

Aus der Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie
des Charité Centrums 3 der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**In-vitro-Untersuchung des Adhäsions-,
Proliferations- und Genexpressionverhaltens von
Primärosteoblasten auf verschiedenen
Oberflächen in Abhängigkeit von der Stimulation
mit PTH 1-34**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Pawel Schwartzmann

aus Orhej, Rep. Moldova

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. dent. A. Friedmann
 2. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. M. Klein
 3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. W.-D. Müller

Datum der Promotion: 03.06.2012

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XII
1. Einleitung.....	1
1.1 Osseointegration im Hintergrund vorliegender Arbeit.....	1
1.2 Reaktion des Gewebes auf die Implantatoberflächen.....	2
1.2.1 Osteoinduktion	2
1.2.2 Osteokonduktion.....	3
1.2.3 Osteointegration	4
1.3 Veränderungen der Implantatoberfläche in periimplantärem Gewebe.....	5
1.4 Implantatmaterialien.....	5
1.5 Oberflächenmorphologie der Implantate.....	6
1.5.1 SLActive.....	8
1.6 Erkenntnisse aus der Literatur über Oberflächen im Vergleich.....	10
1.7 Parathormon (PTH)	12
1.8 Biochemische Marker der Knochenformation	14
1.8.1 Alkalische Phosphatase (ALP).....	14
1.8.2 Fibronectin (FN).....	15
1.8.3 Typ-I-Kollagen (KOL I).....	15
1.8.4 Osteocalcin (OC)	16
1.8.5 Osteonectin (ON).....	16
1.8.6 Osteopontin (OP).....	17
1.8.7 Runt-related transcription factor-2 (RUNX 2)	17
1.8.8 Zement Protein 1 (Cemp1)	18
1.8.9 Parathormon-Rezeptor Typ 1 (PTHR1)	18
1.8.10 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Standardgen.....	19
2. Problemstellung und Zielsetzung	20
3. Material und Methode.....	22
3.1 Kultivierung humaner Osteoblasten	22
3.2 Prüfkörper und Zellaussaat.....	23
3.3 Stimulation der Osteoblasten mit PTH 1-34	25

3.4	Aufbau der Gruppen für die Genexpressions-, Adhäsions- und Proliferationsuntersuchungen	28
3.4.1	Aufbau der Gruppen – Untersuchung der Adhäsion	28
3.4.2	Aufbau der Gruppen – Untersuchung der Proliferation	28
3.4.3	Aufbau der Gruppen – Untersuchung der Genexpression.....	29
3.5	Untersuchung der Vitalität, Morphologie und Zellausbreitung von Osteoblasten.....	30
3.6	Untersuchung der Proliferation der Osteoblasten.....	31
3.7	Genexpressionsuntersuchung mittels Real Time PCR.....	33
3.7.1	RNA-Präparation	33
3.7.2	Photometrische Bestimmung der RNA	34
3.7.3	Reverse Transkription	35
3.7.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.7.5	Nachweis der Produkte.....	39
3.7.6	TOPO Cloning, Sequenzierung und Herstellung der Standards	40
3.7.7	Real Time PCR.....	45
3.8	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	47
4.	Ergebnisse	48
4.1	Untersuchung der Vitalität von primären humanen Osteoblasten.....	48
4.2	Adhäsion der Primärosteoblasten	53
4.2.1	Untersuchung des Adhäsionsverhaltens anhand photometrischer Methoden ...	55
4.2.2	Untersuchung der Adhäsionsmarker	57
4.3	Proliferation der Primärosteoblasten	59
4.4	Genexpression von Primärosteoblasten.....	61
4.4.1	mRNA-Expressionen von ALP	62
4.4.2	mRNA-Expressionen von CEMP 1	64
4.4.3	mRNA-Expressionen von FN.....	66
4.4.4	mRNA-Expressionen von KOL I	68
4.4.5	mRNA-Expressionen von OC	70
4.4.6	mRNA-Expressionen von ON	72
4.4.7	mRNA-Expressionen von OP.....	74
4.4.8	mRNA-Expressionen von PTH R1	76
4.4.9	mRNA-Expressionen von RUNX 2	78
5.	Diskussion	80

5.1	Diskussion der Methodik.....	80
5.2	Untersuchung der Adhäsion von Osteoblasten.....	83
5.3	Untersuchung der Zellproliferation von Osteoblasten	85
5.4	Untersuchung der Genexpression der Osteoblasten.....	86
5.4.1	Genexpression ALP (alkalische Phosphatase)	86
5.4.2	Genexpression CEMP 1 Cementoblastoma-Zellenprotein.....	88
5.4.3	Genexpression von Fibronectin (FN)	88
5.4.4	Genexpression von Kollagen I (KOL I)	89
5.4.5	Genexpression Osteocalcin (OC)	89
5.4.6	Genexpression Osteonectin (ON).....	91
5.4.7	Genexpression Osteopontin (OP).....	91
5.4.8	Genexpression runt-related transcription factor-2 (RUNX2).....	92
5.4.9	Genexpression PTH R1	94
5.5	Überlegungen zur Rolle von PTH bei der Integration eines Implantats	95
5.6	Überlegungen zur Rolle der Hydrophilität bei der Oseointegration	96
6.	Zusammenfassung.....	98
7.	Literaturverzeichnis	101
8.	Eidesstattliche Erklärung.....	111
9.	Lebenslauf.....	112
10.	Danksagung	113

Abkürzungsverzeichnis

α2HS-Glycoprotein	Alfa 2-Heremans-Schmid- <i>glycoprotein</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
<hr/>	
A / cm²	Korrosionsstromdichte
ATPase	Adenosintriphosphatase
BIC	Implantat-Knochen-Kontakt
<hr/>	
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
Ca	Calcium
CA	Carboanhydrase
Ca⁺⁺/PKC-System	Calcium/Proteinkinase C-System
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAMP/PKA-System	cyclisches Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A-System
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
CEMP 1	Zementblastrenmarker 1
CFU-F	Colony forming unit fibroblastic
DMEM	Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
FKS	Fetales Kälberserum
Fn	Fibronectin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HA	Hydroxylapatit
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-BP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IL	Interleukine
KOL I	Kollagen I
MAPK	Mitogen-Activated Protein <i>Kinase</i>
MG Färbung	Masson-Goldner- Färbung
MG-Zellen	Osteosarkomazellen
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
OC	Osteocalcin

ON	Oseonectin
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
P	Phosphat
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Plasma Derived Growth Factors
PDL-Zellen	Parodontale Ligamentfibroblasten
PGE2	Prostaglandine 2
PK	Proteinkinase
PL	Kunststoff
PLC	Phospholipase C
PMMA	Polymethylmethacrylat (Knochenzement)
PT	Poliertes Titanium
PTH	Parathormon
PTH R1	Parathormon-Rezeptor 1
PTHrP	Parathormon related Protein
<hr/>	
Ra	Rauhigkeit
RANK	receptor activator of NFkB
RANKL	receptor activator of NFkB-ligand
RT	Reverse Traskriptase
RT-PCR	Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
RUNX	Runt related Protein
S	Schwefel
SLA	sandgestrahlt und / oder acid etched
SLActive	Chemisch modifizierte SLA
TGF	Transformin Growth Factors
TGF	Transforming Growth Factor
TGF-β 1	Tumor Growth Faktor beta 1
Ti	Titanium
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPS	Plasma-Spray-Implantaten
μg	Mikrogramm

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kontaktwinkel an hydrophilen und hydrophoben Festkörperoberflächen aus der Dissertation von Böing, Jürgen, Modifizierung von Glas- und Titanoberflächen zur Verbesserung von Biokompatibilität (2003).....	10
Abbildung 3:	Die Wirkung des PTH über die cAMP- und PKA-vermittelte Aktivierung des PTH-Rezeptors aus (Charles C. Capen, Calcium-regulating hormones, a metabolic bone disease)	13
Abbildung 4:	Anordnung der Prüfkörper in der 96-Well-Platten	24
Abbildung 5:	Anordnung der Prüfkörper in 24-Well-Platten	25
Abbildung 7:	Daten aus der fluorometrischen Untersuchungseichkurve.	32
Abbildung 8:	Osteoblasten aus den Gruppen (PTH 0), (PTH 6) und (PTH 48) nach 6-tägigem Kontakt mit der Kunststoffoberfläche (PL) im Vergleich (200-fache Vergrößerung)	49
Abbildung 9:	Osteoblasten aus den Gruppen (PTH 0), (PTH 6) und (PTH 48) nach 6-tägigem Kontakt mit der polierten Titaniumoberfläche (PT) im Vergleich (200-fache Vergrößerung).....	50
Abbildung 10:	Osteoblasten aus den Gruppen (PTH 0), (PTH 6) und (PTH 48) nach 6-tägigem Kontakt mit der SLA-Oberfläche im Vergleich (200-fache Vergrößerung).....	51
Abbildung 11:	Osteoblasten aus den Gruppen (PTH 0), (PTH 6) und (PTH 48) nach 6-tägigem Kontakt mit der SLActive-Oberfläche im Vergleich (200-fache Vergrößerung)	52
Abbildung 12:	Adhäsion von Osteoblasten auf den Oberflächen nach 24 Stunden ohne PTH (200-fache Vergrößerung)	53
Abbildung 13:	Adhäsion von Osteoblasten auf den Oberflächen nach 24 Stunden im PTH angereicherten Medium (200-fache Vergrößerung).....	54
Abbildung 14:	Daten aus der fluorometrischen Adhäsionsuntersuchung – Stimulatinsarten im Vergleich.	55
Abbildung 15:	Daten aus der fluorometrischen Adhäsionsuntersuchung.	56
Abbildung 16:	RT-PCR-Daten aus der Adhäsionsuntersuchung.	57
Abbildung 17:	RT-PCR-Daten aus der Adhäsionsuntersuchung.	58
Abbildung 18:	RT-PCR-Daten aus der Adhäsionsuntersuchung.	58
Abbildung 19:	Daten aus der fluorometrischen Untersuchung der Zellproliferation..	59
Abbildung 20:	Daten aus der fluorometrischen Untersuchung der Zellproliferation..	60
Abbildung 21:	Nachweis der Spezifität der angewandten Primer in der RT-PCR	61
Abbildung 22:	Nachweis der Spezifität der angewandten Primer in der RT-PCR	61
Abbildung 23:	RT-PCR-Daten aus der ALP-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	62
Abbildung 24:	RT-PCR-Daten aus der ALP-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.....	63
Abbildung 25:	RT-PCR-Daten aus der CEMP 1-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	64
Abbildung 26:	RT-PCR-Daten aus der CEMP 1-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.....	65
Abbildung 27:	RT-PCR-Daten aus der FN-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	66
Abbildung 28:	RT-PCR-Daten aus der FN-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.....	67

Abbildung 29:	RT-PCR-Daten aus der Kol 1-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	68
Abbildung 30:	RT-PCR-Daten aus der Kol 1-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.	69
Abbildung 31:	RT-PCR-Daten aus der OC-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	70
Abbildung 32:	RT-PCR-Daten aus der OC-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.	71
Abbildung 33:	RT-PCR-Daten aus der ON-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	72
Abbildung 34:	RT-PCR-Daten aus der ON-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.	73
Abbildung 35:	RT-PCR-Daten aus der OP-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	74
Abbildung 36:	RT-PCR-Daten aus der OP-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.	75
Abbildung 37:	RT-PCR-Daten aus der PTH R1-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	76
Abbildung 38:	RT-PCR-Daten aus der PTH R 1-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.	77
Abbildung 39:	RT-PCR-Daten aus der RUNX 2-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.	78
Abbildung 40:	RT-PCR-Daten aus der RUNX 2-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beispiele für Oberflächenkonditionierungen	7
Tabelle 2:	Untersuchte Oberflächen	24
Tabelle 3:	Zusammensetzung des CyQUANT NF Kit (Molecular Probes, USA)	33
Tabelle 4:	Mastermix für die Reverse Transkriptase.....	36
Tabelle 5:	Verwendete Primer für die RT-PCR	38
Tabelle 6:	Mastermix für PCR.....	39
Tabelle 7:	Zyklen bei der PCR	39
Tabelle 8:	Mastermix für TOPO Cloning.....	42
Tabelle 9:	Zusammensetzung des RT-Puffers.....	44
Tabelle 10:	Primermix	46
Tabelle 11:	Zyklen bei der RT-PCR.....	47

1. Einleitung

Bei der vorliegenden Dissertation handelt es sich um eine In-vitro-Arbeit, die vergleichend angelegt ist und darauf abzielt, herauszufinden, wie Osteoblasten von verschiedenen Oberflächen beeinflusst werden. Eine weitere Aufgabe besteht darin, zu vergleichen, wie sich eine Stimulation mit PTH (50 ng/ml) in drei verschiedenen Stimulationsmodi auswirkt. Die Modi sind eine permanente Stimulation (PTH 48), eine intermittierende (PTH 6), oder die Zellen auf den Versuchsträgern werden gar nicht stimuliert (PTH 0). Vor der Entwicklung der konkreten Fragestellungen gilt es, die Termini zu klären und den Stand der Forschung zu umreißen.

1.1 Osseointegration im Hintergrund vorliegender Arbeit

Der Terminus „Osseointegration“ ist von Branemark als ein „direkter und struktureller Verbund zwischen dem organisierten, lebenden Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Implantates“ definiert. Nicht zuletzt dank der Beschreibung der Osseointegration von Branemark et al. und Schröder et al. sowie des Nachweises der Anwendbarkeit durch Adell et al. kann die Fachwissenschaft mittlerweile auf mehr als 40 Jahre Erfahrung mit endossalen Dentalimplantaten zurückblicken (Adell et al., 1981, Branemark et al., 1969, Schroeder A, 1976).

Nach Albrektsson et al. üben die folgend aufgeführten Faktoren einen Einfluss auf die Osteointegration von Implantaten aus (Albrektsson et al., 1981):

- Implantatmaterial – Art und Zusammensetzung
- Implantatdesign – Makrodesign
- Oberflächenqualität – Mikrodesign
- Knochendichte – Wirtqualität
- chirurgisches Vorgehen – Planung und Fertigkeit des Operateurs
- biomechanische Belastungen – Wirtbeanspruchung

Auf der Grundlage der Analyse der Forschungsliteratur kommt Masuda (1998) zu den nachstehenden vier Postulaten für die Osseointegration (Masuda et al., 1998):

- Histomorphometrische Analysen liefern Hinweise darauf, dass die Knochenmenge am Interface nicht in Korrelation zu dem biomechanischen Verhalten steht.

- Alle Untersuchungen zur Osseointegration müssen sämtliche Interaktionen zwischen Implantatoberfläche und den für die Knochenbildung verantwortlichen Zellen berücksichtigen.
- Sowohl das Modelling als auch das Remodelling sind unerlässlich in Bezug auf eine dauerhafte Osseointegration.
- Die Mikroumgebung kann als eine Plattform des Zellverhaltens auf der Oberfläche des Implantats betrachtet werden.

Die Integration eines Implantats in den Knochen initiiert komplexe biologische Prozesse, in welchen nicht allein das periimplantäre Gewebe auf das Implantat reagiert, sondern ebenso die Implantatoberfläche strukturelle Veränderungen als Reaktion auf das Gewebe erfährt (Nanci et al., 1998a, Puleo and Nanci, 1999). Im Rahmen der Osseointegration vollzieht sich mithin eine Interaktion zwischen der Oberfläche der Implantate und den knochenbildenden Zellen. Die Erforschung dieser biologischen Ereignisse auf der Implantat-Knochen-Oberfläche kann dabei helfen, die periimplantäre Osseogenese zu verbessern, wobei das Ziel verfolgt wird, eine optimale Integration zwischen Implantat und Knochen zu schaffen sowie eine schnellere, sicherere und vorhersagbarere Einheilung der Implantate zu erzielen (Puleo and Nanci, 1999).

1.2 Reaktion des Gewebes auf die Implantatoberflächen

Die als „Knochen-Implantat-Interface“ bezeichnete Übergangszone beschreibt die organische Schicht zwischen dem alloplastischen Material und der mineralisierten Knochenmatrix. Um die Reaktion zwischen der Oberfläche eines implantierten Materials und dem Knochengewebe im Laufe der Einheilungsphase besser erfassbar zu machen, unterteilen Albrektsson und Johansson die Implantateinheilung in drei Phasen: Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteointegration (Albrektsson and Johansson, 2001). Diese Phasen gilt es im Nachfolgenden näher zu bestimmen.

1.2.1 Osteoinduktion

Osteoinduktion ist der Teilprozess der Einheilungsphase, bei dem durch die Migration und die Differenzierung mesenchymaler Zellen die Knochenneubildung induziert wird. Der Ablauf ist wie folgt zu beschreiben:

Unmittelbar nach der Aufbereitung der Implantationsstelle füllt sich diese mit Blut, mit welchem die Implantatoberfläche in Berührung kommt (Albrektsson and Johansson,

2001). Zwischen der Knochen- und der Implantatoberfläche entsteht ein Knochen-Implantat-Spalt, der eine Breite von 100 μm (Futami et al., 2000) bis 500 μm (Listgarten, 1996) aufweisen kann. Morphologisch befindet sich in diesem Spalt eine heterogene Masse aus Blut und knöchernen Geweberesten. Das im Blut enthaltene Fibrinogen, das durch Thrombin zu Fibrin umgewandelt wird, lagert sich auf der Implantatoberfläche ab und leitet die Zellen zum Implantat hin (Davies, 1996).

Die Knochenwunde setzt neben extrazellulärer Flüssigkeit und nichtkollagenen Proteinen die Wachstumsfaktoren TGF und PDGF frei. Diese Wachstumsfaktoren stimulieren die Proliferation und Differenzierung der Osteoprogenitorzellen aus dem Knochenmark und dem Periost zu Osteoblastenvorläuferzellen und Osteoblasten (Schenk and Buser, 1998).

Eine in-vivo-Studie von Meyer et al. zeigt, dass sich Osteoblasten bereits am ersten Tag nach der Implantatinserktion auf der Implantatoberfläche festsetzen und eine 20 bis 50 nm breite Schicht bilden (Meyer et al., 2004). Andere Forschungsarbeiten bestätigen ebenfalls, dass die Osteoblasten sehr früh damit beginnen, eine nichtkollagene Matrix-Schicht auf der Implantatoberfläche auszubilden (Albrektsson and Hansson, 1986, Davies, 1996, Davies and Campbell, 1990, Linder, 1985, Meyer et al., 2004, Murai et al., 1996, Nanci et al., 1994). Diese Schicht ist reich an nichtkollagenen Proteinen, Osteocalcin (OC), Osteopontin (OP), Bonesialoproteinen (BSP) sowie bestimmten Plasma-Proteinen, wie etwa das α2HS -Glykoprotein (Ayukawa et al., 1998, Nanci et al., 1998b).

Diese Proteine lagern sich folglich auf der Implantatoberfläche ab. Die Adsorption ist abhängig von den biochemischen Eigenschaften einer Titanoberfläche, wie z. B. der Oxidschicht (Johansson et al., 1989, Lausmaa and Linder, 1988, Nanci et al., 1998b, Valkonen et al., 1986).

1.2.2 Osteokonduktion

Im Zuge dieses Teilprozesses der Einheilung kommt es zur Zellverteilung und zum Knochenwachstum auf der Implantatoberfläche (Albrektsson and Johansson, 2001). Während dieser Phase, einige Tage nach der Implantation, beginnen die Osteoblasten mit der Sezernierung der nichtkollagenen Proteine, wie (IGF I, II), *fibroblast growth factor* (FGF), TGF und *platelet-derived growth factor* (PDGF). Diese Faktoren bewirken eine Vaskularisierung des Gebietes, andererseits stimulieren sie die Vermehrung, Differenzierung und Funktion der Knochenzellen direkt auf der Implantatoberfläche. Die

Osteoblasten sezernieren den organischen Teil der Knochenmatrix, das Typ-I-Kollagen, welcher an der Implantatoberfläche bindet. (Albrektsson and Johansson, 2001, Davies, 1996, Davies and Campbell, 1990, Johansson et al., 1989, Linder, 1985, Murai et al., 1996, Nanci et al., 1998a, Puleo and Nanci, 1999).

Im nächsten Schritt heftet sich Calciumphosphat und andere Mineralien aus den Blutgefäßen an die sezernierten Kollagenfasern an und bildet fächerförmige Kristalle aus. Diese erste amorphe Schicht hat eine Breite von 20 bis 500 nm und ist reich an Kalzium, Phosphor, Osteopontin sowie Sialoprotein (Albrektsson and Johansson, 2001, Davies, 1996, Davies and Campbell, 1990, Johansson et al., 1989, Linder, 1985, Murai et al., 1996, Nanci et al., 1998a, Puleo and Nanci, 1999). Wenn dann Blutgefäße in das erste kalzifizierende Fasergeflecht hineinwachsen, spricht man vom Geflechtknochen (Davies, 1996).

Im Tierversuch kann am siebten Tag nach der Implantation bereits trabekulärer Knochen beobachtet werden, der infolge der zunehmenden Mineralisierung des Geflechtknochens sowie Ausrichtung der Kollagenfasern in der Matrix zustande kommt (Franchi et al., 2004).

1.2.3 Osteointegration

Die Osteointegration schließt den Prozess der Einheilung ab. In ihrem Verlauf wird der gebildete Geflechtknochen durch den lamellaren Knochen ersetzt (Schenk and Buser, 1998). Der Ablauf ist wie folgt kurz zu skizzieren:

In der initialen Phase der Osteointegration wird der Geflechtknochen durch Osteoklasten resorbiert; die Osteoblasten bilden eine neue Knochen-Matrix (Lind, 1998). Die Stimulierung der Osteoklasten wird vom Parathyroidhormon (PTH), von Parathyroid-Related Peptiden (PTHrP), Prostaglandin-E₂ und anderen Zytokinen reguliert (Canalis, 1983a, Canalis, 1983b, Canalis and Lian, 1988).

Während der Resorption setzt die resorbierte Matrix Wachstumsfaktoren frei (Canalis, 1983a, Canalis, 1983b, Canalis and Lian, 1988). TGF-beta ist in diesem Stadium möglicherweise daran beteiligt, eine kontinuierliche Osteoklasten-Aktivität zu verhindern (Chenu et al., 1988).

In kontinuierlichen Schritten wird mit der Mineralisierung des Geflechtknochens mehr lamellarer Knochen gebildet. Chappard et al. beschreiben eine vollständige Umwandlung

des trabekulären Knochens in lamellaren Knochen innerhalb von acht Wochen (Chappard et al., 1999). Sobald die Implantate osseointegriert sind, kommt es zu einem ständigen Umbau des periimplantären Knochens (Puleo and Nanci, 1999).

1.3 Veränderungen der Implantatoberfläche in periimplantärem Gewebe

Abgesehen von komplexen biologischen Prozessen der Zellen auf dem Implantat lassen sich im Anschluss an die Implantation zudem erhebliche strukturelle Veränderungen auf der Implantatoberfläche als Reaktion auf das Gewebe erwarten. Dies ist gemäß Puleo und Nanci ein wesentlicher Faktor für die Osseointegration (Puleo and Nanci, 1999).

Die Oxidschicht scheint bei der Implantateinheilung eine erhebliche Rolle zu spielen und für die biochemischen Eigenschaften der Titanoberfläche verantwortlich zu sein (Johansson et al., 1989, Lausmaa and Linder, 1988, Nanci et al., 1998a, Nanci et al., 1998b, Valkonen et al., 1986). Lausmaa et al. hat gängige kommerzielle Ti-Implantate mit einer Oxidschicht von 2 bis 6 nm analysiert. Nach der Explantation dieser Implantate betrug die Oxidschicht das Zwei- bis Dreifache vom Ausgangswert (Lausmaa and Linder, 1988).

Darüber hinaus konnten analytische Untersuchungen belegen, dass die chemische Zusammensetzung des Oxids mit der Aufnahme von Ca, P und S eine andere war (Lausmaa and Linder, 1988, Valkonen et al., 1986).

Als weitere Interaktion zwischen Implantat und Gewebe ist die Freisetzung der Metall-Ionen zu nennen, welche lokal oder peripher nachgewiesen werden kann (Puleo and Nanci, 1999). Diese Ionen werden im Zusammenhang mit der Entstehung von Allergien diskutiert (Wang et al., 2008).

1.4 Implantatmaterialien

Die Implantatmaterialien müssen eine erfolgreiche Osseointegration und ein Fortbestehen des Implantats im Knochen gewährleisten. Daher spielen in der dentalen Implantologie bei der Wahl des Implantatmaterials dessen biologische und mechanische Eigenschaften die entscheidende Rolle. So muss das Material biokompatibel, formstabil, mechanisch belastbar und radioopak sein (Joos et al., 2006).

Seit der Beschreibung der Titanoberfläche durch Branemark (Branemark et al., 1969) ist Titan mittlerweile unbestritten das Material erster Wahl für Dentalimplantate, da es den Anforderungen der Biokompatibilität am besten entspricht.

Buser hat die biokompatiblen Materialien in biotolerant, bioaktiv und bioinert klassifiziert (Buser et al., 1999).

Als biokompatibel bezeichnet man solche Werkstoffe, die keinen negativen Einfluss auf Lebewesen in ihrer Umgebung haben. Besonders relevant ist die Biokompatibilität von Implantaten deshalb, da sich diese für einen langen Zeitraum in unmittelbarem Kontakt zu einem Lebewesen – zum Träger des Implantats – befinden (Breme et al., 1988).

Eine wesentliche Bedeutung für die Korrosionsbeständigkeit und damit für die Gewebeverträglichkeit hat die sich in Anwesenheit von Sauerstoff auf der Titanoberfläche ausbildende Oxidschicht, wie einleitend oben schon beschrieben wurde. Die Schichtdicke hängt von der Oberflächenbearbeitung, der Rauigkeit und dem Sterilisationsverfahren ab und bildet sich bereits nach einer Sekunde Kontakt mit Luft aus (Pistorius and Willershausen, 2002).

Des Weiteren zeigen werkstoffkundliche Studien auf, dass das leichte Material Titan sowohl eine hohe Zug- als auch Bruchfestigkeit besitzt, womit es dem Kaudruck und der orthodontischen Belastung optimal standhält. Die beiden heutigen verwendeten Arten sind zum einen das Reintitan, zum anderen die Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung Ti6Al4V. Das Reintitan gibt es in vier verschiedenen Graden, die sich hauptsächlich im Sauerstoffanteil unterscheiden (Linkow, 1969, Newesely, 1983).

Weitere Implantatmaterialien, die als Alternative für Titan vorgeschlagen wurden, sind die folgenden drei:

- Tantal (Alberius, 1983)
- Zirkonium (Thomsen et al., 1997)
- Hafnium (Mohammadi et al., 2001)

1.5 Oberflächenmorphologie der Implantate

Die Oberflächemorphologie ist nach Albrektsson et al. ein weiterer Faktor, der auf die periimplantäre Heilung und damit die Osseointegration des Implantates einwirkt. Die Oberfläche wird durch das Zusammenspiel all ihrer mikromechanischen, topographi-

schen und physikochemischen Eigenschaften charakterisiert (Albrektsson and Johansson, 2001).

Oberflächen von Implantaten können generell auf verschiedene Arten hergestellt werden. Dabei können, wie in Tabelle (1) aufgeführt, subtraktive, additive und kombinierte Konditionierungsverfahren unterschieden werden.

Konditionierungsverfahren	Beispieloberflächen
subtraktiv	
Abstrahlen mit verschiedenen Partikeln unterschiedlicher Größe wie Sand, Al_2O_3 und TiO_2 Säureätzung mit HCl/H_2SO_4	TiOblast Osseotite®
Kombination subtraktiver Verfahren	
sandgestrahlt + säuregeätzt sandgestrahlt + säuregeätzt + hydroxyliert gestrahlt + geätzt	SLA SLActive Promote®
additiv	
Titanplasmabeschichtung	TPS
Kombination von subtraktiven und additiven Verfahren	
säuregeätzt + CaP beschichtet TiO_2 -gestrahlt + fluoridmodifiziert gestrahlt + HA beschichtet elektrochemische Verfahren	NanoTite™ OsseoSpeed™ TiUnite™

Tabelle 1: Beispiele für Oberflächenkonditionierungen

Eine Beschichtung der Oberfläche mit Hydroxylapatit (HA) kann mit verschiedenen Herstellungsmethoden erfolgen, neuerdings mit einem Laser (Shirakura et al., 2003). HA bildet eine mechanische Barriere für die Metall-Ionen-Freisetzung (Schepers et al., 1988) oder Titan-Partikel (Martini et al., 2003).

Bei einem anderen additiven Verfahren wird eine Titan-Plasma-Spray (TPS)-Oberfläche erzeugt. Hierbei wird reines Titanpulver mittels einer 20.000 °C heißen Plasmaflamme auf oberflächlich aufgeschmolzen. Es entsteht eine dünne Schicht, welche eine Rautiefe von 15 µm aufweist (Spiekermann et al., 1995). Eine mögliche Freisetzung von Titan-

partikeln aufgrund der erhöhten Biokorrosion ($1.12 \pm 0.12 \text{ IA cm}^2$) ist derzeit Gegenstand fachlicher Diskussionen (Henry and Schibli, 1987, Simon et al., 2005).

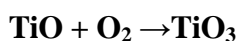
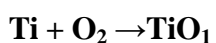
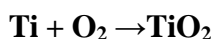
Technisch weniger aufwendig sind dagegen die subtraktiven Verfahren zur Erzeugung eines Mikroreliefs. Eine raue Oberfläche kann hierbei mittels Bestrahlen mit abrasiven Pulvern geschaffen werden, wobei häufig eine Sand-, TiO_2 - oder Al_2O_3 -Bestrahlung eingesetzt wird. Weiterhin ist eine raue Struktur mit einem Ätzmuster zu erreichen. Dazu wird die Titanoberfläche für eine bestimmte Zeit einer Säure ausgesetzt. Das Bestrahlen sowie das Ätzen resultieren in eher spitzen, zackigen Strukturen. Man wendet diese beiden Verfahren außerdem in Kombination miteinander an. Zunächst findet die Bestrahlung und im Anschluss daran die Säurebehandlung statt (SLA-Oberfläche), wodurch simultan eine Reinigung der Oberfläche folgt.

Ebenso findet eine Kombination von additiven und subtraktiven Verfahren bei der Herstellung von Implantatoberflächen Verwendung.

1.5.1 SLActive

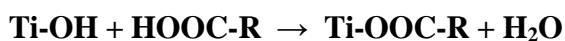
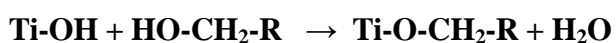
Bei der Herstellung einer SLActive-Oberfläche (Handelsname: SLActive®, Institut Straumann AG, Basel, Schweiz), also einer chemisch modifizierten, sandgestrahlten und säuregeätzten Oberfläche, werden SLActive-Implantate zuerst einmal analog zur SLA-Oberfläche sandgestrahlt und säuregeätzt, wodurch eine identische Makro- und Mikrostruktur realisiert wird. Im weiteren Schritt wird in einem speziellen Produktionsprozess in Stickstoffatmosphäre die SLActive-Oberfläche generiert. Die Implantate kommen ausschließlich mit Stickstoff in Kontakt, sodass sich hierbei kein Verunreinigungsfilm ausbilden kann. Die hydrophile Oberfläche bleibt erhalten, und bei der isolierten Aufbewahrung der Implantate in einer Lösung aus Natriumchlorid geht die Hydrophilie nicht verloren (Rupp et al., 2006).

Zum besseren Verständnis des Herstellungsprozesses ist anzuführen, dass Titan eine hohe Affinität zu Sauerstoff aufweist und eine wenige Nanometer dicke Oxidschicht (TiO , TiO_2 , TiO_3) an der Luft ausbildet.



In wässrigem Milieu liegt die Oberfläche dieser Oxidschicht hydroxyliert vor und reagiert amphoter, d. h. sowohl als Säure als auch als Base. Entsprechend besitzt die hydroxylierte Schicht der Titanoberfläche hydrophile Eigenschaften (Rupp et al., 2006).

Sollten allerdings SLA-Oberflächen im Verlauf des weiteren Produktionsprozesses luftgetrocknet werden, so kann die hydrophile Schicht nicht mehr aufrechterhalten werden. Bei Lagerung an Luft ist eine Verunreinigung der Oberfläche mit organischen Molekülen unvermeidbar. Neben der Adsorption von Kohlenwasserstoffen wurde in geringem Umfang die Reaktion mit Alkoholen und Carbonsäuren unter Bildung von Alkoxiden bzw. Carboxylaten nachgewiesen (Sittig, 1998).



Die Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Titanoxidschicht kann wiederum zu einer Abnahme der freien Oberflächenenergie der Oxidschicht sowie zur Zunahme des Kontaktwinkels führen (Rupp et al., 2004, Rupp et al., 2006, Taborelli et al., 1997). Dies ist aus folgenden Gründen von Bedeutung für vorliegende Untersuchung: Die Benetzbarkeit einer Oberfläche wird primär durch den Kontaktwinkel bestimmt, in dem sich ein Flüssigkeitstropfen zur Oberfläche eines Stoffes befindet. Die Größe dieses Kontaktwinkels zwischen Flüssigkeit und Feststoff hängt in erster Linie von der Wechselwirkung zwischen den Stoffen an der Berührungsfläche ab. Je geringer diese Wechselwirkung ausfällt, desto größer wird der Kontaktwinkel. In dem speziellen Fall der Verwendung von Wasser als Flüssigkeit wird die Oberfläche bei geringem Kontaktwinkel (ca. 0°) als ultra-hydrophil bezeichnet, während sie bei Winkeln um 90° als hydrophob und bei noch größeren Winkeln als ultra-hydrophob bezeichnet wird. In der Studie von Rupp et al. Aus dem Jahr 2006 resultiert, dass der Kontaktwinkel von SLActive 0° beträgt, der von der SLA-Oberfläche ist $139,88^\circ$ und von der polierten Titanoberfläche $91,31^\circ$ (Rupp et al., 2006). In der Abb.1 ist am Beispiel des liegenden Tropfens der Kontaktwinkel bei hydrophilen und hydrophoben Festkörperoberflächen dargestellt. Auf Basis der Bestimmung der Kontaktwinkel können spezifische Eigenschaften der Oberfläche eines Feststoffs identifiziert werden, wie z. B. die freie Oberflächenenergie. Diese Oberflächenenergie stellt ein Maß für den gesamten Energieinhalt einer Festkörperoberfläche dar, welches als ein Äquivalent zu der Oberflächenspannung bei Flüssigkeiten anzusehen ist (Sittig, 1998). Die Reinheit der Titanoberfläche hat also einen

direkten Einfluss auf die initiale Benetzbarkeit, Diese wiederum laut Boyan et.al einen signifikanten Einfluss auf die Bioadhäsion sowie „Osteoafinität“ der Implantate (Boyan et al., 2002, Schwarz et al., 2007a).

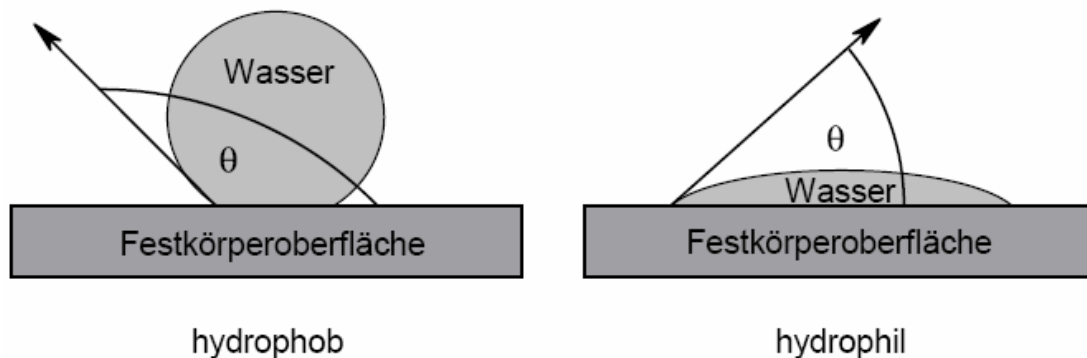


Abbildung 1: Kontaktwinkel an hydrophilen und hydrophoben Festkörperoberflächen aus der Dissertation von Böing, Jürgen: „Modifizierung von Glas- und Titanoberflächen zur Verbesserung von Biokompatibilität (2003)“

1.6 Erkenntnisse aus der Literatur über Oberflächen im Vergleich

Die Ergebnisse von in-vitro- sowie in-vivo-Versuchen diverser Autoren weisen darauf hin, dass die Beschaffenheit einer Implantatoberfläche Aspekte des zellulären Verhaltens sowohl im umliegenden Knochen als auch im Weichgewebe beeinflusst: beispielsweise die Migration, Adhäsion, Proliferation, Differenzierung, Mineralisation, Morphologie und die Orientierung von Zellen (Cooper, 1998, Masuda et al., 1998, Mustafa et al., 2001, Piattelli et al., 1996, Ramirez et al., 2003, Sader et al., 2005, Schneider et al., 2003, Zinger et al., 2004).

Glatte Oberflächen begünstigen die Adhäsion und Proliferation humaner Fibroblasten, was entscheidend für das Weichgewebsmanagement sein kann. Auf rauher Oberfläche wird hingegen die Knochenanlagerung schneller vollzogen. Dies konnte am signifikant höheren Knochen-Implantat-Kontakt gezeigt werden (Buser et al., 1991, Cochran et al., 1996). Die Vergrößerung der Implantatoberfläche durch Rauigkeit kann die Protein- und Zelladhäsion verbessern (Kasemo and Gold, 1999). Die Rauigkeit beeinflusst zudem die Synthese von zwei lokalen Faktoren, TGF β 1 und PGE2, welche über parakrine Mechanismen auf Osteoklasten wirken (Boyan et al., 1999, Boyan et al., 2002, Marco et al., 2005, Orsini et al., 2000, Schwartz et al., 1996). Und schließlich: An rauen

Oberflächen haften leichter Thrombozyten (Davies, 2003, Park JY, 2000) und Monozyten beim ersten Blut-Implantat-Kontakt (Soskolne et al., 2002).

Die Erkenntnis, dass Oberflächen das Zellverhalten ändern können, führte zu der Entwicklung von neuen, sogenannten bioaktiven, modifizierten Oberflächen mit dem Ziel der Verbesserung und Beschleunigung der Osseointegration (Albrektsson and Wennerberg, 2005).

