim Osteoklasten in der unteren linken Bildseite sind diese gut entlang des dünnen Podosomenrings erkennbar.

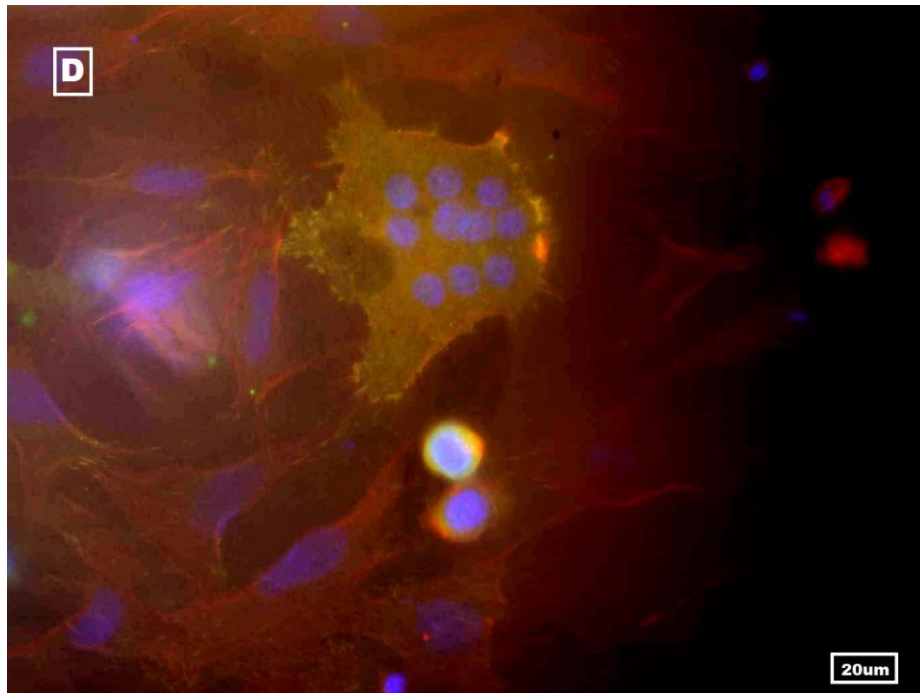


Abbildung 27: Kaninchen-Osteoklasten auf β -TCP disc (1150°C): Kaninchenosteoklasten wurden auf β -TCP discs kultiviert, fixiert und mit Alexa Fluor Phalloidin, DAPI und Anti-maus FAK gefärbt. Die Zellen sind lebensfähig auf β -TCP. Fokalkontakte nicht cytoplasmatischer Natur, sondern entlang der Osteoklastenmembran, welche in direktem Kontakt mit β -TCP disc ist.

3.3 Untersuchung des Oberflächenprofils von β -TCP discs mittels AFM (Rasterelektronenmikroskop)

Anhand von AFM Aufnahmen war es uns möglich, die Oberfläche einer β -TCP disc, welche bei niedrigen Temperaturen (1100°C) gesintert wurde, mit jener bei höheren Temperaturen (1280°C) bezüglich ihres Oberflächenprofils zu vergleichen. So konnte festgestellt werden, dass jene β -TCP discs, welche bei niedrigen Temperaturen gesintert wurden, eine höhere Porosität aufweisen, als jene bei Temperaturen um die 1280°C. Etliche „Berge“ und „Täler“ konnten mittels Cantilever ermittelt werden, was wiederum auf raue Verhältnisse schließen lässt. Anhaften und Verankerung mittels Aktinfilamenten innerhalb der Poren war für Osteoblasten und Osteoklasten möglich. Anders bei Temperaturen um 1280°C. Aufgrund des Sinterungsvorganges sind etliche Poren verschmolzen, was ein Anhaften von Seiten der Zellen erschwert. Die β -TCP Struktur geht womöglich in die α -Form über und die Zellen haben keine

optimalen Gegebenheiten mehr zum anhaften und verteilen. Somit wird verständlich, weshalb eine höhere Zelldichte bei β -TCP discs mit höherer Porosität vorhanden ist als bei jener mit einem glatten Oberflächenprofil.

