

Aus der Klinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie  
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)  
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchung der Freisetzungskinetik  
unterschiedlicher mit rh-BMP-2 beladener  
Polyelektrolyt-Multilayer-Schichten auf  
Titanplättchen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Nikolaus Baron von Hahn**

aus

Salzgitter

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

### **Prüfungskommission**

Referent/in Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Drittreferent/in: Prof. Dr. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 26.01.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Untersuchung der Freisetzungskinetik unterschiedlicher mit rh-BMP-2 beladener Polyelektrolyt-Multilayer-Schichten auf Titanplättchen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Osseointegration und dentale Implantate .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Titan .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Historie.....	2
1.2.2 Eigenschaften.....	3
<b>1.3 Modifizierung von Titanoberflächen .....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Morphologiemodifizierung der Titanoberfläche .....	4
1.3.2 Beschichtung der Titanoberfläche mit Peptiden und Proteinen .....	5
1.3.3 Polyelektrolyt Multilayer (PEM).....	9
<b>1.4 BMP-2.....</b>	<b>11</b>
1.4.1 Historie.....	11
1.4.2 Wirkungsweise.....	12
<b>1.5 Aufgabenstellung.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Präparation und Beladung der Polyelektrolyt-Multilayer .....	19
2.1.2 Probengewinnung.....	20
2.1.3 Rekonstitution der Reagenzien.....	20
2.1.4 ELISA-Durchführung .....	21
2.1.4.1 Coaten der ELISA-Platte .....	22
2.1.4.2 Standards und Proben auftragen.....	23
2.1.4.3 Detektion .....	23
2.1.4.4 Zugabe des Streptavidin-HRP-Konjugats .....	23
2.1.4.5 Entwicklung.....	24
<b>2.2 Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assays).....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Herkunft der Zellen .....	25
2.3.2 Kultivierung.....	25
2.3.3 Zellzahlbestimmung mittels CASY.....	25
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>27</b>

---

<b>3.1</b>	<b>Vorversuche .....</b>	<b>27</b>
3.1.1	Zellkultur.....	27
3.1.1.1	hMSC.....	27
3.1.1.2	C2C12.....	29
3.1.2	rh-BMP-2-Release.....	31
3.1.2.1	Glas.....	31
3.1.2.2	Titan.....	32
<b>3.2</b>	<b>Hauptversuche – rh-BMP-2-Release .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Heparin-Polyelektrolyt-Multilayer.....	35
3.2.2	Collagen-Heparin-Polyelektrolyt-Multilayer.....	38
3.2.3	Collagen-Heparin-Polyelektrolyt-Multilayer chemisch vernetzt.....	41
3.2.4	Heparin-Polyelektrolyt-Multilayer photochemisch vernetzt.....	44
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methode .....</b>	<b>47</b>
4.1.1	Titan als Implantatmaterial.....	47
4.1.2	Wachstumsfaktor rh-BMP-2.....	48
4.1.3	Polyelektrolytmultilayer (PEM) .....	49
4.1.4	Messverfahren.....	50
<b>4.2</b>	<b>Bewertung der Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>58</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Polyelektrolyt-Multilayerbeschichtung.....	10
Abbildung 2: Wirkungsweise von BMP-2.....	13
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Sandwich-ELISA.....	22
Abbildung 4: Zellwachstum und Morphologie der hMSC nach 48 h.....	27
Abbildung 5: Zellwachstum und Morphologie der C2C12-Zellen nach 48 h.....	29
Abbildung 6: Absoluter rh-PEM-2-Release von mit Heparin-, Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-PEM beschichteten Glasplättchen.....	31
Abbildung 7: Beladungsmenge auf den mit Heparin- und Chondroitinsulfat-PEM beschichteten Titanplättchen mit einer Ausgangsstammlösung von 25 µg rh-BMP-2.....	32
Abbildung 8: Absoluter rh-BMP-2-Release von mit Heparin- und Chondroitinsulfat-PEM beschichteten Titanplättchen.....	33
Abbildung 9: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Heparin- und Chondroitinsulfat-PEM beschichteten Titanplättchen.....	34
Abbildung 10: Rh-BMP-2-Beladungsmenge auf Heparin-PEM bei Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.....	35
Abbildung 11: Absoluter rh-BMP-2-Release bei Heparin-PEM und Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.....	36
Abbildung 12: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Heparin-PEM beschichteten Titanplättchen und Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.....	37
Abbildung 13: Rh-BMP-2-Beladungsmenge auf Collagen-Heparin-PEM bei Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.....	38
Abbildung 14: Absoluter rh-BMP-2-Release bei Collagen-Heparin-PEM und Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.....	39
Abbildung 15: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Collagen-Heparin-PEM beschichteten Titanplättchen und Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.....	40
Abbildung 16: Rh-BMP-2-Beladungsmenge auf Collagen-Heparin-PEM bei chemischer Vernetzung von 1% und 100%.....	41
Abbildung 17: Absoluter rh-BMP-2-Release bei Collagen-Heparin-PEM und Graden der chemischen Vernetzung von 1% und 100%.....	42
Abbildung 18: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Collagen-Heparin-PEM beschichteten Titanplättchen und Graden der chemischen Vernetzung von 1% und 100%.....	43
Abbildung 19: Rh-BMP-2-Beladungsmenge auf Heparin-PEM bei photochemischer Vernetzung von 20% und 100%.....	44
Abbildung 20: Absoluter rh-BMP-2-Release bei Heparin-PEM und Graden der photochemischen Vernetzung von 20% und 100%.....	45
Abbildung 21: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Heparin-PEM beschichteten Titanplättchen und Graden der photochemischen Vernetzung von 20% und 100%.....	46

