

**UNTERSUCHUNG DES ADHÄSIONSVERHALTENS VON
GINGIVA-FIBROBLASTEN AUF MIKROSTRUKTURIERTEN
TITANOBERFLÄCHEN**

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Friederike Pfeiffer
aus Karlsruhe

2004

Tag der mündlichen Prüfung:

28.04.2004

Dekan:

Professor Dr. H. U. Schnitzler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Wolburg

2. Berichterstatter:

Professor Dr. W. J. Schmidt

1. EINLEITUNG	5
1.1. DIE UMGEBUNG EINES ZAHNES: DER ZAHNHALTEAPPARAT	5
1.2. DAS GEWEBE DER GINGIVA: GEGENSTAND DER HIER VORGESTELLTEN UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELLADHÄSION	7
1.2.1. WICHTIG FÜR EINE INTAKTE UND GESCHLOSSENE AUSKLEIDUNG DER MUNDHÖHLE: DAS GINGIVAEPITHEL.....	7
1.2.2. DAS BINDEGEWEBE DER GINGIVA.....	8
1.3. DENTALE IMPLANTATE: MÖGLICHKEITEN UND SCHWIERIGKEITEN BEI DER KLINISCHEN APPLIKATION	9
1.3.1. DER KRITISCHE PUNKT: GRENZFLÄCHE ZWISCHEN IMPLANTAT UND UMGEBENDEM GEWEBE.....	10
1.4. UNTERSUCHUNGEN VON ZELLEN AUF KÜNSTLICHEN OBERFLÄCHEN	12
1.4.1. DIE REAKTION VON ZELLEN AUF MIKROSTRUKTURIERTEN OBERFLÄCHEN MIT GROOVE- RIDGE-DESIGN.....	12
1.5. DIE BASIS FÜR DIE ADHÄSION VON ZELLEN AM SUBSTRAT: FOKALKONTAKTE	14
1.5.1. EINIGE WICHTIGE KOMPONENTEN DER FOKALKONTAKTE.....	15
1.5.1.1. Integrine.....	15
1.5.1.2. Zytoplasmatische Linkerproteine.....	16
1.5.1.3. Rho GTPasen: Regulierung des Aufbaus der Fokalkontakte.....	17
1.5.1.4 Funktion und Aufbau von Fokalkontakten.....	19
1.5.2. EIN WICHTIGER ASPEKT DER WUNDHEILUNG: ZELLMIGRATION.....	20
1.6. GESTALTUNG DER FREIEN OBERFLÄCHE DER ADHÄRIERENDEN ZELLEN: MIKROVILLI UND FILOPODIEN	22
1.7. DIE ERM-PROTEINFAMILIE	22
1.7.1. FUNKTION DER ERM-PROTEINE.....	23
1.7.2. VORKOMMEN DER ERM-PROTEINE.....	26
1.8. ANALOGIEN ZWISCHEN FOKALKONTAKTEN UND DEN ERM-PROTEINEN	27
1.9. ZIELE DIESER ARBEIT	28
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1. ZELL-KULTUR	30
2.2. PLÄTTCHEN	31
2.3. IMMUNHISTOCHEMISCHE METHODEN	32
2.4. ARALDIT-EINBETTUNG	34
2.5. SEMIDÜNNNSCHNITTE	36
2.6. ULTRADÜNNNSCHNITTE	36
2.7. AFS-EINBETTUNG MIT CRYOFIXIERUNG	37
2.8. IMMUNOGOLD-MARKIERUNGEN	38
3. ERGEBNISSE	40
3.1. DAS MODELLSYSTEM	40

Inhaltsverzeichnis

3.1.1. GINGIVA-FIBROBLASTEN	41
3.1.2. SUBSTRATE	42
3.2. VERHALTEN VON ZELLEN AUF MIKROSTRUKTURIERTEN OBERFLÄCHEN	43
3.3 LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DES ZELLVERHALTENS	45
3.3.1 INTEGRIN-MARKIERUNG	45
3.3.2 VINCULIN UND ZELLADHÄSION	47
3.4 REPLIKA-TECHNIK	52
3.4.1 KONVENTIONELLE EINBETTUNG OHNE TITAN	54
3.4.2 KONVENTIONELLE EINBETTUNG MIT TITAN	55
3.5 TIEFTEMPERATUR-EINBETTUNG	60
3.5.1 KRYOSUBSTITUTION	60
3.5.2 IMMUNOGOLD-MARKIERUNG VON VINCULIN	62
3.6 ERM-PROTEINE	66
3.6.1. VERTEILUNG VON ERM PROTEINEN IN DER ZELLE	67
3.6.1.1. Untersuchung von verschiedenen Geometrien.....	68
3.6.1.2. Untersuchung von verschiedenen Materialien.....	73
3.6.1.3. Immunogold-Markierung von ERM-Proteinen.....	75
<u>4. DISKUSSION</u>	<u>78</u>
4.1. MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN METHODEN ...	78
4.1.1 ANWENDUNG VON TIEFTEMPERATUR-EINBETTUNG UND IMMUNOGOLD-MARKIERUNG	78
4.1.2. LOKALISIERUNG VON FOKALKONTAKTEN.....	80
4.1.3. ORIENTIERUNG DER ZELLEN.....	80
4.1.4. ERKENNTNISSE AUS DEN ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....	81
4.2. VERSTÄRKTE AUSBILDUNG VON MEMBRANAUSSTÜLPUNGEN AUF MIKROSTRUKTURIERTEN OBERFLÄCHEN	82
4.2.1. LOKALISIERUNG DER ERM-PROTEINE.....	83
4.2.2. IMMUNOGOLD-MARKIERUNG VON ERM	87
4.3. TITAN ALS SUBSTRAT.....	88
4.4. VERGLEICH DER VINCULIN-MARKIERUNG MIT DER ERM-MARKIERUNG	89
4.5. ÜBERLEGUNGEN ZUM HIER VORGESTELLTEN MODELLSYSTEM	90
4.6. ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN	93
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>96</u>
<u>6. LITERATUR</u>	<u>99</u>
<u>DANKSAGUNG</u>	<u>110</u>
<u>LEBENS LAUF</u>	<u>112</u>

1. Einleitung

Untersuchungsgegenstand der hier vorgestellten Arbeit war ein Modellsystem für Zahnimplantate. Da in der dentalen Implantologie inzwischen vorwiegend Titan als Werkstoff eingesetzt wird, wurde Titan als Substrat verwendet und das Verhalten von Zellen darauf beobachtet. Die Anheftung von Zellen auf der Implantatoberfläche entscheidet über den Erfolg des Implantats. Die Topographie der Oberfläche und die Beschaffenheit des Metalls beeinflussen wiederum das Verhalten der Zellen und die Expression von Adhäsions- und anderen Oberflächenmolekülen auf der Zelloberfläche, daher ist es wichtig, die Grenzfläche zwischen kultivierten Zellen und Metalloberfläche zu untersuchen. Im Folgenden wird nun dieses Modellsystem und die entsprechende Situation in vivo beschrieben.

1.1. Die Umgebung eines Zahnes: der Zahnhalteapparat

Der anatomische Zahn setzt sich aus mehreren verschiedenen Komponenten zusammen. Inmitten des Zahnes befindet sich die Zahnpulpa, ein stark vaskularisiertes und spezialisiertes Bindegewebe, das für die Vitalität des gesamten Zahnes verantwortlich ist. Die Zahnpulpa wird von Dentin, oder auch dem Zahnbein, umschlossen, welches den größten Teil des Säugetier-Zahnes darstellt. Der Zahnschmelz ist eine kristalline Matrix, die dem Dentin des Zahnes auf der Zahnkrone aufgelagert ist. Das Wurzelzement ist ein mineralisiertes Bindegewebe, das die äußere Oberfläche der Zahnwurzel bedeckt und dem Dentin aufgelagert ist. Es verankert die desmodontalen Faserbündel mit der Wurzeloberfläche und wird funktionell betrachtet auch zum Zahnhalteapparat gezählt (Abb. 1).

Der Zahnhalteapparat, oder auch Parodontium genannt, besteht aus vier Komponenten: dem Wurzelzement, dem Alveolarknochen, dem Desmodonten und der Gingiva (Abb. 1). Die Funktionen dieser Komponenten sind die Verankerung der einzelnen Zähne und die Zusammenfassung der Zähne eines Kiefers zu einer Zahnreihe, außerdem passen sie sich funktionellen und topographischen Veränderungen an und können Zahnstellungsänderungen ermöglichen oder Schädigungen, zum Beispiel an der Wurzel, reparieren. Im Wurzelzement werden die desmodontalen Kollagenfaserbündel verankert, was der Befestigung des Zahnes im

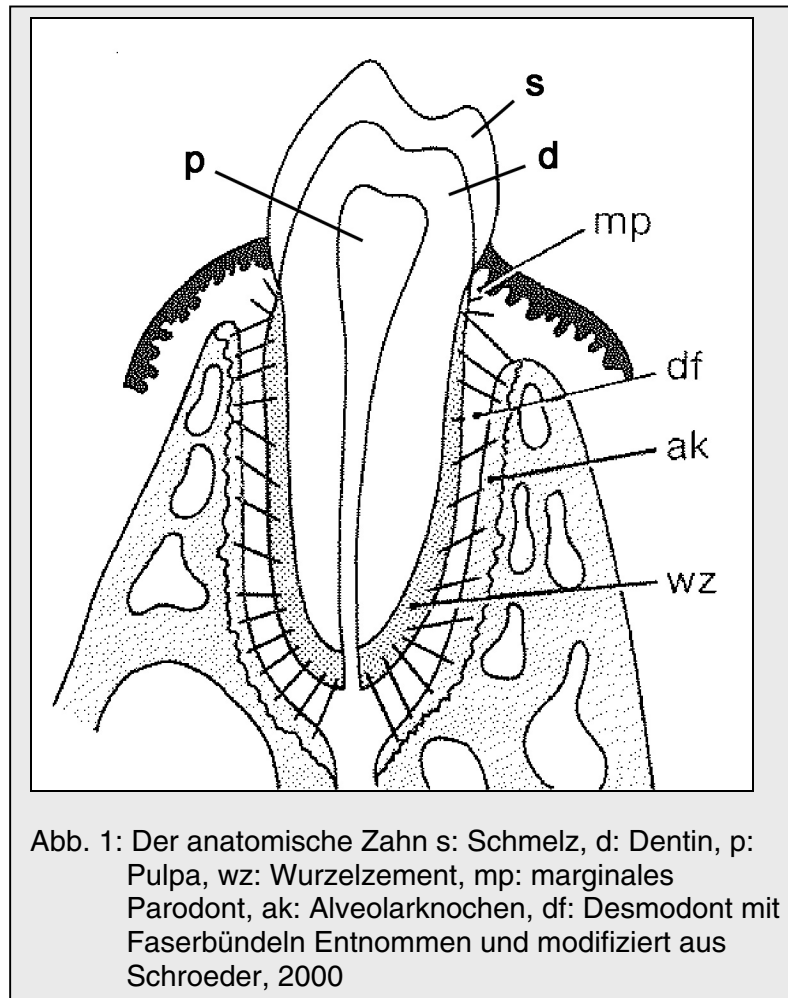


Abb. 1: Der anatomische Zahn s: Schmelz, d: Dentin, p: Pulpa, wz: Wurzelzement, mp: marginales Parodont, ak: Alveolarknochen, df: Desmodont mit Faserbündeln Entnommen und modifiziert aus Schroeder, 2000

Alveolarknochen dient. Dabei bestimmen Länge, Umfang, Form und Zahl der Wurzeln die zur Verfügung stehende Verankerungsfläche des Zahnes. Im Alveolarknochen sind die Zahnwurzeln der in Funktion stehenden Zähne eingelassen. Die sogenannten Alveolarfortsätze entwickeln sich mit der Bildung und dem Durchbruch der Zähne und sind daher zahnabhängige Strukturen. Dies bedeutet, dass sich diese knöchernen Anteile des Ober- und Unterkiefers bei Verlust der Zähne wieder zurückbilden. Zur Funktion der Alveolarfortsätze gehört auch die Aufnahme und Verteilung der Kräfte, die als Druck beim Kauen, Schlucken, Sprechen und Knirschen erzeugt werden. Das Desmodont, auch Periodontium genannt, ist ein zell- und faserreiches Bindegewebe, das zwischen der Wurzeloberfläche des Zahnes und dem Alveolarknochen lokalisiert ist. Das Desmodont verbindet das Wurzelzement mit dem Alveolarknochen und bildet mit

ihnen zusammen eine funktionelle Einheit, die eine gelenkartige Verbindung zwischen Zahn und Knochen herstellt. Die größte Zellpopulation im Desmodont wird von den Fibroblasten dargestellt, die für die Herstellung und Erneuerung der Faserbündel zuständig sind und in einem dreidimensionalen Netzwerk angeordnet sind. Diese vorwiegend aus Kollagen bestehenden Fasern stellen den volumenmäßig größten Teil des Desmodonten dar und sind auf der einen Seite im Wurzelzement und auf der anderen Seite im Alveolarknochen verankert. Die spezielle Anordnung der Fasern ergibt eine in alle Dimensionen des Raumes verspannte Befestigung der Wurzel, die sie gegen Rotationen schützt. Das Desmodont beherbergt außerdem eine Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen, die an der Remodellierung von Knochen und Zement beteiligt sind, sowie Gefäße für die Blutversorgung des Zahnhalteapparates und Nerven.

1.2. Das Gewebe der Gingiva: Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen zur Zelladhäsion

Die Gingiva, auch marginales Parodont genannt, ist Teil der Mundschleimhaut des harten Gaumens und bedeckt den Alveolarknochen und umschließt den Zahnhals. Sie erfüllt mehrere Funktionen. Die Gingiva trägt als Teil des Zahnhalteapparates zur Verankerung der Zähne und der Stabilisierung ihrer Position bei. Als Teil der Mundschleimhaut bildet sie eine den Zahnhals umschließende epitheliale Manschette, die sich der Zahnoberfläche anheftet und für eine kontinuierliche epitheliale Auskleidung der Mundhöhle sorgt. Sie stellt außerdem einen Schutz vor Infektionen dar. Die Gingiva besteht aus epitheliale- und Bindegewebe, beinhaltet aber auch Nerven und Gefäße.

1.2.1. Wichtig für eine intakte und geschlossene Auskleidung der Mundhöhle: das Gingivaepithel

Der epitheliale Teil der Gingiva lässt sich in nicht-keratinisierendes Saumepithel und die keratinisierenden oralen Sulkus- und Gingivaepithelien unterteilen. Das nicht-keratinisierende Saumepithel umgibt den Zahnhals ringförmig und geht auf der Höhe des Sulkusbodens in das orale Sulkusepithel über. Es ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, dessen Zellen über Desmosomen miteinander verbunden sind. Der

zwischen Saumepithel und Zahnoberfläche bestehende Haftmechanismus wird auch als Epithelansatz bezeichnet. Damit wird ein biologisches Prinzip beschrieben, bei welchem Epithelzellen, die mit einem nicht-epithelialen Substrat in Kontakt treten, eine Basallamina ausbilden und sich über Hemidesmosomen an diese anheften. Es bildet sich also ein Komplex aus Zahnoberfläche, Basallamina, Hemidesmosomen und Zellmembran, der für die Haftung der Saumepithelzellen an der Zahnoberfläche sorgt. Der Epithelansatz garantiert die Kontinuität der epithelialen Auskleidung der Mundhöhle, das Saumepithel als Ganzes sorgt für die Erhaltung und die Abwehrleistung des gingivalen Gewebes am Zahnhals. Am gingivalen Sulkus geht das Saumepithel in das orale Sulkusepithel über. Als gingivalen Sulkus bezeichnet man eine bis zu 0,5 mm hohe rinnenartige Vertiefung zwischen Gingivalsaum und Zahnoberfläche. Dieser Sulkus wird also von drei Seiten her begrenzt: von der Schmelzoberfläche auf der einen und dem oralen Sulkusepithel auf der anderen Seite, sowie dem Sulkusboden, der von der freien Oberfläche des Saumepithels gebildet wird, und ist zur Mundhöhle hin offen. Die Tiefe des Sulkus wird zum einen von entzündlichen Reaktionen der Gingiva, aber auch durch mechanischen Stress beeinflusst. Das orale Gingivaepithel schließlich ist Teil der epithelialen Auskleidung der gesamten Mundhöhle.

1.2.2. Das Bindegewebe der Gingiva

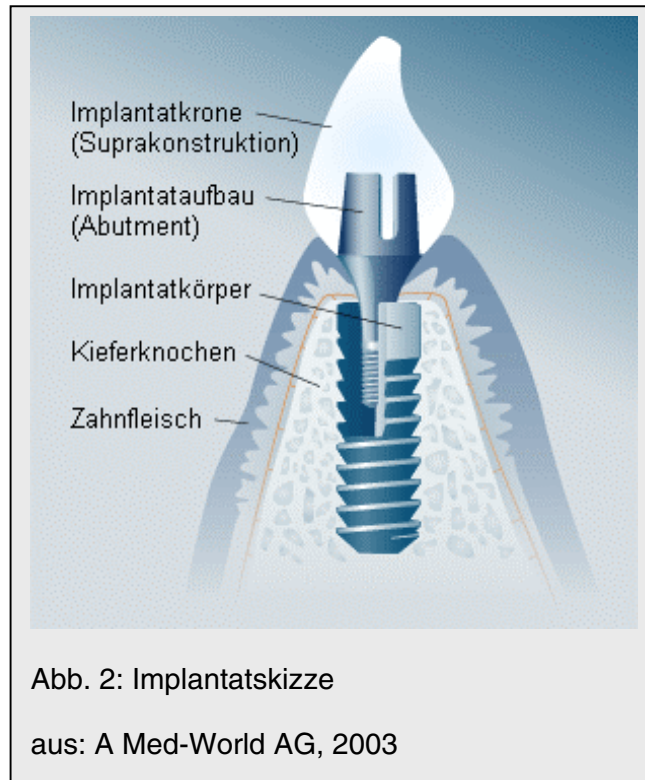
Das Bindegewebe der Gingiva besteht zu einem großen Teil aus kollagenen Faserbündeln, die Grundsubstanz des Bindegewebes setzt sich dagegen aus Proteoglykanen und Glykoproteinen zusammen. Die größte Zellpopulation wird von den Fibroblasten gestellt, die vor allem das Kollagen produzieren. Es sind aber auch Mastzellen und Leukozyten, die für die Reinigung des Gewebes und die immunologische Kontrolle zuständig sind, anzutreffen. Der Faserapparat des gingivalen Bindegewebes weist eine komplizierte Architektur auf und ist als Fortsetzung des desmodontalen Fasergerüsts zu betrachten. Die Faserbündel des Bindegewebes befestigen das gingivale Gewebe an Wurzelzement und Alveolarknochen, stabilisieren die Position der Zähne, unterlagern das Saumepithel und verleihen der Gingiva ihre Reißfestigkeit. An der Grenzfläche zwischen Gingiva und Zahnoberfläche gibt es somit zwei verschiedene Haftmechanismen. Das

Saumepithel ist mit der Zahnoberfläche durch eine epitheliale Haftung verbunden. Im Bereich des Bindegewebes inserieren Faserbündel in das Wurzelzement. Im Idealfall grenzen diese beiden verschiedenen Haftmechanismen an der Schmelz-Zement-Grenze aneinander. Das gingivale Gewebe besitzt eine hohe Regenerationsfähigkeit, aufgrund hoher Umsatzraten seiner epithelialen und bindegewebigen Bestandteile. Ein Großteil der immunologischen Abwehrleistung findet im Saumepithel statt.

1.3. Dentale Implantate: Möglichkeiten und Schwierigkeiten bei der klinischen Applikation

Dem natürlichen Zahn entsprechend, soll auch das dentale Implantat nicht nur im Knochen verankert sein, sondern idealerweise auch mit den gingivalen Weichgeweben, Bindegewebe und Epithel, in direktem Kontakt stehen. Im Bereich der osseointegrierten, also im Knochen verankerten, Dentalimplantate wird vorwiegend Titan als Werkstoff verwendet, da Titan äußerst biokompatibel ist und bei der Einheilung in den Kiefer gute Erfolge gezeigt hat. Bei der Platzierung eines Implantats im Kiefer wird in der Regel eine Titanschraube in den Knochen eingebracht, hat aber auch von Anfang an Kontakt zu Bindegewebs- und Epithelzellen. Wenn die Schraube nach einer gewissen Zeit eingehilt ist, wird sie mit dem künstlichen Zahn beladen. Als Kriterien für den Erfolg der Implantate werden zum Beispiel stabiler Einbau im Knochen, keine Infektionen, angenehmes Tragen und keine Schmerzen des Implantatbesitzers betrachtet (Albrektsson et al., 1986). Dentale Implantate integrieren sich in 61 bis 98 % der Fälle dauerhaft stabil im Kiefer (je nach Beurteilungskriterien), also kommt es in 2 bis 39 % der Fälle zum Verlust des Implantats (Buch et al., 2003). Mögliche Ursache kann zum Beispiel die Bildung einer Bindegewebskapsel rund um das Implantat sein, so dass sich der Knochen nicht mehr an der Implantatoberfläche anlagern kann. Um dieses Verhältnis nicht nur im dentalen Bereich zu verbessern, hat sich in den letzten Jahren das große Forschungsgebiet der Biomaterialwissenschaften gebildet und etabliert, das sich mit der Gestaltung der Implantatoberflächen zur Verbesserung der Anlagerung von Zellen daran befasst.

1.3.1. Der kritische Punkt: Grenzfläche zwischen Implantat und umgebendem Gewebe



Nach der Platzierung eines Implantats in der Mundhöhle (Abb. 2) ist es unbedingt notwendig, eine schnelle und dauerhafte Anlagerung von Zellen an die Implantatoberfläche zu erreichen. Ein sogenannter ‚epithelial seal‘ aus Epithelzellen rund um das Implantat soll die Entstehung bakterieller Infektionen verhindern. Eine dauerhafte Verankerung im Knochen wird durch Interaktion von Osteoblasten mit der Implantatoberfläche hergestellt. Die Interaktion von Bindegewebe und Fibroblasten mit der Implantatoberfläche spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau eines stabilen Halteapparates, der demjenigen des natürlichen Zahnes möglichst ähnlich sein soll, was für den Erfolg des Implantats besonders wichtig ist (Hermann et al., 2000). Da diese Zelltypen, nämlich Epithelzellen, Fibroblasten und Osteoblasten, jeweils verschiedene Ansprüche an ihre Umgebung stellen und auf die genau definierte Implantatoberfläche auf unterschiedliche Art und Weise reagieren, kann man versuchen, bestimmte Areale der Implantatoberfläche so zu gestalten, dass sich nur ein spezieller Zelltyp an diesem Areal anlagert (Cochran et al., 1994). Dies entspricht

der Situation auf der Oberfläche eines natürlichen Zahnes, die für die Anlagerung von Epithel, Bindegewebe und Knochen auch jeweils verschieden gestaltet ist. Dabei hat sich die Forschung bei den dentalen Implantaten bisher hauptsächlich auf die Einheilung in den Knochen und die Reaktionen von Osteoblasten auf den verschiedenen Oberflächen konzentriert, da dies offensichtlich von entscheidender Bedeutung für die Stabilität eines Implantats ist. Lagert sich jedoch ein bestimmter Zelltyp, wie zum Beispiel Epithelzellen oder Fibroblasten um einen zu großen Teil der Implantatoberfläche, kann die langfristige stabile Befestigung des Implantats nicht gewährleistet werden. Andererseits ist die stabile Integration in den Knochen auch nicht ausreichend für den Erfolg des Implantats, wenn das Bindegewebe nicht richtig angelagert wird. Das Ziel ist es also, eine physiologisch stabile Einheit des Bindegewebes am Implantat entstehen zu lassen, die auch als implantotgingivale Einheit bezeichnet wird (Cochran et al., 1997). Ein großes Aufgabengebiet der Forschung der letzten Jahre war es daher, die Reaktionen der verschiedenen Zelltypen auf den verschieden gestalteten Implantatoberflächen zu untersuchen und zu charakterisieren. Ziel dabei war es, ein Implantat herzustellen, dessen Oberfläche es ermöglicht, optimal in Knochen, Bindegewebe und Epithel einzuheilen, und damit der Situation um natürliche Zähne herum möglichst nahe zu kommen. So hat es sich herausgestellt, dass für die Anlagerung von Osteoblasten eine möglichst raue Implantatoberfläche von Vorteil ist (Thomas and Cook, 1985), während Epithel und Bindegewebe vergleichsweise glatte Oberflächen bevorzugen (Hormia et al., 1991; Könönen et al., 1992; Cochran et al., 1994). Man hat sich in den letzten Jahren eher auf die Funktionalisierung bewährter Materialien konzentriert, anstatt nach neuen Materialien zu suchen. Eine Funktionalisierung kann zum einen eine physikalische Modifizierung der Oberfläche, also Änderungen der Topographie oder der Rauigkeit, zum anderen eine chemisch-biologische Modifizierung der Oberfläche durch Beschichtung mit Komponenten der extrazellulären Matrix bedeuten. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den Einfluss der Topographie der Oberfläche gesetzt.

1.4. Untersuchungen von Zellen auf künstlichen Oberflächen

Schon 1911 bemerkte Harrison, dass die Topographie der Oberfläche, auf welcher Zellen wachsen, einen großen Einfluss auf ihr Verhalten ausübt. Er kultivierte Zellen auf Spinnweben und beobachtete, wie sie sich in Bewegung, Form und Anordnung an dieses Oberflächenmuster anpassen (Harrison, 1911). Seitdem wurde dieses Verhalten ausgiebig untersucht. Brunette hat schon vor Jahren festgestellt, dass die Oberflächenstruktur eines Implantats nicht nur bestimmte Zellpopulationen ausselektieren kann, sondern auch die Funktionen der adhärierenden Zellen beeinflusst (Brunette, 1988). Allerdings ist man immer noch dabei, die optimale Implantatoberfläche zu gestalten, und das Verhalten von verschiedenen Zelltypen darauf zu untersuchen. Inzwischen gibt es technisch vielfältige Möglichkeiten, unterschiedliche Materialien mit verschiedenen Musterungen herzustellen. So gibt es zum Beispiel aus der Halbleitertechnologie einige Strukturierungsverfahren für verschiedenste Materialien, die es ermöglichen, eine Vielfalt von Strukturformen und Strukturgrößen, im Bereich von Millimetern bis hin zu Nanometern, herzustellen. Mit diesen definierten Strukturen als Substrat kann das Verhalten der Zellen auf verschiedenen Topographien detailliert untersucht werden (Curtis und Wilkinson, 1999). Die Oberfläche des Substrats, auf dem die Zellen wachsen, bestimmt ihr Adhäsionsverhalten, was sie zur Expressierung bestimmter Oberflächenrezeptoren veranlasst, die ihrerseits Einfluss auf die gesamten Zellreaktionen haben. Die meisten dieser Untersuchungen wurden an Linienstrukturen durchgeführt, die das sogenannte ‚groove-ridge-design‘ aufweisen.

1.4.1. Die Reaktion von Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen mit groove-ridge-design

Die Tatsache, dass Zellen sich entlang längs gerichteter Strukturen orientieren und bewegen, wird auch als ‚contact guidance‘ oder ‚topographic guidance‘ bezeichnet (Weiss, 1934). Auf diesen definierten Mustern lassen sich die Reaktionen von Zellen gut beobachten. Es gibt bereits eine Menge Arbeiten zu diesem Thema, in denen verschiedene Zelltypen, wie Fibroblasten, Epithelzellen oder Makrophagen, auf unterschiedlichsten Rillenstrukturen und Materialien beobachtet wurden (Brunette,

1986a,b; Meyle et al., 1995). Eine Reihe von Hypothesen wurde bereits erstellt, um das Phänomen der Zellorientierung zu erklären, aber der Mechanismus, der zu diesem Verhalten führt, ist noch nicht ganz klar, und variiert auch je nach Zelltyp (Curtis und Wilkinson, 1999). Es scheint so zu sein, dass es keine einzelne dominierende Hypothese gibt, die die ‚topographic guidance‘ auf verschiedenen gestalteten Substraten erklären kann, sondern es sind vermutlich mehrere Mechanismen vorhanden, die in ihrer Gesamtheit dazu beitragen (Brunette, 1988, den Braber et al., 1998a). Zellen sind in der Lage, auf eine Vielzahl verschiedenster Strukturen zu reagieren (Brunette, 1986a). Das Orientierungsverhalten von Zellen richtet sich auch danach, ob sie als isolierte Zelle oder als Zellverband auftreten. Je nachdem ist die Orientierung mehr oder weniger stark ausgeprägt (Clark et al., 1991). Fibroblasten zeigen auf Grund ihrer länglichen Form besonders eindrucksvoll eine parallele Orientierung an Rillenstrukturen und sind daher ein beliebtes Studienobjekt. Die Orientierung der Zellen kann man nicht nur anhand ihrer Form, die sie einnehmen, wenn sie sich entlang der Achse der Rillen anordnen, beobachten. Querschnitte von Fibroblasten, die auf mikrostrukturierten Substraten wachsen, zeigen, dass sich auch ihre Mikrofilamente entlang dieser Achse der Rillen anordnen. Die Anordnung der Mikrofilamente reflektiert also auch die Orientierung der Zelle als Ganzes (Brunette, 1986a; Meyle et al., 1993a). Inzwischen ist klar, dass die mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts auch Einfluss auf die Orientierung der Zellen nehmen. Die Komponenten, die bei der ‚topographic guidance‘ eine entscheidende Rolle spielen, sind Mikrotubuli, Mikrofilamente und Fokalkontakte (Oakley and Brunette, 1993). Beide Systeme, Mikrotubuli und Mikrofilamente, sind wichtig für die Orientierungsreaktion der Zellen und können durch unterschiedliche Stimuli gezielt angesprochen werden (Wójciak-Stothard et al., 1995, Oakley et al., 1997). Das Phänomen der ‚contact guidance‘ kann man zum Beispiel einsetzen, um durch Mikrostrukturen Epithelzellen nur an einem bestimmten Teil des Implantats festwachsen zu lassen. Die Zellen können so daran gehindert werden, in Richtung Knochen zu wachsen, auf diese Weise kann ein ‚epithelial downgrowth‘ verhindert werden.

1.5. Die Basis für die Adhäsion von Zellen am Substrat:

Fokalkontakte

Ein Aspekt des Zellverhaltens, der unentbehrlich für den Erfolg eines Implantats ist, ist die Zelladhäsion, als Basis für die Etablierung eines intakten Gewebes. Die Adhäsion von Zellen am Substrat ist komplexen Mechanismen unterworfen. Unabhängig von der Topographie dieses Substrats spielen Fokalkontakte dabei als Verbindung zwischen Zytoskelett, Membran und extrazellulärer Matrix eine wichtige Rolle (Burrige et al, 1988). Es handelt sich dabei um definierte Areale der Zellmembran, die in engem Kontakt mit dem Substrat stehen und die bei stationären Zellen besonders ausgeprägt sind. Fokalkontakte haben wichtige Funktionen in einer Zelle: sie übertragen Kräfte an den Adhäsionspunkten, um starkes Anheften am Substrat aufrechtzuerhalten und sie sind ein Zentrum, von dem zahlreiche Signaltransduktionswege ausgehen. Eine zentrale Komponente dieser Fokalkontakte sind die Integrine. Diese Transmembranrezeptoren binden an Bestandteile der extrazellulären Matrix und sind auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran über Linkerproteine an das Aktinzytoskelett gekoppelt. Das Aktinzytoskelett bildet sogenannte Aktin Stress Fasern aus, die sich aus Aktinfilamenten und assoziierten Myosinfilamenten zusammensetzen und damit kontrahierbar sind. Die Stress Fasern inserieren in die Fokalkontakte. Außerdem befinden sich eine Reihe von Proteinen der Signaltransduktion auf der zytoplasmatischen Seite der Fokalkontakte. Die Adhäsion der Zelle an der extrazellulären Matrix erzeugt Signale, die für das Überleben der Zelle wichtig sind. Auch werden Reaktionen wie Migration, morphologische Veränderungen, Differenzierung und Proliferation über diesen Kontakt gesteuert. Der Kontakt zwischen Integrinrezeptoren und ihren entsprechenden extrazellulären Matrixmolekülen induziert die Bildung von Proteinansammlungen und ihren Modifikationen im Zytoplasma, was letztendlich zur Bildung von Fokalkontakten führt (Bershadsky et al, 1996). Die genaue molekulare Architektur dieser hochkomplexen Kontakte konnte jedoch noch nicht bis ins Detail aufgeklärt werden. Fokalkontakte sind also eine Möglichkeit für die Zelle, an ihre extrazelluläre Matrix zu binden und die dadurch entstandenen Signale in ihr Inneres weiterzuleiten. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Fokalkontakte auch als

Mechanosensoren funktionieren und die topographischen Gegebenheiten ihrer Umgebung wahrnehmen können (Geiger and Bershadsky, 2001). Außerdem sind Fokalkontakte in der Lage, Kräfte, die auf die Zelle wirken, auf das Zytoskelett zu übertragen, oder die extrazelluläre Matrix zu organisieren (Burrige et al, 1997, Sastry and Burrige, 2000). Fokalkontakte können sich als Antwort auf lokal auftretende Kräfte bilden oder auflösen. Daraus resultiert als Zellantwort eine Reaktion auf unterschiedliche physikalische Eigenschaften des Substrats und eine Beweglichkeit in Richtung der günstigeren Regionen des angebotenen Substrats (Lo et al., 2000; Geiger and Bershadsky, 2001). Aufgrund dieser Tatsachen sind die Fokalkontakte natürlich für die Untersuchungen von Zelladhäsion und Orientierung auf mikrostrukturierten Substraten von großem Interesse, da sie dazu benötigt werden, die chemischen und physikalischen Eigenschaften der neuen Umgebung zu erfassen und sich darin festzusetzen. Wenn also ein Implantat in den Kiefer eingebracht wird, müssen sich die Zellen der umliegenden Gewebe mit der neuen metallischen Oberfläche auseinandersetzen, ihre Beschaffenheit erfassen und sollten sich dann mit Hilfe von Kontakten, die sie ausbilden können, darauf niederlassen.

1.5.1. Einige wichtige Komponenten der Fokalkontakte

1.5.1.1. Integrine

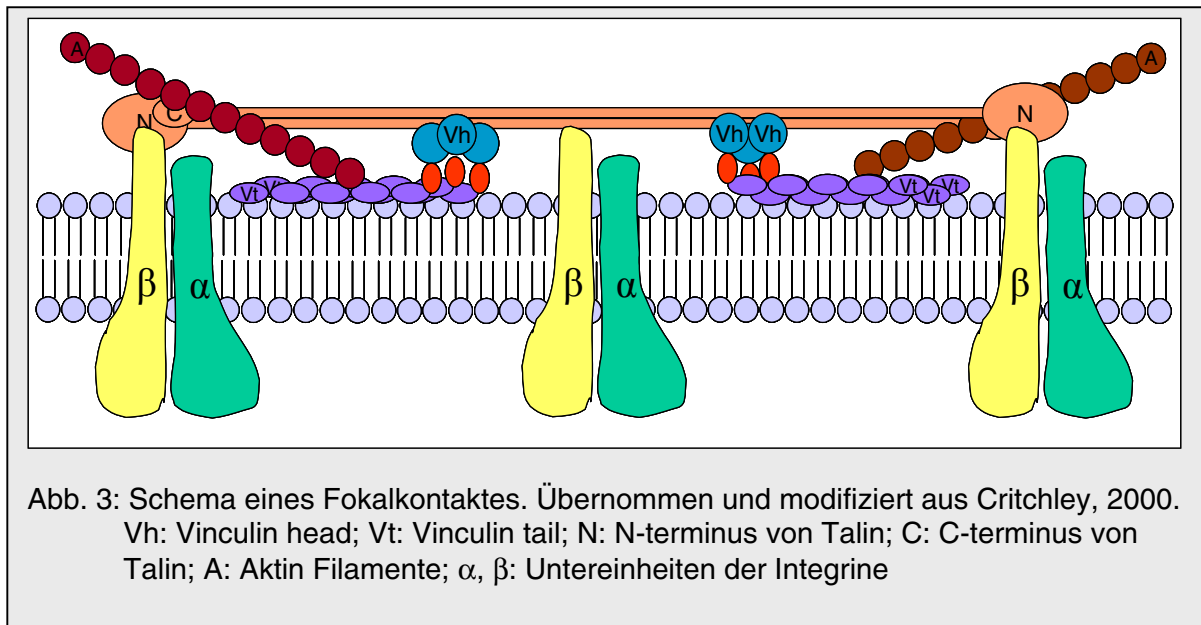
Die Integrine sind eine Familie von Transmembranrezeptoren für die extrazelluläre Matrix. Alle Integrine sind Heterodimere, die sich aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht-kovalent aneinander gebunden sind, zusammensetzen. Integrine binden spezifisch an Komponenten der extrazellulären Matrix und kommen somit in bestimmten Regionen der Zellmembran gehäuft vor, wo sie adhäsive Kontakte zum Substrat bilden, entweder Fokalkomplexe oder Fokalkontakte. Der zytoplasmatische Teil der Integrine ist mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Die meisten Zellen exprimieren mehrere spezifische Integrine. Dabei kann ein Integrin-Heterodimer ein bis mehrere extrazelluläre Matrixproteine erkennen. Die Proteine der extrazellulären Matrix wiederum können von mehreren Integrin-Paaren erkannt werden (Ivaska und Heino, 2000). Auch die zytoplasmatischen Domänen der

Integrin-Untereinheiten haben unterschiedliche Sequenzen und können damit an ausgewählte zytoplasmatische Proteine binden. Auf diese Weise können verschiedene Integrin-Untereinheiten unterschiedliche zelluläre Reaktionen als Antwort auf den gleichen extrazellulären Liganden hervorrufen (Hynes, 1992). Bestimmte Integrin-Dimere jedoch können nur an spezielle extrazelluläre Matrixproteine binden, und dies wiederum beeinflusst die Signale, die ins Zytoplasma weitergegeben werden. Je nachdem, welche Signale die Zelle erhält, wird sie sich teilen, differenzieren oder beginnen zu migrieren. Integrine sind also die zentralen Komponenten der Fokalkontakte, da sie eine Brücke zwischen der extrazellulären Matrix außerhalb der Zelle, und dem Zytoskelett in der Zelle bilden (van der Flier und Sonnenberg, 2001).