Bei wissenschaftlichen Untersuchungen über die modifizierte SLActive-Oberfläche im Vergleich zur konventionellen SLA-Oberfläche konnten auf SLActive-Implantatoberflächen eine signifikant höhere Zellhaftung und eine höhere Zellproliferationsrate von MG63-Osteoblasten im Vergleich zur SLA-Oberfläche nachgewiesen werden. Weiterhin war in der SLActive-Gruppe die Synthese von alkalischer Phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC) sowie lokalen Wachstumsfaktoren (PGE2 und TGF- β 1) signifikant erhöht (Masaki et al., 2005, Zhao et al., 2005).

Im Rahmen einer tierexperimentellen Studie von Schwarz et al. konnten die dynamischen Vorgänge der frühen Einheilphasen enossaler SLA- und SLActive-Titanimplantate beschrieben werden. Anhand der MG-Färbung war erkennbar, dass das Blutkoagulum an hydrophilen SLActive-Implantatoberflächen deutlich stabiler war. Die Implantat-Knochen-Kontakt (BIC)-Werte, die nach sieben und 14 Tagen an SLActive-Implantaten ermittelt wurden, lagen signifikant höher als bei SLA-Implantaten.

Ebenso gibt es offenbar Unterschiede beim jeweils neu gebildeten Knochen auf den beiden Implantatoberflächen. Während nach einer definierten Zeit an SLA-Implantaten lediglich eine zunehmende Verdichtung in der Geflechtknochenbildung zu beobachten war, zeigten SLActive-Implantate bereits die Anlagerung lamellarer Knochenstrukturen (Schwarz et al., 2007a). Schließlich weisen die SLActive-Implantate nach Einheilphasen von zwei, vier und acht Wochen bedeutsam höhere Ausdrehmomente (8 bis 21 %) auf als die entsprechenden Implantate der SLA-Kontrollgruppe (Ferguson et al., 2006).

1.7 Parathormon (PTH)

Das Parathormon ist ein Polypeptid, welches in den Nebenschilddrüsen gebildet wird und aus einer Sequenz von 84 Aminosäuren besteht. Die primäre Funktion des Parathormons ist die Regulation des Calcium-Spiegels im Blut. Beim Absinken des Spiegels kommt es zu einer erhöhten PTH-Sekretion, umgekehrt wird die Produktion bei erhöhten Calcium-Werten reziprok gedrosselt (Georg Löffler, 2007). Das Parathormon wurde erstmals von Collip im Jahre 1925 aus den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse extrahiert. Die Aminosäuresequenz des humanen PTHs konnte dann im Jahre 1978 durch Keutmann et al. definiert und hinreichend geklärt werden (Keutmann et al., 1978).

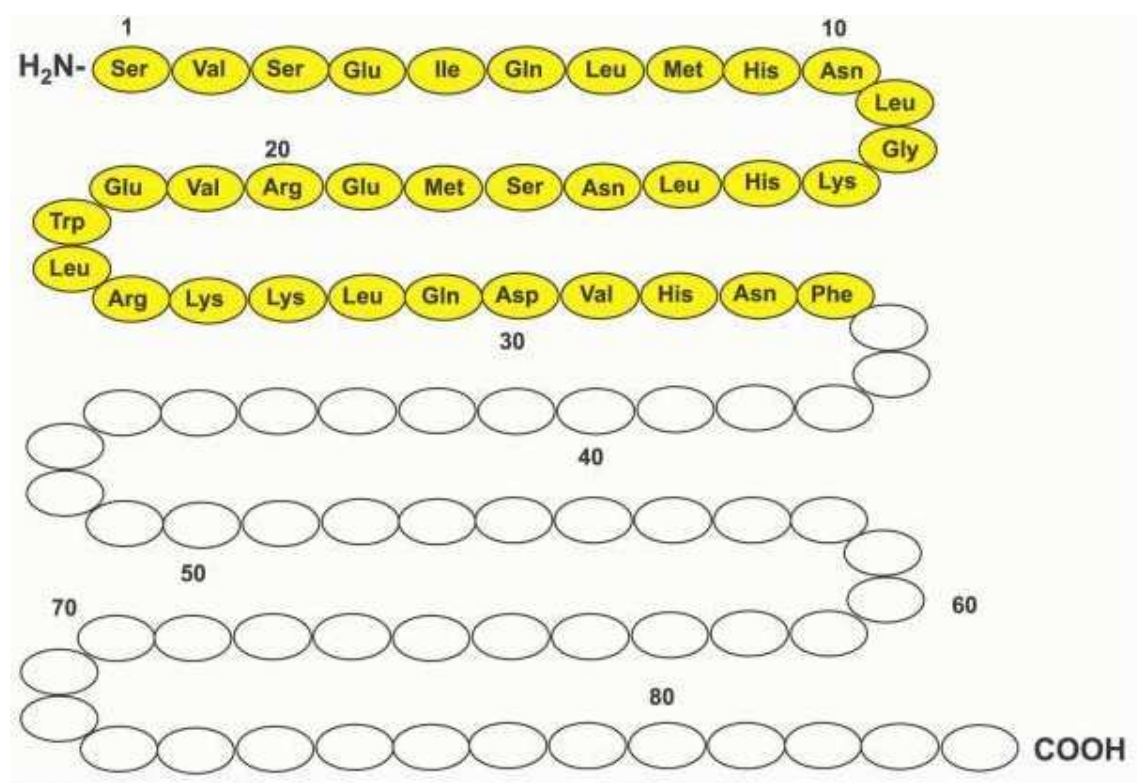


Abbildung 2 Humanes Parathormon. Dobnig H. Journal für Mineralstoffwechsel 2004.

Das „Teriparatid“-Fragment (34 Aminosäuren) hat eine identische Wirkung im Vergleich zum nativen Parathormon (84 Aminosäuren) (Georg Löffler, 2007)

Die Knochen sind nach der Niere die zweite wichtige Wirkstätte von PTH im Körper. Dort steigert PTH die Resorption von mineralisiertem Knochenmaterial, sodass etwa 500 mg Kalzium täglich aus dem Knochen ins Blutplasma transferiert werden. Dabei scheint die Hauptwirkung von PTH über Osteoblasten vermittelt zu werden, obwohl Osteoklasten für den Abbau von Knochen zuständig sind. In diesem Zusammenhang wird eine Aktivierung und Bildung der Osteoklasten über die Osteoblasten und das RANKL/RANK/OPG System diskutiert (Kornak and Mundlos, 2003).

Neben dem osteokatabolen Effekt wird dem PTH eine osteoanabole Wirkung zugesprochen. Diese erstmals von Selye beschriebene Wirkung wird ausschließlich bei intermittierender Gabe von PTH beobachtet und ist immer noch nicht vollständig geklärt (Selye, 1932). Durch kurzzeitige PTH-Stimulation wird eine Zunahme reifer Osteoblasten in den Knochenresorptionszonen, vor allem an der Spongiosa des Knochens, ausgelöst. Im Vordergrund steht die cAMP- und PKA-vermittelte Aktivierung der anti-apoptischen Signalwege im Osteoblasten über den PTH-Rezeptor, was zu einer Zunahme der Osteoblastenzahl führt (Abb. 3). Ferner ziehen kurze PTH-Pulse eine Enddifferenzierung mesenchymaler Stammzellen und eine weitere Zunahme der Osteoblasten nach sich (Ishizuya et al., 1997, Skripitz et al., 2000a, Skripitz et al., 2000b, Uzawa et al., 1995).

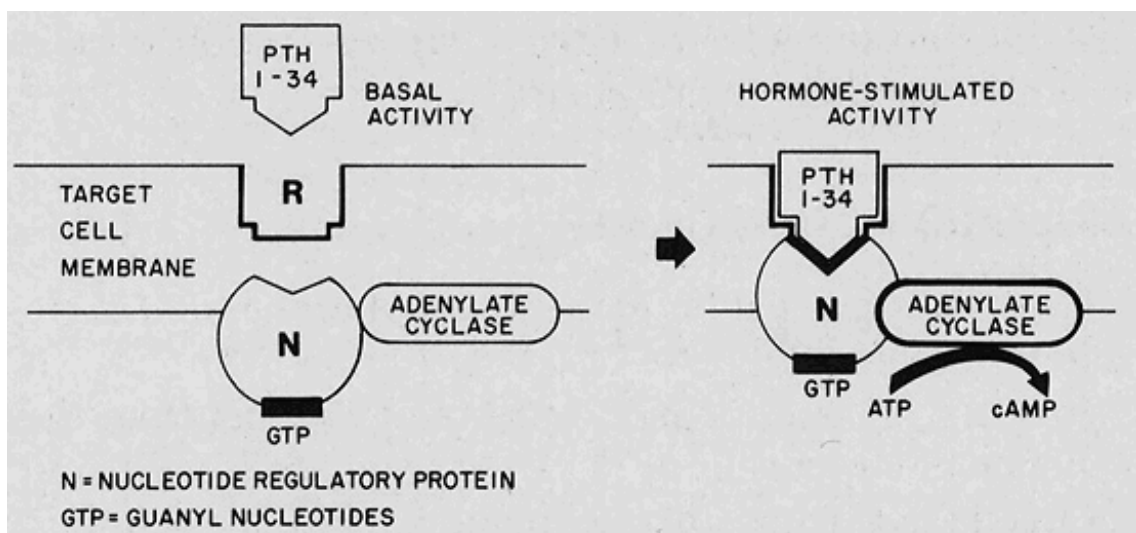


Abbildung 3: Die Wirkung des PTH über die cAMP- und PKA-vermittelte Aktivierung des PTH-Rezeptors aus „Charles C. Capen, Calcium-regulating hormones, a metabolic bone disease.“

Das biologisch aktive PTH bindet an den PTH-Rezeptor an der Oberfläche der Zelle. Der Rezeptor ist an die in der Zellmembran befindliche Adenylatcyclase gebunden. Die Funktion dieses Enzyms wird physiologisch im Rahmen der Signaltransduktion durch G-Proteine reguliert. Die Adenylatcyclase katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat. cAMP hat die Funktion eines Second Messengers. Das Enzym ist also ein Bestandteil der Signalkaskade zur Weiterleitung von Signalen innerhalb von Zellen.

Nach einem weiteren Ansatz geht die Wirkung des PTH auf die veränderte Expression von Genen zurück. Immediate Early Genes sowie Interleukin (IL)-6-mRNA werden bereits nach einer einmaligen Gabe von 80 µgPTH/kgKG vermehrt exprimiert. Sie können für die Steigerung der Zelldifferenzierung und die Abnahme der Zellproliferation verantwortlich sein (Onyia et al., 2005). Wachstumsfaktoren wie der Transforming Growth Factor (TGF), Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1 und die IGF-bindenden Proteine (IGF-BP) 3, 4 und 5 spielen eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel und werden unter PTH-Stimulation vermehrt gebildet (Canalis E., 1989).

Eine Reihe von Studien zur Wirkungsweise von PTH im Zusammenhang mit der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten kommen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. Beispielsweise stimuliert PTH die Proliferation von primären menschlichen Osteoblasten (MacDonald et al., 1986) sowie jene von Primärosteoblasten aus dem Huhn (*chick calvariae*) (Scutt et al., 1994), inhibiert jedoch zugleich die Proliferation der Osteoblasten aus einer Rattenzelllinie (UMR-106) (Kano et al., 1993).

1.8 Biochemische Marker der Knochenformation

1.8.1 Alkalische Phosphatase (ALP)

Bei der alkalischen Phosphatase handelt es sich um ein membranständiges Enzym (Ektoenzym), welches sich in der Form von diversen Isoenzymen in vielen Organen und Geweben des menschlichen Körpers (Leber, Nieren, Darm, Plazenta) befindet; zudem ist es im Knochengewebe nachweisbar (Thiede et al., 1988).

Die Osteoblasten selbst bilden drei Isoformen aus, wobei durchaus ein spezielles Verteilungsmuster innerhalb der einzelnen Knochenkompartimente vorliegen kann. Die alkalische Phosphatase bewirkt die lokale Freisetzung des anorganischen Phosphats und fungiert als ein Calcium bindendes Protein oder auch Ca²⁺-ATPase (Magnusson et al., 1999). Eine erhöhte Serumaktivität der knochenspezifischen ALP ist in den Fällen zu beobachten, in denen das normale Niveau des osteoblastären Umsatzes überschritten

wird. Explizit erfolgt es bei einem verstärkten An- oder Umbau von Knochen während des Wachstums oder bei der Frakturheilung. Es kann aber auch bei der Knochenneubildung, von Knochenmetastasen oder einer Knochenstoffwechselerkrankung vorkommen (Georg Löffler, 2007, Thiede et al., 1988).

1.8.2 Fibronectin (FN)

Fibronectin ist eines der am meisten und besten erforschten Glykoproteine der extrazellulären Matrix. Es existieren zwei Formen des Fibronectins, welches sich einerseits im Blutplasma (pFN) und andererseits in Geweben (cFN) findet. Fibronectin ist für die Zelladhäsion sowie die sich daran anschließende Zelldifferenzierung von zentraler Bedeutung. Hinsichtlich der Zelladhäsion bildet FN eine Schicht zwischen Kollagenfasern und fungiert somit als Verbindung zwischen diesen. Fibronectin bindet an Kollagene des Typs I, II, III, IV und V (MacDonald et al., 1986, Weiss and Reddi, 1981).

Ebenso ist FN relevant für die Differenzierung, Proliferation und Mineralisierung der Osteoblasten. In einer Studie von Moursi et al. wurde in bereits ausdifferenzierten Osteoblasten das Fibronectin mittels Antikörper unterbunden. Das Resultat war, dass die Osteoblasten nicht mehr zur Mineralisation und Knochenbildung imstande waren (Moursi et al., 1996); die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix setzt demnach eine stetige Expression von Fibronectin voraus.

Eine Diskussion findet darüber hinaus statt zur Frage der möglichen Wirkung des FN auf die Chemotaxis der Monozyten und die Sezernierung der Wachstumsfaktoren wie TGF- α - und TGF- β (Groves, 2005).

1.8.3 Typ-I-Kollagen (KOL I)

Aktuell sind 19 verschiedene Typen von Kollagen bekannt, die von mehr als 30 unterschiedlichen Genen kodiert werden (Prockop and Kivirikko, 1995). Typ-I-Kollagen, der bekannteste Vertreter, gehört zu der Gruppe der fibrillären Peptide und findet sich hauptsächlich in Knochen, Haut und Bindegewebe.

Der Beginn der Kollagensynthese in Osteoblasten stellt das essentielle Translationsprodukt – die α -Ketten, welche im endoplasmatischen Retikulum die Prokollagenmoleküle α -Tripelhelix ausbilden. Die α -Tripelhelix ist eine dreifach umeinander gewickelte fadenförmige α -Proteinkette. Extrazellulär werden nicht-helikale C- sowie N-terminale Peptidreste der Prokollagenmoleküle abgespalten. Aus den meisten α -Tripel-

helix resultieren Tropokollagenmoleküle. Diese setzen sich in der Folge zu Fibrillen zusammen; durch eine Quervernetzung mit Lysinseitenketten entsteht eine stabile Struktur. Zusätzlich werden sie über die Aggregation mit Grundsubstanz (beispielsweise Proteoglykane) stabilisiert. In den Kollagenfasern vollziehen sich kontinuierlich Prozesse des Umbaus. Bei diesen Umbauvorgängen wirken sich beständig wandelnde mechanische Beanspruchungen als Reize ganz wesentlich aus (Byers et al., 1995, Prockop and Kivirikko, 1995).

1.8.4 Osteocalcin (OC)

Osteocalcin ist ein vergleichsweise „kleines“ Protein (49 Aminosäuren). Es wird im Knochen von den Osteoblasten gebildet. Osteocalcin bildet einen Teil der extrazellulären nichtkollagenen Knochenmatrix (ein bis zwei Prozent Anteil). Osteocalcin enthält Glutamylreste, welche mithilfe des Kofaktors Vitamin K und des Enzyms γ -Glutamylcarboxylase γ -carboxyliert werden müssen, bevor Osteocalcin im Knochen aktiv Calcium binden kann. Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Hydroxylapatit-Bildung wird Osteocalcin als wichtiger Marker für die Knochenmineralisierung angesehen (Hauschka and Wians, 1989, Neugebauer et al., 1995).

1.8.5 Osteonectin (ON)

Osteonectin ist ein nichtkollagenes Glukoprotein, das ein Molekulargewicht von 32 kDa aufweist. Es wird auch als SPARKS (secreted plasma acidic and rich in cystein) bezeichnet. Das Osteonectin spielt im Rahmen der Umbauprozesse und der Entwicklung von Geweben und im Falle der Wundheilung eine wichtige Rolle. Es interagiert sowohl mit extrazellulären Matrixproteinen als auch mit Zellen, außerdem hat es eine regulierende Wirkung bezüglich der Zell-Matrix-Interaktion (Brekken and Sage, 2001).

Durch posttranslationale Glykosylierung entstehen gewebespezifisch zwei Isoformen: eine sekretierte Form und eine Knochenform. Erstere enthält eine Karbohydrat-Komponente des komplexen Typs mit Sialinsäure und Fukase-Resten, während die Knochenform mit einem manosereichen Karbohydrat-Typ bestückt ist (Lane and Sage, 1994).

Osteonectin hat einen Effekt auf die Hydroxiapatit-Ablagerung sowie die Ossifikation des Knochengewebes. Darüber hinaus bindet es an andere Komponenten der extrazellulären Knochenmatrix, wie z. B. an die Kollagene vom Typ I, III, IV, V und

VIII, Trombospondin und Vitronectin (Lane and Sage, 1994). Ferner wird die Funktion von Osteonectin bei akut entzündlichen Prozessen, bei der Tumorentwicklung und Angiogenese diskutiert, wobei angenommen wird, dass Osteonectin bei der Aktivierung von Neutrophilen eine Rolle spielt (Savani et al., 2000).

1.8.6 Osteopontin (OP)

Osteopontin, oder Bone-Sialoprotein I, wird von Osteoblasten gebildet und ist an der Erhaltung der Knochensubstanz beteiligt. Ein funktionales Charakteristikum ist die Fähigkeit, an Integrine zu binden. Diese Eigenschaft wird durch die RGD-Sequenz vermittelt. Die RGD-Sequenz kommt besonders in Proteinen der extrazellulären Matrix vor, z. B. in Fibronectin und Vitronectin. Zellen können mithilfe von bestimmten Zelloberflächen-Rezeptoren, den Integrinen, an die RGD-Sequenz binden (Bellahcene et al., 2008, Chevallier et al., 2009, Gorski et al., 1997).

Die RGD-vermittelte Zelladhäsion dient der mechanischen Verankerung von Zellen. Daher ist Osteopontin in der Lage, auf einer alloplastischen Oberfläche zu binden und so die Knochenbildung an Implantaten zu fördern (Davies, 1996).

1.8.7 Runt-related transcription factor-2 (RUNX 2)

Der runt-related transcription factor-2 ist im Signalnetzwerk der Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten ein zentrales Element. Zum ersten Mal wurde er 1997 in den Arbeiten von Ducy et al. sowie Komori et al. thematisiert und definiert. Die Expression von Runx2 findet in den mesenchymalen Kondensationen und später in hypertrophen Chondrozyten, Präosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten statt. Die Aktivität von Runx2 wird über den cAMP/PKA-Signalweg durch PTH/PTH R sowie durch Bone morphogenetic proteins (BMPs) und den TGF β -Rezeptor/SMAD-Signalweg verstärkt (Ducy et al., 1996, Ducy et al., 1997, Komori et al., 1997, Komori, 2005, Tintut et al., 1999, Xiao et al., 1998). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Reihe von Faktoren: Co-Repressoren, Co-Aktivatoren ihre Wirkung in Hinsicht auf die Genexpression von Runx2 ausüben (Schroder et al., 2005). Diesbezüglich ist das **bone morphogenetic protein-2 (BMP2)** als ein Faktor herauszustellen, welcher eine Stimulierung der Genexpression von Runx2 initiiert (Gori et al., 1999).

Mit in-vivo-Versuchen an Mäusen konnte belegt werden, dass Runx2 in Bezug auf die Knochenentwicklung ein positiver Regulator von Genen wie Osteocalcin, Matrix

Metalloproteinase 13 (MMP13), Osteopontin, Kollagen I und X ist. Es ist zugleich ein wichtiger Regulator von Indian Hedgehog (Ihh), einem Schlüsselgen der Knorpelentwicklung (Ducy et al., 1997).

1.8.8 Zement Protein 1 (Cemp1)

Der Forschung gelang es erst kürzlich, einen weiteren Marker, das Zement Protein 1 (CEMP1-CP-23), zu isolieren, der in menschlichem Cementoblastoma-Zellenprotein in einem erhöhten Maße exprimiert wird. Des Weiteren ist die Expression in den Progenitorzellen innerhalb der paravaskulären Zone wie auch in den Zellen in endostalen Räumen des Knochengewebes gezeigt worden (Arzate et al., 2002). Mit entsprechenden in-vitro-Experimenten konnte der Beleg dafür erbracht werden, dass CEMP1 bei der Zelldifferenzierung und zudem bezüglich der Adhäsion von Relevanz ist. Außerdem wird dem CEMP 1 die Regulierung der Ablagerung und Zusammensetzung sowie der Morphologie der Hydroxylapatit-Kristalle zugeschrieben.

Carmona-Rodriguez et al. konnten in Untersuchungen zeigen, dass sich Humane Gingiva Fibroblasten (HGF) ohne eine CEMP1-Expression ebenfalls keine OC, BSP, ALP und GAP exprimieren (Carmona-Rodriguez et al., 2007). Da dieses Protein erst vor kurzem beschrieben worden ist, liegt bisher nur wenig Literatur zu diesem Thema vor.

1.8.9 Parathormon-Rezeptor Typ 1 (PTHr1)

Der PTHR1 ist ein membranständiger Rezeptor des Typs 1, der einerseits in der apikalen, andererseits in der basolateralen Zellmembran vorhanden ist. An das G-Protein gekoppelt weist er insgesamt sieben verschiedene Transmembran-Domänen auf und bindet, abgesehen von PTH, auch das sogenannte **parathormon-related peptide** (PTHrP) an sich (Abou-Samra et al., 1992, Mannstadt et al., 1999).

Neben dem PTHR1 existiert noch ein zweiter Subtypus dieses Rezeptors, welcher als PTHR2 bezeichnet wird. Dieser weist die Besonderheit auf, dass er lediglich von PTH, nicht jedoch von PTHrP aktiviert wird. Seine exakte biologische Bedeutung ist bisher allerdings noch nicht umfassend identifiziert worden (Usdin et al., 1995). Ungeachtet der vorhandenen Abweichungen sind beide Rezeptoren gleichermaßen für die Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden zuständig. Zu erwähnen sind hier im Einzelnen (Short and Taylor, 2000):

- die Modulation über die Adenylatzyklase verbunden mit einer Erhöhung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP),
- der Phospholipase-C-Weg in Zusammenhang mit der Bildung von Diacylglycerol (DAG),
- das Inositol-3-Phosphat (IP3) in Verbindung mit einem Anstieg des intrazellulären Ca.

1.8.10 Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Standardgen

Das sog. housekeeping-Gen GAPDH initiiert und katalysiert die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat. Dies ist ein unvermeidlicher Teilprozess der Glykolyse, weswegen das GAPDH-Gen in sämtlichen Zellen eines Körpers exprimiert wird (Tricarico et al., 2002).

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wird oft als Referenzgen bei der Genexpressionsuntersuchung hinzugezogen. In der Fachliteratur ist nur eine geringfügige Beeinflussung der GAPDH-Expression in speziellen zellulären Systemen beschrieben. Da sämtliche Genexpressionen von Markern zum GAPDH relativiert werden, muss das potenzielle Risiko der unvorhergesehenen Beeinflussung daher stets mit bedacht werden (Tricarico et al., 2002). Im Vergleich zu anderen housekeeping-Genen erwies sich die GAPDH-Expression stets, auch unter sehr unterschiedlichen Voraussetzungen und einer Vielzahl von Bedingungen, als überaus stabil (Winer et al., 1999).

2. Problemstellung und Zielsetzung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, konnte in zahlreichen Studien an Menschen und Tieren ein in der Regel positiver Einfluss des Parathormons (PTH) auf den Knochen nachgewiesen werden. In-vivo-Studien, die sich mit Implantatoberflächen beschäftigt haben, konnten neue Erkenntnisse über die zentrale Rolle der Oberflächentopografie bei der Osseointegration sammeln. Vergleicht man allerdings In-vitro-Studien, die die Wirkung des PTH oder einer bestimmten Oberfläche auf die Knochenzellen untersucht haben, zeigt sich, dass die Ergebnisse häufig widersprüchlich sind. Zudem beziehen solche Untersuchungen nur einige Parameter in das Studiendesign ein und zeigen insofern nur ein unvollständiges Bild im Lebenszyklus einer bestimmten Zellart. Ein Zusammenhang zwischen der Oberflächenmorphologie und Stimulation mit PTH ist in der Literatur nicht beschrieben; dabei könnten präzisere Kenntnisse über PTH-induzierte Vorgänge auf Titanoberflächen zu weiteren Errungenschaften in der Implantatforschung beitragen.

Vor dem Hintergrund dieser Problematik sollen für die hier vorliegende Arbeit die Variablen Oberfläche und PTH-Stimulation zum ersten Mal in einem Zellkulturmodell zusammengeführt werden. Die vorliegende In-vitro-Studie an humanen Primär-osteoblasten soll Aufschluss darüber geben, wie diese in ihrer mRNA-Expression und Zellproliferation in den wichtigen Zellzyklusphasen (Adhäsion, Proliferation und Mineralisation) durch das PTH in drei unterschiedlichen Stimulationsmodi beeinflusst werden. Ein weiteres Ziel besteht darin, herauszufinden, wie Osteoblasten von verschiedenen Oberflächen beeinflusst werden.

Untersuchungen des mRNA-Expressionsmusters humaner Primär-osteoblasten im Hinblick auf deren Beeinflussung durch die Faktoren PTH-Stimulation und Oberflächen sollen mithilfe der Real-Time-PCR-Technologie tiefer gehende Einblicke in die Regulationsmechanismen der Osteoblasten geben. Es wird der Frage nachgegangen, wie sich die Expression osteoblastenspezifischer Gene unter dem Einfluss der untersuchten Faktoren verändert. Welche Gene werden stimuliert, welche gehemmt?

Zugleich wird in dieser Arbeit untersucht, welches Expressionsmuster die unbeeinflussten Primär-osteoblasten aus den Gruppen PTH 0 und PL (Kunststoffoberfläche) im Laufe des In-vitro-Versuchs zeigen. Der Vergleich nicht beeinflusster und beeinflusster Primär-

osteoblasten soll die Wirkungsweise von PTH und die Rolle der Oberflächentopographie bei der Osteoblastenmetabolismus in vitro abbilden.

3. Material und Methode

3.1 Kultivierung humaner Osteoblasten

Zum Zwecke der Gewinnung einer Primärkultur von Osteoblasten wurde einer Patientin mit deren Wissen und Zustimmung im Zuge einer Implantat-Operation Knochen aus der Unterkiefer-Front entnommen. Die Knochenentnahme geschah in Einvernehmen mit der Ethikkommission der Charité Universität Berlin.

Unmittelbar nach der Entnahme wurde der Knochen in eine HBSS-Lösung (Hanks` Balanced Salt Solution), angereichert mit 200 µg/ml Streptomycin, 200 U/ml Penicillin und 5 µg/ml Amphotericin B (Seromed Biochrom KG, Berlin), überführt. Im weiteren Verlauf wurde der Knochen unter einer Sterilwerkbank 20 Sekunden lang mit Phosphate Buffered Saline (PBS, 0,1M, pH 7,2, Firma Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland) gespült. Anschließend wurde die Probe mit dem Skalpell in ca. 1 mm große Stücke zerteilt; diese Stücke wurden in eine 25 cm³-Kulturflasche (Nunc GmbH, Deutschland) mit Kulturmedium gelegt. Das Kulturmedium bestand aus Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland), welches mit 10 % fötalem Kälber-Serum (FCS Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland), 5 µg/ml Penicillin, 5 µg/ml Amphotericin B sowie 5 µg/ml nichtessentiellen Aminosäuren für den Proteinstoffwechsel der Zellen angereichert war.

Die Inkubation der Osteoblasten-Primärkultur wurde sieben Tage lang bei 37 °C im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 95 % wasserdampfgesättigter Luft durchgeführt. Um das Anwachsen der Osteoblasten nicht zu stören, wurde die Kulturflasche überaus vorsichtig und behutsam behandelt. Bereits nach sieben Tagen konnten wir in dem Bereich um die Knochenbiopsien einzelne Osteoblasten erkennen, die sich schließlich zu einem konfluenten Zellrasen entwickelten und den Boden der Kulturflasche komplett bedeckten. Im Intervall von zwei bis drei Tagen wurde ein Wechsel des Mediums vollzogen, wobei bei jedem Mediumwechsel 1 ml mehr hinzugegeben wurde. Somit befanden sich vor der ersten Trypsinierung 5 ml Medium in der Kulturflasche.

Sobald die Zelllinie das Stadium der Konfluenz erreicht hatte, wurde eine Passagierung vorgenommen. Hierzu wurde das Medium zunächst abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden anschließend 20 Sekunden lang mit PBS gespült. Nun wurden 5 ml Trypsin (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland) in das Lumen der Kulturflaschen auf den

Zellrasen pipettiert. Die Flaschen wurden jeweils für fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In dieser Zeit sollten sich die Zellen aus dem Zellverband herauslösen. Unter dem Lichtmikroskop wurde danach kontrolliert, inwieweit sich die Zellen abgekugelt und tatsächlich vom Flaschenboden gelöst hatten. Im Anschluss daran versahen wir die Zellsuspension mit dem Kulturmedium (15 ml), um die Wirkung des Trypsins zu antagonisieren. Bei 800 U/min wurde diese Zellsuspension 20 Minuten zentrifugiert. Der aufgetretene Überstand wurde nach dem Zentrifugieren verworfen. Nunmehr wurden 12 ml Medium in eine 75 cm³-Kulturflasche (Nunc GmbH, Deutschland) gefüllt, dabei sollten sämtliche Innenwände der Kulturflasche benetzt werden. Anschließend wurde das entstandene Zellpellet in 3 ml Medium resuspendiert und in die große Kulturflasche pipettiert. Eine Weiterversorgung der Zelllinie in der ersten Passage wurde mit einem wöchentlichen Wechsel des Medium gewährleistet. Zu dem Zeitpunkt, als in der Zelllinie eine Konfluenz beobachtbar war, wiederholten wir die Passagierung. Für unseren Versuch haben wir Osteoblasten aus der 4., 5. und der 6. Passage verwendet, welche unter dem Mikroskop morphologisch alle Anzeichen einer Osteoblasten-Kultur aufwiesen.

3.2 Prüfkörper und Zellaussaat

Es wurden drei unterschiedliche Arten von Titandisks mit jeweils verschiedenen Titanoberflächen verwendet. Zudem galt die Kunststoffoberfläche der Kulturplatten als weitere, vierte untersuchte Oberfläche. Die Titandisks wiesen einen Durchmesser von 1,5 cm und 0,5 cm auf und passen in die handelsüblichen 24-Well- und 96-Well-Zellkulturplatten. Die Titanplättchen mit 1,5 cm Durchmesser wurden für die Genexpressionsbestimmung der Osteoblasten verwendet. Andere Plättchen, welche einen Durchmesser von 0,5 cm besaßen, wurden für die Proliferationsbestimmung verwendet.

Untersuchte Oberflächen:

Bezeichnung	Abkürzung
Kunststoffoberfläche	(PL)
Maschinenhergestellte Ti-Oberfläche (Straumann, Schweiz), Ra ~ 0.12 µm	(PT) (MA)
SLA Titanium, Ra ~ 3.12 µm	(SLA)
Sandgestrahlte und säuregeätzte Titanoberfläche (Straumann, Schweiz)	
SLActive Titanium, Ra ~ 3.12 µm	(SLActive)
Chemisch modifizierte, sandgestrahlte, säuregeätzte Titanoberfläche, unter N ₂ gespült und in isotoner NaCl-Lösung gelagert. (Straumann, Schweiz)	(mod SLA)

Tabelle 2: Untersuchte Oberflächen

Vorbereitung der Zellkulturplatten und Zellaussaat

Vorbereitend wurden zunächst einmal die sterilen 24- und 96-Well-Zellkulturplatten (Nunc GmbH) unter der Sterilarbeitsbank ausgepackt. Anschließend wurden in jedes untersuchte Well 0,5 ml (für 24-Well) bzw. 100 µg (für 96-Well) Kulturmedium gegeben. In einem nächsten Arbeitsschritt wurden zum Zwecke der Dreifachbestimmung jeweils drei Titanplättchen von jeder Sorte unter Verwendung von sterilen Pinzetten aus ihren Behältern entnommen und in die bereits gefluteten Wells gelegt. Die Anordnung der Titandisks in den Kulturplatten ist in Abb. (4) und Abb. (5) illustriert.

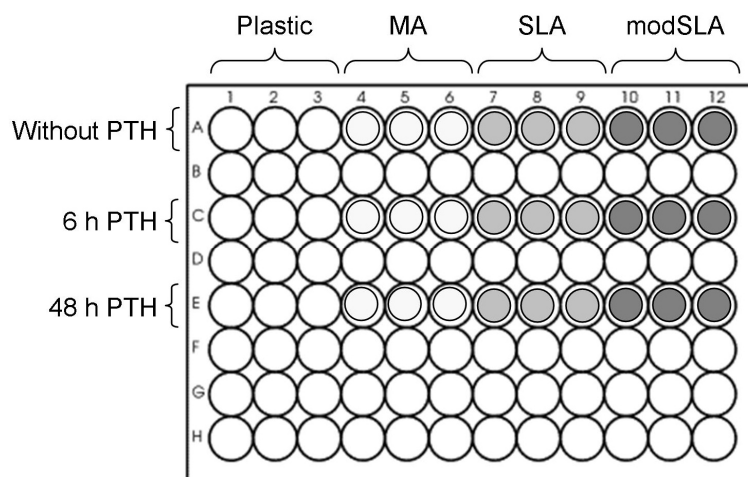


Abbildung 4: Anordnung der Prüfkörper in der 96-Well-Platten

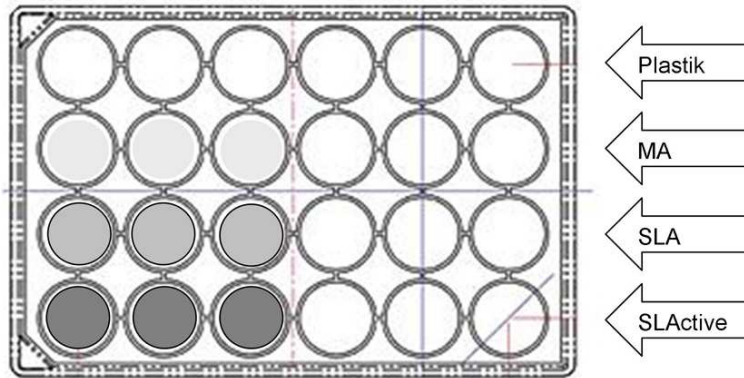


Abbildung 5: Anordnung der Prüfkörper in 24-Well-Platten

Für die nachfolgenden Versuchsansätze wurden Zellsuspensionen von 40.000 Osteoblasten pro ml hergestellt. Die Zellzahlbestimmung im Hämatozytometer wurde gemäß Neubauer (Brand GmbH, Wertheim) durchgeführt, wobei zwei Personen voneinander unabhängig die 16 Quadranten der Neubauer-Kammer separat ausgezählt haben. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde der Mittelwert der Zellenanzahl pro ml definiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in die Zellkulturplatten hineinpipettiert. Ausgehend von der Oberfläche eines Wells und Titanplättchens wurde genau ausgerechnet, wieviel von der Zellsuspension benötigt wurde, um folglich ca. 10.000 Zellen auf cm^2 der untersuchten Oberflächen zu säen. Um sicherzustellen, dass in jedes Well die gleiche Anzahl von Zellen gelangt, wurde die Zellsuspension während dieses Prozesses kontinuierlich durchgemischt. Lediglich bei der Adhäsionsuntersuchung wich die anfängliche Zellanzahl ab: Sie belief sich auf 25.000 Zellen pro cm^2 .