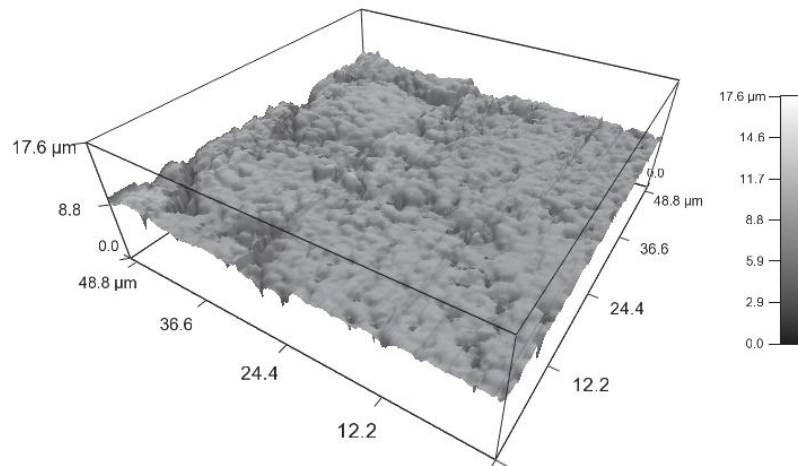


Abbildung 28: AFM-Aufnahme einer β -TCP disc bei Sintertemperatur von 1100 Grad Celsius

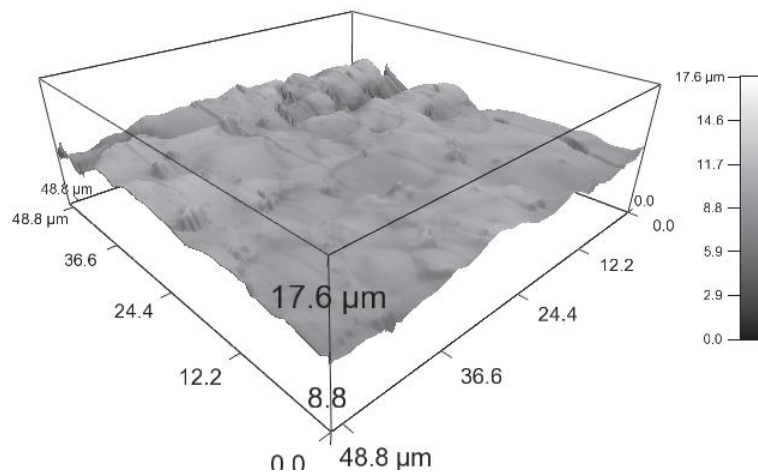


Abbildung 29: AFM-Aufnahme einer β -TCP disc bei Sintertemperatur von 1280 Grad Celsius

4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Fähigkeiten von Osteoblasten und Osteoklasten für die Anwendung im Bereich des Tissue Engineerings genauer zu untersuchen. Neben der Frage, ob diese Zellen in der Lage sind, mit knochenähnlichen Ersatzmaterialien Kontakt aufzunehmen, zu proliferieren und sich zu vermehren, haben wir auch versucht, zu analysieren, ob sie bei bestimmten Bedingungen in der Lage seien, an dem ihnen angebotenen Substrat zu adhären und Fokalkontakte auszubilden. Dabei wurde β -TCP, ein wichtiges, bereits in Verwendung befindliches Biomaterial, untersucht. Als Kontrollgruppen wurden Knochenplättchen und Glasoberflächen verwendet. Osteoblasten und Osteoklasten wurden kultiviert, fixiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Alexa Fluor Phalloidin, DAPI und fluoreszenzmarkierten Antikörpern wie Anti-maus Paxillin/FAK/Integrin- α 2/Integrin- β 1 markiert. Die β -TCP Probekörper wurden gepresst und bei unterschiedlichen Temperaturen gesintert, um unterschiedliche Oberflächenbedingungen für die Zellen zu schaffen. Die angefügte Tabelle soll einen Überblick über die erbrachten Resultate schaffen:

Osteoblasten/Osteoklasten						
	Makroporosität			Mikroporosität		
β-TCP-discs	1100°C	1125°C	1150°C	1200°C	1250°C	1280°C
Zell-Morphologie:	Osteoblasten:keine morphologischen Unterschiede der Zellen innerhalb der Porositätsgrade zu vermerken, kleinere Zellkerne gegenüber Glas					
	Osteoklasten: keine geschlossenen Podosomenringe			Osteoklasten:geschlossene Aktinringe		
Motilität:	willkürliches Wachstum der Zellen ohne spezielle Orientierung an gesamten β-TCP Oberfläche					
Zellzahl:	Porengröße>50µm:			Porengröße<10µm:		
	dichter Zellrasen			verminderte Zelldichte		
Adhäsion/ Fokal-kontakte:						
Paxillin:	OB/OK:zahlreich an Enden der Aktinfilamente,schwache Färbung			OB/OK:verringertes Auftreten von Fokalkontakten entlang der Aktinfilamente		
				starke Farbintensität		
FAK:	OB/OK:entlang der Zellmembran			OB/OK:kaum positive Ergebnisse,Färbung sehr gering		
Integrinαβ:	keine Resultate erzielt,Eigenfärbung des β-TCP					
Knochen-plättchen:				Glasoberflächen:		
Zell-Morphologie:	schmale Zellen mit länglichem Zytoskelett			Zellen mit großen Zytoskelett		
	schmale Zellkerne			große Zellkerne		
Motilität:	einheitliches Wachstum in eine Richtung,			dichtes, willkürliches Zellwachstum		
	entlang des gesamten Knochenplättchens					
Zellzahl:	dichter Zellrasen			dichte,sich überlappende Zellhaufen		
Adhäsion:	keine Resultate, starke Eigenfluoreszenz des Knochens			optimale Paxillin und FAK-Färbung		

Die Ergebnisse zeigten, dass nicht alle Zellen gleich gut auf den ihnen angebotenen Oberflächenprofilen des β-TCP wuchsen. Mikro-, und Makroporosität spielen eine entscheidende Rolle beim Wachstum von Zellen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten an porösen β-TCP Oberflächen stärker proliferierten und adhärten als auf

glatten Arealen. β -TCP discs, welche bei Temperaturen zwischen 1100°C und 1150°C gesintert wurden, weisen, auch nach Erzielung des Oberflächenprofils mittels AFM, deutlich größere Ähnlichkeit mit dem Knochengerüst auf als jene bei höher gesinterten Temperaturen über 1200°C. Dies belegen nicht nur die dichten Zellansammlungen an den β -TCP discs im makroporösen Bereich, sondern auch die durch das AFM eruierten Porendurchmesser von $>50\mu\text{m}$, welche nahe an jene Poren im Knochen heranreichen. Weiters bilden Osteoblasten und Osteoklasten Fokalkontakte, über welche sie in weiterer Folge mit der entsprechenden Oberfläche reagieren, eher an rauen porösen Oberflächen aus als an glatten. Diese Ergebnisse sind wesentlich für die Herstellung von Biomaterialien.

5 Summary

Osteoblasts and osteoclasts play an important role during bone metabolism, not only during bone remodeling, but also during bone repair and fracture healing. Bone structures are constantly remodelled during life. Hormonal, genetic factors, diseases, fractures, drugs, effect bone composition. Last reports show, that around 6.3 million fractures occur every year in the USA and the number of fractures is still increasing. Patients suffer under long periods of regeneration and hospital stay. Therefore, the field of tissue engineering and biomaterials has become an important role in biomedical sciences. Bone substitutes exist in different materials and types and show many advantages and disadvantages. In this thesis I tried to investigate the coherence between cell migration and cell proliferation in relation to different surface topographies of β -TCP, which is a highly investigated and biocompatible bone substitute. After cultivating mouse osteoblasts and rabbit osteoclasts for a short period of time, we started with the immunofluorescence staining. Therefore we used Alexa Fluor Phalloidin, DAPI, monoclonal antibodies against paxillin, Fak and integrin α_2 and integrin β_1 . β -TCP discs were sintered at different temperatures in order to get different microporous and macroporous areas. The formation of the cytoskeleton, cell nuclei and adhesions proteins were noted and assembled. Discs with macroporous structures, which were sintered at temperatures around 1100°C and 1150°C, had stronger cell proliferation and migration rates than those, which were sintered at higher temperatures. Also the formation of adhesion proteins was shown to be different on macro- and microporous discs. Throughout the macroporous discs an increase of adhesions proteins took place, while on microporous discs cells were not able to produce high numbers of adhesions proteins. Therefore it can be concluded that the pore size has a big influence on cell growth and cell motility. The formation of the cytoskeleton and the cell nuclei was similar on every β -TCP disc.