1.5.1.2. Zytoplasmatische Linkerproteine

Vinculin, Talin, Filamin und α -Actinin sind Proteine, die das Zytoskelett mit den Integrinen verbinden. Die sogenannten Linkerproteine sorgen nicht nur für die Verbindung von Integrinen und Zytoskelett, sondern bilden auch eine Plattform, an die zahlreiche andere Moleküle anbinden können, die in die Signaltransduktionskaskaden der Integrine involviert sind. Im Folgenden sollen Funktion und Aufbau des Linkerproteins Vinculin dargestellt werden. Im inaktiven Zustand ist der Kopfteil des Moleküls an den Schwanzteil intramolekular gebunden. Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) induziert eine Konformationsänderung in Vinculin, die die Kopf-Schwanz-Bindung aufhebt (Gilmore and Burridge, 1996). Daraufhin kann Vinculin mit seinem Kopfteil an Talin und α -Actinin binden. Vinculin besitzt zwei Bindungsstellen für Aktin im Schwanzteil des Moleküls. Außerdem kann Vinculin mit seinem carboxy-terminalen Ende in Lipiddoppelschichten inserieren (Critchley, 2000), was zur Stabilisierung der Lokalisierung an der Membran beitragen könnte. Die Herstellung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ist abhängig vom Protein Rho (siehe unten) und fördert die Rekrutierung von Vinculin an die Membran. Welche Funktion Vinculin innerhalb der Fokalkontakte übernimmt, konnte noch nicht geklärt werden, jedoch gibt es einige denkbare Modelle. Vinculin stabilisiert sowohl die Interaktion zwischen Talin und Aktin, als auch die zwischen Talin und der Lipiddoppelschicht. Talin liegt als antiparalleles Dimer vor und bildet

zwei Vinculin-Bindetaschen, wovon jede drei Vinculinmoleküle, die ein Trimer bilden, binden kann. Talin bindet außerdem direkt an die zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit der Integrine (Abb. 3). Vinculin scheint also eher eine regulierende als eine strukturgebende Funktion innerhalb der Fokalkontakte zu spielen (Critchley, 2000).



1.5.1.3. Rho GTPasen: Regulierung des Aufbaus der Fokalkontakte

Eine wichtige Rolle bei der Bildung und Regulierung von Fokalkontakten spielen die kleinen GTPasen der Rho-Familie, die jedoch nicht physikalisch mit diesen Strukturen assoziiert sind (Michaelson et al., 2001), sondern den Auf- und Abbau des Aktinzytoskeletts als Antwort auf extrazelluläre Signale kontrollieren. Die drei am besten untersuchten Mitglieder dieser Proteinfamilie sind Rho, Rac und Cdc42. Rho GTPasen sind aktiv, wenn sie GTP und inaktiv, wenn sie GDP gebunden haben. In ihrer aktiven Konformation sind sie in der Lage, mit ihren Zielproteinen zu interagieren und damit Signale in der Zelle weiterzuleiten. Der Transfer zwischen diesen beiden Konformationen wird zum einen durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors), die die Freisetzung von GDP fördern und damit die Bindung an GTP und die aktive Konformation ermöglichen und zum anderen durch GAPs (GTPases activating proteins), die die Hydrolyse von GTP stimulieren und damit die

inaktive GDP-gebundene Konformation hervorrufen, reguliert. Rho reguliert die Bildung von Aktin Stress Fasern und die Ausbildung von Fokalkontakten (Ridley und Hall, 1992), Rac sorgt für das 'membrane ruffling' und die Entstehung von Lamellipodien bei der Zellmigration (Ridley et al., 1992), während Cdc42 für die Entstehung von Filopodien zuständig ist (Nobes und Hall, 1995). Lamellipodien sind blattartige Strukturen, die ein Netzwerk an Aktinfilamenten beinhalten. Filopodien sind fingerartige Strukturen, die parallele dünne Bündel aus Aktinfilamenten aufweisen. Der genaue Mechanismus zur Entstehung dieser Strukturen ist noch nicht geklärt, doch wird vermutet, dass es sich um eine Polymerisation und Depolymerisation von Aktin unter der Zellmembran handeln könnte (Theriot, 1997). Beide Strukturen werden am sogenannten 'leading edge' der Zelle gebildet, das in die Richtung weist, in die sich die Zelle bewegt. Dabei können sie schwachen Kontakt zum Substrat ausbilden, sogenannte Fokalkomplexe (im Gegensatz zu Fokalkontakten) (Nobes und Hall, 1995). Die Rho GTPasen wurden vor allem im Zusammenhang mit der Regulierung der verschiedenen Strukturen des Aktinzytoskeletts untersucht (Hall, 1998). Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂), dessen Bildung wiederum von Rho induziert wird (Tapon und Hall, 1997), fördert die Aktin-Polymerisierung (Burrige et al., 1997). Die Rho Proteine sind auch mit dafür verantwortlich, Signale, die im Umfeld der Zelle entstehen, ins Zytoplasma weiterzuleiten. Es konnte direkt gezeigt werden, dass die Adhäsion von Fibroblasten an Fibronectin zur Aktivierung der Proteine Rac und Rho führt (Ren et al., 1999; del Pozo et al., 2000). Damit gibt es eine direkte Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix, den Integrinen und der Familie der kleinen GTPasen. Bei Fibroblasten, die auf Fibronectin wachsen, wurde beobachtet, dass sich in Zellen, die sich dort ausbreiten, zunächst Rac-kontrollierte Lamellipodien und später, wenn die Ausbreitung der Zelle abgeschlossen ist, Rho-kontrollierte Stress Fasern ausbildeten, um die Adhäsion zu verstärken (Barry et al., 1997; Price et al., 1998). Außerdem können die Rho GTPasen Einfluss auf die Organisation der Mikrotubuli nehmen und umgekehrt (Waterman-Storer und Salmon, 1999). Rho, Rac und Cdc42 nehmen auch Einfluss auf das Durchschreiten des Zellzyklus, die Transkription bestimmter Gene und zahlreiche andere Signaltransduktionswege (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997), auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

1.5.1.4 Funktion und Aufbau von Fokalkontakten

Fokalkontakte sind also dazu da, die Umwelt der Zelle wahrzunehmen und dies in intrazelluläre Signale zu übersetzen, die wiederum zu Zellreaktionen führen. Die Signaltransduktionskaskaden haben ihren Ursprung auf der zytoplasmatischen Seite der Fokalkontakte, an der sich auch eine Vielzahl an Linkerproteinen und Signaltransduktionsproteinen befinden, die miteinander verbunden sind oder interagieren können. Allein Vinculin kann an mindestens zehn andere Komponenten der Fokalkontakte binden, welche zum Teil wiederum andere Bindungspartner haben, woraus sich die Komplexität der Molekülinteraktionen auf der zytoplasmatischen Seite erahnen lässt (Geiger and Bershadsky, 2001). Hier finden auch Protein-Phosphorylierungen statt, die zur Aktivierung von Proteinen, die Teil des Komplexes sind, wie zum Beispiel FAK (focal adhesion kinase) oder Paxillin führen. Dies führt zur weiteren Rekrutierung und Aktivierung von Signaltransduktionsproteinen, die dann diverse Zellreaktionen in Gang setzen können (Parsons et al., 2000). Die Kontraktilität der Stress Fasern, die aus der Assoziation mit den Myosinfilamenten resultiert, reguliert die Entstehung von Fokalkontakten (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Rho kontrolliert diese Kontraktilität der Stress Fasern, indem es für die Phosphorylierung und damit Aktivierung der MLC (myosin light chain) sorgt (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996; Kaibuchi et al., 1999; Amano et al., 2000; Totsukawa et al., 2000), was letztendlich zur Erzeugung von Spannung und Kraft führt. Wenn Zellen in Bewegung sind, bilden sie an ihren Lamellipodien Kontakte zum Substrat aus. Die Aktivität der GTPase Rac induziert die Bildung von sogenannten Fokalkomplexen, die aber noch keine Fokalkontakte sind. Diese Fokalkomplexe können aber dann mit Hilfe der GTPase Rho zu Fokalkontakten mit assoziierten Stress Fasern reifen (Rottner et al., 1999), die Zelle wird dadurch weniger mobil aber adhäsiver. Rho ist also für die Kontraktilität in nicht-Muskel-Zellen verantwortlich. Diese Kontraktilität führt gemeinsam mit der Adhäsion am Substrat zur Bildung von Fokalkontakten und Stress Fasern (Burridge et al., 1997). Man stellt sich die Bildung von Fokalkontakten wie folgt vor: Im Ausgangszustand adhären Zellen über Integrine am Substrat. Die Integrine sind jedoch nicht geklustert, aber mit den Aktinfilamenten, die nicht unter

Spannung stehen, verbunden. Die Aktivierung von Rho führt zur Aktivierung von Myosin und zur Bildung von Myosinfilamenten (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Dadurch wird die Kraft, die auf die Aktinfilamente wirkt, erheblich verstärkt. Die Aktinfilamente werden gebündelt, was zur anschließenden Klusterung der Integrine, die mit ihnen verbunden sind, führt. Es sind Fokalkontakte und Stress Fasern entstanden (Burridge et al., 1997). Alles zusammen betrachtet, ergibt sich ein spannendes Szenario, in das die Zelle als Ganzes, ihre Kontakte zur extrazellulären Matrix, die einzelnen Komponenten der Fokalkontakte und die kleinen Signaltransduktionsmoleküle, die durch ihre Interaktionen mit anderen Proteinen den Aufbau dieser komplexen Strukturen regulieren, involviert sind (Schoenwaelder und Burridge, 1999). Dieses genau regulierte und lokal kompartimentierte Zusammenspiel von Zytoskelett, Adhäsionsmolekülen und Signaltransduktionsmolekülen ermöglicht eine flexible Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Stimuli. Es stellt die Basis für die Anheftung und Orientierung der Zellen an den mikrostrukturierten Substraten dar, die unter anderem in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.5.2. Ein wichtiger Aspekt der Wundheilung: Zellmigration

Bei der Platzierung eines dentalen Implantats wird das umgebende Gewebe verletzt. Darauf reagieren die Zellen der umliegenden Gewebe mit einem Prozess, der als Wundheilung bezeichnet wird (Melcher, 1988). Ein wichtiger Aspekt der Wundheilung ist die Zellmigration, bei der Zellen in die entstandene Gewebslücke einwachsen, um wieder intaktes Gewebe herzustellen. Die Zellmigration ist ein dynamischer Prozess, der regulierte Veränderungen des Zytoskeletts, der Adhäsionskontakte und der extrazellulären Matrix beinhaltet. Verschieden Zelltypen zeigen unterschiedliches Migrationsverhalten. So wandern Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und neuronale Zellen als Einzelzellen, während epitheliale und endotheliale Zellen als Zellverband migrieren. Die Familie der Rho GTPasen spielt auch bei der Koordination der Zellmigration eine wichtige Rolle (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997; Nobes and Hall, 1999). Die Zellmigration besteht aus vier verschiedenen Mechanismen: Verlängerung der Lamellipodien, Bildung neuer Adhäsionskontakte, Kontraktion des Zellkörpers und Ablösen des hinteren Zellendes (Lauffenburger und

Horwitz, 1996). In langsam migrierenden Zellen, wie zum Beispiel den Fibroblasten, können aus Fokalkomplexen an den Lamellipodien durch die Aktivität der kleinen GTPase Rho Fokalkontakte werden (Rottner et al., 1999, siehe 1.5.1.4.). Ein hoher Gehalt an aktiviertem Rho und eine starke Adhäsion am Substrat, vermittelt durch Integrine, wirken demnach hemmend auf die Zellmigration und fördern die Zelladhäsion (Cox et al., 2001). Die Zelle hört also auf zu migrieren, wenn die Adhäsion sehr stark wird, da das Substrat (die extrazelluläre Matrixkomponente) besonders hoch konzentriert ist oder die Umgebung für die Zelle günstig ist. Die Kontraktion des Zellkörpers wiederum hängt von der Kontraktion des Aktomyosins ab (Mitchison und Cramer, 1996). Rho beeinflusst die Phosphorylierung und Aktivierung der MLC (myosin light chain) (Amano et al., 2000; Zusammenfassung in Kaibuchi et al., 1999) und hat damit zwei gegensätzliche Effekte auf das Zellverhalten. Eine Reduzierung der Rho Aktivität bedeutet zum einen geringere Adhäsion und verstärkte Migration, zum anderen verringert es die Migration durch verminderte Zellkontraktion (Ridley, 2001). Für das Ablösen und Nachziehen des hinteren Endes der Zelle scheinen auch die Mikrotubuli notwendig zu sein (Ballestrem et al., 2000), was mit der Tatsache im Einklang steht, dass diese in langsam wandernden Zellen auf Fokaladhäsionen zuwachsen und deren Turnover induzieren können (Kaverina et al., 1999; Kaverina et al., 2000). Dabei konnte gezeigt werden, dass Rho für die Stabilisierung der Mikrotubuli zuständig war (Gundersen und Cook, 1999) und dass das Zerfallen der Mikrotubuli zu einer Rho-Aktivierung führt, was mit einer Vergrößerung der Fokalkontakte und Phosphorylierung der focal adhesion kinase FAK einhergeht (Bershadsky et al., 1996). Es existiert also eine reziproke Beziehung zwischen Fokalkontakten und den Mikrotubuli. Der Zerfall der Mikrotubuli führt zur Aktivierung von Rho, erhöhter Aktin-Myosin-Kontraktilität und stabilen Fokalkontakten (Sastry and Burridge, 2000), umgekehrt können Mikrotubuli auf Fokalkontakte zuwachsen und den Zerfall dieser Strukturen induzieren (Kaverina et al., 1999). Diese Kombination aus dynamischen Mikrotubuli zusammen mit mechanosensitiven Fokalkontakten bildet ein vielseitiges und anpassungsfähiges System, das die Orientierung der Stress Fasern, die Polarisierung der Zellform und die gerichtete Zellmigration kontrollieren kann (Small et al., 1999). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Rho GTPasen viele Vorgänge der

Zellmigration regulieren und koordinieren und dabei Einfluss auf die verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts und der Zelladhäsion haben. Die Signalketten und zugehörigen Signaltransduktionsproteine variieren jedoch je nach Zelltyp, äußeren Umständen und Zusammenhängen (Ridley, 2001), was die Übertragbarkeit zwischen einzelnen Systemen und die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchsbedingungen schwierig macht.

1.6. Gestaltung der freien Oberfläche der adhärierenden Zellen: Mikrovilli und Filopodien

Plasmamembranen können in zwei Regionen unterteilt werden. Eine Region, in der die Zelladhäsion stattfindet, sich also Integrin-vermittelte Fokaladhäsionen oder Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte befinden und eine Region, in der die Oberfläche frei und nicht gebunden ist. Die Oberfläche der freien Region wird durch verschiedene zelluläre Ausstülpungen charakterisiert, wie zum Beispiel Mikrovilli, Filopodien und Lamellipodien (Bretscher, 1991; Condeelis, 1993; Mitchison and Cramer, 1996). Das Aktinzytoskelett ist wichtig für beide Regionen. Filopodien erstrecken sich von der Zelle aus in deren Umgebung und können so Veränderungen, zum Beispiel in extrazellulären Signalen, feststellen und diese Information ins Zellinnere weitergeben. Ein anderes Mitglied der Familie der Rho GTPasen, Cdc42, reguliert die Ausbildung von Filopodien, indem es die Aktinpolymerisation initiiert, die für die Entstehung der Filopodien notwendig ist (Nobes und Hall, 1995).

1.7. Die ERM-Proteinfamilie

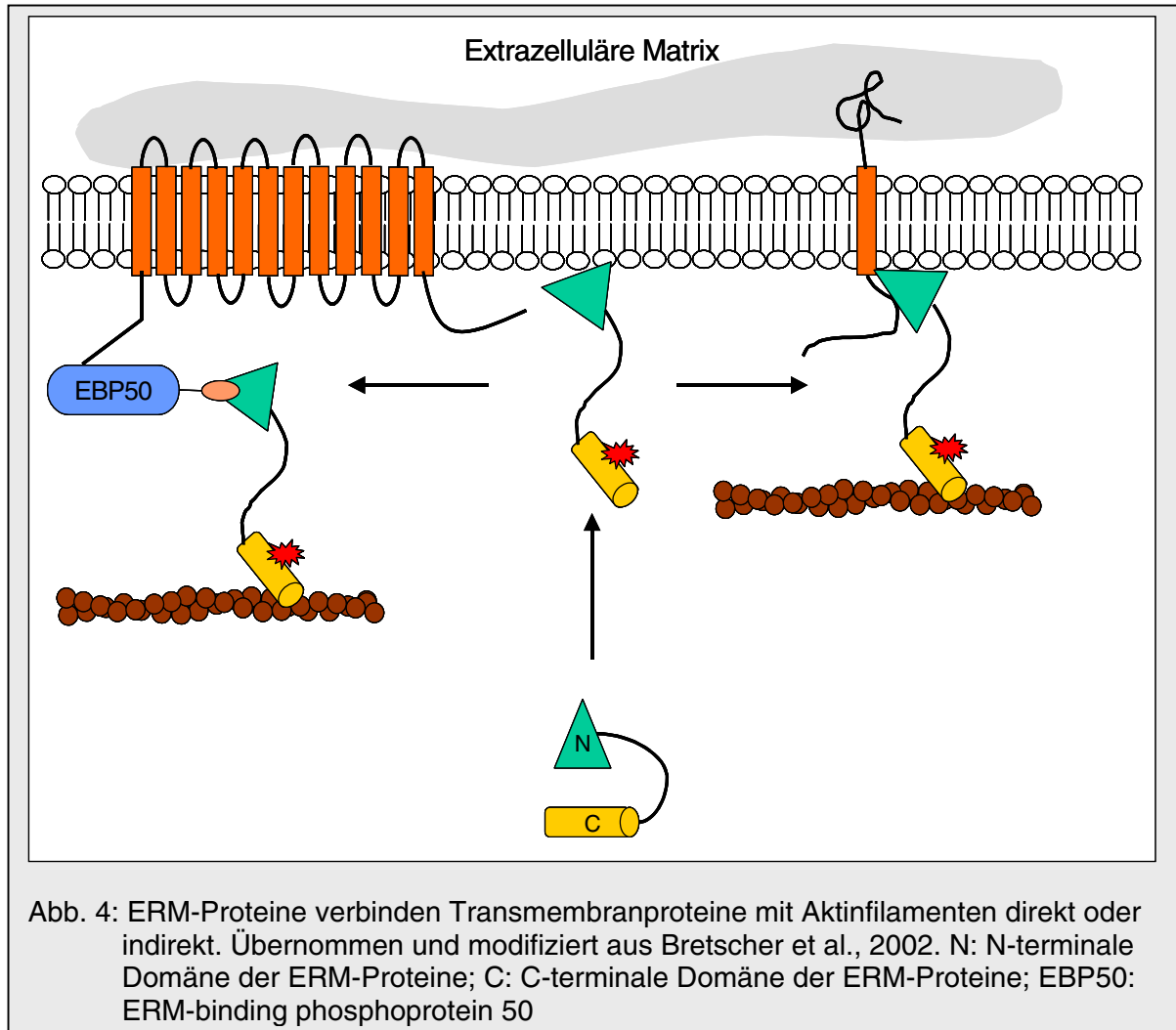
Die drei Proteine der ERM-Familie, Ezrin, Radixin und Moesin sind wichtige Komponenten in mikrovilliartigen Strukturen, also apikalen Membranausstülpungen in polarisierten Epithelzellen, Fibroblasten und Lymphozyten (Bretscher, 1983; Pakkanen et al., 1987; Lankes and Furthmayer, 1991; Franck et al., 1993). Sie gehören zur 4.1-Superfamilie, sind in speziellen Regionen der Zellmembran lokalisiert, an denen Aktinfilamente mit der Plasmamembran assoziiert sind und agieren als Verbindungsstück zwischen Membran und Filamenten (Tsukita et al., 1989; Sato et al., 1992; Bretscher et al., 1997; Tsukita and Yonemura, 1999).

1.7.1. Funktion der ERM-Proteine

Die amino-terminale Domäne der ERM-Proteine wird auch FERM Domäne genannt, was für 4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin Homologiedomäne steht (Chishti et al., 1998). Mit ihrer amino-terminalen Domäne binden die ERM-Proteine an die zytoplasmatische Domäne von Membranrezeptoren, wie zum Beispiel CD43, CD44, ICAM-1, -2 und -3 (Algrain et al., 1993; Yonemura et al., 1993; Tsukita et al., 1994; Hirao et al., 1996; Serrador et al., 1997; Heiska et al., 1998; Yonemura et al., 1998). Mit ihrer carboxy-terminalen Domäne binden sie an Aktinfilamente (Algrain et al., 1993; Turunen et al., 1994). Die Koexistenz einer Bindedomäne für die Membranproteine und einer Bindedomäne für Aktinfilamente innerhalb eines Moleküls befähigt die ERM-Proteine als Verbindung zwischen diesen beiden Strukturen zu funktionieren (Abb. 4). Die amino-terminale und die carboxy-terminale Domäne des Proteins können intramolekular aneinander binden und damit die Interaktion mit Zellmembran und Aktinzytoskelett unterbinden. Das Protein ist dann inaktiv und im Zytoplasma gelöst. Wenn die ERM-Proteine aktiviert werden, öffnet sich diese Verbindung und sie können vom Zytoplasma an die Zellmembran gelangen, um die Aktinfilamente dort zu verankern (Bretscher et al., 1995; Gary and Bretscher, 1995; Hirao et al., 1996; Matsui et al., 1998). Das inaktive ERM-Protein besitzt eine kompakte globuläre Struktur, während das aktivierte Protein eine längliche Struktur aufweist, bei der die beiden globulären Enden durch eine dünne, filamentartige Region verbunden sind (Ishikawa et al., 2001). ERM-Proteine, die an einem Threonin am carboxy-terminalen Ende phosphoryliert wurden (CPERM: C-terminal threonine-phosphorylated ERM proteins), repräsentieren die aktive Form dieser Proteine in vivo und sind ausschließlich an der Membran lokalisiert (Hayashi et al., 1999, Yonemura et al., 2002). Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, ob diese Phosphorylierung wirklich für die Aktivierung notwendig ist oder lediglich der Stabilisierung der aktiven Form dient, denn dadurch wird die Bindung des amino-terminalen an das carboxy-terminale Ende des Proteins verhindert (Matsui et al., 1998). Möglicherweise gibt es noch einen anderen Stabilisierungsmechanismus für die ERM-Proteine als die Phosphorylierung. Ein bereits in den vorhergehenden Abschnitten aufgetauchtes Molekül, PtdIns(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol (4,5)-

Bisphosphat), welches die ERM-Proteine am amino-terminalen Ende bindet (Niggli et al., 1995; Hirao et al., 1996), ist für ihre Aktivierung und Lokalisierung an der Membran in den Mikrovilli-Strukturen zuständig (Barret et al., 2000; Yonemura et al., 2002). Die aktivierten ERM-Proteine, die am carboxy-terminalen Ende phosphoryliert sind, sind zusammen mit den Membranproteinen, an die sie binden, an der Ausbildung und Organisation von Mikrovilli beteiligt (Yonemura et al., 1999). Die Phosphorylierung der ERM-Proteine am carboxy-terminalen Ende, von Ezrin am Threonin der Position 567, von Radixin am Threonin der Position 564 und von Moesin am Threonin der Position 558, wird interessanterweise durch ein Zielprotein von Rho (Rho-kinase) *in vitro* und *in vivo* erreicht (Matsui et al., 1998; Fukata et al., 1998; Oshiro et al., 1998). Die GTPase Rho reguliert möglicherweise auch die Bildung des Komplexes zwischen ERM-Proteinen und CD44 (Hirao et al., 1996). Die ERM-Proteine können umgekehrt aber auch als Rho GDFs (Rho GDI dissociation factors) agieren und damit Rho aktivieren, indem die Abspaltung von GDP und die Anlagerung von GTP gefördert wird (Takahashi et al., 1997). Rho ist also an der Aktivierung der ERM-Proteine beteiligt und umgekehrt können die ERM-Proteine die Aktivität von Rho regulieren. Daraus ergibt sich die Möglichkeit eines positiven Feedback-Systems (Bretscher, 1999; Mangeat et al., 1999, Tsukita and Yonemura, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Proteine der ERM-Familie wichtig für die von Rac und Rho induzierten Veränderungen im Aktinzytoskelett bei Fibroblasten sind (Shaw et al., 1998), und im speziellen Moesin eine Rolle bei der Bildung der von Rho induzierten Stress Fasern und Fokalkontakten spielt (Mackay et al., 1997). ERM-Proteine konnten allerdings nicht in den Fokalkontakten detektiert werden, sie sind an der Bildung dieser Strukturen höchstens über die Aktivierung von Rho beteiligt und nicht im Komplex verankert (Denker et al., 2000). Die Aktivierung von Rho umgekehrt führt nicht nur zur Bildung von CPERMs, sondern auch zur nachfolgenden Bildung von Mikrovilli und einer Akkumulation von ERM-Proteinen in diesen Strukturen (Shaw et al., 1998; Matsui et al., 1999). Dabei scheint die von Rho induzierte Bildung von PtdIns(4,5)P₂ direkt die ERM Proteine zu aktivieren, indem es ihre intramolekulare Bindung verhindert. Diese werden dann durch Phosphorylierung am carboxy-terminalen Ende stabilisiert (Matsui et al., 1999). Die Aktivierung von

Rho führt also zu einer Aktivierung der ERM-Proteine im Zytoplasma und ihrer Rekrutierung an der Zellmembran, wo sie dann Mikrovilli ausbilden können.



Außerdem können ERM-Proteine auch indirekt an Membranproteine über Verbindungsproteine wie EBP50/NHE-RF und E3KARP binden (Abb. 4). Diese wiederum können zahlreiche unterschiedliche Membranproteine binden und somit an das Aktinzytoskelett koppeln, woraus sich neue Funktionen für die ERM-Proteine ergeben, die allerdings noch nicht geklärt sind (Bretscher et al., 2002). ERM Proteine binden auch an NHE1, einen Ionenaustauscher, und funktionieren auch in diesem Fall als Verankerung für das Aktinzytoskelett. Diese Verbindung wird ebenfalls von Rho und seinen Kinasen reguliert. Dabei sind weder ERM noch NHE1 an Zell-Substrat-Komplexen lokalisiert, wohl aber in Lamellipodien. Die Funktion dieses speziellen Komplexes könnte mit der Regulierung osmotischer oder pH-abhängiger

Prozesse in Zusammenhang mit dem Aktinzytoskelett zu tun haben (Denker et al., 2000).

Die aktuelle Forschung über die ERM-Proteine befasst sich nun mit der Untersuchung der detaillierten Mechanismen, durch die ERM-Proteine auf Regulierung des Zytoskeletts, Ausbildung von Membranausstülpungen und Entstehung von Adhäsion Einfluss nehmen. Außerdem werden immer neue Funktionen der ERM Proteine gefunden. Es konnten einige konkrete Vorgänge in der Zelle ausgemacht werden, für die die ERM-Proteine von großer Bedeutung sind. So scheint die Interaktion von Ezrin mit dem CD44-Rezeptor für die gerichtete Bewegung der Zelle notwendig zu sein (Legg et al., 2002). Phosphoryliertes Ezrin induziert über die Aktivierung der GTPase Rac auch morphologische Veränderungen in Epithelzellen und beeinflusst auch die Regulierung der Cadherin-abhängigen Zell-Zell-Kontakte (Pujuguet et al., 2003). Die Kristallstrukturen der aktiven und inaktiven ERM-Proteine sind bisher nicht bekannt gewesen und konnten in den letzten Jahren erst aufgelöst werden. Anhand dieser Strukturen kann nun geklärt werden, wie die Proteine aktiviert werden, welche Regionen des Proteins dabei strukturell verändert werden und mit welchen Komponenten diese Regionen interagieren können (Smith et al., 2003). Es ist auch noch nicht genau verstanden, wie die ERM-Proteine und Linkerproteine im Allgemeinen, die Adhäsionsmoleküle, an die sie binden, erkennen und die Bindung an sie aufrecht erhalten können. Vor kurzem erst konnte über die Erstellung der Kristallstruktur des Komplexes geklärt werden, wie die Verbindung von Radixin mit ICAM-2 zustande kommt und welche Domänen und Interaktionen an dieser hoch affinen und sehr spezifischen Verbindung beteiligt sind (Hamada et al., 2003).

1.7.2. Vorkommen der ERM-Proteine

In den meisten Zellkulturen, zum Beispiel Fibroblasten oder Epithelzellen, sind alle drei ERM-Proteine exprimiert und kolokalisiert, doch scheint ihr Verteilungsmuster in Organen Zelltyp-spezifisch reguliert zu sein (Berryman et al., 1993). Auch ist es gut möglich, dass sie sich wegen ihrer homologen Gensequenzen gegenseitig ersetzen können (Bretscher et al., 2002). So stellte es sich völlig unerwartet heraus, dass eine Moesin knockout-Maus keinerlei Defekte oder Abnormalitäten in ihrer Entwicklung

oder ihren Organen aufzeigte und auch keine erhöhte Expression von Ezrin und Radixin zur Kompensation des Fehlens von Moesin aufwies (Doi et al., 1999). In Zellkulturen kommen die ERM-Proteine in verschiedenen Zelloberflächenstrukturen vor, die mit Aktinfilamenten assoziiert sind, wie Mikrovilli, Filopodien, Uropoden, 'ruffling membranes' und Adhäsionspunkte. Die Verhinderung ihrer Expression in diesen Kulturen führt zu einem Verlust von Mikrovilli, Zell-Zell und Zell-Substrat Kontakten (Takeuchi et al., 1994; Tsukita and Yonemura, 1999). Die Fähigkeit der ERM-Proteine mit Transmembranproteinen, PDZ-Domänen von Proteinen und dem Zytoskelett auf streng regulierte Weise zu interagieren deutet darauf hin, dass diese Proteine eine Rolle bei der Organisation von Signalkomplexen haben und damit daran beteiligt sind, das Zytoskelett, Membran-Protein-Interaktionen und Membrantransport zu regulieren und zu kontrollieren (Bretscher et al., 2002). Die drei ERM-Proteine und die Membranproteine, an die sie binden, haben zum Teil überlappende oder austauschbare Funktionen, sie stellen aber auch eine Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten zur Verfügung, die je nach zellulären und physiologischen Bedingungen genutzt werden können.

1.8. Analogien zwischen Fokalkontakten und den ERM-Proteinen

Es ist nicht zu übersehen, dass es zwischen den Komponenten der Fokalkontakte und den Strukturen, in denen die Protein der ERM-Familie zu finden sind, gewisse Analogien gibt. In beiden Fällen handelt es sich um Komplexe aus Transmembranrezeptoren, Linkerproteinen und Aktinfilamenten. Das Protein Vinculin sowie die ERM-Proteine sind im inaktiven Zustand intramolekular gebunden und werden durch Mitwirken von PtdIns(4,5)P₂ aktiviert, wodurch sich diese Bindung löst, das Molekül sich entfaltet und seine Funktion als Linker zwischen zytoplasmatischer Domäne des Membranrezeptors und Aktinfilamenten aufnehmen kann. Außerdem sind die Mitglieder der Familie der Rho GTPasen in beiden Fällen an der Regulierung des Aufbaus und der Erhaltung der Strukturen beteiligt. Zwar handelt es sich bei Fokalkontakten um die feste Verbindung der Zellmembran mit dem Substrat und bei den Strukturen mit ERM-Proteinen um Membranausstülpungen, die nicht oder nur leicht an das Substrat gebunden sind. Jedoch scheinen beide Strukturen für die Zelle von großer Bedeutung zu sein, wenn es darum geht, die Umgebung und das

Substrat wahrzunehmen und sich daran festzusetzen. Die Untersuchung beider Strukturen ist von großem Interesse in der vorliegenden Arbeit. Die Zusammensetzung und Regulierung solcher Membranstrukturen ist in letzter Zeit von vielen Forschergruppen intensiv untersucht worden und es stellt sich immer mehr heraus, dass diese weitaus komplexer sind als man das zuerst vermutet hat (Ridley, 2000; Bretscher et al., 2002). Die Signaltransduktionskaskaden innerhalb einer Zelle, die Veränderungen im Aktinzytoskelett kontrollieren und schließlich zur Ausbildung von Membranstrukturen führen, sind nicht nur äußerst komplex, sondern auch miteinander verworren. Man ist demnach noch weit davon entfernt, die einzelnen Wege und Antworten auf bestimmte Signale zu verstehen. In dieser Arbeit jedoch wurden nicht die Moleküle der Signaltransduktionsketten selbst untersucht, der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Ausbildung der beschriebenen Membranstrukturen.

1.9. Ziele dieser Arbeit

Betrachtet man nun das hier vorgestellte Modellsystem, findet man gleich mehrere interessante Aspekte des Zellverhaltens, die hier von Bedeutung sind und die in den unterschiedlichsten Zusammenhängen auch schon untersucht worden sind: Die Orientierung von Zellen an der Oberflächentopographie, die Zellmigration und Wundheilung, die Adhäsion am Substrat, die Regulierung dieser Adhäsion und schließlich die Ausbildung von Zelloberflächenstrukturen. Man hat es also nicht nur mit einer bestimmten Zellreaktion zu tun, sondern mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Zellantworten aus verschiedenen Bereichen der Zellbiologie, von der makroskopisch bereits erkennbaren Orientierung, über die Bildung spezieller Adhäsionskomplexe, bis hin zur Signaltransduktion auf molekularer Ebene. Diese unterschiedlichen Aspekte spielen am Ende eine wichtige Rolle für die medizinische Applikation von Implantaten. Ihre Untersuchung trägt dazu bei, das Zellverhalten besser zu verstehen. Die Darstellung einiger Komponenten der Zelladhäsion und Zellmigration gibt einen Einblick in ein spannendes und hochkomplexes System, das die Anpassung auf verschiedensten Wachstumssubstraten ermöglicht und damit eine Grundlage für die Akzeptanz und Einheilung eines Implantats bildet. Dieses

komplexe System ist noch lange nicht bis ins Detail verstanden und daher auch Gegenstand intensiver Forschung.

Das Ziel dieser Arbeit war die genaue Untersuchung der Grenzfläche zwischen Titanoberfläche und dem Biosystem, also den adhärierenden Zellen. Im Mittelpunkt standen dabei mikrostrukturierte Oberflächen, da diese sich zum einen als besonders geeignet für die Beobachtung des Adhäsionsverhaltens von Zellen erwiesen haben und es sich zum anderen auch schon herausgestellt hat, dass sich Zellen auf strukturierten Oberflächen besser anheften als auf glatten. Im ersten Teil der Arbeit wird vor allem die Verteilung von Fokalkontakten auf den Rillenstrukturen näher beleuchtet, dabei steht die Methode der Elektronenmikroskopie im Vordergrund. Im zweiten Teil der Arbeit ist die freie Oberfläche der adhärerten Zellen und besonders die Expression und Verteilung der ERM-Proteine untersucht worden, hierbei wird vor allem die Methode der Fluoreszenzmarkierung und Laser-Scan-Mikroskopie eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden nun folgende Fragestellungen betrachtet:

- 1.) Kann durch das Hinzufügen von Mikrostrukturen und damit der Veränderung der Topographie die Adhäsion der Zellen verbessert und die Ausbildung und Ausrichtung von Fokalkontakten gesteuert werden?
- 2.) Welche Rillengeometrie ist dabei am besten geeignet?
- 3.) Kann das System der ERM-Proteine und die damit verbundene Ausbildung von Oberflächenstrukturen auf der Zelle durch das Hinzufügen des Rillenmusters oder 'groove-ridge-design' gezielt aktiviert werden?

2. Material und Methoden

2.1. Zell-Kultur

Fibroblasten-Primärkulturen aus der humanen Gingiva (Labor Dr. Glatthaar, Reutlingen) wurden in T75 Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) und Kulturmedium kultiviert und bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank inkubiert (Hera Cell von Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau). Die Aussaat der Zellen für die Versuche erfolgte unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer 1%igen EDTA-Lösung und des Enzyms Accutase (PAA Laboratories GmbH, Cölbe). Dabei wurden die Zellen aus den Kulturflaschen abgelöst und auf den dafür vorgesehenen Plättchen (siehe unten) oder in Kulturschalen (35mm Gewebekulturschalen von Falcon, Becton Dickinson, Vertrieb Schubert & Weiss GmbH, München) ausgesät (Abb. 5). Vor der Aussaat wurden die Plättchen (siehe unten) mit Dentalwachs in 24 Well Schalen (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY) angeklebt, danach 30min mit 70% (v/v) Ethanol inkubiert und für 30-45min unter UV-Bestrahlung sterilisiert. Anschließend wurden die Plättchen über Nacht mit Kulturmedium inkubiert. Dieser Inkubationsschritt erleichtert die Anheftung der

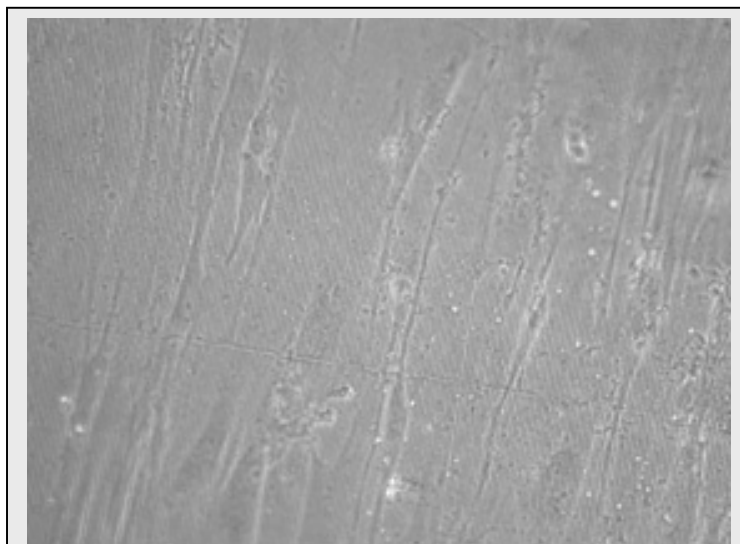


Abb. 5: Humane Gingiva Fibroblasten die auf einer titanisierten Aralditreplika wachsen. Die Rillenbreite beträgt 2µm, die Rillentiefe beträgt 0,4µm.

Primärkulturen auf den Plättchen, durch Anheftung von Proteinen auf der Oberfläche der Plättchen (vgl. Meyle et al., 1993a, b). Je nach Anwendung wurden die Zellen in unterschiedlicher Dichte auf den Plättchen ausgesät und mehrere Tage darauf belassen, dabei wurde regelmäßig frisches Medium zugegeben. Für elektronenmikroskopische Anwendungen war es erforderlich, die Zellen in hoher Dichte auszusäen, für immunhistochemische Anwendungen wurden die Zellen in geringerer Dichte ausgesät.