3.3 Stimulation der Osteoblasten mit PTH 1-34

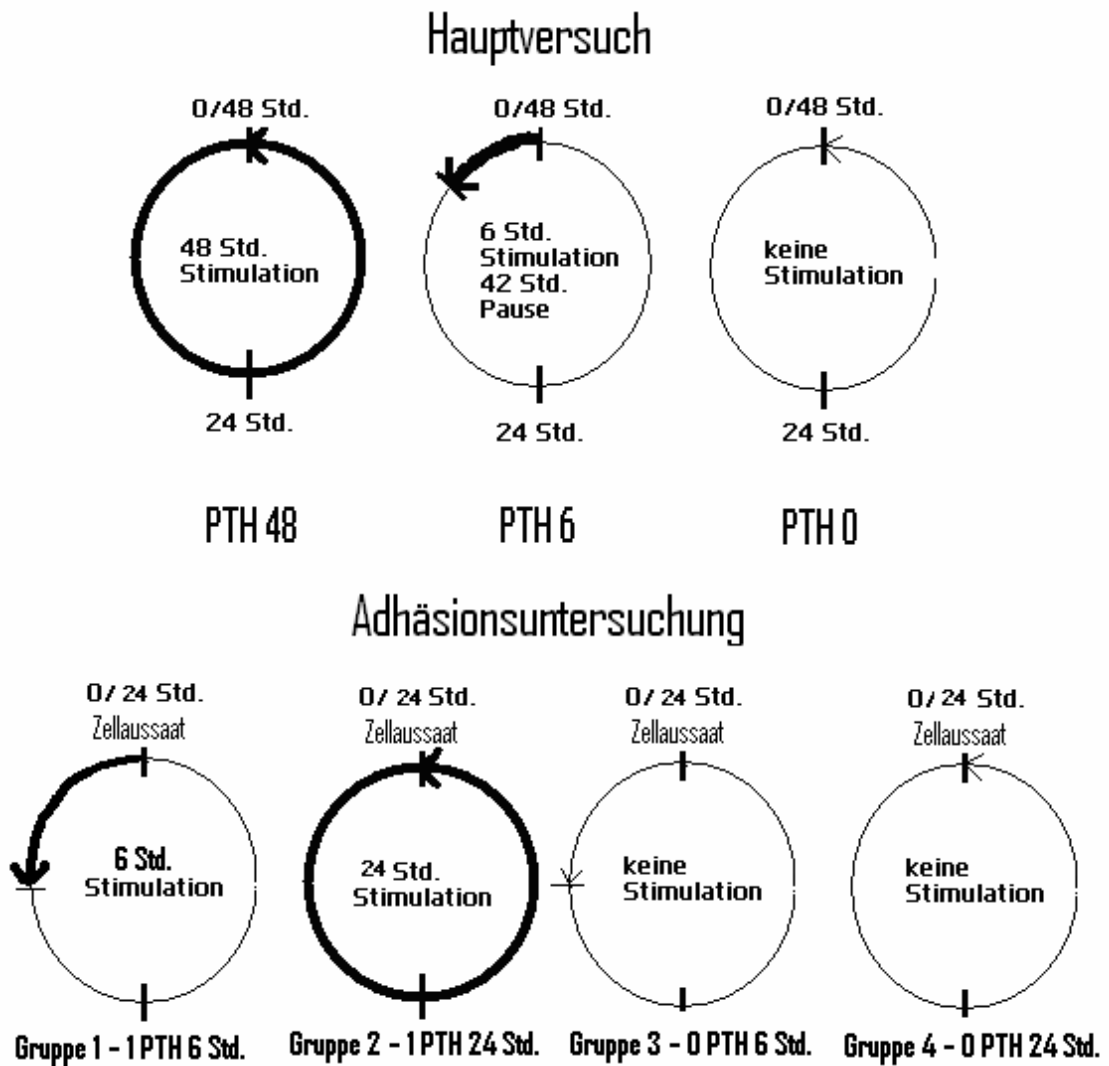
Die Stimulation der Osteoblasten wurde unter Verwendung des synthetisch hergestellten humanen PTH C181H290N55O51S2 (Firma Bachem, Weil am Rhein, Deutschland) durchgeführt. Das wirksame PTH enthielt in diesem Fall 34 Aminosäuren und hatte ein Molekulargewicht von 4117,8 Dalton. Das PTH 1-34 wurde in sterilen Tubes als reines Protein (1 mg/ml) voll lyophilisiert und ohne jegliche Zusatzstoffe geliefert. Die Zusammensetzung der Aminosäuren sah aus wie folgt:

Ala-Val-Ser-Glu-Ile-ILN-Phänomen Met-Sein-ASN-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ser-Ser-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-ILN-Asp-Val-Sein-ASN-Phe

Gemäß der Empfehlung des Herstellers wurde das PTH 1-34 im Kulturmedium gelöst und aufbewahrt. Die Konzentration von 10–11 Mol/ml oder 50 ng/ml wird in den Artikeln von Ishizuya et al. als Konzentrationswert angegeben. Explizit hat sich Toshinori Ishizuya (Ishizuya et al., 1997) mit diesem Thema beschäftigt; nicht nur die Konzentrationswerte, sondern auch die Stimulationsbedingungen der für vorliegende Arbeit durchgeführten Untersuchungen folgen seinen Versuchsanordnungen. Das PTH-Medium wurde jede Woche neu vorbereitet. Des Weiteren wurden dem Medium ab dem sechsten Tag für die Zelldifferenzierung Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat beigemischt.

24 Stunden, nachdem die Osteoblasten ausgesät worden waren, wurden die Zellkulturplatten in Gruppen klassifiziert. Eine Gruppe bestand stets aus zwei Zellkulturplatten, um eine Doppelbestimmung zu ermöglichen. Es wurden drei Stimulationsarten gewählt. In einem festgesetzten Zirkelzeitraum von 48 Stunden wurden die Zellen kontinuierlich (48 Std), intermittierend (6 Std) und überhaupt nicht mit PTH stimuliert (0 Std) (Abb. 6).

Abbildung 6: Stimulationsmodi



Da sich die Adhäsion der Osteoblasten bereits Stunden nach der Zellaussaat vollzieht, unterschied sich der Versuchsaufbau sowohl hinsichtlich der Zellanzahl pro cm² als auch der Stimulationszeit (Abb. 6, 2 Zeile). Wie die einzelnen Gruppen genau gebildet waren, wird nachstehend beschrieben.

3.4 Aufbau der Gruppen für die Genexpressions-, Adhäsions- und Proliferationsuntersuchungen

3.4.1 Aufbau der Gruppen – Untersuchung der Adhäsion

Die Untersuchung der Zelladhäsion bestand aus einer Proliferations- und einer Genexpressionsuntersuchung auf vier verschiedenen Oberflächen in den ersten 24 Stunden nach der Zellaussaat (Abb.6, 2 Zeile). Bei der Genexpression wurden Adhäsionsmarker die Kollagen I, Fibronectin und Osteonectin überprüft. Die genaue Methode der RT-PCR wird im Kapitel 3.7 beschrieben. Weiterhin wurde die Proliferationsrate wie unter 3.6 untersucht. Der Aufbau der Gruppen sah wie folgt aus:

Gruppe 1 – 1 PTH 6 Std.

Die Osteoblasten wurden mit PTH 1-34 stimuliert, nach sechs Stunden wurden die Zellen lysiert und in Hinblick auf eine Expression von Kollagen I, Fibronectin und Osteonectin untersucht. Andere Osteoblasten wurden nach sechs Stunden Stimulation auf die Proliferationsrate hin analysiert.

Gruppe 2 – 1 PTH 24 Std.

Die Osteoblasten wurden mit PTH 1-34 stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen ebenfalls in Hinsicht auf das Expressions- und Proliferationsverhalten betrachtet.

Gruppe 3 – 0 PTH 6 Std.

Die Osteoblasten wurden nicht mit PTH 1-34 stimuliert, nach sechs Stunden wurden die Expression des Adhäsionsmarkers und die Proliferationsrate geprüft.

Gruppe 4 – 0 PTH 24 Std.

Die Osteoblasten wurden nicht mit PTH 1-34 stimuliert. Nach 24 Stunden erfolgte die Genexpressions- und Proliferationsuntersuchung.

3.4.2 Aufbau der Gruppen – Untersuchung der Proliferation

Gruppe 1 – PTH 48 Stunden:

Die Osteoblasten wurden durchgehend mit PTH-1-34-Medium stimuliert, nach 48 Stunden erfolgte der Wechsel des Mediums mit PTH-1-34-Zusatz, siehe Kap. 3.3.

Jeweils am 6., 10., 14., 18. und 22. Tag wurden die Zellen auf ihr Proliferationsverhalten mittels des grün fluoreszierenden Farbstoffes CyQUANT NF (Molecular Probes, USA) untersucht. Nach dem sechsten Tag wurden Vitamin C und β -Glycerophosphat für die Zelldifferenzierung zugegeben. Die Methode der Proliferationsbestimmung wird im Kapitel 3.6 ausführlich dargestellt.

Gruppe 2 – PTH 6 Stunden:

Die Osteoblasten wurden intermittiert und sechs Stunden der PTH-1-34-Stimulation ausgesetzt, anschließend wurde der Wechsel des Mediums ohne PTH 1-34 vollzogen. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte eine erneute PTH 1-34 Stimulation, siehe Kap. 3.3. Sowohl am 6., 10., 14., 18. als auch am 22. Tag wurden die Zellen analog zur ersten Gruppe untersucht. Auch hier wurden dem Medium nach dem sechsten Tag Vitamin C und β -Glycerophosphat beigefügt.

Gruppe 3 – PTH 0 Stunden:

Die Osteoblasten wurden in dieser Gruppe nicht mit PTH 1-34 stimuliert siehe Kap. 3.3. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt. Am 6., 10., 14., 18. und 22. Tag wurden die Zellen analog zu den anderen Gruppen untersucht. Ab dem sechsten Tag wurden hier ebenfalls Vitamin C und β -Glycerophosphat für die Zelldifferenzierung zugegeben.

3.4.3 Aufbau der Gruppen – Untersuchung der Genexpression

Gruppe 1 – PTH 48 Stunden:

Die Osteoblasten wurden durchgehend mit PTH-1-34-Medium stimuliert (Kap. 3.3), nach 48 Stunden erfolgte der Wechsel des Mediums mit PTH-1-34-Zusatz. Jeweils am 6., 10., 14., 18. und 22. Tag wurden die Zellen lysiert und in Hinblick auf ihr Genexpressionsverhalten wie im Kap. 3.7 untersucht. Nach dem sechsten Tag wurden Vitamin C und β -Glycerophosphat für die Zelldifferenzierung zugegeben.

Gruppe 2 – PTH 6 Stunden:

Die Osteoblasten wurden in einem 48-Stunden-Zyklus sechs Stunden mit PTH 1-34 stimuliert. Nach 48 Stunden erfolgte eine erneute PTH-1-34 Stimulation. Am 6., 10., 14., 18. als auch am 22. Tag wurden die Zellen lysiert und bezüglich des Genexpressions-

verhaltens untersucht. Nach dem sechsten Tag wurde Vitamin C und β -Glycerophosphat hinzugegeben.

Gruppe 3 – PTH 0 Stunden:

Die Osteoblasten wurden in dieser Gruppe nicht mit PTH 1-34 stimuliert. Nach 48 Stunden erfolgte der Mediumwechsel. Am 6., 10., 14., 18. und 22. Tag wurden die Zellen analog zu den anderen Gruppen lysiert und auf das Genexpressionsverhalten hin untersucht. Ab dem sechsten Tag wurden ebenfalls Vitamin C und β -Glycerophosphat zugegeben.

3.5 Untersuchung der Vitalität, Morphologie und Zellausbreitung von Osteoblasten

Verwendungszweck

Da im vorliegenden Fall die Zellen auf Titandisks angezüchtet waren, mussten Vitalität, Morphologie und Zellausbreitung anhand der Fluoreszenzfärbung mit Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid bewertet werden.

Fluoresceindiacetat kann sich in die Zellmembran vitaler Zellen einlagern, ohne sie zu zerstören. Es wird durch Enzyme des intakten Zytoplasmas zu Fluorescein hydrolysiert, vitale Zellen fluoreszieren daher grün. Abgestorbene Zellen hingegen fluoreszieren nicht grün; sie sind vielmehr daran zu erkennen, dass ihre Kerne eine rote Fluoreszenz zeigen.

Materialien und Geräte

- Pipetten
- sterile Pipettenspitzen
- Fluoreszenzmikroskop (Olympus)
- Ethidiumbromid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Fluoresceindiacetat (FDA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 0,9 % NaCl
- Zellen

Verfahren

Für die Herstellung der Fluoreszenzlösung wurden zunächst 25 µl Fluoresceindiacetat und 25 µl Ethidiumbromidstammlösung miteinander vermischt und in 950 µl 0,9 % NaCl verdünnt. Anschließend wurden 5 µl der angesetzten Lösung auf die Titaniumplättchen gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und mikroskopisch ausgewertet.

3.6 Untersuchung der Proliferation der Osteoblasten

Verwendungszweck

Die Zellanzahl auf den Prüfkörpern wurde mittels des grün fluoreszierenden Farbstoffes CyQUANT NF (Molecular Probes, USA) quantifiziert. Da lediglich die Zellanzahl auf den Titaniumplättchen beurteilt werden sollte, wurden die Plättchen in neuen 96-Well-Platten platziert.

Der CyQUANT[®] NF-Assay beruht auf der Messung der zellulären DNA, welche anhand des Fluoreszenzfarbstoffes quantifiziert werden kann. Da die zelluläre DNA in der Zelle unverändert bleibt, kann auf Basis dieses Tests ein Verhältnis bezüglich der Zellanzahl erstellt werden.

Bei der Zellyse interagiert der CyQUANT[®] GR-Farbstoff mit der Kern-DNA, und nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 Minuten kann schließlich die Messung der Fluoreszenz mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts durchgeführt werden. Der Assay wurde mit der Absicht entwickelt, eine lineare analytische Reaktion von mindestens 100 bis 20.000 Zellen pro Well einer zumeist 96-Well-Mikrotiterplatte erfassen zu können.

Speziell für die Proliferationsbestimmung wurden für den Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader (Biotek Synergy HAT, USA) einsetzbare, geschwärzte 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunc GmbH) verwendet.

Die Zellanzahl wurde ausgehend von der Korrelation des Fluoreszenzsignals anhand der Eichkurven und Messungsproben ermittelt. Die Eichkurven basierten auf der Zellzählung mit Hämatozytometer gemäß den Vorgaben von Neubauer (Brand GmbH, Wertheim) siehe Kap. 3.6.

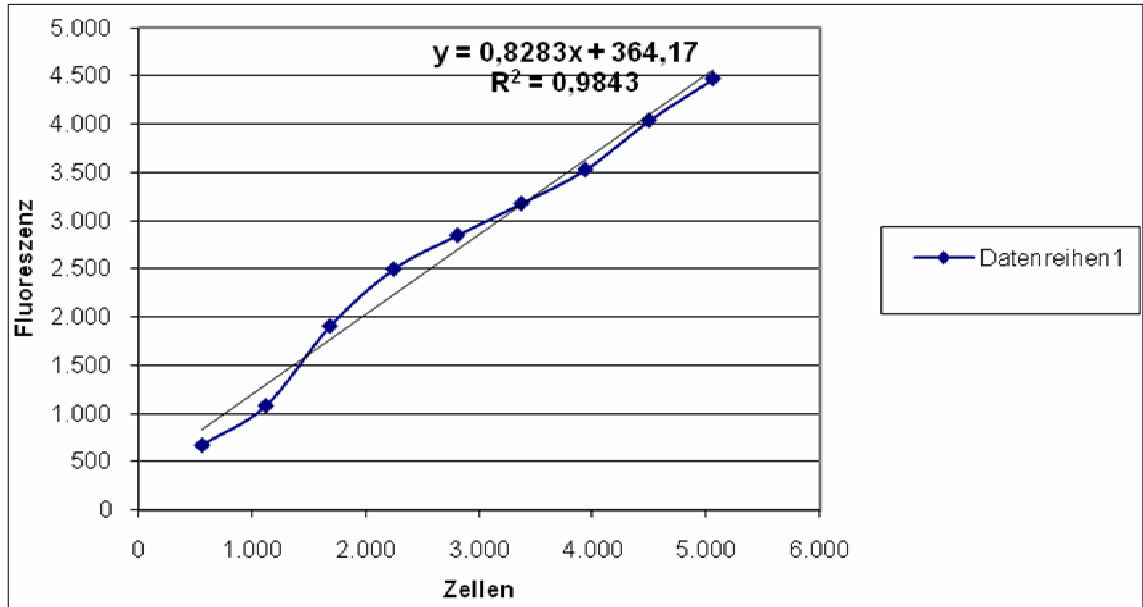


Abbildung 7: Daten aus der fluorometrischen Untersuchungseichkurve.

Eichkurve für die fluorometrische Untersuchung, Fluoreszenz = Menge der Osteoblasten DNA = Anzahl der Osteoblasten auf dem Träger.
Dreifachbestimmung, Bildung eines Mittelwertes, n = 3

Materialien und Geräte

- RNA-Pipetten
- sterile Pipettenspitzen
- Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Biotek Synergy HAT)
- Neubauer-Kammer (Brand GmbH, Wertheim)
- Zentrifuge (Eppendorf-Netheler, Hintz GmbH, Deutschland)
- geschwärzte 96-Well-Platten (Nunc GmbH)
- CyQUANT NF Kit (Molecular Probes, USA)
- steriles destilliertes Wasser
- PBS
- Zellen

Bezeichnung	Menge
CyQUANT® NF dye reagent (Component A)	220 µL
Dye delivery reagent (Component B)	220 µL
5X HBSS buffer (Hank's balanced salt solution) (Component C)	22 mL

Tabelle 3: Zusammensetzung des CyQUANT NF Kit (Molecular Probes, USA)

Verfahren

Die Herstellung des Master-Mixes erfolgte unter strikter Befolgung der Anleitung des Herstellers Molecular Probes, USA: 2,2 ml der Komponente C (5X HBSS buffer) wurden in 8,8 ml sterilem destilliertem Wasser verdünnt. Im Anschluss daran wurden dieser Lösung 22 µL der Komponente A (CyQUANT® NF dye reagent) hinzugefügt. Des Weiteren wurden jeweils 100 µL des Master-Mixes auf jede Probe pipettiert, nachdem das Nährmedium aus dem Well abgesaugt worden war, während die Zellen mit PBS vorsichtig gespült worden sind. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 Minuten wurden dann die Mikrotiterplatten im Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Lesegerät (Biotek Synergy HT) platziert, das Programm wurde gestartet und nach Beendigung des Vorgangs wurden die Daten abgelesen.

3.7 Genexpressionsuntersuchung mittels Real Time PCR

3.7.1 RNA-Präparation

Verwendungszweck

Im vorliegenden Fall wurde die RNA mittels RNeasy Kit (Qiagen) durchgeführt. Das RNeasy-Verfahren ist eine Methode zur Isolierung von RNA, die auf der Technologie der selektiven Bindungseigenschaften einer Silica-Gel-Membran kombiniert mit der Mikrozentrifugationstechnik basiert.

Materialien und Geräte

- Trizol, TRI Reagent®* solution (Applied Biosystems)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- RNeasy Mini-Spinsäulen (rosa)
- 1,5-ml-Collection-Tubes (1,5-ml-Reaktionsgefäße)
- Buffer RLT

- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-freies Wasser

Verfahren

Zunächst wurde die Isolierung der RNA unter exakter Einhaltung des Protokolls RNeasy (Qiagen) vollzogen. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden 20 s lang mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen in 250 µl Trizol homogenisiert. In einem nächsten Schritt wurden jeder Probe 200 µl Chloroform hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln der Mischung und einer 5 min andauernden Inkubation auf Eis wurden die Phasen mittels Zentrifugierung (10.000 rpm, 15 min, 4 °C) voneinander getrennt. Die wässrige RNA-haltige Oberphase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Im Anschluss daran erfolgte die Fällung der RNA mit identischen Volumeneinheiten von Isopropanol bei -20 °C, welche schließlich erneut bei 10.000 rpm abzentrifugiert wurde. Nach mehreren Waschgängen konnte das Pellet dann in 30 µl DEPC-H₂O (0,1 % Diethyl-Pyrocyanat in Reinstwasser) resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt werden.

Nach dieser Skizzierung des Verfahrens soll im folgenden Abschnitt näher auf die photometrische Bestimmung der RNA eingegangen werden.

3.7.2 Photometrische Bestimmung der RNA

Verwendungszweck

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration (in 3 µl RNA-Lösung) wurde eine spektrophotometrische Methode angewandt, mittels eines Photometers (Eppendorf Photometer Bio plus, Hamburg; Wellenlänge-260 nm). Zur exakten Ermittlung des Reinheitsgrades der isolierten Nukleinsäuren wurde zudem die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 280 nm definiert. Der Quotient (Ratio) aus OD 260 nm/OD 280 nm lag hierbei zwischen den Werten 1,8 und 2,0.

3.7.3 Reverse Transkription

Verwendungszweck

Die reverse Transkription wird grundsätzlich *in vitro* für die cDNA-Erststrangsynthese mit RNA eingesetzt. Die Effizienz dieser Reaktion hängt dabei jedoch ganz erheblich von der Qualität sowie der Menge der im jeweiligen Fall verwendeten RNA ab. Die auf diese Weise gewonnene cDNA kann anschließend für die folgenden Anwendungen eingesetzt werden:

- Klonierungen
- PCR
- RNA-Sequenzierungen
- Primer-Extensionen

Material und Geräte

- RNA-Pipetten (separate Eppendorf)
- sterile Pipettenspitzen
- sterile 0,5 ml Eppis
- Oligo-(dT)-Primer
- RNase-Inhibitor
- RNase-freies Wasser (RNase-free water)
- Super Script II Kit von Invitrogen
- RNA
- T3-Thermocycler (Biometra, Deutschland)
- Zentrifuge (Eppendorf-Netheler, Hintz GmbH, Deutschland)

Verfahren

In einem ersten Schritt wurde die Template-RNA-Lösung auf Eis aufgetaut. Für die Reverse Transkription wurden 10 μ l der Template-RNA-Lösung verwendet. Lag die Konzentration der RNA bei einem Wert über 100 ng/ μ l, so wurde diese RNA zusätzlich mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt, bis eine Konzentration von 100 ng/ml erreicht wurde. Im umgekehrten Fall, bei einer Konzentration von unter 100 ng/ μ l, wurde die komplette Menge (10 μ l) verwendet. Der Lösung wurde ein Mix aus dNTP (1 μ l) Oligo-(dT)-Primer (1 μ l) hinzugefügt. Diese Lösung wurde dann in einem Vortex gemischt und

kurz zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Eppendorf-Röhrchen in dem PCR-Gerät platziert. Die Inkubation dauerte 5 min bei 70 °C, wobei die Sekundärstruktur der RNA aufgeschmolzen wurde. In einem nächsten Schritt wurde die Lösung schnell auf Eis abgekühlt, um eine Neubildung der RNA-Sekundärstruktur zu verhindern.

Bezeichnung	Menge
5x first strand buffer (Invitrogen)	4 µl
0.1 M DTT (Invitrogen)	2 µl
RNase out (Invitrogen)	1 µl

Tabelle 4: Mastermix für die Reverse Transkriptase

Nachdem der Master-Mix produziert worden war, wurde dieser in die Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend folgte eine erneute zweiminütige Inkubation bei einer Temperatur von 42 °C. Nun wurde 1 µl Reverse Transkriptase (Invitrogen) hinzugefügt und alles vermischt. Insgesamt entstanden bei diesem Verfahren 20 µl Endvolumen.

Im Anschluss erfolgte nochmals eine Inkubation von 60 min bei einer Temperatur von 42 °C. Um die Reverse Transkriptase zu deaktivieren, galt es die cDNA-Lösung 10 min lang auf eine Temperatur von 70 °C zu erhitzen. Die cDNA wurde bei -20 °C für den weiteren Gebrauch aufbewahrt.

3.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Verwendungszweck

Grundsätzlich kann die PCR (engl.: *polymerase chain reaction*) als ein Verfahren zur selektiven Vervielfältigung der DNA definiert werden. Bei diesem Verfahren kann man zum einen gezielt Expressionsprodukte von Osteoblasten untersuchen, und zum anderen kann das PCR-Produkt selbst im Rahmen eines späteren Arbeitsschrittes für die Generierung der Standards für die RT-PCR eingesetzt werden.

Die PCR-Reaktion basiert auf drei Einzelschritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Diese unterscheiden sich voneinander jeweils in ihrer individuellen Dauer und der Temperatur.

- Denaturierung** Die DNA-Doppelstränge werden hierbei bei einer Temperatur von ca. 95 °C aufgeschmolzen.
- Annealing** In dieser Phase findet die Hybridisierung (bei 68 °C) der Oligonucleotide an komplementären DNA-Sequenzen statt.
- Elongation** In diesem dritten Arbeitsschritt wird die eigentliche Polymerisation (bei einer Temperatur von 72 °C) des DNA-Stranges vollzogen. Die Polymerase synthetisiert dabei einen komplementären Einzelstrang in 5'-3'-Richtung. Des Weiteren verdoppelt sich in jedem Zyklus die Menge der gebildeten Moleküle, was eine exponentielle Vermehrung der spezifischen Sequenz bedeutet.

Bei der PCR hybridisieren Oligonucleotide, welche auch als Primer bezeichnet werden, spezifisch an ihre jeweils komplementären Sequenzen des Gens. Der Gen-Abschnitt, der zwischen den Oligonukleotiden vorliegt, wird dann von der DNA-Polymerase synthetisiert. Die ausgewählten Primer wurden bei BIOTEZ GmbH in Berlin synthetisiert und sind in der nachstehenden Tabelle (5) detailliert aufgelistet.

Protein	Gene name entrez gene ID mRNA	forward primer (5' – 3') reverse primer (5' – 3')	size	T _M
GAPDH	GAPDH NM_002046	CCATCACCATCTTCCAGGAGCGA GGATGACCTTGCCCACAGCCTTG	447	72
Alkaline Phospha-tase	ALPL 249 NM_000478	ACAAGCACTCCCCTTCATCTGGAA TCAATTCTGCCTCCTTCCACCAG	223	70
Collagen I	COL1A1 1277 NM_000088.3	CTGGAAGAGTGGAGAGTACTGGA CGCCATACTCGAACTGGAATCCA	215	70
Osteo-pontin	SPP1 6696 NM_000582	GACATCCAGTACCCTGATGCTAC GCTCTCATCATTGGCTTTCCGCT	231	70
Osteo-calcin	BGLAP 632 NM_199173	GGCCAGGCAGGTGCGAAGCC GTAGGGGACTGGGGCTCCCA	135	68

Protein	Gene name entrez gene ID mRNA	forward primer (5' – 3') reverse primer (5' – 3')	size	T _M
Osteo-nectin	SPARC 6678	AGCTGCGGGTGAAGAAGATCCAT	322	70
	NM_003118	TCCTTGTCGATATCCTTCTGCTTG		
Fibro-nectin	FN1 2335	GACCCTCATGAGGCAACGTGTTA	240	70
	NM_002026	TGGGCAATTAACATTAGTGTGTTGTTCC		
PTHR1	PTHR1 5745	CAGTACCGGAAGCTGCTCAAATC	203	70
	NM_000316	TCAGCTTGTA C CTCGCCATTGCA		
Core binding factor α 1 (CBFA1)	RUNX2 860	AGTGGACGAGGCAAGAGTTTCAC	302	70
	NM_001015051	GCCTGCCTGGGGTCTGTAATCT		
CEMP1 oder CP-23	CEMP1 752014	ccacatccgtcgctgctttcc	284	72
	NM_001048212	GGCTCCCTTCCCCCTTGCTTAC		

Tabelle 5: Verwendete Primer für die RT-PCR

Material und Geräte

- RNA-Pipetten (separate Eppendorf)
- sterile Pipettenspitzen
- sterile 0,5 ml Eppis
- steriles destilliertes Wasser
- genspezifische Primer siehe Tabelle
- cDNA
- 2x BioMix Red (Bioline)
- T3-Thermocycler (Biometra, Deutschland)

Verfahren

In einem ersten Schritt wurden sowohl die „down“- als auch die „up“-Primer auf Grundlage der mitgelieferten Herstellerangaben mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt und in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Anschließend wurde ein Master-Mix angesetzt. Die Herstellung des Master-Mixes ist in der Tabelle (6) dargestellt:

Mastermix	Menge für ein sample
Priemer Mix	1 µl
BioMix red 2x	10 µl
steriles destilliertes Wasser	8 µl

Tabelle 6: Mastermix für PCR

Nach der Herstellung des Master-Mixes wurden 19 µl der Lösung in jedes bereitstehende Eppendorf-Röhrchen gegeben. Zusätzlich wurde in jedes dieser Röhrchen 1 µl cDNA pipettiert, woraufhin dieses Gemisch überaus vorsichtig vermischt wurde. Danach wurden die Röhrchen in die PCR-Maschine transferiert. Das gewählte Programm für diesen Arbeitsschritt wird in der folgenden Tabelle vorgestellt.

Zeit	Temperatur	Zyklen
10 min	95 °C	35 Zyklen
20 s	95 °C	35 Zyklen
30 s	68 °C	35 Zyklen
30 s	72 °C	35 Zyklen
Pause	10 °C	35 Zyklen

Tabelle 7: Zyklen bei der PCR

3.7.5 Nachweis der Produkte

Verwendungszweck

Der Nachweis der Produkte erfolgte anhand der elektrophoretischen Auftrennung in 2 % Agarosegel. Das in der DNA eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert unter ultraviolettem Licht, so entstehen sichtbare Banden.

Material und Geräte

- Elektrophorese-Kammer
- TAE-Puffer 1x (20 ml Stock + 980 ml A. dest.)
- TAE-Puffer Stock 50x :
- 242,28 g Tris (Endkonz. 40 mM)
- 37,25 g EDTA Na-Salt (Endkonz. 2 mM)
- 57,00 ml konz. Essigsäure

- ad 1.000 ml mit A. demin. pH ~ 8,5
- Ethidiumbromid 1 % (Roth, Art.Nr. 2218.2)
- Agarose LE, analytical grade (Promega, Cat. V3125)
- DNA Ladder (NEB) 100 bp oder 1 kb
- Marker 100 bp New England Biolabs
- DNA-Produkt aus der PCR

Verfahren

Für eine Kammer wurden 100 ml Agarose in der Konzentration von 2 % Agarose-Lösung in 1x TAE-Puffer angesetzt. Dann wurde diese Mischung in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Anschließend wurden 5 µl 1 % Ethidiumbromid hinzugefügt. Die Agarose wurde nach dem Erhitzen unter fließendem Leitungswasser leicht abgekühlt.

In einem nächsten Schritt wurde die Platte auf eine waagrechte Unterlage gegossen, woraufhin ca. 20 min lang auf das Erstarren des Gels gewartet wurde. Sobald das Gel fest geworden war, musste der zuvor eingesetzte Kamm entfernt werden, wobei Aussparungen im Gel zurückblieben. Mithilfe einer Pipette wurde in jeweils eine separate Aussparung die DNA-Probe gegeben. Anschließend wurde das Gel in den TAE-Laufpuffer mit dem Farbmaler gelegt.

Nunmehr musste eine konstante elektrische Spannung gemäß der Länge der Elektrophorese-Kammer angelegt werden (die Spannung lag in einem Bereich von 80 Volt bis 90 Volt), wobei die Laufzeit ca. 30 min betrug. Die Elektrophorese wurde erst beendet, als die DNA-Fragmente ausreichend aufgetrennt worden waren. Das Ethidiumbromid, welches sich in die DNA eingelagert hat, fluoresziert unter Einstrahlung von ultraviolettem Licht. Die sichtbaren Banden konnten auf diese Weise ausgewertet werden.

3.7.6 TOPO Cloning, Sequenzierung und Herstellung der Standards

Verwendungszweck

Die TOPO-Klonierung bzw. das TOPO Cloning wird im TOPO-Vektor (Invitrogen) beispielsweise zur Sequenzierung und Präparation von Standards für die Real Time PCR angewandt. Die Standards werden dann aus klonierten DNA-Fragmenten hergestellt. Sie

werden vor allem benötigt, um eine Standardkurve zu generieren. Bei der Real Time PCR wird abhängig von der Probe und dem zu untersuchenden Gen ein stets unterschiedlich starkes Fluoreszenzsignal erfasst, welches wiederum auf die Standardkurve bezogen werden kann. Ausgehend davon kann eine exakte Quantifizierung der Anzahl der Kopien eines Gens innerhalb einer einzelnen DNA-Probe ermittelt werden.

Material und Geräte

- PCR Produkte mit nachträglich angefügten Poly-A-Enden
- TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)
- MIDI DNA-Prep Kit (Qiagen)
- RT-Buffer
- Tracerplasmid pGL3 (2,35 µg/µl)
- kompetente Zellen (XL1-Blue oder TOP 10)
- NZY-Medium
- Thermostat
- sterile Werkbank
- Eppendorf Zentrifuge (Netheler Hinz GmbH, Deutschland)
- Schüttler 37 °C, 200 rpm
- LB-Agarplatten (6 g Agar/400 ml LB-Medium, autoklavieren am selben Tag)
- LB-Medium (20 g Bacto-Trypton, 10 g Bacto Yeast, 10 g NaCl, 2 ml 1 N NaOH ad 2000 ml mit A. Dest.; in 500 ml Flaschen je 400 ml aliquotieren, autoklavieren am selben Tag)
- Ampicillin (100 mg/ml)
- Drigalski-Spatel
- Brutschrank
- sterile Holzzahnstocher
- 50 ml Falconröhrchen
- 15 ml Falcon bzw. Becton Dickinson Röhrchen (Abziehdeckel)
- sterile 2 ml Eppis
- sterile 1,5 ml Eppis
- sterile Petrischalen

Verfahren von TOPO Cloning

Beim Verfahren des TOPO Cloning wurde exakt nach Herstelleranleitung für das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verfahren.

In 1,5 ml sterilem Eppendorf-Röhrchen erfolgte der Ansatz (Endvolumen 6 µl). Die exakte Verteilung der 6 µl auf die einzelnen Komponenten des Produktes sah wie folgt aus:

Bezeichnung	Menge
PCR-Produkt	3,0 µl
steriles Wasser	1,5 µl
Salzlösung (Kit)	1,0 µl
TOPO-Vektor	0,5 µl

Tabelle 8: Mastermix für TOPO Cloning

Als nächster Arbeitsschritt wurden diese Komponenten allesamt miteinander vermischt und abzentrifugiert. Die Mischung wurde für eine Dauer von 10 bis 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dieser Wartezeit wurden kompetente Zellen (e-colli) auf Eis gelegt. Dann wurden den Zellen 100 µl XL1-Blue und Master-Mix zugegeben und es wurde vorsichtig gemischt. Das Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Dann musste der Ansatz 45 s lang bei einer Temperatur von 42 °C inkubiert und anschließend wieder 2 min auf Eis abgekühlt werden. Als nächstes wurden 500 µl NZY-Medium zugegeben, woraufhin eine Inkubation für die Dauer von einer Stunde bei 200 rpm und 37 °C gestartet wurde.

Agar-Agar-Platten mit Ampicillin wurden mit 100 bis 200 µl der Probe mittels Drigalski-Spatel ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend für die Inkubation 22 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C in den Brutschrank gelegt.

Klone picken

Mit sterilen Holzzahnstochern wurden die Klone gepickt und in eine Flüssigkultur überführt. Die Inkubation der Flüssigkultur vollzog sich bei 37 °C und 200 rpm über eine

Dauer von ca. 20 Stunden. Im Anschluss daran wurde die DNA MIDI-Präparation eingeleitet.

MIDI-Präparation

Die Extraktion von DNA erfolgte mittels MIDI-Präparation (DNA MIDI-Prep, Qiagen) gemäß der technischen Anleitung des Herstellers. Bei diesem Verfahren werden die Bakterien mittels alkalischer Lyse Plasmid-DNA gewonnen. Das Lysat wurde mehreren Wasch- und Filtrationsvorgängen mit Silica-Gel-Membran unterzogen. Im Anschluss daran wurde die Probe der extrahierten DNA anhand der Gel-Elektrophorese verifiziert und mithilfe der Absorptionsspektrometrie (Eppendorf Bio Photometer plus) wurde die exakte Konzentration ermittelt.

Probenspaltung

Für den korrekten Aufbau des externen Standards ist es grundsätzlich notwendig, die bestehenden Plasmide an ganz bestimmten Stellen aufzuschneiden und dann spezifische Fragmente zu entnehmen. Dabei wurden die Fragmente mit den passenden Restriktionsendonukleasen aufgeschnitten. Sämtliche Marker außer dem RUNX 2 wurden mit dem Enzym HIND III (New England Biolabs, Schwalbach) gespalten, das RUNX 2 selbst hingegen mit Bam H I (New England Biolabs, Schwalbach). Zudem wurde zur zusätzlichen Kontrolle eine Spaltung der bekannten Probe durchgeführt.

Sequenzierung

Unter „Sequenzierung“ ist generell die Bestimmung der DNA-Sequenz, der genauen Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül, zu verstehen. Die Sequenzierung wurde im vorliegenden Fall von der Firma MWG-Biotech (<https://ecom.mwg.dna.com>) geleistet.

Linearisierung

Um ein Plasmid mit einer Polymerase kopieren zu können, muss das Plasmid zunächst in einer linearen Form vorliegen. Diese Form wurde hergestellt, indem das Plasmid an den entsprechenden Stellen aufgespalten wurde. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der Konzentration im Photometer (Eppendorf Bio plus, Hamburg).

Herstellung des Standards

Als Standard wird jenes PCR-Produkt bezeichnet, das spezifisch für das jeweilige Gen ist. Wie bereits beschrieben wurde unser PCR-Produkt im TOPO-Vektor kloniert, sequenziert, linearisiert und anschließend wurde seine Konzentration bestimmt.

Ausgehend von der photometrisch bestimmten Konzentration der UrLösung (UL) in ng/μl wurde die Anzahl der doppelsträngigen DNA-Moleküle pro μl anhand der folgenden Formel berechnet:

$$[(\text{Konzentration der UL ng} / \mu\text{l} / 1000000000) / \text{Fragmentgröße (Vektor + Insert)} \times 600] \times 6,022 \times 10^{23}$$

Die Herstellung der Standardlösung SL1 wurde so angelegt, dass diese 10^8 einsträngige DNA-Moleküle pro μl enthalten sollte. Zur Berechnung diente hierzu wiederum die Formel:

$$[(10^8 \cdot 100) / \text{doppelsträngige DNA Moleküle} / \mu\text{l}] / 2 = \text{Volumen UL für } 100 \mu\text{l}$$

Endkonzentration	Stammlösung	für 100 ml
10 mM Tris-HCl pH 8,0	1 M (3,028 g/25 ml)	1000 μl
15 mM KCl	4 M (7,456 g/25 ml)	375 μl
0,6 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 M (5,082/25 ml)	60 μl

Tabelle 9: Zusammensetzung des RT-Puffers

Die notwendige Verdünnung der Lösung wurde mit 1 x RT Puffer durchgeführt. Auf Basis der Standardlösung SL1 wurde im nächsten Schritt eine SL2 (10^8 einsträngige DNA-Moleküle/μl) mittels weiterer Verdünnungen produziert, welche außerdem das Tracer-Plasmid pGL3 (2,35 μg/μl) enthielt. Nunmehr war exakte Anzahl der DNA-Kopien (1.000.000 pro μl) in der SL2-Lösung bekannt. Im Zuge mehrerer Verdünnungsstufen der SL2-Lösung konnte bei der Real Time PCR eine Standardkurve generiert werden. Im vorliegenden Fall wurde eine Verdünnungsreihe in 8er-Schritten (von 10.000.000 bis 128 Kopien) als Standard eingesetzt.