At least it can be concluded that β -TCP is a very interesting bone substitute. It shows a high biocompatibility. Our data suggest that porosity of β -TCP triggers biocompatibility and is subsequently important during bone healing.

6 Diskussion

Knochenersatzmaterialien wie β -TCP werden bereits häufig in der Forschung und im klinischen Alltag, siehe Zahnheilkunde, genutzt. Dennoch sind im Bezug auf ihre Anwendung noch einige Aspekte zu klären, mit denen ich mich zum Teil in dieser Arbeit auseinandergesetzt habe. Nicht in jeder Situation erweist sich β -TCP als kompatibel, Vertreter wie HA oder Kalziumphosphatkeramik können im Vergleich zum β -TCP andere Vorteile aufweisen, z.B. die starke Ähnlichkeit des HA mit dem Apatit, die ihre Anwendung eher möglich machen. Ziel dieser Diplomarbeit war die Klärung, ob β -TCP für den Einsatz als Biomaterial im Rahmen der Knochenheilung geeignet ist und welches Verhalten Knochenzellen auf diesem zeigen. Es stellt sich die Frage, kann unter entsprechenden Voraussetzungen β -TCP die natürlichen Verhältnisse des Knochen widerspiegeln, wenn ja, welche charakteristischen Merkmale sollte es aufweisen. Osteoblasten und Osteoklasten spielen eine zentrale Rolle im Knochenstoffwechsel und in der Wundheilung, weshalb wir ihr Verhalten auf β -TCP discs mit unterschiedlichen Porositätsgraden getestet haben. Bei allen Versuchsansätzen musste die wesentliche Frage geklärt werden, ob β -TCP als Biomaterial biokompatibel ist oder nicht. Laut K. Anselme spielt die Biokompatibilität eine wesentliche Rolle bei der Adhäsion von Osteoblasten. (Anselme, 2000) Dasselbe bestätigt Luxenburg et al. in seiner Arbeit über Osteoklasten, (Luxenburg et al., 2006) wobei auch verdeutlicht werden muss, dass neben der Topographie auch die physikalisch/chemische Zusammensetzung des jeweiligen Knochenersatzmaterials von großer Bedeutung für das Zellwachstum ist. Somit hatten wir für unsere Versuchsreihe schon 3 wichtige Untersuchungskriterien definiert, welche beachtet werden mussten: Biokompatibilität, Topographie und physikalisch-chemische Zusammensetzung.

Hierfür nutzten wir die uns zur Verfügung stehenden Probekörper (Glas, Knochenplättchen), allen voran β -TCP discs, auf welchen Maus-Osteoblasten und Kaninchen-Osteoklasten kultiviert und mittels fluoreszenzmikroskopischer Verfahren untersucht wurden. Ähnliche Abläufe und Ergebnisse wurden von Washburn verzeichnet, welche MC3T3-E1-Osteoblasten an Polymeren

kultivierten und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Verhalten untersuchten. (Washburn et al., 2004). In diesem Fall könnte man sich schon überlegen, ob es Unterschiede zwischen primären und anderen Zelllinien aus dem Bereich des Knochens gibt und ob die Herkunft eine wesentliche Rolle auf das Verhalten der Zellen ausübt.