Puffer und Reagenzien:

- ⇒ Kulturmedium: 10% (v/v) Serum (Fötale Bovines Serum, Biochrom, Berlin), 2mM Glutamin (Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 0,01% (w/v) Gentamicin (Gibco) und 1mM Natriumpyruvat (Gibco) in DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium, High Glucose, Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) oder MEM (Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen, Gibco)
- ⇒ EDTA-Lösung: 1% (w/v) EDTA (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach) in PBS für Percoll
- ⇒ PBS für Percoll: 140mM NaCl, 0,4mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 10mM KH₂PO₄, pH 7,2

2.2. Plättchen

Mikrostrukturierte Siliziumwafer wurden im Institut für Angewandte Physik, Arbeitsgruppe Prof. Kern, hergestellt und uns zur Verfügung gestellt. Die Rillenmuster in den Plättchen wurden durch optische Lithographie und ein anschließendes Ätzverfahren erzeugt. Dabei entstanden Muster, die eine Rillenbreite zwischen 0,5 µm und 20 µm und eine Rillentiefe zwischen 0,2 µm und 3 µm aufweisen (Abb. 6). Die Strukturen wurden dann direkt mit einer ca. 50 nm dicken Titanschicht besputtert. Die titanisierten Siliziumplättchen wurden für die immunhistochemischen Anfärbungen direkt mit Zellen besät. Für die elektronenmikroskopische Betrachtung der Fibroblasten auf den verschiedenen Strukturen war es erforderlich, Aralditreplicas von den Siliziumplättchen herzustellen. Hierzu wurde vom Siliziumoriginal zunächst ein Abdruck in Silicon, und davon anschließend ein Abdruck in Araldit hergestellt. Der Aralditabdruck wurde wiederum

mit einer ca. 50nm dicken Titanschicht besputtert. Auf diesen Replikas wurden dann wie oben beschrieben die Zellen ausgesät.

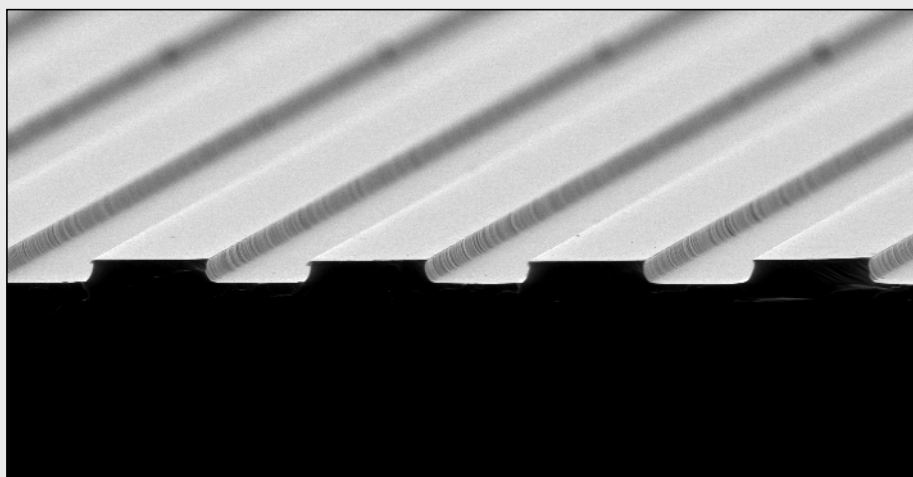


Abb.6: Bild eines Siliziumwafers mit einer Rillenbreite von 10 μm und einer Rillentiefe von 2 μm , und einer Titanschicht von 100 nm.

Reagenzien:

⇒ Silicon: 10% (w/w) Sylgard 184 curing agent, 90% (w/w) Sylgard 184 elastomer

⇒ Araldit: 46,5% (w/w) Araldit CY212 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg),
50,7% (w/w) Araldit Härter HY964 (Serva), 2,8% (w/w) Araldit Beschleuniger
DY964 (Serva)

2.3. Immunhistochemische Methoden

Die auf den titanisierten Siliziumplättchen kultivierten humanen Gingiva-Fibroblasten wurden 10 Minuten mit 1% Paraformaldehyd in HMSS-Puffer bei Raumtemperatur oder alternativ für 10 Minuten mit -20°C kaltem MeOH ebenfalls bei Raumtemperatur fixiert. Die Proben wurden danach 10 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen, 30 Minuten mit Blockpufferpuffer behandelt und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur, bzw. über Nacht bei 4°C mit dem im Blockpuffer verdünnten Primärantikörper inkubiert. Bei den Kontrollen wurden jeweils die Primärantikörper ausgelassen. Vor Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde 3 x 10 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Die Cytochrom-konjugierten Sekundärantikörper oder der F-Aktin markierende Farbstoff Phalloidin wurden ebenfalls in Blockpuffer verdünnt und

die Proben damit 45 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 10 Minuten mit TBS) wurden die Proben für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd in HMSS-Puffer postfixiert, wiederum 2 x 10 Minuten mit TBS gewaschen und bei Bedarf noch mit dem Kernfarbstoff YOPRO für weitere 10 Minuten inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift mit TBS wurden die Proben in 90% Glycerol (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) in TBS eingedeckt. Die Auswertung der Proben erfolgte an einem Laser Scan Mikroskop (LSM 410 invert, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena). Dabei wurden konfokale Bilder aufgenommen, die anschließend mit Adobe Photoshop 5.5 bearbeitet wurden.

Puffer und Reagenzien:

- ⇒ HMSS-Puffer: 137mM NaCl, 5,4mM KCl, 5,5mM Glukose (Merck, VWR International GmbH, Darmstadt), 0,04mM Phenolrot (Merck), 100mM HEPES (ICN), 1mM CaCl, 1mM MgCl₂, pH 7,4
- ⇒ 4% Paraformaldehyd-Lösung: A: 8% (w/v) Paraformaldehyd (Merck) in Aqua dest erhitzen, 1N NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird und dann abkühlen lassen, B: 2x konz. HMSS-Puffer, Lösung A und B 1:1 mischen und mit 1N HCL auf pH 7,4 einstellen
- ⇒ 1% Paraformaldehyd-Lösung: wie oben, nur mit 2%iger Paraformaldehyd-Lösung beginnen
- ⇒ TBS-Puffer: 50mM Trizma Base (Sigma-Aldrich Firmengruppe, Taufkirchen), 150mM NaCl, 1mM CaCl₂*2H₂O, pH 7,4
- ⇒ Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver (Merck), 0,3% (v/v) Triton X (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), 0,04% (w/v) NaN₃ (Sigma) in TBS, pH 7,4
- ⇒ Kernfarbstoff: YO-PRO[®]-1 iodide (491/509), Verdünnungsansatz 1:1000 in TBS (Mo Bi Tec, Molecular Biologische Technologie, Göttingen)
- ⇒ Phalloidin, TRITC-konjugiert, Verdünnungsansatz 1:80 in Blockpuffer (Sigma)

Antikörper:

- ⇒ anti-Ezrin, monoclonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:100 (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
- ⇒ anti-Fibronectin, polyclonal, gezogen im Kaninchen, Verdünnungsansatz 1:1000 (DAKO Cytomation GmbH, Hamburg)

-
- ⇒ anti-Fibronectin, polyclonal, gezogen im Schaf, FITC-konjugiert, Verdünnungsansatz 1:400 (Bio Trend Chemikalien GmbH, Köln)
 - ⇒ anti-Integrin $\alpha V\beta 3$, monoclonal, gezogen in der Maus, Verdünnungseinsatz 1:100 (Chemicon International, Hofheim/Ts)
 - ⇒ anti-Moesin, monoclonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:100 (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)
 - ⇒ anti-Radixin, polyclonal, gezogen in der Ziege, Verdünnungsansatz 1:25 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg)
 - ⇒ anti-Vimentin, monoclonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg)
 - ⇒ anti-Vinculin, monoclonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:100 (Chemicon International, Hofheim/Ts)
 - ⇒ Ziege anti-Maus, konjugiert mit Cy2 (Dianova GmbH, Hamburg)
 - ⇒ Ziege anti-Kaninchen, konjugiert mit Alexa Fluor 488 (Mo Bi Tec)
 - ⇒ Ziege anti-Maus, konjugiert mit Cy3 (Dianova)
 - ⇒ Ziege anti-Kaninchen, konjugiert mit Cy3 (Dianova)
 - ⇒ Ziege anti-Maus, konjugiert mit Cy5 (Dianova)
 - ⇒ Ziege anti-Kaninchen, konjugiert mit Cy5 (Dianova)
 - ⇒ Esel anti-Maus, konjugiert mit FITC (Dianova)
 - ⇒ Esel anti-Kaninchen, konjugiert mit Cy2 (Dianova)
 - ⇒ Esel anti-Ziege, konjugiert mit Cy2 (Dianova)
 - ⇒ Esel anti-Maus, konjugiert mit Cy3 (Dianova)
 - ⇒ Esel anti-Ziege, konjugiert mit Cy3 (Dianova)
 - ⇒ Esel anti-Maus, konjugiert mit Cy5 (Dianova)
 - ⇒ Esel anti-Kaninchen, konjugiert mit Cy5 (Dianova)

2.4. Araldit-Einbettung

Für die konventionellen elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Proben wurde das komplette Plättchen mit den darauf befindlichen Zellen mit 2,5% Glutaraldehyd in HMSS-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Proben

wurden danach 2 x 15 Minuten lang mit Cacodylat-Puffer gespült, mit 1% Osmiumtetroxid 1 Stunde lang nachfixiert und kontrastiert, wieder 2 x 15 Minuten mit Cacodylat-Puffer gewaschen und dann alternativ 15 Minuten mit 1% Tanninsäure bei Raumtemperatur zur Kontrastverstärkung behandelt und anschließend noch einmal in Cacodylat-Puffer gewaschen. Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (15 min 30%, 15 min 50%, über Nacht 70%, 30 min 80%, 30 min 96%, 3 x 30 min 100% Ethanol) entwässert. Im Verlauf dieser Dehydrierung erfolgte ein weiterer Kontrastierungsschritt mit 2% Uranylacetat in 70% Ethanol über Nacht. Für die Infiltration mit dem Kunstharz Araldit wurden die Plättchen mit den ausgesäten Zellen zuerst für 1 Stunde mit einem Gemisch aus Araldit und 100% Ethanol (1:1), dann für 2 Stunden mit einem Gemisch aus Araldit und 100% Ethanol (2:1) und anschließend noch über Nacht mit purem Araldit inkubiert. Nach Zugabe von frischem Araldit wurde das Kunstharz 2 Tage lang in Einbettungsformen bei 60°C polymerisiert. Alternativ wurde bei den Proben ohne Aralditreplikas die Entwässerung im Anschluss an die Alkoholreihe mit der Inkubation in Propylenoxid (Merck) 2 x 20 min lang komplettiert, und die Infiltration zuerst für eine Stunde in einem Gemisch aus Araldit und Propylenoxid (2:1) und danach für 2 Stunden in einem Gemisch aus Araldit und Propylenoxid (3:1) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben in frischem Araldit eingebettet und 2 Tage lang bei 60°C polymerisiert.

Puffer und Reagenzien:

- ⇒ Glutaraldehyd-Lösung: 2,5% (v/v) Glutaraldehyd (für die Elektronenmikroskopie, Paesel und Lorei, Frankfurt/M.) in HMSS-Puffer
- ⇒ Cacodylat-Puffer: 100mM Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat (Merck) in Aqua dest., pH 7,4
- ⇒ Osmiumtetroxid-Lösung: 2% (w/v) Osmiumtetroxid (für die Elektronenmikroskopie, Paesel und Lorei) in Aqua dest. als Stammlösung, 1:1 verdünnen in Cacodylat-Puffer
- ⇒ Tanninsäure: 1% (w/v) Tanninsäure (Science Services, München) in Cacodylat-Puffer
- ⇒ Uranylacetat: 2% (w/v) Uranylacetat (Science Services) in 70% Ethanol

⇒ Araldit: 46,5% (w/w) Araldit CY212 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), 50,7% (w/w) Araldit Härter HY964 (Serva), 2,8% (w/w) Araldit Beschleuniger DY964 (Serva)

2.5. Semidünnschnitte

0,25-0,5 µm dicke Semidünnschnitte wurden an einem Ultramikrotom (Leica Ultracut R, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) mit Glasmessern (W. Reichert LABTEC, München), die mit einem LKB 7800A Knifemaker (LKB-Produkte AB, Stockholm, Schweden) hergestellt worden waren, geschnitten und auf Objektträgern getrocknet, 1 Minute mit Richardson-Lösung bei 70°C gefärbt, mit Aqua dest. gespült, wieder getrocknet und mit DEPEX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) eingedeckt. An diesen Schnitten wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops die Regionen in den Aralditblöcken ausgemacht, in denen sich Zellen auf Rillenstrukturen befanden und diese dann für Ultradünnschnitte mit Rasierklingen zugetrimmt.

Puffer und Reagenzien:

⇒ Richardson-Lösung: A: 1% (w/v) Perjodsäure mit 1% (w/v) Azur II 1:1 mischen, B: 1% (w/v) Methylenblau, 4% (w/v) Natrium-Tetraborat; Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen und dann filtrieren (alle Komponenten von Merck)

2.6. Ultradünnschnitte

Am selben Ultramikrotom (wie oben) und mit einem Diamantmesser (W. Reichert LABTEC) wurden 40-60 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt und auf Kupfer-Grids (Stork Veco B.V., Eerbeek, Niederlande), die mit einer Pioloformfolie (Wacker Chemie GmbH, Burghausen) befilmt waren, aufgezogen. Die Schnitte wurden 5 Minuten mit Bleicitrat nachkontrastiert und mit einem Elektronenmikroskop (EM 10; CEM 902, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen; Negative SO-163, Kodak GmbH, Stuttgart) fotografiert. Von den Negativen wurden Positive (SW-Papier von Tetenal Photowerk GmbH & Co., Norderstedt) abgezogen, welche dann zur Digitalisierung eingescannt (Scan Maker 4, Microtek Electronics Europe GmbH, Duisburg) und anschließend noch bearbeitet (Adobe Photoshop 5.5) wurden.

Puffer und Reagenzien:

⇒ Bleicitrat-Lösung: A: 4,4% (w/v) Bleinitrat, 5,9% (w/v) tri-Natriumcitrat-2-hydrat, 30 Minuten Inkubation auf einem Schüttler, B: 40% (v/v) 1N NaOH; Lösung A und B in einem Verhältnis von 3:2 mischen und mit Paraffin beschichten (alle Komponenten von Merck)

2.7. AFS-Einbettung mit Cryofixierung

Für die immuncytochemischen Markierungen wurden die titanisierten Aralditreplikas mit den darauf kultivierten Gingiva-Fibroblasten zunächst kryofixiert. Dabei wurden die Zellen zunächst mit 1% Paraformaldehyd in HMSS-Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und zur Kryo-Protektion für 15 Minuten mit 30% Glycerol in TBS-Puffer inkubiert. Danach wurden die Proben in flüssiges Ethan eingeschossen, welches durch flüssigen Stickstoff auf -168°C in einer Leica EM CPC Anlage (cryo protection chamber, Leica, Bensheim) heruntergekühlt wurde. Die Proben wurden dann in gefrorenem Zustand in eine Leica EM AFS Anlage (automatic freeze substitution, Leica, Bensheim) transferiert und mit Methanol oder Ethanol 48 Stunden bei -90°C entwässert, wobei das Entwässerungsmedium ein Mal ausgetauscht wurde. Zur Kontrastgewinnung war das Methanol, bzw. Ethanol, mit 0,5% Uranylacetat versetzt. Danach wurde die Temperatur 9 Stunden lang um 5°C pro Stunde erhöht, bis sie -45°C betrug. Bei dieser Temperatur wurde 2,5 Stunden lang zur vollständigen Entwässerung frisches Methanol bzw. Ethanol (ohne Uranylacetat) zugegeben und dabei 3 Mal erneuert. An die Entwässerungsphase schloss sich die Infiltrationsphase an. Dabei wurden die Proben zunächst für 12 Stunden mit einem Gemisch aus Kunstharz und Entwässerungsmedium im Verhältnis 1:1, und dann für weitere 7 Stunden mit einem Gemisch aus Kunstharz und Entwässerungsmedium im Verhältnis 2:1 inkubiert. Als Kunstharz wurde Lowicryl HM20 oder K4M verwendet. Zum Abschluss der Infiltrationsphase wurden die Proben noch für 24 Stunden mit purem Kunstharz inkubiert. Die gesamte Infiltration wurde für Lowicryl HM20 bei einer Temperatur von -45°C , und für Lowicryl K4M bei -35°C durchgeführt. Nun wurden die Proben in den dafür vorgesehenen Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg) platziert und diese mit frischem Lowicryl HM20 oder K4M gefüllt. Da Lowicryl nur bei Bestrahlung mit UV-Licht polymerisiert, wurde auf das AFS-Gerät

eine UV-Lampe gesetzt und die Proben damit bestrahlt. Die Polymerisation wurde erst 48 Stunden lang mit der Ausgangstemperatur -45°C oder -35°C durchgeführt, dann wurde die Temperatur langsam um 10°C pro Stunde erhöht, und schließlich noch 60 Stunden lang bei 20°C weiterpolymerisiert. Danach wurden die Proben aus dem AFS-Gerät genommen und von den Eppendorf-Röhrchen befreit, da das Kunstharz inzwischen hart geworden war. Um die Proben vollständig auspolymerisieren zu lassen, wurden sie noch einige Tage dem Sonnenlicht ausgesetzt.

Puffer und Reagenzien:

- ⇒ Ethan-Gas: Ethan 3.5 (AGA Linde Healthcare GmbH & Co. KG, Hoepfner GmbH, Industriebedarf, Reutlingen)
- ⇒ Lowicryl HM20: 84,7% (w/w) Monomer E, 14,8%(w/w) Crosslinker D, 0,5% (w/w) Initiator C (alle Komponenten von Polysciences Europe GmbH, Eppelheim)
- ⇒ Lowicryl K4M: 86% (w/w) Monomer B, 13,5% (w/w) Crosslinker A, 0,5% (w/w) Initiator C (alle Komponenten von Polysciences Europe GmbH)

2.8. Immunogold-Markierungen

Für die Immunogold-Markierungen wurde die Post-Embedding-Labeling-Methode angewendet. Dabei wird die Markierung nach der Einbettung am Ultradünnschnitt durchgeführt. Von den auspolymerisierten Lowicryl-Blöcken wurden zunächst wie oben beschrieben Semi- und Ultradünnschnitte angefertigt, wobei die Ultradünnschnitte auf Nickel-Grids (Stork Veco B.V.), die ebenfalls mit Pioloform befilmt waren, aufgezogen wurden. Für die Markierung wurden die Grids schwimmend auf 50 μl Tropfen der folgenden Lösungen inkubiert und mit einer Nickel-beschichteten Kupfer-Öse von einem Tropfen zum nächsten befördert. Die Grids wurden zunächst 5 Minuten mit TBS-Puffer benetzt, 30 Minuten mit Blockpuffer behandelt, um die unspezifischen Bindungen zu minimieren und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem im Inkubationspuffer verdünnten Primärantikörper inkubiert. Bei den Kontrollen wurden jeweils die Primärantikörper ausgelassen. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Grids mehrmals mit Inkubationspuffer gewaschen. Die Gold-konjugierten Sekundärantikörper wurden im Verhältnis 1:50 in Inkubationspuffer verdünnt und die Grids damit für eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Grids mehrmals zunächst mit Inkubationspuffer und dann mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend 5 Minuten lang mit 2,5% Glutaraldehyd in HMSS-Puffer postfixiert. Nach weiteren Waschschritten in TBS und in Aqua dest. wurden die Grids zunächst getrocknet. Schließlich wurden die Grids noch optional mit 1% wässriger Uranylacetat-Lösung und/oder Bleicitrat nachkontrastiert, wieder getrocknet und mit einem Elektronenmikroskop untersucht (vergleiche Abschnitt 6, Ultradünnschnitte).

Puffer und Reagenzien:

⇒ Blockpuffer: 5% (w/v) BSA (Bovine Serum Albumin, PAA), 0,1% (v/v) cold water fish gelatin (Sigma), 5% (v/v) goat serum (PAA), 0,01% (w/v) NaN_3 (Sigma), 0,1% Tween20 (Serva) in TBS, pH 7,4

⇒ Inkubationspuffer: 0,8% (w/v) BSA (PAA), 0,1% (v/v) cold water fish gelatin (Sigma), 0,01% (w/v) NaN_3 (Sigma), 0,1% Tween20 (Serva) in TBS pH 7,4

Antikörper:

⇒ anti-Ezrin, monoclonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:100 (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)

⇒ anti-Moesin, monoclonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:100 (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg)

⇒ anti-Radixin, polyclonal, gezogen in der Ziege, Verdünnungsansatz 1:25 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg)

⇒ anti-Vinculin, monoclonal, gezogen in der Maus, Verdünnungsansatz 1:10 (Chemicon International, Hofheim/Ts)

⇒ Ziege anti-Maus, konjugiert mit 10nm Gold (British Bio Cell, TEBU GmbH, Offenbach)

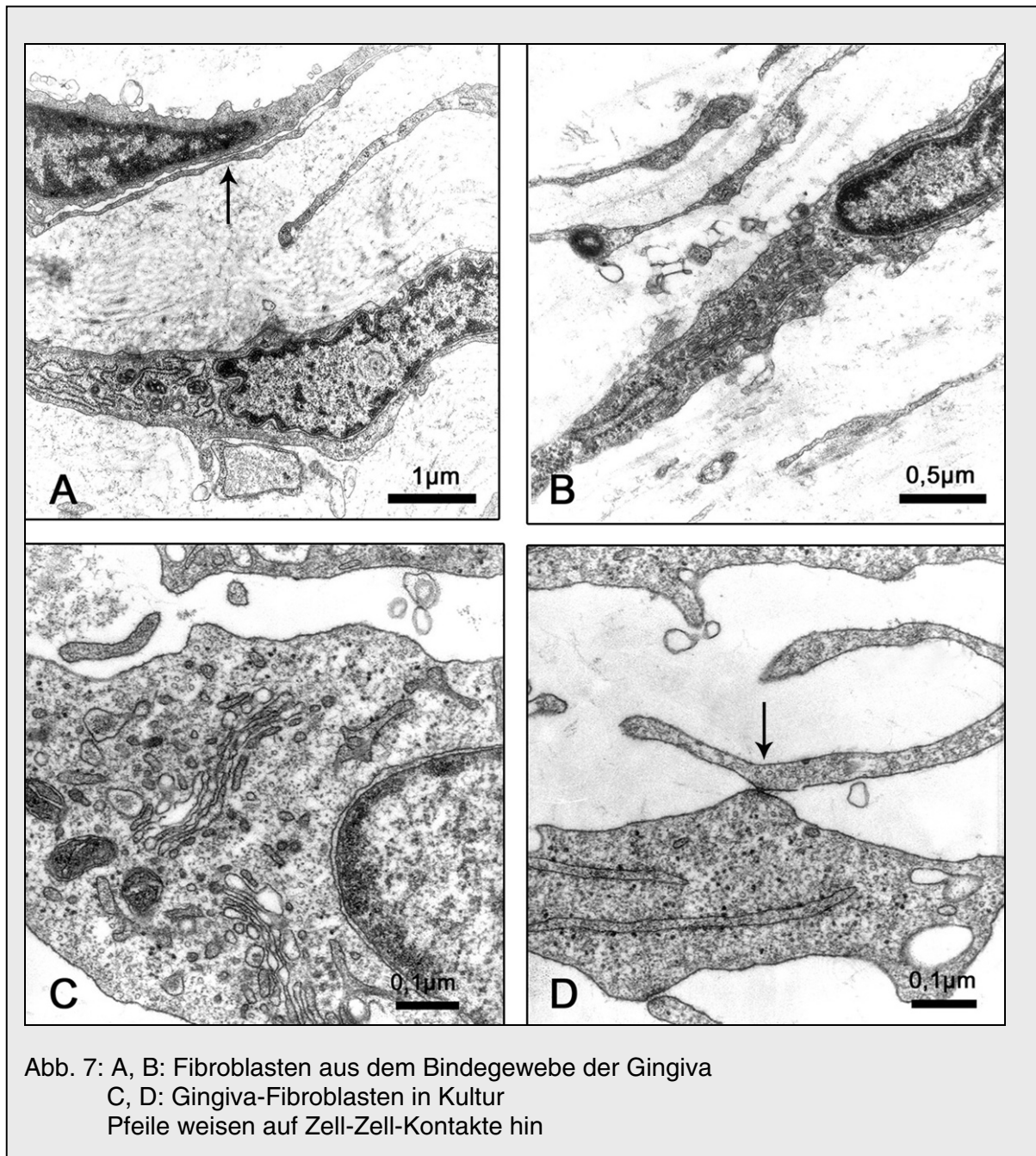
⇒ Ziege anti-Maus, konjugiert mit 15nm Gold (British Bio Cell)

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modellsystem zu etablieren, mit dem die Interaktionen von Zellen mit mikrostrukturierten Oberflächen auf licht- und elektronenmikroskopischem Niveau beobachtet werden können. Wenn diese Interaktionen untersucht und verstanden werden, kann man zukünftige Implantatoberflächen so gestalten, dass die Anheftung der Zellen und damit des gesamten Gewebes optimiert wird. Als Grundlage für die Versuche diente die Theorie, dass die Adhäsion von Zellen am Substrat verbessert werden kann, wenn die Oberfläche des Substrats eine bestimmte Topographie aufweist. Es wurden verschiedene Rillenmuster auf ihren Effekt auf das Zellverhalten hin untersucht, mit dem Ziel einer optimalen Gestaltung der Substratoberfläche näher zu kommen.

3.1. Das Modellsystem

Die erfolgreiche Integration von Implantaten im Gewebe setzt voraus, dass die verschiedenen Zelltypen der umgebenden Gewebe eine enge Interaktion mit der Oberfläche des Implantats eingehen. Bei dentalen Implantaten ist es nicht nur von entscheidender Bedeutung, dass die Implantatoberfläche gut im Knochen verankert wird und mit seinen Osteoblasten interagiert. Für die vollständige Einheilung ist auch ein enger Kontakt des Bindegewebes und der aufliegenden Epithelzellschicht mit dem Implantat notwendig. Die Fibroblasten des Bindegewebes und die Epithelzellen sorgen für die Abgrenzung der Implantatoberfläche gegenüber der Mundhöhle und verhindern so die Einwanderung von Keimen, die eine Entzündung hervorrufen würden. Dentale Implantate sollen möglichst so gestaltet werden, dass der nach der Einheilung entstandene Halteapparat demjenigen gleicht, der im natürlichen Zustand den Zahn festhält und im Alveolarknochen verankert. Abb. 7 A und B zeigen eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Bindegewebe, wie es um einen natürlichen Zahn herum gefunden wird. Besonders auffällig ist die extrem längliche Form der Fibroblasten und ihre langen, dünnen 'Arme', die ins Gewebe hineinragen. Fibroblasten sind im Gegensatz zu beispielsweise Epithelzellen in vivo sehr locker angeordnet und haben meist nur Kontakt zur extrazellulären Matrix. Vereinzelt bilden auch sie jedoch Kontakte zu ihren Nachbarzellen aus (siehe Abb. 7 A).



3.1.1. Gingiva-Fibroblasten

Es war eines der Ziele dieser Arbeit, das Modellsystem möglichst naturgetreu zu gestalten und daher mit Primärkulturen zu arbeiten. Wie sich herausstellte, ist es sehr schwierig, Zellkulturen aus dem Gingivaepithel zu isolieren, wogegen Zellkulturen aus dem Bindegewebe der Gingiva vergleichsweise einfach herzustellen und auch schon käuflich zu erwerben sind. Dadurch stand genügend Zellmaterial für

die Versuche zur Verfügung. Zudem wurden die meisten Untersuchungen zum Thema 'Interaktion von Implantatoberfläche und Gewebe' mit Osteoblasten durchgeführt, doch ist es auch klar geworden, dass die Reaktion des Weichgewebes auch entscheidend am Erfolg des Implantats beteiligt ist.

Abb. 7 C und D zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Primärkultur humaner Gingiva-Fibroblasten. Auch hier ist die längliche Form der Zellen deutlich zu erkennen. Wenn die Dichte der ausgesäten Fibroblasten groß genug ist, bilden sich auch zwischen den Zellen Kontakte aus (siehe Abb. 7 D). Die Fibroblasten des Bindegewebes sorgen für eine Verankerung der Gingiva am Zahn, beziehungsweise am dentalen Implantat, indem sie Kollagenfasern ausbilden, die dann an der Zahnoberfläche befestigt werden. Bei der Einbringung eines Implantats in den Kiefer ist die Situation jedoch etwas anders, da es zunächst wichtig ist, dass die Zellen selbst mit der Implantatoberfläche in Kontakt treten und sich festsetzen, bevor sie beginnen können, Material der extrazellulären Matrix zu produzieren und zu sekretieren. Die schnelle Festsetzung der Zellen an der Oberfläche entscheidet über den Erfolg des Implantats. Daher ist es wichtig, die Oberfläche so zu gestalten, dass sich die Zellen innerhalb weniger Stunden darauf festsetzen und adhären.

3.1.2. Substrate

Wir verwendeten in unseren Versuchen das gängige Rillenmuster (groove-ridge-design), da dieses eine definierte Oberfläche ist und die Zellen darauf leicht zu beobachten sind. Es wurden titanisierte Siliziumplättchen mit verschiedenen Rillenmustern unterschiedlicher Periode und Tiefe hergestellt und mit Zellen besät. Als wafer wurden Siliziumplättchen verwendet, auf denen durch optische Lithographie und einem anschließenden Ätzschritt die Muster entstanden (Abb. 6). Die Plättchen wurden dann noch mit einer Titanschicht besputtert, da Titan das Material von Interesse war und in der dentalen Implantologie oft verwendet wird. Untersucht wurden verschiedene Kombinationen von Tiefe und Breite der Rillen, mit dem Ziel, das Adhäsionsverhalten von Zellen auf den verschiedenen Topographien zu charakterisieren.

3.2. Verhalten von Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen

Das Verhalten von Zellen auf strukturierten Oberflächen, nämlich sich der Topographie der Oberfläche anzupassen und die Längsachse an den Strukturen auszurichten, wird auch 'topographic guidance' genannt. Dabei wird die Zelle ihr Zytoskelett, ihre Intermediärfilamente (Meyle et al., 1993a), ihre Mikrotubuli (Oakley

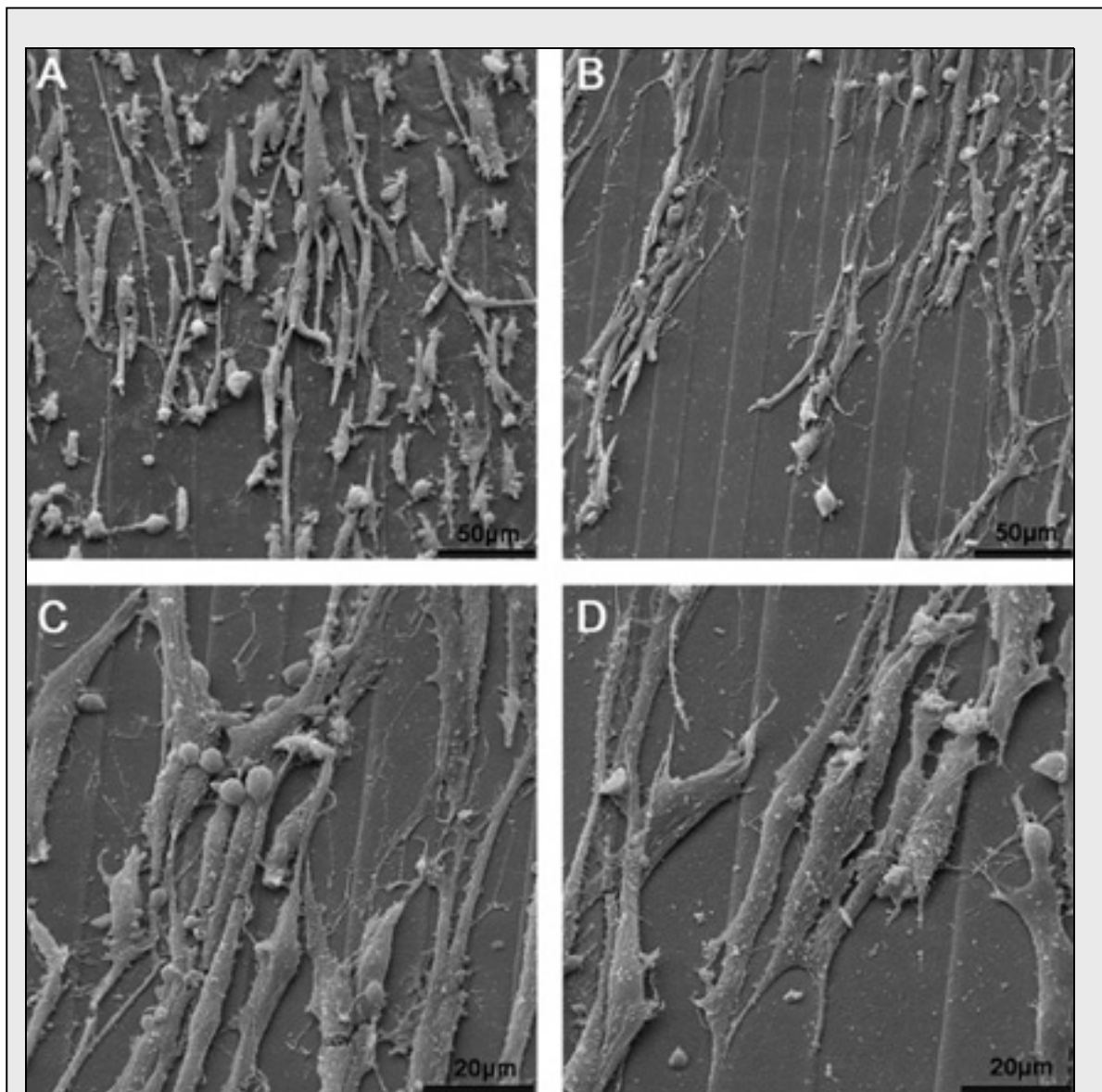
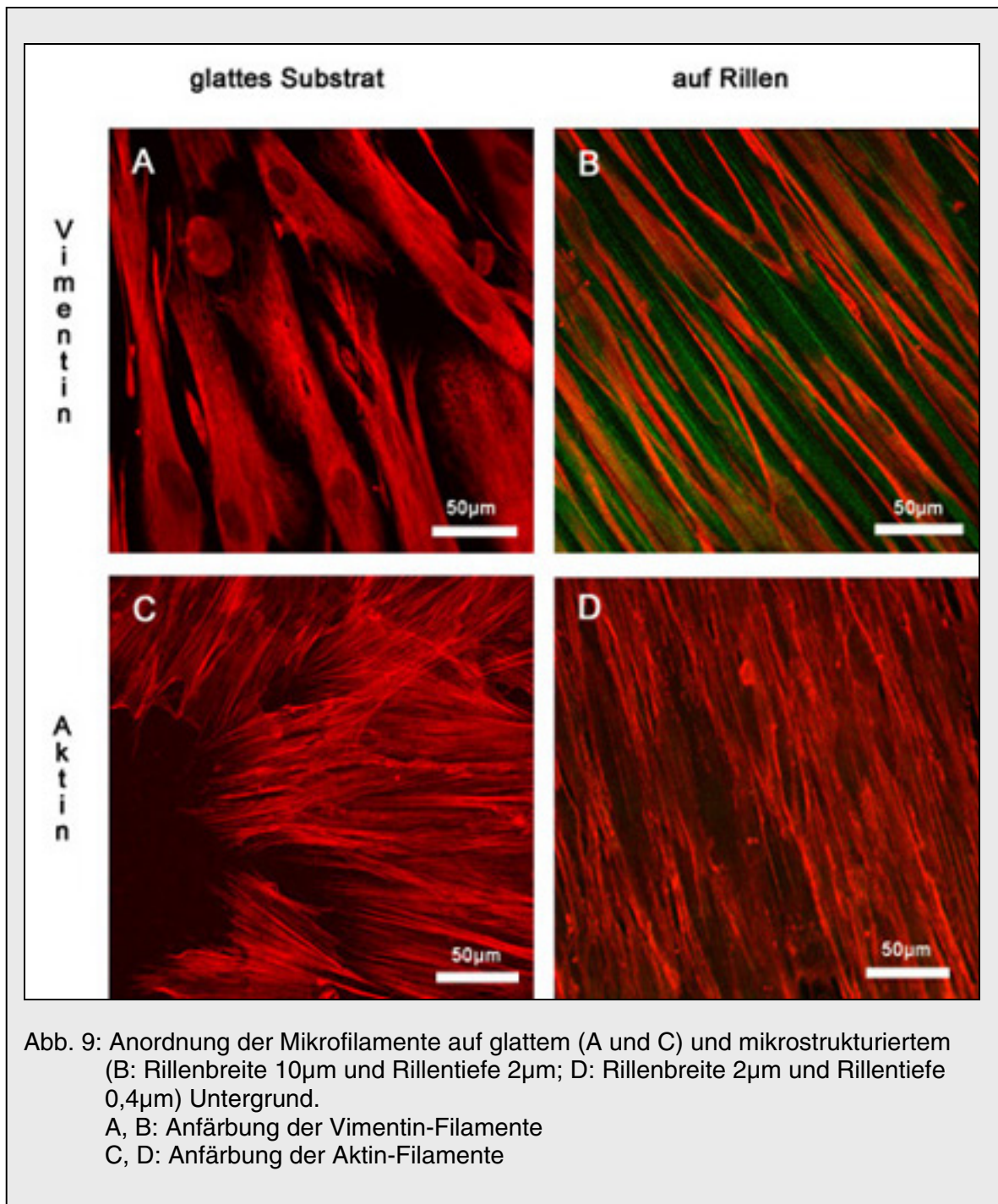


Abb. 8: REM-Aufnahme von Fibroblasten die auf einem titanisierten Siliziumwafer mit einer Rillenbreite von 20 μm und einer Rillentiefe von 2 μm ausgesät wurden. C und D sind Vergrößerungen von A und B.



and Brunette, 1993) und auch ihre Fokalkontakte an den Strukturen der angebotenen Oberfläche orientieren.