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Laborausstattung .....	16
Tabelle 2: Material und Reagenzien.....	17
Tabelle 3: Zellen .....	18
Tabelle 4: Software.....	19
Tabelle 5: Zellzählung der hMSC nach sechs Tagen.....	28
Tabelle 6: Zellzählung der C2C12-Zellen nach sechs Tagen .....	30

## Abkürzungsverzeichnis

BMP-2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
CBFA	<i>bore binding factor</i>
CHO-Zellen	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CRP	C-reaktives Protein
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAG	Glykosaminoglykan
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hMSC	<i>human mesenchymal stem cells</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Mad	<i>mother against decapentaplegic</i>
NaCl	Natriumchlorid
PEM	<i>polyelectrolyte multilayer</i>
RGD-Sequenz	Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Einbuchstabencode RGD)
rh-BMP-2	<i>recombinant human bone morphogenetic protein 2</i>
RUNX	<i>runt related transcription factor</i>
sGAG	Sulfatierte Glykosaminoglykane
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Osseointegration und dentale Implantate

Enossale Implantate spielen in der Versorgung teil- oder unbezahnter Patienten eine wichtige Rolle bei der kaufunktionellen Rehabilitation. Dabei können sie mehrere Aufgaben übernehmen: Zum einen dienen sie dem Erhalt oder der Wiederherstellung sowohl der Kaufunktion als auch der Phonetik sowie des natürlichen Gesichtsprofils (Koeck und Wagner 2005). Zum anderen bewirken sie den Strukturerthalt knöcherner Anteile durch Resorptionsprophylaxe (Koeck und Wagner 2005; Lehmann et al. 2012).

Die Grundlage einer suffizienten Versorgung mittels enossaler Implantate ist deren Verankerung im Knochen, um eine dauerhafte und regelrechte Funktion zu gewährleisten. Die Immobilisation des Implantats im umliegenden Knochengewebe geht dabei vom Implantatlager aus und geschieht durch Knochenneusynthese um das Implantat herum (Albrektsson et al. 1981; Carlsson et al. 1986; Schliephake et al. 2005b). Bei diesem Prozess spielt die Osseointegration eine entscheidende Rolle, welche von Bränemark als direkter Kontakt und Verankerung des Implantats mit dem umgebenden Knochen und Erhalt dieser unter Belastung definiert wurde. Dies geschieht durch strukturelle und funktionelle Apposition von vitalem und geordnetem Knochen an die Implantatoberfläche (Bränemark et al. 1969; Bränemark et al. 1977).

