

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. U. Joos -

**Laser Secondary Neutral Mass Spectrometry und
Immunfluoreszenzmikroskopie zur Charakterisierung der
Biom mineralisation von Monolagen und 3-dimensionalen
Osteoblastenkulturen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Sommer, Julia

aus Dortmund

2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.-P. Wiesmann

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Th. Stamm

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Direktor: Univ.Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. U. Joos -
Referent: Priv.-Doz. Dr. H.-P. Wiesmann
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Th. Stamm

Zusammenfassung

Laser Secondary Neutral Mass Spectrometry und Immunfluoreszenzmikroskopie zur Charakterisierung der Biomineralisation von Monolagen und 3-dimensionalen Osteoblastenkulturen

Sommer, Julia

Die Biomineralisation des Knochens ist ein vielstufiger Prozess, in dem zum einen Collagen-Typ I und verschiedene nicht-collagene Proteine, wie z.B. Bone Sialoprotein und Osteonectin mit Unterstützung der Adhäsionsproteine Actin und Fibronectin eine Matrix bilden, in den zum anderen aber auch Kalzium und weitere anorganische Elemente, wie z.B. Kalium, Phosphor und Magnesium involviert sind. Eine wichtige Stufe stellt dabei die Fähigkeit dar, von einer nicht-mineralisierten Knochenmatrix in eine mineralisierte überzugehen.

Ziel dieser *in vitro* Studie ist die Charakterisierung der Matrixmineralisation anhand der von bovinen Osteoblasten-ähnlichen Zellen in einer Monolagenkultur und in einem 3-dimensionalen Collagengel synthetisierten Proteine, deren Matrixstrukturen mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises und einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilt werden können. Außerdem werden die Verteilungen der verschiedenen anorganischen Elemente in unterschiedlichen Stadien des Mineralisationsprozesses mittels Laser-SNMS (Secondary Neutral Mass Spectrometry) anhand der chemischen Struktur der Zellkultur untersucht.

Der immunhistochemische Nachweis zeigt vor Beginn der Matrixformation ein hohes Expressionslevel für Fibronectin, das wesentlich am Zellattachment beteiligt ist. Eine extrazelluläre Organisation der Collagen-Matrix kann in beiden Kultursystemen erst nach zwei Wochen beobachtet werden und ist erst nach insgesamt fünf Wochen zu einem Großteil abgeschlossen. Dabei sind Dichte und Komplexität der Fibrillen in der Monolagen-Kultur signifikant höher als im Collagen-Gel. Der Peak der Bone Sialoprotein-Expression findet im 2-dimensionalen System nach drei Wochen statt und ist zeitlich mit dem Beginn der Mineralformation assoziiert.

Die mittels SNMS bestimmte Elementverteilung zeigt z.B., dass Kalium vor Beginn der Nukleation angereichert wird. Anhand der Intensitätsverteilung der Ionen können verschiedene Stadien der Biomineralisation identifiziert werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Stand der Forschung.....	1
1.2 2- und 3-dimensionale Zellsysteme.....	2
1.2.1 Actin.....	4
1.2.2 Fibronectin.....	4
1.3 Die Matrixproteine des Knochens.....	6
1.3.1 Bone Sialoprotein.....	6
1.3.2 Collagen-Typ I.....	7
1.3.3 Osteonectin.....	8
1.4 Das Knochenmineral.....	9
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Zellkultur.....	12
2.1.2 Substanzen für die Analyse.....	13
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Zellkultur.....	15
2.2.2 Versuchsaufbau.....	18
2.2.3 Analysemethoden (Fluoreszenzmikroskopie).....	25
2.2.4 Analysemethoden (Laser-SNMS).....	29
3 Ergebnisse.....	41
3.1 Immunfluoreszenzanalyse.....	41
3.1.1 Kontrolle der Kulturbedingungen, des Wachstums und der Migration im 2-dimensionalen <i>in vitro</i> System.....	41
3.1.2 Proteine der extrazellulären Knochenmatrix im 2-dimensionalen <i>in vitro</i> System.....	46
3.1.3 Kontrolle der Kulturbedingungen, des Wachstums und der Migration im 3-dimensionalen <i>in vitro</i> System.....	52

3.1.4	Proteine der extrazellulären Knochenmatrix im 3-dimensionalen <i>in vitro</i> System.....	55
3.2	Laser-SNMS-Analyse der Syntheseleistung.....	59
3.2.1	Einfluss verschiedener Ionen auf Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix im <i>in vitro</i> System.....	60
4	Diskussion	65
4.1	Das <i>in vitro</i> System	65
4.1.1	Kulturbedingungen, Zellwachstum und Migration im 2- und 3-dimensionalen <i>in vitro</i> System	66
4.1.2	Die Matrixproteine des Knochens.....	69
4.2	Das Substratmaterial	73
4.3	Beteiligung verschiedener Ionen an der Mineralformation im <i>in vitro</i> System.....	74
5	Abkürzungsverzeichnis.....	78
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Danksagung.....	95
8	Lebenslauf.....	96

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

Nach Weiner und Wagner [98, 99] „bezeichnet der Ausdruck Knochen eine Familie von Materialien, die alle aus mineralisierten Collagenfasern aufgebaut sind.“ Im menschlichen Körper macht Knochen den größten Teil des Hartgewebes aus. Seine Hauptfunktionen sind sowohl die Speicherung von Kalzium- und Phosphationen für unterschiedliche metabolische Zwecke, als auch die mechanische Stabilisierung. Strukturell betrachtet ist der Verbundwerkstoff Knochen aus Kalziumphosphat und Proteinen zusammengesetzt, davon zu 85-90% aus Collagen und daneben auch kleineren Anteilen von etwa 200 verschiedenen nicht-collagenen Proteinen [34], wie z.B. Bone Sialoprotein (BSP), Fibronectin (FN) und Osteonectin (ON). Auf der Basis dieser Zusammensetzung besteht ein allgemeines Einverständnis, dass Collagen entscheidende Rollen in der Struktur und Funktion von Knochengewebe erfüllt [107]. Die besonderen mechanischen Eigenschaften des Knochens entstehen erst durch das Zusammenspiel von organischer Matrix und anorganischem Mineral: Während das Collagen die Elastizität (Biege- und Zugbelastung) gewährleistet, garantiert das Calciumphosphat die Härte (Druckbelastung).

Es ist allgemein anerkannt, dass physiologische Mineralablagerungen, z.B. die organisierte Formation von Mineral in Muscheln, in Zähnen und im Knochen nicht ohne eine geeignete Matrix stattfinden [15]. Die Matrix bietet eine Orientierungshilfe für Mineralablagerungen und könnte direkt am Mineralisationsprozess beteiligt sein, indem sie als ein Nukleator dient oder Ionen bindet und organisiert, die in Mineralkristalle eingebaut werden.

Die Formation und Reifung von biologischen Apatitkristallen in Knochen, Dentin und Schmelz finden dementsprechend unter der Kontrolle der Matrix statt. Eine mögliche Rolle der spezifischen „Kristall-Proteine“ ist, die Nukleation und das Wachstum von biologischem Apatit während des Mineralisationsprozesses zu steuern [22] und in der Funktion eines Inhibitionsmechanismus die Abscheidung von Kalziumphosphat im Körper am falschen Ort und somit die Entstehung schwerer Erkrankungen zu verhindern [33]. Pathologische Verkalkungen sind z.B. verantwortlich für Arteriosklerose [32, 60, 91, 95], Zahnstein [64, 84], Blasensteine [1, 2, 66] oder die Verkalkung künstlicher Herzklappen [27, 44, 78, 106].

Gerstenfeld et al. [43] zeigen anhand von *in vitro* Studien über Gewebeformation in Osteoblastenkulturen von Hühnern, dass die Knochenbildung als ein mehrstufiger Prozess angesehen werden kann. Zuerst wächst ein Collagen-Templat, dann werden nicht-collagene Proteine expremiert, die letztendlich die Kristallisation des Kalziumphosphats kontrollieren.

Die Mineralisation von Collagen *in vitro* ist sowohl für das Verständnis des Mechanismus, dem die Mineralisation unterliegt, als auch für die Synthese von verbesserten Knochentransplantaten von großem Interesse [16].

Die Frage, ob es sich bei der Bildung von Knochen um einen aktiven oder um einen passiven Prozess handelt, ist Gegenstand einer anhaltenden Diskussion [33]. Als aktiver Prozess wird dabei die Akkumulation von Kalziumphosphat-Nanokristallen in Matrixvesikeln bzw. in einem räumlich begrenzten Zellbereich des Osteoblasten bezeichnet [79, 92, 102]. Unter einem passiven Prozess versteht man eine spontan ablaufende Mineralbildung an geeigneten Keimbildungsplätzen, z.B. auf einer Collagenfaser.

1.2 2- und 3-dimensionale Zellsysteme

Die Produktion eines knochenähnlichen Gewebes *in vitro* basiert auf der Fähigkeit der Osteoblasten, in einem Kultursystem zu migrieren, proliferieren und sich zu differenzieren. Das angestrebte Ziel extrakorporaler Knochengewebsproduktion ist die Mineralisation eines knochenähnlichen extrazellulären Scaffolds. Daher sollte die Synthese von künstlichem Knochen nicht nur Differenzierungs- sondern auch Mineralisationsphänomene berücksichtigen [105].

Es werden zwei grundlegende Methoden verwendet, Zellen zu kultivieren. Sie können als Monolayer in Petrischalen oder auf einer Matrix (z.B. Collagen, Polymere, Kalziumphosphat-Materialien) in Form eines Multilayer-Systems angezüchtet werden [73].

Um Knochenregeneration zu ermöglichen, wurden verschiedene 3-dimensionale Scaffolds entwickelt, bei denen durch Abdecken und Aufrechterhalten eines Raumes der Migrations- und Differenzierungsprozess erleichtert werden sollte [105]. Diese Scaffolds wurden überwiegend auf der Basis von natürlichen oder synthetischen Polymeren hergestellt. Neuere Entwicklungen im Tissue-Engineering haben das Interesse an natürlich vorkommenden 3-

dimensionalen Strukturen, wie z.B. Biomaterialien auf Collagenbasis wieder aufleben lassen [51, 74].

Die Pionierarbeit für die Verwendung von Collagen-Scaffolds zur Zellkultivierung *in vitro* wurde vor Jahren von Erhmann und Gey [35] geleistet. Seitdem werden Collagengele dazu verwendet, die Differenzierung und Expression als gewebespezifische Funktion einer Vielzahl von Zelltypen in Kultursystemen zu unterstützen.

Der überwiegende organische Bestandteil der Extrazellulärmatrix des Knochens ist Collagen-Typ I [105]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Collagen-Typ I die Expression eines Knochenzell-Phänotyps beeinflusst [7, 39, 69, 77] und sowohl für die Entwicklung der Expression eines Osteoblasten-Phänotyps, als auch für die Formation einer mineralisierten Matrix grundlegend ist [77].

Wiesmann et al. [105] zeigen anhand von Osteoblasten-ähnlichen Zellen, die über einen Zeitraum von drei Wochen sowohl in Petrischalen als auch im 3-dimensionalen Collagen-Gel kultiviert werden, dass Proliferation und Migration von Osteoblasten in beiden Systemen vergleichbar sind. Die Entwicklung einer knochenähnlichen extrazellulären Matrix bestätigt die Bildung eines ausgereiften Osteoblasten-Phänotyps ohne Verluste der Lebensfähigkeit über die gesamte Versuchsdauer. Die Osteoblasten-ähnlichen Zellen bilden eine extrazelluläre Matrix, die in beiden Systemen Osteocalcin, Osteonectin und neu synthetisiertes Collagen-Typ I enthält. Knochen-ähnliche Mineralisation kann jedoch nur in der Monolayer-Kultur beobachtet werden.

Lynch et al. [68] haben anhand von aus der Calvaria fetaler Mäuse isolierten Zellen festgestellt, dass Osteoblasten, die auf Collagen-Typ I kultiviert werden, verglichen mit Zellen, die in Petrischalen angezüchtet werden, eine frühere und gesteigerte Expression eines differenzierten Phänotyps zeigen. Einige der für Osteoblasten charakteristischen nicht-collagenen Extrazellulärmatrix-Proteine wie Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin werden im Multilayer-System auf einem höheren Level expremiert als in der Monolagen-Kultur, bzw. 2-dimensionalen Versuchsanordnung. Bei Collagen-Typ I, Fibronectin und Actin zeigt sich jedoch ein dazu inverses Expressionsmuster. Weiterhin haben sie eine im Multilayer-System beschleunigte und gleichmäßige Mineralisation der Matrix im Gegensatz zu der fokal auf vereinzelte Knötchen begrenzten Mineralisation im 2-dimensionalen Monolayer beobachtet. Sie beschreiben dabei drei verschiedene Perioden der Entwicklung [7, 77]: Die erste als eine Periode der Zellproliferation, gefolgt von einer Periode der Matrixreifung und letztendlich -mineralisation.

1.2.1 Actin

Ein weiteres wichtiges Kriterium der Zell-Matrix-Interaktion stellt die Organisation des Zytoskeletts von auf Oberflächen angesiedelten Zellen dar [30].

Actin, das als Stützstruktur 5-10% des gesamten zellulären Proteins ausmacht, ist aus globulären Proteinuntereinheiten aufgebaut, die sehr schnell reversibel polymerisieren können [83]. An die Actinfilamente können sich weitere Proteine anlagern und einzelne Proteinfäden miteinander verknüpfen, wodurch ein 3-dimensionales Netzwerk entsteht. Besonders actinreich ist die Region direkt unter der Plasmamembran.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Actin als zytoskelettales Element eine wichtige Rolle für das Attachment und die Stabilisierung von Zellen spielt. An Adhäsionsplaques gekoppelte Actinfilamentbündel sind in der Lage, Kräfte auf das Substratmaterial zu übertragen. Sie helfen, die Zellform aufrecht zu erhalten und erleichtern die Zelladhäsion [5, 88].

El-Amin et al. [30] haben die intrazelluläre Anordnung und Verteilung von Actin untersucht und Korrelationen zwischen der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmorphologie evaluiert. Sie bestimmen Actin zum Schlüsselprotein der zellulären Struktur und beschreiben die Actin-Organisation von Typ I, Typ II oder Typ III Osteoblasten. Dabei stellen Typ I Osteoblasten im Allgemeinen runde Zellen dar und repräsentieren ein präliminäres Stadium von Actinverknüpfungen. Der Typ II ist durch eine gesteigerte Formation von Actinfilamenten und einen zunehmenden zellulären Durchmesser gekennzeichnet. Typ III Zellen sind elongierte Osteoblasten mit einem organisierten Actinfilament-Netzwerk und demonstrieren Ausdehnung und zelluläre Migration.

1.2.2 Fibronectin

Fibronectin ist ein weit verbreitetes Glykoprotein, das in hohen Konzentrationen in den meisten extrazellulären Matrices, im Plasma (300 µg/ml) und in anderen Gewebeflüssigkeiten vorhanden ist. Als bedeutendes Adhäsionsprotein vermittelt es verschiedene Aspekte zellulärer Interaktionen mit der extrazellulären Matrix, eingeschlossen der Migration [9].

Hinsichtlich seiner Molekularstruktur ist Fibronectin ein fadenförmiges Dimer aus nicht-identischen Untereinheiten proteaseempfindlicher Glykoproteine, die über Disulfidbrücken

miteinander verbunden sind. Verschiedene Fibronectin-Domänen sind darauf spezialisiert, an Makromoleküle der extrazellulären Matrix zu binden [61].

Eine wichtige Entdeckung bezüglich der strukturellen Funktion des Fibronectin ist, dass es eine kurze Aminosäure-Sequenz (Arg-Gly-Asp oder RGD) enthält. Diese ist für die Bindung an auf der Zelloberfläche lokalisierten Integrin-Rezeptoren, für die spätere Differenzierung des Osteoblasten [75, 76] und dessen Lebensfähigkeit entscheidend [45].

Grundsätzlich kann dem Protein in der Matrix ein großes Aufgabenfeld zugewiesen werden: Fibronectin hält als Adhäsionsprotein die Bestandteile der Extrazellulärmatrix zusammen und verbindet einzelne Strukturen der Matrix miteinander, inklusive der beteiligten Zellen [9]. Die Glykoproteine der Matrix fungieren somit als Bindeglied zwischen all den sich im Extrazellulärraum befindenden Strukturen. Fibronectin liegt dabei in Form unlöslicher Fibrillen zusammen, die sich an der Oberfläche der Zellen befinden und deren Anheftung an die Matrix dienen. Zu diesem Zweck ist das Fibronectin in der Lage, sowohl an Integrine auf den Zellen, als auch an Collagene in der Matrix zu binden. Indem es an andere Matrixproteine bindet und deren Aktivitäten modifiziert [19, 22] ist Fibronectin außerdem an der Regulierung der Knochenmineralisation beteiligt [23, 72].

Young [107] fand heraus, dass Fibronectin nach intrazellulärer Synthese extrazellulär in Bereichen der Osteogenese akkumuliert wird. Durch eine DNA-Sequenzanalyse werden die am häufigsten in Zellen des Knochenmarks und des trabekulären Knochen vorkommenden mRNA-Spezies bestimmt und so gezeigt, dass das hohe Level der Fibronectin-Expression in beiden Zelltypen eine wichtige Rolle dieses Proteins im Knochen impliziert.

Sivakumar et al. [89] können anhand von Zeitraffer-Filmen über die Dynamik Fluoreszenz-gelabelter Fibronectin-Strukturen zeigen, dass Fibronectin als eines der ersten Proteine in die extrazelluläre Matrix eingelagert wird und nach 24 Stunden als gut definiertes fibrilläres Netzwerk beobachtet werden kann. Einzelne Fibrillen werden dabei als Resultat von Zellbewegungen um mehr als das 3,5-fache ihrer Originallänge gedehnt oder bis auf ein Viertel ihrer Länge kontrahiert. Durch quantitative Vermessung von Verlagerungs-Vektoren konnte veranschaulicht werden, dass einzelne fibrilläre Fibronectin-Netzwerke innerhalb einer Zellkultur verschiedene dynamische Bewegungen als Antwort auf Zellbewegungen zeigen können und dass Bewegungen von Fibrillen mit Zellbewegungen korrelieren.

Kennedy et al. [58] beschreiben, dass Fibronectin als eines der primären Extrazellulärmatrix-Proteine an Substratoberflächen adsorbiert und dadurch Zellreaktionen beeinflussen kann [53, 59].

1.3 Die Matrixproteine des Knochens

1.3.1 Bone Sialoprotein

Bone Sialoprotein zählt zu den nicht-collagenen Proteinen und enthält als Zellattachment-Protein die Arg-Gly-Asp-Sequenz (RGD), die an Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden kann [38]. Seine Verteilung im Gewebe ist stark begrenzt und es kann nahezu ausschließlich in Knochen und mineralisierten Gewebeverbänden nachgewiesen werden [9].

Hinsichtlich der molekularen Struktur besteht das Glykoprotein aus einer einzelnen Polypeptidkette und enthält Oligosaccharide, die reich an Sialinsäure sind.

Im Knochen wird Bone Sialoprotein von Osteoblasten auf einem hohen Level im Bereich der *de novo* Knochenformation expremiert, dort wo das Molekül an Hydroxylapatit bindet und einen wesentlichen Teil der mineralisierten Matrix organisiert [9].

Einige Studien zeigen, dass die Adhäsionsproteine, die die Tripeptid-Aminosäuresequenz enthalten, mit dem frühen Mineralisationsprozess assoziiert sind [57] und das Attachment der Osteoblasten zur Matrix vermitteln [37].

Boskey [15], die in ihrer Studie der Frage nachgeht, welche Matrixproteine die Mineralisation beeinflussen, beschreibt, dass Bone Sialoprotein häufig in Bereichen initialer Mineralisation gefunden werden kann und für die Initiation der Knochenmineralisation notwendig ist. Sie hat festgestellt, dass das Protein in einer Nährlösung oder in Gel [14] als ein Nukleator oder Promotor agiert, indem bestimmte Domänen in Interaktionen mit Apatit-Nuklei oder -Kristallen involviert sind [52].

Anhand von Studien, die die verschiedenen Zeitpunkte der Gen-Expression der Matrixproteine untersuchen, kann gezeigt werden, dass Bone Sialoprotein als später Marker von bereits reiferen Osteoblasten expremiert wird [41]. Der Peak des mRNA-Levels wird kurz vor dem Einsetzen der Mineralisation registriert [20, 54].

Roach [80] lokalisiert Bone Sialoprotein überwiegend im Bereich der Mineralisationsfront und leitet daraus dessen Notwendigkeit für die Initiation der Knochenmineralisation ab.

Alford et al. [3] können in ihrer Studie Interaktionen von Bone Sialoprotein mit Collagen, Hydroxylapatit und Kalzium nachweisen. In weiteren Studien wurden eine Domäne für die Bindung an Collagen-Typ I gefunden und der Mechanismus der Interaktion charakterisiert [97]. Demnach sei die Bindung von Bone Sialoprotein an Collagen für die Initiation der

Knochenmineralisation und die Adhäsion der Osteoblasten zur mineralisierten Matrix entscheidend.

1.3.2 Collagen-Typ I

Collagen-Typ I ist das anteilmäßig am stärksten vertretene Strukturprotein der Knochenmatrix und bildet nahezu 90% der organischen Komponente [9, 20], wodurch seine entscheidende Rolle in der Struktur und Funktion des Knochengewebes verdeutlicht wird [107].

Es besteht aus drei Peptidketten (Protocollagen), die durch Hydroxylierung von Prolin- und Lysinresten und Glykosylierung entstandener Hydroxylysinreste modifiziert werden, bevor sie sich durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zur Tripelhelix zusammenlagern und als Procollagen in den Extrazellularraum ausgeschleust werden. Dort erfolgt nach Abspaltung C- und N-terminaler Propeptide die spontane Aggregation zu Collagenfibrillen (self-assemble-System), die durch Kondensationsreaktionen inter- und intramolekular vernetzt werden [9].

Bradt et al. [16], die in ihrer Studie die Mineralisation von Collagen *in vitro* untersuchen, beschreiben eine mit der Formation der Mikrofibrillen assoziierte Steigerung der Trübheit des Netzwerks.

Allgemein kann eine typische Abfolge der Knochenbildung beobachtet werden: Nach der Biosynthese und extrazellulären Anordnung des Netzwerks aus faserartigem Collagen I schließt sich die Mineralisation an, indem sich Apatitkristalle entlang der Längsachse der organischen Faser anordnen [33, 105].

Collagen-Typ I war das erste Matrixmolekül, von dem man annahm, Mineralablagerungen zu unterstützen [71]. Spätere Studien zeigen jedoch, dass Collagen ohne das Vorhandensein weiterer assoziierter Matrixproteine [94] oder nach enzymatischer Dephosphorylierung [31] seine Fähigkeit, Apatitablagerungen zu veranlassen, verliert.

Da Collagen I wesentliche Erfordernisse, wie z.B. eine hohe Affinität für die präzipierenden Ionen oder Komplementarität zwischen der molekularen Topographie und der Oberfläche des präzipierenden Minerals, nicht erfüllt, agiert es als Matrix, an die andere Nukleatoren binden können [41]. Während Collagen eine orientierende Matrix für Mineralablagerungen liefert, initiieren die nicht-collagenen Matrixmoleküle Mineralisation.

Da man heute annimmt, dass die Collagenfibrillen der Mineralisation als strukturelle Template dienen [15, 62, 63], ist es notwendig, dass die Formation der Fibrillen vor der Präzipitation des Kalziumphosphats stattfindet oder bereits zu einem Großteil abgeschlossen ist.

Als Produkt des Mineralisationsprozesses zeigt sich ein 3-dimensionales Netzwerk aus Collagenfibrillen, auf denen sich parallel nadelähnliche Kalziumphosphatkristalle mit einer Größe von über 100 nm ablagern [16, 33].

Anhand tierexperimenteller und Zellkultur-Studien kann gezeigt werden, dass Collagen zusätzlich zu seiner Rolle als Strukturbildner und Gerüstprotein der Extrazellulärmatrix auch direkten Einfluss auf Signalwirkungen und Aktivitäten innerhalb der Osteoblasten hat [107], wie z.B. Apoptose [108], Zellproliferation [47] und Differenzierung [68].

1.3.3 Osteonectin

Osteonectin, auch bekannt als SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), wurde als eines der ersten nicht-collagenen Proteine vor über 20 Jahren von John Termine entdeckt und postuliert, knochenspezifische Funktionen zu haben [107].

Das phosphorylierte Glykoprotein wird auch als „bone connector“ bezeichnet, da es eine hohe Affinität sowohl für Collagen, als auch für Mineral besitzt und theorisiert wird, ein knochenspezifischer Nukleator für Mineralisation zu sein [94]. In Studien zur Extrazellulärmatrix-Produktion *in vitro* kann Osteonectin sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen werden [30].

Hinsichtlich seiner Molekularstruktur besteht das Protein aus einer einzelnen Polypeptidkette, die aus vier verschiedenen Domänen zusammengesetzt ist [9] und zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen enthält [20].

Boskey [15] stellt in späteren Studien fest, dass Osteonectin Mineralablagerungen fördert, aber auch als sehr effektiver Inhibitor agieren kann [81] und ihm somit eine duale Rolle im Mineralisationsprozess zugeschrieben werden kann.

Da Osteonectin nur in geringer Menge in Regionen der *de novo* Mineralisation gefunden wird und erst in einer relativ späten Phase in der Matrix vorhanden ist, scheint seine Beteiligung an der Initiation der Kristallformation unwahrscheinlich [80].

In Lösung verhindert Osteonectin ein überschießendes Wachstum der Hydroxylapatit-Kristalle, indem es Wachstumsstellen blockiert und so exzessiver Mineralisation vorbeugt [28]. Das Protein wird deshalb auch als „Negativ-Regulator“ des Kristallwachstums bezeichnet [80].

Roach [80] kann Osteonectin nicht in Bereichen der initialen Kristallformation, aber in signifikanter Menge in der vollständig mineralisierten Matrix nachweisen und untermauert die Funktion des Proteins als Kontrolleur von Größe und Geschwindigkeit der Mineralformation [90].

Lynch et al. [68] zeigen, dass die für Osteoblasten charakteristischen nicht-collagenen Proteine Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin im 3-dimensionalen Multilayer-System auf einem höheren Level expremiert werden als in der Monolayer-Kultur. Der Expressions-Level der mRNA ist für Osteonectin nach neun Tagen 2,5-fach höher als im 2-dimensionalen System.

1.4 Das Knochenmineral

Knochen ist ein komplexes Gewebe, das neben verschiedenen Zelltypen und einer extrazellulären Matrix, die durch ein hoch mineralisiertes Netzwerk aus Collagen-Typ I charakterisiert wird, auch verschiedene anorganische Hartsbstanzen enthält.

Humaner Knochen besteht zu 50-60% aus biologischem Apatit, zu 30-40% aus Collagen und zu etwa 10% aus Wasser [33]. Im Folgenden werden die grundlegenden Daten über die chemische Zusammensetzung des Hartgewebes Knochen und des darin enthaltenen Hydroxylapatits ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) aufgeführt: Die anorganische Phase des Knochens enthält 34,8 Gew.-% Kalzium, 15,2 Gew.-% Phosphor, 0,9 Gew.-% Natrium, 0,72 Gew.-% Magnesium, 0,03 Gew.-% Kalium, 7,4 Gew.-% Carbonat, 0,03 Gew.-% Fluorid, 0,13 Gew.-% Chlorid und 0,07 Gew.-% Pyrophosphat. Das molare Verhältnis von Kalzium zu Phosphat beträgt 1,71. Hydroxylapatit, das den Hauptbestandteil des Knochens bildet und aus rein anorganischen Komplexverbindungen besteht, enthält 39,6 Gew.-% Kalzium und 18,5 Gew.-% Phosphor. Das molare Ca: P-Verhältnis beträgt 1,67 [33, 66, 21].

Verschiedene makromolekulare Faktoren wurden favorisiert, in die Regulation der Mineralnukleation involviert zu sein [13, 42, 46], konnten aber nie exakt definiert werden.

Heute geht man davon aus, dass die biogenetische Formation der Mineralkristalle ein mehrstufiger Prozess ist, in den verschiedene Elemente oder Komponenten, wie z.B. Kalzium, Kalium oder Phosphor involviert sind und der von einem Vorläufergewebe, geformt von Proteinen der Extrazellulärmatrix (überwiegend Collagen I) bis zu einem mineralisierten Gewebe führt, dessen Hauptbestandteil Hydroxylapatit darstellt [26].

Von Kalium wird angenommen, eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Nukleation zu spielen und unkontrollierte Mineralisation, insbesondere während der initialen Phase der Kalziumphosphat-Präzipitation, zu verhindern [25, 26, 103].

Wiesmann et al. [103], die sich mit der Frage beschäftigen, ob bestimmte Elemente in die Initiation oder Regulation der Mineralnukleation des Dentins involviert sind, können an der Mineralisationsfront Mikroareale mit einer Co-Anreicherung von Phosphor und Kalium als direkte Vorstufe von Mineral nachweisen. Simultan mit dem Beginn der Kalzium-Anreicherung und der nachfolgenden Apatitformation, nimmt der Anteil an Kalium in diesen Bereichen signifikant ab. Diese Ergebnisse implizieren, dass Kalium in den Beginn bzw. die Vorbereitungen der Mineralisation involviert ist, indem es mit den Makromolekülen der Matrix interagiert und unkontrollierte Apatitablagerungen verhindert [25, 26].

Nach Abschluss der „Vorbereitungen“ für eine geordnete Mineralnukleation und nach Aktivierung des Matrixsystems kann eine Phosphat- und Kalzium-Akkumulation registriert werden [103].