Besonders eindrucksvoll ist dieses Verhalten am Beispiel von Fibroblasten zu beobachten, da sie durch ihre längliche Form die Orientierung der Zelle gut erkennen lassen. Abb. 8 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten

die auf einem titanisierten Siliziumwafer mit einem Rillenmuster von 2 μm Tiefe und 20 μm Breite ausgesät wurden. Die Zellen orientieren sich am Rillenmuster des Wafers. Bei höherer Vergrößerung (Abb. 8 C und D) ist zu sehen, dass die Zellen viele Membranausstülpungen ausbilden. Diese sind zum Teil auf der freien Zelloberfläche lokalisiert, zum Teil liegen sie dem Substrat auf und es scheint so, als ob sie die physikalische Umwelt der Zelle abtasten (Abb. 8 D). Abb. 9 A zeigt die Anordnung von Vimentin-Filamenten auf glatter Oberfläche, Abb. 9 C dagegen zeigt die Anordnung von Aktin-Filamenten auf glatter Oberfläche. In Abb. 9 B ist zu sehen, wie sich die Intermediärfilamente auf einer mikrostrukturierten Oberfläche orientieren, Abb. 9 D dagegen zeigt orientierte Aktin-Filamente auf einer mikrostrukturierten Oberfläche.

3.3 Lichtmikroskopische Untersuchung des Zellverhaltens

Die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix wird auch als Zelladhäsion bezeichnet. In der Implantologie ist es wichtig, eine möglichst starke Zelladhäsion an der Implantatoberfläche zu erreichen. Ein Maß für die Zelladhäsion ist die Anzahl der ausgebildeten Fokalkontakte. Im Folgenden wurden Gingiva-Fibroblasten auf verschiedenen Substraten ausgesät und die Ausbildung ihrer Adhäsionskontakte beobachtet. Dabei wurden einzelne Komponenten dieser Fokalkontakte mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt und mikroskopisch dokumentiert.

3.3.1 Integrin-Markierung

Ein wichtiger Bestandteil der Adhäsionskomplexe sind die Integrine, welche als Rezeptoren für die extrazelluläre Matrix dienen. Je nach Zelltyp findet man verschiedene Integrine ausgeprägt. In Gingiva-Fibroblasten sind vor allem die Dimere $\alpha_v\beta_3$, auch als Vitronektinrezeptor bekannt, und $\alpha_5\beta_1$, auch als Fibronektinrezeptor bekannt, exprimiert (Hormia et al., 1990; Hormia and Könönen, 1994). Abb. 10 B und D zeigen die Expression von $\alpha_v\beta_3$ in Gingiva-Fibroblasten, die in Kulturschalen mit glatter Oberfläche gewachsen sind. In Abb. 10 B ist besonders gut zu sehen, dass die mit Phalloidin markierten Aktinfilamente direkt in die mit Integrin markierten Fokalkontakte inserieren. In Abb. 10 D ist ein mit Integrin-Antikörpern markiertes leading edge und Fibronektin-Filamente zu sehen. Das

leading edge befindet sich bei migrierenden Zellen vorne in Richtung der Migration. Zellen, die auf unbekanntes Substrat ausgesät werden, nehmen die Bedingungen ihrer neuen Umwelt über verschiedenste Sensorsysteme wahr und migrieren über das Substrat, um die für sie günstigste Umgebung zu finden, in der sie sich schließlich festsetzen.

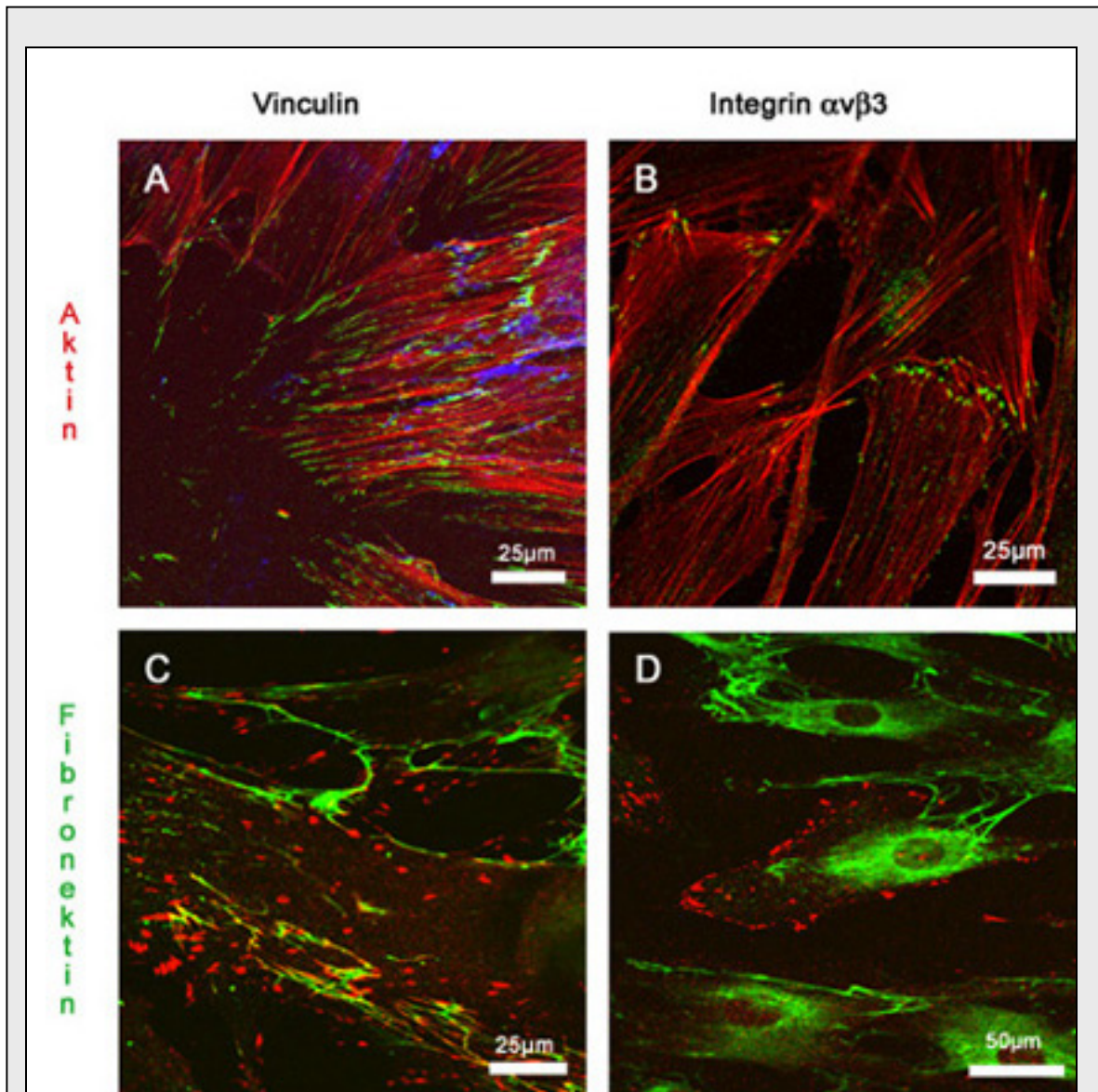


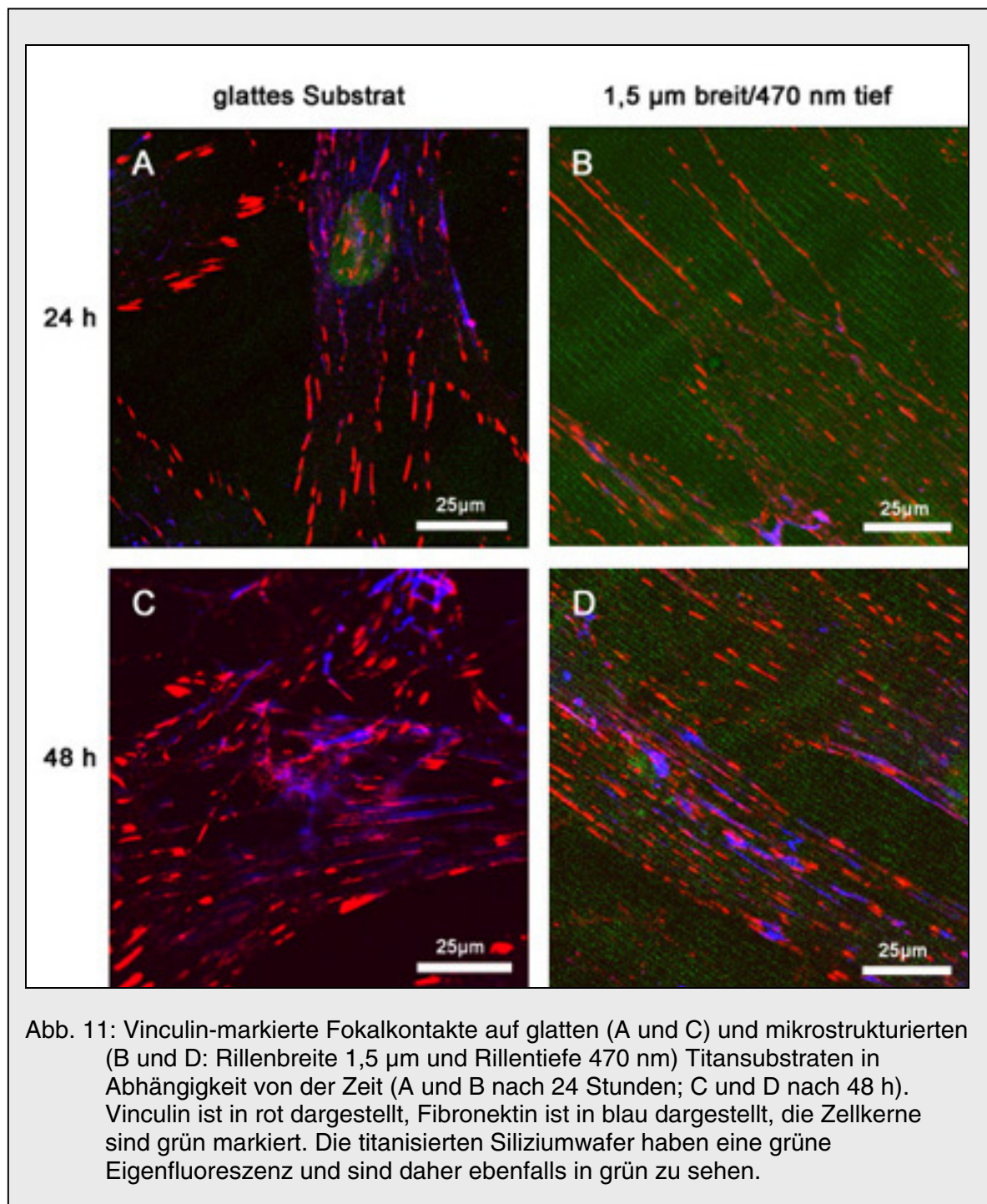
Abb. 10: Fibroblasten in Kultur auf glattem Substrat.

A: Vinculin in grün, Aktin in rot, Fibronektin in blau; B: Integrin in grün, Aktin in rot; C: Vinculin in rot, Fibronektin in grün; D: Integrin in rot, Fibronektin in grün

3.3.2 Vinculin und Zelladhäsion

Eine weit verbreitete Methode in der Biomaterial-Forschung, Fokalkontakte dazustellen, ist die Markierung des Proteins Vinculin. Es ist auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert und funktioniert als Verbindung zwischen den Integrinen und dem Aktin-Zytoskelett. Diese Methode bietet auch den Vorteil, dass Fokalkontakte generell markiert werden, unabhängig davon, welche Integrine sie beinhalten. Sie kann bevorzugt dann angewendet werden, wenn es um die Ausbildung von Fokalkontakten generell geht, ohne die spezielle Verteilung der verschiedenen Integrine zu berücksichtigen. Da in dieser Studie die Verteilung von Fokalkontakten im Allgemeinen auf den verschiedenen Topographien im Vordergrund stand, wurde vor allem die Markierung von Vinculin verwendet. Abb.10 A zeigt, dass auch die mit Vinculin markierten Fokalkontakte direkt mit den Aktin Stress Fasern verbunden sind und sich an deren Enden ausbilden. In Abb. 10 C ist außerdem zu sehen, dass die mit Vinculin markierten Fokalkontakte mit Fibronectin-Fasern kolokalisiert sind. Fibronectin ist eine Komponente der extrazellulären Matrix, die von den Zellen gebildet und sekretiert wird und dann in Fasern vorliegt. In Fibroblasten enthalten die Fokalkontakte Integrine wie $\alpha_5\beta_1$, die Fibronectin binden können. Somit bilden sich die Fokalkontakte direkt auf den Fibronectin-Fasern. Damit ist sichergestellt, dass alle Komponenten, die für die Untersuchung von Fokalkontakten wichtig sind, von den hier verwendeten Zellen exprimiert werden und detektiert werden können.

Die Fokalkontakte bilden sich binnen weniger Stunden, nachdem die Zellen auf den zu untersuchenden Materialien ausgesät wurden, aus und sorgen für die Haftung der Zellen am Untergrund. In Abbildung 11 und Abbildung 12 sind Markierungen von Vinculin an Zellen dargestellt, die auf glattem oder mikrostrukturiertem Untergrund für jeweils 24 Stunden, 48 Stunden, 3 Tage oder 4 Tage gewachsen sind. Die Fokalkontakte sind schon bei den Proben mit Zellen, die 24 Stunden in Kultur gewachsen waren, deutlich zu sehen und haben bei allen Proben eine längliche Form. Bei den Proben mit mikrostrukturiertem Wachstumssubstrat ist deutlich zu erkennen, dass die Fokalkontakte sich ebenfalls an der Geometrie des Substrats ausrichten, wogegen sie auf glattem Substrat in der Richtung angeordnet sind, in der



die Zelle sich bewegt hat (Abb. 11 A). Aufgrund der Eigenfluoreszenz der titanisierten Siliziumwafer ist die Geometrie des Substrats gut zu erkennen. Man kann die Rillen und Stege unterscheiden (siehe Abb. 11 B, D und 12 B, D) und die gebildeten Fokalkontakte in Relation zu diesen Strukturen sehen. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die meisten Fokalkontakte in den Rillen anordnen. Es gibt aber

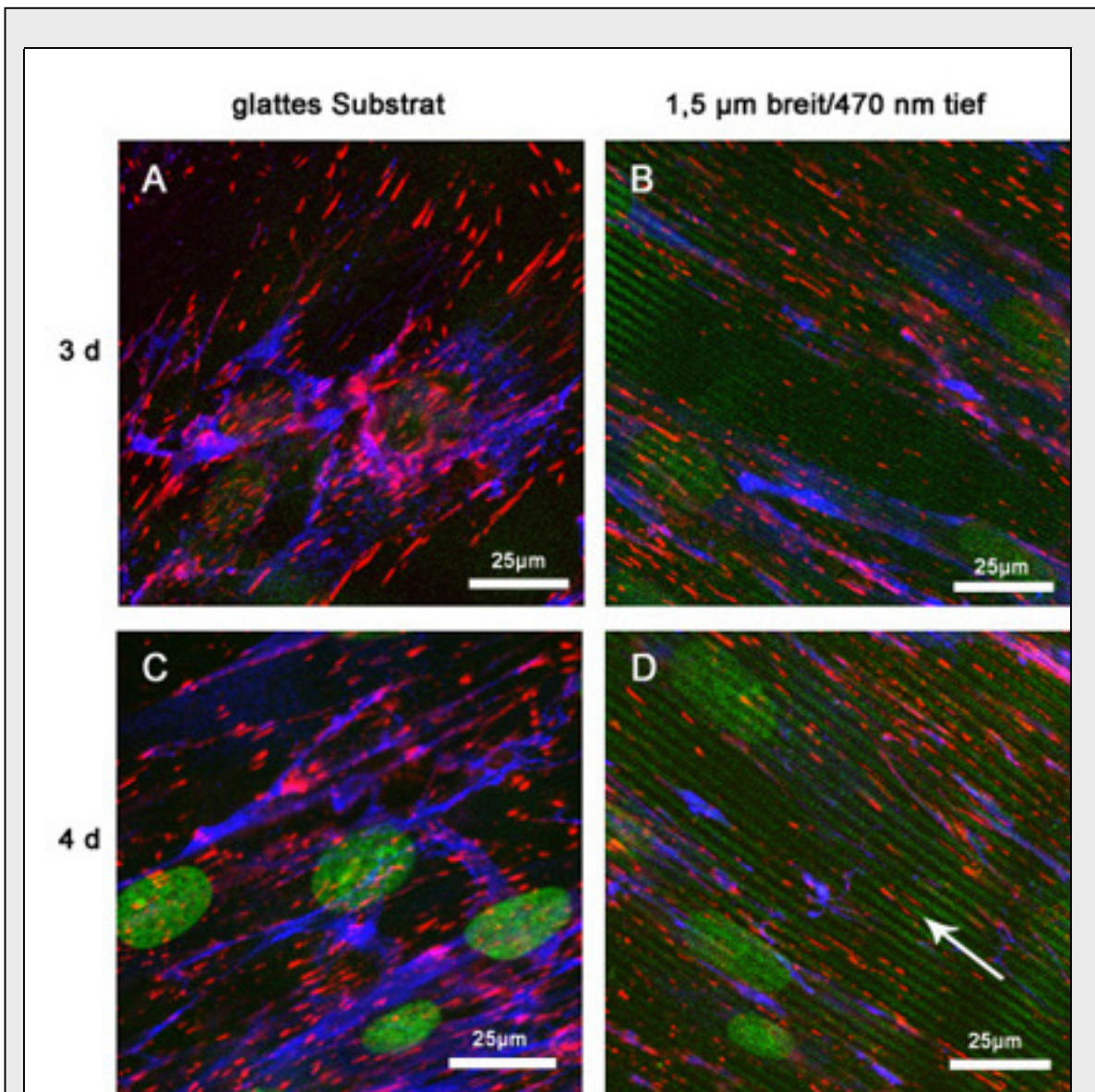
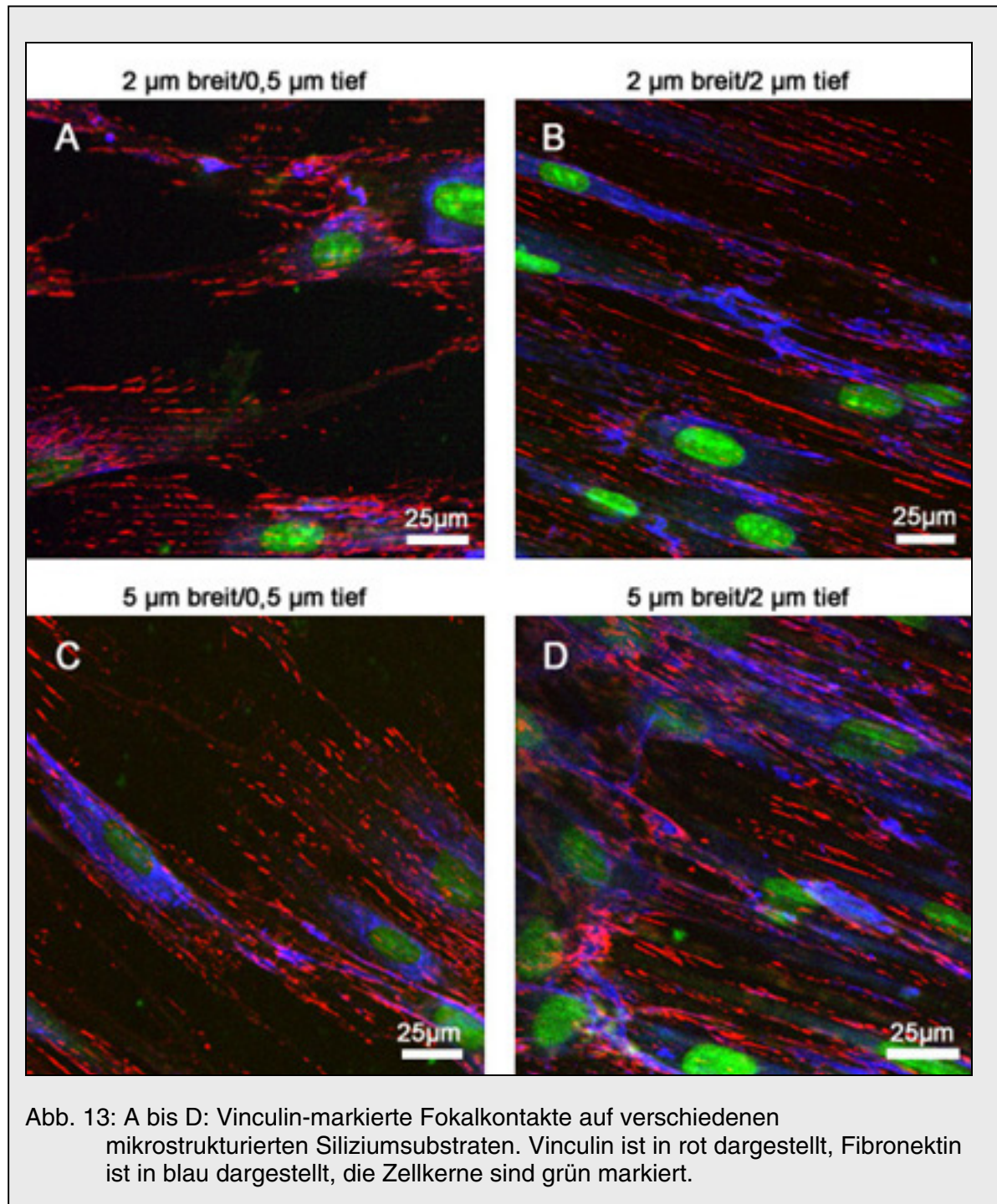


Abb. 12: Vinculin-markierte Fokalkontakte auf glatten (A und C) und mikrostrukturierten (B und D: Rillenbreite 1,5 μm und Rillentiefe 470 nm) Titansubstraten in Abhängigkeit von der Zeit (A und B nach 3 Tagen; C und D nach 4 Tagen). Vinculin ist in rot dargestellt, Fibronectin ist in blau dargestellt, die Zellkerne sind grün markiert. Die titanisierten Siliziumwafer haben eine grüne Eigenfluoreszenz und sind daher ebenfalls in grün zu sehen.

auch welche, die sich auf den Stegen gebildet haben (Pfeil in Abb. 12 D; Tabelle 1). Allgemein entsteht auch der Eindruck, dass die Zahl der Fokalkontakte pro Zelle mit der Zeit zunimmt. Es ist auch zu erkennen, dass die Zellen umso mehr Fibronectin sekretieren, je länger sie in Kultur sind.

Nach 24 Stunden ist noch relativ wenig Fibronectin markiert, nach 4 Tagen sind die Fibronectin-Filamente, die die Zelle sekretiert hat, deutlich zu erkennen. Auf den



Fibronectin-Filamenten können dann wiederum Fokalkontakte gebildet werden. Schließlich nimmt auch die Zahl der Zellen zu, je länger die Proben in Kultur gehalten wurden.

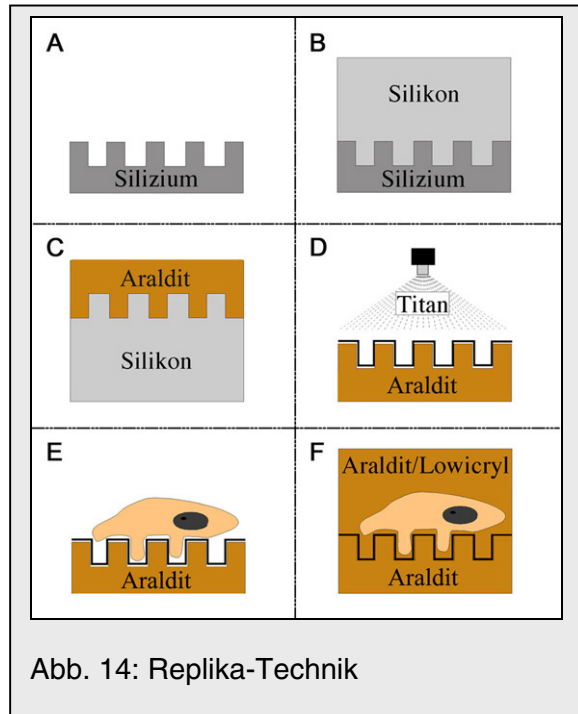
Die Zahl der grün gefärbten Zellkerne nimmt zu und das Gesamtbild der Kulturen erscheint dichter bewachsen. Damit gibt es dann natürlich auch mehr Vinculin-

markierte Fokalkontakte. Abbildung 13 zeigt Vinculin-markierte Fokalkontakte in Zellen, die auf verschiedenen mikrostrukturierten Siliziumsubstraten ohne Titanschicht gewachsen sind. Im Vergleich zwischen Substraten unterschiedlicher Geometrien kann kein Unterschied in der Anzahl der Fokalkontakte festgestellt werden. Es zeigt sich jedoch, dass die Fokalkontakte um so exakter orientiert sind, je enger und tiefer die Rillen sind (Tabelle 1). Im allgemeinen bilden sich Fokalkontakte, die Vinculin enthalten, auf allen Substraten, die den Zellen in Kultur angeboten werden (vergleiche Abb. 10 A und C: Kulturschale; Abb. 11 und 12: Titanschicht; Abb. 13: Silizium). Sie wurden sogar an Zellen in Kultur entdeckt (Burrige et al., 1988). Man geht aber davon aus, dass sie auch in intakten Geweben vorkommen. Deshalb wurden sie in ihrer Eigenschaft als wichtigste Komponente der Zell-Substrat-Adhäsion eingehend und in verschiedensten Systemen untersucht.

Geometrie der Rillen/Stege	Anzahl d. Fokalkontakte	Orientierung d. Fokalkontakte	Lokalisierung auf den Stegen	Lokalisierung in den Rillen
2µm breit/ 0,5µm tief	+++	++	+	+++
2µm breit/ 2µm tief	+++	+++	+	+++
5µm breit/ 0,5µm tief	+++	+	+	+++
5µm breit/ 2µm tief	+++	++	+	+++
1,5 µm breit/ 470 nm tief 24 Stunden	+	++	+	+++
1,5 µm breit/ 470 nm tief 48 Stunden	++	++	+	+++
1,5 µm breit/ 470 nm tief 3 Tage	+++	++	+	+++
1,5 µm breit/ 470 nm tief 4 Tage	+++	++	+	+++

Tabelle 1: semiquantitative Darstellung von Anzahl, Orientierung und Lokalisierung von Fokalkontakten in Abhängigkeit von der Rillengeometrie und der Zeit in Kultur

3.4 Replika-Technik



In bisherigen Untersuchungen (Meyle et al., 1993a,b; 1994) wurden mikrostrukturierte Substrate mit einem Rillenmuster von je 1 μm breiten Stegen und Vertiefungen auf Wachstum und Orientierung der darauf kultivierten Zellen hin untersucht. Ein Ziel des hier vorgestellten Projektes war es jedoch, die Interaktion zwischen Zelle und mikrostrukturiertem Substrat mit transmissions-elektronenmikroskopischen Methoden und Markierungen zu beobachten. Da es für die Transmissions-Elektronenmikroskopie erforderlich ist, mit

Hilfe von Diamantmessern Ultradünnschnitte anzufertigen und es nicht möglich ist, die bisher verwendeten Siliziumplättchen auf diese Weise ultradünn zu schneiden, mussten wir auf die Replika-Technik zurückgreifen. Dabei wurde von den Siliziumplättchen (Abb. 14 A) zunächst ein Abdruck aus Silikon hergestellt (Abb. 14 B) und davon anschließend wiederum ein Abdruck in Araldit (Abb. 14 C). Araldit ist ein in der Elektronenmikroskopie oft benutztes Kunstharz, das ultradünn geschnitten werden kann. Es wird in flüssigem Zustand auf die Silikonformen gegossen und dann 2 Tage lang bei 60°C ausgehärtet.

Die fertigen Aralditreplikas konnten dann noch mit einer 50 nm dünnen Titanschicht besputtert werden (Abb. 14 D), wobei die Titanschicht dick genug sein musste, damit die Zellen auf einer kontinuierlichen Titanschicht wachsen konnten und gleichzeitig dünn genug, damit die Replikas noch ohne Probleme mit einem Diamantmesser ultradünn geschnitten werden konnten. Auf diesen Replikas konnten dann die Zellen ausgesät (Abb. 14 E) und das gesamte Präparat entweder wiederum in Araldit oder einem anderen Kunstharz, Lowicryl, durch verschiedene Techniken, die im Verlauf noch genauer beschrieben werden, eingebettet werden (Abb. 14 F). Die Qualität der

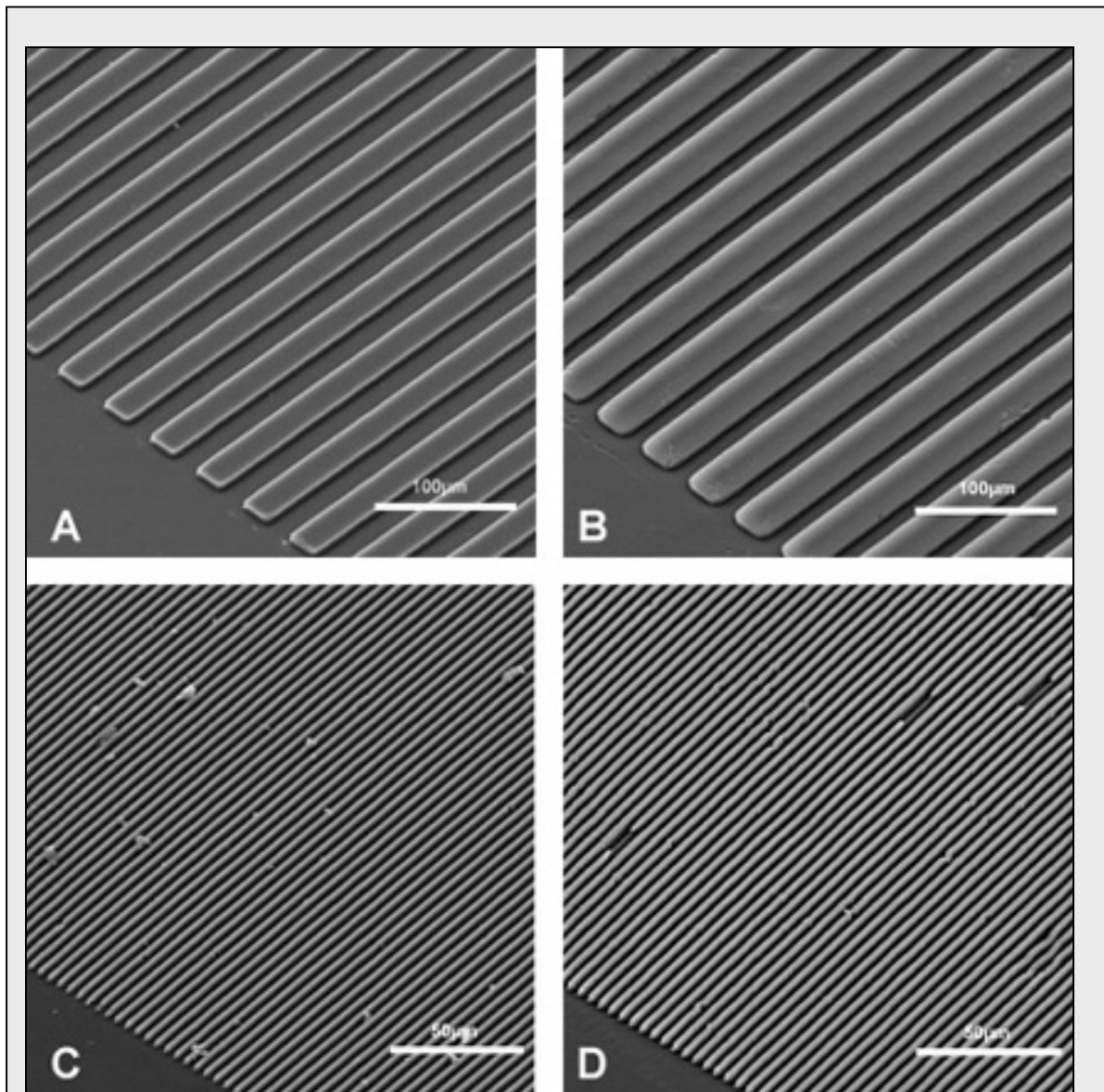
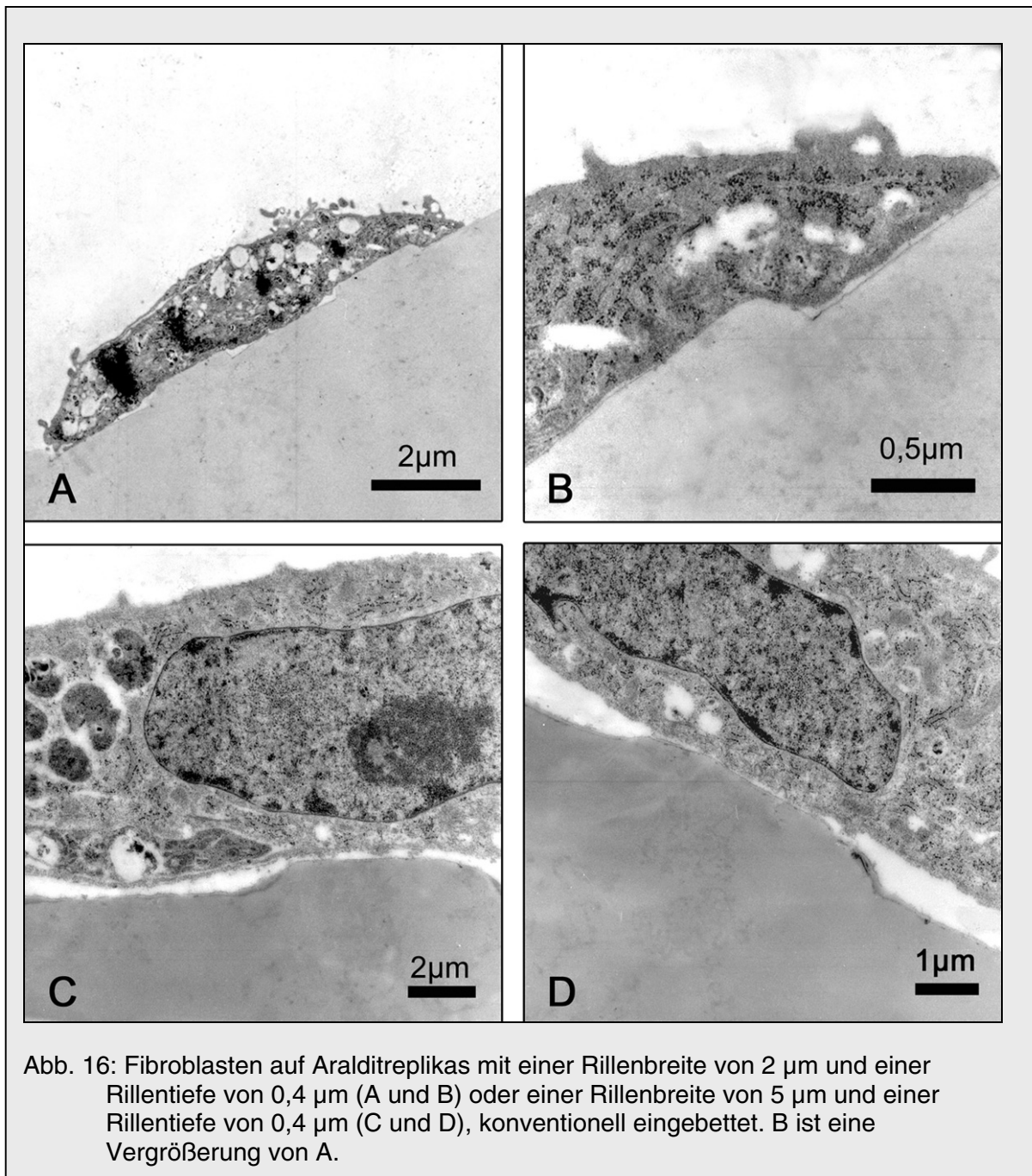


Abb. 15: A: Siliziumwafer mit einer Rillenbreite von 20 μm und einer Rillentiefe von 2 μm
B: Aralditreplika von A
C: Siliziumwafer mit einer Rillenbreite von 2 μm und einer Rillentiefe von 2 μm
D: Aralditreplika von C

Replikas wurde mit dem Raster-Elektronenmikroskop untersucht, und es stellte sich heraus, dass die Rillenmuster der Siliziumoriginale einwandfrei auf den Aralditreplikas wiederzufinden waren (Abb. 15). Auch die Kontinuität der Titanschicht wurde überprüft und für optimal befunden. Die Replika-Technik bringt außerdem noch den Vorteil, dass die aufwendig hergestellten mikrostrukturierten Siliziumwafer



dadurch vervielfältigt werden können, da aus einem Original erst mehrere Silikonformen entstehen und von jeder Silikonform wiederum mehrere Aralditreplikas gemacht werden können.

3.4.1 konventionelle Einbettung ohne Titan

Um festzustellen, ob die Einbettung der Aralditreplikas mit konventionellen Einbettmethoden durchführbar ist, wurden in einem ersten Schritt Aralditreplikas

ohne Titanschicht mit Gingiva-Fibroblasten besät und einige Tage kultiviert, fixiert und dann eingebettet, indem neues Araldit über das vorherige Wachstumssubstrat mit den fixierten Zellen gegeben wurde (Abb. 16). Bei der konventionellen Einbettung in Araldit wird die Entwässerung der Proben üblicherweise mit Propylenoxid abgeschlossen und bei der Infiltration ein Gemisch aus Araldit und Propylenoxid verwendet. Beim Einbetten der Aralditreplikas stellte sich heraus, dass man auf Propylenoxid verzichten muss, da dieses auch schon ausgehärtetes Araldit, also auch die Replikas, auflöst. Die Entwässerung und Infiltration musste also mit Ethanol anstatt Propylenoxid durchgeführt werden, wobei das Zytoplasma der Zellen dabei weniger ausgewaschen wird und die Zellen im Elektronenmikroskop dann 'voller', aber weniger kontrastreich, erscheinen (vgl. Abb. 7 mit 16). Die Aralditreplika und das für die Einbettung verwendete neue Araldit verbanden sich nach der Polymerisation zu einem einheitlichen Werkstoff-Blöckchen, das anschließend für die Untersuchungen im Elektronenmikroskop ultradünn geschnitten werden konnte. Wie in Abbildung 16 zu sehen, ist die Struktur des Substrats im Elektronenmikroskop gut zu erkennen und die Zellen haben sich daran angepasst. Bei der Einbettung gehen während der langen Entwässerung und Infiltration etliche Zellen verloren und es muss auch berücksichtigt werden, dass auf einem Ultradünnschnitt jeweils nur ein Bruchteil der Fläche einer Aralditreplika zu sehen ist. Daher ist es wichtig, bei der Aussaat eine hohe Zelldichte auf den Replikas zu erzielen, damit auf den Ultradünnschnitten im Elektronenmikroskop noch genügend Zellen vorhanden sind, um eine Untersuchung machen zu können.