3.7.7 Real Time PCR

Verwendungszweck

Die Quantifizierung der cDNA kann mittels Real Time PCR erfolgen. Hierfür wird auf den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zurückgegriffen, welcher sich in die doppelstrangige DNA einlagert. Liegt ein gebundener Zustand vor, so steigt die Intensität der jeweiligen Fluoreszenzemission. Proportional zur Vermehrung der Amplifikate steigt die Intensität des Fluoreszenzsignals des Syber Green an. Aufgrund der Tatsache, dass es die Real Time PCR nach jedem einzelnen Zyklus der PCR ermöglicht, die Fluoreszenz des Syber Green exakt zu bestimmen, kann die Amplifikation auf diese Weise bereits in der frühen exponentiellen Phase der Real Time PCR detektiert werden. Indem das Fluoreszenzsignal des Standards exakt einer DNA-Kopiezahl zuzuordnen ist, ist ebenfalls eine Quantifizierung der gesuchten cDNA möglich.

Zum Zwecke der Negativkontrolle wurde das RT-Buffer ohne cDNA verwendet. Diese Kontrollen zeigten bei sämtlichen Real Time PCR-Ansätzen keinen Expressionsprodukt. Die Spezifität des PCR-Produkts wurde anhand der Überprüfung des Schmelzpunktes des PCR-Produkts nachgewiesen.

Die wissenschaftliche Auswertung der Real Time PCR erfolgte unter Verwendung des Softwareprogramms Rotor-Gene 6.0. Für alle Proben wurde der jeweilige CT-Wert ermittelt. Anhand des Auftragens des Logarithmus der aus den zuvor durchgeführten Untersuchungen ermittelten Standardmenge gegen den CT-Wert wurde eine Standardkurve berechnet. Somit war es möglich, für jede unbekannte Probe durch das Einsetzen ihres CT-Werts in die Geradengleichung

$$x = (CT - b) / m$$

die Ausgangsmenge zu bestimmen. Der Wert des Korrelationskoeffizienten der Standardkurven lag in der Spanne von 0,97 bis 0,99. Darüber hinaus berechnete das Softwareprogramm anhand der Steigung der Regressionsgeraden die Effizienz der PCR-Reaktion: Diese lag durchschnittlich in einem Bereich von etwa 90 %.

Material und Geräte

- Rotor Gene RG 3000 (Rotor Gene, Wasserburg)
- RT-Röhrchen mit Deckel (Corbett, Austria)

- Filterspitzen
- RNA-Pipetten (separate Eppendorf)
- sterile 1,5 ml Eppis
- Standard für das jeweilige Gen für Eichkurve
- Immomix (Bioline, Kat. Nr. BIO-25020 für 500 Reaktionen)
- Sybergreen I 50x (bei Bestellung des Immomix mit bestellen)
- Primer
- cDNA

Verfahren

Herstellung der Eichkurve

Für die Eichkurven wurden die Eppendorf-Röhrchen in der numerischen Abfolge von 1 bis 8 beschriftet. Der RT-Puffer wurde vorgelegt. In das erste Eppendorf-Röhrchen wurden zunächst 90 µl RT-Puffer und in das zweite 160 µl RT-Puffer eingefüllt. Anschließend wurden 10 µl des Standards in das erste Eppendorf-Röhrchen gegeben. Auf dieser Basis wurde die Verdünnungsreihe hergestellt. Das sorgfältige Vermischen erfolgte durch fünfzigmaliges Aufziehen und wieder Ausblasen (dabei durfte kein Vortex eingesetzt werden) der Eppendorf-Pipette. Im nächsten Arbeitsschritt wurden 40 µl aus der nunmehr gemischten Lösung entnommen und in das nächste Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Dieser Prozess wurde so lange wiederholt, bis der Inhalt aller acht Eppendorf-Röhrchen gemischt war.

Es schloss sich die Herstellung des Primer-Mixes an, dessen Zusammensetzung in der nachstehenden Tabelle abgebildet ist:

Primermix	Ansatz 1 Probe	Ansatz 60 Proben
Immomix/SybrGreen	4,8 µl	312 µl
Ster. dest. Wasser	2,4 µl	156 µl
Primer	1,2 µl	72 µl

Tabelle 10: Primermix

Befüllung der Real Time PCR-Röhrchen und die Real Time PCR

Zuerst mussten 9 µl des Primer-Mixes in die speziellen RT PCR-Röhrchen pipettiert werden. Dann wurde 1 µl von der cDNA dazugegeben; anschließend wurden die

Röhrchen fest verschlossen und entsprechend kodiert. Sodann wurden die Röhrchen in das Gerät Rotor Gene 3000 überführt. Schließlich wurde das Gerät eingeschaltet und das durchzuführende Programm wie nachfolgend gewählt:

PCR-Programm	Temperatur	Zeit	Zykluswahl
Aktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	20 s	35
Annealing	65 °C	30 s	35
Annealing	72 °C	30 s	35
Schmelzen der Amplifikate	50 °C–99 °C	6s/1 °C	1

Tabelle 11: Zyklen bei der RT-PCR

3.8 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Datenerfassung und die statistische Auswertung wurden mit der Software Microsoft Excel 2003 und SPSS 11.0 geleistet. Es wurde für jede Versuchsreihe eine mehrfache Bestimmung der Messwerte vorgenommen. Bei der Genexpressionsuntersuchung wurden die ermittelten Daten an jene des housekeeping-Gens GAPDH angeglichen.

Die Auswertung der Ergebnisse aus der Adhäsionsuntersuchung war rein deskriptiv und erfolgte visuell durch Vergleich der einzelnen Balken.

Bei der Proliferations- und Genexpressionsuntersuchung wurden Signifikanzen mit dem Wilcoxon-Test bestimmt. Dieser Test ist ein Zweistichprobentest für verbundene Stichproben. Es handelt sich um einen nicht-parametrischen Test, d. h. dieser Test setzt nicht voraus, dass die Messgrößen normalverteilt sind. Die Differenzen zwischen den zu vergleichenden Wertepaaren werden gebildet; diesen werden wiederum nach ihrem absoluten Zahlenwert in wachsender Reihenfolge Rangzahlen R^- und R^+ zugeordnet. Anschließend wird jeweils aus den positiven und negativen Rangzahlen die Summe gebildet. Die Testgröße ist letztlich die kleinere der beiden Rangsummen $R = \text{Minimum } R^-, R^+$. Als signifikant (*) wurde $p = \text{oder } < 0,05$ und als tendenziell (#) $p = \text{oder } < 0,1$ festgesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Vitalität von primären humanen Osteoblasten

Die dargestellten Zellen auf den Oberflächen am sechsten Tag des Versuchs sind repräsentativ für die gesamte untersuchte Zelllinie. Die Osteoblasten zeigen ein typisches Morphologiebild: Die Zellen weisen eine spindelförmige Struktur auf, ihre Fortsätze haben eine Tendenz zur Ausbreitung. Im Vergleich zu rauen Oberflächen, insbesondere bei SLActive, erscheinen die Osteoblasten deutlich kompakter und etwas abgekugelt. Die Anzahl der Zellen nimmt für das Auge sichtbar auf rauen Oberflächen ab. In keiner der Untersuchungsgruppen werden rot gefärbte, abgestorbene Zellen beobachtet. Die untersuchten Oberflächen und PTH haben folglich keinen toxischen Effekt auf primäre Osteoblasten. Die Stimulationsgruppen (PTH 6), ähnlich wie (PTH 48 Std.) unterscheiden sich von der Kontrollgruppe nicht. Die deskriptiven Resultate aus der Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass die PTH-Stimulation zum Zeitpunkt der Bestimmung keinen Einfluss auf Morphologie, Zellausbreitung und Proliferation hat.

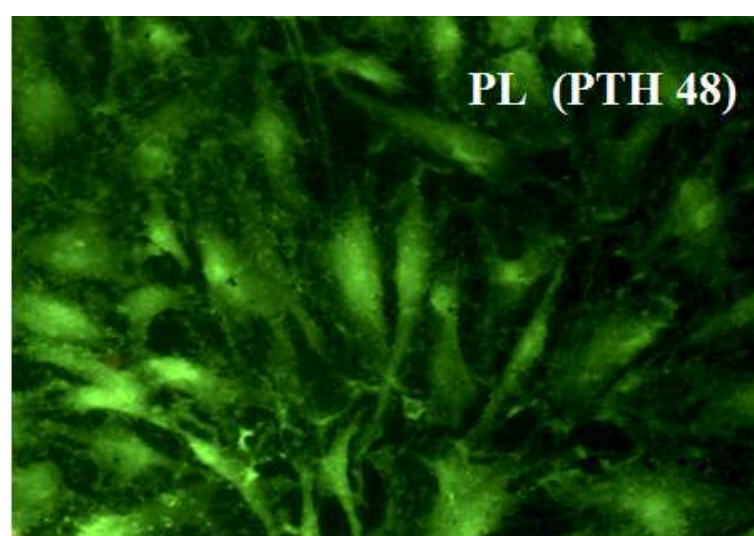
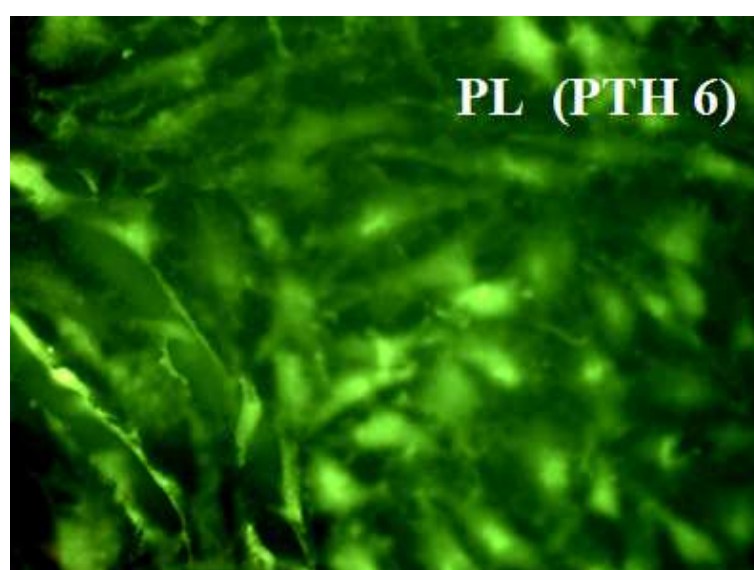
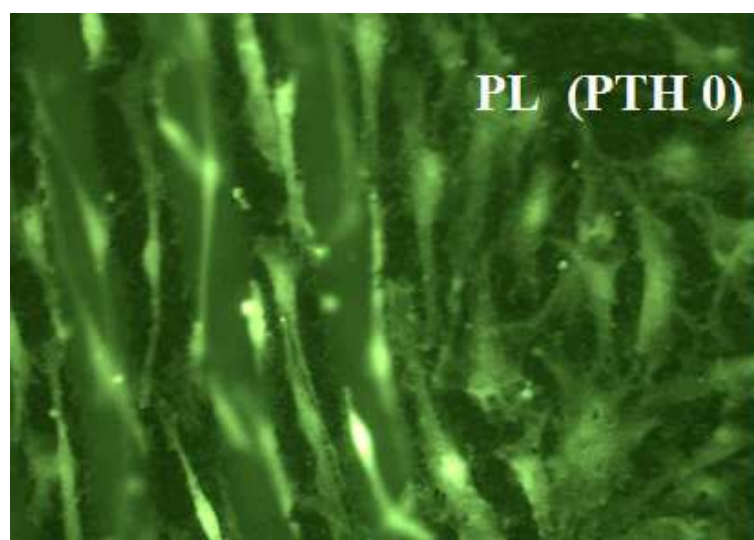


Abbildung 8: Osteoblasten aus den Gruppen (PTH 0), (PTH 6) und (PTH 48) nach 6-tägigem Kontakt mit der Kunststoffoberfläche (PL) im Vergleich (200-fache Vergrößerung)

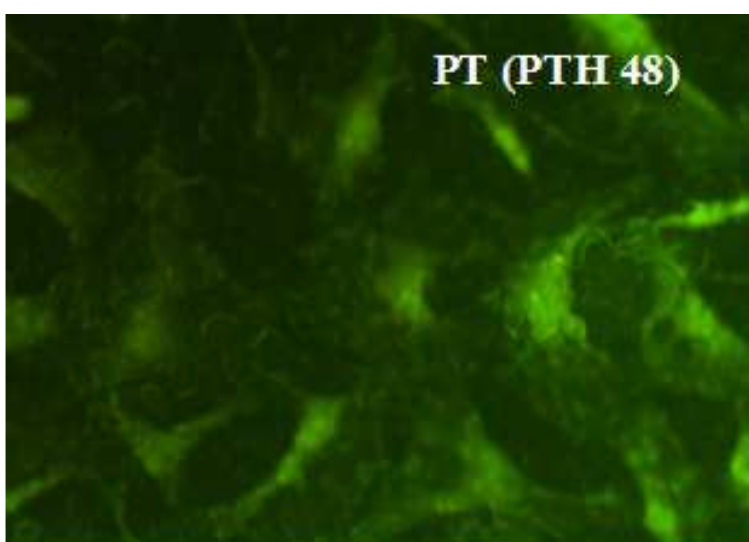
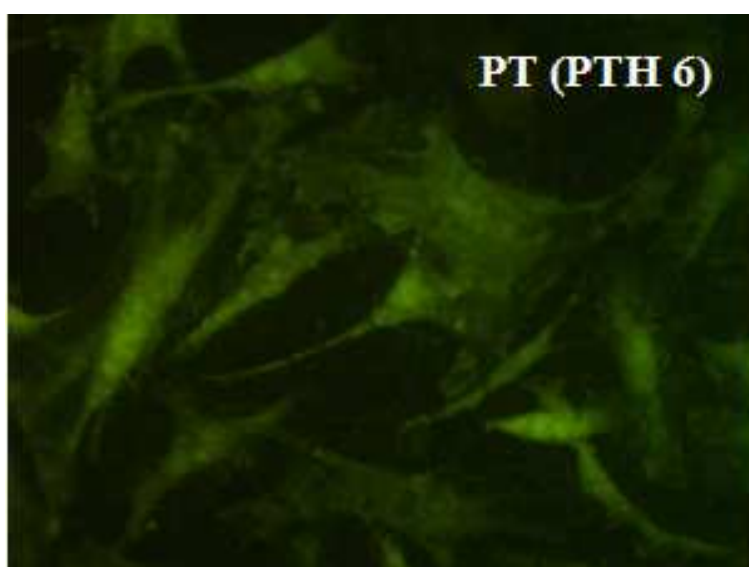
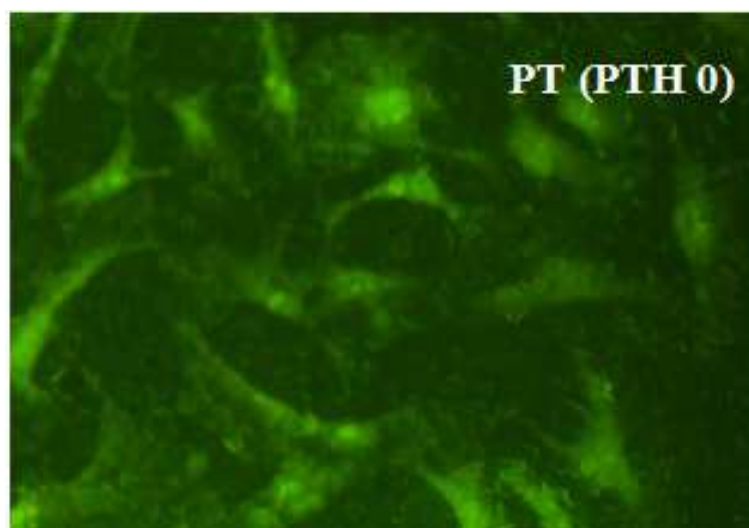


Abbildung 9: Osteoblasten aus den Gruppen (PTH 0), (PTH 6) und (PTH 48) nach 6-tägigem Kontakt mit der polierten Titanoberfläche (PT) im Vergleich (200-fache Vergrößerung)

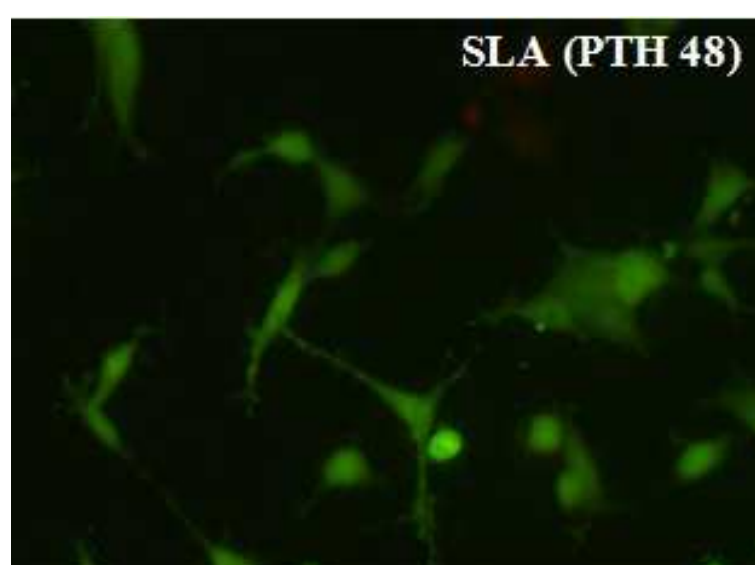
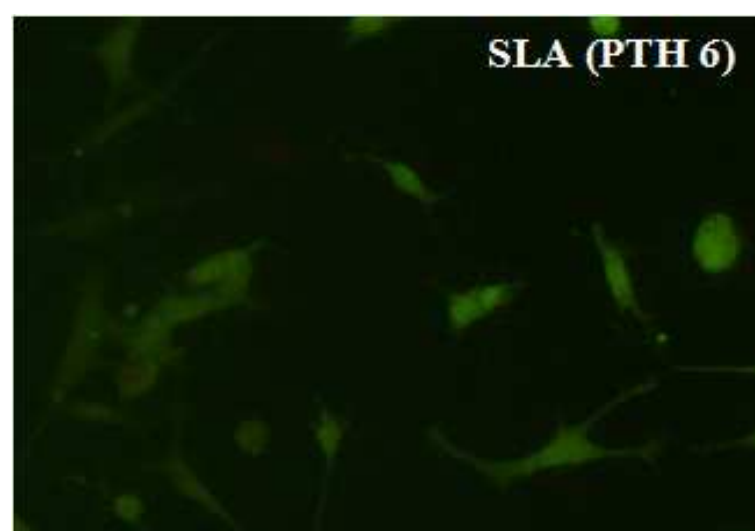
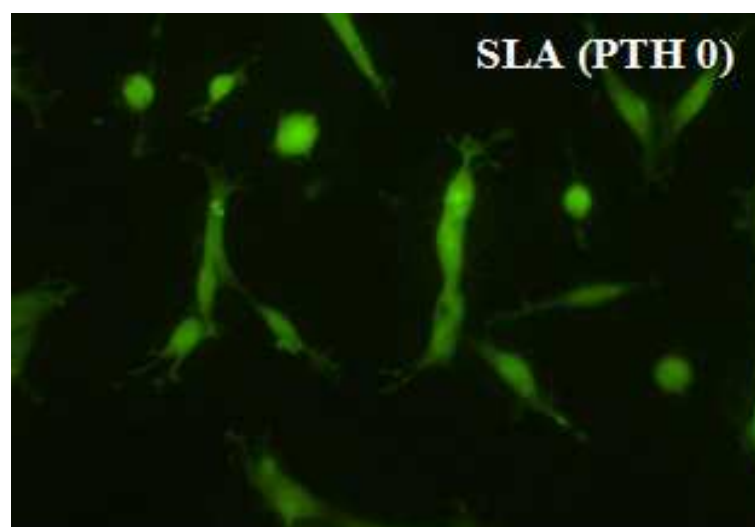


Abbildung 10: Osteoblasten aus den Gruppen (PTH 0), (PTH 6) und (PTH 48) nach 6-tägigem Kontakt mit der SLA-Oberfläche im Vergleich (200-fache Vergrößerung)

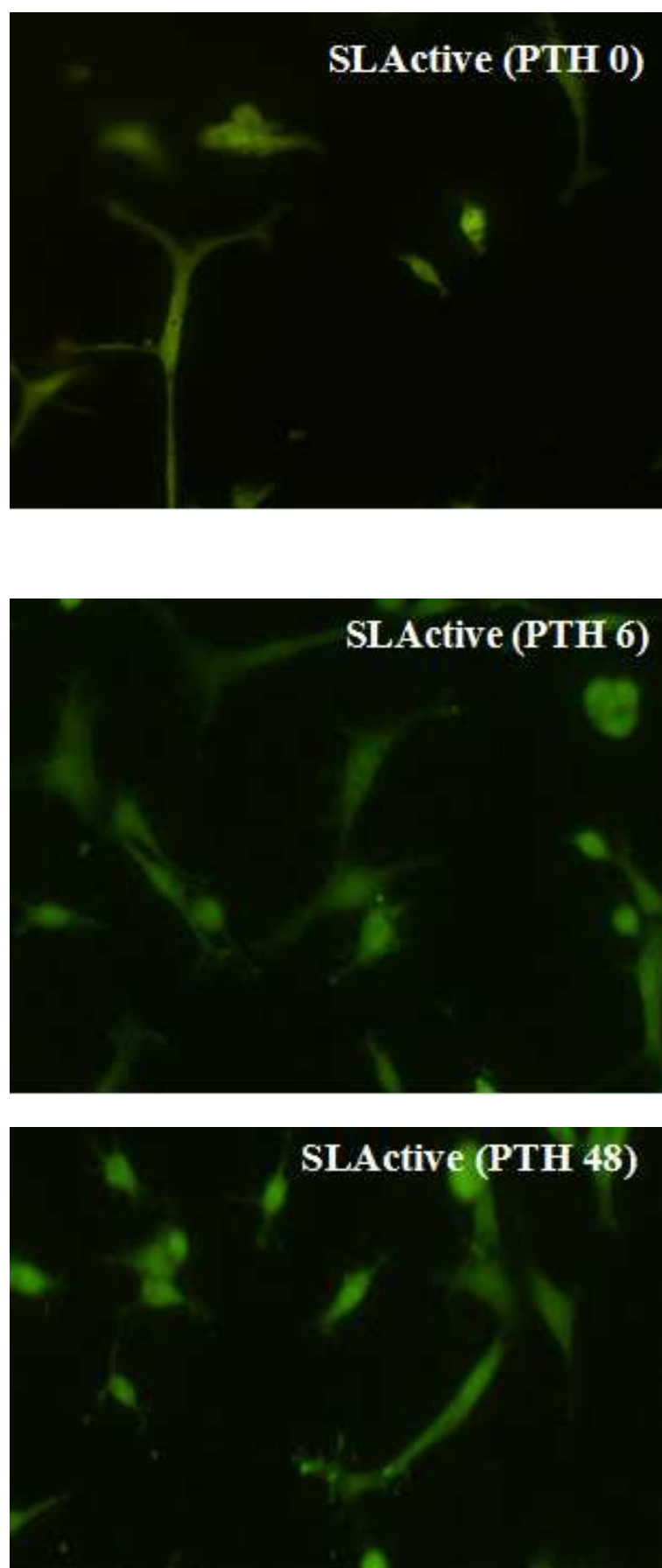


Abbildung 11: Osteoblasten aus den Gruppen (PTH 0), (PTH 6) und (PTH 48) nach 6-tägigem Kontakt mit der SLActive-Oberfläche im Vergleich (200-fache Vergrößerung)

4.2 Adhäsion der Primärosteoblasten

Der Zelladhäsion fördernde Einfluss glatter Oberflächen ist sowohl auf der PL als auch auf der PT deutlich sichtbar. Auf glatten Oberflächen im Vergleich zu rauen Oberflächen bleiben nach 24 Stunden mehr Zellen haften. Eine starke Veränderung der Zellmorphologie ist nicht deutlich sichtbar. Es scheint, dass die Osteoblasten nach 24 Stunden auf rauen Oberflächen stärker ausgebreitet sind. Die Osteoblasten auf der PL- und PT-Oberfläche stehen in unmittelbarem Kontakt miteinander, erscheinen aber kompakter und mehr abgekugelt. Die Stimulationsgruppen unterscheiden sich zum Zeitpunkt der Mikroskopie visuell nicht stark voneinander. In den PTH-Gruppen strecken die Zellen ihre Fillipodien weniger zueinander, während ohne PHT auf rauen Oberflächen das ganz deutlich ist.

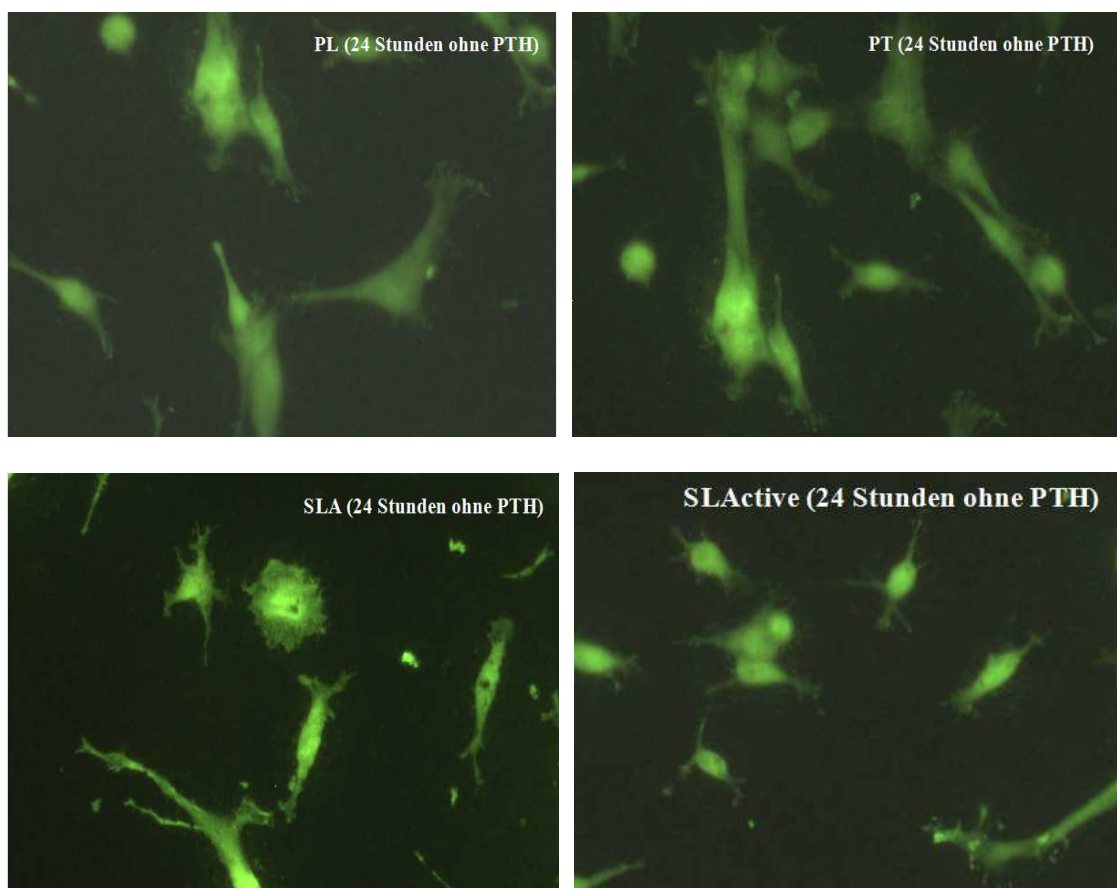


Abbildung 12: Adhäsion von Osteoblasten auf den Oberflächen nach 24 Stunden ohne PTH (200-fache Vergrößerung)

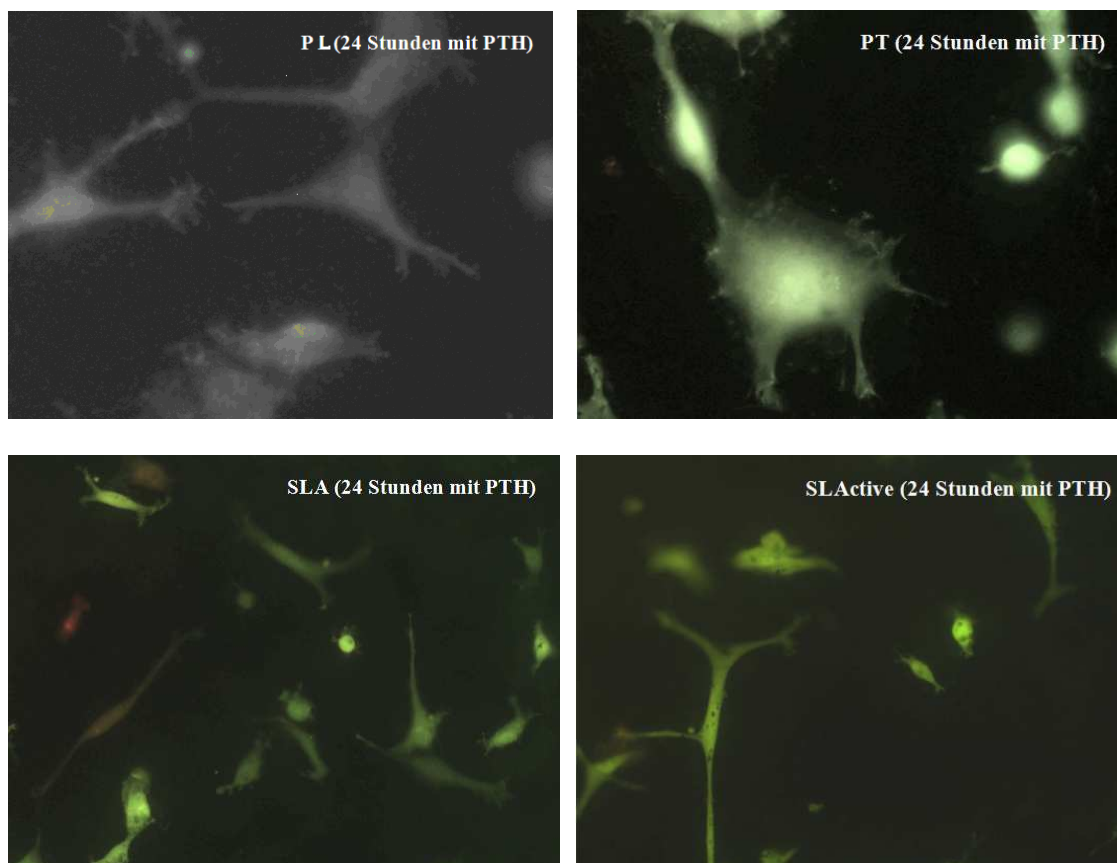


Abbildung 13: Adhäsion von Osteoblasten auf den Oberflächen nach 24 Stunden im PTH angereicherten Medium (200-fache Vergrößerung)

4.2.1 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens anhand photometrischer Methoden

Unsere Ergebnisse aus der Proliferationsuntersuchung zum Adhäsionsverhalten haben einen rein deskriptiven Charakter. Sie lassen die Schlussfolgerung zu, dass sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden in Relation zu den anderen drei Oberflächen (PL, SLA, SLActive) eine größere Menge Zellen auf dem polierten Titanium anhaften kann. Die übrigen Oberflächen weisen untereinander rein deskriptiv keine Unterschiede auf. Wir konnten keine Auswirkung auf die Osteoblasten bezüglich ihres Adhäsionsverhaltens durch die Stimulation mit PTH (1-34) mit unseren Ergebnissen nachweisen.

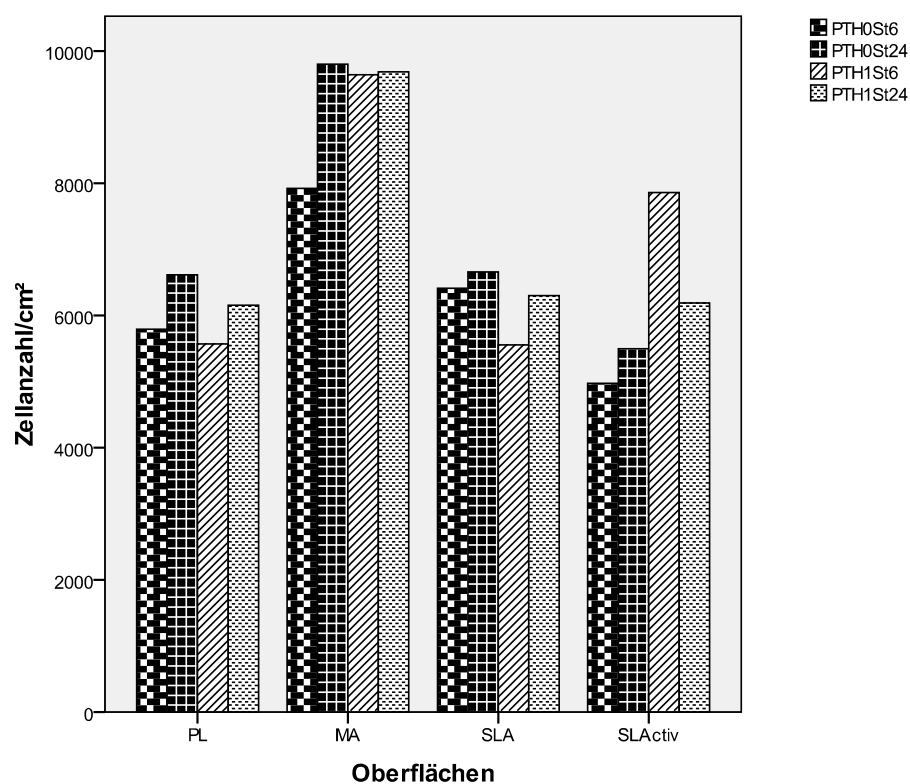


Abbildung 14: Daten aus der fluorometrischen Adhäsionsuntersuchung – Stimulativarten im Vergleich.

Stimulationsarten im Vergleich anhand der Anzahl der adhärenenten Osteoblasten nach 6 und 24 Stunden mit und ohne PTH-Stimulation. Deskriptive Darstellung, Dreifachbestimmung, Bildung eines Mittelwertes, $n = 1$

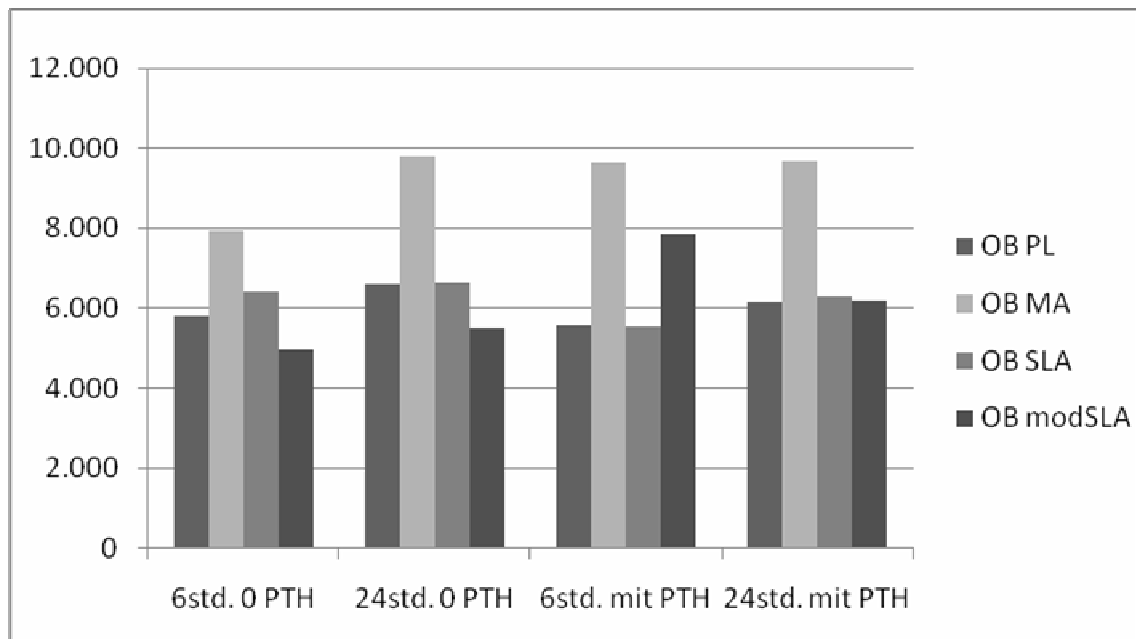


Abbildung 15: Daten aus der fluorometrischen Adhäsionsuntersuchung.

Träger im Vergleich anhand der Anzahl der adhärenenten Osteoblasten nach 6 und 24 Stunden mit und ohne PTH-Stimulation. Deskriptive Darstellung, Dreifachbestimmung, Bildung eines Mittelwertes, $n = 1$

4.2.2 Untersuchung der Adhäsionsmarker

Die Resultate unserer Analyse des expressiven Adhäsionsverhaltens der Osteoblasten sind ebenfalls deskriptiv. Die Ergebnisse lassen nicht erkennen, dass das Expressionsverhalten der Adhäsionsmarker Kollagen I, Fibronectin und Osteonectin weder von den jeweiligen Oberflächen abhängig ist noch von der Stimulation mit PTH (1-34).