Der erste Ablauf in unserer Versuchsreihe beschäftigte sich mit dem morphologischen Verhalten von Osteoblasten und Osteoklasten an verschiedenen Oberflächenprofilen der β -TCP discs, welche eine entscheidende Rolle für die Biokompatibilität darstellt.. Wir konnten mit unserer Versuchsreihe belegen, dass Mikro- und Makroporosität keinen entscheidenden Einfluss auf das morphologische Aussehen der Zellen hat. Weder im makroporösen noch im mikroporösen Bereich konnten relevante Unterschiede verzeichnet werden. Anselme et al. konnte feststellen, dass Osteoblasten, welche aus Mäusekalvarien gewonnen wurden, nach ihrer Aussaat unter günstigen Bedingungen rasch mit dem Substrat in Form von Adhäsion, Wachstum und Verteilung in Berührung treten. Dabei spielt neben der Beschichtung des Materials mit Proteinen vor allem die Porosität eine entscheidende Rolle. Washburn et al. starteten Versuchreihen mit, MC3T3-E1-Osteoblasten an kristallinen Materialien, um deren Verhalten an solchen Gegebenheiten besser zu erforschen. Sie kamen nach dieser Versuchsreihe zu dem Entschluss, dass die Rauigkeit einer Oberfläche einen wesentlich höheren Einfluss auf die Zelladhäsion und Zellproliferation hat als die eingesetzten Proteinüberzüge an der Oberfläche des Substrates. (Washburn et al., 2004) Porengrößen über 100 μ m Durchmesser stellen geeignete Bedingungen für das Anhaften und Einwachsen von Zellen dar.(Hideki et al., 2009). Auch die Ausbildung des Zytoskelettes und der Zellkerne kam an rauen Oberflächen besser zu Geltung. Diese Tatsache konnten wir auch innerhalb unserer Testreihe feststellen und mit den Vergleichsgruppen an Deckgläsern in Einklang bringen. Anders war jedoch das Aussehen der Osteoblasten und Osteoklasten and Knochenplättchen. Die Zellen wiesen morphologisch andere Merkmale, auf als jene am β -TCP oder Deckglas, was wiederum nicht für ein geeignetes Oberflächenprofil des β -TCPs spricht.

Zum Studium der Oberflächenbeschaffenheit wurden β -TCP discs bei unterschiedlichen Temperaturen gesintert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und AFM konnten wir zu ähnlichen Aussagen kommen wie Hideki Yoshikawa et al.: An rauen Oberflächen ist es sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten besser möglich, zu adhären, proliferieren und zu wachsen, nicht aber an glatten Topographien, wobei zum Teil auch an sehr glatten Oberflächen ein erneutes stärkeres Wachstum festzustellen war. Dies könnte entweder an der strukturellen Umwandlung des β -TCPs zu α -TCP liegen, welche während eines Sinterprozesses über 1125°C langsam ablaufen kann. (Donglu, 2004) Oder aber an Rissen in der Oberfläche der β -TCP discs, die während des Trocknungszustandes entstanden sind oder Interkonnektivität der Poren, sodass die Poren untereinander in Kontakt stehen, um ein besseres Einwachsen der Zellen zu ermöglichen und somit einen positiveren Einfluss auf die Knochenbildung haben. (Hideki et al., 2009)

Ein weiterer wichtiger Grund für die Biokompatibilität ist die physikalisch chemische Zusammensetzung des Biomaterials. Dank des Einsatzes eines geeigneten Rasterelektronenmikroskops war es mir möglich, zwei β -TCP Oberflächenprofile genauer zu untersuchen. So konnte ich die bereits vorliegenden Ergebnisse mit jenen des AFMs decken, nämlich das β -TCP bei niedrig gesinteter Temperatur im Bereich um 1100°C eine wesentlich stärkere Porosität aufweist als bei Temperaturen um 1280°C. Die Poren im makroporösen Bereich sind eher mit jenen im Knochen zu vergleichen als bei mikroporösen Verhältnissen. Teils stehen sie in direktem Kontakt miteinander und stellen geeignete Areale für das Einwachsen zu Zellen dar. Dies bekräftigen auch die bereits oben genannten Ergebnisse, dass Osteoblasten und Osteoklasten besser an makroporösen Oberflächen adhären als an mikroporösen Strukturen. Horowitz et al., 2006 bestätigt, dass β -TCP in seiner Zusammensetzung sehr ähnlich der Knochenstruktur ist und erfüllt alle Anforderungen, die ein Biomaterial haben sollte. (Horowitz et al., 2009) Fraglich ist jedoch, wie β -TCP mit anderen Biomaterialvertretern reagieren würde, ob es an Eigenschaften einbüsst oder gewinnt. Um diesen Gedankengang nachgehen zu können, müsste der Versuch gestartet werden, β -TCP beispielsweise als 2-

Phasen Gemisch mit HA zu testen, da HA wiederum große Ähnlichkeit mit dem Knochenmineral, dem Apatit hat.. Studien an HA zeigten, dass Osteoblasten höhere Bindungsaffinität zu HA als zu Titan oder Stahl hatten. Gerade diese Fähigkeit und die daraus resultierende Osteointegration macht HA zu einem sehr interessanten Biomaterial, dass eine gute Kombination mit β -TCP darstellen würde. (Kilpadi et al., 2001)