3.4.2 konventionelle Einbettung mit Titan

Das Ziel der Arbeit war die feinstrukturelle Analyse der Interaktion der Zelle mit Titan. Nachdem es also möglich war, die mit Zellen besäten Aralditreplikas einzubetten und ultradünn zu schneiden, wurde dieser Vorgang im nächsten Schritt mit titanisierten Aralditreplikas wiederholt (Abb. 17 bis 19). Die zusätzliche Titanschicht erschwert den Vorgang des Ultradünnschneidens erheblich. Oft kommt es dabei vor, dass sich die Schnitte an der Grenze zwischen Replika mit Zellen und neuem, bei der Einbettung hinzugefügtem, Araldit entzweien. Daraus resultiert ein hoher Ausschuss an Blöckchen, der nicht mikroskopierbar ist, da sich die Zellen in den

Ultradünnschnitten entweder vom mikrostrukturierten Substrat oder vom umgebenden neuen Araldit getrennt hatten. Bei einem Teil der Blöckchen jedoch verbanden sich altes, titanisiertes Araldit einwandfrei mit neuem und die Ultradünnschnitte konnten untersucht werden.

In den Aufnahmen erscheint die Titanschicht oft mit Rissen oder es fehlt ein Stück, was auf mechanische Beanspruchungen beim Ultradünnschneiden zurückzuführen

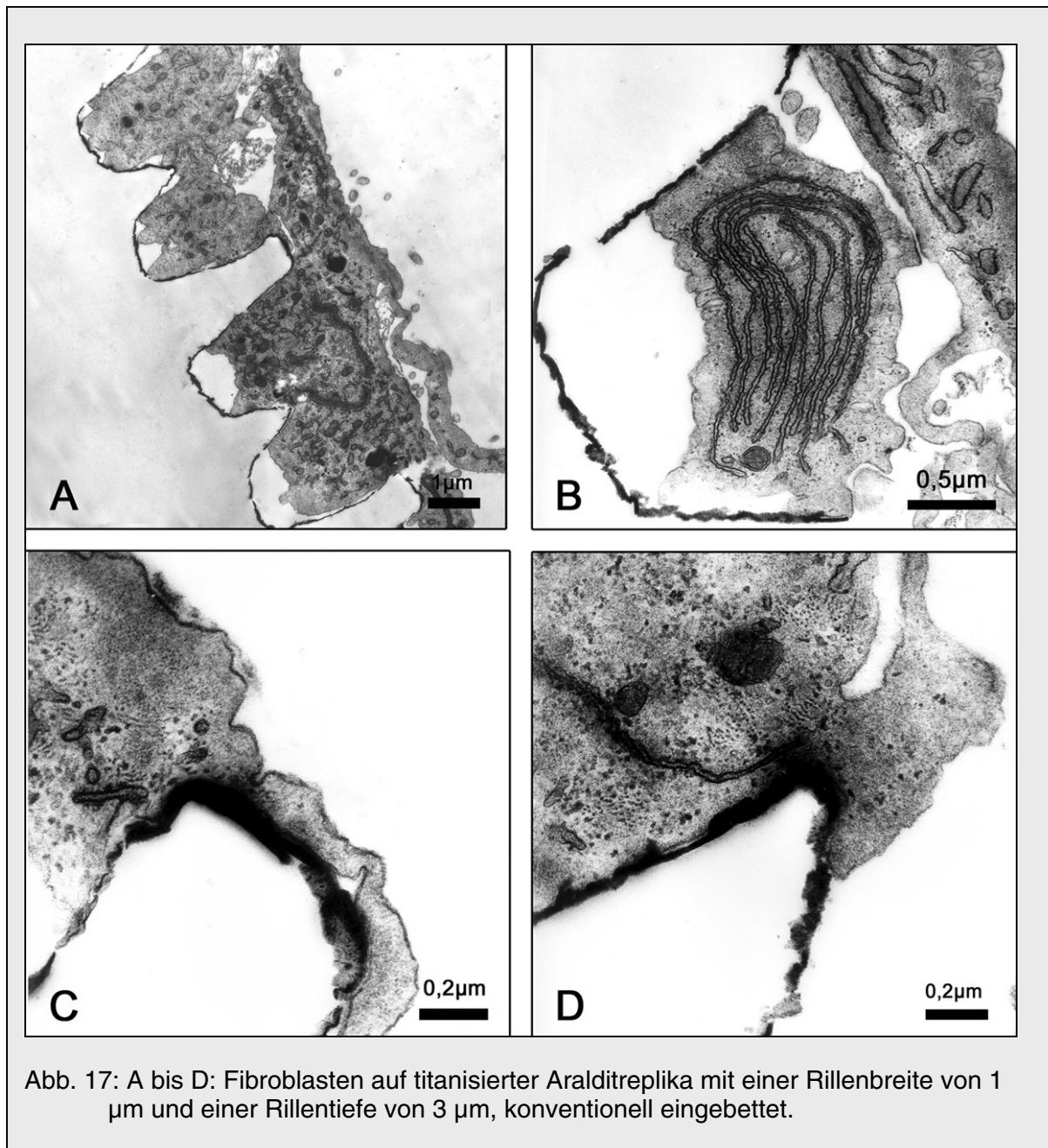


Abb. 17: A bis D: Fibroblasten auf titanisierter Aralditreplika mit einer Rillenbreite von 1 µm und einer Rillentiefe von 3 µm, konventionell eingebettet.

ist oder schon während der Entwässerung und Einbettung entstanden ist. Zu Lebzeiten der Zellen sahen sie sich auf einer kontinuierlichen Titanschicht ausgesetzt, wie durch Überprüfung der Replikas vor der Aussaat von Zellen mit dem Rasterelektronenmikroskop festgestellt werden konnte. Abb. 17, 18 und 19 zeigen strukturierte und titanisierte Aralditreplikas mit verschiedenen Rillenmustern, auf denen Gingiva-Fibroblasten gewachsen waren. Die Zellen sind also in der Lage, sich verschiedensten Rillenbreiten- und Tiefen anzupassen und Kontakte mit der Substratoberfläche zu bilden. Je nach Breite Rillen, senkt sich der ganze Zellkörper ein (Abb. 17 A, 18 C) oder es werden nur Filopodien und Mikrovilli in die Vertiefung eingelassen (Abb. 18 A, B und D).

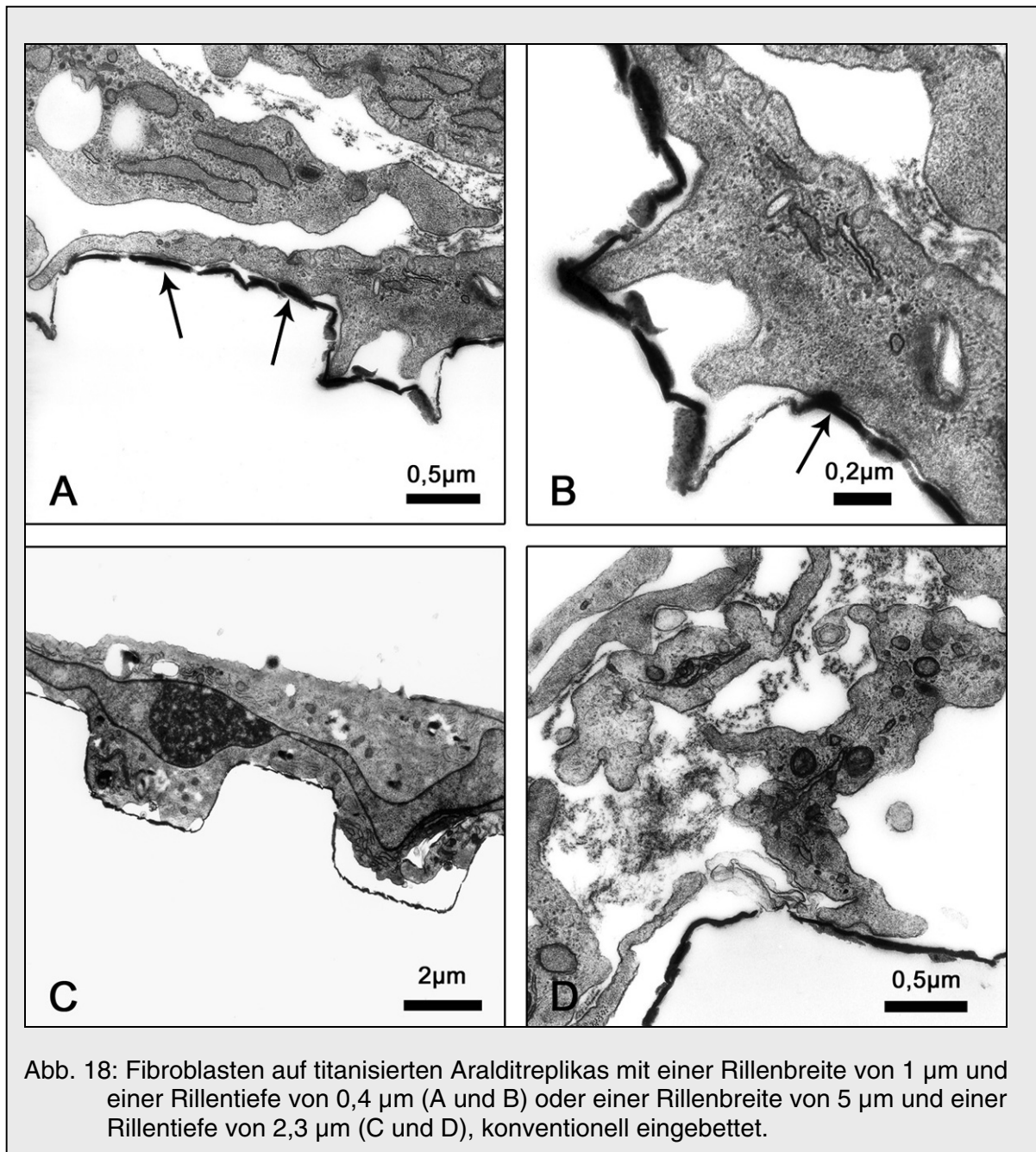
Breite \ Tiefe	1 μm	2 μm	5 μm	10 μm
0,4 μm	+ ooo	+ ooo	+ ooo	
0,8 μm	++ ooo			+ ooo
2,3 μm			++ ooo	
3 μm	+++ o			

Tabelle 2: Anpassung der Zellen an die Geometrie des Substrats.

+ : schwache Orientierung der Zelle an der Rillengeometrie
 ++ : mittlere Orientierung der Zelle an der Rillengeometrie
 +++ : starke Orientierung der Zellen an der Rillengeometrie

o : schwache Auskleidung der Rillen durch zelluläre Substanz
 oo : mittlere Auskleidung der Rillen durch zelluläre Substanz
 ooo : starke Auskleidung der Rillen durch zelluläre Substanz

Daher sind sehr tiefe, enge Strukturen nicht sinnvoll (ab 2 μm Rillentiefe), da die Zellen den Boden der Rillen dann nicht erreichen können. Es sind eher flachere, nicht so breite Strukturen (bis 1 μm tief, dabei kann die Rillenbreite 1 μm oder mehr betragen), die förderlich für die Interaktion von Zelle und Substrat sind. Sehr breite Strukturen (ab 10 μm Rillenbreite) sind aber auch wiederum nicht sinnvoll, da dann die Zellen unter Umständen das Ende der Rillen nicht mehr ausmachen können und damit die Orientierung schwächer wird (vgl. auch Tabelle 2). Dies gilt vor allem für Zelltypen, die nicht so extrem in der Lage sind, sich auszubreiten wie Fibroblasten.



Die Zellen passen sich auf unterschiedliche Weise den Mikrostrukturen an. Manche senken den Zellkern mit in die Rillen ein (Abb. 18 C). Auch andere Organellen, wie zum Beispiel das endoplasmatische Retikulum werden den Strukturen angepasst (Abb. 17 B). Zu bemerken wäre auch noch die hohe Anzahl an Mikrovilli-artigen Strukturen und Filopodien, die die Zellen ausbilden, um die Umgebung abzutasten oder um neue Kontakte zu bilden (Abb. 18 A, B und D). Bei der Darstellung im Elektronenmikroskop lässt sich aber auf Grund der sehr begrenzten Fläche der Zelle,

die im Querschnitt zu sehen ist, nicht sagen, ob die Zellen migrieren oder statisch sind und ob es sich um Filopodien am leading edge handeln könnte. Auffallend ist auch, dass die Zellen besonders an den Ecken (Abb. 17 C und D, 19 A und B) und Unebenheiten (Abb. 18 A und B) des Substrats bevorzugt Kontakte auszubilden scheinen. Diese sind bei dieser Art der Darstellung durch Schwärzungen auf der Innenseite der Membran zu erkennen, was durch die Anhäufung von Proteinen auf der zytoplasmatischen Seite verursacht wird. Es bilden sich also nicht nur an den Kanten des dafür vorgesehenen Rillen-Stege Musters vermehrt Fokalkontakte aus, sondern auch an kleinen, im sub-Mikrometer Bereich befindlichen, bei der Replikation der Siliziumwafer und anschließender Titanisierung entstandenen Unebenheiten.

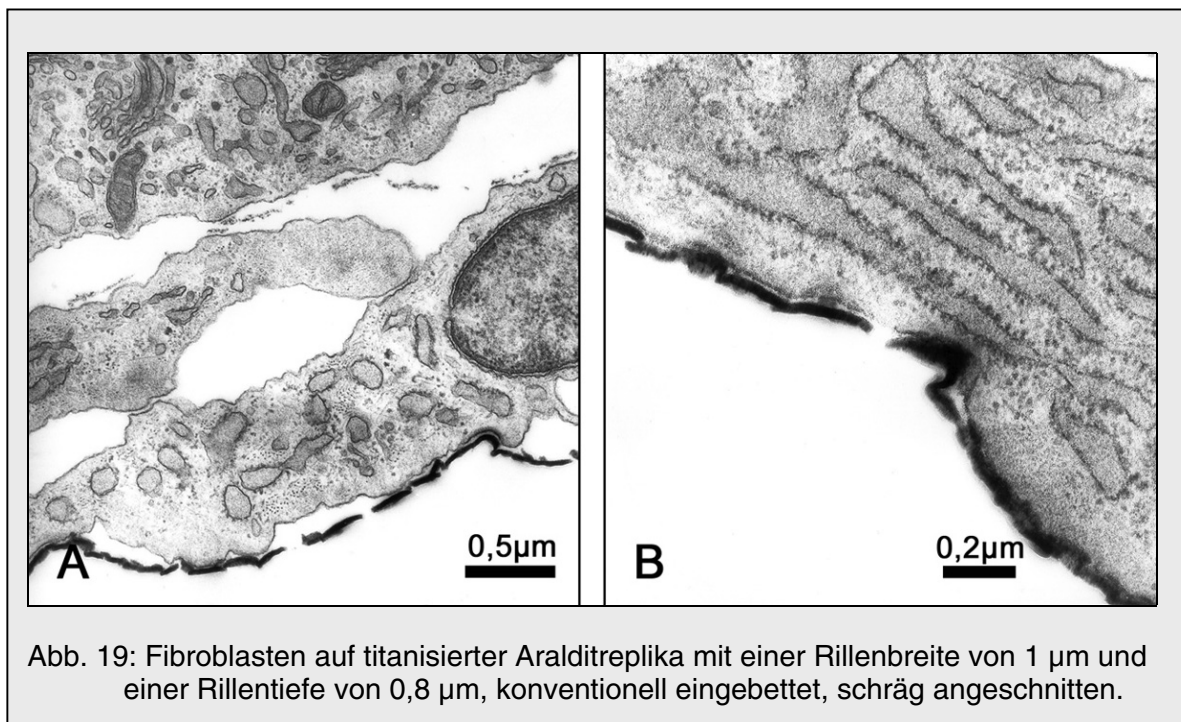


Abb. 19: Fibroblasten auf titanisierter Aralditreplika mit einer Rillenbreite von 1 µm und einer Rillentiefe von 0,8 µm, konventionell eingebettet, schräg angeschnitten.

Mit Hilfe der Replika-Technik und der Untersuchung der Proben im Elektronenmikroskop lässt sich das Verhalten der Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen optimal beobachten, wie sie ihre Form daran anpassen und Kontakte ausbilden. Der genaue Verlauf der Zellmembran ist zu verfolgen und man kann eine Aussage darüber machen, ob die Zellen sich bis auf den Boden der Rillen ausbreiten oder nicht. Diese Beobachtungen sind mit lichtmikroskopischen Methoden nicht

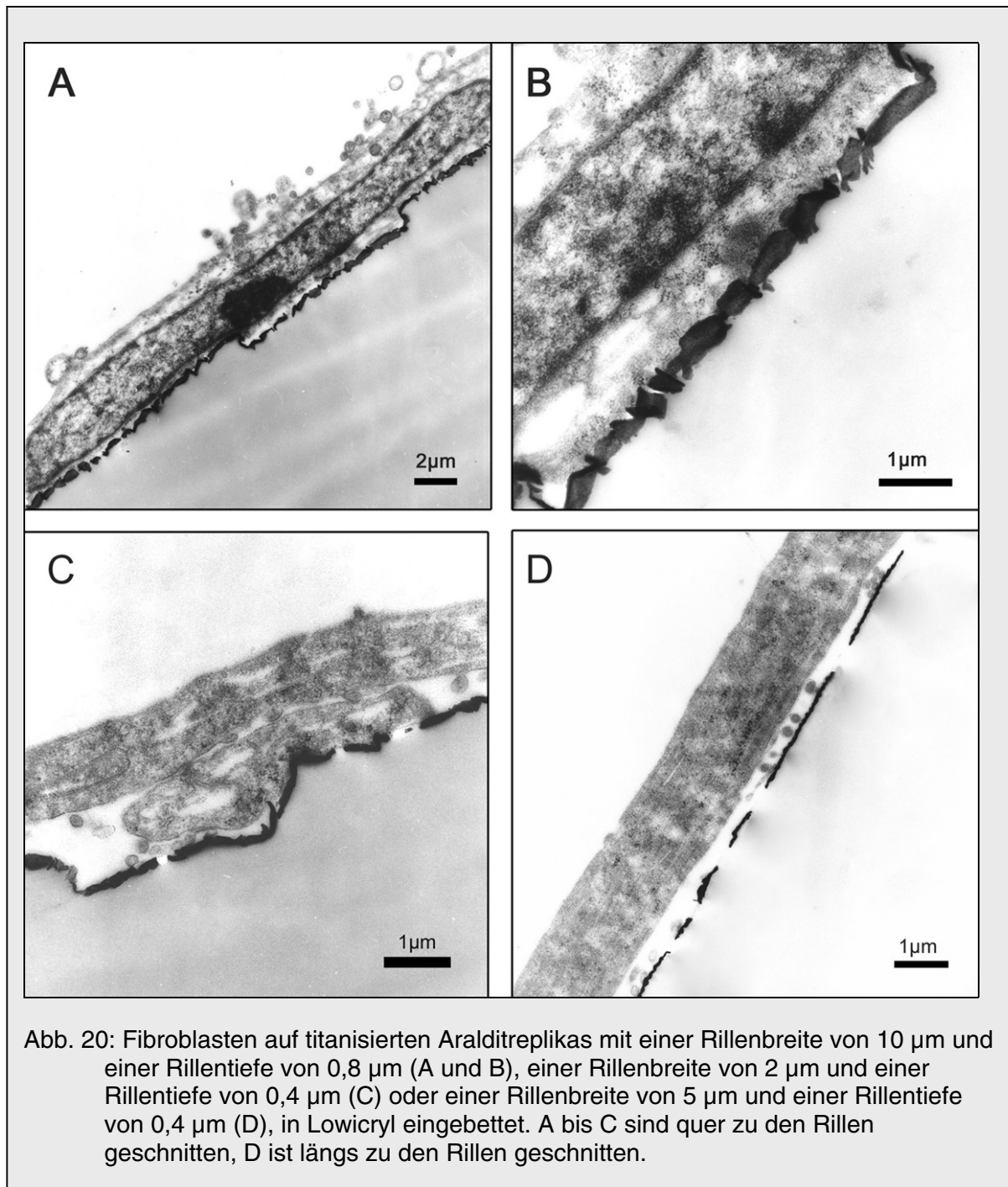
möglich. Mit der hier vorgestellte Technik kann man jedoch nicht die Orientierung der Zellen zeigen, da man im Transmissionselektronenmikroskop einen ultradünnen Querschnitt untersucht. Da die Anpassung der Zellen an die verschiedenen Rillenmuster untersucht werden sollte, wurden die Blöcke in der Regel quer zu den Rillen geschnitten. Um die Orientierung der Zellen als Ganzes beurteilen zu können, bieten sich wiederum die laser-scan- und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen an.

3.5 Tieftemperatur-Einbettung

Im nächste Schritt sollten mit immunzytochemischen Methoden Fokalkontakte sichtbar gemacht werden, um deren Lokalisation dann mit Hilfe des Elektronenmikroskops darzustellen. Da es nicht möglich ist, an Proben, die konventionell in Araldit eingebettet sind, Antikörperreaktionen durchzuführen, muss man auf eine andere Art der Einbettung zurückgreifen, die bei tiefen Temperaturen durchgeführt wird und deswegen eine erhöhte Antigenizität des Untersuchungsmaterials mit sich bringt.

3.5.1 Kryosubstitution

Bei dieser Methode wurden die humanen Gingiva-Fibroblasten erst einige Tage auf den titanisierten Aralditreplikas kultiviert, ganz leicht anfixiert, um den Erhalt der Ultrastruktur zu verbessern und dann in einer CPC (cryo preparation chamber) - Anlage in -168°C kaltes Ethan eingeschossen. Der Vorgang der Kryofixierung bringt den Vorteil mit sich, dass die chemische Fixierung und damit auch die Vernetzung von Proteinen weitgehend entfällt, was wiederum die Antigenizität der Proben erhöht. Die so eingefrorenen Zellen wurden dann in eine AFS (automatic freeze substitution) -Anlage transferiert und bei tiefen Temperaturen in das Kunstharz Lowicryl eingebettet. Lowicryl polymerisiert bei tiefen Temperaturen unter UV-Bestrahlung, im Gegensatz zu Araldit, welches bei 60°C polymerisiert. Damit werden die Proben während der Polymerisierung in der AFS-Anlage nicht so sehr erhitzt und die Proteindegeneration reduziert. Außerdem ist die Vernetzung innerhalb des Kunstharzes Lowicryl nicht so stark wie bei Araldit, womit ein leichteres Eindringen des Antikörpers während der immunzytochemischen Markierung erzielt wird. Hinzu



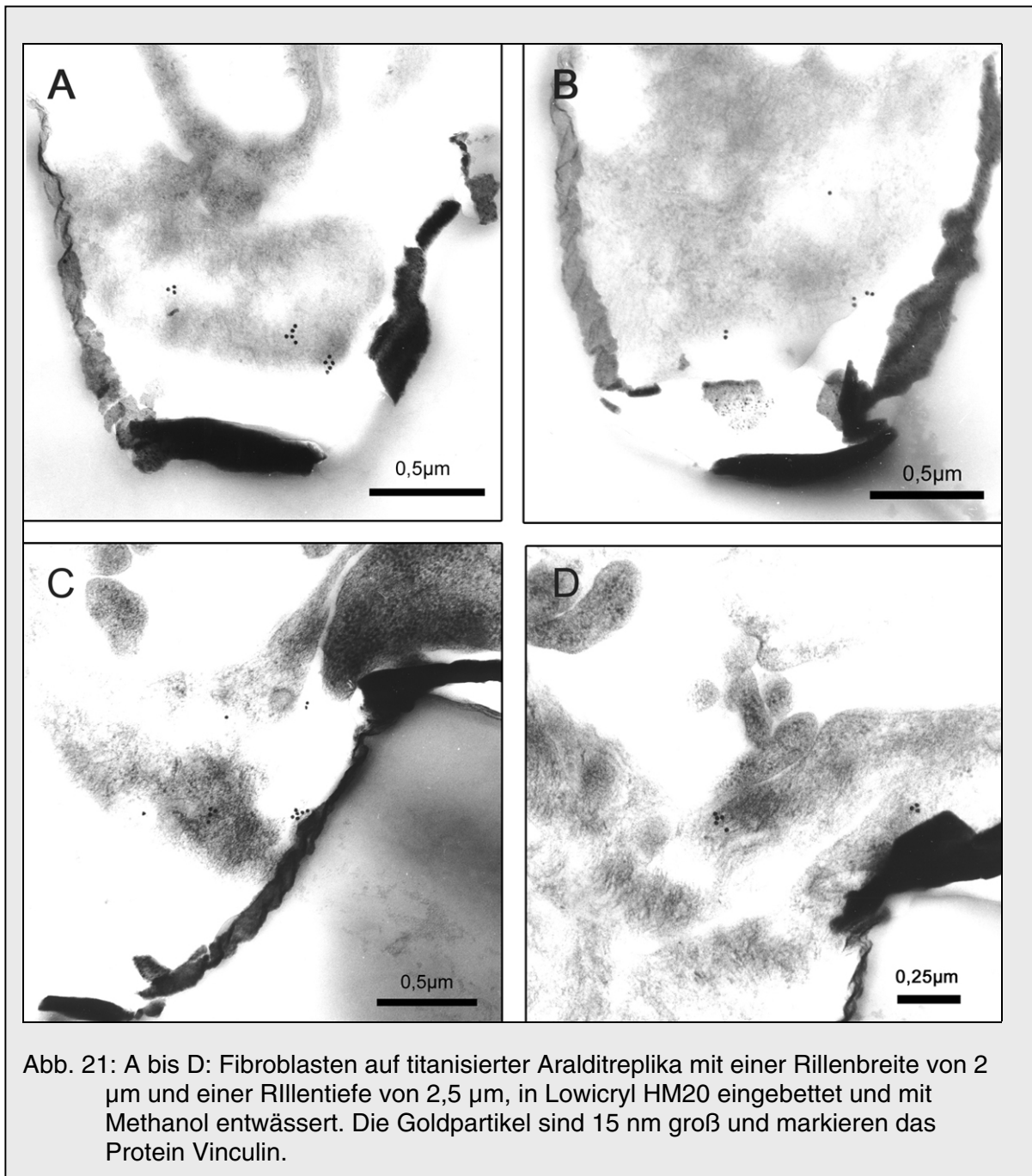
kommt noch, dass durch wesentlich weniger Fixierungsschritte im Vergleich zu der konventionellen Einbettung in Araldit die Proteine in den Zellen weniger vernetzt und damit auch weniger maskiert werden und dem Antikörper besser zugänglich sind.

Der Nachteil dieser Methode liegt allerdings eindeutig in der geringeren Strukturerhaltung der Proben. Einzelne Organellen innerhalb der Zellen sind bei

dieser Technik schwieriger auszumachen, da die Membranen aufgrund der schwächeren Fixierung und Kontrastierung nicht so deutlich sichtbar sind. Das Endprodukt dieser Einbettung war ein mehrschichtiges Werkstoff-Blöckchen aus einer titanisierten und mit Zellen besäten Aralditreplica und dem Einbettmedium Lowicryl. Um das Endprodukt einheitlicher zu gestalten, war versucht worden, Lowicrylreplikas herzustellen. Dies war jedoch nicht möglich, da Lowicryl das Silikon auflöst und damit die Mikrostrukturen zerstört. Es zeigte sich aber, dass sich die titanisierte Aralditreplica optimal mit Lowicryl verband und die auspolymerisierten Werkstoff-Blöckchen ultradünn geschnitten werden konnten. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis einer Tieftemperatur-Einbettung. Die Zellmembranen sind nicht so gut zu erkennen wie zum Beispiel in Abbildung 17, aber man sieht deutlich, dass die Zellen in engen Kontakt zur Oberfläche des mikrostrukturierten Substrats treten. Es handelt sich hierbei um flache Strukturen und man sieht deutlich, wie die Zellen die gesamte Rille ausfüllen können (Abb. 20 A und B) und sich dem Verlauf der Oberfläche anpassen (Abb. 20 C). Abbildung 20 D zeigt einen Schnitt entlang der Längsachse der Rillen, dabei wird die extrem längliche Form der Fibroblasten und ihre längs orientierten Mikrofilamente sichtbar. Die Mikrofilamente sind im Querschnitt nicht oder nur als Punkte zu sehen, da sie sich ebenfalls entlang der Rillen orientieren (vgl. auch Abb. 9 B, Vimentin-Filamente). In Abbildung 20 A und D sind zahlreiche Mikrovilli-ähnliche Strukturen zu sehen, die an der Zelloberfläche ausgeprägt werden.

3.5.2 Immunogold-Markierung von Vinculin

Bei einer immunzytochemischen Markierung, die nach der Einbettung am Ultradünnschnitt stattfindet, spricht man auch von 'Post-Embedding-Labeling'. Nach der Tieftemperatur-Einbettung in Lowicryl werden dabei von den Proben Ultradünnschnitte angefertigt und daran eine Markierung von Vinculin durch Goldpartikel von 15 nm Größe durchgeführt. Die Abbildung 21 zeigt eine solche Immunogold-Markierung an Fibroblasten auf einer Replica mit einem Rillennmuster von 2,5 μm Tiefe und 4 μm Periode, welche in den hier vorgestellten Untersuchungen zu den schmalen und tiefen Rillen gehört. Das Protein Vinculin ist durch die Goldpartikel markiert und die so gekennzeichneten Fokalkontakte sind vor



allen in den Rillen, an deren Boden (Abb. 21 A und B) oder Seitenwänden (Abb. 21 C) zu finden. Abbildung 22 und 23 zeigen ebenfalls Immunogold-Markierungen von Vinculin, hierbei aber an Fibroblasten, die auf Aralditreplikas mit im Vergleich breiten, flachen Rillennustern gewachsen waren. Hier sind die Goldpartikel vor allem an den Kanten des Substrats (Abb. 22 A und D, 23 B), aber auch an Unebenheiten, die sich im sub-Mikrometer-Bereich befinden (Abb. 23 A) zu sehen. Interessant sind auch die zahlreichen Filopodien und mikrovilli-artigen Strukturen, die die Zellen ausgebildet

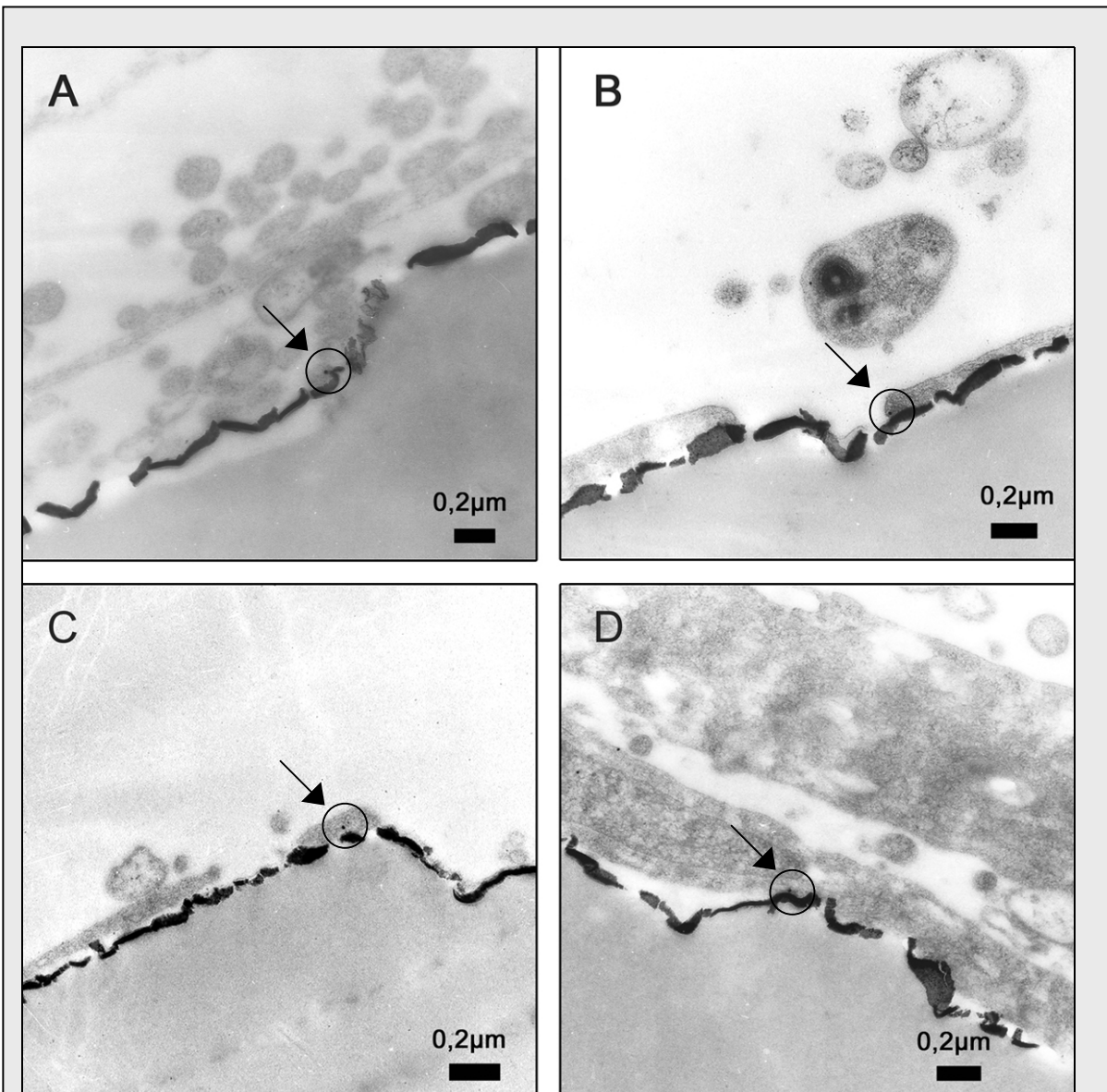


Abb. 22: Fibroblasten auf titanisierten Aralditreplicas.

A: Rillenbreite 5 μm ; Rillentiefe 0,4 μm ; in Lowicryl HM20 eingebettet und mit Methanol-entwässert

B: Rillenbreite 10 μm ; Rillentiefe 0,8 μm ; in Lowicryl HM20 eingebettet und mit Methanol entwässert

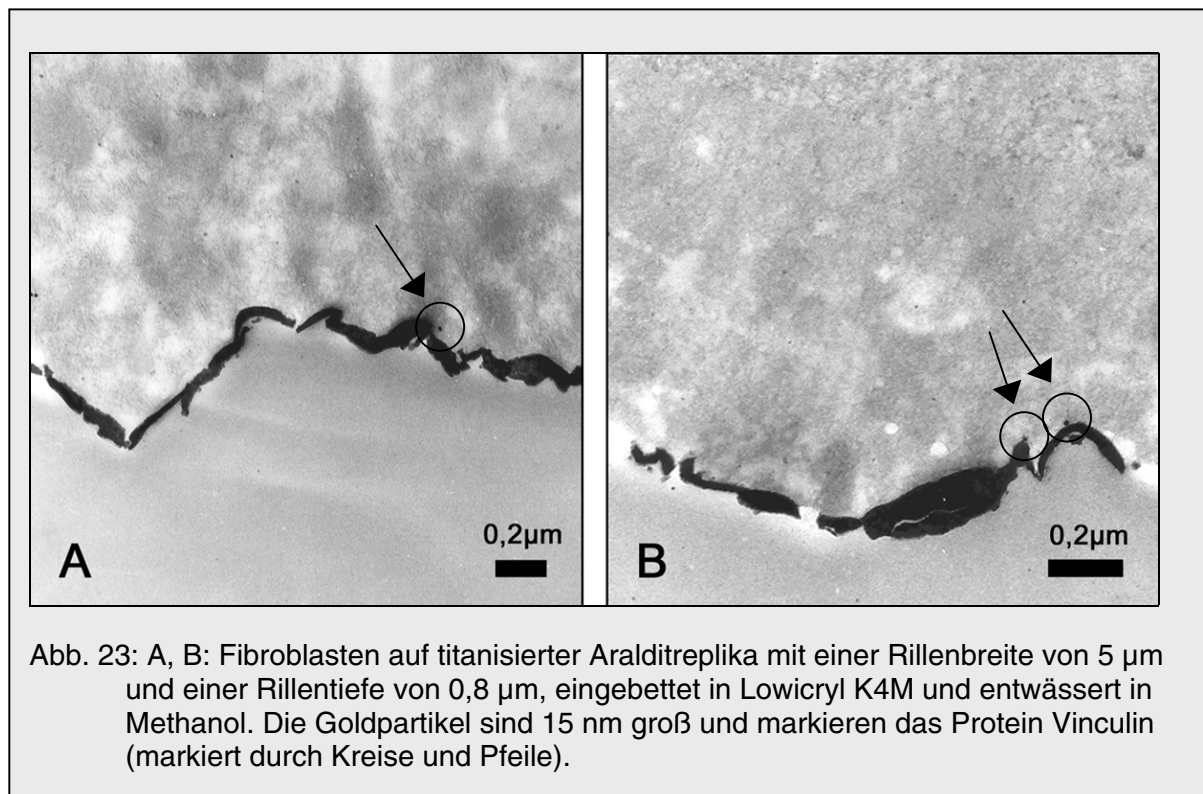
C: Rillenbreite 10 μm ; Rillentiefe 0,4 μm ; in Lowicryl HM20 eingebettet und mit Ethanol entwässert

D: wie C

Die Goldpartikel sind 15 nm groß und markieren das Protein Vinculin (markiert durch Kreise und Pfeile).

haben und die entweder auf dem Substrat entlang kriechen oder von der Zelle weg frei in die Umgebung ragen. An ihnen sind auch oft Goldpartikel zu finden, vor allem

an Kontaktpunkten zum Substrat (Abb. 22 B und C). Bei den tiefen Strukturen fällt auf, dass die Zellen nicht den Rillenboden erreichen, was aber auch daran liegen kann, dass der Zellkörper während der Entwässerung bei der Einbettung geschrumpft ist. Allerdings tritt dieses Phänomen bei den flachen Strukturen nicht auf, weswegen die Vermutung nahe liegt, dass die Zelle tatsächlich nicht den kompletten Raum der Rillen ausgefüllt hat.