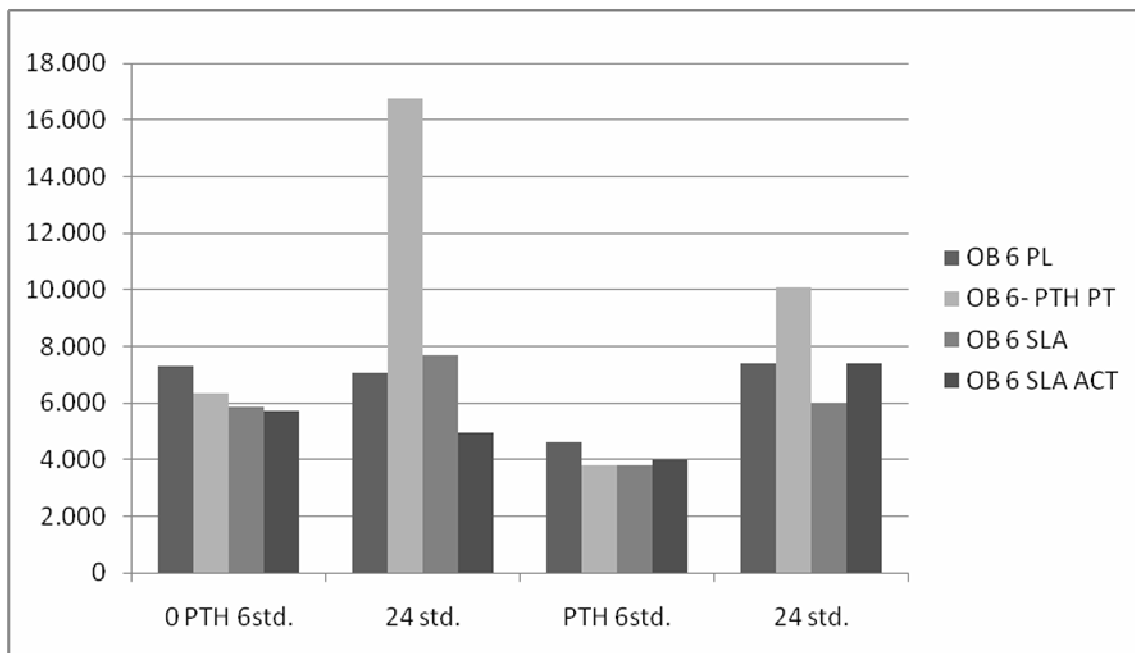


Abbildung 16: RT-PCR-Daten aus der Adhäsionsuntersuchung.

Expression der Fibronectin-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach 6 und 24 Stunden in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Deskriptive Darstellung, Dreifachbestimmung, Bildung eines Mittelwertes, n = 1

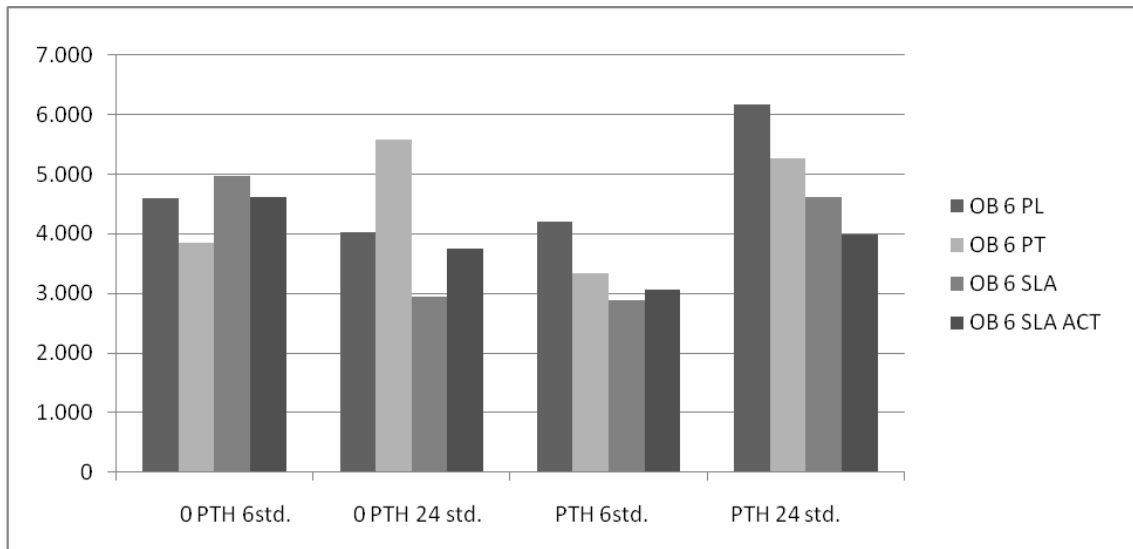


Abbildung 17: RT-PCR-Daten aus der Adhäsionsuntersuchung.

Expression der Kollagen I-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach 6 und 24 Stunden in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Deskriptive Darstellung, Dreifachbestimmung, Bildung eines Mittelwertes, n = 1

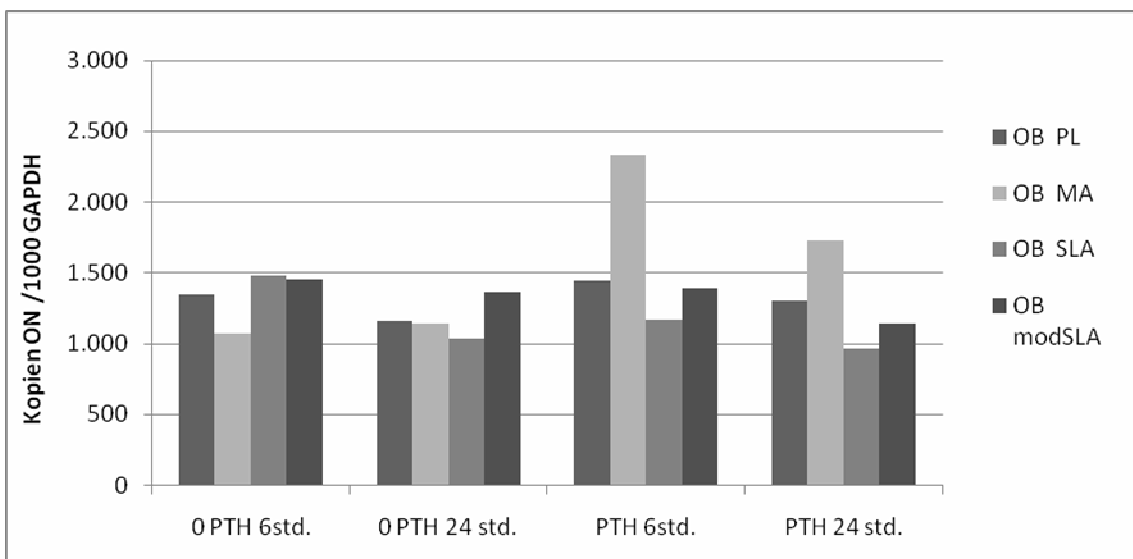


Abbildung 18: RT-PCR-Daten aus der Adhäsionsuntersuchung.

Expression der Osteonectin mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach 6 und 24 Stunden in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Deskriptive Darstellung, Dreifachbestimmung, Bildung eines Mittelwertes, n = 1

4.3 Proliferation der Primärosteoblasten

Die Ergebnisse aus der photometrischen Untersuchung zeigen, dass die Oberfläche die primären humanen Osteoblastenkulturen in signifikanter Weise hinsichtlich der Zellproliferation beeinflusst. Die Osteoblasten können auf glatten Oberflächen eine höhere Proliferationsrate aufweisen, als es auf rauen Oberflächen der Fall ist. Es lässt sich für die Zellproliferation die folgende Rangliste von Materialien aufstellen:

Kontrollgruppe PTH 0:

Zellkulturplastik: 1,0 → poliertes Titanium: 0,9 → SLA: 0,4 → SLActive: 0,3

Gruppe PTH 6:

Zellkulturplastik: 1,0 → poliertes Titanium: 0,7 → SLA: 0,3 = SLActive: 0,3

Gruppe PTH 48:

Zellkulturplastik: 1,0 → poliertes Titanium: 0,9 → SLA: 0,5 = SLActive: 0,5

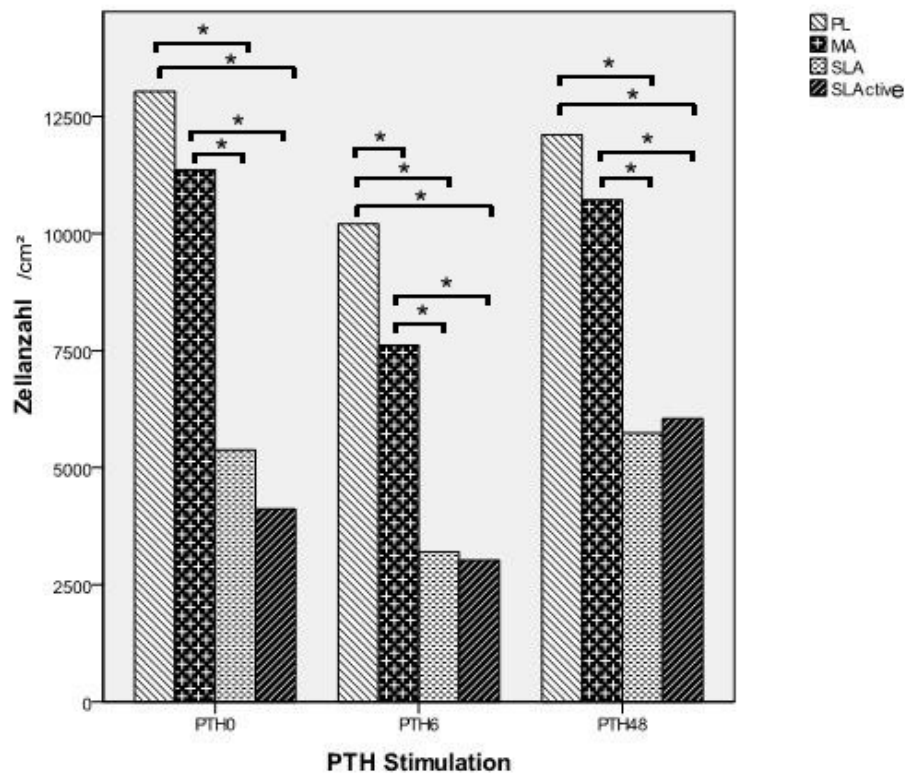


Abbildung 19: Daten aus der fluorometrischen Untersuchung der Zellproliferation.

Träger im Vergleich anhand durchschnittlicher Anzahl der adhärenen Primärosteoblasten auf cm^2 nach dem 2., 4., 6. und 10. Tag auf unterschiedlichen Trägern in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Dreifachbestimmung, Bildung eines Mittelwertes, $n = 4$. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

Eine intermittierende PTH-Gabe im Vergleich zu einer permanenten PTH(1-34) Stimulation wie auch der Kontrollgruppe zeigen über zehn Tage hinweg sehr deutlich eine Suppression der Proliferationsrate. Die Hemmung der Proliferation lag signifikant mit Werten von PL: 0,8; PT: 0,7; SLA: 0,6; SLActive: 0,7 deutlich unterhalb der Werte der Kontrollgruppe. Die Werte gegenüber der Gruppe PTH 48 waren PL: 0,8; PT: 0,7; SLA: 0,5; SLActive: 0,5.

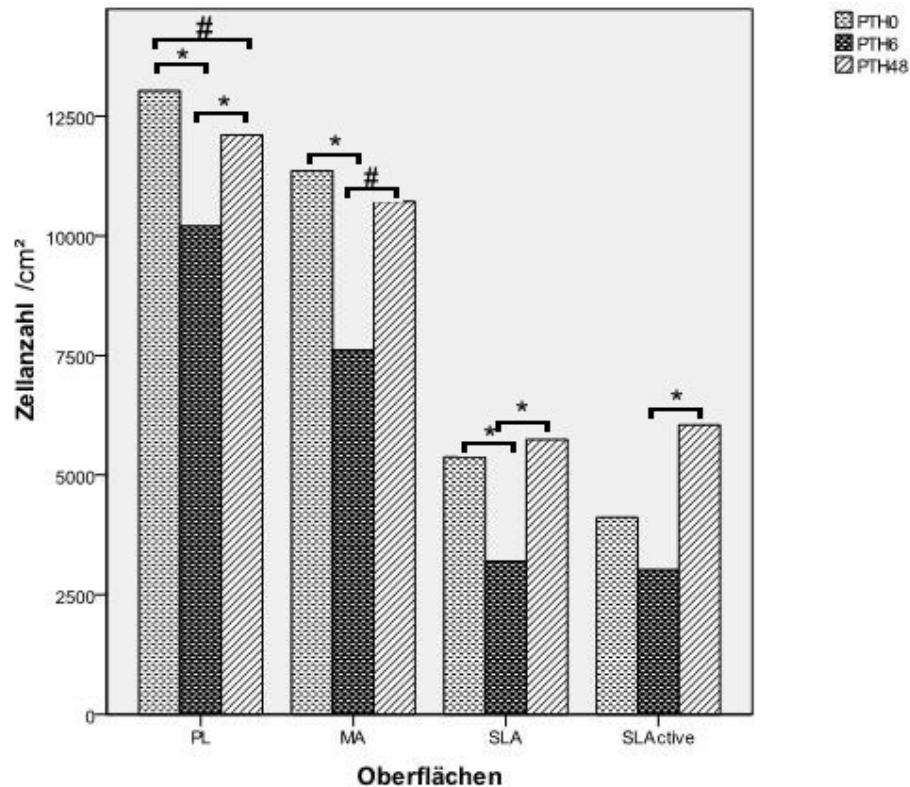


Abbildung 20: Daten aus der fluorometrischen Untersuchung der Zellproliferation.

Träger im Vergleich anhand durchschnittlicher Anzahl der adhärenen Primär-osteoblasten auf cm^2 nach dem 2., 4., 6. und 10. Tag auf unterschiedlichen Trägern in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Dreifachbestimmung, Bildung eines Mittelwertes, $n = 4$. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

4.4 Genexpression von Primärosteoblasten

Humane Primärosteoblasten wurden jeweils am 6., 10., 14., 18. und 22. Versuchstag auf die mRNA-Expressionen von ALP, CEMP 1, FN, KOL I, OC, ON, OP, PTH R1 und RUNX 2 untersucht, zu dem Housekeeping-Gen GAPDH normalisiert und grafisch dargestellt. Die Abbildungen (21) und (22) zeigen, dass sämtliche Marker der untersuchten Zelllinie unterschiedlich stark exprimiert werden.

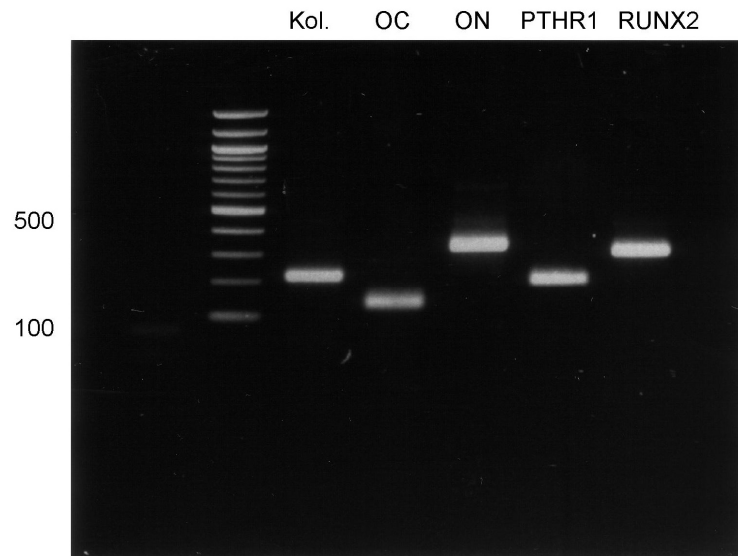


Abbildung 21: Nachweis der Spezifität der angewandten Primer in der RT-PCR

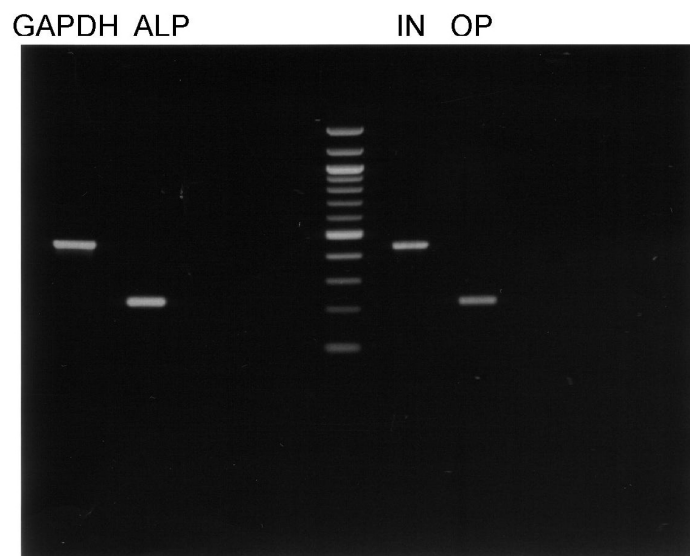


Abbildung 22: Nachweis der Spezifität der angewandten Primer in der RT-PCR

4.4.1 mRNA-Expressionen von ALP

In unserer Untersuchung wurde eine niedrige ALP-mRNA-Expression beobachtet. Sie betrug etwa 0.025 % der GAPDH-Expression. Die RT-PCR-Daten aus der Genexpressionsuntersuchung der ALP-mRNA in Primärosteoblasten zeigen nur wenige Signifikanzen und Tendenzen im Vergleich mit den Stimulationsarten. Auf glatten Oberflächen – PL und PT – konnte eine verminderte Expressionsrate von ALP in der Gruppe PTH 6 um den Faktor PL = 0,8, PT = 0,6 beobachtet werden.

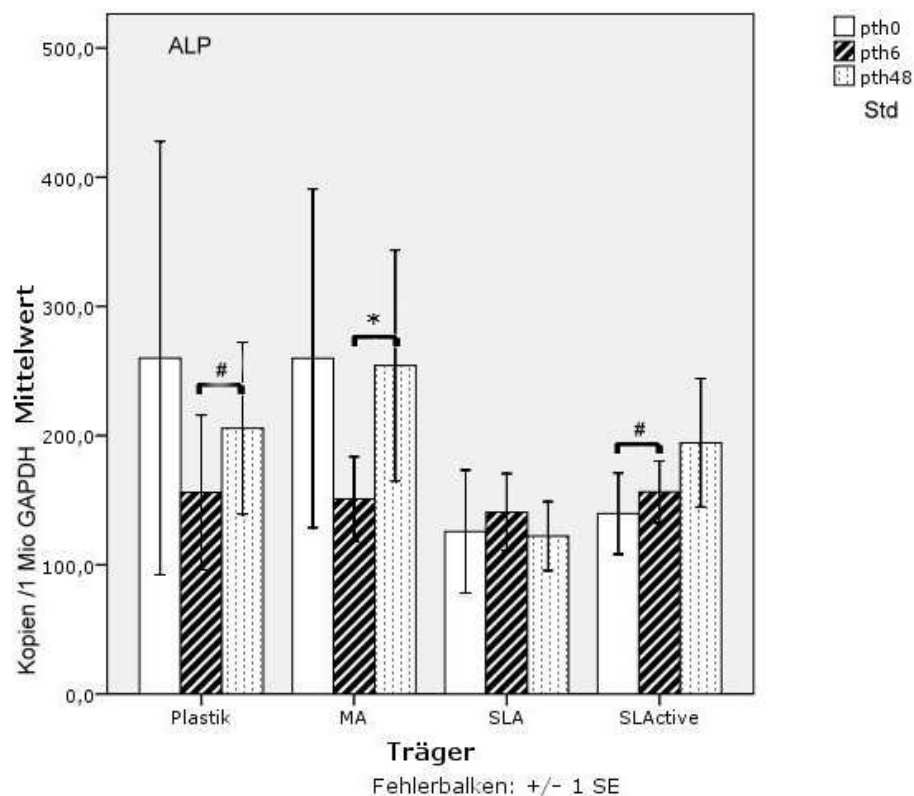


Abbildung 23: RT-PCR-Daten aus der ALP-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der ALP-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, p < 0,05

= statistisch tendenziell, p < 0,1

Die Osteoblasten auf glatten Oberflächen können in den Gruppen PTH 0 und PTH 48 tendenziell eine höhere ALP-mRNA-Genexpressionsrate aufweisen, als es bei rauen Oberflächen der Fall ist. In der Gruppe PTH 6 kann dieser Effekt nicht beobachtet

werden. Es lässt sich für die Zellproliferation die folgende Rangliste der Materialien aufstellen:

Kontrollgruppe PTH 0:

Zellkulturplastik: 1,0 = poliertes Titanium: 1,0 → SLA: 0,4 = SLActive: 0,4

Gruppe PTH 6:

Zellkulturplastik: 1,0 = poliertes Titanium: 1,0 = SLA: 1,0 = SLActive: 1,0

Gruppe PTH 48:

Zellkulturplastik: 1,0 = poliertes Titanium: 1,0 → SLA: 0,7 = SLActive: 0,7

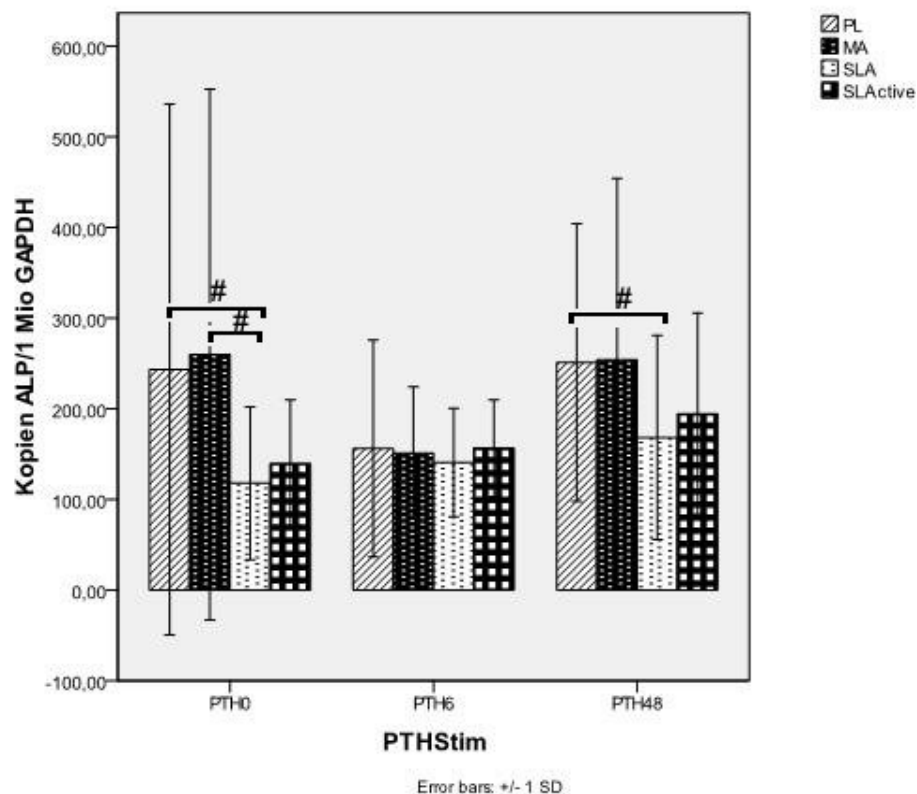


Abbildung 24: RT-PCR-Daten aus der ALP-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der ALP-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, p < 0,05

= statistisch tendenziell, p < 0,1

4.4.2 mRNA-Expressionen von CEMP 1

Bei der Untersuchung der Expression von CEMP 1 war eine starke Expression dieses Markers feststellbar; sie betrug das 20-Fache der GAPDH-Expression. Trotz allem brachte die Auswertung keinerlei signifikante Ergebnisse, die weder eine Regelmäßigkeiten in Bezug auf eine Stimulation oder den Einfluss der Oberflächen auf die Expression dieses Markers hindeuten würde.

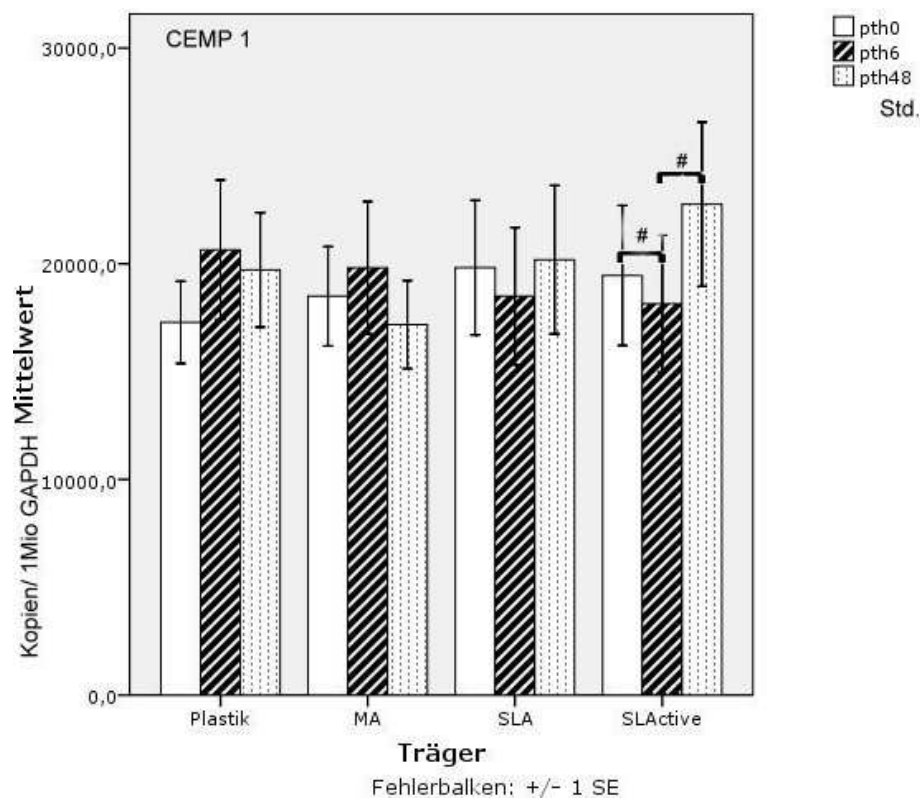


Abbildung 25: RT-PCR-Daten aus der CEMP 1-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der CEMP 1-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, $n = 5$. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

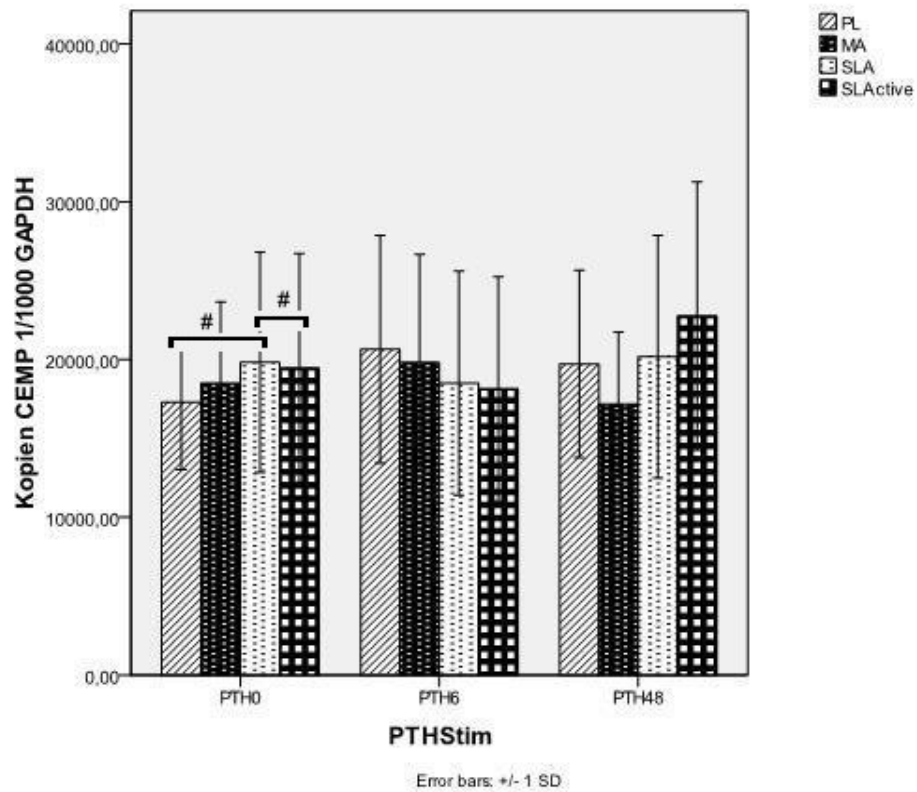


Abbildung 26: RT-PCR-Daten aus der CEMP 1-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der CEMP 1-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, $n = 5$. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

4.4.3 mRNA-Expressionen von FN

Auch im Falle des Fibronectins haben wir eine durchgehend hohe mRNA-Expression beobachtet, 40 bis 60 mal höher als die GAPDH-Expression. Jedoch zeigen Ergebnisse aus der Genexpressionsuntersuchung nicht in allen Fällen Signifikanzen und Tendenzen. Deskriptiv kann konstatiert werden, dass eine PTH-Stimulation zu einer gesteigerten Expression von Fibronectin auf allen Oberflächen gegenüber der Kontrollgruppe PTH 0 führt. Lediglich ein signifikantes Ergebnis (PTH 6 gesteigert um Faktor 1,1) lässt sich auf der SLA anführen.

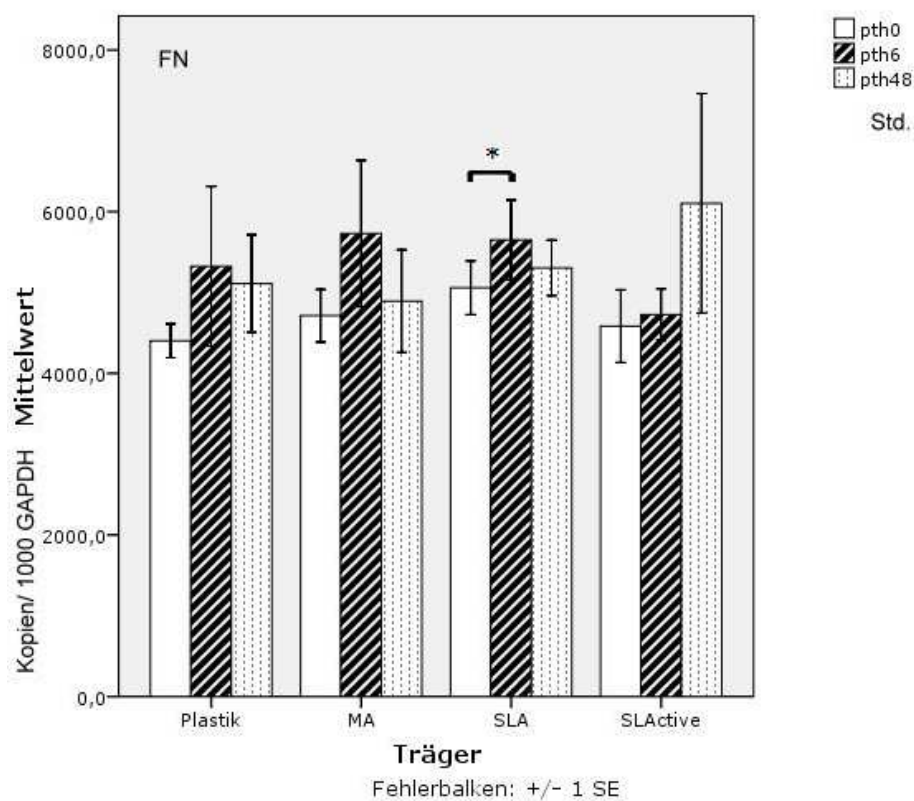


Abbildung 27: RT-PCR-Daten aus der FN-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der Fibronectin-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

Der Vergleich der Oberflächen lässt nur wenige signifikante oder tendenzielle Unterschiede zwischen den analysierten Oberflächen und dem Auftreten von Abhängigkeit vom Materialuntergrund dieses Proteins erkennen.

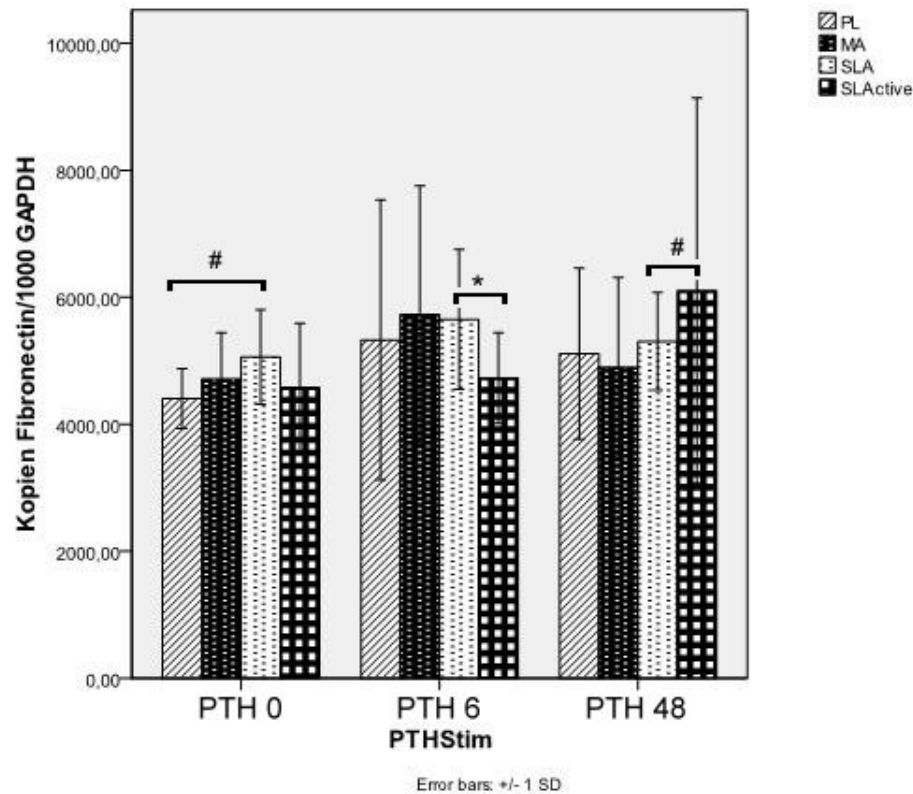


Abbildung 28: RT-PCR-Daten aus der FN-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der Fibronectin-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, $n = 5$. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

4.4.4 mRNA-Expressionen von KOL I

Die Ergebnisse aus der Genexpressionsuntersuchung von KOL I zeigen auch in diesem Fall eine hohe, 1,5-fache Expression gegenüber GAPDH. Deskriptiv kann konstatiert werden, dass eine PTH-Stimulation zu einer gesteigerten Expression von KOL I auf allen Oberflächen gegenüber der Kontrollgruppe PTH 0 führt. Es lässt sich die folgende Rangliste der Stimulationsarten aufstellen:

	PTH 48		PTH 6		PTH 0
PL:	1,0	→	0,8	→	0,6
PT:	1,0	=	1,0	→	0,8
SLA:	1,0	=	1,0	→	0,8
SLActive:	1,0	=	1,0	→	0,9

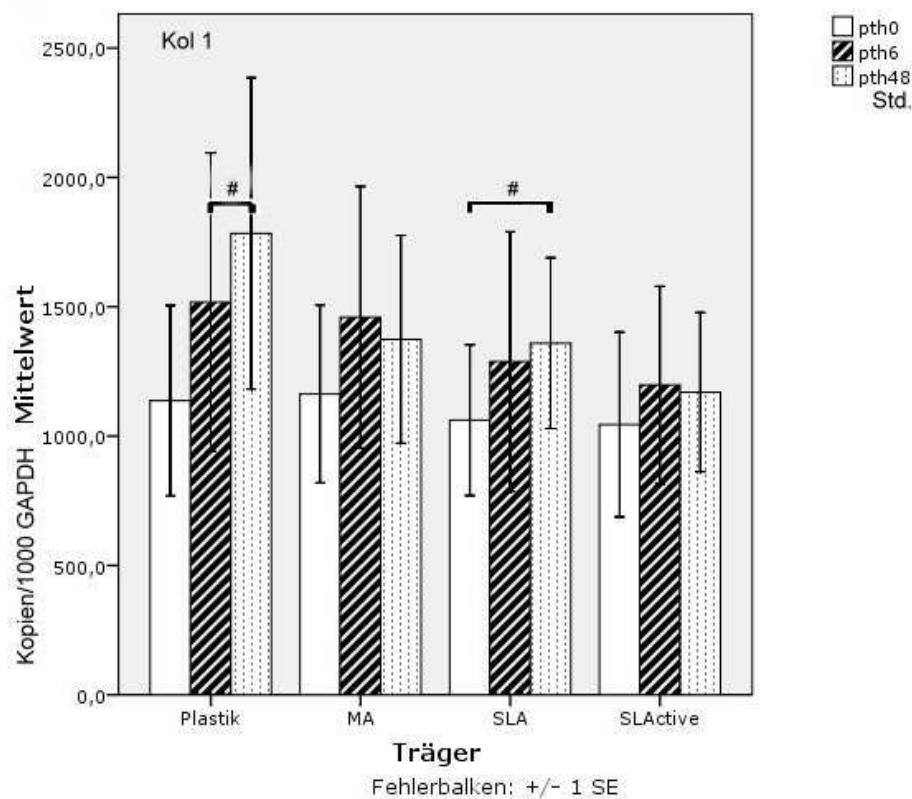


Abbildung 29: RT-PCR-Daten aus der Kol 1-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der Kollagen I-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, $n = 5$. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$,

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

Die Ergebnisse aus der Genexpressionsuntersuchung von Kollagen I zeigen, dass die Osteoblasten auf glatten Oberflächen in den Gruppen PTH 6 und PTH 48 signifikant und tendenziell eine höhere Kollagen-I-mRNA-Genexpressionsrate aufweisen, als es bei rauen Oberflächen der Fall ist. In der Gruppe PTH 0 ist dieser Effekt nicht zu sehen. Es lässt sich für die Gruppen PTH 6 und PTH 48 die folgende Rangliste an Materialien erstellen:

Kontrollgruppe PTH 0:

Zellkulturplastik = poliertes Titanium = SLA = SLActive

Gruppe PTH 6

Zellkulturplastik: 1,0 → poliertes Titanium: 0,9 → SLA: 0,8 → SLActive: 0,8

Gruppe PTH 48

Zellkulturplastik: 1,0 → poliertes Titanium: 0,8 = SLA: 0,8 → SLActive: 0,6

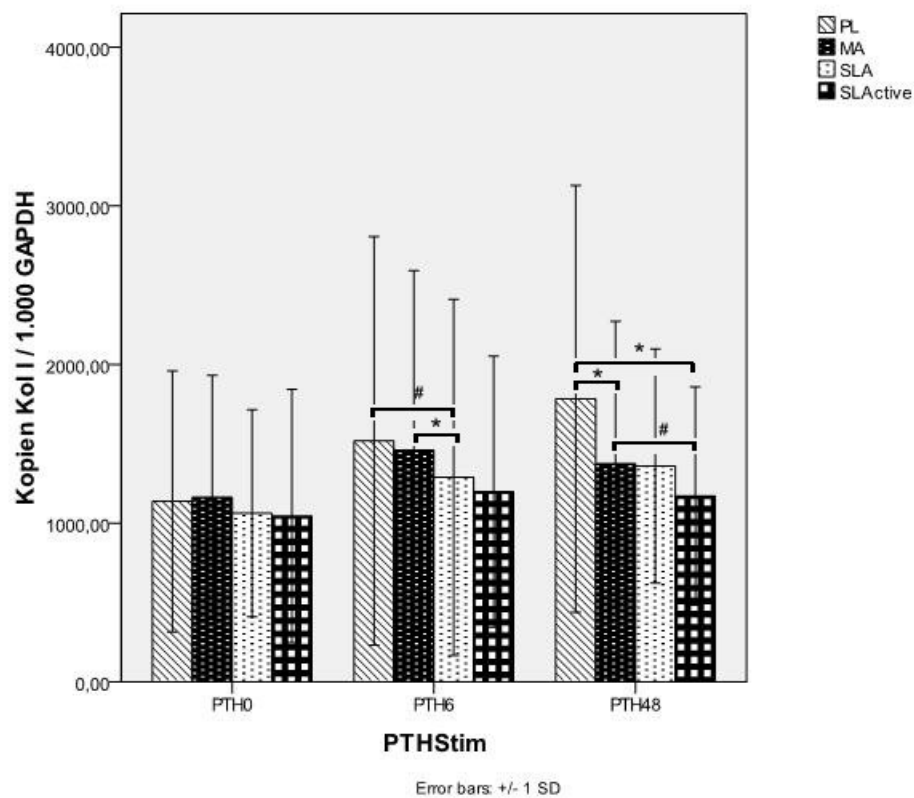


Abbildung 30: RT-PCR-Daten aus der Kol 1-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der KOL I-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

4.4.5 mRNA-Expressionen von OC

Trotz permanenter Steigerung der OC-mRNA-Expression überschritt sie nach 21 Tagen 0,4 % der GAPDH-Expression nicht. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant gesteigerte Expression von Osteocalcin in der Gruppe PTH 6 gegenüber der Kontrollgruppe PTH 0 und Gruppe PTH 48 auf glatten und SLActive-Oberflächen. Signifikant und tendenziell lässt sich die folgende Rangliste an Stimulationsarten erstellen:

	PTH 6		PTH 48		PTH 0
PL:	1,0	→	0,7	=	0,7
PT:	1,0	→	0,7	=	0,7
SLA:	1,0	=	1,0	→	0,8
SLActive:	1,0	→	0,8	→	0,7

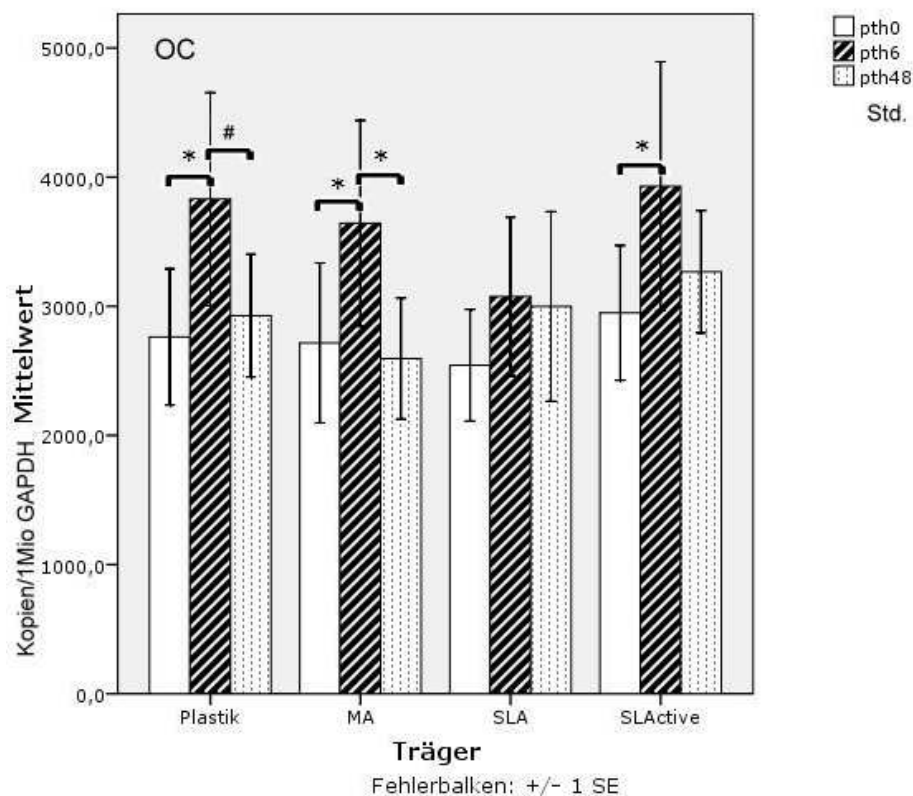


Abbildung 31: RT-PCR-Daten aus der OC-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der Osteocalcin-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, p < 0,05

= statistisch tendenziell, p < 0,1

Im Ergebnis der Genexpressionsuntersuchung in Primärosteoblasten konnte eine signifikant vermehrte Genexpression von Osteocalcin auf der SLActive-Oberfläche in der Gruppe PTH 48 um Faktor 1,3 gegenüber PT und 1,1 gegenüber PL gezeigt werden. Weder in der Kontrollgruppe PTH 0 noch der PTH 6 Gruppe konnten signifikante Unterschiede zwischen den Oberflächen identifiziert werden, obgleich deskriptiv die Genexpression Osteocalcins auf der SLActive-Oberfläche immer größer war.