Höhling et al. [50], die in ihrer Studie untersuchen, welche Makromoleküle der Matrix innerhalb oder an der Oberfläche der Matrixvesikel zu Beginn der Kristallformation dominieren, weisen im Bereich der Mineralnoduli hohe Anteile an Phospholipiden, Kalzium und Phosphat nach. Sie können zeigen, dass Kalzium- und Phosphatgruppen in den mineralisierenden Bereichen („active sites“) akkumuliert werden und Kristallnuklei bilden, die zu Nanometer großen Partikeln heranwachsen.

Auch von Magnesium nimmt man an, in den Mineralisationsprozess von Knochen und Zähnen involviert zu sein. Verschiedene *in vitro* Studien haben gezeigt, dass Magnesium den Mineralmetabolismus indirekt über enzymatische und andere Reaktionen beeinflusst, wie z.B. als Co-Faktor die Aktivierung der alkalischen Phosphatase [4] und direkt Effekte auf den Kristallisationsprozess der anorganischen Mineralphase ausübt, indem es Einfluss auf die Kristallgröße und die Ausdehnung des Gitterwerks nimmt [6, 11, 65, 96]. Dennoch blieb die exakte Rolle von Magnesium in der Biomineralisation des Hartgewebes lange unklar.

Wiesmann et al. [101] untersuchen die Verteilung und Ablagerung von Magnesium in neu geformten Biomineral und können einen hohen Gehalt im Bereich der Wachstumslinien, bzw.

der Mineralisationsfront nachweisen, während sich in davon entfernten Regionen eine eher homogene Verteilung von Magnesium zeigt. Die Ablagerungen während der initialen Phase der Mineralformation implizieren, dass Magnesium als wichtiger Co-Faktor agiert und die Größe der Apatitkristalle beeinflusst oder sogar kontrolliert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

- **Zellen:** primäre bovine Osteoblasten-ähnliche Zellen aus dem Periostgewebe vom Metacarpus frisch geschlachteter Rinder
- **Nährmedien:**
 - MM0: High Growth Enhancement Medium (High-GEM, ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) + 10% fetales Kälberserum + 250 µg/ml Amphotericin B + 10.000 IU/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin + 200 mmol/l L-Glutamin (Biochrom KG seromed®)
 - MM1: MM0 + 10 mmol/l β-Glycerophosphat + 25 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
 - Endothelial Cell Growth Medium: 0,4% ECGS/H + 2% fetales Kälberserum + 0,1 ng/ml Epidermal Growth Factor + 1 µg/ml Hydrocortison + 1ng/ml basic Fibroblast Factor + 50 ng/ml Amphotericin B + 50 µg/ml Gentamicin; (gebraucht, P0, PI oder PII) (Promo Cell GmbH, Heidelberg)
- BSA (Bovine Serum Albumin) (International British Bio Cell)
- Collagenase (0,04%-ig) (Biochrom KG seromed®)
- Earl's-Salzlösung
- Ham's F10-Medium (Biochrom KG seromed®)
- HEPES-Puffer (Biochrom KG seromed®)
- Dibromol® Tinktur gefärbt (Trommsdorf GmbH & co.)
- Methanol
- PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) / Sörenson-Puffer (4,0 g NaCl + 0,10 g KCl + 0,10 g KH₂PO₄ + 0,72 g Na₂HPO₄ x H₂O + aqua dest. ad 500 g)
- TBST (Tris Buffered Saline mit 0,1% Tween 20)
Tyrode-Lösung (Kalzium- und Magnesium-frei)
- 3D Collagen Cell Culture System (1 Kit) mit Collagenlösung (5X RPMI Medium, 5X M 199 Medium, 5X Dulbecco modified Eagle medium (DMEM Medium), 5X PBS mit Phenolrot, Neutralisationslösung) (Chemicon)
- SERVA Detergent 7x ®, (Serva Electrophoresis, Heidelberg)

2.1.2 Substanzen für die Analyse

a) Lösungen für die immunhistochemische Färbung

- Blocking agent PBS - 1% BSA: 100 mg Bovine Serum Albumin (International British Bio Cell) in 10 ml PBS-Puffer oder 1 g BSA in 100 ml PBS-Puffer
- DAKO® Fluorescent Mounting Medium (enthält 15 mM NaN₃) (DAKO Corporation, Carpinteria, USA)
- Methanol
- Paraformaldehyd-Lösung: 0,4 g Paraformaldehyd in 10 ml Aqua dest. + 1 Plätzchen Natrium-Sodiumhydroxid bei 50°C aufwärmen bis Lösung homogen und klar (Merck KGaA, Darmstadt)
- PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) / Sörenson-Puffer
- Triton X-100-Lösung: 100 µl 0,1%-iges Triton X-100 (Octylphenol-polyethyleneglycolether) in 100 ml Aqua dest. (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

b) Antikörper für die immunhistochemische Färbung

- Anti-Actin monoclonal (Sigma, Taufkirchen; Art.-Nr. A4700)
- Anti-Bone Sialoprotein, polyclonal (ImmunDiagnostik GmbH, Bensheim; Art.-Nr. A222)
- Anti-Collagen Typ I, polyclonal (Bio Trend Chemikalien GmbH, Köln; Art.-Nr. 2150-0510)
- Anti-Fibronectin, polyclonal (Bio Trend Chemikalien GmbH, Köln; Art.-Nr. 4470-3589)
- Anti-Osteonectin, monoclonal (TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japan; Art.-Nr. M124)
- Alexafluor 488 Goat-anti-mouse IgG (H+L) (MoBiTec, Göttingen; Art.-Nr. A11001)
- Alexafluor 488 Goat-anti-rabbit IgG (H+L) (MoBiTec, Göttingen; Art.-Nr. A11008)

c) für die Kryopräparation

- Polystyrolkugeln (\varnothing 7 μ m) (Duke Scientific Corporation; Art.-Nr. 4207A)
- Propan (flüssig)
- Stickstoff (flüssig)

d) Geräte

- CO₂-Inkubator (Heraeus Instruments, Düsseldorf)
- Computer Counter-System CASY® I
(Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen)
- Deckgläser (18 mm x 18 mm) (Menzel-Glaser)
- Excimer-Laser LPF 120 (Lambda Physik)
- Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging
(Carl Zeiss Vision GmbH, Göttingen)
- Filtersätze 01 (Anregung im Bereich zwischen 359 bis 371 nm) und 31
(Anregung im Bereich zwischen 550 bis 580 nm),
(Carl Zeiss Vision GmbH, Göttingen)
- Kamera Axio Cam HR Version 5.05.10 (Carl Zeiss Vision GmbH, Göttingen)
- Lichtmikroskop Diaphot-TMD (Nikon Kogaku K.K., Tokyo, Japan)
- Objektträger (76 mm x 26 mm)
(Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edremünde)
- Polystyrol-Kulturschalen (13,5 cm Durchmesser)
(Nunc®, Apogent Company, Roskilde, Dänemark)
- Polystyrol-24er-Kulturwells (Falcon®, Becton Dickinson Labware, NY, USA)
- Silizium-Wafer (7 mm x 9 mm) mit einer Leitfähigkeit von 0,138 S/cm
- Spiegelreflexkamera Nikon 801 (Nikon Kogaku K.K., Tokyo, Japan)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R (Karl Willers Laborbedarf OHG, Münster)

e) Computerprogramme

- Bildbearbeitungs- und Analysesystem Axio Vision 3.1
- Bildverarbeitungsprogramm Thumbs Plus 2002-R
(Phillip Crews & Roger Johnson, Cerious Software, Inc. Und ASX, Inc.)
- Bildbearbeitungsprogramm Microsoft Photo Editor 3.0.2.3
- Windows 2000 Professionell

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellpräparation erfolgt entsprechend einer 1977 von Jones und Boyde [56] beschriebenen und 2000 von Hartig [49] weiterentwickelten Methode, die auf der Fähigkeit der Osteoblasten beruht, unter geeigneten Kulturbedingungen aus Gewebestücken auszuwachsen. Periostgewebe vom Metakarpalknochen frisch geschlachteter Kälber dient dabei als Ausgangsmaterial dieser Auswachsmethode.

Die Kälberbeine werden einmal wöchentlich von einem hiesigen Schlachthof bezogen und wenige Stunden nach Tötung der Tiere präpariert. Unter normalen Laborbedingungen wird zunächst die Entfernung von Fell und Hufen vorgenommen (*Abb. 1a*) und die Beine anschließend gründlich mit Wasser abgespült. Die Desinfektion erfolgt mit Hilfe einer jodhaltigen Tinktur (Dibromol® Tinktur). Nach Entfernung der Sehnen und des dem Periost aufliegenden Weichgewebes mit Skalpell und Pinzette unter sterilen Bedingungen wird das Bein mit 0,9%-igem NaCl gewaschen. Anschließend wird das freiliegende Periost im Bereich der Metaphyse in Längsrichtung in schmale Streifen geschnitten und unter aseptischen Kautelen vom Knochen abgezogen (*Abb. 1b*). Die Perioststreifen werden mehrmals gründlich in 37°C warmer Earl's Salzlösung gewaschen und in etwa 5 mm x 5 mm große Stücke unterteilt. Dann werden jeweils 15 bis 20 Perioststücke mit der osteogenetischen Seite (dem Knochen zugewandte Seite) nach unten in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 13,5 cm gelegt. Um ein Ablösen der Perioststücke bei Zugabe des Nährmediums zu vermeiden, muss eine kurze Anhaftungszeit an den Polystyrolboden der Kulturschale von etwa 20 Minuten eingehalten werden. Danach können sie mit je 20 ml 37°C warmem Nährmedium versorgt werden (*Abb. 1c*).

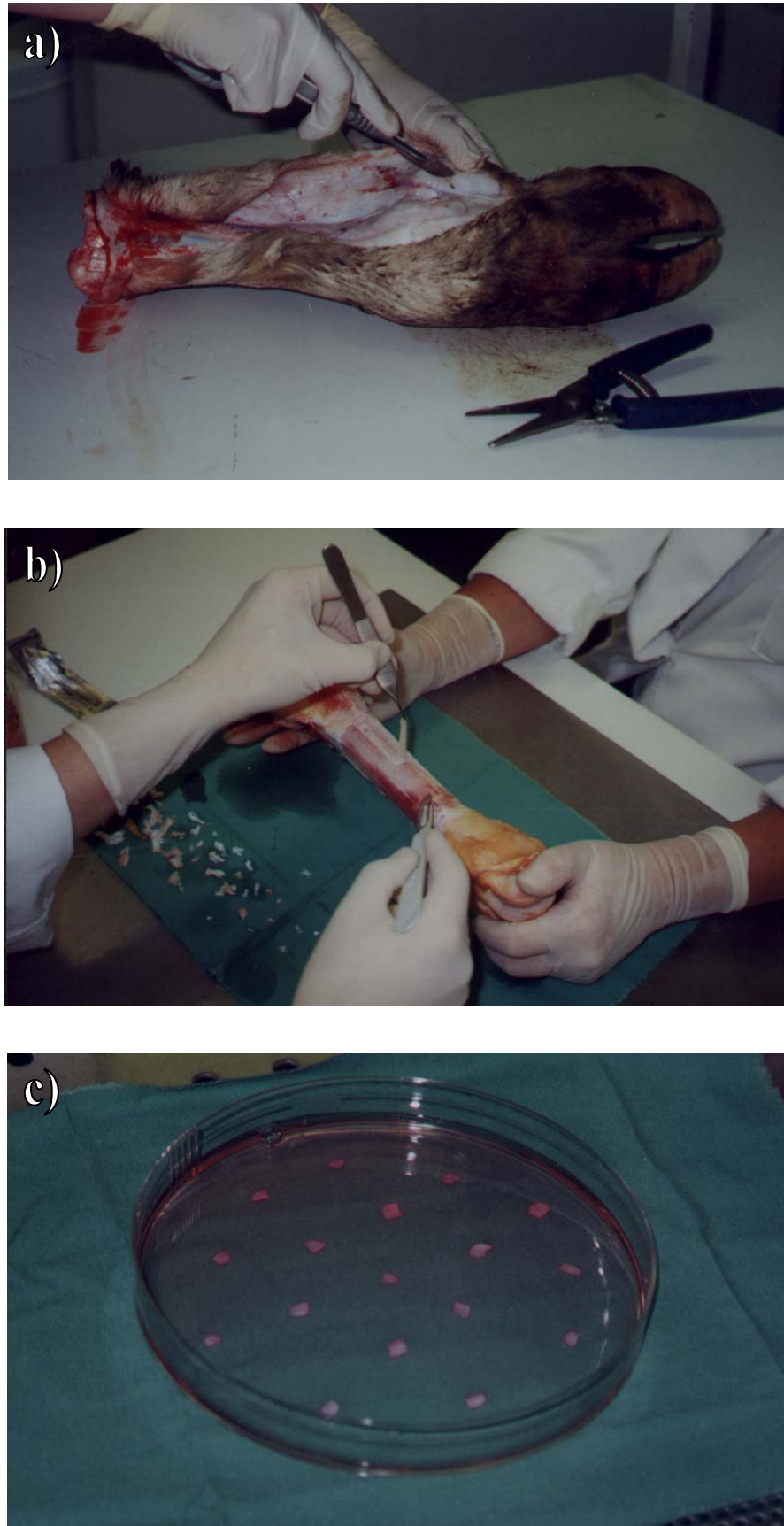


Abbildung 1a-c: Knochenzellgewinnung aus Perioststücken vom bovinen Metakarpalknochen: a) Kälberbeine bei der Entfernung von Fell und Hufen, b) Abziehen eines in Längsrichtung geschnittenen Perioststreifens von der Metaphyse, c) in Kulturschale ausgelegte 5 mm x 5 mm große Perioststücke nach Zugabe des Nährmediums

Als Nährmedium dient das im Folgenden als „MM0-Medium“ bezeichnete Medium, das überwiegend aus dem kommerziell erhältlichen Standardmedium „High Growth Enhancement Medium“ (High-GEM, ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) besteht, dem jeweils weitere Zusatzstoffe, Antimykotika und Antibiotika zugesetzt werden (s. *Tab. 1, S. 20*). Der Mediumwechsel erfolgt einmal pro Woche, indem das alte Medium mit einer Wasserstrahlpumpe vollständig abgesaugt und durch frisches MM0-Medium ersetzt wird. Die Inkubation der Zellen wird in einem CO₂-Inkubator bei einer Temperatur von 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5% durchgeführt. Die Kulturbedingungen und die Zellproliferation werden regelmäßig durch ein Lichtmikroskop (Diaphot-TMD, Nikon Kogaku K.K., Tokyo, Japan) kontrolliert. Die Entnahme der Perioiststücke kann je nach Proliferation der Zellen nach 2 oder 3 Wochen vollzogen werden.

Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers nach ungefähr 3 - 5 Wochen können die Zellen passagiert und für weitere Versuchszwecke verwendet werden. Dazu müssen die dem Polystyrolboden anhaftenden Zellen vorsichtig abgelöst und in neue Kulturschalen umgesiedelt werden. Das Nährmedium wird hierzu abgesaugt und die Zellschicht für 20 Minuten bei 37°C mit 0,4 g Collagenase und 98,8 mg Ham'scher Lösung F10 in 10 ml HEPES-Puffer (Biochrom KG seromed®) inkubiert und danach mehrere Male mit ca. 8 ml PBS gewaschen. Nach nochmaliger 15-minütiger Inkubation mit Kalzium- und Magnesiumfreier Tyrode-Lösung, die 300 mg Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) in 1000 ml NaCl-Lösung mit 200 mg KCl, 8 g NaCl, 1 g NaHCO₃, 50 mg NaH₂PO₄, und 1000 mg Glukose enthält, können die Zellen mit einer Pipette vom Schalenboden abgespült und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen gegeben werden. Aus diesem werden 100 µl der Zellsuspension entnommen und mit 10 ml CASYton in ein anderes Gefäß gegeben, um mit Hilfe des Computer Counter Systems (CASY®I Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen) die Zellzahl und die Zellgrößen-Verteilung bestimmen zu können.

Dazu zentrifugiert man die Zellen im Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei 500 U/min und einer Temperatur von 20°C und zählt zeitgleich die Zellen im anderen Gefäß mit dem CASY-I-Gerät. Nach Absaugen des Tyrode-Überstandes wird das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Anschließend können die Zellen in definierter Zellkonzentration auf den in 24er Wells angeordneten Siliziumwafern ausgesiedelt werden.

2.2.2 Versuchsaufbau

2.2.2.1 Vorbereitung der Versuchsträger

Die Zellkulturen werden auf Substraten ausgesiedelt, auf denen sie sich vermehren können. Bei den verwendeten Substraten handelt es sich um Siliziumträger, p-dotierte Wafer mit einer Leitfähigkeit von 0,1385 S/cm und einer Größe von 7 mm x 9 mm x 1 mm. Eine Seite der Wafer ist aus herstellungstechnischen Gründen poliert und somit glatt-spiegelnd, die andere unpolierte Seite ist rau und matt.

Die Versuchsträger werden zunächst gründlich mit destilliertem Wasser und einem speziellen, für die Zellkultur geeigneten Detergentium (SERVA Detergent 7x®, Serva Electrophoresis, Heidelberg) gewaschen, 15 min in einem Becherglas mit 70%igem Alkohol gereinigt und nach Absaugen des Alkohols in dem lose verschlossenen Becherglas autoklaviert.

Vor der eigentlichen Aussiedlung der Zellen werden die in den 24er Wells angeordneten autoklavierten Siliziumwafer zunächst für 4 Tage mit MM0-Medium bedeckt und im CO₂-Inkubator gelagert, um günstige Voraussetzungen für die anschließende Kultivierung der Zellen zu schaffen. Das MM0-Medium wird direkt vor der Zellaussiedlung abgesaugt.

Für Mineralisations-Experimente ersetzt man das MM0-Medium durch ein im Folgenden als „MM1-Medium“ bezeichnetes Nährmedium, dem neben den oben beschriebenen Komponenten des MM0-Mediums zusätzlich 10 mmol/l frisches β -Glycerophosphat und 25 μ g/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zugefügt wird (*s. Tab. 1, S. 20*).

Die aus dem Rindermetacarpusperiost ausgewachsenen Primärzellen werden mit Collagenase vom Boden der Kulturschalen abgelöst und in einer definierten Zelldichte zusammen mit dem Nährmedium MM1 in den 24er Wells auf den Silizium-Trägern ausgesiedelt.

Für eine spätere Analyse der Expression der knochenspezifischen Proteine Actin, Bone Sialoprotein, Fibronectin, Collagen-Typ I und Osteonectin werden die Zellen sowohl in zweidimensionaler als auch in dreidimensionaler (in Collagengel) Anordnung auf den Siliziumproben ausgesiedelt und über einen Zeitraum von insgesamt 5 Wochen kultiviert.

Die Analyse der Syntheseraten der Proteine erfolgt mit Hilfe von Immunfluoreszenz in Abständen von einem Tag, einer, zwei, drei und fünf Wochen und mittels Laser-SNMS nach einer Kultivierungsdauer von zwei und fünf Wochen, um Resultate über die Kapazität ossärer Mineralisationsvorgänge *in vitro* zu erhalten. Die Kulturbedingungen werden routinemäßig kontrolliert, die Zellproliferation kann jedoch aufgrund der Anordnung auf den Siliziumproben nicht durch ein Lichtmikroskop beobachtet werden.

2.2.2.2 Zellaussiedlung in 2-dimensionaler Anordnung

Für die Monolayer-Studie werden nur Zellen der ersten Passage verwendet. Die Zellen werden in insgesamt fünf 24er Kulturwells à 12 Siliziumproben auf der polierten Seite der Wafer ausgesiedelt.

Als Aussaat-Konzentration wird die Konzentration der zugegebenen Zellsuspension [Zellen/ml] angegeben, da meist nicht alle Zellen nach der Aussiedlung an dem Polystyrolboden der Kulturschale bzw. dem Siliziumwafer anhaften. Die Aussaat erfolgt bei den Mineralisationsexperimenten in hohen Konzentrationen (6.840.000 Zellen in 1 ml MM1). Pro Probe verwendet man 10 μ l MM1, was zu einer konfluenten Verteilung der Zellen führt (114.000 Zellen pro Silizium-Wafer, bzw. 60.000 Zellen/cm²). Eine regelmäßige lichtmikroskopische Überwachung der Kulturen unterbleibt aufgrund der Lichtundurchlässigkeit der Silizium-Wafer.

Pro Siliziumträger werden 1ml MM1 (reines Nährmedium) hinzugefügt (Abb. 2). Das Nährmedium MM1 enthält neben dem bekannten MM0 als Zusatz β -Glycerophosphat als externen Phosphatlieferanten und Ascorbinsäure. Die Kultivierung der Zellen findet in einem CO₂-Inkubator bei 100% Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% statt.



Abbildung 2: 24er Kulturwell mit Siliziumwafern und Nährmedium MM1

Um eine noch schnellere Mineralisation zu erzielen, wird dem MM1-Medium nach dem ersten Tag zusätzlich gebrauchtes „Endothelial Cell Growth Medium“ (ECG-Medium, PromoCell GmbH, Heidelberg) (P0, PI oder PII) im Verhältnis 2 : 1 zugefügt, das sich aus

0,4% ECGS/H, 2% fetalem Kälberserum, 0,1 ng/ml Epidermal Growth Factor, 1 µg/ml Hydrocortison, 1 ng/ml basic Fibroblast Factor, 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamicin zusammensetzt (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Bezeichnung, Zusammensetzung und Verwendungszweck der verschiedenen Nährmedien

BEZEICHNUNG	BESTANDTEILE	VERWENDUNGSZWECK
MM0	High-GEM + 10% fetales Kälberserum + 250 µg/ml Amphotericin B + 10.000 IU/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin + 200 mmol/l L-Glutamin	Kulturmedium zur Aufzucht der Primärzellen
MM1	MM0 + 10 mmol/l β-Glycerophosphat + 25 µg/ml Ascorbinsäure	$\frac{2}{3}$ des Kulturmediums für das Mineralisationsexperiment
ECG-Medium	0,4% ECGS/H + 2% fetales Kälberserum + 0,1 ng/ml Epidermal GrowthFactor + 1 µg/ml Hydrocortison + 1 ng/ml basic Fibroblast Factor + 50 ng/ml Amphotericin B + 50 µg/ml Gentamicin	$\frac{1}{3}$ des Kulturmediums für das Mineralisationsexperiment

Die Präparation der Endothelzellen dafür erfolgt anhand von Endothelstücken menschlicher Nabelvenen unter sterilen Kautelen. Anschließend werden die Zellen 2 Wochen in Endothelial Cell Growth Medium bei wöchentlichem Mediumwechsel kultiviert und können dann für weitere Versuchszwecke passagiert werden. Dem MM1-Medium fügt man ausschließlich das gebrauchte Endothelial Cell Growth Medium von Endothelzellen der Passage 0, I oder II im Verhältnis 1: 2 zu.

Der Wechsel dieses im Folgenden als „Kombinationsmedium“ bezeichneten Mediums wird wöchentlich durchgeführt, indem das alte Medium vollständig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch neues MM1-Medium, ergänzt durch ECG-Medium, ersetzt wird. Die Zusammensetzung und der Verwendungszweck der Kulturmedien sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Da die Syntheseleistung der Zellen bezüglich der extrazellulären Matrix in diesem Fall nicht anhand der lichtmikroskopischen Beobachtung der Zellmorphologie, des Zellzahlanstiegs und der Größenprofile der Zellpopulationen charakterisiert werden kann, erfolgt in Abständen von einem Tag, einer Woche, zwei, drei und fünf Wochen eine Immunfluoreszenzfärbung, sowie nach zwei und fünf Wochen eine Kryofixierung von jeweils $n = 12$ Proben.

Nach entsprechender Kultivierung werden jeweils $n = 6$ Proben fixiert, geblockt und mit entsprechenden Antikörpern inkubiert (s. Kapitel 2.2.3.1, S. 25), um mittels Fluoreszenzmikroskopie einen qualitativen immunhistochemischen Nachweis der verschiedenen extrazellulären Matrixproteine der einzelnen Zellpopulationen für die jeweiligen Kultivierungszeiträume zu erbringen.

Zum weiteren Nachweis der Biomineralbildung als wesentlichen Punkt der Syntheseleistung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen werden die weiteren $n = 6$ Proben zu den entsprechenden Zeitpunkten in Zusammenarbeit mit dem physikalischen Institut in einem Kryopräparationsprozess vorbereitet und anschließend mittels Laser-SNMS analysiert (s. Kapitel 2.2.4, S. 29-40).

2.2.2.3 Zellaussiedlung in 3-dimensionaler Anordnung

Mit Hilfe der dreidimensionalen Anordnung von Zellkulturen wird versucht, die Monolayertechnik zu ergänzen und neue Ansätze, was die Anwendbarkeit von Zellkulturen in bestimmten Bereichen betrifft, hinzuzugewinnen [105]. Dabei gibt es verschiedene Ansätze, um das Ziel, dreidimensionale Gewebe aus vereinzelt Zellen zu gewinnen, zu erreichen.

In diesem Experiment wird die Tatsache ausgenutzt, dass Zellen z.B. eingebunden in ein Collagengemisch nicht nur in einer Schicht wachsen, sondern dass man, geeignete Bedingungen vorausgesetzt, auch eine 3-dimensionale Anordnung von mehreren Schichten von Zellen wie ein Sandwich aufbauen kann [67]. Unter den dreidimensionalen Kulturbedingungen in Collagengelen wird eine bessere Differenzierung und eine gute Fibronectin- und Collagen-Typ I-Expression der Zellen erwartet.

Für die Collagengelpräparation wird ein 3D Collagengel Zellkultur Kit (Chemicon) verwendet. Das Kit beinhaltet Collagen-Lösung, 5X RPMI Medium, 5X M199 Medium, 5X Dulbecco modified Eagle medium (DMEM Medium), 5X PBS mit Phenolrot und Neutralisationslösung. Das Volumen an Collagen ist darauf abgestimmt, eine Konzentration von 80% zu erhalten und dabei einen neutralen pH-Wert und eine physiologische ionische Zusammensetzung vorzuweisen.

Alle Lösungen werden während der Präparation auf Eis gelagert. Das 5X Medium muss kompatibel zum verwendeten Zelltyp sein.

Das gewünschte Volumen der Collagengel-Lösung kann entsprechend der Tabelle 2 hergestellt werden:

Tabelle 2: Konzentrationsangaben der einzelnen Gesamtmengen bei der Collagengelpräparation

Gesamtmenge (ml)	Collagenlösung (ml)	5X PBS oder Medium (ml)	Neutralisationslösung (µl)
10	8	2	250
5	4	1	125
2,5	2	0,5	62,5
1	0,8	0,2	25
0,5	0,4	0,1	12,5

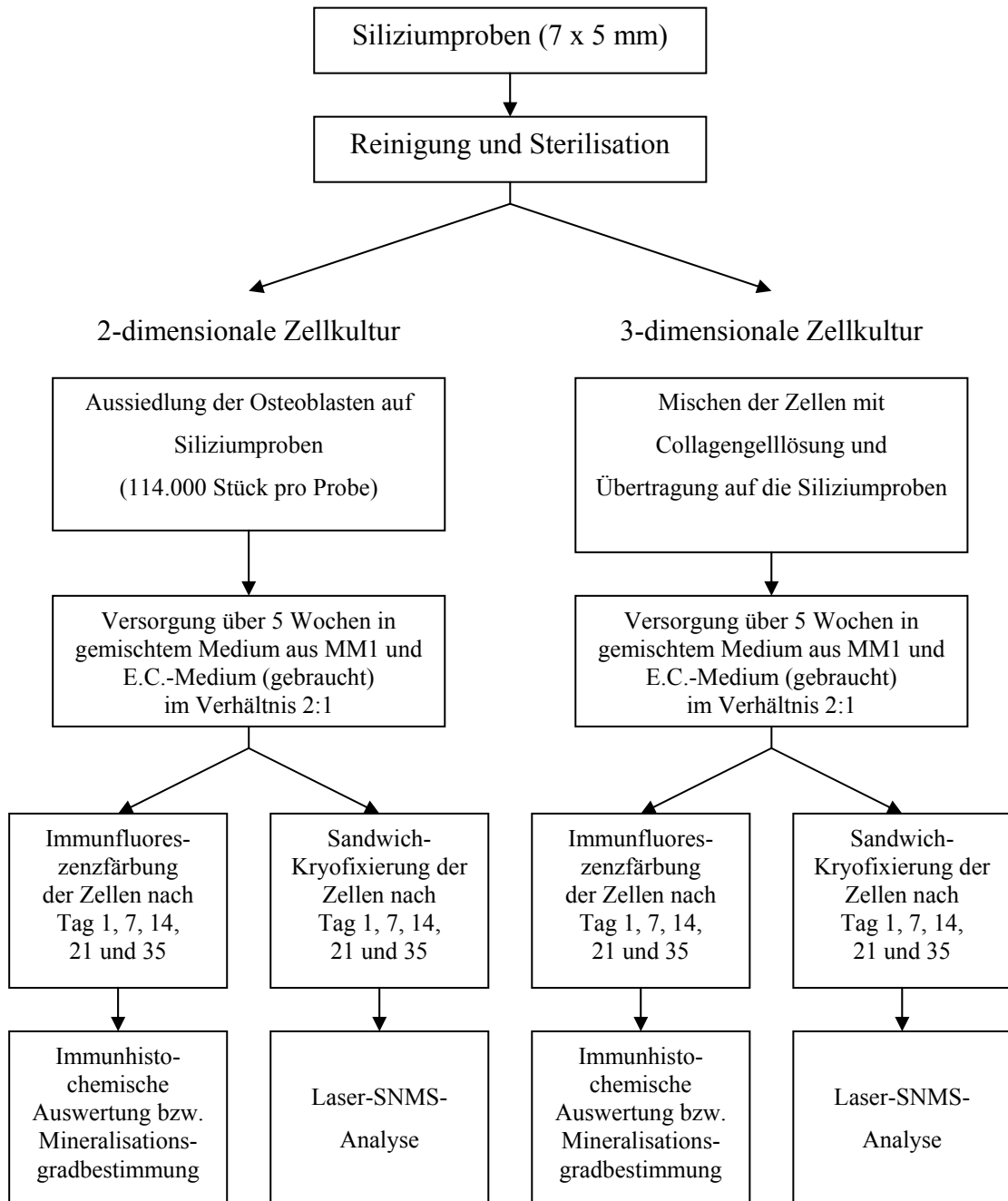
Im Fall des 3D-Versuchs benötigt man eine Gesamtmenge von 1 ml Collagengel und pipettiert entsprechend der Tabelle 0,8 ml Collagenlösung in ein steriles Zentrifugenröhrchen. Das analoge Volumen an 5X PBS oder DMEM Medium (0,2 ml) wird addiert und eine homogene Lösung gebildet, die sich dadurch gelb färbt. Nach Zufügen der Neutralisationslösung (25 μ l) wechselt die Farbe der Lösung ins Rötliche. Danach wird die Lösung, dessen pH neutral sein soll und anhand der Rotfärbung durch das Phenolrot im 5X Medium überprüft werden kann, für ca. eine Minute auf Eis gelagert.