Im Gegensatz zur Osseointegration als erfolgreiche Verankerung eines Implantats im Knochen, die auch als ankylotische Einheilung bezeichnet wird (Koeck und Wagner 2005), ist die fibroossäre Einheilung eine Indikation für eine Explantation. Bei dieser mangelhaften Form der Implantat-Knochen-Reaktion entsteht zwischen dem Implantat und dem knöchernen Implantatlager eine Bindegewebszone, welche keinerlei Ähnlichkeit mit dem natürlichen Desmodont besitzt, anfällig für Infekte ist und somit die Prognose verschlechtert (Watzek et al. 2009).

Notwendige Voraussetzung einer erfolgreichen Osseointegration ist unter anderem die komplikationslose Heilung des Knochens. Osseointegrative Prozesse können dabei durch vielfältige Faktoren beeinträchtigt werden. So kann bei einer Beeinträchtigung der Stoffwechsellage im Bereich des knöchernen Implantatlagers durch verschiedene

endogene wie exogene Faktoren eine sichere Verankerung des Implantats im knöchernen Lager nicht immer erfolgen. Derartige Einflüsse können beispielsweise Systemerkrankungen wie ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus (endogen) sein, aber auch Nikotinabusus oder Traumata (exogen) im betroffenen Gebiet. Auch iatrogene Einflüsse können eine Problematik der erfolgreichen Osseointegration darstellen. Dazu zählen insbesondere die strahleninduzierte Osteonekrose, auch Osteoradionekrose genannt (Madrid et al. 2010), sowie die medikamenten-assoziierte Osteonekrose (Migliorati 2003). Eine weitere Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Osseointegration ist die aseptische, atraumatische und exakte chirurgische Implantatinsertion (Brånemark et al. 1969).

In Abhängigkeit von den genannten Faktoren kann die Einheilphase enossaler Implantate unterschiedlich lange dauern. Brånemark und seine Kollegen beschrieben für den Unterkiefer unter optimalen Bedingungen eine Einheildauer von drei bis vier Monaten und für den Oberkiefer von fünf bis sechs Monaten (Adell et al. 1981; Brånemark 1983). Spätere Studien zeigten, dass dies auch schon nach kürzerer Zeit erfolgt sein kann (Cochran et al. 2002; Beldar et al. 2013).

Ist ein Implantat durch erfolgreiche Osseointegration in ausreichender Dimension mit einem entzündungsfreien Knochenlager umgeben, kann es ähnlich stark belastet werden wie ein parodontal gesunder Zahn (Lehmann et al. 2012).

## **1.2 Titan**

### **1.2.1 Historie**

Titan als eigenes Element wurde Ende des 18. Jahrhunderts erstmals entdeckt. Der englische Chemiker William Gregor untersuchte 1791 Titaneisensand aus einem Fluss und beschrieb das bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt Material. 1795 war es der deutsche Chemiker Heinrich Klaproth, der aus Rutil (einem Titanoxid) eine Substanz gewann. Diese benannte er nach dem Göttergeschlecht der Titanen aus der griechischen Mythologie (Zwicker 1974; Brauner 1992).

Erst im Jahre 1939 wurde der Grundstein für die industrielle Verarbeitung von Titan gelegt, als es Kroll gelang, aus Titanetrachlorid reines Titan zu gewinnen. Bei dem nach ihm benannten Kroll-Prozess wird das Ausgangsmaterial mit Hilfe von Kalium und

Magnesium zu Titan reduziert, was nunmehr die Herstellung von großen Mengen ermöglicht (Brauner 1992).