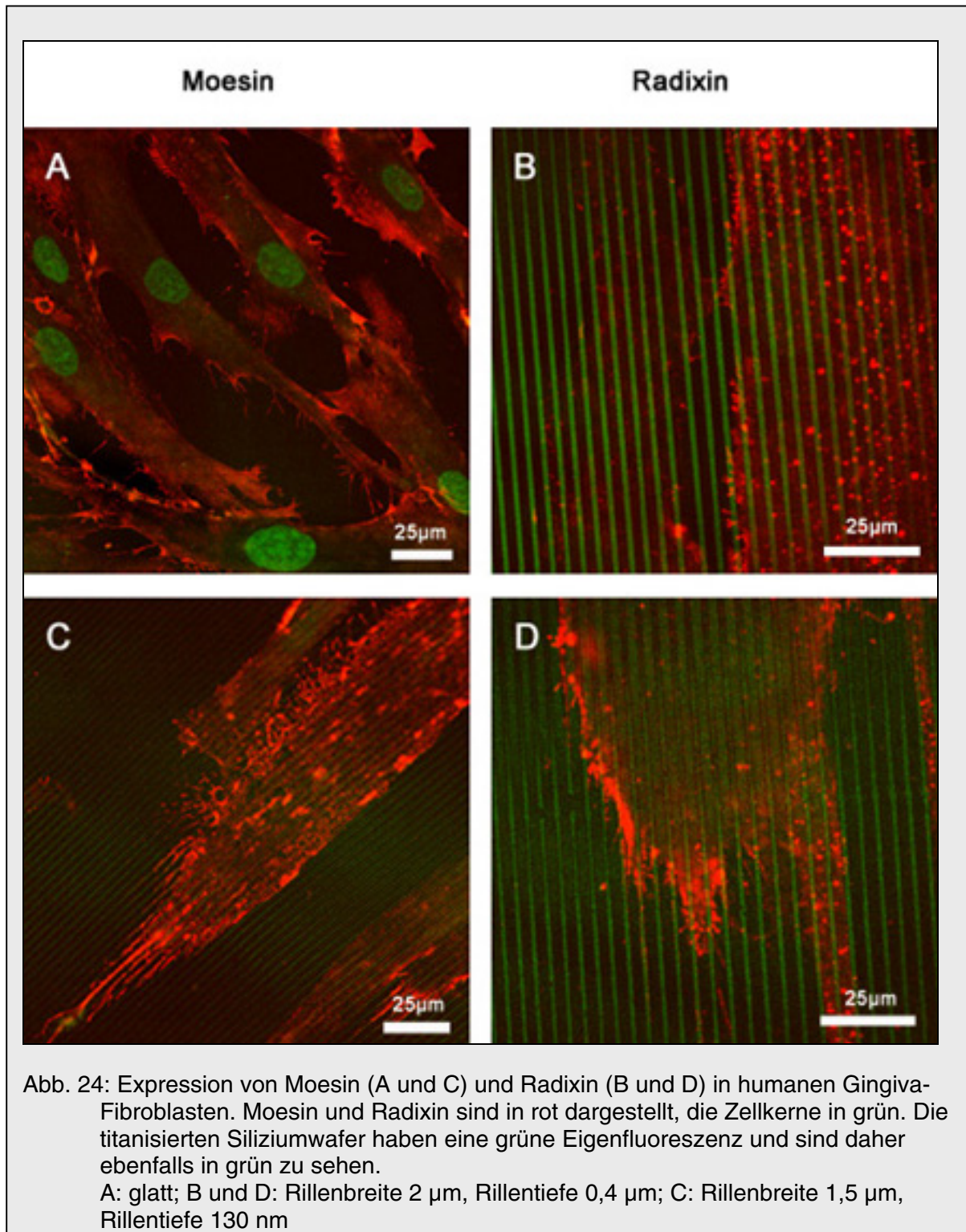


Bei der Auswertung der Markierungen musste festgestellt werden, dass eine Quantifizierung auf elektronenmikroskopischem Niveau von Immunogoldpartikeln, die die vorhandenen Vinculin-Moleküle repräsentieren, nicht möglich ist. Man kann die Anzahl der Goldpartikel nicht mit der Stärke der Adhäsion auf den Substraten mit unterschiedlichen Rillenmustern in Relation setzen. Die Intensität der mit Goldpartikeln markierten Vinculin-Moleküle ist zu gering, was an der minimalen Fläche liegt, die auf der Oberfläche des Ultradünnschnitts den Antikörpern bei der Markierung zugänglich ist. Fibroblasten sind zwar extrem große Zellen, die an ihrer Unterseite zahlreiche Fokalkontakte ausbilden, diese müssen jedoch beim Ultradünnschneiden genau getroffen werden um mit Erfolg markiert zu werden. Es

besteht auch die Möglichkeit, dass die Antigene bei der aufwendigen Einbettung entweder maskiert, degeneriert oder ausgewaschen wurden. Obwohl verschiedene Entwässerungsmedien (Methanol: Abb. 21 A bis D, 22 A und B, 23 A und B; Ethanol: 22 C und D) und zwei verschiedene Methacrylate (Lowicryl HM20: Abb. 21 A bis D, 22 A bis D; Lowicryl K4M: 23 A und B) getestet wurden, konnte die Markierungsdichte nicht erhöht werden. Es lässt sich daher lediglich eine Aussage über die Lokalisierung von Vinculin auf dem Rillenmuster treffen. Ein quantitativer Vergleich über die Anordnung von Vinculin zwischen den verschiedenen Geometrien kann jedoch nicht angestellt werden.

3.6 ERM-Proteine

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung von Mechanismen, die es den Zellen ermöglichen, sich an der Topographie der Oberfläche anzupassen. Die drei Proteine der ERM-Familie, Ezrin, Radixin und Moesin, sind vor allem für ihre Eigenschaft als Linkerproteine zwischen Zellmembranen und Aktin-Filamenten bekannt geworden. Im Unterschied zu Proteinen der Fokalkontakte, wie zum Beispiel Vinculin, sind sie jedoch nicht in Zell-Substrat-Kontakten lokalisiert, sondern vielmehr in Membranstrukturen der freien Zelloberfläche. ERM-Proteine sind also besonders dort exprimiert, wo die Membran stark gefaltet ist, um die Zelloberfläche zu vergrößern, wie zum Beispiel bei Lamellipodien und Filopodien migrierender Zellen oder bei Mikrovilli. In den hier vorgestellten elektronenmikroskopischen Studien war immer wieder zu beobachten, dass die Zellen auf den mikrostrukturierten Plättchen bemerkenswert viele Membranausstülpungen auf ihrer Oberfläche ausgebildet hatten. Diese erschienen entweder auf der freien Seite der Zelloberfläche oder in Form von Mikrovilli oder Filopodien, die sich zwar vom Zellkörper weg erstreckten, aber dem Substrat auflagen. Grundlage für die nun folgenden Studien war die Frage, ob es sich bei diesen mehrfach beobachteten Membranausstülpungen um Strukturen handeln könnte, die ERM-Proteine enthalten und somit von ihnen reguliert und induziert werden. Ezrin, Radixin und Moesin wurden auf ihr Vorkommen und ihre Verteilung in Gingiva-Fibroblasten, die auf verschiedenen Mikrostrukturen und auf verschiedenen Materialien kultiviert worden waren, hin untersucht.



3.6.1. Verteilung von ERM Proteinen in der Zelle

Gingiva-Fibroblasten exprimieren alle drei ERM-Proteine, Ezrin, Radixin, und Moesin. Abbildung 24 zeigt die immunzytochemische Markierung von Radixin und

Moesin in diesen Zellen. Besonders auffallend ist die Markierung von Mikrovilli und Filopodien an der Zellperipherie. Alle drei ERM-Proteine konnten in diesen Strukturen gefunden werden und scheinen also an deren Bildung und Regulierung beteiligt zu sein. Es gibt auch eine zytoplasmatische Markierung der ERM-Proteine, wobei viele Punkte in der Zelle markiert werden (Abb. 24 B). Es kann sich dabei aber nicht um Substrat-Kontakte handeln, da die ERM-Proteine in diesen Strukturen nicht vorkommen (Denker et al., 2000). Möglicherweise handelt es sich um inaktive Moleküle, die geklustert im Zytoplasma vorliegen. Leider konnte aus technischen Gründen nicht geklärt werden, ob diese intrazellulär markierten Moleküle mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Da die Markierung der ERM-Proteine ausschließlich bei einer vorangegangenen Fixierung mit Methanol möglich war und die Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts wiederum nur bei Fixierung mit Paraformaldehyd aber nicht mit Methanol durchführbar war, konnten diese beiden zellulären Komponenten nicht gleichzeitig markiert werden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die intrazelluläre, punktförmige Markierung der ERM-Proteine eine unspezifische Markierung durch die hier verwendeten Antikörper ist, da sie in den Kontrollen ohne Primärantikörper nicht zu sehen ist.

3.6.1.1. Untersuchung von verschiedenen Geometrien

Zunächst wurde die Verteilung der ERM-Proteine auf verschiedenen Geometrien untersucht. Dazu wurden titanisierte Siliziumplättchen, die verschiedene Rillenmuster auf ihrer Oberfläche trugen, mit Gingiva-Fibroblasten besät und mit Antikörpern gegen Radixin (Abb. 25, 26 A und B) bzw. Moesin (Abb. 26 C und D, 27) behandelt. Ziel dieser Untersuchung war es, festzustellen ob es Unterschiede in der Expression von ERM-Proteinen gibt, wenn sie auf verschiedenen mikrostrukturierten Geometrien oder auf glattem Substrat wachsen. Dabei kann man beobachten, dass die ERM-Proteine auf allen Rillenmustern exprimiert werden, also auf flachen und breiten ebenso wie auf tiefen und engen. In allen Fällen werden Mikrovilli und Filopodien markiert. Es gibt jedoch auch die zytoplasmatische Färbung. Es fällt jedoch auf, dass auf den tiefen und engen Mikrostrukturen weniger Filopodien zu sehen sind (Abb. 26 B und D). Die Zellen sind auf diesen Strukturen auch nicht so sehr ausgebreitet, sondern lang und schmal. Diese tiefen Strukturen hindern also die Zelle daran, sich

seitlich auszubreiten und erlauben lediglich eine starke Orientierung entlang der Rillen, was dazu führt, dass die äußere Form der Zellen dann extrem lang und schmal wird und sie kaum Kontakte zu ihren Nachbarzellen bilden (Tabelle 3).

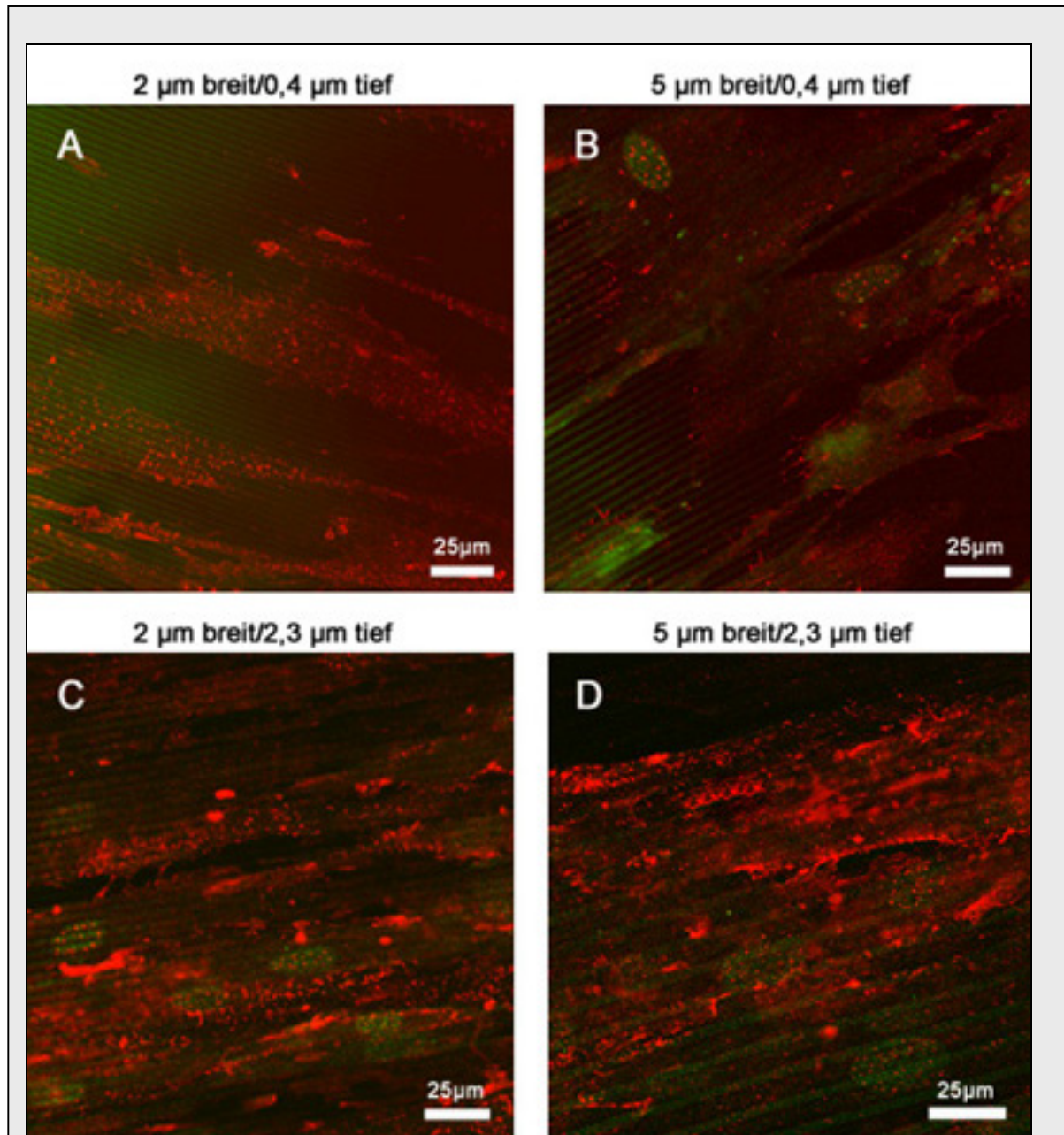


Abb. 25: A bis D: Verteilung von Radixin in Fibroblasten, die auf verschiedenen mikrostrukturierten und titanisierten Siliziumwafern wachsen. Die Rillenbreite und die Rillentiefe der Muster sind jeweils angegeben. Radixin ist in rot dargestellt, die Zellkerne in grün. Die titanisierten Siliziumwafer haben eine grüne Eigenfluoreszenz und sind daher ebenfalls in grün zu sehen.

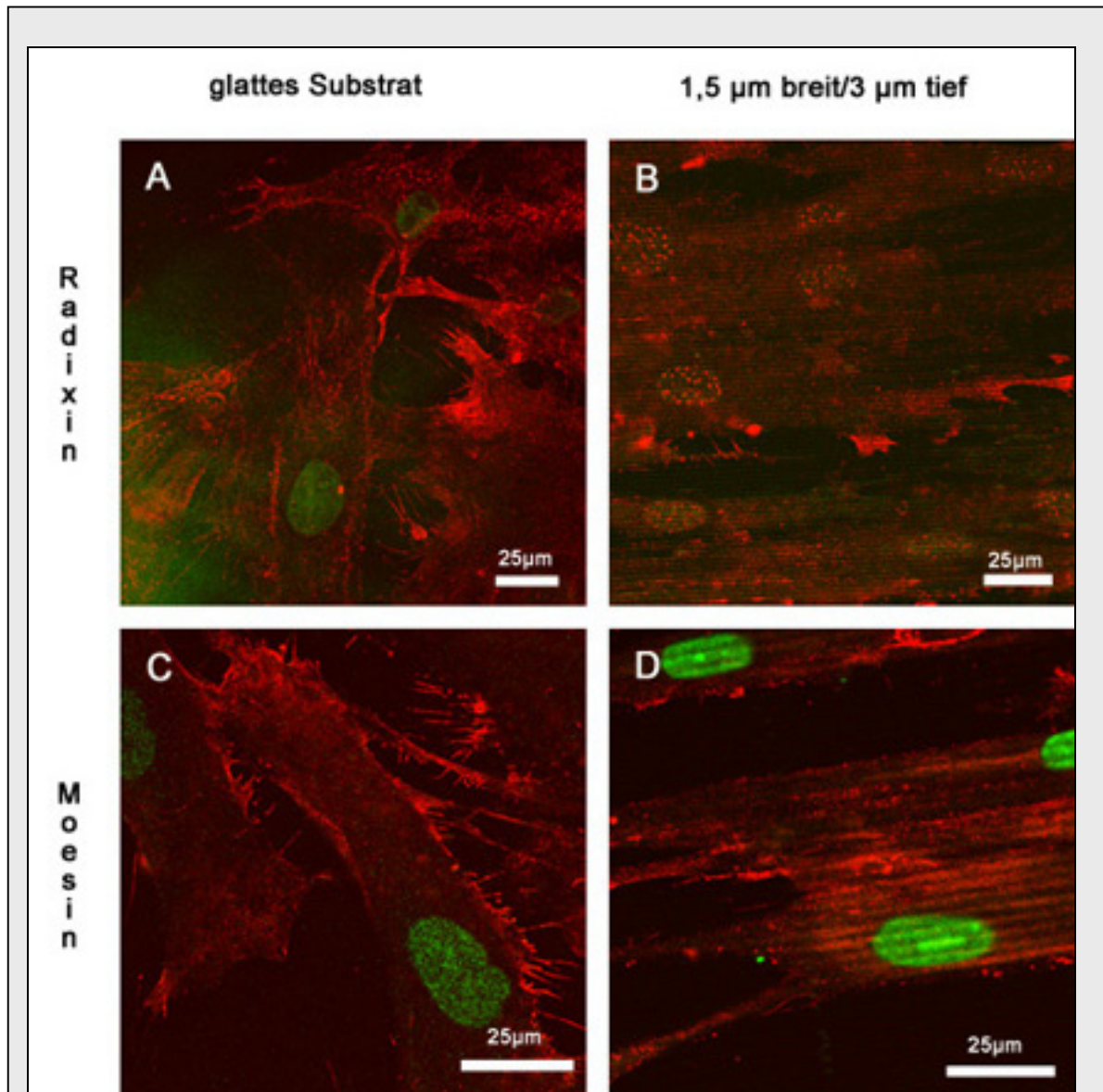
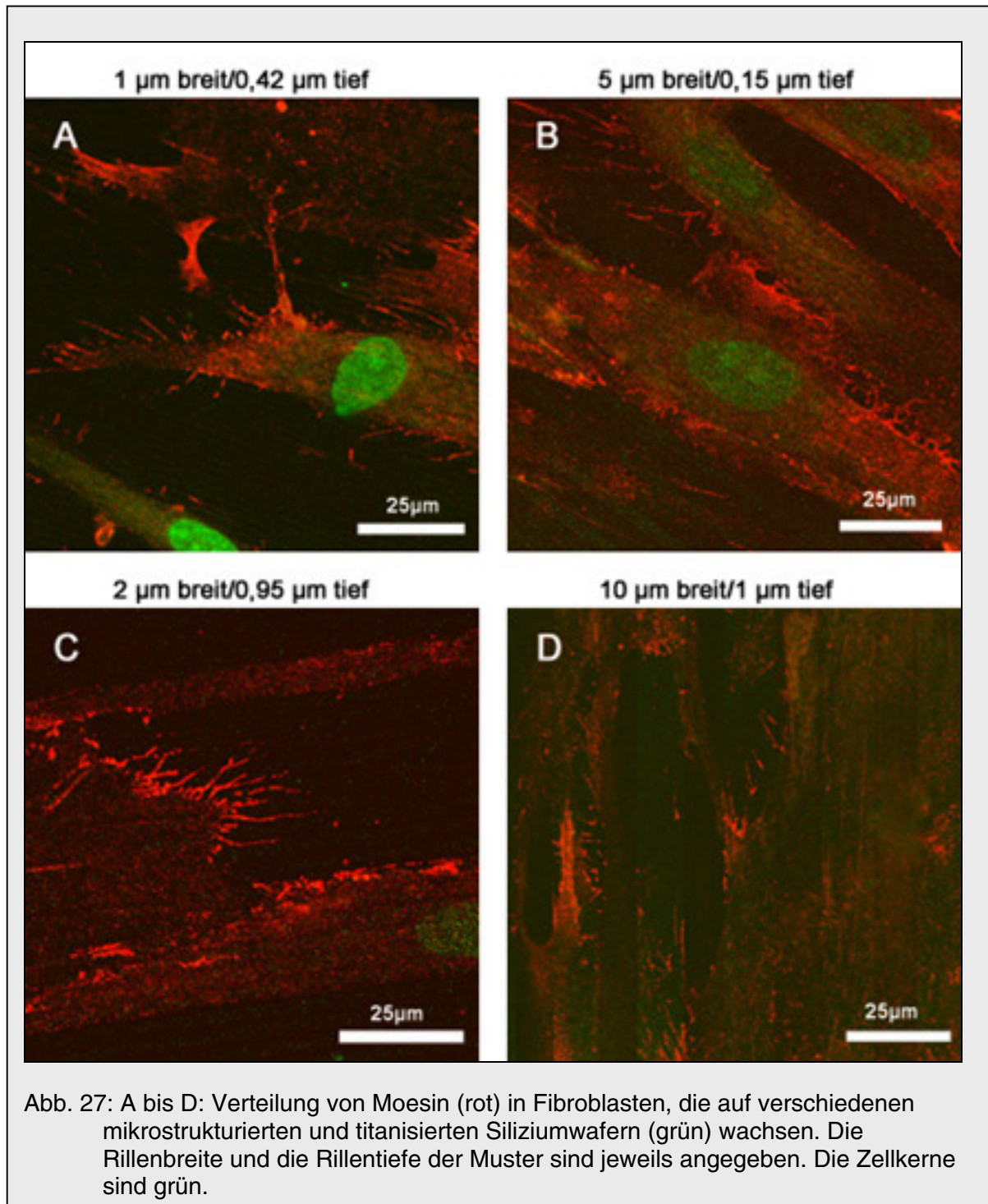


Abb. 26: Verteilung von Radixin (A und B) und Moesin (C und D) in Fibroblasten, die auf glatten (A und C) oder mikrostrukturierten (B und D; Rillenmuster mit 1,5 µm Rillenbreite und 3 µm Rillentiefe) und titanisierten Siliziumwafern wachsen. Radixin und Moesin sind in rot dargestellt, die Zellkerne in grün. Die titanisierten Siliziumwafer haben eine grüne Eigenfluoreszenz, und sind daher ebenfalls in grün zu sehen.

Diese Beobachtung der starken Orientierung und eingeschränkten Ausbreitung von Zellen auf tiefen Strukturen wurde auch schon von anderen Gruppen beobachtet (Dalton et al., 2001). Ein weiterer Punkt, der die Anzahl der ausgebildeten Mikrovilli und Filopodien zu beeinflussen scheint, ist die Zelldichte.



Bei der Auswertung der Versuche konnte immer wieder beobachtet werden, dass die Markierung von ERM-positiven Mikrovilli und Filopodien dann am auffallendsten und zahlreichsten ist, wenn die Zellen nicht zu dicht auf den Substraten gewachsen sind und keinen geschlossenen Zellrasen bilden. Diese Beobachtung erscheint logisch,

wenn man in Betracht zieht, dass Zellen, die vereinzelt wachsen und ausreichend Platz zur Verfügung haben, um sich auszubreiten, auch mehr Platz haben, um Zellausläufer auszusenden, um die Beschaffenheit der Umgebung zu erkunden. Zellen, die in großer Dichte auf dem Substrat wachsen, bilden einen dichten Zellrasen auf den Substrat, sind in ihren Ausbreitungsmöglichkeiten wesentlich mehr eingeschränkt und bilden daher weniger oder gar keine Zellausläufer aus (nicht gezeigt). Überraschenderweise konnte kein Unterschied in der Expression von ERM-Proteinen im Vergleich zwischen glatten und mikrostrukturierten Substraten festgestellt werden. Auf glatten Oberflächen bildeten sich ebenfalls zahlreiche Mikrovilli und Filopodien aus. Die Mikrostrukturen scheinen also keinen Einfluss auf die Ausbildung dieser zellulären Membranausstülpungen zu haben (Tabelle 3).

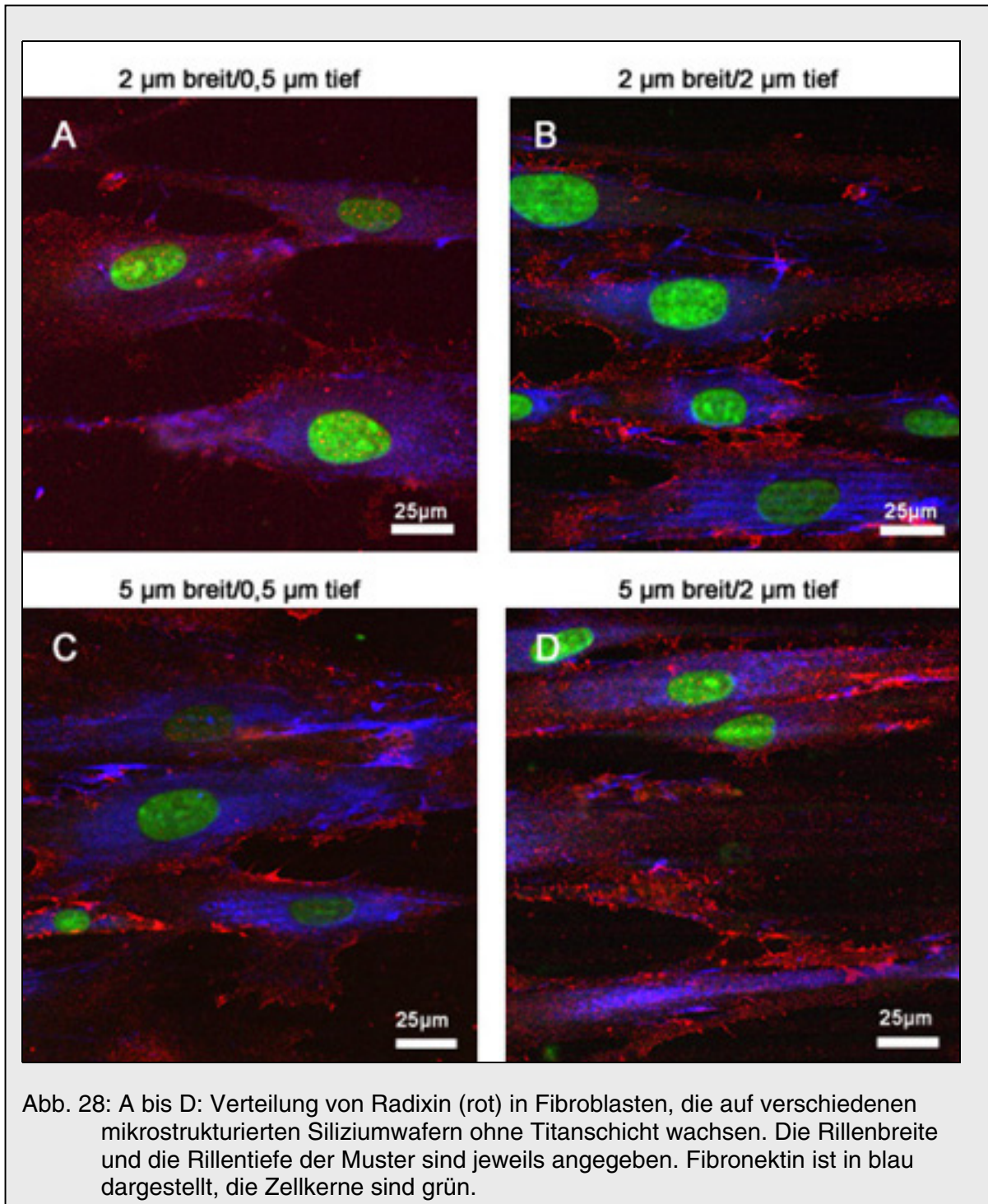
Geometrie der Rillen/Stege	Anzahl d. Filopodien (Radixin)	Anzahl d. Filopodien (Moesin)	Orientierung der Filopodien	Orientierung der Zellen	Ausbreitung der Zellen
1 µm breit/ 0,42 µm tief		+++	---	+	++
1,5 µm breit/ 0,13 µm tief		+++	---	++	++
1,5 µm breit/ 3 µm tief	++	++	+++	+++	-
2 µm breit/ 0,95 µm tief		+++	+	++	++
2 µm breit/ 0,4µm tief	+++		---	++	++
2 µm breit/ 2,3 µm tief	+++		++	+++	+
5 µm breit/ 0,15 µm tief		+++	---	+	++
5µm breit/ 0,4 µm tief	+++		---	++	++
5 µm breit/ 2,3 µm breit	+++		++	+++	+
10 µm breit/ 1 µm tief		+++	---	+	++
glatt	+++	+++	---	---	+++

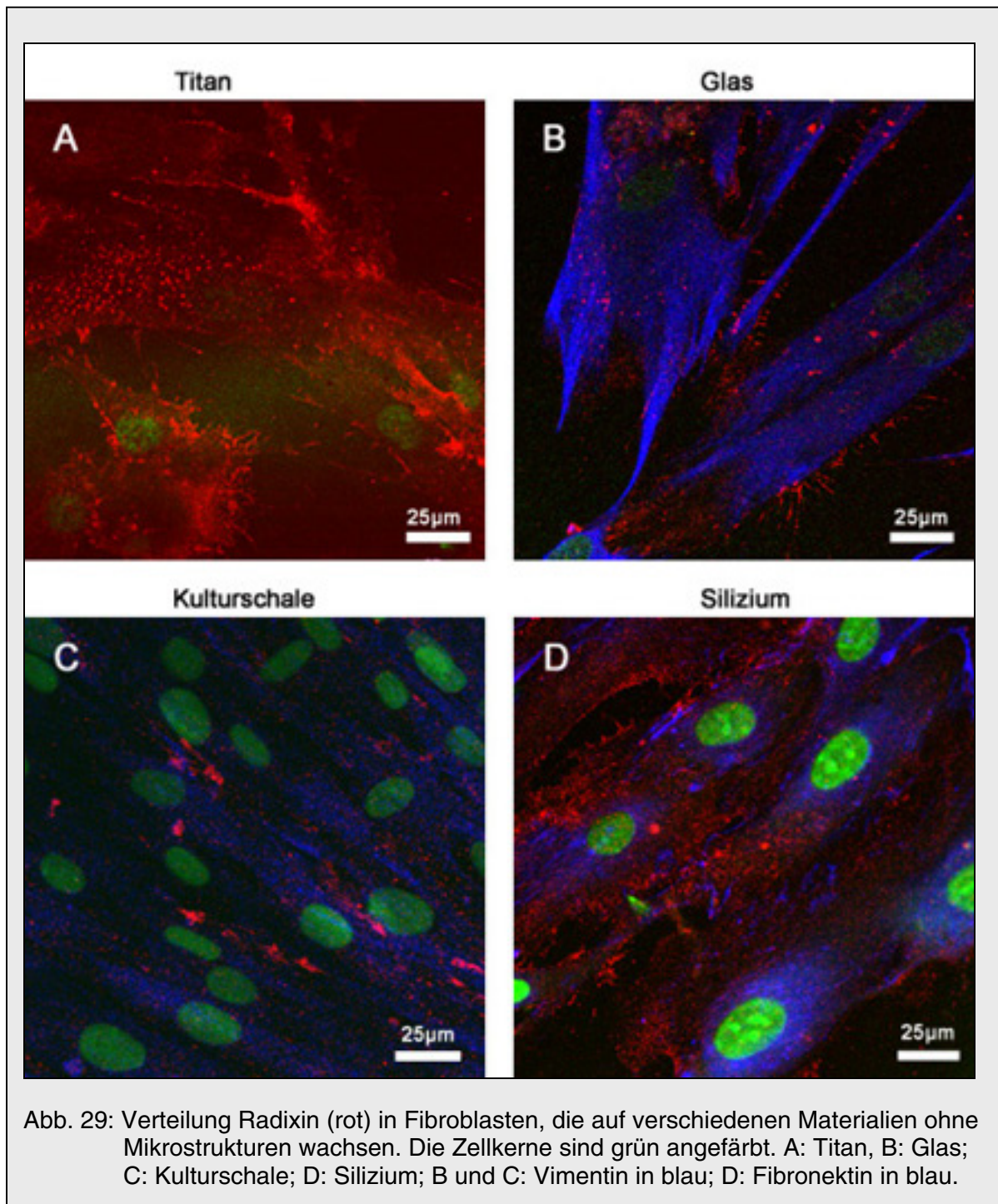
Tabelle 3: Ausbildung und Orientierung von ERM-positiven Filopodien auf verschiedenen mikrostrukturierten und titanisierten Substraten.

Je ausgeprägter die Orientierung, desto mehr + Zeichen; je undeutlicher die Orientierung, desto weniger + Zeichen und mehr - Zeichen wurden vergeben.

3.6.1.2. Untersuchung von verschiedenen Materialien

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Beschaffenheit des Substrats, auf dem die Zellen wachsen, einen Einfluss auf die Ausbildung von Mikrovilli und Filopodien und die Expression von ERM-Proteinen hat. In Abbildung 28 ist eine Radixin-Markierung





an Zellen, die auf verschiedenen mikrostrukturierten Siliziumwafern ohne Titanschicht gewachsen waren, dargestellt.

Es sind einige ERM-positive Filopodien zu erkennen, jedoch im Vergleich zu Zellen auf titanisierten Siliziumplättchen sind es sehr wenige. Abbildung 29 zeigt den Unterschied zwischen Glas, Kulturschale (Plastik), Silizium und Titan. In

Kulturschalen konnten generell keine ERM-positiven Mikrovilli oder Filopodien detektiert werden (Abb. 29 C). Es gibt zwar eine schwache zytoplasmatische Färbung, wie in Abschnitt 3.6.1. beschrieben, diese ist aber die einzige, die man auf diesem Material finden kann. Bei Zellen, die auf Glas- oder Silizium-Plättchen ausgesät wurden, finden sich einige wenige und vereinzelt ERM-positive Filopodien (Abb. 29 B und D), jedoch nicht so ausgeprägt wie auf Titan-bedeckten Substraten. Zellen, die hingegen auf Titan gewachsen waren, bilden zahlreiche, gut ausgebildete ERM-positive Filopodien aus (Abb. 29 A). Offensichtlich hat die Beschaffenheit des Substrats, auf dem die Zellen wachsen, einen erheblichen Einfluss auf ihr Verhalten hinsichtlich der Regulierung von Zelloberflächenstrukturen. Dieser Einfluss, der von der Art des Materials ausgeht, scheint größer zu sein als der Einfluss, der von der Mikrostrukturierung des Substrats ausgeht. Die Zelle antwortet also auf die Beschaffenheit des Materials, auf dem sie sich befindet, mit der Bildung von aktiven ERM-Molekülen und der darauffolgenden Ausbildung von Mikrovilli und Filopodien. Titan ist bekannt für seine Biokompatibilität und wird daher schon seit Jahren erfolgreich als Material für Implantate eingesetzt. Diese Ergebnisse weisen nun auf einen interessanten Zusammenhang zwischen der Biokompatibilität von Titan auf der einen und den Aufgaben der ERM-Proteine in der Zelle auf der anderen Seite hin.

3.6.1.3. Immunogold-Markierung von ERM-Proteinen

Schließlich kann man die Verteilung der ERM-Proteine auch mit der in den Abschnitten 3.4. und 3.5. beschriebenen elektronenmikroskopischen Methoden darstellen. Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die immunzytochemische Markierung von Ezrin, Radixin und Moesin an Zellen, die auf mikrostrukturierten Substraten gewachsen waren. In Abbildung 30 D und Abbildung 31 handelt es sich um Einbettungen mit dem Kunstharz Lowicryl HM20, bei Abbildung 30 A, B und C wurde das Kunstharz Lowicryl K4M benutzt. Bei keinem der verwendeten Kunstharze zeichnet sich jedoch eine Verbesserung der Intensität der Markierung ab. Diese Markierungen bestätigen auf ultrastruktureller Ebene die Lokalisation der ERM-Proteine in den Filopodien (Abb. 30 A, B und C, Abb. 31 A). Sie zeigen auch, dass die ERM-Proteine nicht speziell an den Kontakten der Zelle zum Substrat zu finden sind. Die Unterschiede zwischen der Intensität der Markierung zwischen Radixin

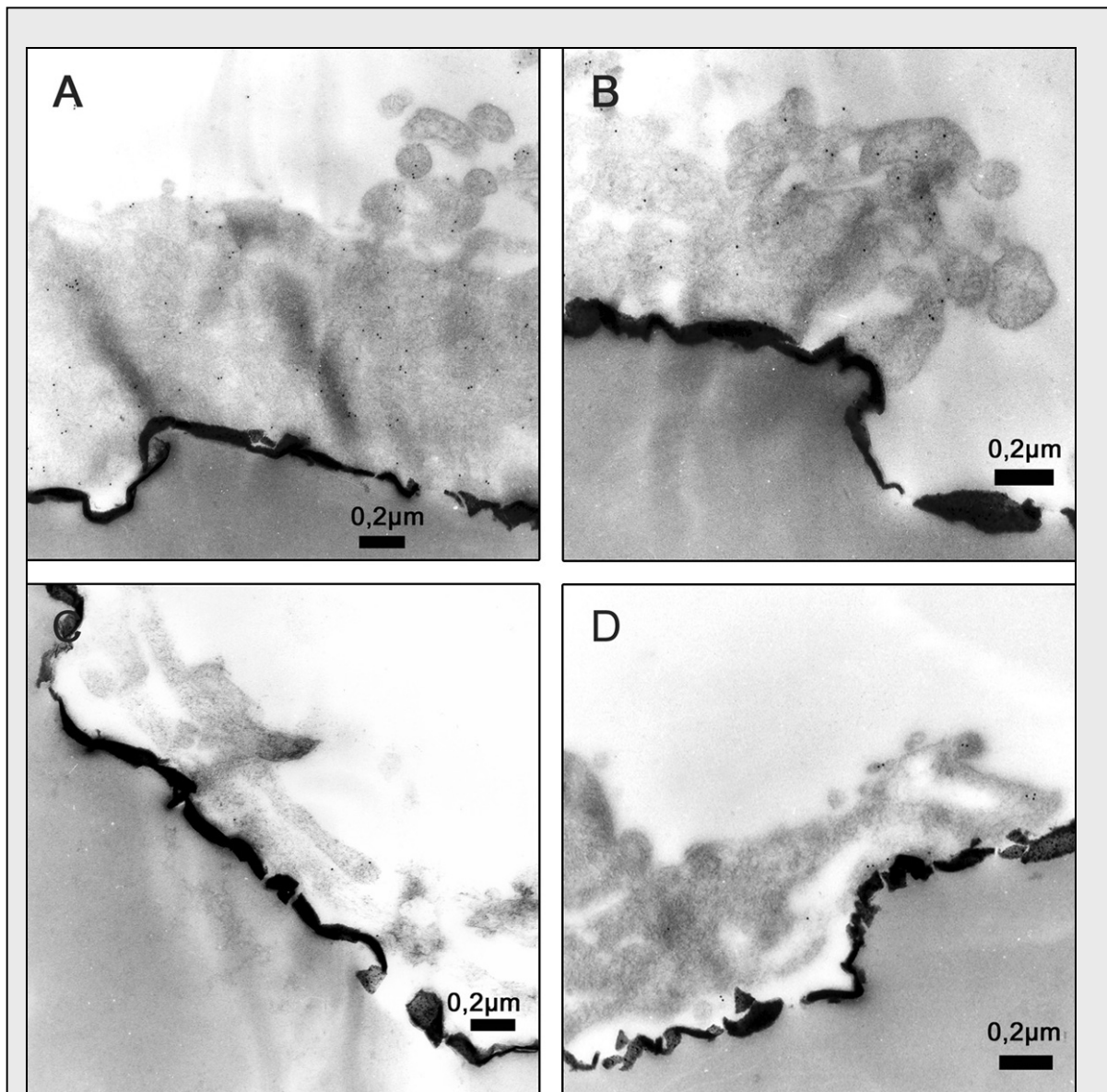


Abb. 30: : Fibroblasten auf titanisierten Aralditreplikas.