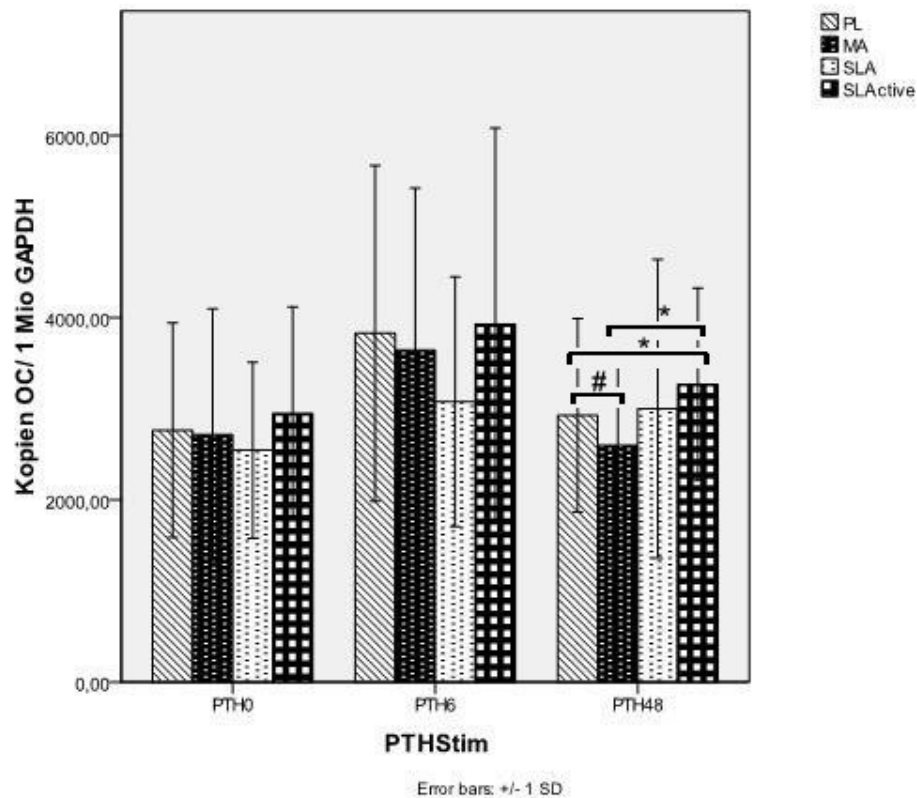


Abbildung 32: RT-PCR-Daten aus der OC-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der OC-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, p < 0,05

= statistisch tendenziell, p < 0,1

4.4.6 mRNA-Expressionen von ON

In unserer Untersuchung haben wir eine hohe Expression von ON-Expression beobachtet. Sie betrug 50 % der GAPDH-Expression. Die Resultate zeigen eine signifikante Erhöhung der Genexpression von Osteonectin in den PTH-Gruppen auf rauen SLA- und SLActive-Oberflächen sowie im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Erhöhte Osteonectinraten in den PTH 6- und PTH 48-Gruppen konnten auf allen Oberflächen beobachtet werden, wobei diese bei der permanenten PTH (1-34) am größten ausgeprägt war. Es lässt sich die folgende Rangliste von Stimulationsarten aufstellen:

	PTH 48		PTH 6		PTH 0
PL	1,0	→	0,9	→	0,7
PT	1,0	=	1,0	→	0,8
SLA	1,0	→	0,8	→	0,6
SLActive	1,0	→	0,8	→	0,6

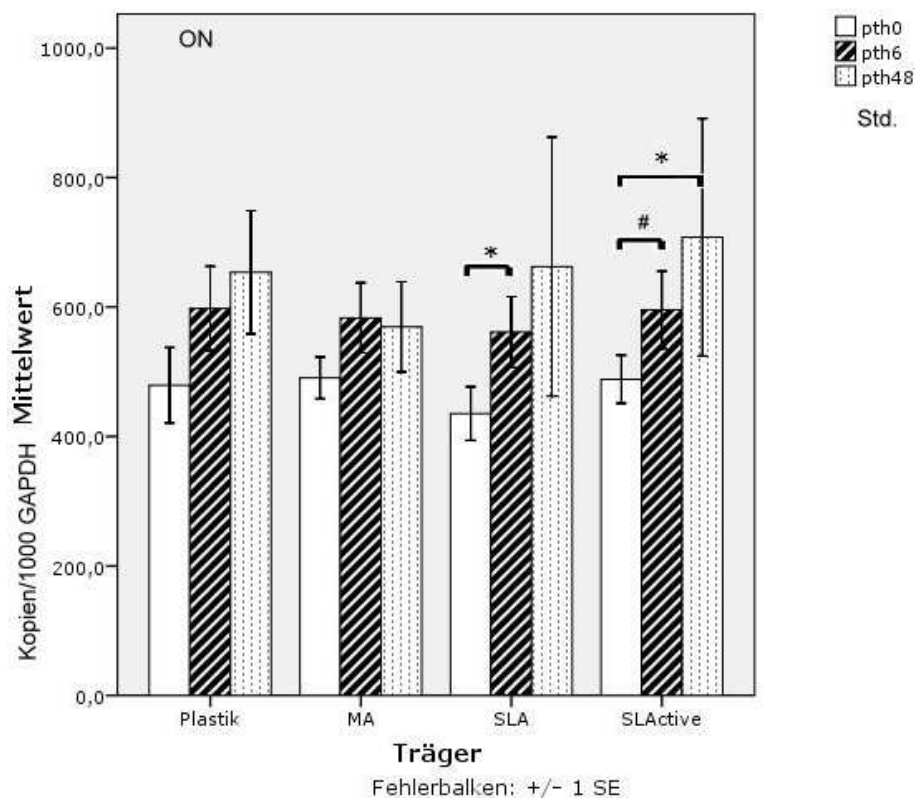


Abbildung 33: RT-PCR-Daten aus der ON-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der Osteonectin-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und

Standartabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

Der Vergleich der Oberflächen lässt nur wenige tendenzielle und keine signifikanten Unterschiede zwischen den analysierten Oberflächen und dem Auftreten von Abhängigkeit vom Materialuntergrund auf die Expression des Proteins Osteonectin erkennen.

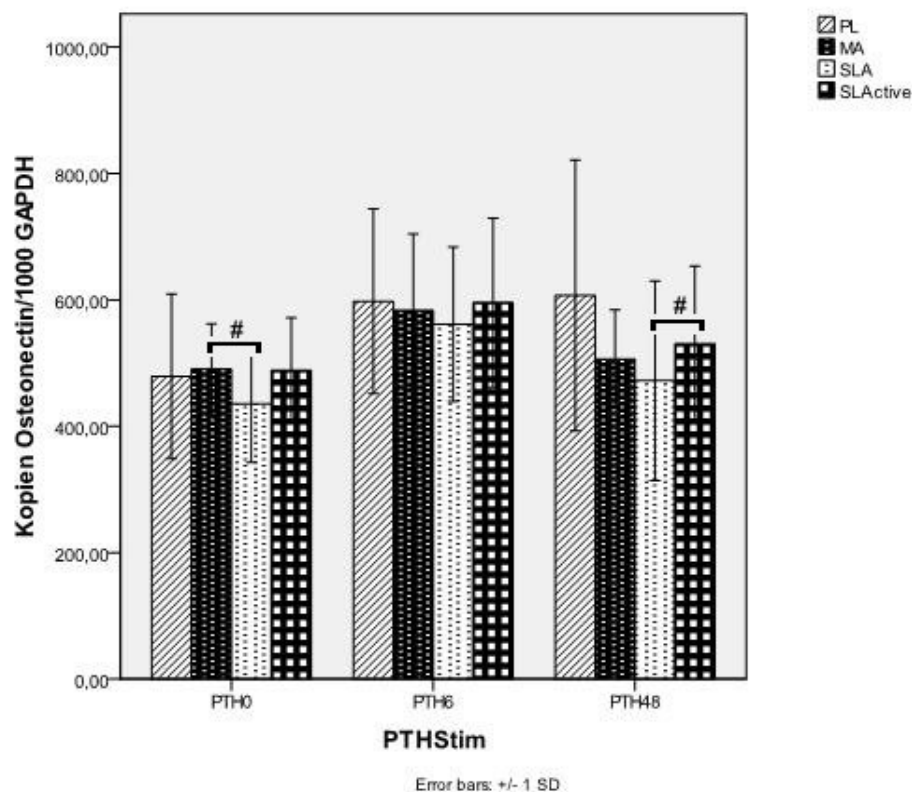


Abbildung 34: RT-PCR-Daten aus der ON-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der Osteonectin-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standartabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

4.4.7 mRNA-Expressionen von OP

In der vorliegenden Untersuchung betrug die mRNA-Expression von OP lediglich 1 % der GAPDH-Expression. Im Vergleich der Stimulationsart zeigte sich in der Gruppe PTH 6 tendenziell eine gesteigerte Genexprimierung des Markers Osteopontin auf rauen Oberflächen, insbesondere auf SLA (Faktor 2, 2) und SLActive (Faktor 1,8). Auf glatten Oberflächen konnten solche Beobachtungen nicht gemacht werden.

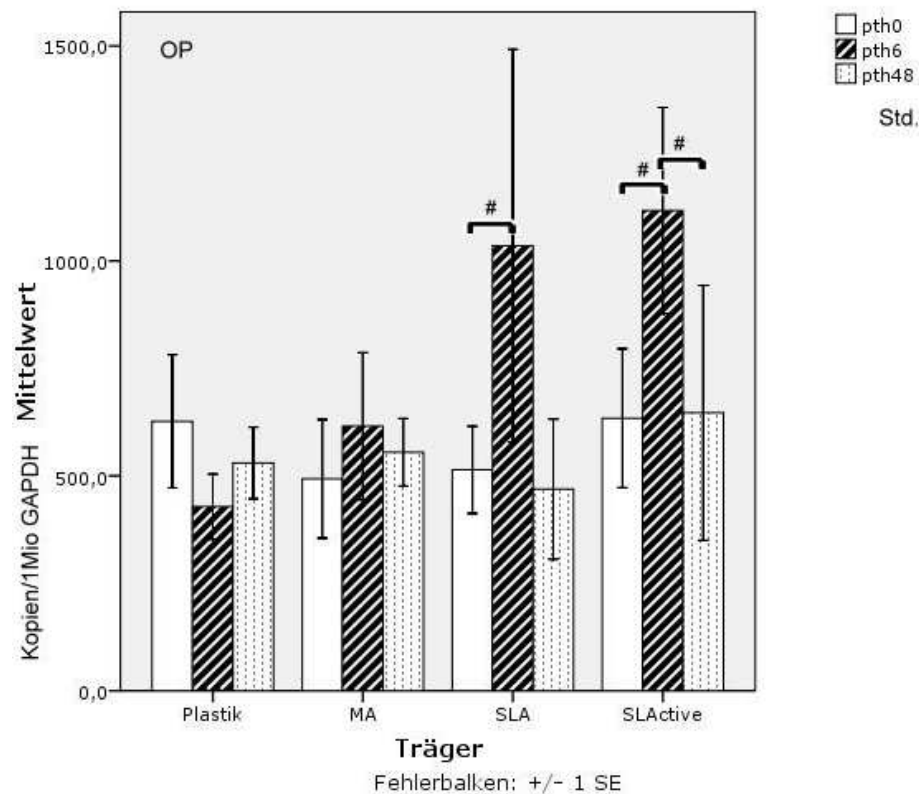


Abbildung 35: RT-PCR-Daten aus der OP-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der Osteopontin-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14. und 18. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 4. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

In unserer Untersuchung wurde tendenziell festgestellt, dass Osteopontin auf rauen SLA- und SLActive-Oberflächen in höherem Maße genexprimiert als auf glatten PT-Oberflächen (Faktor 1,8) und Plastik (Faktor 2,1) wird – und dies auch nur in der Gruppe der Osteoblasten, die intermittierend mit PTH (1-34) stimuliert worden waren. In den Gruppen PTH 0 und PTH 48 sind keine deutlichen Unterschiede zu verzeichnen.

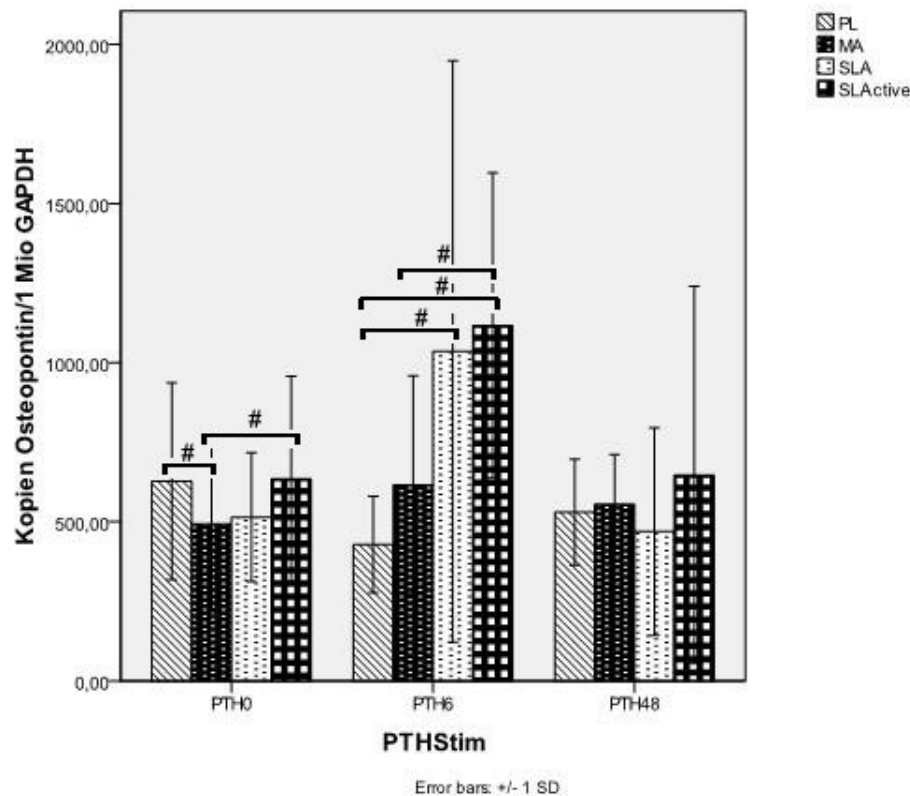


Abbildung 36: RT-PCR-Daten aus der OP-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der Osteopontin-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14. und 18. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, $n = 4$. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

4.4.8 mRNA-Expressionen von PTH R1

Die Expression von PTH R1 lag im Bereich von 0,5 % des GAPDH. Die Ergebnisse aus der quantitativen Expressionsmessung des Markers PTH R1 verdeutlichen eine gesteigerte Genexpression dieses Markers in der Gruppe PTH 48. In der Kontrollgruppe PTH 0 gab es keine Schwankungen. In der Gruppe der Osteoblasten mit intermittierender PTH (1-34)-Stimulation war das Gen PTH R1 herunterreguliert worden und lag dennoch unterhalb des Wertes der Kontrollgruppe – wenngleich der Unterschied nicht allzu groß war. Tendenziell und deskriptiv lässt sich die folgende Rangliste von Stimulationsarten aufstellen:

	PTH 48		PTH 0		PTH 6	
PL	1,0	→	0,8	→	0,5	
PT	1,0	=	0,9	=	0,9	
SLA	1,0	→	0,7	→	0,6	
SLActive	1,0	→	0,6	=	0,6	

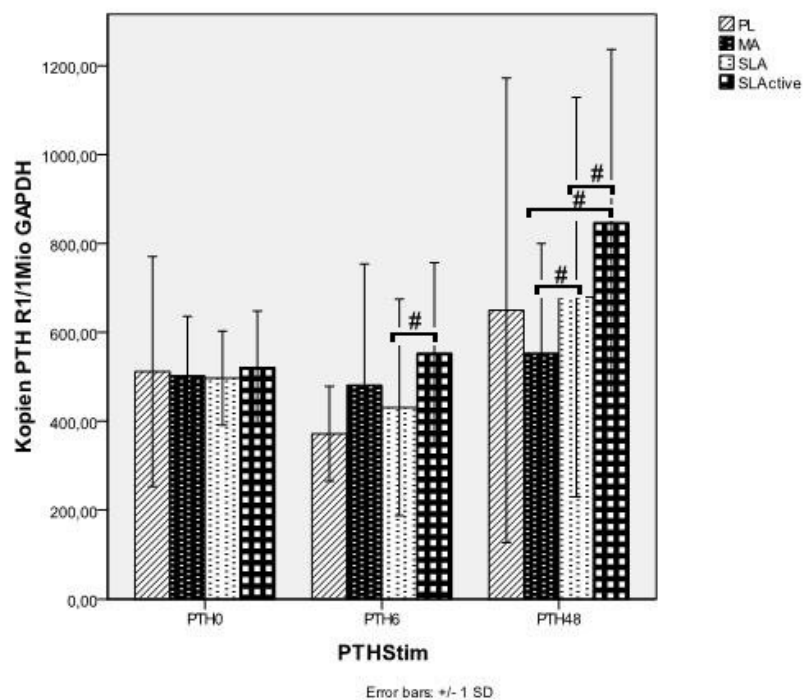


Abbildung 37: RT-PCR-Daten aus der PTH R1-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der PTH R1-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

Die Expression von PTH R1 in der Gruppe PTH 0 war auf allen Oberflächen identisch. In den Gruppen PTH 6 und PTH 48 gab es allerdings Schwankungen zwischen den Oberflächen. Tendenziell war eine gesteigerte Genexpression von PTH R1 auf der SLActive-Oberfläche festzustellen: in der Gruppe PTH 6 um Faktor 1,4 gegenüber PL und in der Gruppe PTH 48 um Faktor 1,5 gegenüber PT.

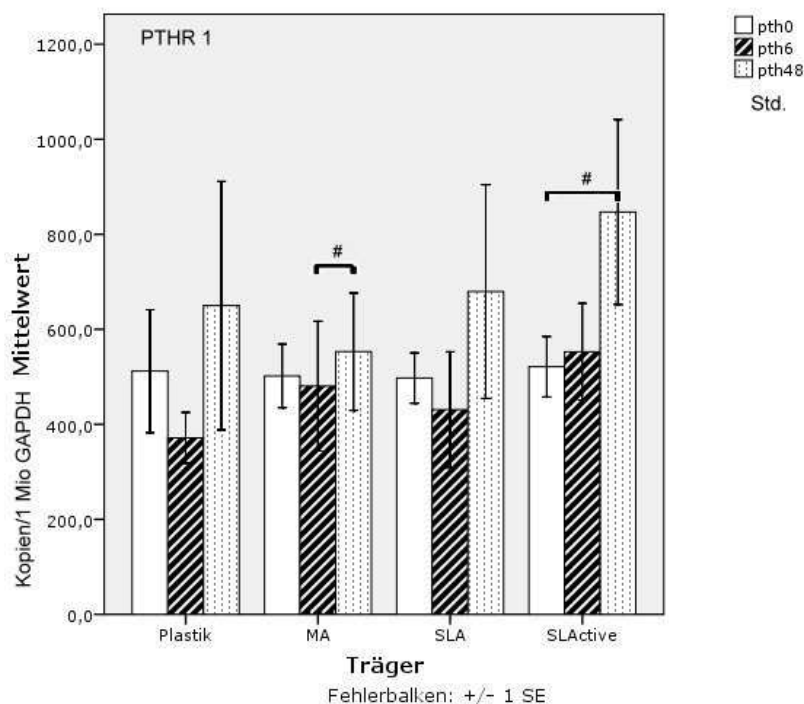


Abbildung 38: RT-PCR-Daten aus der PTH R 1-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der PTH R1-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

4.4.9 mRNA-Expressionen von RUNX 2

Auch die RUNX 2-mRNA-Expression war im Vergleich zum Housekeeping-Gen niedrig, sie betrug 0,5 % der GAPDH-Expression. In der RT-PCR-Untersuchung des PTH-Effektes auf die RUNX 2-Genexpression wurden nur einige Signifikanzen und Tendenzen beobachtet, die sich auf der Kunststoffoberfläche ereigneten. Hier stellten wir eine signifikante Erhöhung der Genexpression in der Gruppe PTH 48 um Faktor 1,4 sowie eine tendenzielle in der Gruppe PTH 6 um Faktor 1,2 gegenüber der Kontrollgruppe fest. Deskriptiv konnte auf sämtlichen Oberflächen eine PTH-Stimulation in einer höheren Genexpressionsrate von RUNX 2 festgestellt werden.

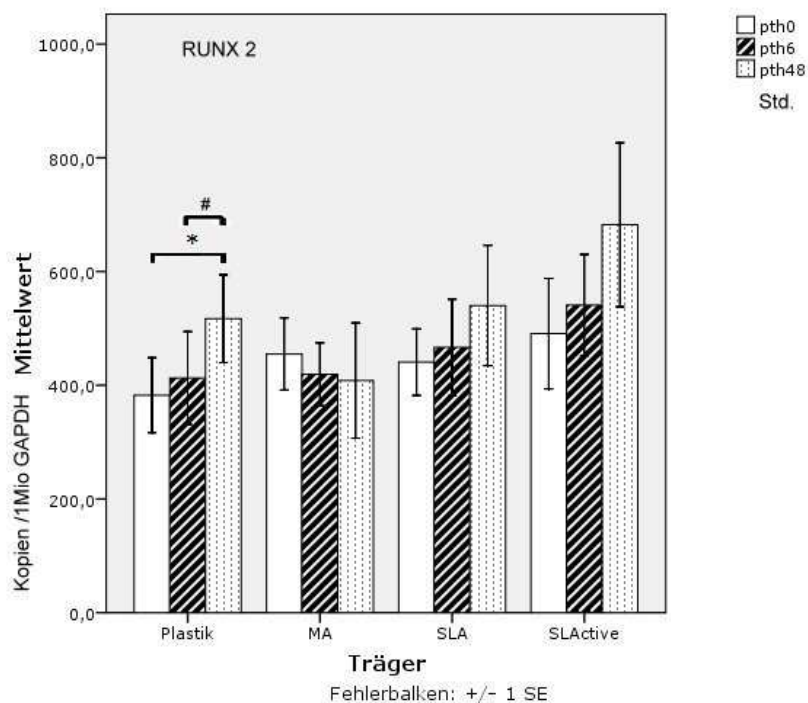


Abbildung 39: RT-PCR-Daten aus der RUNX 2-Genexpressionsuntersuchung – Stimulationsarten im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der RUNX 2-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n = 5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

Im Vergleich der Oberflächen in der RUNX 2-Genexpression in verschiedenen PTH-Gruppen waren nicht alle generierten Ergebnisse auch signifikant oder tendenziell. In der PTH 48-Gruppe ließen sich die meisten Signifikanzen und Tendenzen identifizieren. Auf der Basis dieser Relationen zwischen den Daten konnte das folgende Ranking erstellt werden: In der PTH 48-Gruppe: SLActive: 1,0 → SLA: 0,8 = Kunststoff: 0,8 → poliertes Titan: 0,6. In der Gruppe PTH 6 lag lediglich eine Tendenz dahin gehend vor, dass SLActive eine höhere RUNX 2-Genexpression gegenüber dem polierten Titan aufwies, und zwar um Faktor 1,3. In der Kontrollgruppe PTH 0 war die Expression bezüglich RUNX 2 signifikant um Faktor 1,2 höher auf SLA- und polierten Titanimplantatoberflächen als auf Kunststoff.

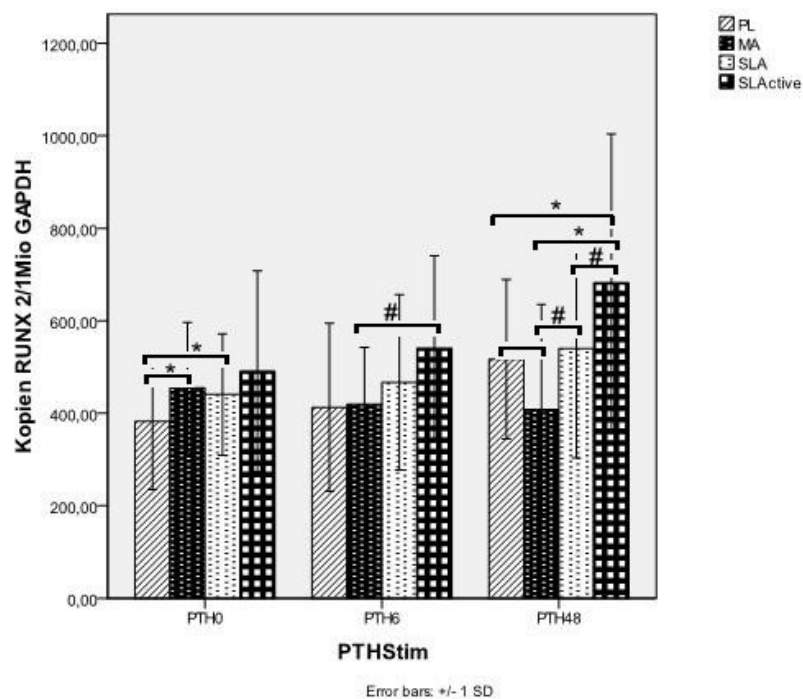


Abbildung 40: RT-PCR-Daten aus der RUNX 2-Genexpressionsuntersuchung – Träger im Vergleich.

Durchschnittliche Expression der RUNX 2-mRNA in Primärosteoblasten auf verschiedenen Trägern nach dem 6., 10., 14., 18. und 22. Tag in Abhängigkeit von der PTH-Stimulation. Zweifachbestimmung, Mittelwerte und Standardabweichungen, n=5. Statistische Auswertung mit SPSS (Wilcoxon-Test)

* = statistisch signifikant, $p < 0,05$

= statistisch tendenziell, $p < 0,1$

5. Diskussion

Der Wirkung des Parathormons auf die Osteoblasten sowie das Knochengewebe wird im Zusammenhang mit dem Knochenmetabolismus eine erhebliche Bedeutung zugeschrieben (Georg Löffler, 2007). Jedoch war es bisher nicht möglich, die exakten zellulären und molekularen Wirkmechanismen hinreichend zu analysieren und zu erklären (Ishizuya et al., 1997, Kano et al., 1993). Dank zahlreicher tierexperimentell durchgeführter Studien war es schließlich möglich, die anabole Wirkung dieses Hormons auf den Knochen identifizieren zu können. Die weitere Erforschung dieser positiven PTH-Effekte richtet sich nach der weiteren Entwicklung von Behandlungsmethoden der Osteoporose (Fujita et al., 1999, Lindsay et al., 1997), und Optimierung von Heilungsmethoden bei Frakturen (Holzer et al., 1999). Es ist naheliegend, dass neue Erkenntnisse über PTH für die Verbesserung der Osteointegration von dentalen Implantaten auch wichtig sein können.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, eine qualitative sowie quantitative Analyse des Genexpressions-, Adhäsions- und Proliferationsverhaltens der Osteoblasten auf unterschiedlichen Oberflächen durchzuführen. Die dabei auftretenden Interaktionen zwischen Osteoblasten, dem PTH und den unterschiedlichen Oberflächen wurde im Rahmen einer Vergleichsuntersuchung analysiert.

In einigen Studien wurde ausschließlich der Einfluss des Parathormons auf Osteoblasten (Ishizuya et al., 1997) untersucht; andere Studien beschäftigten sich nur mit dem Einfluss der Oberflächeneigenschaften des Substrats auf Osteoblasten (Zhao et al., 2005). In der vorliegenden Studie wurden erstmalig beide Parameter in einem Zellkulturmodell zusammengeführt und auf diese Weise die Reaktion der Osteoblasten auf eine bestimmte Stimulationsart von der Oberflächenbeschaffenheit eines Substrates abhängig untersucht.

5.1 Diskussion der Methodik

Die Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht sowohl eine qualitative als auch quantitative Analyse knochenspezifischer Genexpressionen humaner Primärosteoblasten. Die RT-PCR-Technologie bietet eine hohe Sensitivität und wird weltweit in der Forschung angewandt (www.genequantification.info).

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde ein Korrelationskoeffizient der Standardkurven von ($r=0,97$) bis ($r=0,99$) und eine Effizienz der RT-PCR von etwa 90 % erreicht. Bei zu starken Intensitätsschwankungen sowie einem Korrelationskoeffizient

von unter 92 % wurde die RT-PCR wiederholt. Insgesamt kann also festgehalten werden, dass trotz einzelner Abweichungen ein hoher positiver linearer Zusammenhang zwischen zwei durchgeführten RT-PCR-Läufen innerhalb einer Versuchsgruppe besteht und zuverlässige Daten generiert werden können.

Mithilfe der PCR-Technologie können Expressionsmuster der Osteoblasten wiedergegeben werden. Ein Vergleich mit Expressionsmustern anderer Studien ist jedoch häufig nicht möglich (Qi et al., 2009), da

1. keine Standards in der Methodik existieren,
2. zahlreiche Methoden und Auswertungsmöglichkeiten existieren,
3. es eine Vielzahl von Zellmodellen, verschiedene Stimulationsprotokolle und verschiedene Kriterien zur Definition einer Expressionsveränderung gibt.

Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass keine spezifischen Empfehlungen existieren, die zu einer korrekten biologischen Interpretation der gewonnenen Ergebnisse führen (Qi et al., 2009). Daher gestaltet sich die Diskussion der generierten Daten aus PCR-Studien sehr schwer, insbesondere wenn es darum geht, eine Aussage bezüglich der Auswirkung der Veränderung in der Expression einzelner Gene auf den Phänotyp einer Zelle zu treffen, oder zu beurteilen, wie groß diese Genexpressionsveränderung sein muss, um einen Einfluss auf besagten Phänotyp zu haben. Bislang gibt es keine Studie, die diese Problematik ausreichend klären konnte, ebenso unklar bleibt, ob die Veränderungen der mRNA-Expression ein aussagekräftiger Index für die Wichtigkeit eines Genes für die Proteinbiosynthese oder die Zellfunktion ist.

Zur Bestimmung der Zellanzahl existieren unterschiedliche Ansätze. Die einfachste Methode ist die folgende: Eine definierte Anzahl von Zellen wird auf einer Oberfläche ausgesät. Nach einer bestimmten Zeit werden die nichtadhärierte Zellen gezählt, bzw. könnten Zellen abgelöst, und deren Anzahl ermittelt werden (El-Ghannam et al., 1999, Lotz et al., 1989). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Adhäsion mithilfe von Eichkurven zu errechnen. Hierbei handelt es sich um die genaueste Methode zur Messung der Zellanzahl (Yamamoto et al., 2000, Yamamoto et al., 1998).

In der vorliegenden Studie wurde die letztgenannte Methode angewandt. Die Quantifizierung der Anzahl der Zellen, die sich auf den zu prüfenden Oberflächen befand, wurde mithilfe des grün fluoreszierenden Farbstoffs CyQUANT NF (Molecular Probes, California, USA) durchgeführt. Der CyQUANT[®] NF-Assay beruht auf der Messung

zellulärer DNA. Da die zelluläre DNA in der Zelle unverändert bleibt, kann die Zellanzahl mithilfe dieses Verfahrens sehr genau ermittelt werden. In der vorliegenden Untersuchung lag der Korrelationskoeffizient der Eichkurve bei ($r=0,98$).

In Anbetracht des gewählten Zellkulturmodells muss angeführt werden, dass die Expressionsstärke der Gene zwischen unterschiedlichen Zellen prinzipiell unterschiedlich ist (Aigner et al., 2003). Die genetische Vielfalt einzelner Individuen verleitet viele Arbeitsgruppen dazu, die Proben von mehreren Spendern zu mischen (Chen et al., 2000). Andere Studien hingegen haben Proben separat ausgewertet (Qi et al., 2009). Im Rahmen unserer Studie verwendeten wir humane Primärosteoblasten aus dem Alveolarraum eines Probanden. Das Expressionsmuster der Gene von Osteoblasten sind in zahlreichen Studien beschrieben (Ducy et al., 1996, Qi et al., 2009). Hieraus resultiert unsere Auswahl der Marker (ALP, FN, KOL I, OC, OP, ON, RUNX 2, CEMP 1, PTH R 1).