Wir haben in unseren Experimenten auch die zelluläre Lokalisation des Adhäsionsproteins Paxillin, der Adhäsionskinase FAK, Integrin α_2 und Integrin β_1 , welche an den Fokalkontakten zwischen Zelle und Substrat beteiligt sind, eingehend untersucht. Diese konnten nur nachgewiesen werden, wenn die Oberfläche des β -TCPs mit geeigneten Proteinen mit RGD-Sequenz, an welche Integrine andocken können, versehen war. Die Zellen adhärieren an der β -TCP Oberfläche, Osteoblasten bilden an den Enden ihrer Aktinfilamente Paxillin deutlich aus und auch FAK ist mit der uns zur Verfügung stehenden Methode entlang der Zellmembran nachgewiesen worden. Selbe Ergebnisse sind auch bei den Osteoklasten aufgetreten. Die Unterschiede liegen in der Stärke und Intensität der gefärbten Antikörperregionen. An den porösen Vertretern der β -TCP discs sind geringere Farbintensität zu verzeichnen, als an jenen β -TCP discs mit glatter Oberfläche. Gründe dahinter könnten unter anderem sein, dass die Antikörper in den Poren verloren gehen und nicht für die Zellfärbung zur Verfügung stehen, oder dass sie durch Waschvorgänge verloren gegangen sind. Leider war es uns nicht möglich, Integrin-Interaktion darzustellen, da aufgrund der Eigenfärbung sowohl an den β -TCP discs als auch an den Knochenstücken keine deutlichen Umrisse der Zellen mehr sichtbar gemacht werden konnten. Unterschiedliche Versuche mit diversen Verdünnungsschritten der fluoreszenz-markierten Antikörper führten auch zu keiner besseren Darstellung. Überlegungen seitens des Einsatzes einer rasterelektronischen Aufnahme sollten nicht verworfen werden.

Zusammenfassend wurde gefunden, dass β -TCP wichtige Erfordernisse für seine Anwendung als Knochenersatzmittel erfüllt, was anhand der erbrachten Ergebnisse bestätigt werden konnte. Sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten waren in der Lage an den β -TCP discs zu proliferieren,

adhärieren und Fokalkontakte auszubilden. Durch die Optimierung von Porosität und physikalisch/chemischer Zusammensetzung könnte seine Verwendung im Bereich der Knochendefektheilung und im Bereich des Tissue Engineerings weiter optimiert werden.

7 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES BONE-REMODELLINGS MIT BETEILIGTEN ZELLEN	10
ABBILDUNG 2: WEGE DER INTERAKTION ZWISCHEN OSTEOLASTEN UND OSTEOKLASTEN	13
ABBILDUNG 3: WITWENBUCKEL	16
ABBILDUNG 4: OSTEOPOROSE-KNOCHENVERLUST	17
ABBILDUNG 5: PROZESSE DER SEKUNDÄREN WUNDHEILUNG.....	20
ABBILDUNG 6: XENOTRANSPLANTATION.....	24
ABBILDUNG 8: 3D-IMPLANTATE	28
ABBILDUNG 9: ENTWICKLUNG VON BIOMATERIALIEN	29
ABBILDUNG 10: ALPHA TCP.....	32
ABBILDUNG 11: WANDERUNG VON HUMANEN PRIMÄREN OSTEOLASTEN AN UNTERSCHIEDLICHEN EBENEN VON 3D-TCP SCAFFOLDS	33
ABBILDUNG 12: IP-CHA (INTERCONNECTED POROUS HA)	34
ABBILDUNG 13: ADHÄSION VON ZELLEN AN BIOMATERIALIEN.....	37
ABBILDUNG 14: SEM-AUFNAHME	40
ABBILDUNG 15: STRUKTURELLER AUFBAU VON FAK.....	41
ABBILDUNG 16: INTEGRIN VERMITTELTE FAK-AKTIVIERUNG	43
ABBILDUNG 17: PYRAMIDENCANTILEVER.....	57
ABBILDUNG 18: GRAFISCHE DARSTELLUNG DES OBERFLÄCHENPROFILS EINER β -TCP DISC	58
ABBILDUNG 19: MAUS-OSTEOLASTEN AUF (A) UNBESCHICHTETEM DECKGLAS UND AUF (B) KNOCHENPLÄTTCHEN	61
ABBILDUNG 20: MAUS-OSTEOLASTEN AN β -TCP DISC 1125°C.	62
ABBILDUNG 21: MAUS-OSTEOLASTEN AUF DECKGLAS (A) UND β -TCP DISC (B) (1250°C).....	64
ABBILDUNG 22: MAUS-OSTEOLASTEN AUF β -TCP DISC (A) (1200°C) UND β -TCP DISC (1250°C) (B).....	65
ABBILDUNG 23: MAUS-OSTEOLASTEN AUF β -TCP DISCS (1250°C)	67