Zu dieser gekühlten Lösung wird das gewünschte Volumen an Zelllösung (6.840.000 Zellen in 800 μ l MM1) hinzugefügt. Für die Präparation eines stabilen Gels ist zu beachten, dass der Anteil der Zelllösung am Gesamtvolumen nicht mehr als 10% beträgt, so dass zu Beginn der Versuchsreihe eine subkonfluente Zelldichte angestrebt wird. Nach erneuter Kühlung der Lösung für ca. eine Minute, werden davon für fünf Kulturwells à 12 Proben jeweils 15 μ l pro Silicium-Waver pipettiert. Die Inkubation der Zellen für zunächst zwei Stunden erfolgt bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre, die 5% CO₂ enthält, um die Polymerisation des Collagens zu initiieren. Erst nach der Formation und charakteristischen Eintrübung des polymerisierten Collagengels werden pro Probe ein Milliliter MM1 addiert und die Zellen kultiviert.

Die Kulturen werden wie auch bei der 2-dimensionalen Versuchsanordnung über fünf Wochen mit Kombinationsmedium versorgt und bezüglich des Matrixaufbaus und des Mineralisationsvorgangs analysiert.

Das nachfolgende Flussdiagramm (*Abb. 3*) gibt einen Überblick über den Versuchsablauf an den ausgesiedelten Primärzellen.

Abbildung 3: Flussdiagramm über die Abfolge und den zeitlichen Verlauf des Mineralisations-Experimentes in der 2- und 3-dimensionalen Anordnung



2.2.3 Analysemethoden (Fluoreszenzmikroskopie)

2.2.3.1 Immunhistochemische Färbung der 2-dimensionalen Zellkultur

Zur Beurteilung der Zellproliferation und Synthese der Extrazellulärmatrix dient der Nachweis der knochenspezifischen bzw. Extrazellulärmatrix-relevanten Proteine Actin, Bone Sialoprotein, Fibronectin, Collagen-Typ I und Osteonectin in der jeweiligen Zellprobe.

Zunächst wird der am Siliziumwafer haftende Zellmonolayer fixiert, indem das Kombinationsmedium mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Zellen dreimal für jeweils fünf Minuten mit kaltem PBS (Phosphate Buffered Saline / Sörenson-Puffer) gewaschen und über 20 Minuten mit -25°C kaltem, reinen Methanol bei -25°C im Tiefkühlfach fixiert werden. Anschließend werden die Proben erneut dreimal mit PBS gewaschen, um den Methanol-Rückstand zu entfernen. Die Fixierung ist hiermit abgeschlossen.

Nach Behandlung des Zellmonolayer für 15 Minuten mit einem Blockreagenz, bestehend aus einer frisch angesetzten 1%-igen BSA-Lösung mit PBS als Lösungsmittel (100 mg Bovine Serum Albumin (International British Bio Cell) in 10 ml PBS-Puffer oder 1 g BSA in 100 ml PBS-Puffer) erfolgt die Einwirkung der verdünnten Primärantikörper (*s. Antikörperliste, Kapitel 2.1.2, S. 13*). Das Hinzufügen von 1% Rinderserumalbumin erhöht die Proteinkonzentration und reduziert die unspezifische Färbung. Bei der indirekten Immunfluoreszenz inkubiert man die zu untersuchende Probe mit einem Antikörper, der verschiedene Antigene, bzw. das gesuchte Epitop spezifisch erkennt. Der PBS - 1% BSA-Überstand wird dabei vorsichtig mittels einer Glaspipette und einer angeschlossenen Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Über das Blockreagenz werden ebenfalls die Primärantikörper im Verhältnis 1:100 verdünnt. Je 1000 µl der Antikörperlösungen werden auf die Zellmonolayer der jeweiligen Siliziumträger pipettiert (*Abb. 4*). Ein Ineinanderlaufen der Lösungen wird dabei durch die Anordnung der Siliziumwafer im Kulturwell verhindert.



Abbildung 4: indirekte Immunfluoreszenz: Einwirkung der mit Blockreagenz verdünnten Primärantikörper

Im Anschluss an die 60-minütige Inkubationszeit bei 37°C saugt man die Antikörperlösungen ab und wäscht die Proben dreimal mit PBS. Dadurch werden alle überschüssigen Antikörper, die nicht an das Epitop gebunden haben, ausgewaschen. Im zweiten Schritt erfolgt unter bestmöglichem Lichtausschluss für weitere 60 Minuten die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der später als sichtbarer Marker für das Ausmaß der Proteinexpression der Osteoblasten-ähnlichen Zellen analysiert werden kann. Je nach Herkunft des Primärantikörpers ist der Sekundärantikörper speziell gegen den Fc-Teil des Maus- (Alexa Fluor 488 Goat-anti-mouse IgG) oder Kaninchen-Antikörpers (Alexa Fluor 488 Goat-anti-rabbit IgG) gerichtet (s. *Antikörperliste, Kapitel 2.1.2, S. 13*). Der Sekundärantikörper wird ebenfalls mit Blockreagenz im Verhältnis 1:100 verdünnt und trägt kovalent gebunden den Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoreszeinisothiocyanat). Zum FITC-Labeln werden von den Antikörperlösungen jeweils 300µl auf die analogen Siliziumproben im Kulturwell, passend zum jeweiligen host (Actin, Osteonectin und Collagen-Typ I (mouse): Goat-anti-mouse IgG; Fibronectin, Bone Sialoprotein und Collagen-Typ I (rabbit): Goat-anti-rabbit IgG) pipettiert. Zur Beseitigung des Überschusses an Sekundärantikörper werden die Proben danach erneut dreimal mit PBS und abschließend zweimal mit Aqua dest. gewaschen.

So vorbereitet entnimmt man die Wafer mit Hilfe einer Pinzette aus dem Kulturwell und positioniert sie auf insgesamt sechs gereinigten Objektträgern. Auf die Oberfläche der präparierten Zellen wird ein Tropfen DAKO® Fluorescent Mounting Medium (enthält 15 mM NaN₃, DAKO Corporation, Carpinteria, USA) (s. *Kapitel 2.1.2, S. 13*) aufgebracht und die Deckgläschen darüber gelegt (Abb. 5).



Abbildung 5: gemountete Siliziumwafer auf Objektträgern, vorbereitet zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse

Die Proben trocknen über Nacht bei Zimmertemperatur an einem lichtgeschützten Ort und können danach bei einer Temperatur von 4°C in einer mit Alufolie umhüllten Kulturschale gelagert werden.

Für die qualitative Auswertung der Färbung werden die so vorbereiteten Proteinstrukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich Matrixstrukturen und Mineralisation betrachtet, eingescannt und das digitale Bild mit dem Bildverarbeitungsprogramm Thumbs Plus 2002-R (Phillip Crews & Roger Johnson, Cerious Software, Inc. Und ASX, Inc.) am Rechner qualitativ ausgewertet. Die Intensität der Färbung gibt dabei das Maß für die Antigenmenge in der Probe an.

2.2.3.2 Immunhistochemische Färbung der 3-dimensionalen Zellkultur

Bei der 3-dimensionalen Versuchsanordnung werden die Zellen analog zur 2-dimensionalen fixiert, indem das Kombinationsmedium mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen dreimal für jeweils fünf Minuten mit kaltem PBS gewaschen werden. Anstelle von reinem Methanol wird jedoch in der 3-dimensionalen Zellkultur eine frisch präparierte Paraformaldehyd-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) verwendet.

Zur Herstellung dieser Lösung werden 0,4 g Paraformaldehyd in 10 ml Aqua dest. gelöst, ein Plätzchen Natrium-Sodiumhydroxid hinzugefügt und die Lösung bei einer Temperatur von 50°C erwärmt bis sie homogen und klar imponiert. Nach der 20-minütigen Paraformaldehyd-Fixierung werden die Zellen für zwei Minuten mit 0,1% Triton X-100 (Octylphenol-polyethyleneglycolether, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) permeabilisiert. Dazu

werden 100 µl 0,1%-iges Triton X-100 in 100 ml Aqua dest. gelöst und mit einem Rührstäbchen homogenisiert. Anschließend erfolgt erneut ein dreimaliges Waschen der Proben mit PBS. Die Proteinstrukturen werden mit dem Blockreagenz PBS - 1% BSA (s. *Kapitel 2.2.3.1, S. 25*) über einen Zeitraum von 15 Minuten geblockt. Analog zur 2-dimensionalen Versuchsanordnung werden die Siliziumproben erst mit Primär-, dann mit Sekundärantikörpern, die mit Blockreagenz im Verhältnis 1:100 verdünnt sind, inkubiert. Zwischen diesen Schritten und nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper werden die Proben mit PBS gewaschen. Abschließend werden die Träger zweimal mit Aqua dest. gewaschen und so der Überschuss an Sekundärantikörpern beseitigt. Das Positionieren der Wafer auf den Objektträgern, sowie das Mounten der Proben mit DAKO® Fluorescent Mounting Medium werden entsprechend der Beschreibung in *Kapitel 2.2.3.1, S. 25* durchgeführt.

Die Analyse der FITC-gelabelten Proteinstrukturen erfolgt im Vergleich mit der 2-dimensionalen Zellkultur anhand der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung.

2.2.3.3 Autofluoreszenzanalyse der 2- und 3-dimensionalen Zellkulturen

Zur genauen Analyse des in den Zellkulturen stattfindenden Mineralisationsprozesses wird innerhalb der 2- und 3-dimensionalen Versuchsreihe zusätzlich zu den immunhistochemischen Färbungen, jeweils eine Zellprobe der fünften Woche als Autofluoreszenz-Probe analysiert. Durch Betrachtung der FITC-gelabelten Proben mit Hilfe der Zeiss Filtersätze 01 (Anregung im Bereich zwischen 359 bis 371 nm) und 31 (Anregung im Bereich zwischen 550 bis 580 nm), (s. *Kapitel 2.1.2, S. 13*) lassen sich die von den Osteoblasten-ähnlichen Zellen synthetisierten Mineralisationskeime mit Hilfe der entstehenden Autofluoreszenz nachweisen.

Für die Auswertung der Autofluoreszenz-Proben werden die Proteinstrukturen eingescannt und das digitale Bild mit dem Bildverarbeitungsprogramm Thumbs Plus 2002-R am Rechner ausgewertet. Die Intensität der Färbung gibt dabei das Maß für den Mineralisationsgrad an.

2.2.4 Analysemethoden (Laser-SNMS)

Um die Zellen im für die Laser-SNMS erforderlichen Vakuum analysieren zu können und das Innere der Zellen dem oberflächensensitiven Verfahren zugänglich zu machen, wird als Verfahren ein dreistufiger Kryopräparationsprozess, bestehend aus Kryofixierung, anschließendem Kryobruch und Gefriertrocknung, eingesetzt. Die Kryopräparation und die Laser-SNMS-Analysen werden in Zusammenarbeit mit Steffen Dambach, einem Mitarbeiter des Physikalischen Instituts der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, durchgeführt.

Ziel dieses Präparationsverfahrens zur Untersuchung von Zellen ist es, alle Stoffwechselprozesse zu beenden und gleichzeitig die strukturelle und chemische Integrität der lebenden Zellen zu erhalten. Weiterhin werden die Proben in einen stabilen Zustand gebracht, in dem sie auch unter Ultra-Hochvakuumbedingungen analysiert werden können.

Da Zellen zu mehr als zwei Drittel aus Wasser bestehen und sich dies für die Analyse im Vakuum als ungeeignet herausgestellt hat, gilt es, durch das gewählte Präparationsverfahren dieses Wasser aus den Zellkulturen zu entfernen, ohne dabei Schäden in der Struktur oder chemischen Verteilung der Komponenten herbeizuführen.

Parallel zu den verschiedenen Zeitpunkten der immunhistochemischen Färbungen in Abständen von einem Tag, einer Woche, zwei, drei und fünf Wochen werden die jeweils $n = 6$ Proben nach einer Kultivierungsdauer von zwei und fünf Wochen durch den Kryopräparationsprozess für die spätere Analyse mit Laser-SNMS vorbereitet.

2.2.4.1 Kryofixierung

Die Kryofixierung stellt eine Fixierungsmethode dar, bei der durch schnelles Einfrieren einer Probe die Erhaltung der momentanen Verteilung aller Komponenten in dem biologischen Gewebe gewährleistet wird. Für die Fixierung von entscheidender Bedeutung sind dabei vor allem die Prozesse, die sich während des Herunterkühlens abspielen. Durch den Wärmeentzug wird der Stoffwechsel in biologischen Systemen verlangsamt, bis er letztendlich eingestellt wird. Die $n = 6$ Proben werden mit Hilfe einer Pinzette für 5 Sekunden in durch flüssigen Stickstoff (-196°C) gekühltes Propan eingetaucht und dadurch rasch abgekühlt. Der starke Temperaturverlust bewirkt die Herstellung des amorphen Zustands des

Wassers. Dadurch werden die zerstörenden Folgen der Kristallisation im Zellinneren verhindert, was die Grundvoraussetzung für die Analyse im Vakuum darstellt.

Die einzelnen Präparationsschritte sind schematisch in *Abbildung 6* dargestellt. Als erstes werden den Zellkulturen Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von $7\ \mu\text{m}$, die sich in einer Pufferlösung befinden, als Abstandhalter hinzugegeben. Mit der Verwendung von Abstandhaltern wird gewährleistet, dass die Zellen im nächsten Präparationsschritt, bei dem die Kulturen im 90° -Winkel mit einem zweiten Siliziumwafer abgedeckt werden, nicht zwischen den Wafern zerquetscht werden. Um ein möglich rasches Abkühlen der Proben zu gewährleisten, wird dieses Sandwich zur Kryofixierung in durch flüssigen Stickstoff gekühltes Propan getaucht. Dabei werden mit Propan Kühlraten von $1,0 - 1,2 \cdot 10^4\ \text{K/s}$ erzielt, die notwendig sind, um das Wasser in den Proben in den amorphen Zustand zu versetzen.

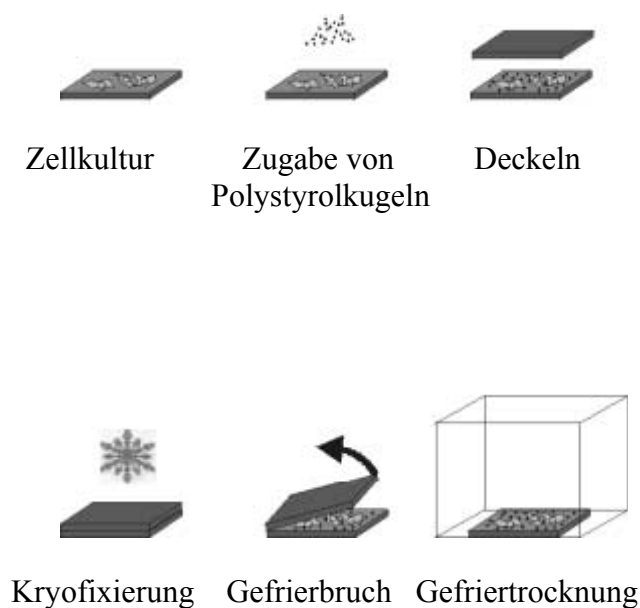


Abbildung 6: schematischer Ablauf der Kryopräparation

Bei der Bildung dieses amorphen Eises, einer nicht-kristallinen Form des Eises, setzt ein Phasenwechsel von flüssig nach fest ein. Dabei wird die an das Kühlmittel (Kryogen) abgegebene Wärme während des Eintauchvorgangs in das Kryogen durch Wärmeleitung von der Probe entfernt. Durch diesen Energietransfer steigt die Temperatur des Kryogens in der Umgebung der Probe an. Indem man die Probe innerhalb des Kryogens bewegt, wird die Wärmeleitung unterstützt und die erwärmten Moleküle durch kalte ersetzt. Die Kühlrate ist dabei so hoch, dass kein Kristallisationskeim die für das Kristallwachstum kritische Größe erreicht. Mit einer Kühlrate von 10^4 K/s an der Probenoberfläche ist es möglich, das Wasser bis zu einer Probentiefe von 45 μm in den amorphen Zustand zu versetzen [29]. Somit setzt keine Kristallisation ein und das Wasser erstarrt amorph.

2.2.4.2 Kryobruch

Im Anschluss an die Kryofixierung wird das Sandwich durch Gefrierbruch, d.h. durch ein Auseinanderbrechen der beiden Siliziumwafer bei einer Temperatur von 77 K, wieder voneinander getrennt. Die Zellkultur wird dazu unter flüssigem Stickstoff gebrochen und bis zum Einbringen in den Gefriertrockner unter LN_2 gehalten. Dadurch bildet sich eine Bruchebene in der gefrorenen Zellkultur aus und das Innere der Zellen wird freigelegt. Durch geeignete Wahl der Größe der Polystyrolkugeln erreicht man, dass die Zellen mittig durchgerissen werden. Die Verwendung von Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von 7 μm ermöglicht die Analyse der intrazellulären Bereiche mit SNMS. Da die Membran jedoch eine Sollbruchstelle darstellt, kann ein Teil der Zellen durch den Kryobruch nicht geöffnet werden. Der letzte Präparationsschritt besteht in der Gefriertrocknung.

2.2.4.3 Gefriertrocknung

Bei der Gefriertrocknung wird der Probe das darin vorhandene gefrorene Wasser bei entsprechenden Temperatur- und Druckbedingungen entzogen, ohne dass diese die flüssige Phase durchläuft. Zur Vermeidung eines Kollapses der organischen Matrix sollte bei der Entfernung des Wassers aus der Probe oberste Vorsicht gelten, um strukturelle Schäden oder Veränderungen der chemischen Zusammensetzung zu minimieren.

Der Trocknungszyklus der Gefriertrocknung erfolgt prinzipiell in zwei Stufen: In der Primärtrocknung wird das Eis durch Sublimation direkt vom festen in den gasförmigen Zustand überführt. Dies wird nur durch den, wenn auch geringen, Dampfdruck des Eises

möglich, so dass in einem System, dem ständig Wasserdampf entzogen wird, eine vollständige Überführung des Eises in Wasserdampf vollzogen werden kann. Dieser Entzug von Wasserdampf wird in der apparativen Gefriertrocknung zum einen durch die Herstellung eines Vakuums und zum anderen mittels Phosphorpentoxid erreicht, das bei Kontakt mit Wasserdampf eine chemische Reaktion eingeht. Die Primärtrocknung erfolgt bei einer Temperatur von 178 K.

Aufgrund der Möglichkeiten des von den Mitarbeitern des physikalischen Institutes verwendeten Gefriertrockners wird die Trocknung der Proben zunächst für zwei Stunden bei einer Temperatur von 153 K und einem Druck von 1 Pa betrieben. Die Restanteile des Wassers, die der Sublimation nicht zugänglich sind, werden in der Phase der Sekundärtrocknung bei höheren Temperaturen aus der Probe entfernt. Dabei handelt es sich überwiegend um die Wasserhülle, mit der die meisten Moleküle im lebenden Zustand zur Vermeidung des Zusammenklebens umgeben sind. Dazu werden die Proben für 20 Stunden bei 193 K getrocknet und die Temperatur anschließend innerhalb von zwei Stunden nach und nach auf Zimmertemperatur erhöht.

Obwohl bereits durch die Primärtrocknung mehr als 90% des Wassers entfernt werden, ist der Prozess der Sekundärtrocknung langwierig und dauert beinahe genauso lange wie der der Primärtrocknung. Der Grund hierfür liegt vor allem an den langen Diffusionswegen, die das Wasser durch die bereits getrocknete Struktur der Probe zurücklegen muss.

Unter trockener Atmosphäre (Eksikator) werden die Proben zur Analyseanlage transportiert und dort sofort wieder ins Ultrahochvakuum eingebracht, so dass die Verunreinigungen und auch die Wiederbedeckung mit Wasser so gering wie möglich gehalten werden.

2.2.4.4 Grundlagen von Laser-SNMS

Die Laser-SNMS stellt eine empfindliche Element- und Molekülanalyse biologischer Proben dar. Sie bietet mit ihrer hohen Massen- und Ortsauflösung, sowie ihrer hohen Oberflächensensitivität Voraussetzungen, Proteine schon in kleinen Mengen eindeutig nachweisen und lokalisieren zu können. Weiterhin ermöglicht sie eine Abbildung der Intensitätsverteilungen mit subzellulärer Auflösung.

Der erfolgreiche Einsatz des Verfahrens verlangt eine sorgfältige Präparation (s. Kapitel 2.2.4.1 – 2.2.4.3, S.29-32), die das Gewebe in seinem lebenden Zustand fixiert,

Analysen zugänglich macht und dabei die chemische und strukturelle Integrität des Gewebes bewahrt.

Der Analyseprozess der chemischen Zusammensetzung einer Oberfläche durch Sekundärionen- und Neutralteilchen-Massenspektrometrie lässt sich in die drei Prozessschritte Zerstäubung, Ionisierung und Analyse mit Hilfe eines Massenspektrometers unterteilen. Zunächst wird die Oberfläche der Probe durch Primärionenbeschuss mit Galliumionen von einigen keV und verwendeten Stromdichten von $< 10^{-6}$ A/cm² zerstäubt, wodurch sich aus den obersten Monolagen intrinsisch ionisierte Ionen und Neutralteilchen lösen. Die Laser-SNMS beschäftigt sich mit der Analyse der durch Anregung der Oberfläche entstehenden intrinsischen Prozesse, bzw. der emittierten Sekundärteilchen, bei denen es sich neben Photonen und Elektronen auch um Atome und Moleküle handelt. Eine detaillierte Zusammenstellung einzelner Modelle, die die intrinsische Ionisation beschreiben, ist bei Hagenhoff zu finden [48].

Zu dieser Emission probenspezifischer Teilchen und dem damit verbundenen Materialabtrag (Zerstäubung) kommt es nur, wenn die innerhalb der Probe durch Stoßkaskaden [86, 87] übertragene Energie größer ist als die Oberflächenbindungsenergie. Die Kaskaden breiten sich innerhalb von 10^{-12} s bis 10^{-11} s unabhängig voneinander um den Einschlag des Primärions aus und besitzen eine laterale Ausdehnung zwischen 5 nm und 10 nm [10]. Während ein geringer Anteil der Atome und Moleküle bereits durch intrinsische Prozesse ionisiert ist, liegt der Anteil der neutral emittierten Teilchen meist bei über 99%.

Eine massenspektrochemische Analyse der beim Beschuss einer Probenoberfläche mit Primärionen emittierten Sekundärteilchen ist nur bei geladenen Teilchen möglich. Während die intrinsisch ionisierten Sekundärionen mittels Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) direkt nach der Zerstäubung massenspektrochemisch untersucht werden können [24], müssen die emittierten Neutralteilchen bei der SNMS vor der Analyse separat nachionisiert werden (Ionisierungsprozess). In der Laser-SNMS wird der Ionisierungsprozess getrennt von der Zerstäubung durchgeführt. Unter der Voraussetzung, dass die Wahrscheinlichkeit der intrinsischen Ionisierung < 1 ist, findet der Ionisierungsprozess im Falle der SNMS unabhängig von der chemischen Zusammensetzung der Probenoberfläche statt. Seit der Entwicklung leistungsfähiger Laser hat sich dabei die Ionisation durch Photonen gegen andere Methoden durchgesetzt. Hierzu wird der Laserstrahl über der Probe eingespiegelt, so dass die Neutralteilchen, die sich dort nach dem Primärionenbeschuss befinden, mit Hilfe der Laserstrahlung die nötige Energie erhalten, um

ein Elektron abzugeben. Die so entstehenden Photoionen werden analog zu den positiven Ionen mittels SNMS analysiert. Eine ausführliche Beschreibung der drei wichtigsten Ionisationsschemata findet sich bei Brüning und Dambach [17, 24].

Für die Massenspektrometrie werden probenspezifische Ionen wie beschrieben erzeugt. Die Funktionsweise eines Flugzeitmassenspektrometers beruht auf der massenspezifischen Laufzeit der Sekundärionen bei gleicher Energie und vorgegebener Flugstrecke [24]. Hierzu werden die Ionen mit einer jeweiligen Masse und Ladung in einem elektrischen Feld auf eine konstante Geschwindigkeit beschleunigt. Diese Beschleunigung in Richtung des Analysators ergibt sich durch ein Potentialgefälle zwischen Probenoberfläche und Extraktor. Ionen mit gleichen Ladungen, aber unterschiedlichen Massen, durchfliegen dabei mit derselben Energie, aber verschiedenen Geschwindigkeiten, eine feldfreie Driftstrecke. Die Bestimmung der Masse bzw. des Verhältnisses von Masse zu Ladung der Ionen erfolgt über die Zeit, die für das Zurücklegen der Driftstrecke benötigt wird. Auf diese Weise lassen sich die einzelnen Teilchen aufgrund verschiedener Flugzeiten trennen und so die Zusammensetzungen der Proben bestimmen. Während der Startzeitpunkt dabei durch eine gepulste Primärionenanzug gegeben wird, ist der Stoppzeitpunkt durch das Auftreffen der Ionen auf den Detektor festgelegt. Mit Hilfe der Flugzeitmassenspektrometrie ist es daher möglich, Informationen über die laterale Verteilung der Moleküle und Elemente an der Probenoberfläche zu erhalten.

Die Abhängigkeit der Flugzeit von der Masse m und der Ladung q der Sekundärteilchen lässt sich direkt aus der Gleichung für die kinetische Energie ableiten:

$$E_{kin} = 2 q U_0 = \frac{1}{2} m v^2$$

Hierbei ist U_0 die Extraktionsspannung und v die Geschwindigkeit des Sekundärteilchens. Die Flugzeit t ergibt sich daraus bei gegebener Flugstrecke L in Abhängigkeit vom Verhältnis von Masse zu Ladung m/q :

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2qU_0}}$$

Die Massenauflösung R ist die charakteristische Größe eines Massenspektrometers. Sie ist definiert als das Verhältnis der Masse m zu der Halbwertsbreite Δm des entsprechenden Peaks im Spektrum:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Aufgrund der Abhängigkeit der Flugzeit t von der Masse m erhält man die Zeitabhängigkeit der Massenauflösung. Die Massenauflösung wird also durch die Flugzeitdifferenzen Δt gleicher Masse begrenzt. Diese Zeitunterschiede haben unterschiedliche Ursprünge:

- Entstehungsdauer der Ionen Δt_{Start}
- Flugzeit im Analysator Δt_{Ana}
- Zeitantwort des Detektors Δt_{Det}
- Kanalbreite der Registrierung Δt_{Reg}

Sind diese einzelnen Zeitabweichungen normalverteilt, dann geht die Gleichung über in:

$$R = \frac{1}{2} \frac{t}{\sqrt{\Delta t^2_{Start} + \Delta t^2_{Ana} + \Delta t^2_{Det} + \Delta t^2_{Reg}}}$$

2.2.4.5 Prinzipieller Aufbau der Anlage

Eine Übersichtsaufnahme der Anlage ist in *Abbildung 7* dargestellt.