### 1.2.2 Eigenschaften

Titan ist ein Übergangsmetall mit der Ordnungszahl 22 und steht in der vierten Nebengruppe des Periodensystems. Es ist durch seine hervorragenden Materialeigenschaften in den letzten Jahrzehnten zum Goldstandard von enossalen Implantaten in der Zahnmedizin geworden (Albrektsson et al. 2008). Die wichtigsten Eigenschaften, mit denen sich Titan als Implantatmaterial von anderen Materialien hervorhebt, sind dabei das geringe spezifische Gewicht mit  $4.5 \text{ g/cm}^3$ , der sehr niedrige Wärmeleitkoeffizient mit  $22 \text{ W/mK}$ , ein günstiges Verhältnis des Elastizitätskoeffizienten von  $110 \text{ Gpa}$  zur Wichte (Kuchling 2011), eine verhältnismäßig hohe Festigkeit, die mittels Legierungen noch verbessert werden kann und die sehr hohe Korrosionsbeständigkeit gegenüber aggressiven Medien und die damit verbundene Biokompatibilität (inert) (Päßler 1997).

Die hohe Korrosionsbeständigkeit steht im Widerspruch zum negativen Normalpotential, was eigentlich auf ein lösliches und reaktionsfreundliches Metall schließen lässt (Hösch und Strietzel 1994; Strietzel et al. 1998). Durch eine passivierende Oxidschicht, die wiederum durch die Reaktionsfreudigkeit des Titans mit Sauerstoff entsteht, kommt eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit zustande. Diese auch als Passivierungsschicht bezeichnete Titanoxidschicht isoliert das Titan gegen Einflüsse der Umgebung und der Reaktion mit dieser. Nach Beschädigung der Titanoxidschicht wird diese innerhalb kürzester Zeit erneut gebildet. Die Oxidschicht und das geringe allergene Potenzial im Vergleich zu anderen Metallen macht die gute Biokompatibilität von Titan aus, was in der Medizin auch als inert bezeichnet wird (Päßler 1997; Hosoki et al. 2018).

### 1.3 Modifizierung von Titanoberflächen

Bei gesunden, physiologischen Voraussetzungen sorgt der biologische Prozess der periimplantären Knochenheilung für Erfolgsraten von mehr als 90% nach zehn bis 15 Jahren (Lindquist et al. 1996; Schwartz-Arad et al. 2005). Zur Ermöglichung einer erfolgreichen Osseointegration trotz beeinträchtigter Knochenverhältnisse etwa durch Infektionen, Traumata oder Systemerkrankungen (s. o.) kann die Oberfläche von

Titanimplantaten biofunktionalisiert werden. Dabei kann die Kompensation der verringerten biologischen Qualität des Knochens durch eine Förderung der Regenerationsfähigkeit des umliegenden Knochengewebes oder auch durch Bereitstellung von Stimuli an der Implantatoberfläche erfolgen. Dies geschieht über zwei Hauptwege: Veränderung der Oberflächenmorphologie oder Veränderung der Oberflächenchemie (Schliephake und Scharnweber 2008).

### 1.3.1 Morphologiemodifizierung der Titanoberfläche

Um die Gewebeintegration von Implantaten zu verbessern, kann dessen Oberfläche vergrößert werden. Dies ist sowohl durch Abtragen (ablativ) als auch durch Auftragen (additiv) möglich (Schliephake und Scharnweber 2008). Es zeigte sich, dass es durch eine Erhöhung der Oberflächenmikrorauheit zu einer besseren Anlagerung von Osteoblasten an das Implantat kommt als bei glatten Oberflächen (Boyan et al. 1998). Ferner wurde bewiesen, dass eine raue Oberfläche während der Osseointegration die Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten bewirkt; dabei liegt insgesamt ein reiferer Osteoblastenphänotyp vor (Kieswetter et al. 1996; Wennerberg und Albrektsson 2009).