A: Rillenbreite 5 μm ; Rillentiefe 0,8 μm ; in Lowicryl K4M eingebettet und mit Methanol-entwässert. Die Goldpartikel sind 10 nm groß und markieren das Protein Ezrin.

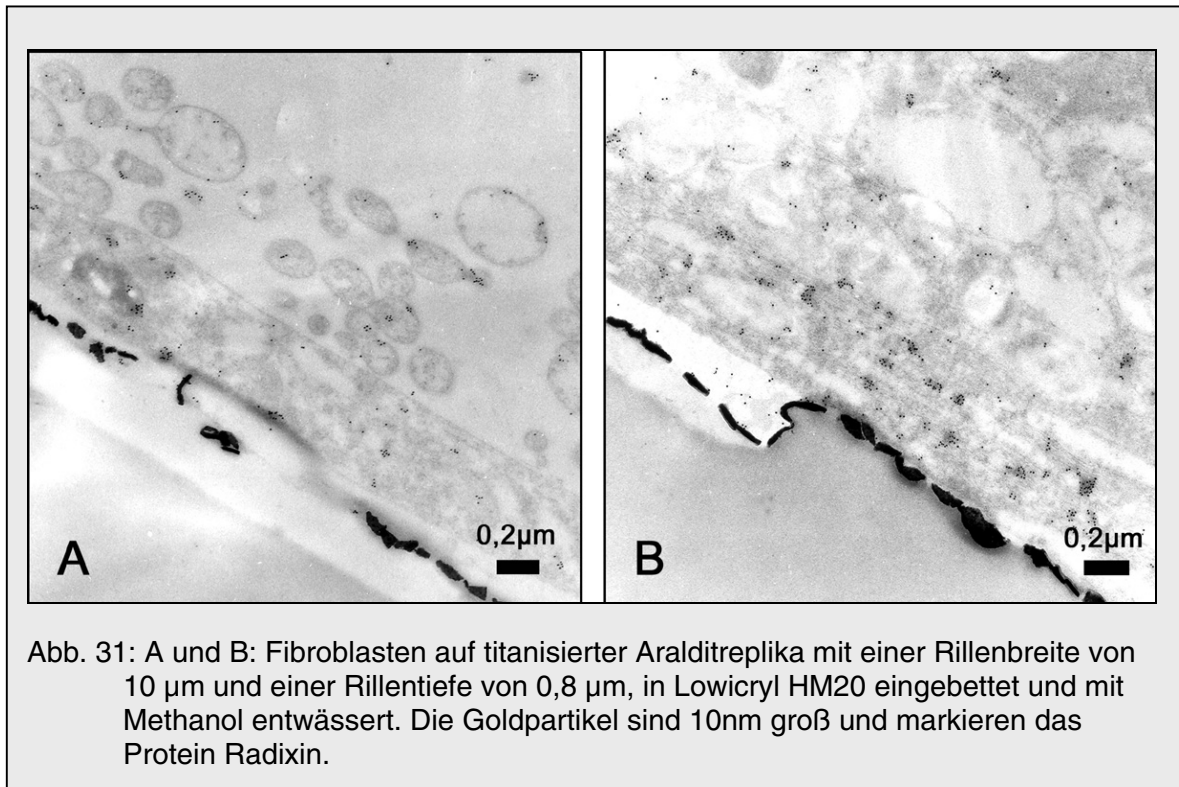
B: wie A

C: Rillenbreite 5 μm ; Rillentiefe 0,8 μm ; in Lowicryl K4M eingebettet und mit Methanol entwässert. Die Goldpartikel sind 10 nm groß und markieren das Protein Moesin.

D: Rillenbreite 10 μm ; Rillentiefe 0,4 μm ; in Lowicryl HM20 eingebettet und mit Ethanol entwässert. Die Goldpartikel sind 10 nm groß und markieren das Protein Moesin.

(Abb. 31) zum einen und Ezrin und Moesin (Abb. 30) zum anderen, sind auf die unterschiedlichen Eigenschaften der benutzten Antikörper zurück zu führen und

können nicht direkt als Indikator für die Quantität der drei verschiedenen Proteine in der Filopodien verwendet werden. Die hier verwendeten Antikörper für Ezrin und Moesin waren monoklonal, der für Radixin verwendete Antikörper dagegen war polyklonal.



4. Diskussion

4.1. Möglichkeiten und Grenzen der elektronenmikroskopischen Methoden

Das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit, die Verteilung der Fokalkontakte auf elektronenmikroskopischem Niveau darzustellen, konnte erreicht werden. Es gelang, die titanisierten Replikas mit den darauf kultivierten Zellen zum einen für die konventionelle Einbettung in das Kunstharz Araldit (Abb. 17, 18 und 19) und zum anderen für die immunzytochemischen Markierungen in das Kunstharz Lowicryl (Abb. 20) einzubetten, davon Ultradünnschnitte herzustellen und am Ende eine Immunogold-Markierung des Proteins Vinculin (Abb. 21, 22 und 23) daran durchzuführen. Bei der Auswertung stellte sich jedoch heraus, dass die Anzahl der markierten Vinculin-Moleküle zu gering war, um davon die quantitative Anzahl an Fokalkontakten als Maß für die Adhäsion abzuleiten. Aufgrund der geringen Markierungsdichte konnte kein Vergleich zwischen den verschiedenen Rillenmustern angestellt werden, wie es zu Beginn angestrebt worden war. Es war aber möglich, die Lokalisation der Fokalkontakte darzustellen. Diese befinden sich nämlich hauptsächlich in den Rillen oder an den Wänden der Rillen oder an den Unebenheiten des Substrats. Diese spezielle Lokalisierung war bei allen untersuchten Rillenmustern zu beobachten. Die Elektronenmikroskopie eignet sich bei dieser Art der Fragestellung zur Beschreibung des Verhaltens von Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen. Es kann jedoch über den Mechanismus der Zelladhäsion keine Aussage getroffen werden und es ist auch kein quantitativer Vergleich verschiedener Mikrostrukturen und Rillenmuster möglich.

4.1.1 Anwendung von Tieftemperatur-Einbettung und Immunogold-Markierung

Die Methode der Tieftemperatur-Einbettung mit anschließender Immunogold-Markierung wird dazu verwendet, die subzelluläre Lokalisierung von Antigenen in Zellkompartimenten zu bestimmen. Um jedoch die Antigenität der Zellen zu erhalten, wird auf die sonst übliche Fixierung bei der Einbettung von Material für die

Elektronenmikroskopie verzichtet, was einen Verlust der Strukturhaltung mit sich bringt. Dies ist deutlich sichtbar im Vergleich von konventionell eingebetteten (Abb. 7, 16 bis 19) mit tieftemperatur-eingebetteten Zellen (Abb. 20 bis 23). Die Ausbeute an Vinculin-markierten Fokalkontakten, die in dieser Arbeit beschrieben sind, ist extrem gering. Es konnten Fokalkontakte gefunden werden, bei denen Goldpartikel die Präsenz von Vinculin anzeigten, jedoch nur in geringer Anzahl. Da jedoch durch Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 11, 12 und 13) gezeigt werden konnte, dass sich zahlreiche Vinculin-haltige Fokalkontakte an der Grenze zwischen Zelle und Substrat befanden und dies auch schon mehrfach in der Literatur beschrieben wurde, kann die geringe Anzahl Immunogold-markierter Vinculin-Moleküle nicht repräsentativ sein. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, diesen Umstand zu erklären:

1. Der für die Untersuchungen benutzte Primär-Antikörper gegen Vinculin, der das Antigen in Paraformaldehyd-fixiertem Zellen mühelos binden kann, könnte dieses Antigen in Lowicryl-eingebettetem Material nur mit wesentlich geringerer Affinität erkennen.
2. Das Vinculin-Antigen könnte bei der Immunogold-Markierung seltener detektiert werden, weil es entweder durch die Einbettung in das Kunstharz Lowicryl maskiert ist oder es bei der ausgiebigen Entwässerung zu Beginn der Tieftemperatureinbettung ausgeschwemmt wurde. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich Antigene bei der Entwässerung im Medium lösen und anschließend mit dem Medium entfernt werden. Um dieses Problem zu klären, wurden verschiedene Entwässerungsmedien ausgetestet (vgl. Abb. 21 bis 23), was aber auch nicht zu einer effizienteren Markierung führte.
3. Die Markierung wird an Ultradünnschnitten durchgeführt, die 50 bis 70 nm dick sind. Bei der Immunogold-Markierung ist den Antikörpern lediglich die Oberfläche dieser Schnitte zugänglich. Dies bedeutet, dass der Schnitt genau an einer Stelle ausgeführt worden sein muss, an dem sich ein Fokalkontakt befindet. Es gibt zwar über die Zelloberfläche verteilt zahlreiche Fokalkontakte, da die Zelle jedoch mehrere Mikrometer lang sein kann, ist es nicht sicher, dass sich an jedem Querschnitt tatsächlich ein Fokalkontakt befindet.

Aus diesen Überlegungen heraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass diese Methode nicht dazu geeignet ist, eine Aussage über die Stärke der Adhäsion der Zellen am Substrat an Hand der Anzahl ihrer Fokalkontakte zu machen. Es ist keine Quantifizierung möglich und damit auch kein Vergleich zwischen verschiedenen Geometrien der Oberfläche.

4.1.2. Lokalisierung von Fokalkontakten

Obwohl es nicht möglich war, eine repräsentative Anzahl an Fokalkontakten zu markieren, so ist es doch gelungen, einige spezifisch für Vinculin markierte Kontakte sichtbar zu machen. Dabei wurden die Fokalkontakte entweder am Boden der Rillen (Abb. 21 A und B) oder an deren Wänden gefunden (vgl. Abb. 21 C und D). Vor allem an Kanten und Unebenheiten wurden die Goldpartikel entdeckt, begleitet von einer Verdichtung des Zellmaterials. Auffallend war auch der Unterschied zwischen Zellen, die auf flachen und solchen, die auf tiefen Strukturen gewachsen waren. Während bei den tiefen Strukturen oft mehrere Goldpartikel an einer Stelle gefunden wurden (Abb. 21), befand sich bei den flachen Strukturen oft nur ein einzelnes Goldkorn am Adhäsionspunkt (Abb. 22 und 23). Ob dies allerdings ein Hinweis auf die molekulare Zusammensetzung der verschiedenen Fokalkontakte bei flacheren und tieferen Rillengeometrien ist, bedarf intensiver Untersuchung mit molekularbiologischen Methoden, welche die Zusammensetzung der Proteine in den Fokalkontakten klären könnten.

In der hier beschriebenen Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, mit Zellen besäte und titanisierte Aralditrepikas durch Kryosubstitution in Lowicryl einzubetten und die Fokalkontakte, die sich auf mikrostrukturierten Substraten bilden, auf elektronenmikroskopischem Niveau durch immunzytochemische Markierung mit Goldpartikeln darzustellen.

4.1.3. Orientierung der Zellen

Im Transmissionselektronenmikroskop, in dem überwiegend Querschnitte zu den Rillen beobachtet wurden, ist die Orientierung der Zellen bei diesen Bildern nicht erkennbar. Wenn man allerdings Längsschnitte entlang der Rillenachse betrachtet, wird die extrem längliche Form und die an dieser Achse orientierten Mikrofilamente

sichtbar (Abb. 20 D). Man kann also aus diesen Beobachtungen Schlüsse über den Mechanismus, der zu dieser Orientierung führt, ziehen. Bereits vor einigen Jahren stellte Brunette fest, dass die Mikrofilamente parallel zur Zellachse orientiert sind (Brunette, 1986a). Wenn Zellen in engen, tiefen Rillen verlaufen, sieht es so aus, als ob die Wände die Freiheit der Zellen mechanisch einschränken. Die Zellen versuchen sich so anzuordnen, dass ihre leading lamella auf einem möglichst flachen Untergrund befestigt ist, so dass die Stabilität erhöht wird.

4.1.4. Erkenntnisse aus den elektronenmikroskopischen

Untersuchungen

Frühere elektronenmikroskopische Untersuchungen an Fibroblasten, die auf mikrostrukturierten Epoxy-Harz Replikas gewachsen waren, zeigten bereits, dass zelluläre Ausstülpungen sich bis auf den Boden der 1 Mikrometer tiefen und 1 Mikrometer breiten Rillen ausdehnten. Aus diesen Erkenntnissen heraus entstand der Begriff des ‚mechanical interlocking‘ zwischen den Zellen und der Substratoberfläche. Diese Art von Interaktion würde zu einer verstärkten Haftung des Implantats im Gewebe führen (Meyle et al., 1993a, b). Der exakte Verlauf der Zellmembran entlang der Topographie der Oberfläche und die genaue Lokalisierung der Zonen, an denen sich Kontaktpunkte zwischen Zelle und Substrat bilden, sind nur bei Betrachtung im Elektronenmikroskop zu erkennen. Die zusätzlichen Kanten, die durch die Hinzufügung von Rillen entstehen und eine Oberflächenvergrößerung des Substrats mit sich bringen, führen auch zu einer größeren Kontaktzone zwischen Zelle und Substrat. Es zeigt sich auch, dass sich Fokalkontakte vorwiegend an den Kanten des Substrats ausbilden. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, die Interaktion von Zelle und Substrat in einem gewissen Rahmen zu kontrollieren. Die Rillengeometrie bestimmt vor allem die Orientierung der Zellen, wodurch die Fläche auf dem Implantat, die von einem bestimmten Zelltyp bedeckt werden soll, eingegrenzt werden kann. Es gibt zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten von Tiefe und Breite der Rillen, von denen einige auch hier untersucht wurden und es stellte sich heraus, dass zu tiefe Rillen hinderlich für die Ausbreitung der Zellen sind. Zu breite Rillen verlieren wiederum ihren Effekt, da die Zelle das andere Ende der Rille nicht mehr abtasten kann. Mit Hilfe des Elektronenmikroskops konnte festgestellt

werden, inwiefern die Zellen in der Lage sind, die Rillen mit zellulären Komponenten auszufüllen. Bei breiteren Rillen senkt sich der gesamte Zellkörper in die Rille ein und die Organellen werden der Rillengeometrie angepasst. Bei schmalen Rillen werden lediglich zelluläre Ausstülpungen, wie zum Beispiel Filopodien, in die Rille eingesenkt. Welchen Einfluss dieses Verhalten auf die Stärke der Adhäsion haben, kann allerdings mit dieser Methode nicht geklärt werden.

4.2. Verstärkte Ausbildung von Membranausstülpungen auf mikrostrukturierten Oberflächen

Bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate fiel auf, dass die Zellen auf mikrostrukturierten Rillenmustern wesentlich mehr Filopodien oder Mikrovilli ausbildeten (Abb. 8, 16 A, 17 A und B, 18, 20 A und D, 22, 30 und 31), als auf den glatten Oberflächen der Kulturschalen (Abb. 7 C und D). Dies wurde auch schon von anderen Autoren bemerkt (Brunette, 1986a) und damit in Verbindung gebracht, dass diese Ausstülpungen der Zelle dabei helfen, auf Unebenheiten im Substrat zu reagieren (Brunette, 1986b). Hierdurch wurde die Frage nach einem Mechanismus aufgeworfen, der für die Ausbildung von Membranausstülpungen verantwortlich sein könnte, auf. Potentielle Kandidaten sind die Mitglieder der ERM-Protein-Familie, über die in den letzten Jahren sehr viel geforscht wurde, wobei gezeigt wurde, dass sie bei der Ausbildung von Mikrovilli-artigen Strukturen eine große Rolle spielen (Tsukita und Yonemura, 1999; Bretscher et al., 2002). Diese Tatsache war die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen der ERM-Proteine am hier vorgestellten Modellsystem.

Es wurde schon vielfach beobachtet, dass die Orientierung und Migration von Zellen von den Eigenschaften des angebotenen Substrats bestimmt wird (Brunette, 1986a; den Braber et al., 1998a, b). Dies trifft allerdings nicht nur für topographische Eigenschaften zu, sondern auch für die Starrheit des Substrats. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die Zellen sich eher auf härterem als auf weicherem Substrat ausbreiten, wenn sie die Wahl haben. Es kommt dabei zu einer gerichteten Zellbewegung in Richtung des härteren Substrats, die auch als 'Durotaxis' bezeichnet wird (Lo et al., 2000). In der selben Arbeit wurde auch ein Modellmechanismus präsentiert, wie die Zelle die unterschiedlichen

Beschaffenheiten des Substrats erkennen und darauf reagieren kann: Die Zelle 'entsendet' lokal Ausstülpungen, die die mechanische Beschaffenheit der Umgebung erkennen sollen. Die Ausstülpungen, die vom Substrat starkes Feedback bekommen, werden verstärkt und entwickeln das 'leading edge', diejenigen die ein schwaches Feedback erhalten, werden weiter destabilisiert. Die Erklärung hierfür ist, dass auf den härteren Substraten eine höhere Spannung entsteht, die sich auf die Bildung von Fokalkontakten auswirkt und auch stress-sensitive Ionenkanäle aktivieren kann. Diese koordinierte Antwort wäre ein effektives Mittel, die Zellbewegung anhand der mechanischen Gegebenheiten zu leiten (Lo et al., 2000). Vergleicht man nun dieses Modell mit den Immunmarkierungen von Radixin, ergibt sich eine interessante Parallele. ERM-Protein markierte Filopodien und Mikrovilli wurden vor allem auf titanisierten Proben detektiert. Dieser Umstand lässt den Schluss zu, dass diese Filopodien, die bei vereinzelt wachsenden Zellen zu beobachten sind, in die Umgebung der Zelle entsandt sind, um das Substrat zu untersuchen. Möglicherweise spielen die Proteine der ERM Familie bei dieser Erkennung der Umwelt und der Orientierung an der Substrattopographie eine entscheidende Rolle. Je mehr Filopodien ausgebildet werden, desto mehr Information über die Beschaffenheit der Umgebung kann die Zelle erhalten. Im Gegensatz dazu konnten in Kulturschalen keine ERM-markierten Mikrovilli und Filopodien detektiert werden, obwohl die Zellen auf diesem Untergrund sehr gut wachsen und adhären können. Dennoch scheinen sich die Zellen in dieser Umgebung anders zu verhalten als auf den titanisierten Substraten.

4.2.1. Lokalisierung der ERM-Proteine

Yonemura und Mitarbeiter injizierten in Fibroblasten C3 transferase, ein Inhibitor für das Protein Rho, was zur Folge hatte, dass die ERM-Proteine nicht nur dephosphoryliert, sondern auch von den Mikrovilli ins Zytoplasma delokalisiert wurden. Die Oberfläche der Zellen war im Vergleich zu den Kontrollzellen glatt (Yonemura et al., 2002). Auf der Oberfläche der von uns ausgesäten Zellen konnten im Transmissionselektronenmikroskop auch zahlreiche Mikrovilli-ähnliche Strukturen beobachtet werden. Radixin und Moesin wurden durch Immunhistochemie in den Gingiva-Fibroblasten nachgewiesen (siehe Abb. 24). Daher liegt die Vermutung

nahe, dass die von uns auf Titan kultivierten Zellen auch Mikrovilli ausprägen und die drei ERM Proteine dort exprimieren.

Bei der genauen Lokalisierung der ERM-Proteine durch die Immunhistochemie ergibt sich allerdings ein Problem. Für die Markierung mit den Antikörpern gegen die ERM-Proteine ist eine Fixierung mit Methanol erforderlich, bei Methanol-fixierten Zellen kann aber keine Aktin-Färbung mit dem Reagenz Phalloidin und auch keine Markierung durch den Antikörper gegen Vinculin durchgeführt werden. Daher konnten die Kolo-kalisierung der ERM-Proteine weder mit Aktin noch mit Vinculin überprüft werden. Dieses Problem wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, die die Zellen für die ERM-Markierung mit TCA (trichloroacetic acid) fixiert hatten und dann ebenfalls keine gleichzeitige Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin ausführen konnten (Yonemura et al., 2002). Phalloidin kann also nicht an Aktin-Filamente binden, die vorher mit Methanol oder TCA behandelt wurden. Aufgrund der zahlreichen Hinweise aus der Literatur (siehe Einleitung Kapitel 1.7.1.) kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Strukturen, die mit den ERM-Antikörpern gefärbt wurden an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt sind.

Zum Zeitpunkt der Experimente waren noch keine Antikörper zu erhalten, die zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten ERM-Proteinen unterscheiden konnten. Daher wurde in diesen Experimenten die totale Menge an ERM-Proteinen, die in der Zelle vorkam, markiert. Dies erklärt die Tatsache, dass bei den immunhistochemischen Experimenten nicht nur die Mikrovilli und Filopodien angefärbt wurden, sondern immer auch eine zytoplasmatische Markierung zu sehen war, die möglicherweise den Pool an inaktiven ERM-Proteinen, die im Zytoplasma lokalisiert sind, darstellt. Diese punktförmige zytoplasmatische Färbung ist auch in anderen Studien beobachtet worden (Yonemura et al., 1999).

Durch Sequenzierung stellte sich heraus, dass die drei ERM-Proteine untereinander sehr homolog sind und damit auch ihre Struktur sehr konserviert ist. Dies weist darauf hin, dass sie sehr ähnliche Funktionen haben können, die sich eventuell auch überlagern. Daher haben ERM-Proteine zum Teil gleiche, aber auch jeweils verschiedene Funktionen und sind aber generell in der Lage, sich gegenseitig zu ersetzen (Takeuchi et al., 1994). Grundsätzlich ist es daher schwierig, die Funktionen der einzelnen Proteine Ezrin, Radixin und Moesin zu unterscheiden (Bretscher et al.,

2002). Aufgrund dieser großen Homologie von Ezrin, Radixin und Moesin kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass es bei den Markierungen zu Kreuzreaktionen kam und nicht nur ein spezifisches der drei Proteine sondern auch eventuell zwei oder drei Proteine der ERM-Familie markiert wurden. In einer Studie von Yonemura und Mitarbeitern, die die Immunzytochemie mit speziellen, selbst hergestellten Antikörpern durchführten, wird festgestellt, dass die Expression von Radixin oft zu niedrig ist, um das Protein mit dieser Methode sichtbar zu machen (Yonemura et al., 1999; Yonemura et al., 2002). Andere Arbeiten ergaben, dass in Swiss 3T3 Zellen eher wenig Ezrin exprimiert wird (Matsui et al., 1998). Jedoch sind sich die Verteilungen der drei Proteine in der Zelle sehr ähnlich, wobei sie vor allem in Zellkulturen koexprimiert vorkommen (Tsukita and Yonemura, 1999). Es kommt bei der Kultivierung von Zellen wahrscheinlich zu einer Art Dedifferenzierung, so dass entgegen dem sonst üblichen zellspezifischen Expressionsmuster der drei ERM-Proteine alle drei koexprimiert werden. In unseren Versuchen waren vor allem die Expression von Radixin und Moesin durch Markierung mit den jeweiligen Antikörpern gut zu sehen (siehe Abb. 24). Die Redundanz der drei ERM-Proteine und die Tatsache, dass sie ihre Funktionen zumindest in der Zellkultur gegenseitig kompensieren können, erschwert im Allgemeinen solche Untersuchungen, die darauf angelegt sind, gezielt Reaktionspartner und den Einfluss der einzelnen ERM-Proteine auf Signaltransduktionsketten festzustellen. Daher muss auch in dieser Arbeit damit gerechnet werden, dass die Markierungen nicht spezifisch nur eines der drei ERM-Proteine anfärben, sondern gleichzeitig auch die anderen Mitglieder dieser Familie detektieren könnten. Dieses Problem wurde von einer Arbeitsgruppe dadurch gelöst, dass sie ihre Untersuchungen in *Drosophila*-Zellen durchführten, denn *Drosophila* hat nur ein Gen für ERM-Proteine, nämlich Moesin (Speck et al., 2003). Diese Lösung des Problems kann aber beim Arbeiten mit humanen Zellen nicht angewandt werden.

Die Lokalisierung der ERM-Proteine im Zytoplasma konnte auf allen Substraten gesehen werden, jedoch nur auf Titan konnte eine deutliche Färbung der Mikrovilli und Filopodien mit den anti-ERM Antikörpern erreicht werden. Dies spricht dafür, dass in den auf Titan kultivierten Zellen die ERM-Proteine aktiviert wurden und daraufhin Mikrovilli ausbilden konnten. Es scheint so zu sein, dass immer ein Pool an

inaktiven ERM-Proteinen, bei denen das amino-terminale und das carboxy-terminale Ende miteinander verbunden sind, im Zytoplasma vorliegt (Hayashi et al., 1999). Wenn die Zelle ein Signal erhält, Mikrovilli auszubilden, werden zunächst die im Zytoplasma vorhandenen Proteine aktiviert und phosphoryliert und können anschließend an der Zellmembran lokalisiert werden, wo sie ihre passenden Membranproteine und die Aktinfilamente verbinden. Das Vorkommen von aktiven und phosphorylierten ERM-Proteinen ist zelltypspezifisch reguliert und wird wahrscheinlich vom Rho-abhängigen Signaltransduktionsweg kontrolliert (Hayashi et al., 1999). Die Theorie, die unseren Versuchen zu Grunde lag, war Folgende: ERM-Proteine werden benötigt, wenn die Zelle Membranausstülpungen ausbildet, was sie offensichtlich in erhöhtem Maße tut, um sich der Geometrie der Oberfläche anzupassen. Also erwarteten wir, dass die Expression der ERM-Proteine verstärkt sein würde, wenn die Zellen auf strukturierten Substraten wachsen. Zu unserer großen Überraschung stellte sich heraus, dass zwischen mikrostrukturierten und glatten Titansubstraten mit den Mitteln der Fluoreszenzmikroskopie kein Unterschied festzustellen war. In beiden Fällen konnte eine große Anzahl an ERM-markierten Mikrovilli und Filopodien detektiert werden. Andererseits zeigten sich erhebliche Unterschiede, wenn in die Verteilung der ERM-Proteine in Zellen, die auf Titan gewachsen waren, mit der Verteilung in Zellen, die auf Zellkultur-Plastik (Polystyrol), reinem Silizium oder auch Glas gewachsen waren, verglichen wurde. In Zellen, die auf Zellkultur-Plastik, Silizium oder Glas wuchsen, konnten die ERM-Proteine nur in diffuser Verteilung im Zytoplasma lokalisiert werden, Mikrovilli oder Filopodien wurden kaum markiert. Dies spricht dafür, dass Zellen auf Titan-Substraten Mikrovilli und Filopodien ausbilden können, die durch Aktion der ERM-Proteine entstehen, was bei der Ausbreitung und Adhäsion auf dem Substrat hilfreich ist, während sie dazu auf Plastik, Silizium oder Glas nur in geringem Ausmaß in der Lage ist. Es scheint sich um zwei verschiedene Systeme der Adhäsion am Substrat zu handeln. Zum einen die Vinculin-vermittelten Fokalkontakte, die auf allen Substraten und vor allem in Fibroblasten ausgebildet werden und für die Adhäsion und somit das Überleben der Zellen sorgen. Zum anderen gibt es die ERM-Proteine und die Membranmoleküle, welche sie mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Das zu letzt erwähnte System ist zwar nicht direkt in die Zell-Substrat-Adhäsion involviert, scheint

jedoch für die Orientierung der Zelle in ihrer Umgebung und die gerichtete Bewegung und Adhäsion an einer für die Zelle günstigen Stelle wichtig zu sein. Dieser Mechanismus scheint nicht auf allen Substraten gleichermaßen aktiviert zu werden, sondern unter den hier untersuchten Substraten im Speziellen auf Titan.

Die ERM-Proteine werden nun in verschiedenen Systemen gefunden und untersucht. So zeigte es sich kürzlich, dass der durch Rho regulierte CD44/ERM-Komplex für die Mobilität und Knochenresorption von Osteoklasten von Bedeutung ist (Chellaiah et al., 2003). Dies ist ein interessanter Aspekt, wenn man den Zusammenhang mit der Einheilung eines Implantats betrachtet, wo Knochenremodellierung und Aktivität von Osteoklasten auch eine wichtige Rolle spielen. Die Bedeutung der ERM-Proteine und ihre Rolle bei verschiedensten Prozessen im Organismus werden also erst allmählich entdeckt und untersucht. Eine japanische Gruppe schlug vor, Moesin als Biomarker für orale Karzinomzellen in der Histopathologie zu verwenden, weil von ihr gezeigt werden konnte, dass das Gleichgewicht zwischen membran-assoziiertem und zytoplasmatischem Moesin in den Karzinomzellen zugunsten von zytoplasmatischem Moesin verschoben war (Kobayashi et al., 2003). Es handelt sich also bei den ERM-Proteinen und ihren Transmembranrezeptoren, an die sie binden, um ein überaus wichtiges und sensibles System, das in vielen Prozessen in Zellen und Geweben eine große Rolle spielt und noch viele unbekannte Aspekte bereithält. Die in dieser Arbeit gefundene Material-abhängige Verteilung von ERM-Proteinen in Gingiva-Fibroblasten weist darauf hin, dass diese Proteinfamilie auch eine Funktion bei der Reaktion von Zellen auf die Eigenschaften von körperfremden Substraten und damit auch bei der Einheilung von Implantaten ins Gewebe übernehmen.

4.2.2. Immunogold-Markierung von ERM

Bei der Immunogold-Markierung von ERM-Proteinen an Zellen, die auf mikrostrukturierten und titanisierten Substraten gewachsen waren, konnte wiederum zum einen eine diffuse Lokalisierung im Zytoplasma, zum anderen eine spezifische Markierung von Mikrovilli und Filopodien festgestellt werden. Da jedoch durch die Tieftemperatur-Einbettung in Lowicryl die Strukturhaltung der Zelle sehr schwach ist, können die markierten Proteine im Zytoplasma keinem spezifischen Zellkompartiment zugeordnet werden. Vor allem bei der Markierung mit dem Radixin-

Antikörper entstand eine spezifische und gut ausgeprägte Goldmarkierung der Mikrovilli/Filopodien (Abb. 31). Bei der Markierung mit den Antikörpern gegen Ezrin und Moesin sind weitaus weniger Goldpartikel zu sehen. Dies erklärt sich jedoch durch die Unterschiede in den Antikörpern selbst, denn der Radixin-Antikörper ist polyklonaler Herkunft und erzeugt bei der immunzytochemischen Markierung an Lowicryl-Schnitten eine intensivere, aber auch unspezifischere Markierung, wogegen die Antikörper gegen Ezrin und Moesin monoklonaler Herkunft sind und ihr Markierungsverhalten speziell auf den Lowicryl-Schnitten ist weit weniger intensiv, aber auch mit weniger unspezifischem Hintergrund (Abb. 30). Es lässt sich jedoch feststellen, dass bei der Immunogold-Markierung mit ERM-Antikörpern keine spezifischen Zell-Substrat-Kontakte markiert werden, sondern die Zellmembranstrukturen der Mikrovilli und Filopodien und eine nicht genau definierbare zytoplasmatische Markierung.

4.3. Titan als Substrat

Titan ist äußerst biokompatibel und wird daher schon seit geraumer Zeit als Material für Implantate eingesetzt. Außerdem oxidiert Titan bei Kontakt mit Luft, was bedeutet, dass die äußerste Schicht eines Titanstücks immer als Titan-Oxid vorliegt (Lautenschlager und Monaghan, 1993) Bei unseren Versuchen wurde kein kompaktes Titanstück verwendet, sondern aus technischen Gründen entweder ein Siliziumwafer (für die Lichtmikroskopie) oder eine Aralditreplika (für die Elektronenmikroskopie), die in beiden Fällen mit Titan besputtert waren. Es stellt sich daher die Frage nach der Beschaffenheit dieser dünnen Titanschicht, die sich möglicherweise anders verhält als ein Titanblock. Die Titanschicht war auf jeden Fall flächendeckend, mit Sicherheit auch oxidiert und lässt sich daher gut mit einem kompakten Titanblock vergleichen. Vor allem die Titanoxidschicht auf der Oberfläche legt die biokompatiblen Eigenschaften des Titans fest. Im Allgemeinen ist es schwierig eine Aussage darüber zu treffen, welches Material und welche Oberflächengestaltung für die Integration eines Implantats zu wählen sind, da die Materialien, Oberflächenstrukturen und die in vitro Systeme sehr verschieden sind und das zelluläre Verhalten eben auch von diesen Bedingungen abhängt. Die dünne Titan-Beschichtung hat aber auch den Vorteil, dass sie zu einer homogenen

Oberfläche führt. Bei der Herstellung der Mikrostrukturen kann es durch die verwendeten Ätzmethoden zu chemischen Veränderungen der Oberfläche kommen (Oakley et al., 1997), die durch die Titanschicht bedeckt werden.

Eine interessante Entdeckung, die im Verlauf der hier dargestellten Versuche gemacht wurde, ist ohne Zweifel der Unterschied in der Expression von ERM-Proteinen auf titanhaltigen Materialien im Vergleich zu Plastik oder Glas. Dagegen konnte wider Erwarten kein Unterschied in der ERM-Verteilung im Vergleich zwischen glatten und mikrostrukturierten Substraten festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache wäre, dass die Molekülstruktur des Titans oder das Vorhandensein des Titanoxids an sich schon günstige Strukturen für die Zellen darstellen. Dies wäre dann auch unabhängig davon, ob es noch Rillenstrukturen im Mikrometerbereich gibt oder nicht und hätte auch keine sichtbare Orientierung der Zelle zur Folge. Auf Zellkultur-Plastik, Silizium oder Glas scheint dies nicht der Fall zu sein. Es würde sich dann also um Strukturen in einem Größenbereich handeln, der mit den von uns gewählten Methoden nicht mehr untersucht werden kann. Wie in den Abbildungen 17 bis 23 zu sehen, bilden sich auch vor allem an Stellen mit kleinen Unebenheiten Fokalkontakte aus. An kleinen Erhebungen innerhalb der Rille konnte oft eine enge Interaktion der Zellmembran mit dem Untergrund und eine Schwärzung auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran beobachtet werden, ein Anzeichen für die Anwesenheit von Fokalkontakten. Dabei handelt es sich also um Strukturen, die in wesentlich kleineren Bereichen zu suchen sind als im Mikrometer-Bereich. Diese Beobachtungen liefern möglicherweise unter anderem eine Erklärung dafür, warum Titan so biokompatibel ist. Es scheint in der Lage zu sein, das ERM-System zu aktivieren, damit die ERM-regulierten Zelloberflächenstrukturen ausgebildet werden können, was sonst vor allem in vivo passiert. Auf Glas und Zellkultur-Plastik konnte dieses System hingegen nicht aktiviert werden.

4.4. Vergleich der Vinculin-Markierung mit der ERM-Markierung

Mit Hilfe der Vinculin-Markierung werden Fokalkontakte an der Grenze zwischen Zellmembran und Substrat sichtbar gemacht (Abb. 10 A und C, 11, 12, 13, 21, 22, 23). Diese bilden sich auf Mikrostrukturen meist in den Rillen, aber auch auf den

Stegen (Abb. 11 B und D, 12 B und D). Sie sind vor allem in Zellen, die in Kultur wachsen, deutlich ausgeprägt. In Zellen, die auf glatten Substraten wachsen, bilden sie sich in Richtung der Zellmigration, unabhängig davon, welches Material angeboten wird (Abb. 10 A und C: Kulturschale; Abb. 11 und 12: Titan; Abb. 13: Silizium). Im Gegensatz dazu ergibt sich bei der Markierung der ERM-Proteine ein völlig anderes Bild. Es werden keine Fokalkontakte, sondern vor allem Mikrovilli und Filopodien angefärbt, die sich an der Zellperipherie bilden (Abb. 24 bis 29). Verstärkt ist dies der Fall, wenn die Zellen auf Titan wachsen, unabhängig davon ob eine Mikrostruktur vorhanden ist oder nicht, auf Glas und Silizium geschieht dies viel seltener, auf Kulturschalen-Plastik so gut wie gar nicht. Es handelt sich also um zwei verschiedene Systeme in der Zelle, die auf unterschiedliche Signale hin aktiviert werden. Interessanterweise werden beide unter anderem von der GTPase Rho aktiviert (Ridley und Hall, 1992; Shaw et al., 1998), was jedoch nicht der einzige Regulationsfaktor sein kann. Beide Systeme dienen der Zelle jedoch dabei, sich in ihrer Umgebung zu orientieren und sich darin festzusetzen.