ABBILDUNG 24: KANINCHEN-OSTEOKLAST AUF (A) DECKGLAS	70
ABBILDUNG 25: KANINCHEN-OSTEOKLASTEN AM RINDERKNOCHEN....	71
ABBILDUNG 26: KANINCHEN-OSTEOKLAST AN β -TCP (1200°C).....	71
ABBILDUNG 27: KANINCHEN-OSTEOKLASTEN AUF β -TCP DISC (1150°C).	72
ABBILDUNG 28: AFM-AUFNAHME EINER β -TCP DISC BEI SINTERTEMPERATUR VON 1100 GRAD CELSIUS	73
ABBILDUNG 29: AFM-AUFNAHME EINER β -TCP DISC BEI SINTERTEMPERATUR VON 1280 GRAD CELSIUS	73

8 Curriculum vitae

Name: Marlene Illetschko

Geburtsdatum: 09.04.1986

Geburtsort: Gmünd, NÖ

Schulbildung:

1992-1996: Volksschule Alt- Nagelberg, NÖ

1996- 2004: Bundesgymnasium Gmünd

3. Juni 2004: Reifeprüfung

Studium:

seit Oktober 2004: Diplomstudium Pharmazie, Universität Wien

9 Literaturverzeichnis

1. Anselme K 2000 Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21(7):667-681.
2. Badowski C, Pawlak G, Grichine A, Chabadel A, Oddou C, Jurdic P, Pfaff M, Albigés-Rizo C, Block MR 2008 Paxillin Phosphorylation Controls Invadopodia/Podosomes Spatiotemporal Organization. *The American Society for Cell Biology* 19:633-645.
3. Barrère F, Blitterswijk C, Groot K 2006 Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal of Nanomedicine* 3:317-332.
4. Bignon A, Chouteau J, Chevalier J, Fantozzi G, Carret JP, Chavassieux P, Boivin G, Melin M, Hartmann D 2003 Effect of micro- and macroporosity of bone substitutes on their mechanical properties and cellular response. *Journal of Materials science: Materials in Medicine* 14:1089-1097.
5. Bose S, Bandyopadhyay A 2013 Chapter 1 - Introduction to Biomaterials. In: Amit B, Susmita B (eds.) *Characterization of Biomaterials*. Academic Press, Oxford, pp 1-9.
6. Dempster 2006 Anatomy and Functions of the Adult Skeleton. *American Society for Bone and Mineral Research*.
7. Donglu S 2004 Biomaterials and tissue engineering. Chapter I, Chapter II: pp1-137
8. Drosse I, Volkmer E, Capanna R, Biase PD, Mutschler W, Schieker M 2008 Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury* 39, Supplement 2:S9-S20.
9. Duncan J, MacDonald JF, Hanna JV, Shirosaki Y, Hayakawa S, Osaka A, Skakle JMS, Gibson IR 2014 The role of the chemical composition of monetite on the synthesis and properties of α -tricalcium phosphate. *Materials Science and Engineering: C* 34:123-129.
10. Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GA 2000 Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biology* 19(2):97-105.
11. Einhorn TA 1998 The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics And Related Research Supplement* 355:7-21.
12. Fages J, Jean E, Frayssinet P, Mathon D, Poirier B, Autefage A, Larzul D 1998 Bone allografts and supercritical processing: effects on osteointegration and viral safety. *The Journal of Supercritical Fluids* 13(1-3):351-356.
13. Frost HM 1989 The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clinical Orthopaedics And Related Research Supplement* 248:283-293.
14. Greenbaum MA, Kanat I 1993 Current concepts in bone healing. Review of the literature. *Journal of American Podiatric Medical Association* 83:123-9.