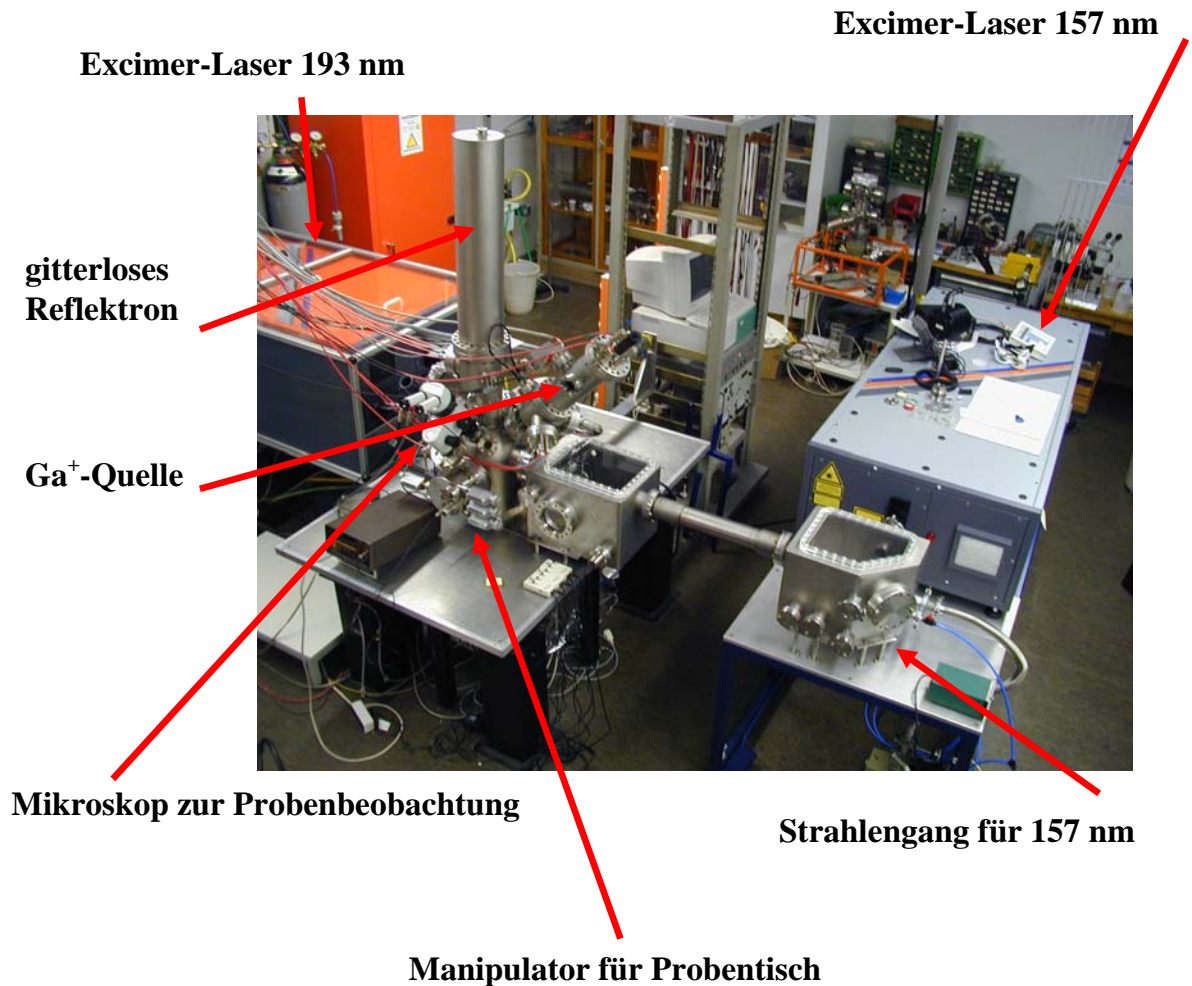


Abbildung 7: Übersichtsaufnahme der Anlage

Für die Messungen der vorliegenden Arbeit wird ein kombiniertes TOF-SIMS / Laser-SNMS-Gerät verwendet. Der schematische Aufbau dieser Anlage ist in *Abbildung 8* dargestellt.

Bei der verwendeten Anlage handelt es sich um eine Ultrahochvakuum-Apparatur, in der über verschiedene Pumpensysteme ein Basisdruck von 10^{-8} mbar erzielt werden kann. Die Ultrahochvakuumbedingungen sind erforderlich, um eventuelle Verunreinigungen der Probenoberfläche durch Ablagerungen des Restgases der Anlage zu minimieren. Die niedrigen Drücke sind für die SNMS-Analyse weiterhin notwendig, um den Anteil der

nachionisierten Restgas-Bestandteile möglichst gering zu halten, da diese zu Interferenzen mit den eigentlichen Probensignalen führen. Die Anlage besteht aus einer Primärionenquelle (1), die in einem Winkel von 45° zur Probenoberfläche (2) angebracht ist. Bei dieser Primärionenquelle handelt es sich um eine von Rulle und Schwieters entwickelte zweilinsige Gallium-Flüssigmetallionenquelle [82, 85]. In dieser Quelle werden die Primärionen erzeugt und mittels elektrostatischer Linsen auf die Probe fokussiert. Die dadurch auf der Probe erzeugten Sekundärionen werden im TOF-SIMS- Modus direkt durch die am Extraktor (3) angelegte Spannung von normalerweise 2 kV über eine Sekundärionenoptik (4) in das Flugrohr geleitet. Die Analyse der durch intrinsische Prozesse entstandenen Sekundärionen erfolgt im Rahmen der SIMS, auf die aber aufgrund einer Wahrscheinlichkeit der intrinsischen Ionisierung von <1 , nicht weiter eingegangen werden soll. Im Laser-SNMS-Modus müssen die Neutralteilchen zuvor mit einem Excimer-Laser (8) nachionisiert werden. Auf dem Weg zum Detektor durchfliegen die Ionen das Reflektron (5), das die unterschiedlichen Startenergien der Ionen zum Teil kompensiert. Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit für hohe Massen werden alle Ionen auf 10 keV beschleunigt (6) und treffen dann auf den Detektor (7). Dieser besteht aus einer Channelplatte, einem Szintillator und einem Photomultiplier. Die Channelplatte wandelt die auftreffenden Ionen in Elektronen um, die dann im Szintillator in Photonen konvertiert werden. Diese werden außerhalb des Vakuums von einem Photomultiplier registriert. Der dort erzeugte elektrische Puls kann auf Erdpotential an die Registrierung weitergeleitet werden.

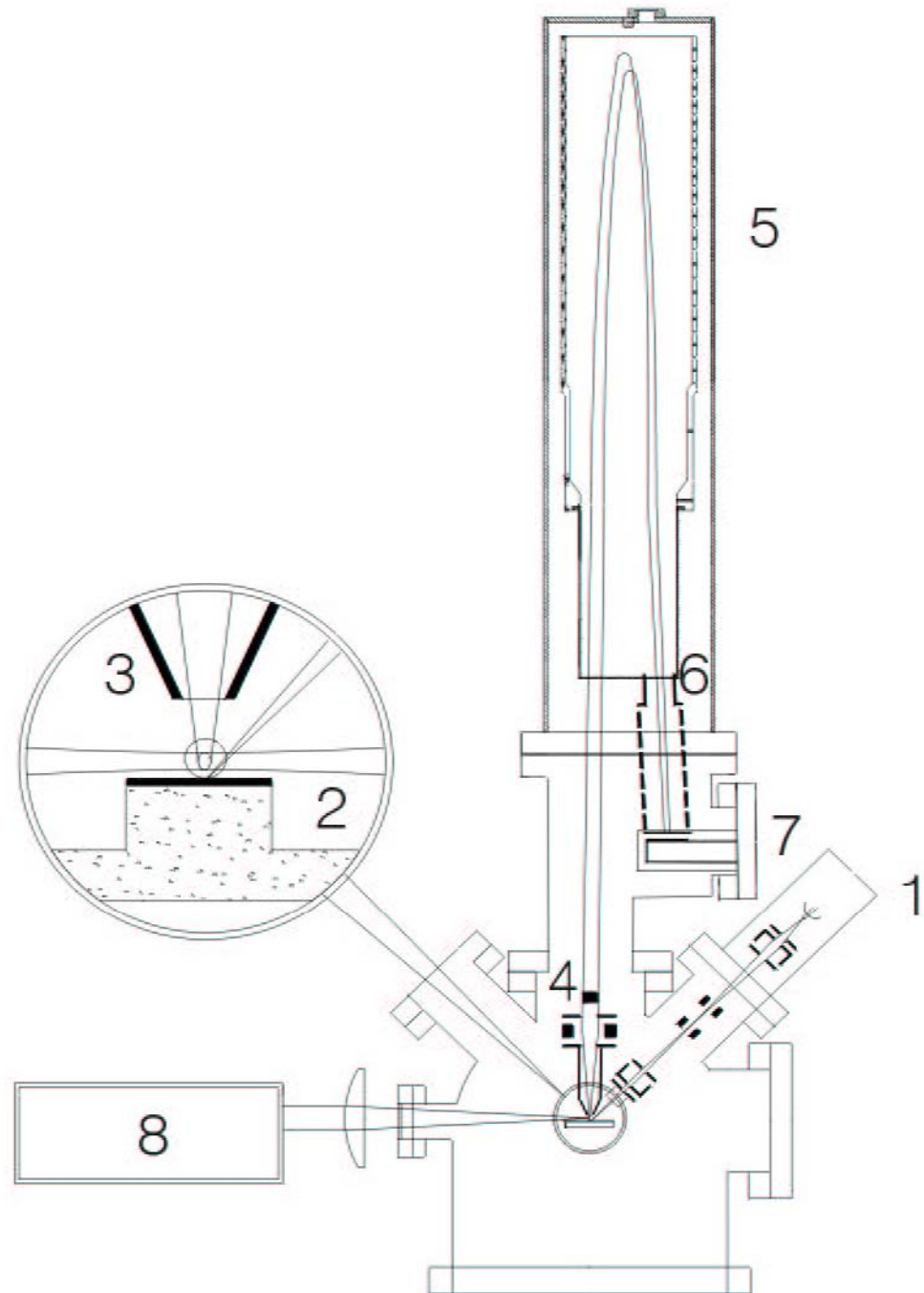


Abbildung 8: schematischer Aufbau eines Sekundärionen-Flugzeitmassenspektrometers
Gallium-Primärionenquelle (1), Probe (2), Extraktor (3), Sekundärionenoptik (4), Flugrohr
mit Reflektrom (5), Nachbeschleunigung (6), Detektor (7), Lasersystem (8)

Bei einem Blick in die Anlage (Abb. 9) erkennt man die Kamera, die der Probenbeobachtung dient, um gezielt einzelne Stellen anfahren und vermessen zu können. Mit Hilfe der Flood-Gun werden Aufladungsprobleme kompensiert, indem eine durch den Beschuss mit Primärionen positiv aufgeladene Probe durch den anschließenden Beschuss mit Elektronen aus der Flood-Gun wieder neutralisiert wird. Der Sekundärionendetektor dient der Detektion der durch den Primärionenbeschuss induzierten Sekundärelektronen. Diese auf der Probe entstehenden Sekundärionen werden durch ein statisches Potential von 300 eV in den Elektronendetektor extrahiert. Das Elektronenbild gibt die Topographie-Effekte der Oberfläche wieder. Die Sekundärionen werden mit Hilfe des Extraktors in das Flugrohr geleitet und darin nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis getrennt.

Im Bereich des Manipulators ist der Targethalter fixiert, der in x-, y- und z-Richtung verschoben und rotiert werden kann. Auf ihm sind die zu analysierenden Proben fixiert. Mit der als Analysequelle eingesetzten Flüssigmetallionenquelle werden Metallionen auf die Probenoberfläche geschossen und lösen dort durch eine Stoskaskade

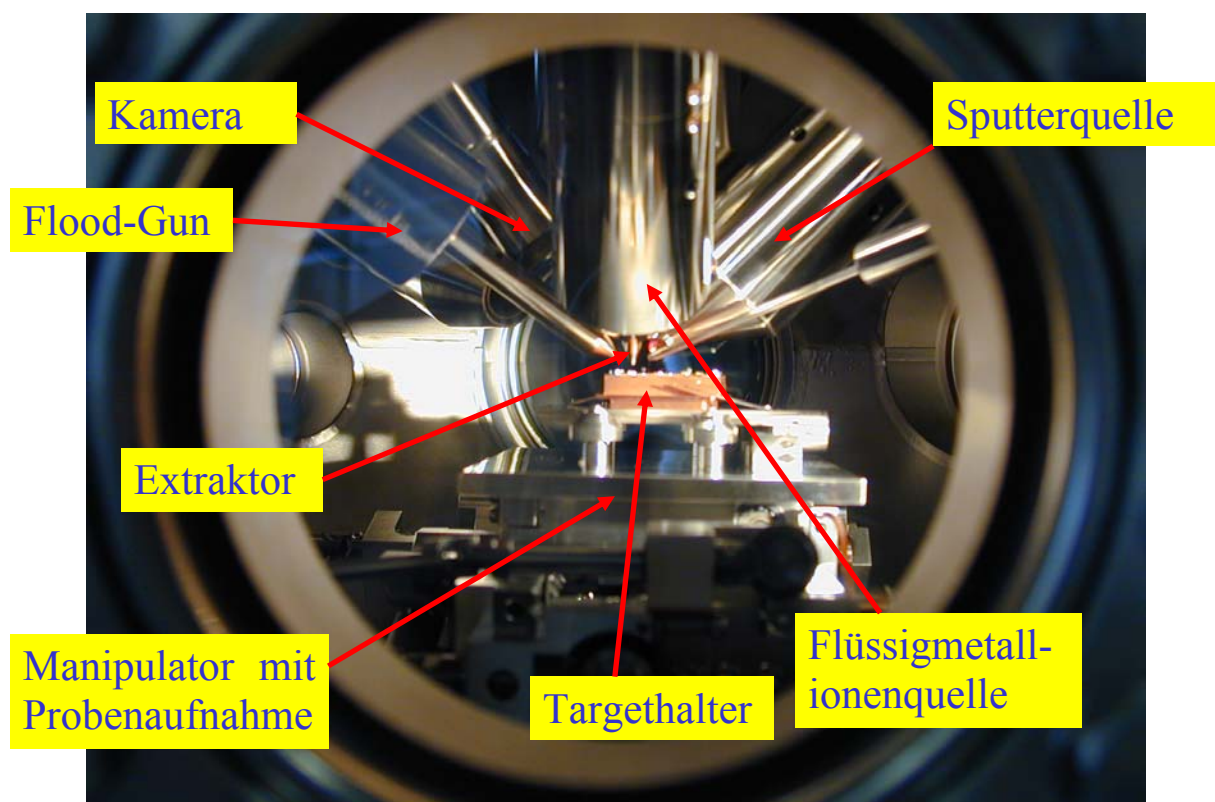


Abbildung 9: Blick in die Anlage

Sekundärteilchen von der Oberfläche, die dann analysiert werden. Die Flooding-Nadel wird hin und wieder eingesetzt, um zur Ausnutzung bestimmter Effekte gezielt bestimmte Gase in die direkte Umgebung der Probe strömen zu lassen. Die Sputterquelle wird als Ionenquelle zum gezielten Vorbeschießen, d.h. zum gezielten Abtragen von Atomlagen, aber auch als Analysequelle verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Immunfluoreszenzanalyse

Die Charakterisierung der Expressionsmuster und der Struktur der von den Osteoblasten-ähnlichen Zellen in den jeweiligen Versuchszeiträumen exprimierten Proteine erfolgt anhand einer Analyse der ausgewählten immunhistochemisch markierten Zell- und Matrixproteine Actin, Fibronectin Bone Sialoprotein, Collagen-Typ I und Osteonectin. Dazu werden die zell- und knochentypischen Proteine FITC-gelabelt (s. Kapitel 2.2.3.1, S. 25 und Kapitel 2.2.3.2, S. 27) und fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der 2-dimensionalen Zellkultur werden in den Abbildungen 10 bis 15, Seite 42 bis Seite 51 dargestellt, die der 3-dimensionalen Zellkultur werden in den Abbildungen 16 bis 20 Seite 52 bis Seite 59 veranschaulicht.

3.1.1 Kontrolle der Kulturbedingungen, des Wachstums und der Migration im 2-dimensionalen *in vitro* System

Actin

Actin kommt als Bestandteil von Myofibrillen und Mikrofilamenten des Zytoskeletts vor und zählt daher nicht zu den Proteinen der Extrazellulärmatrix. Das Labeln von Actin dient hier der Kontrolle der Kulturbedingungen, der Zellvitalität und des Attachments.

Nach der Kultivierungsdauer von einem Tag zeichnen sich die nahezu konfluent auf dem Siliziumwafer ausgesiedelten Zellen durch ihre trapezförmige, polygonale Form mit spindelförmigen Zellausläufern aus (Abb. 10a). Zwischen den benachbarten Zellen sind freie Stellen des Substratmaterials zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine gerichtete Orientierung der Zellen ersichtlich. Die Zellkultur befindet sich in einem guten Zustand: Es sind nur vitale Zellen und keine Ausfällungen von toten Zellen zu sehen, die Integrität der Zellstruktur ist erhalten und das Attachment erfolgt. Die Kern-Plasma-Relation ist ausgeglichen, der Zellkern hat eine kugelförmige Gestalt.

Bei näherer Betrachtung erkennt man im Zytoplasma zahlreiche feine parallelisierte Actinfilamente (*Abb. 10b*), die in Längsrichtung der Zelle verlaufen (siehe Pfeile). Besonders actinreich sind die Ausläufer der Osteoblasten-ähnlichen Zellen.

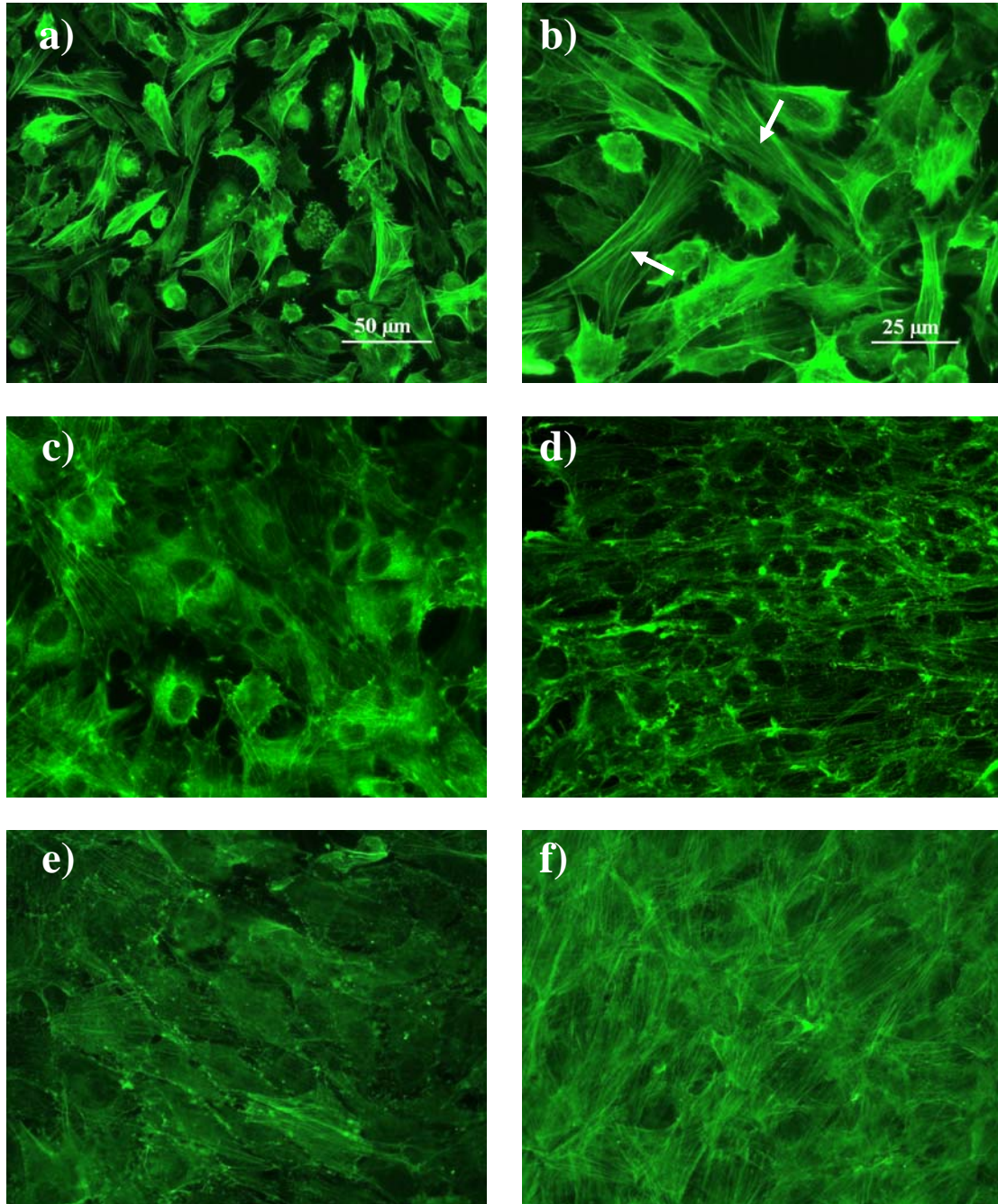


Abbildung 10a-f: 2D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Actinstrukturen nach a-b) einem Tag und c-f) einer, zwei, drei und fünf Wochen. a) Übersicht, Vergrößerungsangabe in Bild b) auch gültig für Bilder c-f)

Nach der Kultivierungsdauer von einer Woche ist der Zellrasen verdichtet (*Abb.10c*). Die ehemals langen Zellausläufer sind nur noch schwach ausgeprägt. Die Bündel von Actinfilamenten verlaufen nicht mehr nur in Längsrichtung der Zelle, sondern orientieren sich sowohl längs, als auch quer in verschiedenen Winkeln zueinander.

Weiterhin treten im Zytoplasma unscharf begrenzte größere Verdichtungszone auf, die auch an der Innenseite der Zellmembran vorkommen.

Zwei Wochen nach Versuchsbeginn liegen die Zellen dicht gepackt und lassen keine freien Bereiche zwischen den Nachbarzellen erkennen (*Abb.10d*). Die Osteoblasten-ähnlichen Zellen bilden auf der Siliziumoberfläche einen kompakten konfluenten Zellmonolayer. Die Zellen orientieren sich parallel zueinander in längs verlaufenden Zellsträngen. Die Actinfilamente sind stark ausgeprägt und konvergieren auf die jeweiligen Zellenden.

Um den 21. Tag ist die Orientierung mit steigender Zellzahl aufgehoben, die Zellen sind mosaikartig dicht gepackt (*Abb.10e*). Die Zellkerne weisen weiterhin eine kugelförmige Gestalt auf, jedoch ist die Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zytoplasmas verschoben. Actin erscheint im Zellinneren sowohl als lockeres zytosolisches Proteinaggregat, als auch in Form feiner kreuz und quer verlaufender Mikrofilamente.

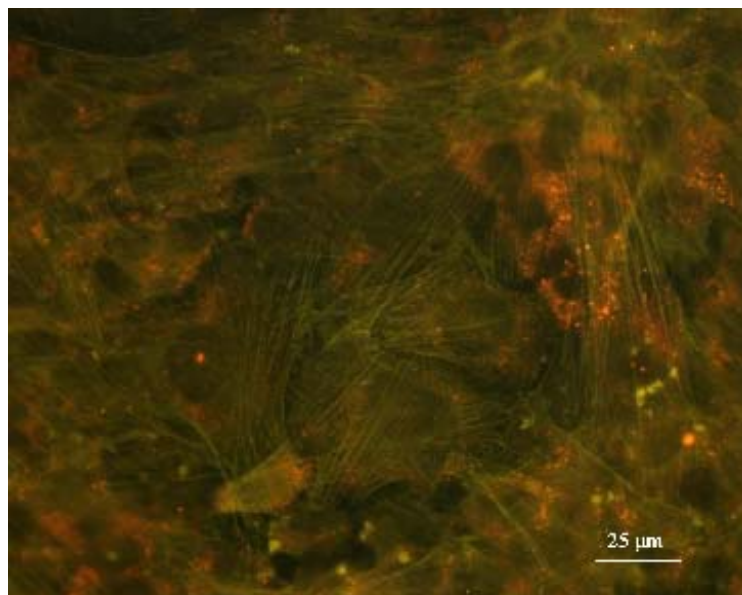


Abbildung 11: Eigenfluoreszenzanalyse: Fluoreszenzsignale über immunhistochemisch gelabelten Actinstrukturen nach fünfwöchiger Kultivierungsdauer

Nach der Kultivierungsdauer von fünf Wochen lassen sich aufgrund von Überlagerungen durch ausgeprägte Actin-Filamentbündel kaum noch einzelne Zellen oder Zellkerne ausmachen. Zahlreiche Proteinfäden sind miteinander verknüpft und verbunden, so dass ein dreidimensionales Netzwerk entstanden ist (*Abb. 10f*).

Bei der Eigenfluoreszenzanalyse (*s. Kapitel 2.2.3.3, S. 28*) der fünf Wochen alten Zellkultur mit Hilfe eines anderen Filters (Zeiss Filtersatzes 31) (*s. Kapitel 2.1.2, S. 13*), sind über die ganze Fläche des dichten Actin-Faserverbunds verteilt Fluoreszenzsignale zu sehen (*Abb. 11*). Einzelne Globuli mit hoher Fluoreszenzintensität liegen dicht an dicht und werden oft von den rundlichen Zellkernstrukturen überlagert.

Fibronectin

Eines der in großer Fülle im Knochen nachgewiesenen NCP's ist das Glykoprotein Fibronectin (FN), das die kurze Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) enthält. Nach 24 Stunden Inkubationszeit ist die Zahl der pro Flächeneinheit adhärenenten Zellen im Vergleich zu der zuvor betrachteten Kultur nicht besonders hoch (*Abb. 12a*). Die Ausrichtung der Zellen ist randomisiert. Obwohl sich einige Zellen (insbesondere im linken oberen Bildbereich) parallel zueinander in vertikaler Richtung orientieren, erkennt man nach einem Tag insgesamt keine bevorzugte Ausrichtung der Zellen.

Zu diesem Zeitpunkt können intrazellulär intensive Fluoreszenz und somit ein starkes FN-Signal detektiert werden. Im Zytoplasma gruppieren sich einzelne zu größeren Bereichen verschmolzene Fluoreszenz-Spots, die sich durch eine hohe Fluoreszenzintensität auszeichnen (siehe Pfeile). Extrazellulär lässt sich das Glykoprotein nach einem Tag nicht nachweisen.

Bereits nach sieben Tagen zeigt sich eine repräsentative, von Extrazellulärmatrix bedeckte, Substratoberfläche, die mit Hilfe der Immunfluoreszenz in *Abbildung 12b* dargestellt wird. Nachdem die Färbespots in den Extrazellulärraum ausgeschleust werden, sieht man ein verzweigtes Fasersystem, das sowohl die Matixbestandteile untereinander, als auch diese mit den Zellen verbindet, die nur vereinzelt unterhalb des Netzwerks auszumachen sind. Der Durchmesser der einzelnen Fibrillen differiert zwischen dünnen Ausläufern und stärkeren Faseranteilen, die neben diffusen Verdichtungszone auch kreisrunde Hohlräume bzw. Lumen bilden, in die die Zellen eingelagert sind (siehe Pfeile). FN zeigt am Ende der siebentägigen Versuchsdauer insgesamt eine relativ hohe Expression.

Mit zunehmender Kultivierungsdauer erkennt man nach 14 Tagen eine gesteigerte Dichte und Stärke des fibrillären Netzwerks (*Abb. 12c*). Das FN der Matrix läuft sternförmig in Form

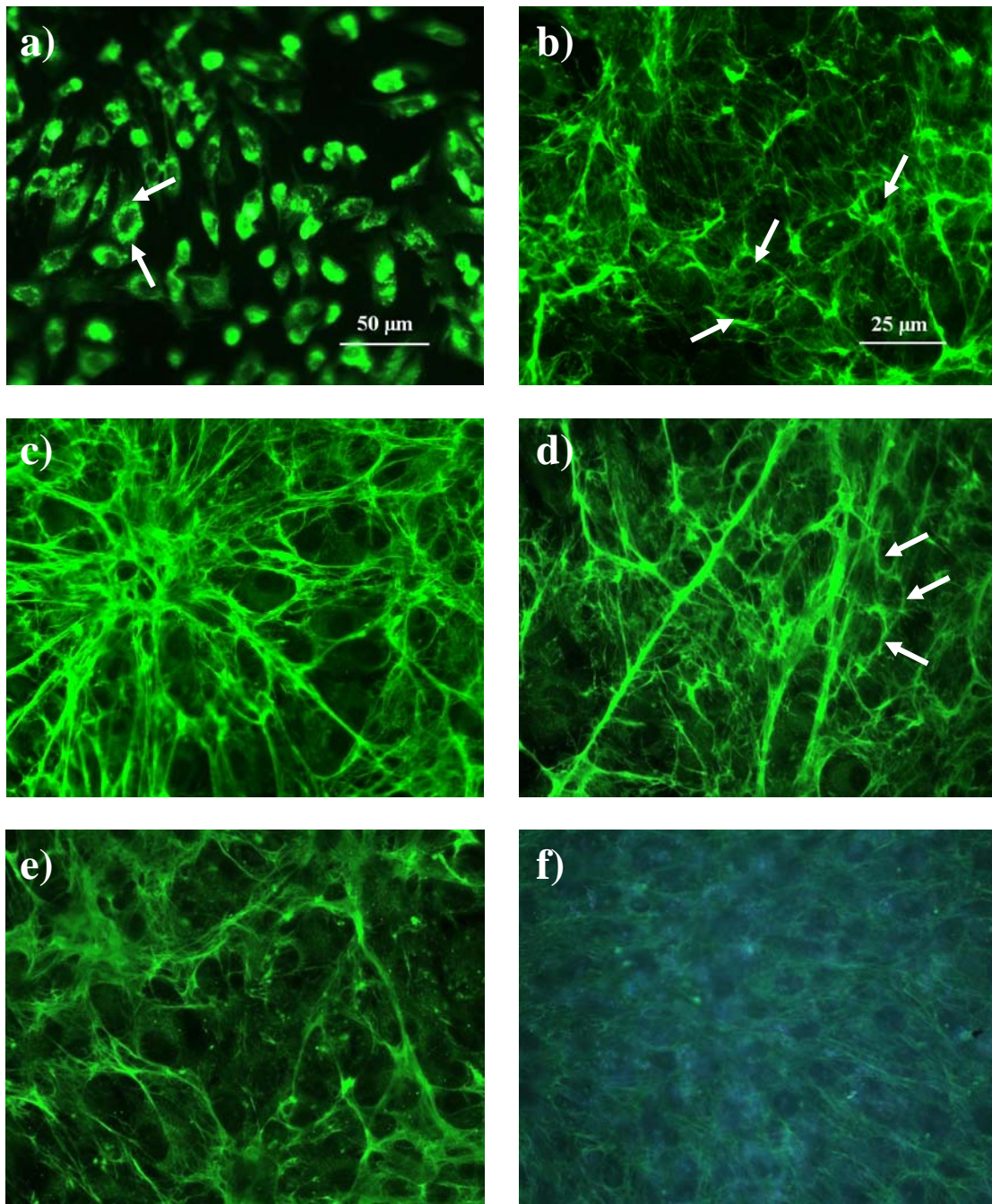


Abbildung 12a-f: 2D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Fibronectinstrukturen nach a-e) einem Tag, einer, zwei, drei und fünf Wochen, f) Eigenfluoreszenzanalyse nach 35 Tagen, a) Übersicht, Vergrößerungsangabe in Bild b) auch gültig für Bilder c-f)

unlöslicher FN-Fibrillen zusammen. Man sieht netzartige Gebilde, die mit Ablagerungen von globulären Strukturen verbunden sind. Der Durchmesser der Lumen des Faserwerks nimmt zu und gewährt Sicht auf die unterhalb der Matrix angehefteten Zellen. Eine bevorzugte Ausrichtung der Zellen ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu erkennen.