Wegen der Bereitschaft der Zellen zur Proliferation und Differenzierung, lassen sich die Primärosteoblasten für wissenschaftliche Untersuchungen adäquat nutzen (Fillies et al., 2005). Puleo und Nanci (1999) vertraten die Auffassung, dass sich Osteoblasten aus unterschiedlichen Entnahmestellen selbst bei einem Individuum unterscheiden können (Knochenmark vs. Schädeldach). Bei Verwendung von tierischen Primärosteoblasten wurde von Mustafa et al. (2001) angenommen, dass dies negative Auswirkungen auf die Verlässlichkeit des Testergebnisses habe, weil es sich nicht um menschliches Zellgut handelte. Ferner wiesen Mustafa et al. darauf hin, dass selbst bei miteinander verwandten Tieren wie etwa bei Ratten und Mäusen sich erhebliche Differenzen hinsichtlich der Genexpression ergeben können. Daher ist anzuzweifeln, ob die Reaktionen von Zellen von Versuchstieren tatsächlich eine verlässliche Aussage auf das prognostizierte Resultat beim Menschen zulässt (Fillies et al., 2005, Mustafa et al., 2001)

Die Ergebnisse unserer Untersuchung geben Hinweise darauf, dass PTH (1-34) nicht dazu in der Lage ist, die Adhäsion, die Proliferation und die Genexpression in gleichem Maße zu erhöhen oder zu reduzieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass diese Eigenschaften von der Stimulationsart und ihrer Dauer abhängig sind. Wir konnten zeigen, dass sowohl die intermittierende (PTH 6) als auch die permanente PTH-Stimulation (PTH 48) die Zahl einiger spezifischer Marker ansteigen lässt. Auf andere Marker hingegen hat PTH keinen Einfluss, es kann sogar die Genexpression von Knochenmarkern inhibieren. Der Einfluss von PTH 1-34 auf die Osteoblasten korrelier-

te nicht mit der topographischen Beschaffenheit der ausgewählten Oberflächen der Prüfkörper. Die Untersuchung des Zellverhaltens auf unterschiedlichen Oberflächen ergab für die vorliegende Osteoblastenzellkultur, dass die Oberflächentopographie Auswirkungen auf Adhäsion, Proliferation als auch Genexpression der Zellen hat.

5.2 Untersuchung der Adhäsion von Osteoblasten

Die Zelladhäsion – die erste Interaktion mit der Oberfläche – spielt eine bedeutende Rolle für das Überleben der Osteoblasten (Globus et al., 1998). Proteine wie Fibronectin, Bone sialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN), Annexin V oder Kollagen Typ I und Osteonectin regulieren nicht nur die Adhäsion der Knochenzelle; sie sind ebenfalls für die Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* notwendig (Moursi et al., 1996). Als Schlüsselfaktoren für die Vermehrung und Differenzierung von Zellen gelten deren Anheftung und Ausbreitung (Globus et al., 1998). Die Tatsache, wie fest Osteoblasten auf einer Implantatoberfläche haften können, kann demnach als Maßstab für die Materialverträglichkeit dienen (Anselme et al., 1999).

In der vorliegenden Studie wurde die Adhäsion der Osteoblasten auf Basis einer fotometrischen Untersuchung der Zellanzahl direkt auf den Titaniumplättchen mittels des CyQUANT[®] NF-Assay bestimmt. Des Weiteren wurden die Osteoblasten auf Expression der Adhärenzmarker Fibronectin, Kollagen I und Osteonectin geprüft.

Ungeachtet der Tatsache, dass Osteonectin ein Mineralisationsmarker ist (Anselme et al., 1999), konnte eine starke Expression des Markers während der ersten Stunden im Anschluss an die Zellaussaat beobachtet werden. Diese Beobachtungen werden von anderen Studien untermauert, bei denen ebenfalls eine Expression des Osteonectins während der Adhäsionsphase festgestellt wurde. Der Wirkmechanismus dieses Proteins in der Adhäsionsphase ist nicht umfassend geklärt (Calvo et al., 1996, Lian and Gundberg, 1988). Angesichts dessen wurde Osteonectin in die Untersuchung der Zelladhäsion miteinbezogen.

Die vorliegenden Resultate der Zellzählung haben einen rein deskriptiven Charakter. Sie lassen die Schlussfolgerung zu, dass sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden in Relation zu den anderen drei Oberflächen (PL, SLA, SLActive) eine größere Menge Zellen auf poliertem Titanium (PT) anhaften konnten. Die übrigen Oberflächen wiesen untereinander keine Unterschiede auf. Es konnte keine Auswirkung auf die Osteoblasten

bezüglich ihres Adhäsionsverhaltens durch die Stimulation mit PTH (1-34) nachgewiesen werden.

Die Resultate der Analyse zum Genexpressionverhalten in der Adhäsionsphase sind ebenfalls deskriptiv. Es konnte jedoch verifiziert werden, dass das Adhäsionsverhalten der Osteoblasten von den jeweiligen Oberflächen unabhängig ist und die Stimulation mit PTH (1-34) keinen Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmarker hatte.

Es existieren wenige Studien, die die Zelladhäsion auf hydrophilen Oberflächen untersucht haben. Ebenso finden sich nur wenige Daten, die auf die Rolle des PTH bei der Zellanhaftung hindeuten. Hinsichtlich des PTH liegt eine Korrelation mit Daten aus der Studie von Ishizuya et al. vor, in der gezeigt werden konnte, dass PTH keine Auswirkungen auf die Adhäsion von Osteoblasten hat (Ishizuya et al., 1997). Dagegen zeigen Davies und Chambers anhand von koloniebildenden Fibroblasten, dass PTH genau wie PGE 2 bereits nach zwei Stunden einen positiven Effekt auf die Adhäsion hat (Davies and Chambers, 2004).

Rupp et al. gehen davon aus, dass die Zelladhäsion auf hydrophilen Oberflächen schneller verläuft, da die Zellen auf eine unverschmutzte Oberfläche (SLActive) treffen. Bei hydrophoben Oberflächen treten die Osteoblasten mit chemischen und biologischen Verbindungen in Konkurrenz, die zunächst aufgespaltet werden müssen (Rupp et al., 2006). In einer Studie aus dem Jahr 2007 berichten Qu et al., dass es keine Unterschiede zwischen der SLA- und SLActive-Oberflächen gab. Danach waren über 90 % der Osteoblasten nach vier Stunden auf beiden Implantatoberflächen adhärent geworden (Qu et al., 2007). Bei In-vitro- aber auch In-vivo-Studienbedingungen treffen die Osteoblasten nie auf eine völlig saubere Oberfläche (Lai HC, 2010). Weiterhin ist zu beachten, dass Proteine um die begrenzt verfügbaren Oberflächenbindungsstellen konkurrieren. Bei der Frage, welche Menge des Proteins sich auf der Oberfläche ablagern kann, ist die Oberflächenaffinität der entscheidende Faktor. Dabei ist es möglich, dass bereits adsorbierte Proteine durch solche verdrängt werden, die sich durch eine höhere Oberflächenaffinität auszeichnen (Davies, 1996, Green et al., 1999).

Auch in der vorliegenden Arbeit kamen sämtliche Oberflächen noch vor der Zellaussaat mit proteinreichem Medium in Berührung. Daher kann nicht versichert werden, dass die SLActive-Oberfläche zu Beginn der Untersuchung die ursprünglichen Eigenschaften besaß. Außerdem soll bei In-vitro-Studien mit einer Stimulation beachtet werden, dass

fetales Kälberserum per se hohe Mengen unterschiedlicher Wachstumsfaktoren aufweist. Diese können in eine Interaktion mit zelleigenen Proteinen oder auch PTH treten und auf diese Weise die Ergebnisse verzerren.

5.3 Untersuchung der Zellproliferation von Osteoblasten

Mittels der Zellproliferationstestung können Rückschlüsse auf die Bioverträglichkeit von Oberflächen als auch von Stimulatoren gezogen werden (Anselme et al., 1999).

In der vorliegenden Studie wurde die Quantifizierung der Zellen auf den Prüfkörpern am zweiten, vierten, sechsten und am zehnten Tag mithilfe des grün fluoreszierenden Farbstoffes CyQUANT NF durchgeführt. Dabei sollte die Zellanzahl auf unterschiedlichen Oberflächen ermittelt und verglichen werden. Weiterhin sollte geprüft werden, inwiefern die PTH-Stimulation einen Einfluss auf die Proliferation von Osteoblasten hat.

In der hier vorliegenden Untersuchung konnte sowohl die Stimulation mit PTH (1-34) als auch die Oberflächentopografie die primären humanen Osteoblastenkulturen in deren Zellproliferation signifikant ($p < 0,05$) beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass die Osteoblasten auf glatten Oberflächen eine höhere Proliferationsrate aufweisen als auf rauen. Eine intermittierte PTH-Gabe hat im Vergleich zu der permanenten PTH (1-34)-Stimulation und der Kontrollgruppe in deutlicher Weise eine Suppression der Proliferationsrate über zehn Tage hinweg hervorgerufen.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit dem Einfluss der Rauigkeit von Titanoberflächen auf das Verhalten von Knochenzellen. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass glatte Oberflächen die Zelladhäsion und Proliferation begünstigen. Außerdem werden bei In-vitro-Studien seit der Einführung der SLActive-Oberfläche gegenüber der SLA-Oberfläche erhöhte Proliferationsraten registriert (Boyan et al., 1999, Schwarz et al., 2009). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie stimmen weitgehend mit denen der Arbeitsgruppe von Boyan überein. Wir konnten sowohl in der Gruppe mit PTH als auch ohne PTH-Stimulation keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,1$) zwischen den rauen SLA und SLActive-Oberflächen aufzeigen. Das ist ein Indiz dafür, dass im vorliegenden Studienmodell die Benetzbarkeit einer Oberfläche auf die Proliferation von Osteoblasten keine Rolle spielt und dass eher die Rauigkeit der entscheidende Faktor ist.

Im Gegensatz zu unseren Resultaten fanden Anselme et al. eine geringere Adhäsion und Differenzierung von Osteoblasten an relativ glatten, polierten Oberflächen mit einer mittleren Rauigkeit von 0,2 µm als an rauen, gesandstrahlten Oberflächen mit einem Rauigkeitswert von 3,4 µm (Anselme et al., 1999).

Bezüglich der PTH-Stimulation ist festzuhalten, dass während der Untersuchung trotz identischer Konzentrationswahl und ähnlichen Kultivierungskonditionen Ergebnisse erzielt wurden, die sich von denen anderer Studien (Ishizuya et al., 1997, Kano et al., 1993) unterscheiden. Der Unterschied bestand in der Wahl der Zelllinie. Während für die hier vorliegende Untersuchung primäre humane Osteoblasten verwendet wurden, griffen beispielsweise Ishizuya et. al auf Rattenosteoblasten zurück. Ishizuya et al. konnten deutlich zeigen, dass eine intermittierende, sechsstündige PTH-Stimulation in einem 48-Stunden-Zyklus eine deutliche Proliferationssteigerung hervorruft. Eine permanente Stimulation wirkte sich dagegen negativ auf die Zellproliferation aus. Dieser Unterschied kann durch einen unterschiedlichen Effekt von Osteoblasten anderer Herkunft auf das PTH interpretiert werden.

5.4 Untersuchung der Genexpression der Osteoblasten

Die Osteoblasten durchlaufen verschiedene Stadien der Differenzierung mit einhergehender hoher Ausprägung spezifischer Marker (Martin et al., 1993; Owen et al., 1990; Stein et al., 1990). Während der Proliferationsphase handelt es sich um Fibronectin und Kollagen I, in der Matrixentwicklungs- und Matrixreifungsphase um die alkalischen Phosphatase, Osteopontin, Osteonectin und RUNX 2 bzw. in der Mineralisierungsphase um Osteocalcin.

5.4.1 Genexpression ALP (alkalische Phosphatase)

Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein früher Osteoblasten-Differenzierungsmarker (Magnusson et al., 1999). In verschiedenen Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat entscheidenden Einfluss auf die Expression von ALP hat (Owen et al., 1990). Daher wurden ab dem sechsten Kultivierungstag dem Medium Ascorbat und β -Glycerophosphat hinzugefügt. Zu keinem Versuchszeitpunkt wurde in allen Gruppen, trotz Ascorbat- und β -Glycerophosphatzusatz, eine erhöhte ALP-mRNA-Expression beobachtet, sie überschritt nie die 0.025 %-Marke der GAPDH-Expression. Ein Grund für die niedrige mRNA-Expression der ALP könnte darin liegen,

dass es sich noch um junge Osteoblasten handelte. Junge Osteoblasten exprimieren noch keine ALP. Sie differenzieren sich zunächst zu reifen Osteoblasten, die erst zum späteren Zeitpunkt ALP exprimieren (Aubin, 1998).

In der vorliegenden Studie konnten keine Differenzen im Expressionsmuster von ALP zwischen den Implantatoberflächen SLA und SLActive festgestellt werden. Eine vermehrte Expression von ALP auf glatten Oberflächen trat in der Kontrollgruppe sowie in der Gruppe mit der permanenten PTH-Stimulation (PTH 48) auf. In der Gruppe der intermittierenden PTH-Stimulation (PTH 6) war der Effekt nicht nachweisbar. Insgesamt konnte weder ein signifikanter Einfluss der PTH-Stimulation noch der Oberflächenmorphologie auf die ALP-Expression nachgewiesen werden.

Aufgrund der niedrigen ALP-Expression sowie der Unterschiede im Studiendesign lassen sich die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie mit anderen nur schwer vergleichen. Des Weiteren widersprechen sie den Daten aus der Fachliteratur. Es ist unstrittig, dass Osteoblasten auf rauen Oberflächen mehr ALP bilden als auf glatten Oberflächen (Boyan et al., 2002, Schwarz et al., 2009, Zhao et al., 2005). Lincks et al. beispielsweise beobachteten sowohl auf glatten als auch auf rauen Titanlegierungen keine divergierenden ALP-Aktivitäten, wobei die Aktivität der Zellen auf glattem Reintitan jedoch unterhalb der Aktivitätswerte von denen auf rauen Reintitanproben lag (Lincks et al., 1998). Teilweise verwendeten die erwähnten Autoren in ihren Studien die gleichen Zellen und Titandisks, erhielten dennoch voneinander abweichende Ergebnisse. Aus diesem Grund besteht weiterhin Klärungsbedarf bezüglich des Einflusses der Oberflächengestaltung auf die ALP-Aktivität im Zusammenhang mit der Osteoblastendifferenzierung und der Materialzusammensetzung.

Eine gesteigerte ALP-Expression bei intermittierender Gabe von PTH (PTH 6) wurde von (Ishizuya et al., 1997) an Calvarie-Osteoblasten von neugeborenen Ratten demonstriert. Eine kontinuierliche (PTH 48) und intermittierende Exposition (PTH 1) hatten dagegen eine stark hemmende Wirkung auf die ALP-Expression. Die intermittierende (PTH 3) und die Exposition (PTH 24) wiesen keine signifikante Erhöhung der ALP-Expression auf. Die Resultate zeigen, dass sich die Wirkung von PTH auf die Genexpression von ALP auswirkt. Diese Wirkung wird maßgeblich von der Dauer, der Häufigkeit und dem Zeitpunkt der Stimulation des Hormons *in vitro* beeinflusst.

5.4.2 Genexpression CEMP 1 Cementoblastoma-Zellenprotein

Es existiert offenbar nur eine einzige Studie zum Thema Genexpression CEMP 1. Sie wurde 2002 von Arzate et al. publiziert. In dieser Studie wurde CEMP 1 sowohl bei der Zelldifferenzierung als auch der Adhäsion eine zentrale Relevanz zugeschrieben (Arzate et al., 2002). Obgleich ein Mangel an Fachliteratur herrscht und eine damit einhergehende Diskussion der Resultate fehlt, wurde CEMP 1 dennoch in die hier vorliegende Studie einbezogen, um weitere Erkenntnisse über den Knochenmarker zu gewinnen.

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie konnte eine starke Expression des CEMP 1 festgestellt werden; sie war 20 Mal stärker als die des GAPDH. Die Auswertung der Ergebnisse brachte jedoch keinerlei signifikante Effekte von PTH (1-34) in Bezug auf eine Stimulation oder den Einfluss der Oberflächen auf die Expression dieses Markers zum Ausdruck. In Anbetracht der Tatsache, dass dieses Protein erst kürzlich erstmals beschrieben worden ist und es gegenwärtig kaum Literatur dazu gibt, muss von einer kritischen Diskussion der Ergebnisse an dieser Stelle abgesehen werden.

5.4.3 Genexpression von Fibronectin (FN)

Fibronectin zählt zu den adhäsiven Glycoproteinen. Es ist an der Chemotaxis und der Anhaftung der Zellen, darunter auch Osteoblasten auf Oberflächen beteiligt. Es reguliert die Differenzierung und die Funktion der Osteoblasten und spielt eine bedeutende Rolle bei der Wundheilung (Globus et al., 1998, Moursi et al., 1996).

Im Rahmen der hier beschriebenen Studie wurde eine durchgehend hohe Fibronectin-mRNA-Expression beobachtet: 40 bis 60 Mal höher als die GAPDH-Expression. Es wurden jedoch marginale deskriptive Differenzen zwischen den Oberflächen und Stimulationsmodi festgestellt. Es konnte auf sämtlichen Oberflächen eine geringe Expressionsteigerung in Stimulationsgruppen PTH 6 und PTH 48 beobachtet werden.

Mit der Adsorption von Fibronectin auf verschiedenen Oberflächen haben sich Pegueroles et al. beschäftigt. Sie kamen zum Ergebnis, dass Zellen auf rauen Oberflächen nicht unbedingt mehr Fibronectin sezernieren, dafür ist aber das Fibronectin anders, sehr unregelmäßig angeordnet. Es wird vermutet, dass die Eigenschaften einer Oberfläche die Anordnung des Fibronectins bestimmt (Pegueroles et al. 2010).

Derzeit gibt es in der Literatur nur wenige Studien zur Wirkung von PTH auf die Expression von Fibronectin. Einige Rückschlüsse konnten auf der Grundlage der Studie

von Davies und Chambers gezogen werden, die eine positive Wirkung von PTH auf die Adhäsion von koloniebildenden Fibroblasten gezeigt hat (Davies and Chambers, 2004).

5.4.4 Genexpression von Kollagen I (KOL I)

Das Kollagen Typ I (KOL I) ist als Osteoblastenmarker bekannt, da es bereits bei unreifen Osteoprogenitorzellen bis zum reifen Osteoblasten in großen Mengen exprimiert wird (Aubin, 1998). Auch im Rahmen der hier beschriebenen Studie wurde eine 1,5-fache Expression gegenüber GAPDH beobachtet. Die Expression von Kollagen Typ I lag bei der Stimulation sowohl bei intermittierender (PTH 6) als auch permanenter (PTH 48) Stimulation deutlich höher als in der Kontrollgruppe. In beiden Gruppen war die Expression von KOL I auf glatten Oberflächen stärker als auf rauen. Da die Kollagen-Typ I-mRNA-Expression in der Kontrollgruppe (PTH 0) unauffällig war, wird ein Einfluss von PTH auf die mRNA-Expression von Kollagen I vermutet.

Während Steinert et al. (Steinert et al., 2000) eine stärkere Kollagensynthese auf Kunststoffen demonstrierten, zeigten Masaki und seine Forschergruppe, dass die Genexpression von Kollagen des Typs I auf rauen und insbesondere auf der SLActive-Titaniumoberflächen stärker auftritt als auf glatten Oberflächen oder Kunststoff (Masaki et al., 2005).

Der Effekt von PTH auf Kollagen I-Expression wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Studie von (Watson et al., 1999) zeigt, dass PTH die Kollagensynthese durch die Stimulation von IGF-1 inhibieren kann. Dieses Prinzip ist bereits von Canalis et al. und Jones et al. untersucht worden. Beide Autorengruppen waren jedoch der Auffassung, dass PTH nicht direkt auf IGF-1, sondern über IGF-BP auf die Kollagensynthese wirkt. Auffällig war in dieser Studie von Canalis et al. auch, dass die jeweilige Bildung von Fibronectin und Kollagen I miteinander korrelierte. Mit Blick auf zukünftige Untersuchungen resultiert daraus, dass es auszureichen scheint, ausschließlich einen der beiden Parameter zu untersuchen (Canalis, 1983c). (Ishizuya et al., 1997) haben beschrieben, dass lediglich eine permanente PTH-Stimulation die Kollagensynthese hemmt.

5.4.5 Genexpression Osteocalcin (OC)

In zahlreichen Studien wird Osteocalcin (OC) als Osteoblastenmarker der voll ausdifferenzierten Zellen bezeichnet. OC wird in der späten Phase der

Osteoblastenreifung expremiert. Es bindet Calciumionen und Hydroxylapatit mit hoher Affinität und kontrolliert Größe sowie Geschwindigkeit der Kristallbildung (Ducy et al., 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte eine permanente Steigerung der OC mRNA-Expression beobachtet werden; sie überschritt jedoch nach 21 Tagen nie 0,4 % der GAPDH-Expression. Eine Tendenz der Differenzierung zu reifen Osteoblasten und der beginnenden Mineralisation ist aufgrund der Steigerung zu vermuten. Es bleibt dennoch fraglich, ob die verwendeten Osteoblasten die Mineralisationsphase erreicht haben. Es ist bekannt, dass die OC-Expression in humanen Primärosteoblasten abhängig von den Kulturbedingungen und jeweiliger Zellkultur selbst bis zum Tag 35 nicht einsetzt, wohingegen die Rattenosteoblasten die Mineralisationsphase bereits nach dem 10. Tag erreichen können (Ducy et al., 1996).

In der hier vorliegenden Studie konnte eine signifikant vermehrte Genexpression von Osteocalcin ($p < 0.05$) auf der SLActive-Oberfläche in der Gruppe jener Osteoblasten beobachtet werden, die eine permanente Stimulation mit PTH (1-34) erfuhren. Weder in der Kontrollgruppe (PTH 0) noch in der (PTH 6) Gruppe konnten Unterschiede im Expressionsmuster auf den Oberflächen entdeckt werden.

Dass die PTH-Stimulation einen deutlichen Effekt auf die Genexpression von Osteocalcin hat, konnten Ishizuya et al. nachweisen. Auch im Falle von OC erwies sich die intermittierende PTH-Stimulation (PTH 6) auf die Genexpression als förderlich (Ishizuya et al., 1997). Im Widerspruch zu Ishizuya et al. stehen die Befunde aus der Gruppe der permanenten Stimulation der hier vorliegenden Untersuchung. Während Ishizuya et al. (1997) eine suppressive Wirkung einer permanenten PTH-Stimulation feststellten, war die Expression von Osteocalcin in der hier vorliegenden Untersuchung sogar etwas erhöht. Möglicherweise kann der Unterschied im Reaktionsmuster des jeweils verwendeten Zelltyps (Ratten-vs. Primärosteoblasten) liegen.

In der vorliegenden Studie konnte kein deutlicher Einfluss der Oberfläche auf die mRNA-Expression von OC festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich teilweise mit Ergebnissen von Masaki et al. Auch dort wurde in Untersuchungen an humanen palatinalen mesenchymalen Stammzellen keine Differenzen unter verschiedenen rauen Oberflächen (SLA und SLActive) hinsichtlich der Osteocalcinexpression festgestellt (Masaki et al., 2005). Zhao et al. hingegen identifizierten auf SLActive-Oberflächen bei

MG-63-Osteoblasten eine signifikant höhere Expression von Osteocalcin (OC) sowie der alkalischen Phosphatase (ALP) und lokaler Wachstumsfaktoren (PGE₂ und TGF- β 1) (Zhao et al., 2005).

5.4.6 Genexpression Osteonectin (ON)

Osteonectin ist ein phosphoryliertes calciumbindendes Glycoprotein, das *in vitro* an Kollagen sowie Hydroxylapatit bindet und zusammen mit Osteocalcin die Bildung von Kristallisationszonen sowie die Mineralisation von Kollagen induziert (Lane and Sage, 1994). Im Rahmen der hier beschriebenen Studie wurde eine erhebliche ON-Expression beobachtet; sie betrug mehr als 50 % der GAPDH-Expression.

In der vorliegenden Studie konnte eine Abhängigkeit in der Expression von Osteonectin von der Materialoberfläche nicht nachgewiesen werden. Es existieren nur wenige Studien zu Osteonectin-Expression auf den Implantatoberflächen. Marinucci et al. analysierten Primärosteoblasten auf die Genexpression von unter anderem Osteonectin mittels RT-PCR (Marinucci et al., 2006). Es wurden drei Titan-Oberflächentopografien in Relation zueinander gesetzt: poliertes Titan, mikrosandgestrahltes Titan und sandgestrahltes Titan. Das Ergebnis zeigte eine ähnliche Osteonectin-mRNA-Expression auf allen Oberflächen, wie in der hier vorgestellten Studie.

In Bezug auf die PTH-Stimulation war die Osteonectinexpression zwischen den Modi unterschiedlich. Es konnten erhöhte Osteonectin-Werte auf allen Oberflächen beobachtet werden, wobei diese bei der permanenten PTH (1-34) am ausgeprägtesten war. Eine signifikante Erhöhung der Genexpression von Osteonectin war in den PTH-Gruppen auf rauen SLA- und SLActive-Oberflächen im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachweisbar. Onyia et al. konnten im Rahmen einer Mikro-Array-Studie an Rattenosteoblasten zeigen, dass das Osteonectin 1,9-fach bei intermittierender und 2,6-fach bei der permanenten PTH-Stimulation überexprimiert wird (Onyia et al., 2005).

5.4.7 Genexpression Osteopontin (OP)

Osteopontin (OP) ist ein multifunktionaler Osteoblastenmarker. Es ist für die Regulation der Calcium- und Hydroxylapatitbildung wichtig (Chevallier et al., 2009). OP reguliert die Migration und das Zellattachment von Osteoblasten über verschiedene Integrinrezeptoren (Davies, 1996). In der vorliegenden Arbeit exprimierten die Primärosteoblasten in allen Gruppen nur wenig OP-mRNA; sie betrug lediglich 1 % der

GAPDH-Expression. Beck et al. konnten zeigen, dass die Osteopontinexpression stark von der ALP-Aktivität abhängt, da das freie Phosphat die OP-Expression reguliert (Beck et al., 2000). Dieses Phänomen lässt sich auch in der hier vorliegenden Untersuchung beobachten; auch hier waren beide, die ALP- und OP-Expression niedrig.

Es konnte eine Tendenz der Osteoblasten beobachtet werden, dass das Osteopontin auf rauhen SLA- und SLActive-Oberflächen in höherem Maße exprimiert wird als auf glatten PT-Oberflächen und auf Kunststoff – und dies auch nur in der Gruppe der Osteoblasten, die intermittierend mit PTH (1-34) stimuliert wurden. In der Gruppe der permanenten Stimulation (PTH 48) zeigten die Zellen im Expressionsmuster keine Unterschiede.

Eine verstärkte Expression von Osteopontin auf rauhen Oberflächen bestätigt die jüngste In-vitro-Studie aus dem Jahr 2010 von (Klein et al.) Sie untersuchten neben ALP, OC, KOL I auch das Osteopontin und fanden heraus, dass OP über die Zeit (1 bis 21 Tage) mehr auf rauhen und insbesondere auf der SLActive-Oberfläche exprimiert wird als auf glatten (Klein et al. 2010)

Es existieren zum heutigen Zeitpunkt keine In-vitro-Studien, die die von uns gezeigten Tendenzen hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen PTH-Stimulation und der Osteopontin-Expression bestätigen oder widerlegen können. Eine tierexperimentelle Studie an Mäusen von Ono et al. zeigt, dass bei einem Maximum der anabolen Wirkung von PTH bei einer optimalen Dosierung die Osteopontin m-RNA-Expression ausblieb. Es wurde daraufhin vermutet, dass OP eine Rolle als lokaler Antagonist zu PTH spielt (Ono et al. 2010).

5.4.8 Genexpression runt-related transcription factor-2 (RUNX2)

Der Transkriptionsfaktor RUNX 2 gilt als der spezifischste exprimierte Osteoblastenmarker. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in In-vivo- und in In-vitro-Studien den Nachweis erbringen, dass RUNX 2 die Expression vieler osteoblastären Marker steuert (Aubin, 1998, Ducy et al., 1996, Ducy et al., 1997, Komori, 2005). RUNX 2 wird von Osteoprogenitorzellen schwach exprimiert. Die Expression steigt jedoch mit der Osteoblastendifferenzierung an und sinkt beim Osteozyten wieder ab (Ducy et al., 1997). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte in allen Gruppen eine niedrige RUNX 2-mRNA-Expression (0,5% der GAPDH-Expression) beobachtet werden, dass möglicherweise ein Zeichen für die niedrige Differenzierung der Versuchsosteoblasten sein kann.

Des Weiteren wurden während der Untersuchung des PTH-Effektes auf die RUNX-2-Expression geringe Signifikanzen auf den Kunststoffoberflächen beobachtet. In der Gruppe PTH 48 war die Erhöhung der Genexpression signifikant, während in der Gruppe PTH 6 gegenüber der Kontrollgruppe auf einzelnen Oberflächen nur ein Trend beobachtet wurde. Bezogen auf die Stimulationsart war die Expression von RUNX 2 in den Gruppen mit einer PTH-Stimulation auf sämtlichen Oberflächen erhöht.

In der Literatur wird die Meinung vertreten, dass PTH einen Effekt auf die RUNX 2-Expression hat. Bei der Recherche konnte jedoch keine Studie gefunden werden, die humane Primärosteoblasten verwendeten oder ähnliche Versuchsbedingungen hatten. Es ist durchaus denkbar, dass das PTH über mehrere Reaktionskaskaden verfügt, die zu einem höheren Maß an RUNX-2-Expression führen. Venkatesh et al. erklärten den endogenen Anstieg von RUNX 2 anhand der Aktivierung des PKA-vermittelten 6XOSE-Reporters. Eine durch Aktivierung der PKA vermittelte erhöhte Aktivität der ALP könnte an der veränderten Genregulation von RUNX2 in Osteoblasten beteiligt sein (Venkatesh et al., 2003). Tintut et al. stellten anhand einer MC3T3-Osteoblasten-Zelllinie fest, dass eine kontinuierliche Stimulation mit PTH mittels der Aktivierung von CAMP nur über einen Zeitraum von 32 Stunden hinweg zu einer stärkeren Genexpression des RUNX 2 führt; nach 32 Stunden wurde ein Abfall derselben beobachtet (Tintut et al., 1999). Xiao et al. erklärten die genexpressionssteigernde Wirkung von PTH auf RUNX 2 mit der Aktivierung des MAPK-Transduktionsweges. Es reichen deshalb bereits geringste Dosen von PTH, um eine vermehrte RUNX-Expression hervorzurufen (Xiao et al., 1998).

Bezüglich des Vergleichs der RUNX 2 Genexpression auf verschiedenen Oberflächen waren nicht alle generierten Ergebnisse signifikant. In der Gruppe (PTH 48) ließen sich die meisten Signifikanzen und Tendenzen identifizieren. Danach kam es auf der SLActive zu mehr RUNX 2-Genexpression als auf der SLA und zu noch mehr auf glatten Oberflächen. In der Gruppe (PTH 6) lag diese Tendenz weiterhin vor, aber der Effekt war deutlich geringer ausgeprägt. In der Kontrollgruppe (PTH 0) war die Expression bezüglich RUNX 2 nur gegenüber Kunststoff signifikant höher. Rein deskriptiv kann festgehalten werden, dass die hydrophile Titanoberfläche (SLActive) bezüglich der RUNX-2-Expression gegenüber SLA förderlicher ist, dabei war die Genexpression um Faktor 1,2 höher. Ebenso konnten Marinucci et al. in ihrer Studie zeigen, dass auf rauen Oberflächen die Osteoblasten mehr RUNX 2 m-RNA exprimieren (Marinucci et al., 2006). Die Ergebnisse von Masaki et al. fielen so aus, dass RUNX 2 auf

der SLActive-Oberfläche geringfügig mehr RUNX 2 exprimiert wurde als auf der SLA, jedoch deutlich weniger als auf poliertem Titan oder einer Kunststoffoberfläche (Masaki et al., 2005).

5.4.9 Genexpression PTH R1

Das PTH wirkt am PTH-1-Rezeptor über mindestens zwei verschiedene Signalwege. Zum einen kommt es über guanosintriphosphat-(GS)-bindende Proteine interzellulär zu einem Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) sowie zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Zum anderen kommt es zu einer GS-Protein-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und zu einer interzellulären Erhöhung des Inositoltriphosphats (IP₃). Die Aktivierung des eingesetzten PTH-2-Rezeptors geschieht einerseits durch seinen vermutlich physiologischen Liganden, das tuberoinfundibuläre Peptid (TIP39), andererseits anhand von PTH. Im Vergleich zu PTH R1 wirkt PTH R2 lediglich über den cAMP (Short and Taylor, 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung lag die Expression des PTH R1 im Bereich von 0,5 % des GAPDH, und damit als gering einzuschätzen. Diesbezüglich findet sich keine Literatur und somit fehlt auch die Grundlage für die Diskussion der Bedeutung der erniedrigten m-RNA-Expression des PTH R1. Die erheblichen Schwankungen unter den einzelnen Gruppen PTH 6 und PTH 48 sowie die ausbleibenden Effekte in der Kontrollgruppe PTH 0 belegen aber ganz klar die Affinität der Osteoblasten gegenüber dem stimulierenden Hormon. Dennoch konnten zwar keine Signifikanzen, jedoch Trends ausgemacht werden, die eine Wirkung des PTH (1-34) auf die PTH-R1-Expression erklären können.

Während der Untersuchung konnte eine gesteigerte Genexpression von PTH R1 in der Gruppe PTH 48 beobachtet werden, wogegen in der Kontrollgruppe PTH 0 hinsichtlich der Expression keine Effekte sichtbar waren. In der Gruppe mit intermittierender PTH-(1-34)-Stimulation war das Gen PTH R1 im Vergleich zu der Kontrollgruppe weniger exprimiert – wenngleich der Unterschied nicht allzu groß war.

Tendenziell war eine gesteigerte Genexpression von PTH R1 auf der SLActive-Oberfläche festzustellen; die Ergebnisse hinsichtlich der übrigen Oberflächen waren hingegen nicht eindeutig. Aus diesem Grund konnte keine Korrelation zwischen den Oberflächengruppen aufgestellt werden.

Die Literatur bestätigt die Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchung dahin gehend, dass die Osteoblasten einen PTH-Rezeptor besitzen und die Affinität der Osteoblasten zum PTH auf diesem Wege determiniert wird. Die Expression dieses Gens ist abhängig von PTH von der Art der angesetzten Stimulation. Von Ishizuya et al. wurde eine intermittierende PTH-Stimulation (PTH 6) mit einer größeren Expression von PTH/PTHrP-Rezeptor 1 gegenüber einer permanenten assoziiert. Eine intermittierende Stimulation mit einer Stunde pro 48 Stunden (PTH 1) bewirkte hingegen einen leichten Rückgang der PTH-R1-Expression. Eine kontinuierliche Exposition (PTH 48) bedeutete einen deutlichen Rückgang der Expression des PTH/PTHrP-Rezeptors 1 (Ishizuya et al., 1997). Diese Ergebnisse deuten ein sehr fein abgestimmtes frequenzabhängiges System an.

5.5 Überlegungen zur Rolle von PTH bei der Integration eines Implantats

Skripitz et al. zeigten mittels physikalischer Tests, dass die dreimal wöchentliche Injektion einer PTH-Dosis von 60 µg/kg Körpergewicht die Implantation von Schrauben und Metallstäben bei Ratten verbessert (Skripitz et al., 2000b). Zwar ist der Rattenknochen im Unterscheid zum menschlichen Knochen nicht aus Osteonen aufgebaut und besitzt keine intrakortikalen Havers'schen Systeme (Hirano et al., 1999, Vickery et al., 1996), gleichwohl existiert eine Phase des Bone Remodeling, d.h. eine Knochenresorption und -formation, die mit 31 Tagen gegenüber drei bis fünf Monaten beim Menschen deutlich kürzer ausfällt und aus diesem Grund für Studien gut geeignet ist. Zhang et al. untersuchten den PTH-Effekt auf den fünften Lendenwirbelkörper an 20 Monate alten Beagles und erreichten auch hier eine Verbesserung der Spongiosaformation, vor allem in der stärker belasteten Region des Wirbelkörpers (Zhang et al 1997).

Die Ergebnisse der photometrischen Untersuchung der Proliferation der vorliegenden Studie zeigen, dass eine intermittierende PTH-Gabe im Vergleich zu einer permanenten PTH-(1-34)-Stimulation auch im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine deutliche Suppression der Proliferationsrate über zehn Tage hinweg hervorgerufen hat.

Gleichwohl konnte anhand von Ergebnissen der Genexpressionsuntersuchung gezeigt werden, dass die PTH-Stimulation jedes Markers von der Stimulationsart abhängig ist. So sind einige Marker wie ALP auf glatten Oberflächen, KOL I, ON, PTH R1, RUNX 2 bei

der permanenten Stimulation stärker exprimiert als bei einer intermittierenden. Das Osteopontin und das Osteocalcin zeigen einen umgekehrten Effekt. Auf die alkalische Phosphatase auf rauen Oberflächen, sowie auf CEMP 1 und Fibronectin hat das PTH (1-34) offensichtlich keinen Einfluss. In der Gruppe PTH 6 konnte eine leicht inhibierende Wirkung der Genexpression von PTH R1 beobachtet werden.

Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung kann eine stimulierende Wirkung von PTH (1-34) in-vitro auf einige Marker festgestellt werden; es können jedoch keine eindeutigen Aussagen zu der Rolle des PTH auf die Oseointegration in vivo gemacht werden. Grundsätzlich und speziell bei der vorliegenden Studie muss berücksichtigt werden, dass Ergebnisse aus In-vitro-Untersuchungen nicht direkt mit denen aus In-vivo-Untersuchungen vergleichbar sind. Weiterhin muss angemerkt sein, dass wir einem konkreten Stimulationsprotokoll von Ishizuya et al. unter Verwendung humaner Primärosteoblasten gefolgt sind, die Ergebnisse könnten bei abweichenden Versuchsbedingungen oder Auswahl anderer Marker auch unterschiedlich ausfallen.

5.6 Überlegungen zur Rolle der Hydrophilität bei der Oseointegration

Es existieren bereits wissenschaftliche Erkenntnisse aus In-vivo-Studien, die hydrophile SLActive-Oberflächen mit hydrophoben Titanioberflächen vergleichen.

Die modSLA-Implantate weisen nach einer Einheilphase von zwei, vier und acht Wochen bedeutsam höhere Ausdrehmomente (8 bis 21 %) als die entsprechenden Implantate der SLA-Kontrollgruppe (Ferguson et al., 2006) auf.