Ein frühes Verfahren der Modifizierung von Titanoberflächen durch Vergrößerung der Implantatfläche stellt das Titan-Plasma-Spray-Verfahren (TPS) dar (Ledermann 1979). Dabei wird Titanpulver durch eine Hochtemperatur-Plasmaflamme teilweise geschmolzen und auf die Oberfläche des Titanimplantats gesprüht. Die so erzeugte raue Implantatoberfläche führt zu einer im Vergleich mit einer glatten Oberfläche des Implantats erhöhten mechanischen Retention im Implantatlager (Claes et al. 1976). Da es nicht in ausreichendem Maße gelungen ist, die beim TPS-Verfahren entstandenen unerwünschten Nebenprodukte zu eliminieren und zudem Bedenken hinsichtlich des Abtrages von Titanpartikeln während der Implantation bestanden (Weingart et al. 1994), werden derzeit vermehrt ablativ Verfahren verwendet. Dabei bedienen sich die modernen Modifikationsverfahren der Möglichkeit, Material von der Implantatoberfläche mittels Ätzen durch Säuren (Klokkevoold et al. 2001), durch Sandstrahlen (Ivanoff et al. 2001) oder einer Kombination aus beidem abzutragen (Buser et al. 1998). Bei den jeweiligen Verfahren unterscheiden sich die Grade der entstehenden Rauheit. Während durch Ätzung eine Oberflächenstruktur im Nanometerbereich entsteht, kommt es durch Sandstrahlen zu einer Struktur im Submillimeter- bis

Mikrometerbereich. Dies ist ein nicht unerheblicher Unterschied, da verschiedene Grade der Rauheit die Produktion von Rezeptoren verändern, welche zur Vermittlung der Adhäsion an der Titanoberfläche beitragen (Postiglione et al. 2003).

Bei Knochenimplantatkontakt mit einer rauen Oberfläche wurde in der Knochenneubildung sowohl eine erhöhte Produktion von Zytokinen nachgewiesen als auch Moleküle, die auf eine osteogene Differenzierung von denjenigen Zellen hinweisen, welche Kontakt mit einer mikrostrukturierten Oberfläche hatten (Kieswetter et al. 1996; Boyan et al. 1998). Bedeutsam ist zudem die mit der Rauigkeit einhergehende Erhöhung der Oberflächenenergie, welche die Wechselwirkungen des Implantats mit dem umliegenden Gewebe begünstigt. Hierdurch wird die Adsorption von Serumproteinen und anderen Glykoproteinen der extrazellulären Matrix (ECM) wie Fibronectin erleichtert (Park und Davies 2000; Boukari et al. 2006).

Insgesamt haben mehrere Studien belegt, dass Implantate, deren Oberflächen derart modifiziert wurden, einen früheren und intensiveren Knochenimplantatkontakt ausbilden als bei Implantaten ohne entsprechende Modifizierung; dies kann sogar in beeinträchtigtem Knochengewebe erfolgreich sein (Cordioli et al. 2000; Bergkvist et al. 2004; Friberg et al. 2005; Iezzi et al. 2005).

### 1.3.2 Beschichtung der Titanoberfläche mit Peptiden und Proteinen

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Osseointegration von Titanimplantaten besteht darin, diejenigen Moleküle oder Proteine an der Titanoberfläche zu immobilisieren, die die periimplantäre Knochenheilung durch vielfältige Prozesse verbessern (Junker et al. 2009). Diese können zum einen Aminosäuresequenzen wie die RGD-Sequenz (Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure im Einbuchstabencode) sein, zum anderen Wachstumsfaktoren wie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder das *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2), welches für die Rekrutierung und osteogenen Differenzierung von undifferenzierten Mesenchymzellen von entscheidender Bedeutung ist (Hankenson et al. 2015).

Die am wenigsten aufwendige und komplexe Herangehensweise, Wachstumsproteine oder Peptidsequenzen an die Oberfläche eines anorganischen Biomaterials wie Titan binden zu können, ist die Nutzung der Adsorption. Bei der adsorptiven Bindung, welche als Anreicherung von Stoffen an Oberflächen definiert ist, kann man sich beider

Unterarten, die Physisorption und die Chemisorption, bedienen (Schliephake und Scharnweber 2008).

Bei der Physisorption entsteht die Anhaftung des Stoffes durch Van-der-Waals-Kräfte, eine chemische Bindung wird nicht eingegangen. Bei Titan als anorganischem Biomaterial macht man sich dabei seine negativ geladene Oberfläche zu Nutze, weil positiv geladene Proteine an diesen negativen Oberflächenladungen binden können (Schliephake 2010).