Am Ende der dreiwöchigen Versuchsdauer hat der Durchmesser der Fasern nur vereinzelt zugenommen (*Abb. 12d*). Man erkennt eine bevorzugte Ausrichtung bzw. Migration der Zellen, indem sie in direkter Umgebung der Fibrillen perlschnurartig unterhalb und entlang der einzelnen FN-Stränge aufgereiht sind (siehe Pfeile).

Nach 35 Tagen ist die Bildung von Lumen im FN-Netzwerk weiter fortgeschritten (*Abb. 12e*). Während sich nur einzelne Stränge verstärken, nimmt die Dichte des fibrillären Netzwerks nicht weiter zu. Es lässt sich keine Steigerung des FN-Signals ausmachen.

Bei Betrachtung dieser Proben mit Hilfe des Zeiss Filtersatzes 01 (*s. Kapitel 2.1.2, S. 13*) kann man durch die Eigenfluoreszenz *in vitro* geformte Globuli auf und zwischen den Zellen in verschiedenen Fokusebenen nachweisen (*Abb. 12f*). Nach 35 Tagen ist ein Großteil der Substratfläche von Färbespots bedeckt. Kleine Noduli mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 200 nm können als frühe Indikatoren der neu geformten Strukturen in direktem Kontakt zur Zelloberfläche gefunden werden.

3.1.2 Proteine der extrazellulären Knochenmatrix im 2-dimensionalen *in vitro* System

Bone Sialoprotein

Die Darstellung der Extrazellulärprotein-Proteine mit Hilfe der spezifischen Antikörper zeigt bei Betrachtung von Bone Sialoprotein (BSP), das zu den nicht-kollagenen Proteinen (nicht-collagenous matrix proteins, NCP's) gehört, nach 24 Stunden Inkubationszeit eine subkonfluente Monolayerkultur (*Abb. 13a*). Die Zellen entsprechen bezüglich ihrer Morphologie den in *Kapitel 3.1.1* beschriebenen Zellformen.

Bei insgesamt geringer immunzytochemischer Detektion zeigt sich für BSP nach 24-stündiger Inkubationszeit eine ausschließlich intrazelluläre Anfärbung in Form punktförmiger Spots, die sich primär um den Zellkern konzentrieren (siehe Pfeile) und deren Dichte mit zunehmendem Abstand vom Zellkern abnimmt. Dagegen sind die radiären, zum Teil sogar

stachelzellartigen Zytoplasma-Fortsätze frei von Punktflächen. Einzelne Fibrillen oder faserartige Geflechte sind zu diesem Zeitpunkt nicht zu sehen.

Nach einwöchiger Kultivierungsdauer unterscheidet sich das Verteilungsmuster der Spots nicht wesentlich von dem nach 24 Stunden beobachteten (*Abb. 13b*). Dennoch lassen sich einzelne Verdichtungszone mit besonders hoher Intensität ausmachen. Die Zellen sind in diesen Bereichen aufgequollen und es sind nur noch verwaschene Umriss zu erkennen. Das Chromatin der Zellkerne ist zum Teil von radspeichenförmiger Struktur.

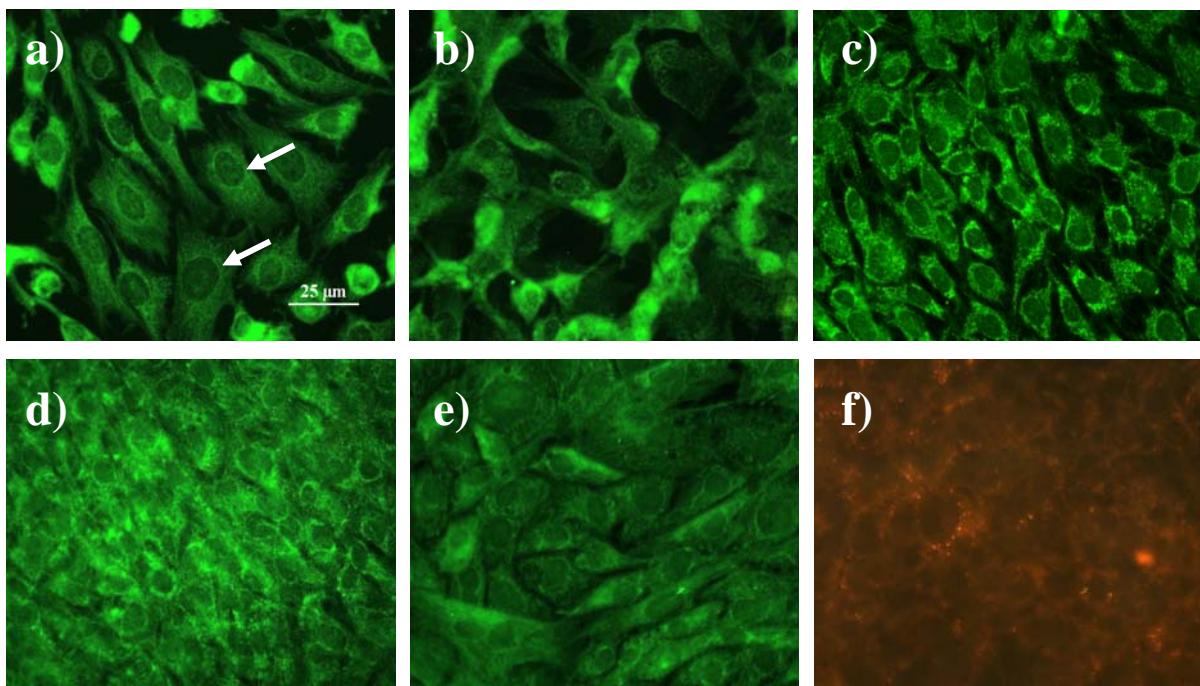


Abbildung 13a-f: 2D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Bone Sialoprotein-Strukturen nach a-e) einem Tag, einer, zwei, drei und fünf Wochen, f) Eigenfluoreszenzanalyse nach 35 Tagen, Vergrößerungsangabe in Bild a) auch gültig für Bilder b-f)

Weiterhin erkennt man lang gestreckte Zytoplasmaausläufer, die die einzelnen Zellen als interzelluläre Kontakte miteinander verbinden. Die Expression von BSP ist am Ende der einwöchigen Inkubationszeit abgesehen von vereinzelt Ablagerungen insgesamt gering.

Zwei Wochen nach Versuchsbeginn ist die Synthese des nicht-kollagenen Proteins jedoch deutlich erhöht (*Abb. 13c*). Man erkennt generalisierte Färbespots, die ubiquitär sowohl in Nähe des Zellkerns, als auch in den Zytoplasmafortsätzen zu finden sind. Besonders hoch ist ihre Dichte in direkter Umgebung des Zellkerns, wo sie zu flächigen Bereichen verschmolzen

sind. Darüber hinaus beobachtet man noch lokale Verengungen des Interzellularraumes in Form von gap junctions zwischen einigen Zellen.

Nach 21 Tagen kann BSP durch ein hohes Signal sowohl intra-, als auch extrazellulär detektiert werden (*Abb. 13d*). Die Zellen liegen dicht gepackt, eingebettet in eine relativ homogene extrazelluläre Matrix mit einzelnen Verdichtungszone, die im direkten Kontakt zur Zelloberfläche stehen.

Eine weitere Erhöhung der Expression kann auch nach 35 Tagen nicht festgestellt werden (*Abb. 13e*). Die Synthese des BSP fällt gegen Ende der Kultivierungsdauer ab, in diesem Stadium erkennt man keine zytobiologischen Charakteristika von synthetisierenden Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Auffällig sind die Risslinien, die sich zwischen den einzelnen Zellhaufen gebildet haben.

Bei der Eigenfluoreszenzanalyse mit Hilfe des Zeiss Filtersatzes 31 werden die fluoreszierenden Anteile der Matrix sichtbar, die sich insbesondere in den Risslinien zwischen den Zellen und an der Zelloberfläche befinden (*Abb. 13f*). Entlang dieser Risse erkennt man fluoreszierende Keime, die allmählich zu Strängen konfluieren.

Collagen-Typ I

Bei der Untersuchung von Collagen-Typ I, einem zu den Strukturproteinen der extrazellulären Matrix gehörenden fibrilläres Protein, zeigen sich nach einem Tag subkonfluent auf dem Siliziumwafer adhärierende Zellen (*Abb. 14a*). Zu diesem Zeitpunkt ist die immunzytochemische Detektion für Collagen (CO) noch nicht besonders hoch. Nach einer durchschnittlichen Expression lassen sich intrazellulär feine Granula-artige Strukturen beobachten, die sich stellenweise in direkter Umgebung des Zellkerns zu flächigen Bereichen konzentrieren und dort mit erhöhter Fluoreszenzintensität sichtbar werden.

Nach sieben Tagen ist der Aufbau der extrazellulären Matrix der Osteoblasten-ähnlichen Zellen, die sich nun als konfluenter Monolayer auf dem Substrat präsentieren, fortgeschritten (*Abb. 14b*). Die intrazellulär angeordneten Strukturen sind vergrößert, separat voneinander angeordnet und homogen auf das Zytoplasma verteilt. Verdichtungszone mit besonders hoher Fluoreszenzintensität lassen sich nur vereinzelt nachweisen. CO-Fibrillen oder faserartige Strukturen sind nicht zu erkennen.

Nach einer Kultivierungsdauer von zwei Wochen ist die Komplexität der Strukturen gestiegen (*Abb. 14c*). Neben den verwaschen erscheinenden intrazellulären Spots lässt sich nun auch

eine extrazelluläre Anordnung in Form eines Netzwerks aus faserartigem Collagen-I (besonders in der rechten Bildhälfte) beobachten. Dieses organisiert sich zunehmend in Fibrillen bzw. fadenförmigen Polymeren, zu dessen Gunsten die Zellen allmählich in den Hintergrund treten.

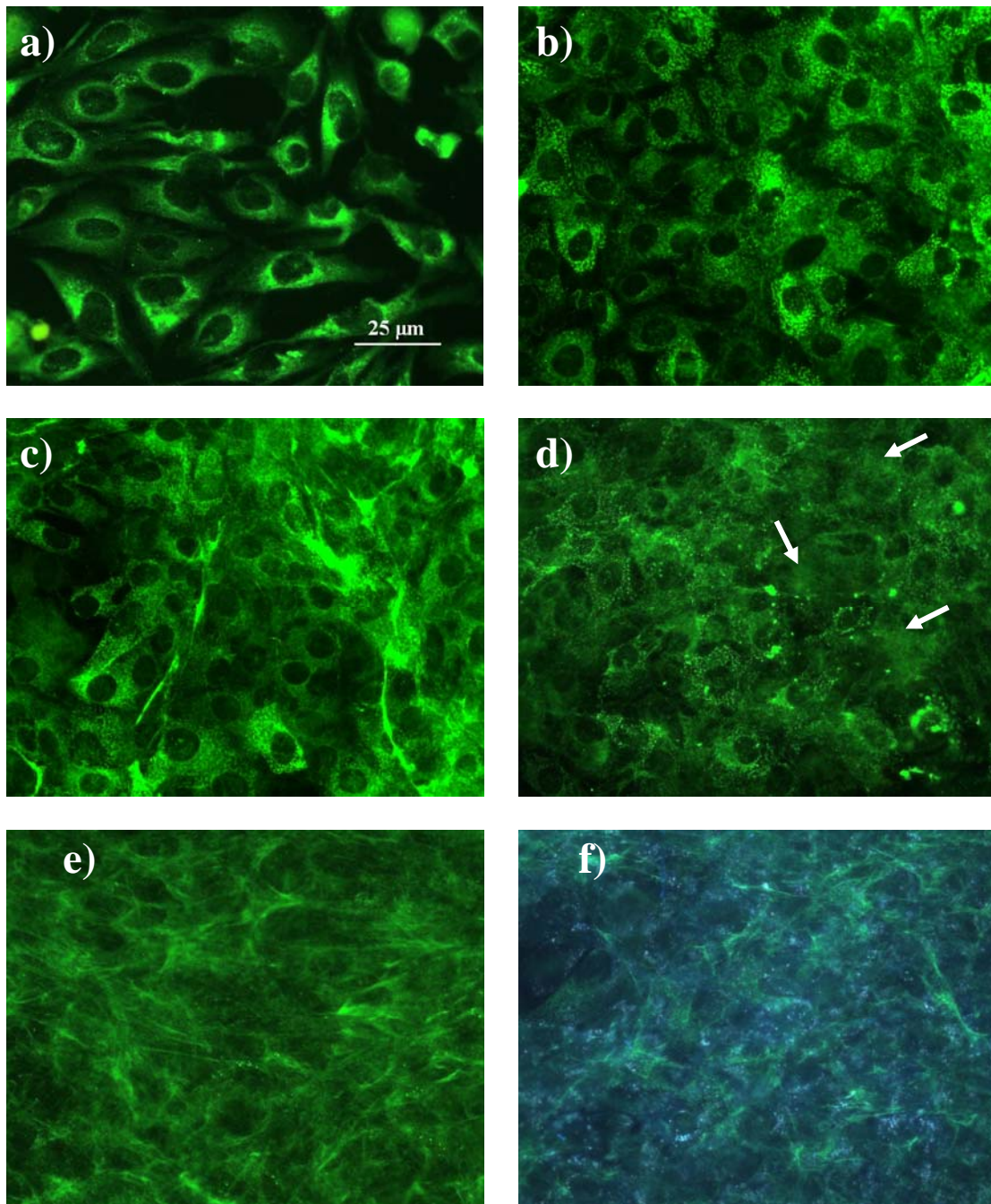


Abbildung 14a-f: 2D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Collagen-Typ I-Strukturen nach a-e) einem Tag, einer, zwei, drei und fünf Wochen, f) Eigenfluoreszenzanalyse nach 35 Tagen
Vergrößerungsangabe in Bild a) auch gültig für Bilder b-f)

Einundzwanzig Tage nach Versuchsbeginn sind die Fibrillen extrazellulär zu wollknäulartigen Geflechten (siehe Pfeile) formiert, was mit einer gesteigerten Trübung der Netzwerke assoziiert ist (*Abb. 14d*). In diesen Bereichen kann man keine einzelnen Zellen mehr ausmachen, während die Zellgrenzen in anderen Regionen durch die intrazellulären Färbespots angezeigt werden.

Nach 35 Tagen sind Dichte und Stärke des fibrillären Netzwerks deutlich gestiegen (*Abb. 14e*). Die wie Schiffstau ineinander verdrillten Faserbündel erscheinen aufgequollen und trüb und gewähren keine Sicht auf die darunter liegenden Zellen.

Bei der Analyse der Eigenfluoreszenz mit Hilfe des Zeiss Filtersatzes 01 kann man nach 35 Tagen ein relativ homogen fluoreszierendes CO beobachten (*Abb. 14f*). Die initialen Färbespots entstehen in direkter Umgebung der Mikrofibrillen und verschmelzen entlang der Fasern zu größeren Globuli.

Osteonectin

Die immunhistochemische Untersuchung von Osteonectin (ON), einem ebenfalls zu den NCP's gehörenden Glykoprotein, zeigt, dass die Anheftung der Zellen auf dem Siliziumwafer nach 24-stündiger Inkubationszeit zu einer subkonfluenten Monolayerkultur führt und die Zellen phänotypisch alle Charakteristiken von Osteoblasten-ähnlichen Zellen aufweisen (*Abb. 15a*).

Abgesehen von einigen Verunreinigungen durch verbliebene Farbstoffreste wird für ON nach einem Tag keine hohe intrazelluläre Fluoreszenzintensität beobachtet. Das ON-Signal ist gering und das Matrixmuster mit dem von BSP nach 24 Stunden zu vergleichen.

Mit zunehmender Kulturdauer ist der Zellrasen verdichtet und lässt nur noch wenige freie Bereiche zwischen den Nachbarzellen erkennen (*Abb. 15b*). Auch am Ende der einwöchigen Inkubationszeit ist die immunzytochemische Detektion für ON gering ausgeprägt und auf das Zytoplasma beschränkt. ON kann nach insgesamt niedriger Expression in Form staubartiger Partikel über den gesamten intrazellulären Raum verteilt beobachtet werden.

Nach 14 Tagen sind die Osteoblasten-ähnlichen Zellen zu parallel verlaufenden Zellsträngen angeordnet (*Abb. 15c*). Man erkennt eine erstmals geringfügig gesteigerte Akkumulation der extrazellulären Matrix in direkter Umgebung der Zellen. Durch die hohe metabolische Aktivität der Zellen lässt sich ON als feinpartikuläre Anreicherung sowohl intra-, als auch

interzellulär detektieren und bildet um die einzelnen Zellkerne schmale Säume mit erhöhter Fluoreszenzintensität.

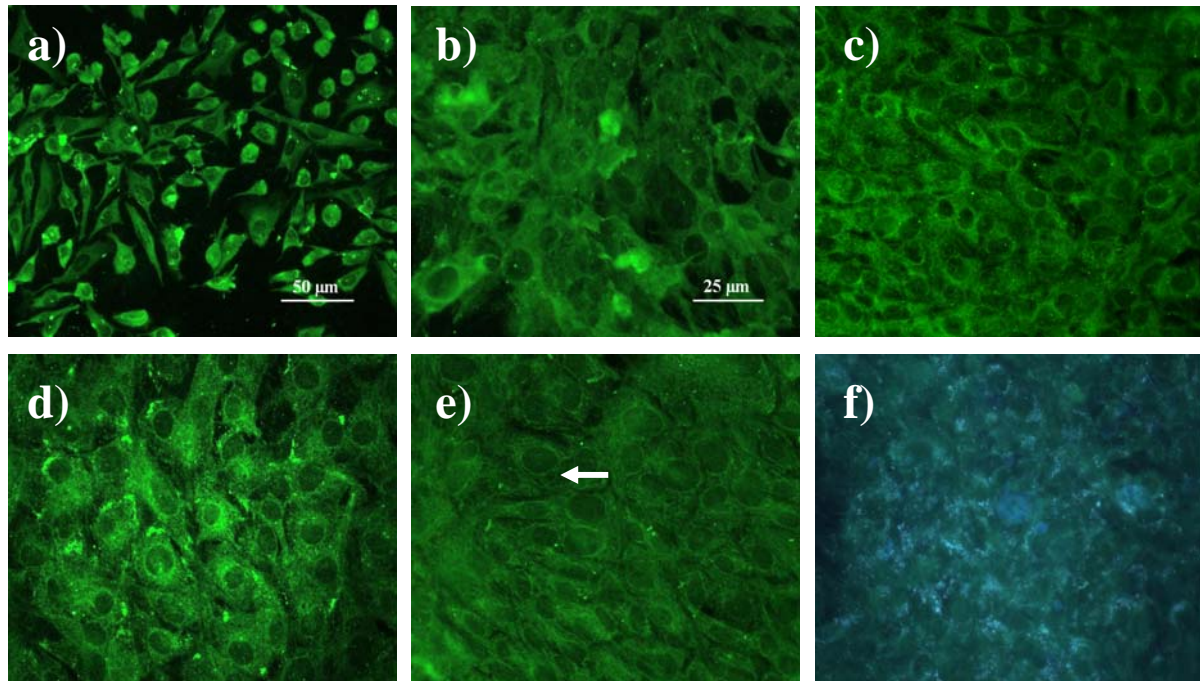


Abbildung 15a-f: 2D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Osteonectinstrukturen nach a-e) einem Tag, einer, zwei, drei und fünf Wochen, f) Eigenfluoreszenzanalyse nach 35 Tagen, a) Übersicht, Vergrößerungsangabe in Bild b) auch gültig für Bilder c-f)

Der Peak der Strukturentstehung ist nach einer Inkubationszeit von 21 Tagen erreicht (Abb. 15d). Während die saumförmige Ablagerung von ON weiterhin beobachtet werden kann, ist die Biosynthese und extrazelluläre Anordnung des Proteins deutlich gestiegen. Man beobachtet eine gut ausgeprägte und differenzierte extrazelluläre Matrix. Neben einigen Bereichen mit besonders hoher Akkumulation in Nähe der Zellkerne bildet sich über den Großteil der Probenoberfläche eine kleinmaschige Matrix aus.

Nach 35 Tagen ist der Durchmesser der Maschen größer und man erkennt kleine schwammartige Netzstrukturen (siehe Pfeil) in direkter Umgebung der Zellen (Abb. 15e). Die Anfärbung bzw. Fluoreszenzintensität für ON ist relativ gering ausgeprägt.

Im Rahmen der Eigenfluoreszenzanalyse mit Hilfe des Zeiss Filtersatzes 01 können einzelne Verdichtungszone mit fluoreszierenden Globuli nachgewiesen werden (Abb. 15f). Diese liegen vermehrt im Bereich der Zelloberfläche in das ON-Maschenwerk eingebettet. Dabei

gruppieren sie sich invers zu den Zonen mit höherer ON-Syntheserate. Die einzelnen Spots liegen vielmehr in einiger Entfernung der saumförmigen ON-Ablagerungen.

3.1.3 Kontrolle der Kulturbedingungen, des Wachstums und der Migration im 3-dimensionalen *in vitro* System

Actin

Um Rückschlüsse auf die Kulturbedingungen, die Zellvitalität und das Attachment ziehen zu können, wird Actin auch in der 3-dimensionalen Versuchsanordnung gelabelt und die Zellstrukturen analysiert. Dabei werden nicht alle Kultivierungszeiträume anhand der Fluoreszenzbilder aufgezeigt, sondern nur relevante Abweichungen oder Gemeinsamkeiten von bzw. mit dem 2-dimensionalen *in vitro* System exemplarisch dargestellt.

Nach einem Tag zeigen sich subkonfluent auf dem Siliziumwafer ausgesiedelte Zellen, die keinen, wie im 2-dimensionalen *in vitro* System beobachteten, Monolayer bilden, sondern im Sinne eines Multilayers zwischen die verschiedenen Gellagen eingestreut sind und in verschiedenen Fokusebenen liegen (*Abb. 16a*).

Die Zellstrukturen stellen sich verwaschen dar, klare Umrisse der einzelnen Zellen können nicht eindeutig definiert werden. Neben den zu Beginn der Kultivierung beobachteten polygonalen und spindelförmigen Zellformen zeichnen sich die Zellen nach einer Woche durch eine eher rundliche Form ohne lange Ausläufer aus. Einzelne Zellorganellen, wie z.B. Zellkerne, sind nicht zu sehen. Auch Actinfilamente können nicht beobachtet werden, Actin erscheint im Zellinneren als lockeres zytosolisches Aggregat.

Zwei Wochen nach Versuchsbeginn zeigen sich in verschiedenen Ebenen angeordnete Actinfilamente (*Abb. 16b*). Sie nehmen verschiedene Richtungen ein, bilden vereinzelt Netzwerke und orientieren sich nicht, wie in der 2-dimensionalen Kultur, zu überwiegend längs verlaufenden Filamentsträngen. Einzelne Zellen sind kaum zu erkennen. Abgesehen von der fehlenden Orientierung und Anordnung entsprechen die Filamente in ihrer Struktur der 2-dimensionalen Kultur.

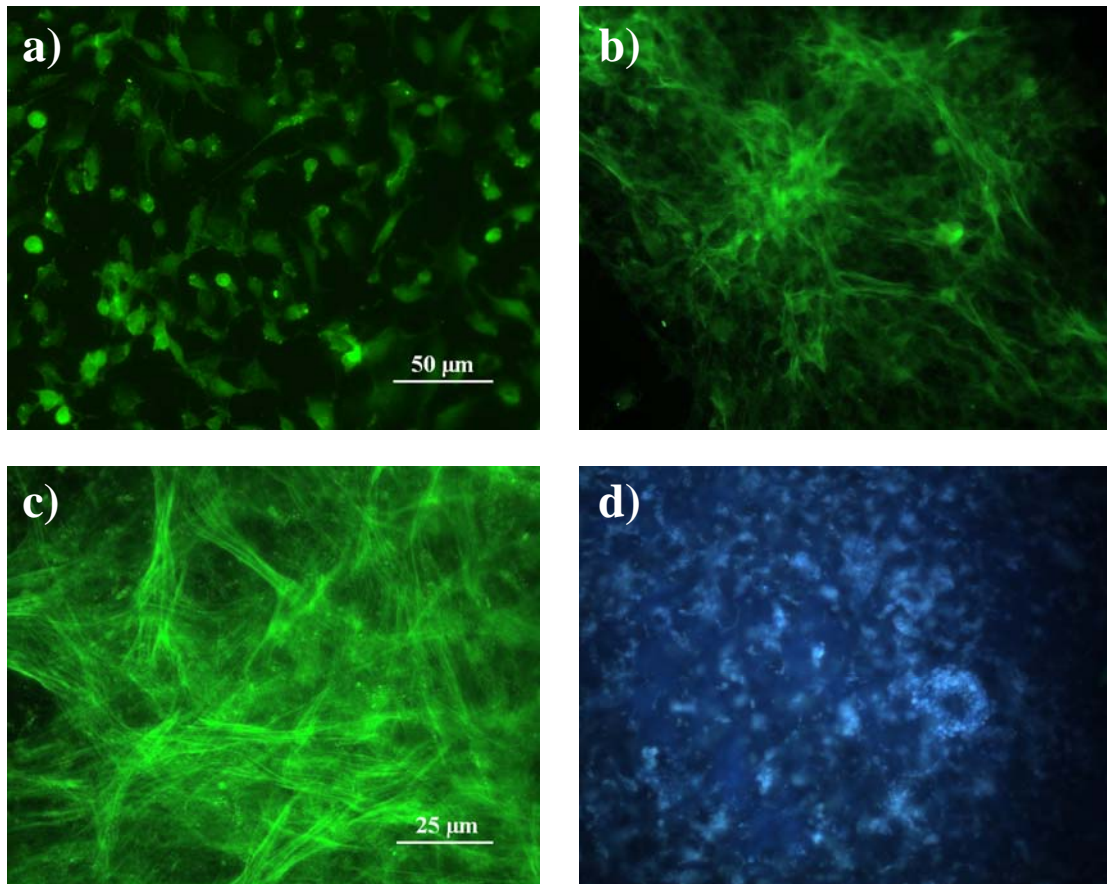


Abbildung 16a-d: 3D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Actinstrukturen nach a-c) einem Tag, zwei und fünf Wochen, d) Eigenfluoreszenzanalyse nach 35 Tagen, Vergrößerungsangabe in Bild a) auch gültig für Bild b) bzw. in Bild c) für Bild d)

Nach 35 Tagen haben die Dichte und die Verknüpfungen der nun deutlich zu erkennenden Filamente zugenommen (Abb. 16c). Es sind ausschließlich lange Actinfilamente zu sehen, die zu einem 3-dimensionalen Netzwerk aufgebaut sind. Dieses ist jedoch weniger flächendeckend als im 2-dimensionalen *in vitro* System.

Die Eigenfluoreszenzanalyse mit Hilfe des Zeiss Filtersatzs 01 zeigt ein über die gesamte Fläche verteiltes Signal (Abb. 16d). Eingebettet in das Collagengel liegen zu größeren Strukturen verschmolzene Globuli, die nur zum Teil scharf dargestellt sind.

Fibronectin

Bei der Darstellung des Extrazellulär-Matrixproteins FN beobachtet man nach einwöchiger Kultivierungsdauer ein fibrilläres Netzwerk mit relativ feinen, streckenweise parallel zueinander verlaufenden, teilweise spitzwinklig zusammenlaufenden Fasern, die Netze mit extrem längsverzogenen Maschen bilden (Abb. 17a). Die Fibrillen verlaufen extrazellulär,

oberhalb der Zellen und bilden im Collagengel ein 3-dimensionales Gerüst. Ablösungen des Collagen-Gels vom Siliziumwafer sieht man besonders an den Randbereichen der Probe. Verglichen mit dem Strukturmuster der 2-dimensionalen Kultur ist das Fasersystem von geringerer Dichte und lässt weniger Verknüpfungspunkte bzw. Verdichtungszone erkennen. Das Netzwerk ist großmaschiger und bildet Hohlräume mit einem Durchmesser von bis zu 40 μm .