Im Rahmen einer tierexperimentellen Studie konnten die dynamischen Vorgänge der frühen Einheilphasen enossaler SLA- und modSLA-Titanimplantate beschrieben werden. So konnte anhand der MG-Färbung gezeigt werden, dass das Blutkoagulum an hydrophilen modSLA-Implantatoberflächen deutlich stabiler ist. Die Werte für die Knochenimplantatkontakte an modSLA-Implantaten nach sieben und nach 14 Tagen waren signifikant höher als an SLA-Implantaten; sogleich ging die Anlagerung lamellarer Knochenstrukturen auf modSLA-Implantaten schneller als bei SLA-Implantaten vonstatten (Schwarz et al., 2007b, Schwarz et al., 2009).

Die Ergebnisse aus den In-vitro-Studien geben im Vergleich zu den In-vivo-Studien die Rolle der Hydrophilität in ihrer Wirkung auf das Verhalten von Osteoblasten im kleineren

Umfang wieder. Zhao et al. konnten zeigen, dass auf SLActive-Implantatoberflächen ein signifikant höheres Zell-Attachment sowie eine ebenso signifikant höhere Zellproliferationsrate von MG63-Osteoblasten im Vergleich zur SLA-Oberfläche erreicht wird (Zhao et al., 2005). Die Synthese der alkalischen Phosphatase (ALP), das Osteocalcin (OC) sowie der lokaler Wachstumsfaktoren (PGE2 und TGF- β 1) waren in der SLActive-Gruppe ebenfalls höher als auf der SLA-Oberfläche (Masaki et al., 2005, Schwarz et al., 2009, Zhao et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen keine Unterschiede in der Genexpression zwischen der SLA- und SLActive-Oberflächen – bis auf leichte Tendenzen in der Expression von RUNX 2. Trotz dieser Beobachtung waren die Expressionsraten auf den SLA und SLActive mit denen auf glatten Oberflächen vergleichbar und bei einigen Markern nur geringfügig höher. Somit konnte gezeigt werden, dass die Genexpression im vorliegenden Fall nicht von der hydrophilen Eigenschaften einer Oberfläche abhängt.

6. Zusammenfassung

In mehreren Studien konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Oberflächenrauigkeit eine direkte Wirkung auf die Osteoblastenadhärenz, Proliferation sowie Differenzierung hat. Die SLActive-Oberfläche weist in der Mehrzahl dieser Arbeiten im Vergleich zu der SLA-Oberfläche ein signifikant höheres Zell-Attachement sowie eine ebenso signifikant höhere Zellproliferationsrate von Osteoblasten unterschiedlichen Ursprungs auf. Darüber hinaus ist in der SLActive-Gruppe die Synthese osteoblastärer Marker wie alkalische Phosphatase, Osteocalcin, RUNX 2, Kollagen Typ I oder lokaler Wachstumsfaktoren (PGE2 und TGF- β 1) signifikant erhöht. Diese Daten deuten darauf hin, dass Oberflächeneigenschaften wie Mikrostruktur oder Oberflächenenergie das Potenzial haben, auf die Osteoblastendifferenzierung Einfluss zu nehmen.

Der Wirkung des Parathormons auf die Osteoblasten und auf den Knochenmetabolismus des Körpers wird wachsende Aufmerksamkeit geschenkt. Viele tierexperimentell geführte Studien konnten eine anabole Wirkung des Hormons auf den Knochen identifizieren. Bisher allerdings vermochten einzelne Versuchsmodelle und -ansätze nicht, die exakten zellulären und molekularen Mechanismen dieser anabolen Wirkung hinreichend zu erklären. Die Erkenntnisse aus diesen Studien lassen das PTH als einen vielversprechenden, aber noch nicht hinreichend erforschten Hoffnungsträger auf dem Gebiet der Knocheninduktion erscheinen. Demnach hätten tiefer gehende Kenntnisse über die hormonelle Stimulierung des Knochens weitreichende Konsequenzen auf den Gebieten der dentalen Implantologie und der Alveolarknochenforschung.

Vor diesem Hintergrund bestand das primäre Ziel der vorliegenden Dissertation darin, erstmalig in einem Zellkulturmodell eine quantitative und qualitative Untersuchung des Genexpressions-, Adhäsions- und Proliferationsverhaltens der Osteoblasten auf verschiedenen Oberflächen in Abhängigkeit von der Stimulation mit dem Parathormon durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden Primärosteoblasten herangezüchtet und auf verschiedenen Oberflächen angesiedelt. Die zu untersuchenden Oberflächen waren: Kunststoffoberfläche, maschinenhergestellte polierte Titanioberfläche, sandgestrahlte und säuregeätzte Titanoberfläche; chemisch veränderte, sandgestrahlte, säuregeätzte Titanoberfläche. Die Zellen auf den Versuchsträgern wurden mit PTH 1-34 entweder gar nicht (PTH 0), intermittierend (PTH 6) oder permanent (PTH 48) stimuliert. Die

Konzentration von 10 bis 11 Mol/ml oder 50 ng/ml wurde in Anlehnung an die Studie von Ishizuya et al. verwendet.

Die Ergebnisse aus den Adhäsionsuntersuchungen zeigen, dass auf glatten Oberflächen, insbesondere auf der polierten Titanioberfläche mehr Osteoblasten anhaften, sie jedoch im gleichen Maße Adhäsionsmarker wie Kollagen von Typ I, Fibronectin oder Osteonectin exprimieren. Die PTH-Stimulation scheint keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Osteoblasten zu haben.

Die Proliferationsuntersuchungen zeigen, dass sowohl die Stimulation mit PTH (1-34), als auch die jeweilige Oberfläche die primären humanen Osteoblastenkulturen in signifikanter Weise beeinflussen. In unserem Versuch weisen die Osteoblasten auf glatten Oberflächen eine höhere Proliferationsrate als auf rauen Oberflächen auf; eine intermittierende PTH-Stimulation scheint sogar die Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen. Die Ergebnisse aus der Adhäsion- und Proliferationsuntersuchung wurden anhand von Bildern aus der Fluoreszenzmikroskopie zusätzlich visualisiert.

Bei der Genexpressionsuntersuchung wurde die mRNA-Expression der knochenassoziierten Marker ALP, FN, KOL I, OC, OP, ON, RUNX 2, CEMP 1, PTH R1 qualitativ und quantitativ durch RT-PCR ermittelt. Die Ergebnisse aus der Genexpressionsuntersuchung legen nahe, dass die PTH-Stimulation nicht aller Marker und nicht im gleichen Maße von der intermittierenden oder permanenten Stimulationsart abhängt. In Kombination aus statistisch berechneten Daten und diskriptiver Beobachtung kommen wir zu dem Ergebnis, dass der Marker alkalische Phosphatase auf den glatten Oberflächen, sowie KOL I, ON, PTH R1 und RUNX 2 auf allen Oberflächen bei der permanenten Stimulation stärker exprimiert werden. Umgekehrt wurden die Marker Osteopontin und Osteocalcin bei der intermittierenden PTH-Stimulation verstärkt exprimiert. Die Expression der alkalischen Phosphatase auf rauen Oberflächen, CEMP 1 und Fibronectin auf allen Oberflächen zeigten sich von der PTH-Stimulation unabhängig. Schließlich haben wir in der Gruppe (PTH 6) sogar eine leicht inhibierende Wirkung bei der Genexpression von PTH R1 beobachtet. Insgesamt kann unsere Studie belegen, dass PTH eine Wirkung auf die Osteoblasten *in vitro* hat. Die Oberflächenbeschaffenheit des Substrats hat ebenfalls Einfluss auf die Zellen. Interessant bei dem Vergleich der Genexpression auf verschiedenen Oberflächen war, dass sich in der Kontrollgruppe (PTH 0) nur wenige signifikante Unterschiede zeigten. Dagegen konnten größere Schwankungen zwischen den Oberflächen in den Gruppen (PTH 6) und (PTH 48)

beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Genexpression von Osteoblasten im vorliegenden Fall nicht alleine von der Oberflächenmorphologie abhängig ist, sondern ein Zusammenspiel der Faktoren voraussetzt, bei der vorliegenden Arbeit also die Kombination mit der PTH-Stimulation.

7. Literaturverzeichnis

- Abou-Samra, A. B., Juppner, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X. F., Schipani, E., Urena, P., Richards, J., Bonventre, J. V., Potts, J. T., Jr., and et al. 1992. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium [Apr 1]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2732-2736.
- Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., and Branemark, P. I. 1981. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw [Dec]. *Int J Oral Surg* 10:387-416.
- Aigner, T., Zien, A., Hanisch, D., and Zimmer, R. 2003. Gene expression in chondrocytes assessed with use of microarrays. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2:117-123.
- Alberius, P. 1983. Bone reactions to tantalum markers. A scanning electron microscopic study [Apr]. *Acta Anat (Basel)* 115:310-318.
- Albrektsson, T., Branemark, P. I., Hansson, H. A., and Lindstrom, J. 1981. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52:155-170.
- Albrektsson, T., and Hansson, H. A. 1986. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces [May]. *Biomaterials* 7:201-205.
- Albrektsson, T., and Johansson, C. 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration [Oct]. *Eur Spine J* 10 Suppl 2:S96-101.
- Albrektsson, T., and Wennerberg, A. 2005. The impact of oral implants - past and future, 1966-2042 [May]. *J Can Dent Assoc* 71:327.
- Anselme, K., Noel, B., and Hardouin, P. 1999. Human osteoblast adhesion on titanium alloy, stainless steel, glass and plastic substrates with same surface topography [Dec]. *J Mater Sci Mater Med* 10:815-819.
- Arzate, H., Jimenez-Garcia, L. F., Alvarez-Perez, M. A., Landa, A., Bar-Kana, I., and Pitaru, S. 2002. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein [Aug]. *J Dent Res* 81:541-546.
- Aubin, J. E. 1998. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:73-82.
- Ayukawa, Y., Takeshita, F., Inoue, T., Yoshinari, M., Shimono, M., Suetsugu, T., and Tanaka, T. 1998. An immunoelectron microscopic localization of noncollagenous bone proteins (osteocalcin and osteopontin) at the bone-titanium interface of rat tibiae [Jul]. *J Biomed Mater Res* 41:111-119.
- Beck, G. R., Jr., Zerler, B., and Moran, E. 2000. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression [Jul 18]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8352-8357.
- Bellahcene, A., Castronovo, V., Ogbureke, K. U., Fisher, L. W., and Fedarko, N. S. 2008. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer [Mar]. *Nat Rev Cancer* 8:212-226.
- Boyan, B. D., Lincks, J., Lohmann, C. H., Sylvia, V. L., Cochran, D. L., Blanchard, C. R., Dean, D. D., and Schwartz, Z. 1999. Effect of surface roughness and composition on costochondral chondrocytes is dependent on cell maturation state [May]. *J Orthop Res* 17:446-457.

- Boyan, B. D., Bonewald, L. F., Paschalis, E. P., Lohmann, C. H., Rosser, J., Cochran, D. L., Dean, D. D., Schwartz, Z., and Boskey, A. L. 2002. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography [Dec]. *Calcif Tissue Int* 71:519-529.
- Branemark, P. I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B. O., Lindstrom, J., and Ohlsson, A. 1969. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3:81-100.
- Brekken, R. A., and Sage, E. H. 2001. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication [Jan]. *Matrix Biol* 19:816-827.
- Breme, J., Steinhauser, E., and Paulus, G. 1988. Commercially pure titanium Steinhauser plate-screw system for maxillofacial surgery [Jul]. *Biomaterials* 9:310-313.
- Buser, D., Schenk, R. K., Steinemann, S., Fiorellini, J. P., Fox, C. H., and Stich, H. 1991. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs [Jul]. *J Biomed Mater Res* 25:889-902.
- Buser, D., Nydegger, T., Oxland, T., Cochran, D. L., Schenk, R. K., Hirt, H. P., Snetivy, D., and Nolte, L. P. 1999. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a biomechanical study in the maxilla of miniature pigs [May]. *J Biomed Mater Res* 45:75-83.
- Byers, P. H., Marini, J. C., and Gerber, L. 1995. Frontiers in rehabilitation medicine: osteogenesis imperfecta, overview of a conference. *Connect Tissue Res* 31:253-255.
- Calvo, M. S., Eyre, D. R., and Gundberg, C. M. 1996. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover [Aug]. *Endocr Rev* 17:333-368.
- Canalis, E. 1983a. Effect of glucocorticoids on type I collagen synthesis, alkaline phosphatase activity, and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae [Mar]. *Endocrinology* 112:931-939.
- Canalis, E. 1983b. The hormonal and local regulation of bone formation [Winter]. *Endocr Rev* 4:62-77.
- Canalis, E. 1983c. Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae [Jan]. *Metabolism* 32:14-20.
- Canalis, E., and Lian, J. B. 1988. Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *Bone* 9:243-246.
- Canalis E., Centrella M. 1989. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J. Clin. Invest* 83:60-65.
- Capan, Charles C. Calcium-regulating hormones, a metabolic bone disease
- Carmona-Rodriguez, B., Alvarez-Perez, M. A., Narayanan, A. S., Zeichner-David, M., Reyes-Gasga, J., Molina-Guarneros, J., Garcia-Hernandez, A. L., Suarez-Franco, J. L., Chavarria, I. G., Villarreal-Ramirez, E., and Arzate, H. 2007. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts [Jul 6]. *Biochem Biophys Res Commun* 358:763-769.
- Chappard, D., Legrand, E., Pascaretti, C., Basle, M. F., and Audran, M. 1999. Comparison of eight histomorphometric methods for measuring trabecular bone

- architecture by image analysis on histological sections [May 15-Jun 1]. *Microsc Res Tech* 45:303-312.
- Chenu, C., Pfeilschifter, J., Mundy, G. R., and Roodman, G. D. 1988. Transforming growth factor beta inhibits formation of osteoclast-like cells in long-term human marrow cultures [Aug]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5683-5687.
- Chevallier, N., Anagnostou, F., Zilber, S., Bodivit, G., Maurin, S., Barrault, A., Bierling, P., Hernigou, P., Layrolle, P., and Rouard, H. 2009. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate [Sep 25]. *Biomaterials*.
- Cochran, D. L., Nummikoski, P. V., Higginbottom, F. L., Hermann, J. S., Makins, S. R., and Buser, D. 1996. Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results [Sep]. *Clin Oral Implants Res* 7:240-252.
- Cooper, L. F. 1998. Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements [Oct]. *J Prosthet Dent* 80:439-449.
- Davies. 2003. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 67/8:932-949.
- Davies, J., and Chambers, T. J. 2004. Parathyroid hormone activates adhesion in bone marrow stromal precursor cells [Mar]. *J Endocrinol* 180:505-513.
- Davies, J. E. 1996. In vitro modeling of the bone/implant interface [Jun]. *Anat Rec* 245:426-445.
- Davies, J. M., and Campbell, L. A. 1990. Fatal air embolism during dental implant surgery: a report of three cases [Jan]. *Can J Anaesth* 37:112-121.
- Ducy, P., Geoffroy, V., and Karsenty, G. 1996. Study of osteoblast-specific expression of one mouse osteocalcin gene: characterization of the factor binding to OSE2. *Connect Tissue Res* 35:7-14.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., and Karsenty, G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation [May 30]. *Cell* 89:747-754.
- El-Ghannam, A., Ducheyne, P., and Shapiro, I. M. 1999. Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite [May]. *J Orthop Res* 17:340-345.
- Ferguson, S. J., Broggini, N., Wieland, M., de Wild, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D. L., and Buser, D. 2006. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface [Aug]. *J Biomed Mater Res A* 78:291-297.
- Fillies, T., Wiesmann, H. P., Sommer, D., Joos, U., and Meyer, U. 2005. [Osteoblast reaction on SLA and microgrooved implant surfaces] [Jan]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9:24-28.
- Franchi, M., Bacchelli, B., Martini, D., Pasquale, V. D., Orsini, E., Ottani, V., Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R., and Ruggeri, A. 2004. Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants [May]. *Biomaterials* 25:2239-2246.
- Fujita, T., Fujii, Y., Miyauchi, A., and Takagi, Y. 1999. Comparison of antiresorptive activities of ipriflavone, an isoflavone derivative, and elcatonin, an eel carbocalcitonin. *J Bone Miner Metab* 17:289-295.
- Futami, T., Fujii, N., Ohnishi, H., Taguchi, N., Kusakari, H., Ohshima, H., and Maeda, T. 2000. Tissue response to titanium implants in the rat maxilla: ultrastructural and histochemical observations of the bone-titanium interface [Feb]. *J Periodontol* 71:287-298.

- Georg Löffler, Petro E. Petrides, Peter C. Heinrich. 2007. Biochemie und Pathobiochemie. *Springer-Lehrbuch*, 8. Auflage:ISBN 978-973-540-32680-32689.
- Globus, R. K., Doty, S. B., Lull, J. C., Holmuhamedov, E., Humphries, M. J., and Damsky, C. H. 1998. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts [May]. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1385-1393.
- Gori, F., Thomas, T., Hicok, K. C., Spelsberg, T. C., and Riggs, B. L. 1999. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation [Sep]. *J Bone Miner Res* 14:1522-1535.
- Gorski, J. P., Kremer, E. A., Chen, Y., Ryan, S., Fullenkamp, C., Delviscio, J., Jensen, K., and McKee, M. D. 1997. Bone acidic glycoprotein-75 self-associates to form macromolecular complexes in vitro and in vivo with the potential to sequester phosphate ions [Mar 15]. *J Cell Biochem* 64:547-564.
- Green, R. J., Davies, M. C., Roberts, C. J., and Tendler, S. J. 1999. Competitive protein adsorption as observed by surface plasmon resonance [Feb]. *Biomaterials* 20:385-391.
- Groves, J. T. 2005. Learning the chemical language of cell-surface interactions [Sep 13]. *Sci STKE* 2005:pe45.
- Hauschka, P. V., and Wians, F. H., Jr. 1989. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone [Jun]. *Anat Rec* 224:180-188.
- Henry, P. J., and Schibli, L. 1987. Two-piece cast superstructure for mandibular osseointegrated bridgework [Sep-Oct]. *Quintessence Dent Technol* 11:321-327.
- Hirano, T., Burr, D. B., Turner, C. H., Sato, M., Cain, R. L., and Hock, J. M. 1999. Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone fragment (1-34), LY333334, on remodeling and mechanical properties of cortical bone in rabbits [Apr]. *J Bone Miner Res* 14:536-545.
- Holzer, G., Majeska, R. J., Lundy, M. W., Hartke, J. R., and Einhorn, T. A. 1999. Parathyroid hormone enhances fracture healing. A preliminary report [Sep]. *Clin Orthop Relat Res*:258-263.
- Ishizuya, T., Yokose, S., Hori, M., Noda, T., Suda, T., Yoshiki, S., and Yamaguchi, A. 1997. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells [Jun 15]. *J Clin Invest* 99:2961-2970.
- Johansson, C., Lausmaa, J., Ask, M., Hansson, H. A., and Albrektsson, T. 1989. Ultrastructural differences of the interface zone between bone and Ti 6Al 4V or commercially pure titanium [Jan]. *J Biomed Eng* 11:3-8.
- Joos, U., Wiesmann, H. P., Szuwart, T., and Meyer, U. 2006. Mineralization at the interface of implants [Sep]. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35:783-790.
- Kano, J., Sugimoto, T., Fukase, M., and Chihara, K. 1993. Cross talk of dual-signal transduction systems in the regulation of DNA synthesis by parathyroid hormone in osteoblastic osteosarcoma cells [Mar]. *J Bone Miner Res* 8:323-329.
- Kasemo, B., and Gold, J. 1999. Implant surfaces and interface processes [Jun]. *Adv Dent Res* 13:8-20.
- Keutmann, H. T., Sauer, M. M., Hendy, G. N., O'Riordan, L. H., and Potts, J. T., Jr. 1978. Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone [Dec 26]. *Biochemistry* 17:5723-5729.
- Klein, M. O., Bijelic, A., Toyoshima, T., Gotz, H., von Koppenfels, R. L., Al-Nawas, B., and Duschner, H. Long-term response of osteogenic cells on micron and submicron-scale-structured hydrophilic titanium surfaces: sequence of cell proliferation and cell differentiation [Jun]. *Clin Oral Implants Res* 21:642-649.

- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., and Kishimoto, T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [May 30]. *Cell* 89:755-764.
- Komori, T. 2005. [Functions of BMPs, Runx2, and osterix in the development of bone and cartilage] [Sep]. *Nippon Rinsho* 63:1671-1677.
- Kornak, U., and Mundlos, S. 2003. Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach [Sep]. *Am J Hum Genet* 73:447-474.
- Lai HC, Zhuang LF, Liu X, Wieland M, Zhang ZY, Zhang ZY. 2010. The influence of surface energy on early adherent events of osteoblast on titanium substrates. *J Biomed Mater Res A*. Apr;93(1):289-296.
- Lane, T. F., and Sage, E. H. 1994. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions [Feb]. *Faseb J* 8:163-173.
- Lausmaa, J., and Linder, L. 1988. Surface spectroscopic characterization of titanium implants after separation from plastic-embedded tissue [May]. *Biomaterials* 9:277-280.
- Lian, J. B., and Gundberg, C. M. 1988. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications [Jan]. *Clin Orthop Relat Res*:267-291.
- Lincks, J., Boyan, B. D., Blanchard, C. R., Lohmann, C. H., Liu, Y., Cochran, D. L., Dean, D. D., and Schwartz, Z. 1998. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition [Dec]. *Biomaterials* 19:2219-2232.
- Lind, M. 1998. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation [Oct]. *Acta Orthop Scand Suppl* 283:2-37.
- Linder, L. 1985. High-resolution microscopy of the implant-tissue interface [Jun]. *Acta Orthop Scand* 56:269-272.
- Lindsay, R., Nieves, J., Formica, C., Henneman, E., Woelfert, L., Shen, V., Dempster, D., and Cosman, F. 1997. Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis [Aug 23]. *Lancet* 350:550-555.
- Linkow, L. I. 1969. The endosseous blade implant and its use in orthodontics [Dec]. *Int J Orthod* 7:149-154.
- Listgarten, M. A. 1996. Soft and hard tissue response to endosseous dental implants [Jun]. *Anat Rec* 245:410-425.
- Lotz, M. M., Burdsal, C. A., Erickson, H. P., and McClay, D. R. 1989. Cell adhesion to fibronectin and tenascin: quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response [Oct]. *J Cell Biol* 109:1795-1805.
- MacDonald, B. R., Gallagher, J. A., and Russell, R. G. 1986. Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone [Jun]. *Endocrinology* 118:2445-2449.
- Magnusson, P., Larsson, L., Magnusson, M., Davie, M. W., and Sharp, C. A. 1999. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone [Nov]. *J Bone Miner Res* 14:1926-1933.
- Mannstadt, M., Juppner, H., and Gardella, T. J. 1999. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties [Nov]. *Am J Physiol* 277:F665-675.
- Marco, F., Milena, F., Gianluca, G., and Vittoria, O. 2005. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron* 36:630-644.

- Marinucci, L., Balloni, S., Becchetti, E., Belcastro, S., Guerra, M., Calvitti, M., Lilli, C., Calvi, E. M., and Locci, P. 2006. Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro [Sep-Oct]. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21:719-725.
- Martini, D., Fini, M., Franchi, M., Pasquale, V. D., Bacchelli, B., Gamberini, M., Tinti, A., Taddei, P., Giavaresi, G., Ottani, V., Raspanti, M., Guizzardi, S., and Ruggeri, A. 2003. Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants [Mar]. *Biomaterials* 24:1309-1316.
- Masaki, C., Schneider, G. B., Zaharias, R., Seabold, D., and Stanford, C. 2005. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression [Dec]. *Clin Oral Implants Res* 16:650-656.
- Masuda, T., Yliheikkila, P. K., Felton, D. A., and Cooper, L. F. 1998. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies [Jan-Feb]. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13:17-29.
- Meyer, U., Joos, U., and Wiesmann, H. P. 2004. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part I [Jun]. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:325-332.
- Mohammadi, S., Esposito, M., Cucu, M., Ericson, L. E., and Thomsen, P. 2001. Tissue response to hafnium [Jul]. *J Mater Sci Mater Med* 12:603-611.
- Moursi, A. M., Damsky, C. H., Lull, J., Zimmerman, D., Doty, S. B., Aota, S., and Globus, R. K. 1996. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation [Jun]. *J Cell Sci* 109 (Pt 6):1369-1380.
- Murai, K., Takeshita, F., Ayukawa, Y., Kiyoshima, T., Suetsugu, T., and Tanaka, T. 1996. Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats [Apr]. *J Biomed Mater Res* 30:523-533.
- Mustafa, K., Wennerberg, A., Wroblewski, J., Hultenby, K., Lopez, B. S., and Arvidson, K. 2001. Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone [Oct]. *Clin Oral Implants Res* 12:515-525.
- Nanci, A., Kawaguchi, H., and Kogaya, Y. 1994. Ultrastructural studies and immunolocalization of enamel proteins in rodent secretory stage ameloblasts processed by various cryofixation methods [Apr]. *Anat Rec* 238:425-436.
- Nanci, A., Wuest, J. D., Peru, L., Brunet, P., Sharma, V., Zalzal, S., and McKee, M. D. 1998a. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules [May]. *J Biomed Mater Res* 40:324-335.
- Nanci, A., Zalzal, S., Lavoie, P., Kunikata, M., Chen, W., Krebsbach, P. H., Yamada, Y., Hammarstrom, L., Simmer, J. P., Fincham, A. G., Snead, M. L., and Smith, C. E. 1998b. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors [Aug]. *J Histochem Cytochem* 46:911-934.
- Neugebauer, B. M., Moore, M. A., Broess, M., Gerstenfeld, L. C., and Hauschka, P. V. 1995. Characterization of structural sequences in the chicken osteocalcin gene: expression of osteocalcin by maturing osteoblasts and by hypertrophic chondrocytes in vitro [Jan]. *J Bone Miner Res* 10:157-163.
- Newesely, H. 1983. [Dental implants and their materials] [Jul]. *Naturwissenschaften* 70:324-331.
- Onyia, J. E., Helvering, L. M., Gelbert, L., Wei, T., Huang, S., Chen, P., Dow, E. R., Maran, A., Zhang, M., Lotinun, S., Lin, X., Halladay, D. L., Miles, R. R., Kulkarni, N. H., Ambrose, E. M., Ma, Y. L., Frolik, C. A., Sato, M., Bryant, H.

- U., and Turner, R. T. 2005. Molecular profile of catabolic versus anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: an analysis by DNA microarray [May 15]. *J Cell Biochem* 95:403-418.
- Orsini, G., Fanali, S., Scarano, A., Petrone, G., di Silvestro, S., and Piattelli, A. 2000. Tissue reactions, fluids, and bacterial infiltration in implants retrieved at autopsy: a case report [Mar-Apr]. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15:283-286.
- Owen, T. A., Bortell, R., Yocum, S. A., Smock, S. L., Zhang, M., Abate, C., Shalhoub, V., Aronin, N., Wright, K. L., van Wijnen, A. J., and et al. 1990. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription [Dec]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9990-9994.
- Park JY, Davies JE 2000. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 11/6:530-539.
- Piattelli, A., Scarano, A., Vaia, E., and Matarasso, S. 1996. Histological evaluation of the peri-implant bone around plasma-sprayed non-submerged titanium implants retrieved from man: a report of two cases [Dec]. *Biomaterials* 17:2219-2224.
- Pistorius, A., and Willershausen, B. 2002. Biocompatibility of dental materials in two human cell lines [Feb 21]. *Eur J Med Res* 7:81-88.
- Prockop, D. J., and Kivirikko, K. I. 1995. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403-434.
- Puleo, D. A., and Nanci, A. 1999. Understanding and controlling the bone-implant interface [Dec]. *Biomaterials* 20:2311-2321.
- Qi, M. C., Zou, S. J., Han, L. C., Zhou, H. X., and Hu, J. 2009. Expression of bone-related genes in bone marrow MSCs after cyclic mechanical strain: implications for distraction osteogenesis [Sep]. *Int J Oral Sci* 1:143-150.
- Qu, Z., Rausch-Fan, X., Wieland, M., Matejka, M., and Schedle, A. 2007. The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification [Sep 1]. *J Biomed Mater Res A* 82:658-668.
- Ramires, P. A., Wennerberg, A., Johansson, C. B., Cosentino, F., Tundo, S., and Milella, E. 2003. Biological behavior of sol-gel coated dental implants [Jun]. *J Mater Sci Mater Med* 14:539-545.
- Rupp, F., Scheideler, L., Rehbein, D., Axmann, D., and Geis-Gerstorfer, J. 2004. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications [Mar-Apr]. *Biomaterials* 25:1429-1438.
- Rupp, F., Scheideler, L., Olshanska, N., de Wild, M., Wieland, M., and Geis-Gerstorfer, J. 2006. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces [Feb]. *J Biomed Mater Res A* 76:323-334.
- Sader, M. S., Balduino, A., Soares Gde, A., and Borojevic, R. 2005. Effect of three distinct treatments of titanium surface on osteoblast attachment, proliferation, and differentiation [Dec]. *Clin Oral Implants Res* 16:667-675.
- Savani, R. C., Zhou, Z., Arguiri, E., Wang, S., Vu, D., Howe, C. C., and DeLisser, H. M. 2000. Bleomycin-induced pulmonary injury in mice deficient in SPARC [Oct]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L743-750.
- Schenk, R. K., and Buser, D. 1998. Osseointegration: a reality [Jun]. *Periodontol* 2000 17:22-35.
- Schepers, E., De Clercq, M., and Ducheyne, P. 1988. Histological and histomorphometrical analysis of bioactive glass and fibre reinforced bioactive glass dental root implants [Sep]. *J Oral Rehabil* 15:473-487.

- Schneider, G. B., Perinpanayagam, H., Clegg, M., Zaharias, R., Seabold, D., Keller, J., and Stanford, C. 2003. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression [May]. *J Dent Res* 82:372-376.
- Schroder, H. C., Boreiko, O., Krasko, A., Reiber, A., Schwertner, H., and Muller, W. E. 2005. Mineralization of SaOS-2 cells on enzymatically (silicatein) modified bioactive osteoblast-stimulating surfaces [Nov]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75:387-392.
- Schroeder A, Pohler O, Sutter F 1976. Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 86(7):713-727.
- Schwartz, Z., Martin, J. Y., Dean, D. D., Simpson, J., Cochran, D. L., and Boyan, B. D. 1996. Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation [Feb]. *J Biomed Mater Res* 30:145-155.
- Schwarz, F., Ferrari, D., Herten, M., Mihatovic, I., Wieland, M., Sager, M., and Becker, J. 2007a. Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs [Nov]. *J Periodontol* 78:2171-2184.
- Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M., and Becker, J. 2007b. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early subepithelial connective tissue attachment at chemically modified and conventional SLA titanium implants. A pilot study in dogs [Sep]. *Clin Oral Investig* 11:245-255.
- Schwarz, F., Wieland, M., Schwartz, Z., Zhao, G., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Schedle, A., Broggini, N., Bornstein, M. M., Buser, D., Ferguson, S. J., Becker, J., Boyan, B. D., and Cochran, D. L. 2009. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants [Feb]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 88:544-557.
- Scutt, A., Duvos, C., Lauber, J., and Mayer, H. 1994. Time-dependent effects of parathyroid hormone and prostaglandin E2 on DNA synthesis by periosteal cells from embryonic chick calvaria [Sep]. *Calcif Tissue Int* 55:208-215.
- Selye. 1932. On the stimulation of new bone formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol. *Endocrinology* 16:547.
- Short, A. D., and Taylor, C. W. 2000. Parathyroid hormone controls the size of the intracellular Ca(2+) stores available to receptors linked to inositol trisphosphate formation [Jan 21]. *J Biol Chem* 275:1807-1813.
- Simon, M., Lagneau, C., Moreno, J., Lissac, M., Dalard, F., and Grosogeat, B. 2005. Corrosion resistance and biocompatibility of a new porous surface for titanium implants [Dec]. *Eur J Oral Sci* 113:537-545.
- Sittig, C.E. 1998. Charakterisierung der Oxidschichten auf Titan und Titanlegierungen sowie deren Reaktionen in Kontakt mit biologisch relevanten Modelllösungen. *Dissertation Nr. 12657 ETH Zürich*.
- Skripitz, R., Andreassen, T. T., and Aspenberg, P. 2000a. Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone: a time sequence study in rats [Dec]. *Acta Orthop Scand* 71:619-624.
- Skripitz, R., Andreassen, T. T., and Aspenberg, P. 2000b. Parathyroid hormone (1-34) increases the density of rat cancellous bone in a bone chamber. A dose-response study [Jan]. *J Bone Joint Surg Br* 82:138-141.

- Soskolne, W. A., Cohen, S., Sennerby, L., Wennerberg, A., and Shapira, L. 2002. The effect of titanium surface roughness on the adhesion of monocytes and their secretion of TNF-alpha and PGE2 [Feb]. *Clin Oral Implants Res* 13:86-93.
- Spiekermann, H., Jansen, V. K., and Richter, E. J. 1995. A 10-year follow-up study of IMZ and TPS implants in the edentulous mandible using bar-retained overdentures [Mar-Apr]. *Int J Oral Maxillofac Implants* 10:231-243.
- Steinert, A., Hendrich, C., Merklein, F., Rader, C. P., Schutze, N., Thull, R., and Eulert, J. 2000. [Standardized testing of bone implant surfaces with an osteoblast cell culture cyste. III. PVD hard coatings and Ti6Al4V] [Dec]. *Biomed Tech (Berl)* 45:349-355.
- Taborelli, M., Jobin, M., Francois, P., Vaudaux, P., Tonetti, M., Szmukler-Moncler, S., Simpson, J. P., and Descouts, P. 1997. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (I) Surface characterization [Jun]. *Clin Oral Implants Res* 8:208-216.
- Thiede, M. A., Yoon, K., Golub, E. E., Noda, M., and Rodan, G. A. 1988. Structure and expression of rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) alkaline phosphatase: product of a single copy gene [Jan]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:319-323.
- Thomsen, P., Larsson, C., Ericson, L. E., Sennerby, L., Lausmaa, J., and Kasemo, B. 1997. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium [Nov]. *J Mater Sci Mater Med* 8:653-665.
- Tintut, Y., Parhami, F., Le, V., Karsenty, G., and Demer, L. L. 1999. Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. Ubiquitin/proteasome-dependent regulation [Oct 8]. *J Biol Chem* 274:28875-28879.
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S. A., and Orlando, C. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies [Oct 15]. *Anal Biochem* 309:293-300.
- Usdin, T. B., Gruber, C., and Bonner, T. I. 1995. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor [Jun 30]. *J Biol Chem* 270:15455-15458.
- Uzawa, T., Hori, M., Ejiri, S., and Ozawa, H. 1995. Comparison of the effects of intermittent and continuous administration of human parathyroid hormone(1-34) on rat bone [Apr]. *Bone* 16:477-484.
- Valkonen, E., Ribbing, C. G., and Sundgren, J. E. 1986. Optical constants of thin TiN films: thickness and preparation effects [Oct 15]. *Appl Opt* 25:3624.
- Venkatesh, C. P., Gayathri, N., and Murthy, K. R. 2003. Myopic strabismus fixus: a mitochondrial myopathy? [May]. *Am J Ophthalmol* 135:720-722.
- Vickery, B. H., Avnur, Z., Cheng, Y., Chiou, S. S., Leaffer, D., Caulfield, J. P., Kimmel, D. B., Ho, T., and Krstenansky, J. L. 1996. RS-66271, a C-terminally substituted analog of human parathyroid hormone-related protein (1-34), increases trabecular and cortical bone in ovariectomized, osteopenic rats [Dec]. *J Bone Miner Res* 11:1943-1951.
- Wang, C. Y., Zhao, B. H., Ai, H. J., and Wang, Y. W. 2008. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells grown on two different titanium implant surfaces [Mar]. *Biomed Mater* 3:15004.
- Watson, P. H., Fraher, L. J., Kisiel, M., DeSousa, D., Hendy, G., and Hodsmann, A. B. 1999. Enhanced osteoblast development after continuous infusion of hPTH(1-84) in the rat [Feb]. *Bone* 24:89-94.

- Weiss, R. E., and Reddi, A. H. 1981. Role of fibronectin in collagenous matrix-induced mesenchymal cell proliferation and differentiation in vivo [Jun]. *Exp Cell Res* 133:247-254.
- Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., and Williams, P. M. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro [May 15]. *Anal Biochem* 270:41-49.
- Xiao, Z. S., Thomas, R., Hinson, T. K., and Quarles, L. D. 1998. Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor [Jul 3]. *Gene* 214:187-197.
- Yamamoto, A., Mishima, S., Maruyama, N., and Sumita, M. 2000. Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin- or collagen-coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy [May]. *J Biomed Mater Res* 50:114-124.
- Yamamoto, Y., Ikeda, K., Watanabe, M., Shimomura, A., Suzuki, H., Oshima, T., Imamura, Y., Ohuchi, K., and Takasaka, T. 1998. Expression of adhesion molecules in cultured human nasal mucosal microvascular endothelial cells activated by interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha: effects of dexamethasone [Sep]. *Int Arch Allergy Immunol* 117:68-77.
- Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D. L., and Boyan, B. D. 2005. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure [Jul 1]. *J Biomed Mater Res A* 74:49-58.
- Zinger, O., Anselme, K., Denzer, A., Habersetzer, P., Wieland, M., Jeanfils, J., Hardouin, P., and Landolt, D. 2004. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography [Jun]. *Biomaterials* 25:2695-2711.

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Pawel Schwartzmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In-vitro-Untersuchung des Adhäsions-, Proliferations- und Genexpressionverhaltens von Primärosteoblasten auf verschiedenen Oberflächen in Abhängigkeit von der Stimulation mit PTH 1-34“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischer Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Danksagung

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Anton Friedmann für die Überlassung des Themas aussprechen. Er stand mir stets mit motivierendem und freundlichem Rat und Unterstützung zur Seite.

Einen großen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernd-Michael Kleber aussprechen, dem Leiter der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Matthias Walther aus dem Institut für Biochemie für die freundliche Hilfe danken.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin, insbesondere Herrn Mouaz Soudan und Verena Kanitz für die konstruktive Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mir stets Rückhalt bei der Anfertigung dieser Dissertation gaben.