15. Hideki Y, Noriyuki T, Tsuyoshi M, Akira M 2009 Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Interface Focus*:341-348.
16. Hildebrand JD, Schaller MD 1993 Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *The Journal of Cell Biology* 123(4):993-1005.
17. Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons TJ 1995 Paxillin, a Tyrosine Phosphorylated Focal Adhesion- associated Protein binds to the Carboxyl Terminal Domain of Focal Adhesion Kinase. *Molecular Biology of the Cell* 6:637-647.
18. Horowitz RA, Mazor Z, Foitzik C, Prasad H, Rohrer M, Palti A 2009 β -Tricalcium Phosphate as Bone Substitute Material: Properties and Clinical Applications. *The International Journal of Dental Implants & Biomaterials*:2-11.
19. Ilic D, Furuta Y 1995 Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK- deficient mice. *Nature* 377 (6549):539-44.
20. Imel EA, DiMeglio LA, Burr DB 2014 Metabolic Bone Diseases. *Basic and Applied Bone Biology*:317-344.
21. Jee WSS 2001 Integrated bone tissue physiology: anatomy and physiology. In: Cowin SC, ED. *Bone mechanics handbook*, Second ed. Florida: CRC Press: 2001:1-68
22. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O 2006 Podosome and sealing zone: Specificity of the osteoclast model. *European Journal of Cell Biology* 85(3-4):195-202.
23. Kenley RA, Yim K, Abrams J, Ron E, Turek T, Marden L, Hollinger J 1993 Biotechnology and Bone Graft Substitutes. *Pharmaceutical Research* Vol.10:1393-1401.
24. Kilpadi KL, Chang P-L, Bellis SL 2001 Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel.
25. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J 2012 An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry* 45(12):863-873.
26. Luxenburg C, Addadi L, Geiger B 2006 The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *European Journal of Cell Biology* 85(3-4):203-211.
27. Martin RB 2000 Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone*, 2000; 26:1-6.
28. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD 2005 Focal Adhesion Kinase: In Command And Control Of Cell Motility. *Molecular Cell Biology* 6.
29. Murugan R, Ramakrishna S 2005 Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology* 65(15-16):2385-2406.
30. Nkene E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW 2004 Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective

- study. *International Journal of Oral And Maxillofacial Surgery* 33(2):157-63.
31. Ohtsuki C, Kamitakahara M, Miyazaki T 2009 Bioactive ceramic-based materials with designed reactivity for bone tissue regeneration. *The Journal of the Royal Society, Interface/ the Royal Society, Supplement 3*: 349-60
 32. Parsons TJ 2003 Focal Adhesion Kinase: the first ten years. *Journal of Cell Science* 116 1409-1416.
 33. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE 1998 *Biomaterial Science: An introduction to materials in medicine*. 3rd Edition
 34. Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D 2004 Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Cell Research* 1692(2–3):77-102.
 35. Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA 2005 Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials*: 26(2): 137-46
 36. Smith IO, McCabe LR, Baumann MJ 2006 MC3T3-E1 osteoblast attachment and proliferation on porous hydroxyapatite scaffolds fabricated with nanophase powder. *International Journal of Nanomedicine* 2:189-194.
 37. Steen BM, Gerstenfeld LC, Einhorn TA 2011 12 - The Role of the Immune System in Fracture Healing. In: Joseph L, Md, Yongwon C, PhD, Mark H, Hiroshi Takayanagi MDP (eds.) *Osteoimmunology*. Academic Press, San Diego, pp 343-367.
 38. Tondravi MM, McKercher S, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum S, Quiroz M 1996 Novel osteoporosis mutation caused by the knocked out of the hematopoietic transcription factor PU.1 in transgenic mice. *Bone* 19(3):163.
 39. Turner CE, Glenney JRJ, Burridge K 1990 Paxillin: A New Vinculin-binding Protein Present in Focal Adhesions. *The Journal of Cell Biology* 111:1059-1068.
 40. Washburn NR, Yamada KM, Simon CGJ, Kennedy SB, Amis EJ 2004 High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials* 25:1215-1224.
 41. Yang L, Perez-Amodio S, Barrère-de Groot FYF, Everts V, van Blitterswijk CA, Habibovic P 2010 The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts. *Biomaterials* 31(11):2976-2989.