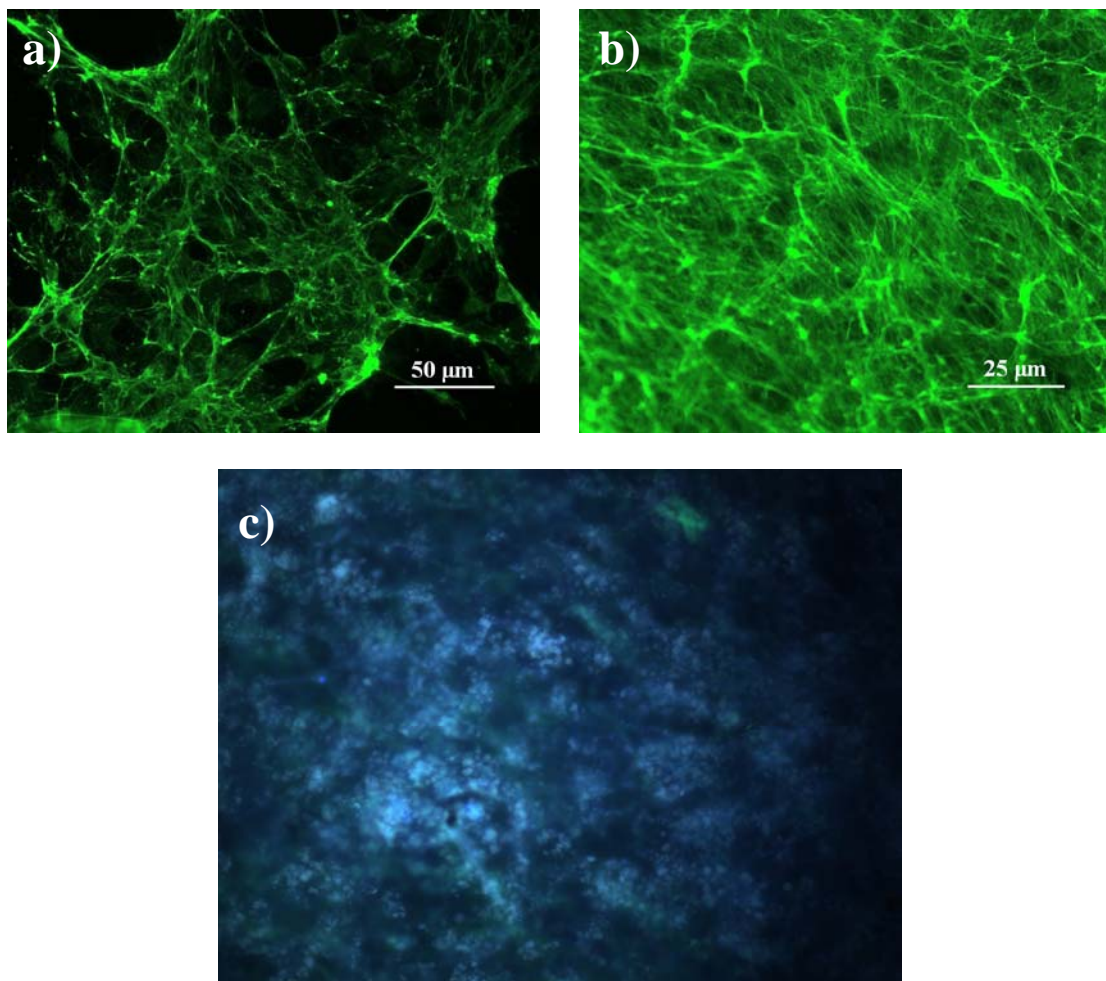


Abbildung 17a-c: 3D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Fibronectinstrukturen nach a-b) einer und fünf Wochen, c) Eigenfluoreszenzanalyse nach 35 Tagen, Vergrößerungsangabe in Bild b) auch gültig für Bild c)

Eine deutliche Steigerung der Produktion von Extrazellulärmatrix bzw. eine Differenzierung des Strukturaufbaus beobachtet man erstmals fünf Wochen nach Versuchsbeginn (Abb. 17b). Man sieht ein feines fibrilläres Netzwerk von hoher Dichte mit multiplen Verdichtungszone

und Ablagerungen von globulären Gebilden. Einzelne Zellen lassen sich nicht ausmachen. Der Durchmesser und die Länge der einzelnen Fasern sind insgesamt wesentlich geringer als in der 2-dimensionalen Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten der Analyse beobachtet wird. Während das FN-Netzwerk im Monolayer-System am Ende der Kultivierungsdauer große Lumen gebildet hat, zeigt es im Gel bezogen auf die gesamte Kultivierungsdauer nach 35 Tagen die höchste Matrix-Expression bzw. -Dichte. Die Strukturmuster beider Kultursysteme unterscheiden sich sowohl bezüglich des Faserdurchmessers, als auch zeitlich in Bezug auf den Peak der Expression.

Bei der Analyse der Eigenfluoreszenz beider *in vitro* Systeme mit Hilfe des Zeiss Filtersatzes 01 fällt auf, dass die Menge der nach 35 Tagen in der Multilayer-Kultur gebildeten Spots die des Monolayer-Systems übersteigt (*Abb. 17c*). Das Collagengel wird nahezu vollständig von Fluoreszenzsignal durchzogen.

3.1.4 Proteine der extrazellulären Knochenmatrix im 3-dimensionalen *in vitro* System

Bone Sialoprotein

Nach einwöchiger Kultivierungsdauer zeigt die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung von BSP ein Multilayer-Wachstum der Osteoblasten-ähnlichen Zellen (*Abb. 18a*). Man erkennt subkonfluent auf dem Siliziumwafer verteilte Zellen in verschiedenen Fokusebenen bzw. Gellagen. An einigen Stellen kann eine Ablösung des Gels vom Wafer beobachtet werden (siehe Pfeil). Bei insgesamt reduzierter immunzytochemischer Detektion erkennt man keine, wie in der 2-dimensionalen Kultur zu diesem Zeitpunkt beobachteten, intrazellulären Spots. Die Zellen zeigen kaum Charakteristika von aktiven Protein-synthetisierenden Zellen. Im Vergleich ist die Expression zu diesem Zeitpunkt insgesamt noch geringer als in der Monolayer-Kultur.

Während BSP im 2-dimensionalen System nach 21 Tagen durch ein starkes Signal sowohl intra-, als auch extrazellulär detektiert werden kann, ist der Strukturaufbau der Matrix in der Multilayer-Kultur noch nicht weit fortgeschritten (*Abb. 18b*). Zwar sieht man zu diesem Zeitpunkt vermehrt auch extrazellulär im Gel verteilte Punktflächen, jedoch zeigen diese eine geringe Fluoreszenzintensität und konzentrieren sich nicht wie im 2-dimensionalen System an

der Zelloberfläche. Einzelne Verdichtungszone oder zu Schollen verschmolzene Bereiche sind dementsprechend nicht zu erkennen.

Der Peak der Protein-Matrixproduktion ist nach einer Inkubationszeit von 35 Tagen erreicht (*Abb. 18c*). Man erkennt eine gesteigerte Akkumulation der Matrixstrukturen, die die Zelloberfläche wie eine Hülle umschließen und dicht aneinander gepackte Kugeln bilden. Vereinzelt lassen sich fibrilläre Strukturen beobachten, die überwiegend von geringer Länge sind und teilweise zu feinen Netzwerken konfluieren. Auffällig sind einzelne Verdichtungszone mit besonders hoher Fluoreszenzintensität. Insgesamt betrachtet weichen die Strukturmuster im 2- und 3-dimensionalen System von einander ab.

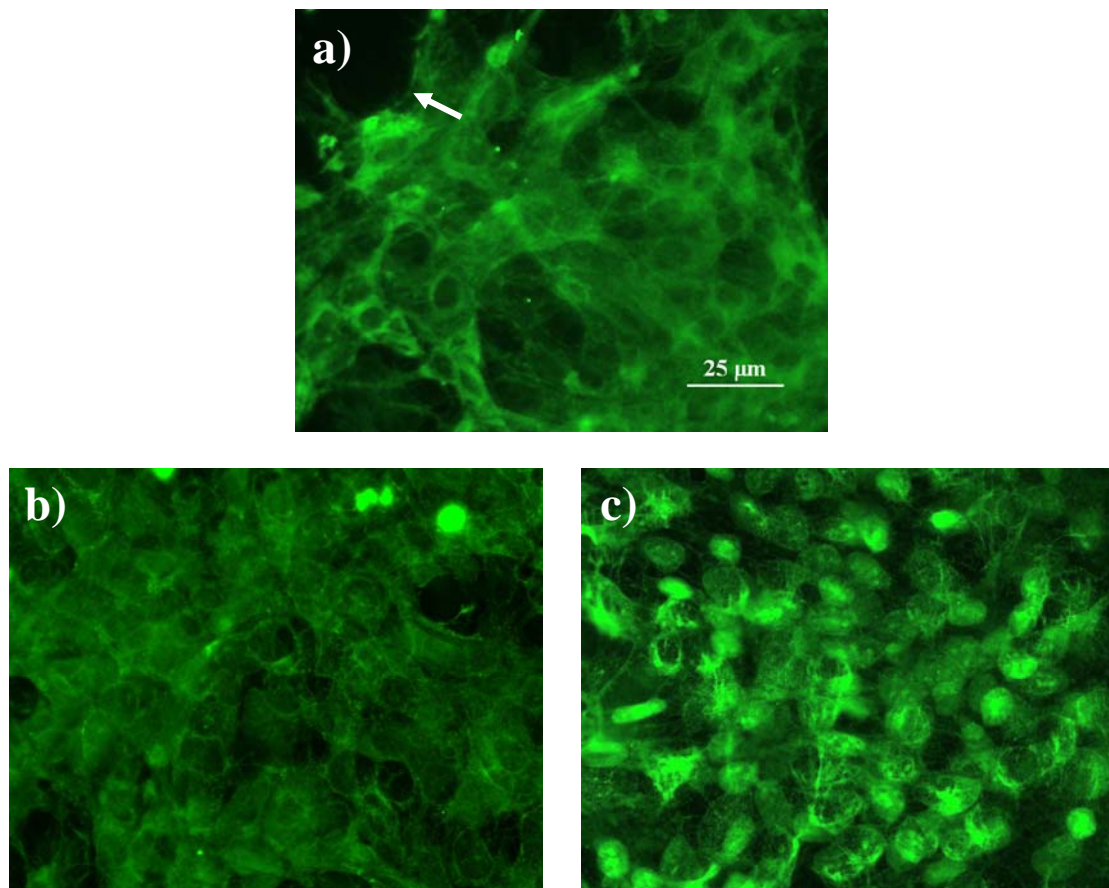


Abbildung 18a-c: 3D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Bone Sialoprotein-Strukturen nach a-c) einer, drei und fünf Wochen, Vergrößerungsangabe in Bild a) auch gültig für Bilder b) und c)

Collagen-Typ I

Die Analyse des Strukturaufbaus zeigt bei der Betrachtung von CO nach einwöchiger Inkubationszeit eine konfluente Multilayer-Kultur mit intrazellulär angeordneten Färbespots, die homogen über das Zytoplasma verteilt sind (Abb. 19a). Die Spots stimmen bezüglich ihrer Größe und Lokalisation mit den nach sieben Tagen im 2-dimensionalen System beobachteten Strukturen überein. Im Gegensatz dazu sind Dichte und Fluoreszenzintensität jedoch geringer ausgeprägt. Weiterhin sieht man in der 3-dimensionalen Kultur trüb und aufgequollen imponierende Strukturen (insbesondere in der linken oberen Ecke), die sich an der Zelloberfläche befinden und sich zu größeren Plaques zusammenlagern.

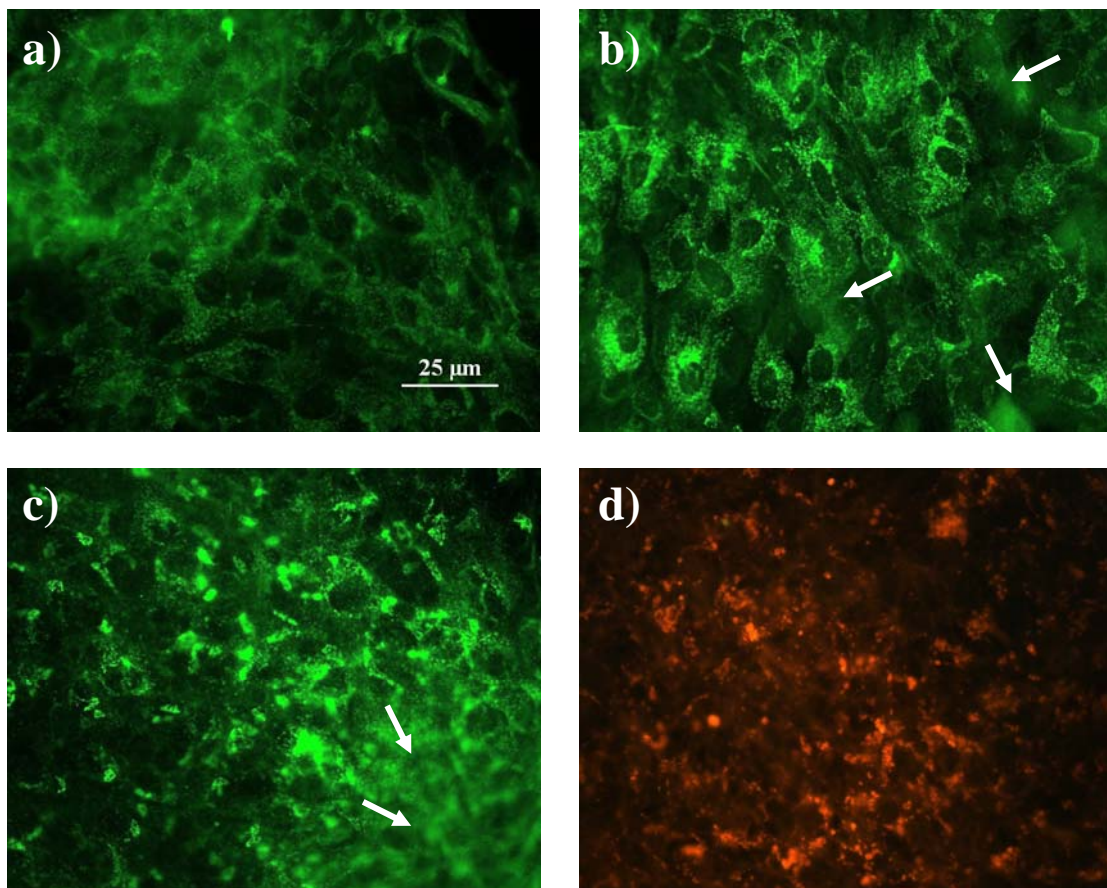


Abbildung 19a-d: 3D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Collagen-Typ I-Strukturen nach a-c) einer, drei und fünf Wochen, d) Eigenfluoreszenzanalyse nach 35 Tagen, Vergrößerungsangabe in Bild a) auch gültig für Bilder b-c)

Bei insgesamt hoher immunzytochemischer Detektion zeigt sich für CO nach 21 Tagen eine intrazelluläre Anfärbung in Form punktförmiger Bereiche, die sich besonders in direkter Umgebung des Zellkerns zu flächigen Strukturen konzentrieren (Abb. 19b). Extrazellulär

sieht man vereinzelte verwaschene Strukturen, die zu kleineren Geflechten konfluieren (siehe Pfeile). Verglichen mit dem 2-dimensionalen System sind Dichte und Fluoreszenzintensität der intrazellulären Spots der Multilayer-Kultur nach drei Wochen höher, stimmen aber im wesentlichen mit den nach sieben Tagen in der Monolayer-Kultur beobachteten überein. Die Komplexität und Dichte der extrazellulären Matrixstrukturen sind nach drei Wochen geringer ausgeprägt als in der 2-dimensionalen Kultur.

Während sich im 2-dimensionalen System nach einer Kultivierungsdauer von 35 Tagen ein extrazelluläres fibrilläres Netzwerk von hoher Dichte organisiert hat, lassen sich in der 3-dimensionalen Kultur nur vereinzelt zu Faserbündeln verdrillte Fibrillen beobachten (*Abb. 19c*), (siehe Pfeile). Im Gegensatz zum Monolayer-System, in dem man zu diesem Zeitpunkt keine Färbespots sieht, detektiert man in der 3-dimensionalen Kultur vergrößerte und zu Schollen verschmolzene Granula-artige Strukturen von hoher Fluoreszenzintensität in verschiedenen Fokusebenen. Insgesamt betrachtet zeigen die Strukturmuster beider Kulturen nach 35 Tagen große Unterschiede.

Bei der Analyse der Eigenfluoreszenz mit Hilfe des Zeiss Filtersatzes 31 sieht man nach 35 Tagen eine relativ homogen fluoreszierende CO-Matrix mit einzelnen Verdichtungszone, die insbesondere im Zentrum der Substratfläche lokalisiert sind (*Abb. 19d*). Die Intensität der Fluoreszenz ist insgesamt geringer als zum gleichen Zeitpunkt in der 2-dimensionalen Kultur.

Osteonectin

Die immunhistochemische Untersuchung von ON zeigt nach einwöchiger Inkubationszeit konfluent im Collagengel liegende Zellen, die in ihrer Morphologie mit denen im 2-dimensionalen System übereinstimmen (*Abb. 20a*). Bei insgesamt geringer immunzytochemischer Detektion beobachtet man für ON eine intrazelluläre Anfärbung in der Zellkultur. ON erscheint im Zellinneren als lockeres zytosolisches Aggregat. Über die Matrix verteilt sieht man, wie bereits im Monolayer-System, staubartige Partikel, die sich durch eine höhere Fluoreszenzintensität auszeichnen. Insgesamt betrachtet lassen sich zu diesem Zeitpunkt, außer der Anordnung im Gel, keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Systemen feststellen.

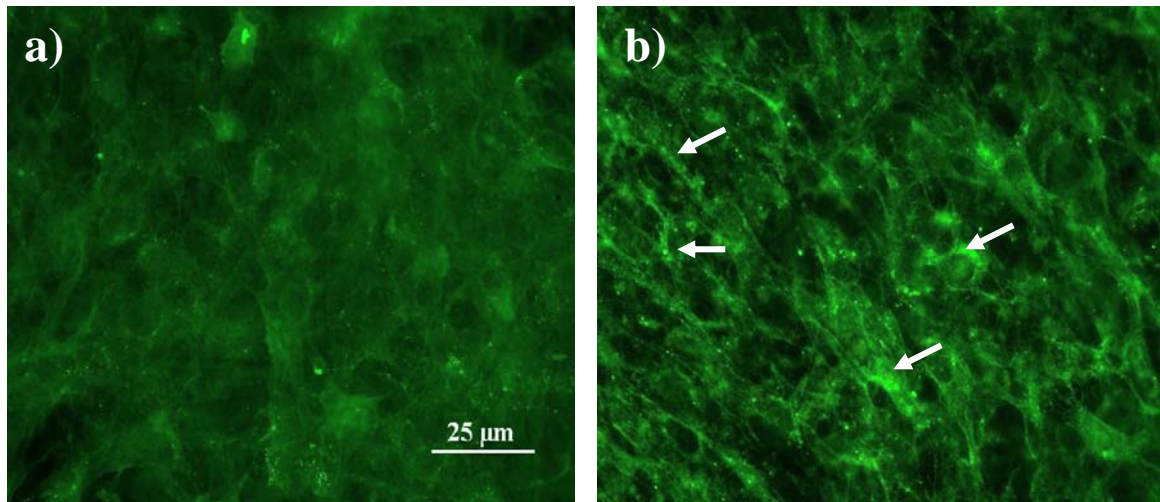


Abbildung 20a-b: 3D-Fluoreszenzbilder immunhistochemisch gelabelter Osteonectinstrukturen nach a-b) einer und fünf Wochen, Vergrößerungsangabe in Bild a) auch gültig für Bild b)

Nach einer Kultivierungsdauer von 35 Tagen sind die Osteoblasten-ähnlichen Zellen, wie bereits in der 2-dimensionalen Kultur, zu parallel verlaufenden Zellsträngen angeordnet und liegen eingebettet in eine dichte extrazelluläre Matrix (Abb. 20b). Während der Peak der Strukturentstehung im Monolayer bereits nach 21 Tagen erreicht ist, kann man das höchste Ausmaß der Expression in der Multilayer-Kultur nach einer Inkubationszeit von fünf Wochen beobachten. Stark fluoreszierende Spots bilden saumförmige Ablagerungen an der Zelloberfläche und konfluieren zu länglichen Ketten hintereinander gereihter Strukturen (siehe Pfeile). Ein, wie im 2-dimensionalen System beobachtetes schwammartiges Maschenwerk, kann man nicht sehen.

3.2 Laser-SNMS-Analyse der Syntheseleistung

Bei den durchgeführten Mineralisationsexperimenten werden die verschiedenen Stadien der Biomineralisation in vitro hinsichtlich der Verteilung charakteristischer chemischer Elemente mit Hilfe des Sekundärionen-Flugzeitmassenspektrometers analysiert. Dabei werden unterschiedliche Stadien des Mineralisationsprozesses anhand der chemischen Struktur der Zellkultur identifiziert.

3.2.1 Einfluss verschiedener Ionen auf Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix im *in vitro* System

Die ausgewachsenen bovinen Primärzellen werden, wie in Punkt 2.2.2.2 beschrieben, im gewünschten Reifestadium von vier Wochen auf glatten Siliziumwafern ausgesiedelt, das Kombinationsmedium (*s. Tab 1*, *S. 20*) hinzugegeben und nach zwei- bzw. fünfwöchiger Kultivierung für massenspektrochemische Untersuchungen kryofixiert, gefriergebrochen und gefriergetrocknet. Anschließend wird eine SNMS-Analyse der Ionenverteilung in verschiedenen Stadien der Matrixreifung durchgeführt.

Abbildung 21a-g, Seite 61 zeigt ein Ionen-induziertes-Elektronen-Bild (IIE-Bild) gefriergebrochener und gefriergetrockneter Osteoblasten-ähnlicher Zellen in einem frühen Stadium der Mineralisation, sowie mittels Laser-SNMS gewonnene Ionen-Verteilungsbilder der Zellkulturen.

Mit Hilfe des IIE-Bildes ist es möglich, einzelne Zellen zu identifizieren (*Abb. 21a*). Die strukturelle Integrität der Zellkultur ist gut erhalten. Präparations-Artefakte, wie Zellschrumpfung und andere Schäden der zellulären Morphologie, die in gefriergetrockneten Proben beobachtet werden können, sind gering ausgeprägt. Nach der Anheftung der Zellen auf die Versuchsträger und einer zweiwöchigen Inkubationszeit kann eine nahezu konfluente Monolayerkultur beobachtet werden. Die erkennbaren Strukturen, die sich im IIE-Bild von der unteren linken Seite des Bildes bis ins Zentrum, sowie am oberen und unteren Bildrand, erstrecken, stellen Regionen mit adhärennten Osteoblasten-ähnlichen Zellen dar. Dabei weisen die Zellen, wie bereits bei den immunhistochemisch behandelten Proben beobachtet, eine polygonale längliche Form mit kurzen spindelförmigen Ausläufern auf und sind an den dunkler imponierenden Randbereichen teilweise vom Substratwafer abgelöst. Bei den kryogebrochenen Zellen verläuft die Bruchebene häufig entlang der Zelloberfläche und reißt nur einige Zellen mittig durch. Es lassen sich vereinzelt Zellorganellen wie z.B. der Zellkern (siehe Pfeil) ausmachen. In den nicht von Zellen bedeckten Bereichen des Substrats erkennt man sowohl freie Stellen des Silizium-Wafers, als auch Bereiche mit Nährmedium und einer wabenartigen Struktur (insbesondere rechter Bildrand, mittig).

In den SNMS-Bildern korrelieren die ansteigenden Intensitäten der Ionensignale mit einem Farbübergang von schwarz nach gelb in der Farbskala. Schwarz entspricht einem relativ niedrigen Gehalt an entsprechendem Ion, rot und gelb deuten auf eine relativ hohe Ionenintensität hin.

Das Silizium-Verteilungsbild weist eine Struktur auf, die beim Vergleich mit dem IIE-Bild die Stellen des freien bzw. nicht mit biologischem Material bedeckten Wafers erkenntlich macht (*Abb. 21b*). Das Silizium-Signal stammt nur aus Bereichen, in denen der Substrat-Wafer frei von adhärennten Zellen ist, während in den zellulären Regionen eine vernachlässigbare Anzahl an Silizium-Signalen auftritt.

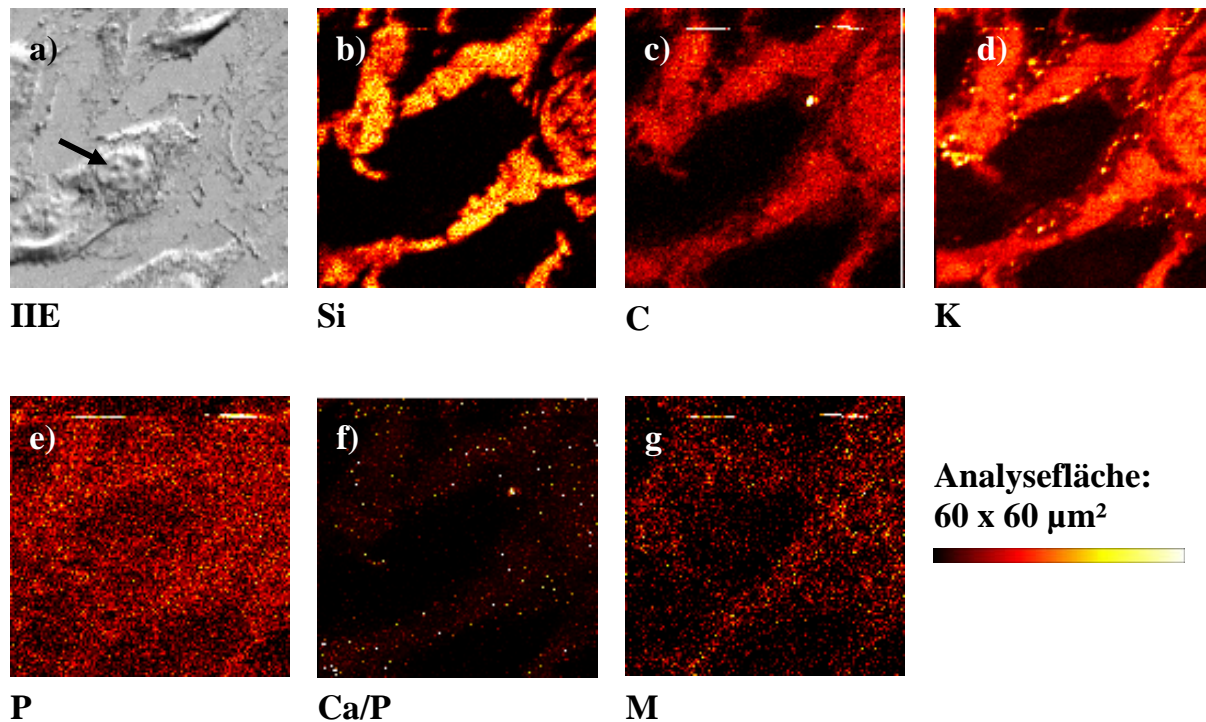


Abbildung 21a-g: a) ein Ionen-induziertes-Elektronen-Bild (IIE-Bild) und b-g) Laser-SNMS-Bilder nahezu konfluenter Osteoblasten-ähnlicher Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der Mineralisation

Ebenso lassen sich hohe Signalintensitäten für die Elemente Kalzium (*Abb. 21c*) und Kalium (*Abb. 21d*) in den zellfreien Regionen nachweisen, wenn auch mit im Vergleich etwas geringeren Intensitäten als im Silizium-Ionenverteilungsbild (*Abb. 21b*). Die Areale mit adhärennten Osteoblasten-ähnlichen Zellen erscheinen auch in diesen beiden Bildern schwarz, d.h. es sind nur niedrige bis keine Ionensignale für die Elemente Kalzium und Kalium messbar.

Sowohl das Phosphor-, als auch das Magnesium-Signal zeigen eine zu Kalzium und Kalium unterschiedliche Verteilung (*Abb. 21e, g*): Beide können sowohl in zellfreien Arealen des Siliziumwafers nachgewiesen werden, als auch in Regionen mit adhärennten Zellen, wenn

auch in letzteren mit reduzierter Signalintensität. Die Ionenverteilung für Phosphor ist dabei höher und von stärkerer Intensität als die für Magnesium.

Die Verteilungen der Ionensignale von Silizium, Kalzium und Kalium ähneln sich, dennoch erkennt man Unterschiede in einigen Arealen, insbesondere beim Vergleich der Kalium- und Silizium-Ionenbilder: In direkter Nachbarschaft der Osteoblasten-ähnlichen Zellen registriert man ein hohes Kalium-Signal, das die Zellen wie ein schmales Band umgibt (*Abb. 21d*). Weiterhin lassen sich innerhalb dieses Bandes einzelne Kalium-Spots mit besonders hoher Signalintensität nachweisen, während das Silizium-Signal in diesen Bereichen eher niedrig ist (*Abb. 21b*).

In *Abbildung 21f* lässt sich das Verteilungsverhältnis, das sich aus der Division von Kalzium und Phosphor ergibt, zeigen. Nach zweiwöchiger Kultivierungsdauer ist der Ionenanteil des Kalziums gering und korreliert ausschließlich mit den zellfreien Regionen des Substrats. In den Bereichen mit adhärennten Zellen kann eine Phosphor-Anreicherung nachgewiesen werden.

Anders verhält es sich zu einem späteren Zeitpunkt im bereits fortgeschrittenen Stadium der Kultivierung Osteoblasten-ähnlicher Zellen.