4.5. Überlegungen zum hier vorgestellten Modellsystem

Bei der Untersuchung des zellulären Verhaltens *in vitro* müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Nach der Isolierung aus dem Gewebe ist es zunächst ein Ziel, die Zellen zu vermehren, damit genügend Material zur Verfügung steht. Dies entspricht jedoch nicht dem natürlichen Verhalten der Zellen im Gewebe, wo die meisten Zellen in differenzierter Form vorliegen, um ihre bestimmte Funktion ausüben zu können und sich nur teilen, wenn es nötig ist. Wenn Zellen in Kultur also wachsen und eine hohe Teilungsrate haben, ist das nicht unbedingt ein Maß dafür, wie gut dieses Substrat sich als Implantatmaterial eignen würde. Unter Umständen ist es besser, wenn es weniger aber dafür differenziertere Zellen gibt. Das Ziel in der Implantologie muss es also sein, die Oberflächen so zu gestalten, dass sich die Zellen darauf möglichst natürlich verhalten. Sie sind nicht nur danach zu beurteilen, wie viele Zellen darauf wachsen und wie oft diese sich teilen. Fokalkontakte scheinen in Bezug auf das Substrat, auf dem sie wachsen, nicht sehr sensibel zu sein und bildeten sich daher auf allen beobachteten Materialien in vergleichbarer Häufigkeit aus. Die ERM-Protein-regulierten Zelloberflächenstrukturen, also Mikrovilli und

Filopodien, jedoch bildeten sich in dieser Studie vor allem auf Titanoberflächen. Es ist gut möglich, dass dieses Verhalten demjenigen gleicht, welches die Zelle ausführt, wenn sie sich in intaktem Gewebe befindet. Diese Strukturen bilden sich schließlich auch vorwiegend an Stellen aus, an denen die Dichte der Zellen nicht zu hoch ist und es ausreichend Platz für jede einzelne Zelle gibt. Fibroblasten wachsen auch im Gewebe nicht zu dichten Lagen zusammen, sondern kommen vor allem einzeln vor, wenn es auch ab und zu Zell-Zell-Kontakte geben kann (Abb. 7).

Ein anderer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass die Adhäsion der Zellen nach Inkubation der Plättchen mit Medium wesentlich besser war. Die Plättchen wurden vor der Aussaat der Zellen über Nacht in Medium inkubiert, welches Serumprotein enthält. Diese Serumproteine werden von den Oberflächen der Plättchen adsorbiert, was die Adhäsion der Zellen im Anschluss erleichtert. Dabei sind Membranrezeptoren involviert, die die Serumproteine erkennen können. Bei der Anheftung von Zellen am Substrat sind die Zellen zunächst rund, zeigen viele Mikrovilli und Membranausstülpungen auf der Zelloberfläche und breiten sich dann auf der Substratoberfläche aus (Brunette, 1988). Der Prozess der Anheftung ist nach 4 Stunden bereits abgeschlossen (vgl. auch Abb. 11). Diese Situation ist aber vergleichbar mit der *in vivo*-Situation, bei der das Implantat auch nicht steril in der Mundhöhle erscheint, sondern mit den Flüssigkeiten der umgebenden Gewebe in Kontakt kommt. Die Zellen beginnen dann nach gelungener Adhäsion mit der Sekretion ihrer eigenen Matrix und den dazu passenden Rezeptoren, was ihre Anheftung noch verstärkt. Es ist also von Vorteil, wenn die Zellen nicht nur mit reinem Titan in Kontakt kommen, sondern daran noch Proteine gebunden sind, die die Zellanheftung erleichtern können. Zellen können nämlich nicht direkt an die Materialoberfläche binden, sondern nur an extrazelluläre Glykoproteine, wie zum Beispiel Fibronectin, die daran adsorbiert sind. Jedoch wachsen die Zellen auch dann auf Glas nicht so gut an, wenn es mit BSA oder Serum beschichtet wurde. Der Erfolg der Adhäsion hängt also vor allem vom Material an sich ab. Serum scheint auf Grund seiner verschiedenen Komponenten besser zu funktionieren als BSA. Diese adhäsiven Eigenschaften sind auf Vitronectin zurückzuführen, welches auch die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix der Fokalkontakte zu sein scheint (Burridge et al., 1988). Ein derzeitiges großes Forschungsgebiet der

Biomaterialwissenschaft ist die Modifikation gängiger Materialien, die für die Herstellung von Implantaten benutzt werden, das heißt Komponenten der extrazellulären Matrix an das Material zu koppeln, um so die primäre Anheftung von Zellen nach der Einbringung des Implantats zu verbessern (Dean et al., 1995; Säuberlich et al., 1999).

Die Mikrostrukturen können also keine erhöhte Expression der ERM Proteine hervorrufen, da ihre Expression auf glattem Titan und auf mikrostrukturiertem Titan nicht zu unterscheiden war. Die Strukturen können aber die Orientierung und die Ausbreitung der Zellen beeinflussen. Tiefe, enge Rillenmuster hemmen die Ausbreitung der Zellen und führen zu vereinzelt extrem länglichen Fibroblasten (Abb. 26 B und D, Tabelle 3). Es wurde auch von anderen Gruppen schon festgestellt, dass das Rillenmuster nicht das allgemeine Migrationsverhalten stimuliert, es aber dadurch dirigiert werden kann (Dalton et al., 2001). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Immunogold-Markierungen sprechen auch dafür, dass es zum 'mechanical interlocking' zwischen Zellen und Rillen kommt und dies die Anheftung verstärkt. Wie die Immunogold-Markierungen zeigen (Abb. 21), bilden sich die Fokalkontakte in tieferen Rillenstrukturen auch vorwiegend in den Rillen oder an deren Wänden aus, was dafür spricht, dass die Zelle hier besser Halt finden kann. Auf jeden Fall unterscheidet sich dieser Sachverhalt klar von der Situation auf glatten Oberflächen, wo Zellen statistisch verteilt ihre Adhäsionskontakte bilden. Leider konnte mit den hier verwendeten Methoden nicht festgestellt werden, ob sich die tatsächliche physikalische Kraft erhöht, mit der sich die Zelle am Substrat 'festhält'. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von konventionell eingebetteten Fibroblasten auf titanisierten Replikas (Abb. 17 bis 19) zeigen, dass sich vor allem an Kanten des Substrats Adhäsionskontakte ausbilden. Daraus lässt sich schließen, dass für die verbesserte Anheftung der Zellen am Substrat nicht unbedingt Rillen notwendig sind, sondern auch andere Mikro- oder Nanostrukturen hilfreich sein können. In der Biomaterialforschung wurden in der vergangenen Jahren zahlreiche verschiedenste Strukturen und Materialien daraufhin getestet (Curtis und Wilkinson, 1999). Möglicherweise bietet Titan an sich mit seiner äußeren Oxidschicht bereits Nanostrukturen, die für die Ausbildung von Adhäsionsstrukturen förderlich sind. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der

lichtmikroskopischen Untersuchung der ERM-Proteine, bei denen kein Unterschied bei der Ausbildung von Filopodien zwischen glattem und mikrostrukturiertem Titan zu entdecken war, wohl aber zwischen Titan als Substrat und anderen Materialien. Für die Gestaltung von Implantatoberflächen sind diese Beobachtungen auf jeden Fall von Bedeutung. Man könnte die einzelnen Zonen des Implantats so gestalten, dass sich nur ein bestimmter Zelltyp darauf niederlassen kann. Außerdem könnte man das Richtungswachstum der Zellen durch die Rillen steuern und so verhindern, dass Fibroblasten, und auch andere Zellen, zu weit nach oben oder unten über die für sie vorgesehene Fläche auf dem Implantat hinauswachsen.

4.6. Anwendungsmöglichkeiten

Zunächst sollten die hier beschriebenen Untersuchungen noch an Knochen- und Epithelzellen durchgeführt und die Ergebnisse dann verglichen werden. Es existieren im Bereich der Biomaterialforschung bereits zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Ausbildung von Fokalkontakten und der Markierung von Vinculin und verschiedenen Integrinen auf diversen Substraten mit vielfältigen Mikro- und Nanostrukturen befasst haben. Jedoch gibt es keine Untersuchung über das Vorkommen und die Verteilung der drei ERM-Proteine, Ezrin, Radixin und Moesin. Um noch einen Schritt weiterzugehen, wäre dann natürlich die Wiederholung dieser Untersuchungen an einem in-vivo-Modell von Interesse. Dabei müsste ein Implantat in den Kiefer eines Versuchstiers eingepflanzt werden, um dann die Expression von Vinculin und den drei Proteinen der ERM-Familie im umliegenden Gewebe festzustellen, vor allem in den Fibroblasten der Gingiva, den Epithelzellen, die den Saum zur Mundhöhle hin darstellen und den Osteoblasten des angewachsenen Knochens.

Ein wichtiger Aspekt bei der Adhäsion von Zellen an verschiedenen Substraten ist auch die Stärke der Adhäsion. Es ist nicht nur möglich, die Adhäsion über die Markierung von Proteinen der Fokalkontakte zu beobachten, es kann auch die tatsächliche Kraft gemessen werden, die nötig ist um eine Zellen vom Substrat auf dem sie gewachsen ist abzulösen. Hierzu benötigt man eine spezielle Apparatur, ein sogenanntes Rheometer, in dem Shear Stress definierter Stärke erzeugt und das Zellverhalten mit einer Kamera beobachtet werden kann. Abbildung 32 zeigt auf diese Weise entstandene Aufnahmen, für diese wurden humane Endothelzellen auf

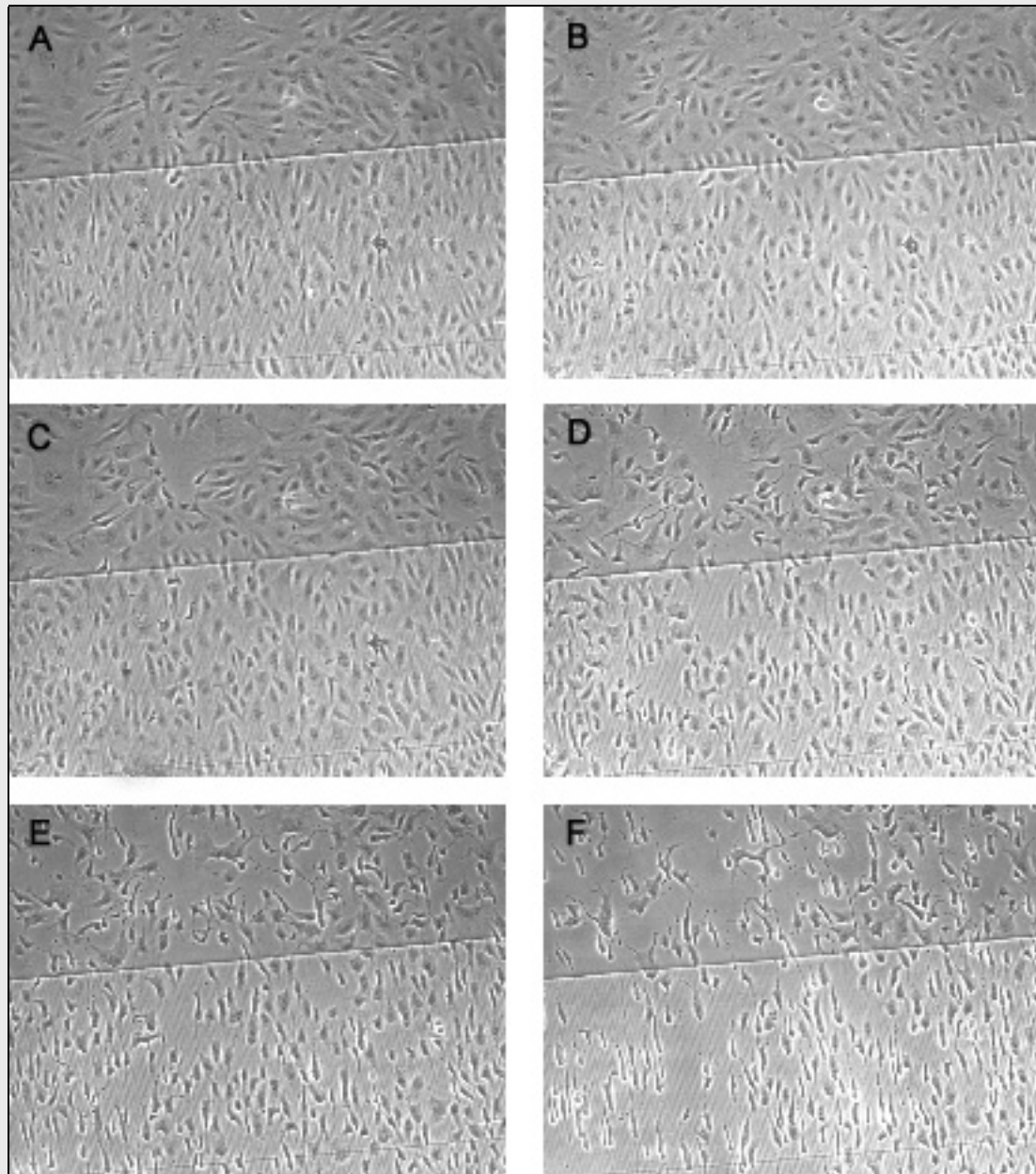


Abb. 32: humane Endothelzellen auf mikrostrukturiertem und titanisiertem Glas im Rheometer. Die obere Hälfte des Bildes entspricht jeweils glattem Untergrund, in der unteren Hälfte sind die Mikrostrukturen zu sehen.

- A: zu Beginn des Versuchs ohne angelegten Shear Stress
- B: nach 30 Minuten und einem Shear Stress von 48 dyn/cm^2
- C: nach 50 Minuten und einem Shear Stress von 132 dyn/cm^2
- D: nach 70 Minuten und einem Shear Stress von 180 dyn/cm^2
- E: nach 90 Minuten und einem Shear Stress von 180 dyn/cm^2
- F: nach 110 Minuten und einem Shear Stress von 180 dyn/cm^2

mikrostrukturierten und titanisierten Glasplättchen ausgesät und anschließend im Rheometer Shear Stress definierter Größe ausgesetzt (die Aufnahmen entstanden in

Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-J. Schnittler vom Institut für Physiologie in Dresden).

Je höher also der Shear Stress und je länger die Zellen diesem ausgesetzt sind, desto mehr Zellen lösen sich vom Substrate ab (Abb. 32 A bis F). Angewandt auf das hier vorgestellte Modellsystem ist es für zukünftige Versuche von äußerst großem Interesse die verschiedenen Mikrostrukturen und auch die getesteten unterschiedlichen Materialien mit darauf kultivierten Zellen aus der Gingiva mit dieser Methode auf physikalische Unterschiede hinsichtlich der Stärke der Adhäsion hin zu testen.

Abschließend ist es noch wichtig, die Tatsache zu erwähnen, dass es ist inzwischen nicht nur möglich ist, auf relativ kleinen Siliziumwafern Mikrostrukturen zu produzieren, sondern dass man diese Muster auch auf Titanblöcke (commercially pure) aufbringen kann (den Braber et al., 1998b). Daher können die Erkenntnisse aus den Untersuchungen, wie sich Zellen auf Mikrostrukturen verhalten, auch für die Gestaltung zukünftiger Implantate angewendet und die Adhäsion der Zellen daran verbessert werden.

5. Zusammenfassung

Untersuchungsgegenstand der Arbeit war ein Modellsystem für Zahnimplantate. Da in der dentalen Implantologie inzwischen vorwiegend Titan als Werkstoff eingesetzt wird, wurde Titan als Substrat verwendet und das Verhalten von Zellen darauf beobachtet. Die Anheftung von Zellen auf der Implantatoberfläche entscheidet über den Erfolg des Implantats. Die Topographie der Oberfläche und die Beschaffenheit des Metalls beeinflussen wiederum das Verhalten von Zellen und die Expression von Adhäsions- und anderen Oberflächenmolekülen auf der Zelloberfläche, daher ist es wichtig, die Grenzfläche zwischen kultivierten Zellen und Metalloberfläche zu untersuchen. Im Mittelpunkt der Untersuchung standen mikrostrukturierte Oberflächen, da sich diese zum einen als besonders geeignet für die Beobachtung des Adhäsionsverhaltens von Zellen erwiesen haben und es sich zum anderen herausgestellt hat, dass sich Zellen auf strukturierten Oberflächen besser anheften als auf glatten.

Als Substrate wurden Siliziumplättchen verwendet, in die ein Rillenmuster geätzt war. Diese wurden anschließend mit einer Titanschicht bedeckt. Auf diese Substrate wurden Fibroblasten aus Gingivagewebe ausgesät, und ihr Verhalten mit elektronen- und lichtmikroskopischen Methoden beobachtet.

Folgende Fragestellungen wurden dabei untersucht:

- 1.) Kann durch das Hinzufügen von Mikrostrukturen und damit der Veränderung der Oberflächentopographie die Adhäsion der Zellen verbessert und die Ausbildung und Ausrichtung von Fokalkontakten gesteuert werden?
- 2.) Welche Rillengeometrie ist dabei am besten geeignet?
- 3.) Kann das System der ERM-Proteine und die damit verbundene Ausbildung von Oberflächenstrukturen auf der Zelle durch das Hinzufügen des Rillenmusters oder 'groove-ridge-design' gezielt aktiviert werden?

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Verteilung von Fokalkontakten auf verschiedenen Rillengeometrien mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht. Dazu wurden von den Siliziumplättchen zunächst Abdrücke in Araldit, einem in der Elektronenmikroskopie häufig benutzten Kunstharz, hergestellt, worauf die Zellen kultiviert und dann entweder mit konventioneller Technik in Araldit oder durch

Tieftemperatur-Einbettung in Lowicryl eingebettet wurden. Die konventionelle Einbettung eignet sich dazu, die Anpassung der Zelle an die Mikrostruktur auf ultrastruktureller Ebene zu beobachten. Bei den Ultradünnschnitten der Tieftemperatur-Einbettung wurde im Anschluss noch eine Immunogold-Markierung des Proteins Vinculin zur Darstellung der Fokalkontakte durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Fokalkontakte vorwiegend in den Rillen, an deren Wänden oder an Unebenheiten im Substrat, die sich im Nanometer-Bereich befanden, und nicht auf den Stegen lokalisiert waren. Die Zellen orientierten sich an der Mikrostruktur und passten sich der Topographie der Oberfläche exakt an.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden an den Zellen, die auf mikrostrukturierten und titanisierten Siliziumplättchen wuchsen, die Proteine der ERM-Familie fluoreszenzmarkiert. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie, Ezrin, Radixin und Moesin, sind an der Zellmembran lokalisiert. Dort binden sie zum einen direkt oder indirekt an Transmembranproteine, zum anderen an das Aktin-Zytoskelett. Ihr Vorkommen wurde vor allem in Zellen mit Membranausstülpungen und Oberflächenvergrößerungen, wie zum Beispiel Mikrovilli oder Filopodien beobachtet. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine erhöhte Anzahl an Filopodien, daher war die Untersuchung der ERM Proteine von Interesse. Alle drei Proteine konnten durch Fluoreszenzmarkierung in den verwendeten Gingiva-Fibroblasten nachgewiesen werden. Dabei stellte sich heraus, dass sie nicht wie erwartet vermehrt auf mikrostrukturierten Substraten auf der Zelloberfläche exprimiert wurden, wenn die Oberfläche des Substrats und damit auch die Fläche der Zell-Substrat-Interaktion vergrößert wurde. Es zeigte sich jedoch eine deutliche Färbung von Zelloberflächenstrukturen wie Mikrovilli und Filopodien auf allen titanisierten Substraten, unabhängig davon, ob diese mikrostrukturiert waren oder nicht. Zellen, die auf Glas, Silizium oder Kulturschalen-Plastik wuchsen, zeigten nicht diese ausgeprägte Färbung, sondern vor allem eine unspezifische zytoplasmatische Färbung. Die Zellen konnten also nur auf Titan-Substraten Mikrovilli und Filopodien ausbilden, die durch die ERM-Proteine induziert wurden und bei der Adhäsion (und Orientierung in der Umgebung) für die Zellen hilfreich waren. Dies unterstützt die Tatsache, dass sich Titan als äußerst biokompatibles Material für die Herstellung von Implantaten eignet.

Die Zellen reagieren also auf die Beschaffenheit und Topographie des ihnen angebotenen Substrats mit der Aktivierung verschiedener Systeme und der Ausbildung spezieller Strukturen. Die Untersuchung dieser verschiedenen Reaktionen als Antwort auf chemisch und physikalisch unterschiedliche Substrate ist von Bedeutung für die Gestaltung von Implantatoberflächen und die Verbesserung der Zelladhäsion daran, damit Implantate langfristig stabil in das Gewebe integriert werden können.

6. Literatur

- Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR (1986) The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1, 11-25
- Algrain M, Turunen O, Vaheri A, Louvard D, Arpin M (1993) Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol* 120, 129-139
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271, 20246-20249
- Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K (2000) Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 261, 44-51
- A Med-World AG (2003) Internet: medicine worldwide
Adresse: <http://www.m-ww.de/krankheiten/zahnerkrankungen/zahnimplantate.html>
- Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Hinz B, Imhof BA (2000) Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell* 11, 2999-3012
- Barret C, Roy C, Montcourrir P, Mangeat P, Niggli V (2000) Mutagenesis of the Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PIP₂) binding site in the NH₂-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J Cell Biol* 151, 1067-1079
- Barry ST, Flinn HM, Humphries M, Critchley DR, Ridley AJ (1997) Requirement for Rho in integrin signalling. *Cell Adhes Commun* 4, 387-398
- Berryman M, Franck Z, Bretscher A (1993) Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci* 105, 1025-1043
- Bershadsky A, Chausovsky A, Becker E, Lyubimova A, Geiger B (1996) Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol* 6, 1279-1289
- Bretscher A (1983) Purification of an 80, 000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *J Cell Biol* 97, 425-432
- Bretscher A (1991) Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 7, 337-374

-
- Bretscher A, Gary R, Berryman M (1995) Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry* 34, 16830-16837
- Bretscher A, Reczek D, Berryman M (1997) Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci* 110, 3011-3018
- Bretscher A (1999) Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* 11, 109-116
- Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell context. *Nature Reviews* 3, 586-599
- Brunette DM (1986a) Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Exp Cell Res* 164, 11-26
- Brunette DM (1986b) Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exp Cell Res* 167, 203-217
- Brunette DM (1988) The effects of implant surface topography on the behaviour of cells. *Int J Oral Maxillofac Implants* 3, 231-246
- Buch RSR, Weibrich G, Wagner W (2003) Erfolgskriterien in der Implantologie. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 2003 7, 42-46
- Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 4, 487-525
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M, Zhong C (1997) Focal adhesion assembly. *Trends Cell Biol* 7, 342-347
- Chellaiah MA, Biswas RS, Rittling SR, Denhardt DT, Hruska KA (2003) Rho-dependent Rho kinase activation increases CD44 surface expression and bone resorption in osteoclasts. *J Biol Chem* 278, 29086-29097
- Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, Chasis JA, Conboy JG, Gascard P, Takakuwa Y, Huang SC, Benz EJ, Bretscher A, Fehon RG, Gusella JF, Ramesh V, Solomon F, Marchesi VT, Tsukita S, Tsukita S, Arpin M, Louvard D, Tonks NK, Anderson JM, Fanning AS, Bryant PJ, Woods DF, Hoover KB (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to membrane. *Trends Biochem Sci* 23, 281-282

-
- Chrzanowska-Wodnicka M and Burridge K (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133, 1403-1415
- Clark P, Conolly P, Curtis ASG, Dow JAT, Wilkinson CDW (1991) Cell guidance by ultrafine topography in vitro. *J Cell Sci* 99, 73-77
- Cochran DL, Simpson J, Weber HP, Buser D (1994) Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 9, 289-297
- Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D (1997) Biologic width around titanium implants. A histometric analysis of the implanto-gingival junction around unloaded and loaded nonsubmerged implants in the canine mandible. *J Periodontol* 68, 186-198
- Condeelis J (1993) Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* 9, 411-444
- Cox EA, Sastry SK, Huttenlocher A (2001) Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell* 12, 265-277
- Critchley DR (2000) Focal adhesions – the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 12, 133-139
- Curtis A and Wilkinson C (1999) New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *Biochem Soc Symp* 65, 15-26
- Dalton BA, Walboomers XF, Dziegielewski M, Evans MDM, Taylor S, Jansen JA, Steele JG (2001) Modulation of epithelial tissue and cell migration by microgrooves. *Biomed Mater Res* 56: 195-207
- Dean JW, Culbertson KC, D'Angelo AM (1995) Fibronectin and laminin enhance gingival cell attachment to dental implant surfaces in vitro. *J Oral Maxillofac Implants* 10, 721-728
- del Pozo MA, Price LS, Alderson NB, Ren XD, Schwartz MA (2000) Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTP-ase Rac to its effector PAK. *EMBO J* 19, 2008-2014
- den Braber ET, de Ruijter JE, Ginsel LA, van Recum AF, Jansen JA (1998a) Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed Mater Res* 40, 291-300
- den Braber ET, Jansen HV, de Boer MJ, Croes HJE; Elwenspoek M, Ginsel LA, Jansen JA (1998b) Scanning electron microscopic, transmission electron

- microscopic, and confocal laser scanning microscopic observation of fibroblasts cultured on microgrooved surfaces of bulk titanium substrata. *J Biomed Mater Res* 40, 425-433
- Denker SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayer H, Barber DL (2000) Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. *Mol Cell* 6, 1425-1436
- Doi Y, Itoh M, Yonemura S, Ishihara S, Takano H, Noda T, Tsukita S, Tsukita S (1999) Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J Biol Chem*, 274, 2315-2321
- Franck Z, Gary R, Bretscher A (1993) Moesin, like ezrin, colocalizes with actin in the cortical cytoskeleton in cultured cells, but its expression is more variable. *J Cell Sci* 105, 219-231
- Fukata Y, Kimura K, Oshiro N, Saya H, Matsuura Y, Kaibuchi K (1998) Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J Cell Biol* 141, 409-418
- Gary R, Bretscher A (1995) Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* 6, 1061-1075
- Geiger B and Bershadsky A (2001) Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 13, 584-592
- Gilmore AP and Burridge K (1996) Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381, 531-535
- Gundersen GG and Cook TA (1999) Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 11, 81-94
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514
- Hamada K, Shimizu T, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S, Hakoshima T (2003) Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *EMBO J* 22, 502-514
- Harrison RG (1911) On the stereotropism of embryonic cells. *Science* 34, 279
- Hayashi K, Yonemura S, Matsui T, Tsukita S, Tsukita S (1999) Immunofluorescence detection of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins with their carboxyl-terminal threonine phosphorylated in cultured cell and tissues: Application of a novel

- fixation protocol using trichloroacetic acid (TCA) as a fixative. *J Cell Sci*, 112, 1149-1158
- Heiska L, Alfthan K, Gröholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpén O, (1998) Association of ezrin with intercellular adhesion molecule -1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). *J Biol Chem* 273, 21893-21900
- Hermann JS, Buser D, Schenk RK, Higginbottom FL, Cochran DL (2000) Biologic width around titanium implants. A physiologically formed and stable dimension over time. *Clin Oral Impl Res* 11, 1-11
- Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita S, Tsukita S (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: Possible involvement of phosphatidylinositol turnover and rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 135, 37-51
- Hormia M, Yläne J, Virtanen I (1990) Expression of integrins in human gingiva. *J Dent Res* 69, 1817-1823
- Hormia M, Könönen M, Kivilahti J, Virtanen I (1991) Immunolocalization of proteins specific for adherens junctions in human gingival epithelial cells grown on differently processed titanium surfaces. *J Periodont Res* 26, 491-497
- Hormia M, Könönen M (1994) Immunolocalization of fibronectin and vitronectin receptors in human gingival fibroblasts spreading on titanium surfaces. *J Periodont Res* 29, 146-152
- Hynes RO (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25
- Ishikawa H, Tamura A, Matsui T, Sasaki H, Hakoshima T, Tsukita S, Tsukita S (2001) Structural conversation between open and closed forms of radixin : low-angle shadowing electron microscopy. *J Mol Biol* 310, 973-978
- Ivaska J, Heino J (2000) Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57, 16-24
- Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68, 459-486
- Kaverina I, Krylyshkina, O, Small, JV (1999) Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol* 146, 1033-1044

-
- Kaverina I, Krylyshkina, O, Gimona M, Beningo K, Wang YL, Small JV (2000) Enforced polarisation and locomotion of fibroblasts lacking microtubules. *Curr Biol* 10, 739-742
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuko M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996) Regulation of myosin phosphatase by rho and rho-associated kinase (rho-kinase). *Science* 273, 245-248
- Kobayashi H, Sagara J, Masumoto J, Kurita H, Kurashina K, Taniguchi S (2003) Shifts in cellular localization of moesin in normal oral epithelium, oral epithelial dysplasia, verrucous carcinoma and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 32, 344-349
- Könönen M, Hormia M, Kivilahti J, Hautaniemi J, Thesleff I (1992) Effect of surface processing on the attachment, orientation, and proliferation of human gingival fibroblasts on titanium. *J Biomed Mat Res* 26, 1325-1341
- Lankes WT and Furthmayer H (1991) Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8297-8301
- Lauffenburger DA und Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369
- Lautenschlager EP und Monaghan P (1993) Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int Dent J* 43, 245-253
- Legg JW, Lewis CA, Parsons M, Ng T, Isacke CM (2002) A novel PKC-regulated mechanism controls CD44-ezrin association and directional cell motility. *Nature Cell Biol* 4, 399-407
- Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL (2000) Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79, 144-152
- Mackay DJG, Esch F, Furthmayer H, Hall A (1997) Rho- and Rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *J Cell Biol* 138, 927-938
- Mangeat P, Roy C, Martin M (1999) ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 9, 187-179
- Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S, Tsukita S (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140, 647-657

-
- Matsui T, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1999) Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9, 1259-1262
- Melcher AH (1988) Summary of biological considerations. *J Dent Educ* 52, 812-814
- Meyle J, Gültig K, Wolburg H, von Recum AF (1993a) Fibroblast anchorage to microtextured surfaces. *J Biomed Mat Res* 27, 1553-1557
- Meyle J, Wolburg H, von Recum AF (1993b) Surface micromorphology and cellular interactions. *J Biomater Appl* 7, 362-374
- Meyle J, Gültig K, Hüttemann W, von Recum A, Elßner G, Wolburg H, Nisch W (1994) Oberflächenmikromorphologie und Zellreaktion. *Z Zahnärztl Implantol* 10, 51-60
- Meyle J, Gültig K, Nisch W (1995) Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. *J Biomed Mater Res* 29, 81-88
- Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR (2001) Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* 152, 111-126
- Mitchison TJ und Cramer LP (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-379
- Niggli V, Andreoli C, Roy C, Mangeat P (1995) Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Lett* 376, 172-176
- Nobes CD und Hall A (1995) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62
- Nobes CD und Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144, 1235-1244
- Oakley C and Brunette DM (1993) The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata. *J Cell Sci* 106, 343-354
- Oakley C, Jaeger NAF, Brunette DM (1997) Sensitivity of fibroblasts and their cytoskeletons to substratum topographies: topographic guidance and topographic compensation by micromachined grooves of different dimensions. *Exp Cell Res* 234, 413-424

-
- Oshiro N, Fukata Y, Kaibuchi, K (1998) Phosphorylation of moesin by Rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem* 273, 34663-34666
- Pakkanen R, Hedman K, Turunen O, Wahlström T, Vaheri A (1987) Microvillus-specific Mr 75,000 plasma membrane protein of human choriocarcinoma cells. *J Histochem Cytochem* 35, 809-816
- Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA (2000) Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* 19, 5606-5613
- Pujuguet P, del Maestro L, Gautreau A, Louvard D, Arpin M (2003) Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* 14, 2181-2191
- Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* 9, 1863-1871
- Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18, 578-585
- Ridley AJ und Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Dickmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410
- Ridley A (2000) Rho GTPases: Integrating integrin signaling. *J Cell Biol* 150, F107-F109
- Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722
- Rottner K, Hall A, Small JV (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* 9, 640-648
- Sastry SK and Burridge K (2000) Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp Cell Res* 261, 25-36
- Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1992) A gene family consisting of ezrin, radixin, and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci* 103, 131-143

-
- Säuberlich S, Klee D, Richter E-J, Höcker H, Spiekermann H (1999) Cell culture tests for assessing the tolerance of soft tissue to variously modified titanium surfaces. *Clin Oral Impl Res* 10, 379-393
- Schoenwaelder SM and Burridge K (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11, 274-286
- Schroeder HE (2000) *Orale Strukturbiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Serrador JM, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, Furthmayer H, Schwartz-Albiez R, Calvo J, Lozano F, Sánchez-Madrid F (1997) Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule -3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol* 138, 1409-1423
- Shaw RJ, Henry M, Solomon F, Jacks T (1998) Rho-A-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Mol Biol Cell* 9, 403-419
- Small JV, Kaverina I, Krylyshkina O, Rottner K (1999) Cytoskeleton cross-talk during cell motility. *FEBS Lett* 452, 96-99
- Smith WJ, Nassar N, Bretscher A, Cerione RA, Karplus PA (2003) Structure of the active N-terminal domain of ezrin – conformational and mobility changes identify keystone interactions. *J Biol Chem* 278, 4949-4956
- Speck O, Hughes SC, Noren NK, Kulikauskas RM, Fehon RG (2003) Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* 421, 83-87
- Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, Tsukita S, Takai Y (1997) Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 272, 23371-23375
- Takeuchi K, Sato N, Kasahara H, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1994) Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol* 125, 1371-1384
- Tapon N, Hall A (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9, 86-92
- Theriot JA (1997) Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol* 136, 1165-1168
- Thomas KA and Cook SD (1985) An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mat Res* 19, 875-901

-
- Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F (2000) Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 150, 797-806
- Tsukita S, Hieda Y, Tsukita S (1989) A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. *J Cell Biol* 108, 2369-2382
- Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A, Tsukita S (1994) ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126, 391-401
- Tsukita S and Yonemura S (1999) Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 274, 34507-34510
- Turunen O, Wahlstrom T, Vaheri A (1994) Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol* 126, 1445-1453
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11, 2295-2322
- van der Flier A, Sonnenberg A (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305, 285-298
- Waterman-Storer CM und Salmon E (1999) Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 11, 61-67
- Weiss P (1934) In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J Exp Zool* 68, 393-448
- Wójciak-Stothard B, Curtis ASG, Monaghan W, McGrath M, Sommer I, Wilkinson CDW (1995) Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell Motil Cytoskeleton* 31, 147-158
- Yonemura S, Nagafuchi A, Sato N, Tsukita S (1993) Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 120, 437-449
- Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, Tsukita S (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140, 885-895

Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1999) Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J Cell Biol* 145, 1497-1509

Yonemura S, Matsui T, Tsukita S, Tsukita S (2002) Rho-dependent and – independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci* 115, 2569-2580

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Hartwig Wolburg danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Labor wissenschaftlich zu arbeiten und die Promotion durchzuführen. Dies gab mir die Gelegenheit, die äußerst spannende Technik der Elektronenmikroskopie zu erlernen. Seine Begeisterung für die Wissenschaft hat ansteckend gewirkt und seine Aufgeschlossenheit gegenüber neuen Ideen hat diese Arbeit entscheidend geprägt.

Frau Dr. Karen Wolburg-Buchholz danke ich für viele Tipps und Anregungen vor allem für die Immunogold-Markierungen, aber auch für andere Fragestellungen, ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima im Labor.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Gesa Rascher-Eggstein, die mich vor allem zu Beginn der Doktorarbeit mit Rat und Tat unterstützt hat, und mir die im Labor etablierten Techniken beigebracht hat. Von ihr habe ich viel über wissenschaftliches Arbeiten gelernt.

Kristin Möckel, Ria Knittel und Gabi Frommer-Kästle möchte ich für das sehr gute Arbeitsklima, aufbauende Gespräche in den Kaffeepausen und zuverlässige Hilfe im Labor wenn es nötig war danken.

Herrn Prof. Dr. Dieter Kern vom Institut für Angewandte Physik möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, und dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Ergebnisse auf einer Tagung in Lugano zu präsentieren. Herrn Bertram Herzog und Herrn Dr. Thomas Altbäumer danke ich ebenfalls für gute Zusammenarbeit und für die stets zuverlässige Herstellung der Silziumplättchen mit und ohne Titanschicht und mit allen gewünschten Rillenmustern.

Nadja Mannowetz, Robina Reinicke und Sylvia Bolz danke ich für das Lesen des Manuskripts und dass sie mich aufgebaut haben, wenn es mal nicht so gut lief.

Von Anne Adam bekommt man auf sehr angenehme Weise immer einen kompetenten Rat, in wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Fragen, dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Herrn Dr. Heinz Schwarz und Herrn Jürgen Berger danke ich für die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schnittler und Herrn Dr. Jochen Seebach danke ich für das Durchführen der Shear Stress Experimente am Institut für Physiologie in Dresden.

Frau Dr. Petra Fallier-Becker danke ich für die Gingiva-Fibroblasten, die hervorragend in unserer Zellkultur gewachsen sind.

Herrn Dr. Ulrich Vogel danke ich für die gute Einweisung am Laser-Scan-Mikroskop, und die schnelle Hilfe zu jeder Zeit, wenn etwas daran repariert werden musste.

Frau Dr. Gertrud Kurz-Isler und Frau Renate Junghans danke ich für das gute Arbeitsklima im Untergeschoss des Instituts für Pathologie.

Meine Eltern haben mich immer bei allem unterstützt, was ich machen wollte, meine Entscheidungen und meine Berufswahl nie in Frage gestellt, sondern immer an mich geglaubt. Ich danke ihnen für die Voraussetzungen, die ich von zu Hause für meinen Lebensweg mitbekommen habe.

Thomas Grieser danke ich für jedes einzelne wunderschöne Wochenende in den vergangenen Jahren und für alles, was er für mich getan hat. Seine Motivation und Unterstützung haben mich vor allem in der Endphase der Doktorarbeit durchhalten lassen.

Friederike Pfeiffer

geboren am 19.04.1977 in Karlsruhe

Ausbildung:

- 1983 – 1986: Grundschule der internationalen AFCENT Schule in Brunssum, NL
- 1986 – 1987: Schlossbergschule in Remchingen-Singen
- 1987 – 1996: Gymnasium Neuenbürg
- 1996: allgemeine Hochschulreife
- 1996 – 1998: Grundstudium Biologie an der Universität Konstanz
- 1998: Vordiplom Biologie an der Universität Konstanz
- 1998 – 1999: Hauptstudium Biologie an der Universität Konstanz
- 1999 – 2000: Austauschprogramm an der State University of New York (SUNY) at Stony Brook
- 2000: Master of Arts in Biological Science an der SUNY
Betreuer: Prof. Dr. Dafna Bar-Sagi
Thema: Analysis of Ras effector pathways
- 2000 – 2003: Doktorandenstelle am Institut für Pathologie in Tübingen im Rahmen des DFG Schwerpunktes 'Grenzfläche zwischen Werkstoff und Biosystem': Zellreaktionen auf mikrostrukturierten Oberflächen unter der Leitung von Prof. Dr. H. Wolburg
- seit Januar 2004: Doktorandenstelle am Institut für Pathologie in Tübingen im Rahmen eines Fortüne-Drittmittelprojektes unter der Leitung von Prof. Dr. H. Wolburg
- 2004: Dissertation an der Universität Tübingen
Betreuer: Prof. Dr. H. Wolburg
Thema: Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Gingiva-Fibroblasten auf mikrostrukturierten Titanoberflächen

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Friederike Pfeiffer
Engelfriedshalde 85
72076 Tübingen