Bei *in vivo* Versuchen wurden Titanoberflächen mittels Physisorption mit BMP-2 beladen. Hierbei zeigte sich zwar eine vermehrte Bildung von Knochenhartgewebe und eine verstärkte Vaskularisierung, jedoch gingen während der ersten Stunden der Freisetzung je nach Oberflächenstruktur 96%-99% der Bioaktivität verloren (Hall et al. 2007).

Die Physisorption wird ebenfalls verwendet, um Proteine und Peptide indirekt mittels Co-Adsorption zu binden. Dazu werden Strukturproteine wie z. B. Kollagen auf der Titanoberfläche gebunden, die sodann als Reservoir für Wachstumsproteine und andere Komponenten der Knochenmatrix dienen können. Bei diesem co-adsorptiven Verfahren mit Kollagen wurde zwar BMP auf Titanoberflächen gebunden (Bierbaum et al. 2006) und die Knochenbildung verbessert. Jedoch konnte die spezifische Wirkung des freigesetzten Wachstumsproteins nicht gezeigt werden, weil schon die alleinige Beschichtung mit Kollagen eine vergleichbare Knochenneubildung erzeugte (Schliephake et al. 2005a).

Ebenfalls durch die Bindung von Kollagen wurde eine Beschichtung von Titan mit VEGF erreicht, indem Heparin kovalent in das Kollagen eingebaut und der Wachstumsfaktor physikalisch an das Heparin immobilisiert wurde (Steffens et al. 2004).

VEGF nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation der Vaskulogenese ein und fördert die Angiogenese (Neufeld et al. 1999). Neben der Induktion von Proliferation und Migration der Endothelzellen hat es auch chemotaktische Eigenschaften, die die Differenzierung von Osteoblasten und Chondroblasten beeinflusst. Dadurch hat es einen fördernden Einfluss auf die Knochenregeneration (Kanczler und Oreffo 2008).

Im Vergleich zu nicht modifizierten, heparinisierten Kollagenbeschichtungen, welche schon eine Zunahme der Endothelzellproliferation bewirkt hatten, konnte durch Beladung mit VEGF ein weiterer Anstieg der Proliferation erreicht und somit das angiogenetische Potential gesteigert werden (Steffens et al. 2004).

Mit einem ähnlichen Ansatz wurde mittels Kollagen und Co-Adsorption versucht, RGD-Peptide auf Titanoberflächen zu binden, um die Osseointegration zu verbessern (Schliephake et al. 2002).

RGD-Peptide gehen durch Bindung an Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine Zellbindung mit Proteinen der ECM ein (Matsuura et al. 2000). Neben der dadurch entstehenden mechanischen Verankerung werden in den Zellen Signalketten aktiviert, die zur Migration und Proliferation der Zellen führen. Solche die RGD-Sequenz präsentierende Proteine sind beispielsweise Vitronectin (Zell-Matrix-Adhäsion), Osteopontin (Knochenwachstum) oder Fibrinogen (Blutplättchenkoagulation) (Pierschbacher und Ruoslahti 1984; Healy et al. 1999; Zamuner et al. 2017). Um bestimmte Zielzellen zu aktivieren, sind die unterschiedlichen Integrin-Rezeptoren anzusprechen, was durch komplexere RGD-Sequenzen (RGDXY-Sequenzen) möglich ist (Cutler und García 2003; Petrie et al. 2006).

Um die RGD-Sequenzen auf der Titanoberfläche zu immobilisieren, wurde das Titan zuerst mit Kollagen beschichtet. Hierfür wird das Kollagen aus einer Lösung adsorbiert und anschließend durch einen elektrochemischen Prozess fixiert. Die in diesem Fall zyklischen RGD-Peptide binden kovalent über Thiolanker an Kollagen.