In *Abbildung 22h-n*, Seite 63 sind ein IIE-Bild, sowie Laser-SNMS-Bilder einer mineralisierten extrazellulären Matrix nach einer Kultivierungsdauer von fünf Wochen dargestellt.

Mit Hilfe des IIE-Bildes (*Abb. 22h*) kann man einzelne Zellen sehen, die sich ausgehend vom unteren linken Rand über das Zentrum des Bildes bis zum oberen Rand erstrecken. Die konfluent auf dem Siliziumwafer haftenden Zellen weisen eine lang gestreckte Form mit mehreren langen Zellausläufern auf. Die dunkel imponierenden Randbereiche stellen wie bereits bei den zwei Wochen alten Proben (*Abb. 22a*) teilweise vom Substrat abgelöste Zellstrukturen dar (siehe Pfeil). Zwischen den benachbarten Zellen erkennt man freie Stellen des Siliziumwafers.

Die Verteilung der Silizium-Signale entspricht den zellfreien Arealen der Probe (*Abb. 22i*). Die gemessene Signalintensität ist hoch und mit dem nach zweiwöchiger Kultivierungsdauer erstellten Silizium-Ionenbild (*Abb. 22b*) vergleichbar. Dagegen misst man in den Bereichen der Probe, in denen sich im IIE-Bild deutliche Zellstrukturen erstrecken, niedrige Silizium-Signale.

Im Gegensatz zu den in *Abbildung 21* nach zweiwöchiger Kultivierungszeit beschriebenen Intensitätsverteilungen weisen die Areale mit niedrigem Silizium-Signal hohe Signalintensitäten für Kalzium (*Abb. 22j*), Magnesium (*Abb. 22n*) und Phosphor (*Abb. 22l*) auf.

Weiterhin zeigt sich im Vergleich mit den zwei Wochen alten Proben ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Zellstrukturen und Arealen mit hohen Kalzium- (*Abb. 22j*) und niedrigen Kalium-Signalen (*Abb. 22k*).

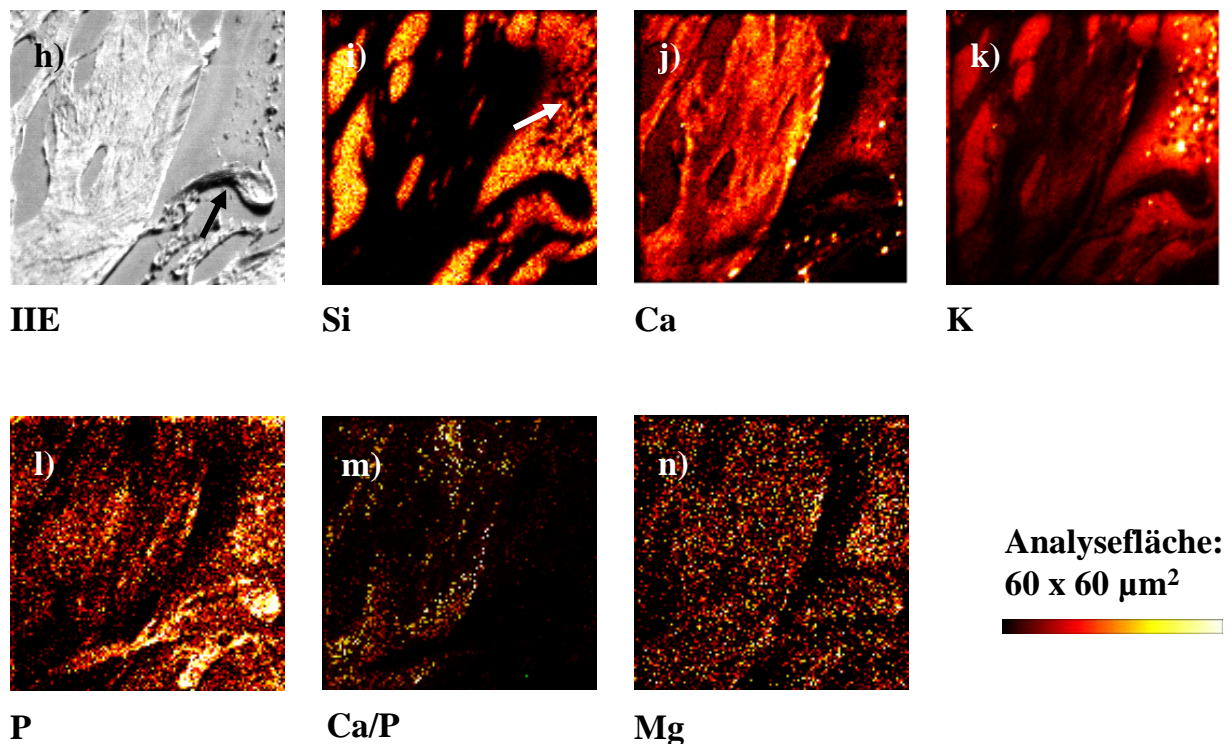


Abbildung 22h-n: h) ein IIE-Bild und i-n) Laser-SNMS-Bilder Osteoblasten-ähnlicher Zellen zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Mineralisation

Wie bereits bei der Phosphor-Intensitätsverteilung nach zwei Wochen (*Abb. 21e*) beobachtet, lassen sich auch bei den fünf Wochen alten Zellkulturen Phosphorsignale über den nahezu gesamten gescannten Bereich der Probe nachweisen (*Abb. 22l*). Im Unterschied zu den nach zwei Wochen analysierten Ionenverteilungen der Proben haben sich die Signale jedoch deutlich verstärkt und zeigen keine Intensitätsabnahme in den von adhären Zellen besetzten Regionen.

Das Verteilungsverhältnis von Kalzium zur Phosphor (*Abb. 22m*) weicht von den nach zweiwöchiger Kultivierungsdauer gemessenen Ionensignalen ab. Während das Kalzium-

Signal nach zwei Wochen nur außerhalb der von Zellen bedeckten Areale mit geringer Intensität nachgewiesen werden kann (*Abb. 22f*), registriert man in den fünf Wochen alten Proben hohe Signalintensitäten für Kalzium im Bereich der Zellstrukturen. Auffallend sind die in Arealen mit hohen Kalzium-Signalen (*Abb. 22j*) stärkeren Intensitäten für Kalzium im Verhältnis zu Phosphor (*Abb. 22m*).

Außerhalb der Bereiche mit adhärennten Osteoblasten-ähnlichen Zellen lassen sich insbesondere am rechten seitlichen Rand der Bilder steigende Signalintensitäten für die Elemente Kalium (*Abb. 22k*), Phosphor (*Abb. 22l*) und Magnesium (*Abb. 22n*) messen. Wie bereits bei der Kalium-Ionenverteilung nach zweiwöchiger Kultivierungsdauer (*Abb. 22d*) beobachtet, können auch in *Abbildung 22k* deutliche Spots mit besonders hohen Kaliumkonzentrationen registriert werden. Diese Spots mit hoher Intensität stimmen bezüglich ihrer Lokalisation, Ausdehnung und Anzahl mit den dunklen, intensitätsarmen Spots des Silizium-Bildes (*Abb. 22i*) überein (siehe Pfeil).

4 Diskussion

4.1 Das *in vitro* System

Die Charakterisierung der von den bovinen Zellkulturen synthetisierten Matrixstrukturen erfolgt anhand des immunhistochemischen Nachweises und einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Proteine.

Die Untersuchungen der Zellmorphologie und -aktivität zu den verschiedenen Zeitpunkten ergibt, dass die Zellen Osteoblasten-ähnlich sind. Dabei lassen alle Zellkulturen den gleichen morphologischen Aufbau erkennen (*s. Kapitel 3.1.1, S. 41 und Kapitel 3.1.3, S. 52*), der auch in anderen Osteoblasten-Kultursystemen beobachtet werden kann [8, 105]. Weitere Hinweise auf die osteoblastische Herkunft der Zellen werden durch ihre Fähigkeit, knochenspezifische Marker, wie z.B. Bone Sialoprotein zu synthetisieren, geliefert [7, 18, 20]. In allen untersuchten Zellpopulationen kann der immunhistochemische Nachweis der charakteristischen Zellproteine Actin und Fibronectin (*s. Kapitel 3.1.1, S. 41 und Kapitel 3.1.3, S. 52*) und der Knochenmatrixproteine Bone Sialoprotein, Collagen-Typ I und Osteonectin (*s. Kapitel 3.1.2, S. 46 und Kapitel 3.1.4, S. 55*) erbracht werden.

Der direkte Vergleich beider Systeme zeigt, dass die Zellen auch über einen ausgedehnten Zeitraum die Fähigkeit zu Wachstum, Differenzierung und zur phänotypischen Protein-Expression besitzen.

Ebenso stellt die Fähigkeit zur Mineralisation ein Osteoblasten-spezifisches Merkmal dar [8, 18]. Eine wesentliche Voraussetzung für die Bildung von Hydroxylapatit-haltigem Mineral in der Zellkultur ist die Anwesenheit einer Phosphorquelle wie β -Glycerophosphat [12, 20]. Neben β -Glycerophosphat werden dem Kulturmedium für das Mineralisationsexperiment zusätzlich Ascorbinsäure und gebrauchtes Endothelial Cell Growth Medium zugefügt, um die Biomineralisation *in vitro* zu beschleunigen. Dabei bewirkt die Ascorbinsäure in Osteoblastenkulturen eine Steigerung der Sekretion von Procollagen I-Komponenten. Außerdem kommt es zu einer Beschleunigung der Weiterverarbeitung von Procollagen I, was eine Stimulation der Kollagenfibrillenbildung und eine Verstärkung der extrazellulären Matrixbildung zur Folge hat [20, 39, 40].

4.1.1 Kulturbedingungen, Zellwachstum und Migration im 2- und 3-dimensionalen *in vitro* System

Actin

Die Kontrolle der Kulturbedingungen, der Zellvitalität und des Attachments erfolgen im 2- und 3-dimensionalen System anhand der Analyse der Zellproteine Actin und Fibronectin (s. Kapitel 3.1.1, S. 41 und Kapitel 3.1.3, S. 52).

Durch das Labeln von Actin, das als Bestandteil von Myofibrillen und Mikrofilamenten des Zytoskeletts vorkommt, ist eine Beurteilung der phänotypischen Zellmorphologie möglich. Die Osteoblasten-ähnlichen Zellen zeichnen sich in beiden Systemen durch eine trapezförmige, polygonale Form mit zunächst spindelförmigen Zellausläufern und einen kugelförmigen Kern aus.

Mit zunehmender Kultivierungsdauer sind die ehemals langen Zytoplasmafortsätze, sowohl durch die fortgeschrittene Verdichtung des Zellrasens, als auch durch die abgeschlossene Zelladhäsion am Substratwafer, nur noch schwach ausgeprägt. Vergleichbare Ergebnisse werden auch in anderen Osteoblasten-Kultursystemen beobachtet [105].

Das zum Großteil durch Actin vermittelte Attachment der Osteoblasten stellt dabei ein essentielles Phänomen für die erste Interaktion zwischen Zellen und Substratmaterial dar und bildet die Voraussetzung für die nachfolgende Matrix- bzw. Gewebeintegrität [55]. Auch Jayaraman et al. [55] bestätigen, dass die Zelladhäsion ein fundamentaler Prozess ist, der direkt in Zellwachstum, Migration und Zelldifferenzierung involviert ist.

Im Gegensatz zur Anordnung in der Monolagen-Kultur formieren sich die Osteoblasten-ähnlichen Zellen im Collagengel zu einem Multilayer, während im 2-dimensionalen System auch nach ausgedehnter Kultivierungsdauer nur eine Zellschicht beobachtet werden kann. Insofern bietet die Verwendung eines Gels auf Collagenbasis einige Vorteile für das Tissue Engineering: Indem vitale Zellen vor Implantation auf einem Defektfüllungsmaterial ausgesiedelt werden, bzw. in einem 3-dimensionalen Gel wachsen, könnte der Heilungsprozess von Knochendefekten erheblich beschleunigt werden. Es bietet auch insofern Vorteile, als dass Collagen einfach produziert und durch körpereigene Enzyme abgebaut werden kann [105].

Verglichen mit der 3-dimensionalen Kultur ist der Expressionslevel von Actin im Monolayer-System höher: Zwar haben Dichte und Verknüpfungen der Actinfilamente über den Zeitraum von 35 Tagen Kultivierungsdauer im Collagengel zugenommen, das Filamentnetzwerk

imponiert jedoch insgesamt weniger flächendeckend als im 2-dimensionalen *in vitro* System. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Lynch et al. [68]. Sie stellen fest, dass Osteoblasten, die auf Collagen-Typ I kultiviert werden, verglichen mit Zellen, die in der Monolage angezüchtet werden, eine insbesondere initial spätere und geringere Actin-, Fibronectin- und Integrin-Expression zeigen.

Die Effekte von Collagen auf den Verlauf der Expression des Osteoblasten-Phänotyps werden überwiegend durch Interaktionen des Collagens mit heterodimeren Integrin-Rezeptoren vermittelt [68]. Diese Rezeptoren interagieren abwechselnd mit α -Actinin, Talin und möglicherweise anderen Proteinen, die die Integrine mit dem Actin-enthaltenden Zytoskelett verbinden. Unsere Ergebnisse suggerieren, dass Signalwege über Integrine die Expression einiger phänotypischer Eigenschaften der Osteoblasten, die in Collagengelen wachsen, beeinflussen und so eine verminderte Actin-Expression zur Folge haben könnten.

Die im Zytoplasma der Zellen verlaufenden Actinfilamente zeigen eine in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer veränderte Ausrichtung. Insgesamt können fünf verschiedene Phasen beobachtet werden: Zu Beginn der Versuchsreihe verlaufen feine parallelisierte Actinfilamente in Längsrichtung der Zelle und bieten ihr so eine initiale Formgebungshilfe bzw. Stützstruktur [5, 88]. In der zweiten Phase orientieren sich die Filamente sowohl längs als auch quer zueinander und tragen somit weiter zur Stabilisierung der Zellmembran bei. Nach einer Kultivierungsdauer von zwei Wochen sind die Actinfilamente stark ausgeprägt und konvergieren in der dritten Phase auf die jeweiligen Zellenden, wo sie mit Membranproteinen verankert werden. In der vierten Phase erscheint Actin im Zellinneren sowohl als lockeres zytosolisches Proteinaggregat, als auch in Form feiner kreuz und quer verlaufender Mikrofilamente und bildet schließlich in der fünften Phase ein stark verknüpftes 3-dimensionales Netzwerk. Dabei stellen einzelne Verdichtungen Zonen dar, die wohl der Verknüpfung und als Ansatzstruktur der Actinfilamente dienen. Das Netzwerk entsteht dadurch, dass sich an die Filamente weitere Proteine anlagern und einzelne Actinfäden miteinander verknüpfen.

Fibronectin

Ein weiteres Adhäsionsprotein ist Fibronectin, das zu den anteilmäßig stärksten in der extrazellulären Matrix vertretenen Komponenten zählt und insbesondere während der frühen Knochenformation nachgewiesen wird [20, 107]. Dennoch wurden seine Expression bezogen

auf andere Matrixproteine des Knochens und seine Rolle während der frühen Knochenentwicklung nicht klar definiert.

Nachdem FN zunächst nur intrazellulär in Form zu größeren Bereichen verschmolzener Pigmente detektiert werden kann (*s. Kapitel 3.1.1, S. 41 und Kapitel 3.1.3, S. 52*), zeigt sich extrazellulär bereits nach einer Woche ein verzweigtes Fasersystem, das sowohl die Matrixbestandteile untereinander, als auch diese mit den Zellen verbindet [9]. Die Dichte der fibrillären Fasern und die Zahl der Verknüpfungen sind dabei in der Monolagen-Kultur signifikant höher als im 3-dimensionalen System, das sich überwiegend durch großmaschige bis zu 40 µm große Hohlräume auszeichnet. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Sivakumar et al. [89], die anhand von Zeitraffer-Filmen über die Dynamik Fluoreszenz-gelabelter FN-Strukturen zeigen, dass FN als eines der ersten Proteine in die Extrazellulärmatrix eingelagert wird und als gut definiertes fibrilläres Netzwerk beobachtet werden kann.

Der hohe Expressionslevel nach bereits sieben Tagen suggeriert, dass FN insbesondere zu Beginn der Matrixformation wichtige Funktionen innehat: Durch seine Beteiligung am Zellattachment stellt es eine wesentliche Voraussetzung für die Matrixbildung dar. FN dient durch diese Anhaftung der Stabilisierung der Architektur der extrazellulären Matrix und spielt eine Rolle in der räumlichen Anordnung der Strukturpolymere. Verschiedene Studien, die sich mit der zeitlichen Reihenfolge der mRNA-Expression einzelner Proteine innerhalb des Knochenformationsprozesses beschäftigen, können zeigen, dass FN zu Beginn der Knochenentwicklung als eine der ersten mRNA-Spezies in Osteoblasten und Osteoblasten-Vorläufern gefunden werden kann [20, 68] und extrazellulär in Bereichen der Osteogenese akkumuliert wird [107].

Als Adhäsionsprotein fungiert FN als Bindeglied zwischen all den sich im Extrazellularraum befindenden Strukturen und ist z.B. in der Lage, Collagen über eine spezifische CO-Bindungsstelle zu formieren [20]. Studien über die Bedeutung der FN-CO-Beziehung zeigen, dass FN eine essentielle Rolle in der Anordnung der CO-Fibrillen spielt [20, 70]. Die FN-Expression könnte für die ordnungsgemäße Formation der collagenen Knochenmatrix entscheidend sein. FN kontrolliert außerdem die Anheftung der Zellen an die Matrix, indem es über die RGD-Sequenz an Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet [20, 30].

Der insbesondere in der Monolayer-Kultur bis zum Ende der zweiten Kultivierungswoche zunehmende Faserdurchmesser und die gesteigerte Dichte der sternförmig zulaufenden Netzwerke implizieren, dass FN Filamente und Fasern von großer mechanischer Stabilität ausbildet, die den extrazellulären Strukturen Festigkeit verleihen. Nach zwei Wochen nimmt

der Faserdurchmesser nur noch vereinzelt zu, während das Netzwerk immer größere Lumen bildet. Das FN-Geflecht scheint allmählich aufzureißen und für die Stabilisierung der Matrix zunehmend an Bedeutung zu verlieren, wodurch gleichzeitig der Beginn der Matrixmineralisation angezeigt werden könnte. Insofern kann FN eher ein im Vorfeld wichtiger Verankerungseffekt der Matrixstrukturen als eine direkte Beziehung zur Mineralformation zugeschrieben werden [9].

Die Variationen der Faserdurchmesser mit dem gleichzeitigen Vorkommen sowohl dünner Ausläufer als auch stärkerer Faseranteile könnten dadurch erklärt werden, dass sich einzelne FN-Fibrillen als Resultat von Zellbewegungen um mehr als das 3,5-fache ihrer Originallänge dehnen oder sich bis auf ein Viertel ihrer Gesamtlänge kontrahieren [89].

FN scheint ebenso maßgeblich in die Migration der Osteoblasten involviert zu sein: Nach drei Wochen erkennt man in der Monolayer-Kultur eine bevorzugte Ausrichtung der Zellen, indem sie perlschnurartig unterhalb und entlang der einzelnen Faserstränge aufgereiht sind. Das Glykoprotein vermittelt verschiedene Aspekte zellulärer Interaktionen mit der extrazellulären Matrix, eingeschlossen der Migration [9]. Sivakumar et al. [89] veranschaulichen durch Vermessung von Verlagerungs-Vektoren, dass fibrilläre Netzwerke innerhalb einer Zellkultur verschiedene dynamische Bewegungen als Antwort auf Zellbewegungen zeigen können und dass Verlagerungen von Fibrillen mit Zellbewegungen assoziiert sind.

4.1.2 Die Matrixproteine des Knochens

Bone Sialoprotein

Osteoblasten kontrollieren die Knochenbildung, indem sie aktiv in die extrazelluläre Formation und Mineralisation der Knochenmatrix involviert sind [104]. Die Charakterisierung der Knochenzellen *in vitro* basiert auf der Detektion verschiedener Osteoblasten-Marker, wie z.B. der alkalischen Phosphatase [41], Collagen-Typ I, Osteocalcin, Osteonectin [80] und Bone Sialoprotein.

Bone Sialoprotein, das zu den nicht-collagenen Proteinen zählt [107], kann in beiden Kultursystemen auch nach einwöchiger Inkubationszeit nur in geringer Menge immunhistochemisch detektiert werden (*s. Kapitel 3.1.2, S. 46 und Kapitel 3.1.4, S. 55*) und scheint daher für die initiale Matrixformierung zunächst nicht entscheidend zu sein. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die die verschiedenen Zeitpunkte der Gen-

Expression der Matrixproteine untersucht haben und zeigen konnten, dass BSP als später Marker von bereits reiferen Osteoblasten expremiert wird [41]. Der Peak des mRNA-Levels wird kurz vor dem Einsetzen der Mineralisation registriert [15, 20, 54].

Während BSP in der Multilayer-Kultur intrazellulär auch nach zwei Wochen nur anhand eines schwachen Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden kann, ist die Expression in der 2-dimensionalen Kultur signifikant erhöht und lässt bereits zu flächigen Bereichen verschmolzene Pigmente erkennen. Nach drei Wochen kann das Protein auch extrazellulär nachgewiesen werden und bildet eine homogene Verteilung in der Matrix mit einzelnen Verdichtungszone an der Zelloberfläche. Möglicherweise fördert BSP über die RGD-Sequenz, die wie bei FN an Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden kann [38], die Anheftung der Zellen an die Matrix, wodurch seine Akkumulation in Nähe der Zellmembran erklärt werden könnte.

Der Zeitpunkt des Peaks der Expression zu Beginn der Hydroxylapatit-Formation und die Lokalisation des Proteins lassen weiterhin vermuten, dass BSP zeitlich direkt mit der *de novo* Knochenformation assoziiert ist. BSP könnte an der Initiation der Mineralisation beteiligt sein [15, 20, 80], indem es möglicherweise eine Rolle als Nukleator spielt. Bestimmte Domänen des Proteins, wie z.B. die CO-Bindungsstelle [97], könnten dabei in Interaktionen mit Apatit-Nuklei involviert sein [52].

Eine weitere Erhöhung der Expression wird in der 2-dimensionalen Zellkultur auch nach 35 Tagen nicht festgestellt, während der Peak der Protein-Matrixproduktion im Multilayer-System erst nach dieser fünfwoöchigen Inkubationszeit und somit ca. zwei Wochen später als im Monolayer beobachtet werden kann. Die Expression fällt im Monolayer gegen Ende der Kultivierungsdauer ab. BSP wird nach Abschluss der Initiation der Mineralformation nur noch zu einem geringen Anteil gebildet.

Bei der Autofluoreszenzanalyse werden die mineralisierten Teile der Matrix sichtbar, die sich insbesondere zwischen den einzelnen Zellen und an der Zelloberfläche gebildet haben. Mit der Mineralformation ist die ultimative Stufe der Osteoblasten-Differenzierung erreicht, da die Kristallnukleation und das Kristallwachstum die finalen Schritte in der Kaskade der Biomineralisation des Hartgewebes darstellen [105].

Collagen-Typ I

Collagen-Typ I bildet nahezu 90% der organischen Komponente der Knochenmatrix [9, 20] und spielt somit eine entscheidende Rolle in der Struktur und Funktion des Knochengewebes. Allgemein kann eine typische Abfolge in der Knochenbildung beschrieben werden: Der erste Schritt umfasst die Biosynthese und extrazelluläre Anordnung des Netzwerks aus faserartigem CO, woran sich in einem zweiten Schritt die Mineralisation anschließt [33, 105]. Während sich in beiden Kultursystemen nach einwöchiger Inkubationszeit ausschließlich homogen über das Zytoplasma verteilte Protocollagen-Strukturen nachweisen lassen, zeigt sich nach zwei Wochen ein extrazellulär angeordnetes Netzwerk aus faserartigen fadenförmigen Polymeren (*s. Kapitel 3.1.2, S. 46 und Kapitel 3.1.4, S. 55*). Die insbesondere in der Monolayer-Kultur zunehmende Komplexität und Dichte der extrazellulären Matrixstrukturen sind mit einer Steigerung der Trübheit der Netzwerke assoziiert, die durch die molekulare Vernetzung und Formation der Mikrofibrillen hervorgerufen wird [16].

Da man heute annimmt, dass die CO-Fibrillen der Keimbildung von biologischem Apatit als strukturelle Template dienen [15, 62, 63], erscheint es notwendig, dass die Formation der Fibrillen vor der Präzipitation des Kalziumphosphats stattfindet. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass der Beginn der extrazellulären Organisation des CO-Netzwerks erst zwei Wochen nach Versuchsbeginn beobachtet werden kann und erst nach einer Inkubationszeit von fünf Wochen zu einem Großteil abgeschlossen ist. Man könnte daher vermuten, dass die Formation der CO-Fibrillen zwar kurz vor Aktivierung der Matrix und vor Beginn der Mineralisation stattfindet, die Entwicklung einer komplexen Matrix jedoch zeitlich parallel mit den Mineralablagerungen, bzw. mit einem geringen „Vorsprung“ des Faserwerks erfolgt.

Da CO den Apatitablagerungen nur als Orientierungshilfe dient und diese ohne das Vorhandensein weiterer assoziierter Matrixproteine selber nicht zu veranlassen vermag [94], bzw. ein sehr langsamer Initiator für Mineralisation ist [80], agiert es als Matrix, an das andere Nukleatoren wie die nicht-collagenen Proteine binden können [41]. Über spezifische Domänen mit CO-Bindungsstellen oder eine hohe Affinität können FN [20, 80], BSP [3, 97] und ON [107] an die CO-Matrix binden und den Mineralisationsprozess beeinflussen.

Die Autofluoreszenzanalyse zeigt nach 35 Tagen homogen mineralisierte CO-Fibrillen. Der Anteil mineralisierten Gewebes ist dabei in der Monolayer-Kultur höher als im 3-dimensionalen System. Initiale Mineralisationskeime können in direkter Umgebung der Mikrofibrillen nachgewiesen werden und verschmelzen entlang der Fasern zu größeren Mineralglobuli. Diese globulären mineralisierten Strukturen sind für den Beginn der

Mineralisation typisch [104] und werden in einigen Studien, die sich mit der strukturellen Beziehung zwischen Kristallablagerungen und Matrix [50], und mit der Kristallmorphologie und -formation beschäftigen [16, 50, 33, 100, 104], beobachtet.

Die extrazelluläre Anordnung des CO-Netzwerks spielt bei all diesen Prozessen, wie der Matrixorganisation, Nukleatorenbindung, Kalziumphosphat-Präzipitation und Mineralisation eine entscheidende Rolle.

Osteonectin

Obwohl ON im Knochen als eines der ersten nicht-collagenen Proteine entdeckt wurde, war seine Rolle im Mineralisationsprozess bisher relativ umstritten und konnte nur ansatzweise geklärt werden. Während das Glykoprotein anfänglich in einigen Studien als knochenspezifischer Nukleator für Mineralisation bezeichnet wurde [9, 15, 94], vermuteten andere, dass ON im Kristallwachstum als effektiver Inhibitor agiert [81] und seine Beteiligung an der Initiation der Kristallformation unwahrscheinlich ist [80].

ON kann in beiden Kultursystemen auch nach zweiwöchiger Inkubationszeit nur mit gering ausgeprägter immunzytochemischer Detektion intrazellulär in Form einer feinpartikulären Verteilung und extrazellulär in direkter Umgebung der Zellen nachgewiesen werden (*s. Kapitel 3.1.2, S. 46 und Kapitel 3.1.4, S. 55*). Diesen Ergebnissen entsprechend scheint die Expression des Glykoproteins zeitlich nicht mit dem Beginn der Matrixformation und der Initiation der Mineralisation zusammenzuliegen.

Der Peak der ON-Expression wird im Monolayer-System nach einer Kultivierungsdauer von drei und im Multilayer nach fünf Wochen erreicht und zeichnet sich durch eine ausgeprägte extrazelluläre Akkumulation des Proteins aus. Während ON in Regionen der initialen Kristallformation nur in geringer Menge gefunden wird [80], steigt seine Expression zu einem späteren Zeitpunkt des Mineralisationsvorgangs an. Eine Beteiligung des Proteins an der Kontrolle des Ausmaßes und der Geschwindigkeit der Kristallformation ist nicht auszuschließen. Über die zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen [20] könnte ON differenziert bestimmte Kristallwachstumsstellen blockieren und so einer überschießenden Mineralisation des Hartgewebes vorbeugen. In einer anderen Studie wird ON bereits zum „Negativ-Regulator“ des Kristallwachstums deklariert [80].

Diese Annahme wird weiterhin dadurch unterstützt, dass das neu gebildete Mineral im Rahmen der Autofluoreszenzanalyse überwiegend in Bereichen nachgewiesen werden kann, in denen keine ON-Akkumulation lokalisiert ist.

Der erst zu einem späten Zeitpunkt der Matrixmineralisation registrierte Anstieg der Proteinexpression könnte mit einer Blockierung von Kristallwachstumsstellen und einer Verhinderung unkontrollierter Mineralformation assoziiert sein.

4.2 Das Substratmaterial

Bei der Auswahl des Substrates kommt es darauf an, ein leitendes Material zu verwenden, da das für die spätere Analyse durch SIMS Vorteile bringt. Des Weiteren ist die Ungiftigkeit des Substrates wichtig, um ein Überleben der Zellkulturen zu ermöglichen. Außerdem soll das verwendete Substratmaterial möglichst nicht Bestandteil der zu untersuchenden Zellkulturen sein. Aus diesen Gründen werden Siliziumproben gewählt, die sich bereits in anderen Studien als geeignetes Substratmaterial bewährt haben [24, 26, 36].

Die im IIE-Bild erkennbaren Strukturen (*s. Kapitel 3.2.1, Abb. 21, S. 61 und Abb. 22 S. 63*) stellen Bereiche mit adhärenenten Osteoblasten-ähnlichen Zellen dar. Diese mit Zellen besetzten Regionen können anhand des Silizium-Signals, das vom Substratmaterial ausgeht, eindeutig von nicht mit Osteoblasten-ähnlichen Zellen bedeckten Arealen unterschieden werden: Da Silizium nur in geringsten Spuren in Zellen vorkommt [43], weist das Silizium-Ionenbild eine Verteilung auf, die beim Vergleich mit dem IIE-Bild eindeutig die Stellen des freien bzw. nicht mit biologischem Material bedeckten Wafers erkenntlich macht. Während das Silizium-Signal nur aus Bereichen stammt, in denen der Substrat-Wafer frei von Zellstrukturen ist, treten in den zellulären Regionen eine vernachlässigbare Anzahl an Silizium-Signalen auf.

Anhand dieser deutlichen Differenzierung der Signalverteilungen ist es möglich, einzelne Elemente exakt zu lokalisieren und gleichzeitig ihre räumliche Beziehung zu Zellstrukturen herzustellen.

Auch aufgrund der erhaltenen Integrität der Zellstruktur und des erfolgreichen Attachments der Zellen kann Silizium als adäquates Substratmaterial angesehen werden.

4.3 Beteiligung verschiedener Ionen an der Mineralformation im *in vitro* System

Die Fähigkeiten von Laser-SNMS, chemische Elemente in Proben zu detektieren und zu quantifizieren, werden erfolgreich dazu verwendet, die Interaktion ausgewählter, in den Mineralisationsprozess involvierter Ionen zu untersuchen und die Elemente hinsichtlich der Verteilung in verschiedenen Stadien der Matrixreifung zu analysieren (s. Kapitel 3.2, S. 59-64).

Die Umformung einer nicht-mineralisierten extrazellulären Matrix, die von den Osteoblasten-ähnlichen Zellen als Grundsubstanz (Osteoid) abgeschieden wird, in eine mineralisierte Knochenmatrix, ist ein komplizierter Prozess: Auf der einen Seite soll das Matrixsystem eine kontrollierte Mineralisation fördern, die entsprechend einer gebräuchlichen Hypothese mit der Bildung erster Mineralisationskeime an spezifischen polaren Regionen (active sites) der Collagen-Mikrofibrillen beginnt [50, 100]. Auf der anderen Seite soll eine unkontrollierte, vorzeitige Mineralisation in diesen Bereichen verhindert werden.

Während sich viele Studien mit dem Transport und den Ablagerungen von Kalzium und Phosphor befassten [50, 100], wurde der möglichen Rolle der monovalenten Ionen während der Gewebsmineralisation nur wenig Aufmerksamkeit gezollt.

Kalium scheint in beiden Fällen eine entscheidende Rolle zu spielen. Obwohl sich die Verteilungen der Ionensignale von Silizium, Kalzium und Kalium vor Beginn der Mineralisation ähneln, lassen sich dennoch Unterschiede in einigen Arealen erkennen, insbesondere beim Vergleich der Kalium- und Silizium-Ionenbilder: In direkter Nachbarschaft der Osteoblasten-ähnlichen Zellen registriert man nach zwei Wochen ein hohes Kalium-Signal, das die Zellen wie ein schmales Band umgibt. Weiterhin lassen sich innerhalb dieses Bandes einzelne Kalium-Spots mit besonders hoher Signalintensität nachweisen, während das Silizium-Signal in diesen Bereichen eher niedrig ist.

Wie bereits in Studien von Wiesmann et al. [103] über die Initiation und Regulation der Mineralnukleation von Prädentin bzw. Dentin in Rattenzähnen nachgewiesen wird, können anscheinend auch in der Knochenmatrix in einem frühen Stadium der Mineralbildung Mikroareale mit einer Kalium-Anreicherung detektiert werden.

Der Prozess der Nukleation kann grob in drei Schritte eingeteilt werden: Zuerst wird von den Osteoblasten eine Collagen-reiche extrazelluläre Matrix synthetisiert, die noch nicht in der Lage ist zu mineralisieren, jedoch unkontrollierte Ablagerungen von Mineralkristallen verhindern kann.

In einem zweiten Schritt wird das Matrixsystem im Bereich der Mineralisationsfront aktiviert und für die Mineralnukleation vorbereitet. Es wäre denkbar, dass Kalium an diesem Prozess beteiligt ist und eine Reihe von Enzymmolekülen in ihrer katalytischen Aktivität beeinflusst. Als allosterischer Effektor reguliert Kalium z.B. eine signifikante Menge an Phosphotransferase-Reaktionen [93]. Die von Wiesmann et al. [103] im Dentin gemessenen Kalium-Anreicherungen stimmen mit den Konzentrationen, die für eine Enzymaktivierung notwendig wären, überein.

Denkbar wäre auch, dass die Kaliumionen bereits innerhalb der Zelle oder später, nach der Sekretion, extrazellulär während des Remodelings der Matrix an die stark anionischen nicht-collagenen Polyionen der organischen Extrazellulärmatrix gebunden werden. Auf diese Weise könnte Kalium die für Mineralisationskeime aktivierten Regionen der Matrixmoleküle blockieren und so eine zu frühe Kalziumphosphat-Präzipitation verhindern [25].

Das Phosphor-Signal wird vor Beginn der Mineralisation sowohl in zellfreien Arealen des Siliziumwafers nachgewiesen, als auch in Regionen mit adhären Zellen, wenn auch in letzteren mit reduzierter Signalintensität. Im Bereich der Zellstrukturen könnte das Signal Phosphor- bzw. Phosphatanteilen der äußeren Zellmembran, wie z.B. Phospholipiden und Ionenpumpen (z.B. Na-Ka-ATPase) zugeschrieben werden, im Zellinneren den Fermenten Phosphorylase und Alkalische Phosphatase.

In der Matrix ist die Co-Anreicherung von Phosphor und Kalium zeitlich mit einer Vorstufe der Mineralisation assoziiert. Auch Wiesmann et al. [103] weisen im Prädentin direkt im Bereich der Mineralisationsfront hohe Konzentrationen an Phosphor und Kalium nach.

In einem dritten Schritt kann nun eine geordnete Mineralnukleation mit nachfolgendem Kristallwachstum stattfinden, indem das aktivierte Matrixsystem Kalzium- und Phosphationen aus der extrazellulären Flüssigkeit „einfängt“ und bindet. Die Hauptmatrixproteine Collagen-Typ I und Fibronectin könnten dabei als Ausgangspunkt für Mineralisationskeime dienen und späteres Kristallwachstum an der Mineralisationsfront beeinflussen.

In der fünf Wochen alten Zellkultur zeigt sich, im Gegensatz zu den nach zweiwöchiger Kultivierungszeit registrierten Intensitätsverteilungen, eine Korrelation zwischen Zellstrukturen mit niedrigen Kalium- und hohen Kalzium- und Phosphor-Signalen. Diese Messergebnisse verdeutlichen, dass der Beginn der Mineralnukleation zeitlich mit einem Rückgang der Kalium-Konzentration in der Matrix stattfindet. Gleichzeitig deutet die

Akkumulation der Apatit-formenden Kalzium- und Phosphorionen in bereits aktivierten Matrixarealen auf den Beginn der Mineralformation hin [50]. Dementsprechend registriert man zu einem späteren Zeitpunkt, bzw. mit dem Einsetzen der Mineralisation, hohe Signalintensitäten für Kalzium und Phosphor über den nahezu gesamten gescannten Bereich der Probe, während die Intensitätsverteilung für Kalium stark abnimmt.

Die Kalzium-Ionenverteilung zeigt innerhalb der mineralisierenden Zone keine homogene Verteilung, was mit verschiedenen Stadien der Mineralformation und -reifung zusammenhängen mag.

Der Anstieg des Phosphor-Signals könnte außerdem auf organische Phosphatgruppen spezieller Makromoleküle, wie z.B. Phosphophoryn, zurückgeführt werden, das die Anreicherung und Kristallnukleation von Kalzium und Phosphat induziert, sobald diese an die kollagene Matrix gebunden werden [100].

Wie bereits bei der Kalium-Ionenverteilung nach zweiwöchiger Kultivierungsdauer beobachtet, können auch in den fünf Wochen alten Proben Spots mit besonders hohen Kaliumkonzentrationen registriert werden. Die Spots stimmen bezüglich ihrer Lokalisation, Ausdehnung und Anzahl mit den dunklen, intensitätsarmen Spots des Silizium-Bildes überein. Diese Ionensignale stammen nicht aus bereits mineralisierenden Matrixzonen, sondern aus weiteren Mikroarealen im Bereich neuer Mineralisationsfronten. Die inhomogene Verteilung von Kalium mit niedrigen Signalintensitäten im Bereich der mineralisierten Zone und hohen Intensitäten in noch nicht mineralisierten Regionen, könnten auf verschiedene Stadien der Mineralinitiation und Mineralformation innerhalb der Matrix hindeuten.

Das Magnesium-Signal zeigt eine andere Verteilung: Vor Beginn der Mineralisation kann es, wenn auch mit reduzierter Signalintensität, sowohl in zellfreien Arealen des Siliziumwafers nachgewiesen werden, als auch in Regionen mit adhärenen Zellen.

Nach fünfwöchiger Kultivierungsdauer registriert man einen deutlichen Intensitätsanstieg des Magnesium-Signals, der darauf zurückgeführt werden könnte, dass das bivalente Ion in der Phase der Mineralformation einen wichtigen Co-Faktor für Kalzium und Phosphor darstellt [25]. Überwiegend anerkannt ist die These, dass Magnesium eine Art begleitendes Ion für Kalzium und Phosphor in mineralisierenden Geweben wie Dentin oder Knochen darstellt [101]. Der Zeitpunkt der Magnesium-Anreicherung fällt mit dem Beginn der Mineralformation zusammen. Auch Wiesmann et al. [101] zeigen anhand des Vergleichs der Verteilung und Ablagerung von Magnesium in Prädentin und Dentin, dass das Ion während der frühen Phase der Mineralformation angereichert wird und das Hartgewebe später nur noch einen geringen Magnesiumanteil aufweist.

Auch andere Studien belegen den Einfluss von Magnesium auf die Kristallgröße und die Ausdehnung des Gitterwerks [6, 11, 65, 96].

Dennoch muss die genaue Rolle von Magnesium in verschiedenen Stadien der Mineralformation und -kristallisation noch geklärt werden.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
BSA:	Bovine Serum Albumin
BSP:	Bone Sialoprotein
bzw.:	beziehungsweise
Ca:	Kalzium
cm:	Zentimeter
CO:	Collagen-Typ I
d.h.:	das heißt
et al.:	et alii (und Mitarbeiter)
FITC:	Fluoreszeinisothiocyanat
FN:	Fibronectin
Ga:	Gallium
IIE-Bild:	Ionen-induziertes Elektronen-Bild
K/s:	Kühlraten pro Sekunde
K:	Kalium
K:	Kelvin
Mg:	Magnesium
mm:	Millimeter
µm:	Mikrometer
n:	Probenumfang / Anzahl der Proben
nm:	Nanometer
ON:	Osteonectin
P:	Phosphor
PBS:	Phosphat Buffered Saline
s.:	siehe
S.:	Seite
Si:	Silizium
SNMS:	Secondary Neutral Mass Spectrometry
Tab.:	Tabelle

TBST:	Tris Buffered Saline mit 0,1% Tween 20
TOF-SIMS:	Time of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry
U/min:	Umdrehungen pro Minute
z.B.:	zum Beispiel

6 Literaturverzeichnis

1. Achilles W (1987)
Crystallization in gel matrices: a new experimental model of calcium stone formation
Contrib. Nephrol. 58: 59-64
2. Achilles W, Jockel U, Schaper A, Burk M, Riedmiller H (1995)
In vitro formation of “urinary stones”: generation of spherulites of calcium phosphate in gel and overgrowth with calcium oxalate using a new flow model of crystallization
Scanning Microsc 9: 577-585
3. Alford AI, Hankenson KD (2005)
Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling and regeneration
Bone [Epub ahead of print]
4. Althoff J, Quint P, Krefting ER, Höhling HJ (1982)
Morphological studies on the epiphyseal growth plate combined with biochemical and x-ray microprobe analysis
Histochemistry 74: 541-552
5. Anselme K (2000)
Osteoblast adhesion on biomaterials
Biomaterials 21: 667-681
6. Aoba T, Moreno EC, Shimoda S (1992)
Competitive adsorption of magnesium and calcium ions onto synthetic and biological apatites
Calcif Tissue Int 51: 143-150
7. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB (1990)
Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured

- fetal calvaria cells
J Cell Physiol 143: 213-221
8. Auf'mkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER (1985)
Characterization of human bone cells in culture
Calcif Tiss Int 37: 228-235
9. Ayad S, Boot-Handford R, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth (1998)
The extracellular matrix. Facts book
Academic Press, San Diego
10. Benninghofen A, Rüdener FG, Werner HW (1987)
Ion mass spectrometry: Basic concepts, instrumental aspects, applications and trends
Chem Anal 86
11. Bigi A, Foresti E, Gregorini R, Ripamonti A, Roveri N, Shah JS (1992)
The role of magnesium on the structure of biological apatites
Calcif Tissue Int 50: 439-444
12. Bindermann I, Greene RM, Pennypacker JP (1979)
Calcification of differentiating skeletal mesenchyme in vitro
Science 206: 222-225
13. Boskey AL, Maresca M, Doty S, Sabsay B, Veis A (1990)
Concentration-dependent effects of dentine phosphoryn in the regulation of in vitro hydroxyapatite formation and growth
Bone Miner 11: 55-65
14. Boskey AL (1995)
Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: Effects on mineralization
Ann NY Acad Sci 760: 249-256

15. Boskey AL (1996)
Matrix proteins and mineralization: An overview
Connective Tissue Research 35: 357-363
16. Bradt JH, Mertig M, Teresiak A, Pompe W (1999)
Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation
Chem. Mater. 11: 2694-2701
17. Brüning C (2004)
Anwendung der Hauptkomponentenanalyse zur Auswertung massenspektrochemischer Untersuchungen an Proteinproben
Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
18. Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Schmidt J (1990)
Bone formation of osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture
Calcif Tiss Int 46: 46-56
19. Couchourel D, Escoffier C, Rhoanizadeh R, Bohic S, Daculsi G, Fortun Y (1999)
Effects of fibronectin on hydroxyapatite formation
J Inorg Biochem 73: 129-136
20. Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA (1998)
Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development
Calcif Tissue Int 62: 74-82
21. Daculsi G, Bouler JM, LeGeros RZ (1997)
Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials
Int Rev Cytol 172: 129-191
22. Daculsi G, Pilet P, Cottrel M, Guicheux G (1999)
Role of fibronectin during biological apatite crystal nucleation: Ultrastructural

- characterization
J Biomed Mater Res 47: 228-233
23. Dallas SL, Keene DR, Bruder SP, Saharinen J, Sakai LY, Mundy GR, Bonewald LF (2000)
Role of the latent transforming growth factor beta binding protein 1 in fibrillin-containing microfibrils in bone cells in vitro and in vivo
J Bone Miner Res 15: 68-81
24. Dambach S (2002)
Analyse von gefriergebrochenen und gefriergetrockneten Zellkulturen mit TOF-SIMS und Laser-SNMS
Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
25. Dambach S, Fartmann M, Kriegeskotte C, Brüning C, Hellweg S, Wiesmann HP, Lipinsky D, Arlinghaus HF (2004)
TOF-SIMS and laser-SNMS analysis of apatite formation in extracellular protein matrix of osteoblasts in vitro
Surf Interface Anal 36: 711-715
26. Dambach S, Fartmann M, Kriegeskotte C, Brüning C, Wiesmann HP, Lipinsky D, Arlinghaus HF (2004)
Laser-SNMS analysis of apatite formation in vitro
Applied Surface Science 231-232: 506-509
27. Deiwick M, Glasmacher B, Pettenazzo E, Hammel D, Castellon W, Thiene G, Reul H, Berendes E (2001)
Primary tissue failure of bioprotheses: new evidence from in vitro tests
J Thorac Cardiovasc Surg 49: 78-83
28. Doi Y, Horiguchi T, Kim SH, Moriwaki Y, Wakamatsu N, Adachi M, Ibraki K, Moriyama K, Sasaki S, Shimokawa H (1992)
Effects of nicht-collagenous proteins on the formation of apatite in Ca- β -

- glycerophosphate solutions
Arch Oral Biol 37: 15-21
29. Echlin P (1992)
Low-temperature microscopy and analysis
Plenum Press, New York
30. El-Amin SF, Lu HH, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan RS, Laurencin CT (2002)
Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering
Biomaterials 24: 1213-1221
31. Endo A (1987)
Potential role of phosphoprotein in collagen mineralization – an experimental study in vitro
J Orthop Assoc 61: 563-569
32. Epple M, Lanzer P (2001)
How much interdisciplinarity is required to understand vascular calcifications?
Formulation of four basic principles of vascular calcification
Z Kardiol 90: III/2-III/5
33. Epple M, Dorozhkin SV (2002)
Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten
Angew Chem 114: 3260-3277
34. Epple M (2003)
Biomaterialien und Biomineralisation
Teubner Verlag, 126
35. Erhmann RL, Gey GO (1956)
The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen
J Natl Cancer Inst 16: 1375-1403

36. Fartmann M, Dambach S, Kriegeskotte C, Lipinsky D, Wiesmann HP, Wittig A, Sauerwein W, Arlinghaus HF (2003)
Subcellular imaging of freeze-fractured cell cultures by TOF-SIMS and Laser-SNMS
Applied Surface Science 203-204: 726-729

37. Fisher LW, McBride OW, Termine JD, Young MF (1990)
Human bone sialoprotein: deduced protein sequence and chromosomal localization
J Biol Chem 265: 2347-2351

38. Flores ME, Norgard M, Heinegard D, Reinholt FP, Andersson G (1992)
RGD directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein and fibronectin
Exp Cell Res 201: 526-530

39. Franceschi RT, Iyer BS (1992)
Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells
J Bone Miner Res 7: 235-246

40. Franceschi RT, Iyer BS, Cui Y (1994)
Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells
J Bone Min Res 9: 843-854

41. Gehron Robey P, Bianco P, Termine JD (1992)
The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation
Disorders of bone and mineral metabolism, 241-263

42. George A, Silberstein R, Veis A (1995)
In situ hybridization shows Dmp 1 (AG1) to be a developmentally regulated dentin-specific protein produced by mature odontoblasts
Connect Tissue Res 33: 67-72

43. Gerstenfeld LC, Lian JB, Gotoh Y, Lee DD, Landis WJ, McKee MD, Nanci A, Glimcher MJ (1989)
Use of cultured embryonic chicken osteoblasts as a model of cellular differentiation and bone mineralization
Connect Tissue Res 21: 215

44. Giachelli C (2001)
Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation
Z Kardiol 90: III/31-III/37

45. Globus RK, Doty SB, Lull JC, Holmuhamedov E, Humphries MJ, Damsky CH (1998)
Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts
J Cell Sci 111: 1385-1393

46. Gorski JP (1992)
Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization
Calcif Tissue Int 50: 391-396

47. Green J, Schotland S, Stauber DJ, Kleeman CR, Clemens TL (1995)
Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells
Am J Physiol 268: C 1090-1103

48. Hagenhoff B (1993)
Sekundärmassenspektrometrie an molekularen Oberflächenstrukturen
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

49. Hartig M, Joos U, Wiesmann HP (2000)
Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro
Eur Biophys J 29: 499-506

50. Höhling HJ, Arnold S, Barckhaus RH, Plate U, Wiesmann HP (1995)
Structural relationship between the primary crystal formations and the matrix macromolecules in different hard tissues. Discussion of a general principle
Connect Tissue Res 33: 171-178

51. Huc A, Planche C, Weiss M, Mannschott P, Chapin F, Chabrand D (1975)
Study of pig valve heterografts by x-ray diffraction
J Biomed Mater Res 9: 79-95

52. Hunter GK, Goldberg HA (1993)
Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein
Proc Nat Acad Sci USA, 8562-8565

53. Hynes RO, Yamada KM (1982)
Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins
J Cell Biol 95: 369-377

54. Ibraki K, Termine JD, Whitson SW, Young MC (1992)
Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts
J Bone Min Res 7: 743-754

55. Jayaraman M, Meyer U, Bühner M, Joos U, Wiesmann HP (2004)
Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro
Biomaterials 25: 625-631

56. Jones SJ, Boyde A (1977)
The migration of osteoblasts
Cell Tiss Res 184: 179-193

57. Kawaguchi H, McKee MD, Okamoto H, Nanci A (1993)
Immunocytochemical and lectin-gold characterization of the interface between alveolar bone and implanted hydroxyapatite in the rat
Cells Mat 3: 337-350

58. Kennedy SB, Washburn NR, Simon CG, Amis EJ (2006)
Combinatorial screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation
Biomaterials 27: 3817-3824
59. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ (2003)
Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion
J Biomed Mater Res 66A: 247-259
60. Kim KM (2001)
Cellular mechanism of calcification and its prevention in glutaraldehyde treated vascular tissue
Z Kardiol 90: III/99-III/105
61. Kornblihtt AR et al. (1985)
Primary structure of human Fibronectin: Differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene
EMBO J 4: 1755-1759
62. Landis WJ, Hodgens KJ, Song MJ, Arena J, Kiyonaga S, Marko M (1996)
Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging
J Struct Biol 117: 24-35
63. Landis WJ (1999)
An overview of vertebrate mineralization with emphasis on collagen-mineral interaction
Gravit Space Biol Bull 12: 15-26
64. LeGeros RZ (1974)
Variations in the crystalline components of human dental calculus. I. crystallographic
J Dent Res 53: 45-50

65. LeGeros RZ, Daculsi G, Kijkowska R, Kerebel B (1989)
The effect of magnesium on the formation of apatites and withlockites. In: Itokawa Y, Durlach J (eds.) *Magnesium in Health and Disease*
John Libbey & Co. Ltd., New York
66. LeGeros RZ (1991)
Calcium phosphates in oral biology and medicine
Monogr Oral Sci 15: 1-201
67. Lindl T (2002)
Zell- und Gewebekultur
Spektrum Akad Verlag, 172-174
68. Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB (1995)
The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotyp in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: Modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization
Exp Cell Res 216: 35-45
69. Masi L, Malentacchi C, Benvenuti S, Amedei A, Bigozzi U, Montali E, Brandi ML (2000)
In vitro expression of proalpha 1 (I) collagen mRNA by human pre-osteoclastic cells
Endocrinol Invest 23: 1-4
70. McDonald JA, Kelley DG, Broekelmann TJ (1982)
Role of fibronectin in collagen deposition: Fab' to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracellular matrix
J Cell Biol 92: 485-492
71. Mergenhagen SE, Martin GR, Rizzo AA, Wright DN, Scott DB (1960)
Calcification in vivo of implanted collagen
Biochim Biophys Acta 43: 563-565

72. Merle B, Durussel L, Delmas PD, Clezardin P (1999)
Decorin inhibits cell migration through a process requiring its glycosaminoglycan side chain
J Cell Biochem 75: 538-546
73. Meyer U, Szulczewski DH, Möller K (1993)
Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterials
Eur Cell Mater 3: 129
74. Miyata T, Taira T, Noishiki Y (1992)
Collagen engineering for biomaterial use
Clin Mater 9: 139
75. Moursi AM, Damsky CH, Lull J, Zimmermann D, Doty SB, Aota S, Globus RK (1996)
Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation
J Cell Sci 109: 1369-1380
76. Moursi AM, Globus RK, Damsky CH (1997)
Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro
J Cell Sci 110: 2187-2196
77. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990)
Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix
J Cell Physiol 143: 420-430
78. Pettenazzo E, Deiwick M, Tiene G, Molin G, Glasmacher B, Martignago F, Bottio T, Reul H, Valente M (2001)
Dynamic in vitro calcification of bioprosthetic porcine valves: evidence of apatite

- crystallization
J Thorac Cardiovasc Surg 121: 500-509
79. Plate U, Tkotz T, Wiesmann HP, Stratmann U, Joos U, Höhling HJ (1996)
Early mineralization of matrix vesicles in the epiphyseal growth plate
J Microsc 183: 102-107
80. Roach HI (1994)
Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption
Cell Biol Int 18: 617-628
81. Romberg WR, Werness PG, Riggs BL, Mann KG (1986)
Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bonespecific and other calcium-binding proteins
Biochem 25:1176-1180
82. Rulle H (1991)
Entwicklung und Erprobung einer gepulsten 30 kV Flüssigmetallionenquelle
Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
83. Sato K, Adachi T, Matsuo M, Tomita Y (2005)
Quantitative evaluation of threshold fiber strain that induces reorganization of cytoskeletal actin fiber structure in osteoblastic-cells
J Biomech 38: 1895-1901
84. Schroeder H (1969)
Formation and inhibition of dental calculus
J Periodontol 40: 643-646
85. Schwieters J (1992)
Abbildende molekulare Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie
Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

86. Sigmund P (1969)
Theory of sputtering I. Sputtering yield of amorphous and polycrystalline targets
Phys Rev 184: 383
87. Sigmund P (1972)
Collision theory of displacement damage, ion ranges and sputtering
Rev Roum Phys 17: 823
88. Sinha RK, Tuan RS (1996)
Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopaedic implant materials
Bone 18: 451-457
89. Sivakumar P, Czirok A, Rongish BJ, Divakara VP, Wang YP, Dallas SL (2006)
New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts
J Cell Sci 119: 1350-1360
90. Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M (2002)
Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC
Conn Tiss Res 43: 308-319
91. Stary HC (2000)
Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression
Z Kardiol 89: II/28-II/35
92. Stratmann U, Schaarschmidt K, Wiesmann HP, Plate U, Höhling HJ (1996)
Mineralization during matrix-vesicle-mediated mantle dentine formation in molars of albino rats: a microanalytical and ultrastructural study
Cell Tissue Res 284: 223-230
93. Suelter CH (1970)
Enzymes activated by monovalent cations
Science 168: 789-795

94. Termine JD, Kleinmann HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981)
Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen
Cell 26: 99-105
95. Tomazic BB (2001)
Physiochemical principles of cardiovascular calcification
Z Kardiol 90: III/68-III/80
96. Tsuboi S, Nakagaki H, Ishiguro K, Kondo K, Mukai M, Robinson C, Weatherell JA, (1994)
Magnesium distribution in human bone
Calcif Tissue Int 54: 34-37
97. Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA (2005)
Identification of type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction
J Biol Chem 280: 13487-13492
98. Weiner S, Traub W, Wagner HD (1999)
Lamellar bone: structure-function relations
J Struct Biol 126: 241-255
99. Weiner S, Wagner HD (2000)
Bone fractures
Bone 27: 875-876
100. Wiesmann HP, Höhling HJ, Zierold K, Barckhaus RH (1995)
Elemental distributions in predentin associated with dentin mineralization in rat incisor
Connect Tissue Res 33: 179-184
101. Wiesmann HP, Tkotz T, Joos U, Zierold K, Stratmann U, Szuwart T, Plate U, Höhling HJ (1997)

- Magnesium in newly formed dentin mineral of rat incisor
J Bone Miner Res 12: 380-383
102. Wiesmann HP, Chi L, Stratmann U, Plate U, Fuchs H, Joos U, Höhling HJ (1998)
Sutural mineralization of rat calvaria characterized by atomic-force microscopy and
transmission electron microscopy
Cell Tissue Res 294: 93-97
103. Wiesmann HP, Plate U, Zierold K, Höhling HJ (1998)
Potassium is involved in apatite biomineralization
J Dent Res 77: 1654-1657
104. Wiesmann HP, Hartig M, Stratmann U, Meyer U, Joos U (2001)
Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in in vitro
Biochimica et Biophysica Acta 1538: 28-37
105. Wiesmann HP, Nazer N, Klatt C, Szuwart T, Meyer U (2003)
Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-
dimensional collagen gel
J Oral Maxillofac Surg 61: 1455-1462
106. Wintermantel E, Ha SW (2002)
Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren
Springer, Heidelberg
107. Young MF (2003)
Bone matrix proteins: their function, regulation and relationship to osteoporosis
Osteoporos Int 14 (Suppl 3): 35-42
108. Zhao W, Byrne MH, Wang Y, Krane SM (2000)
Osteocyte and osteoblast apoptosis and excessive bone deposition accompany failure
of collagenase cleavage of collagen
J Clin Invest 106: 941-949

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank geht an:

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. Ulrich Joos für die Möglichkeit in seinem Institut an dieser Arbeit forschen zu dürfen,

Herrn Priv. Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann für die Vermittlung dieser Arbeit und die Anregung zu diesem Thema, sowie für die fachliche Unterstützung,

Frau Irene Grabiniok für die ausgezeichnete technische Assistenz und den Nachschub an Zellen und Materialien,

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, ganz besonders Noorul Nazer für seine Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima,

Steffen Dambach und Christoph Brüning aus der Arbeitsgruppe Physik für die Vermessung der Ionenproben, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die stete Hilfsbereitschaft bei allen auftretenden Fragen zur SNMS,

alle Freunde und Studienkollegen, die mich im Laufe des gesamten Studiums begleitet und unterstützt haben,

und insbesondere an meine Eltern und meine Schwester, die mich während der ganzen Zeit nach Kräften unterstützt haben und ohne deren Beitrag dieses Studium nicht möglich gewesen wäre.

8 Lebenslauf