Versuche zeigten, dass es auf glatten Titanoberflächen mit so gebundenen RGD-Peptiden zu einer signifikanten Steigerung des Implantat-Knochen-Kontaktes kam (Schliephake et al. 2002; Schliephake et al. 2005b). Bei geätzten Titanoberflächen jedoch kam es über den positiven Effekt der Nanostrukturierung hinaus zu keinen Verbesserungen durch die Immobilisierung der RGD-Peptide (Schliephake et al. 2009). Daher ist es durch dieses Verfahren bisher nicht möglich gewesen, die Vorteile einer nanostrukturierten Implantatoberfläche durch eine RGD-Peptid-Bindung zu erweitern.

Im Gegensatz zu Physisorption wird bei der Chemisorption zwischen der Oberfläche und einem Stoff eine chemische Bindung eingegangen, bei der eine Veränderung sowohl des Adsorbens als auch des Adsorbats möglich ist. Bedeutsam ist dies für die Beschichtung von Titan mit bioaktiven Proteinen, da durch eine chemische Veränderung der Proteinstruktur die biologischen Eigenschaften verändert und eingeschränkt werden können.

Um Titanoberflächen mittels Chemisorption mit knochenwachstumsfördernden Faktoren beschichten zu können, ist die Verwendung von Ankermolekülen erforderlich. Diese Ankermoleküle besitzen zum einen eine oberflächenaktive Kopfgruppe, die kovalent an

die Substratoberfläche bindet, und zum anderen eine funktionelle Gruppe, die Proteine bindet (Schliephake 2010). Für BMP-2 werden dabei üblicherweise Phosphonatanker benutzt, welche über ihre Phosphonatgruppe an der Oxidschicht der Titanoberfläche binden. Die endständigen funktionellen Gruppen dieser Anker-moleküle werden aktiviert, wodurch wiederum eine kovalente Bindung mit Aminogruppen von Wachstumsfaktoren möglich wird. Die chemisorptive Bindung von BMP-2 ermöglichte eine verzögerte Freisetzung des Faktors und eine signifikante periimplantäre Knochenbildung (Adden et al. 2006).

Ein anderer Ansatz zur Immobilisierung von Wachstumsfaktoren an Titanoberflächen ist die nanomechanische Verankerung. Dieses Verfahren basiert auf dem Wachstum der Oxidschicht auf der Oberfläche des Titans durch anodische Polarisation. Durch das Wachsen der Oxidschicht wird es möglich, Moleküle oder Nanopartikel einzubauen. Dies wurde erfolgreich mit an Phosphonatankern konjugierten RGD-Peptiden durchgeführt (Bernhardt et al. 2005).

Ein Nachteil sowohl der nanomechanischen als auch der chemisorptiven Immobilisierung von biologisch aktiven Proteinen und Peptiden an der Oberfläche von Titan zur Verbesserung der periimplantären Geweberegeneration ist die mangelnde Möglichkeit der Sterilisierung. Die bei Implantaten notwendige Sterilisierung führt in beiden Fällen zu einer leichten Inaktivierung der Oberfläche (Schliephake 2010).

Aus diesem Grund wurde die nanomechanische Verankerung durch den Einbau von terminal funktionalisierten Oligonukleotiden erweitert, da diese eine Sterilisierung besser überstehen (Michael et al. 2007).

Untersuchungen zur Verankerung von rh-BMP-2 auf Titanoberflächen mittels nanomechanisch fixierten Oligonukleotidankerstränge zeigten zudem, dass es durch die längere Verweildauer des Wachstumsfaktors an der Implantatoberfläche zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und Endothelzellen kam. Weitere Konsequenz war eine vermehrte Transkription osteogener Marker wie Osteopontin oder das Osteoblasten-spezifische Gen CBFA-1 (*core binding factor*), das auch als *runx related transcription factor 2* (RUNX2) bezeichnet wird (Abe et al. 2000; Schliephake et al. 2012). *In vivo* zeigte sich, dass es zwar in einem Bereich von 200  $\mu\text{m}$  um das Implantat zu einem erhöhten Knochenimplantatkontakt kam, dies jedoch nicht mit einer signifikanten Erhöhung des periimplantären Knochen-volumen einherging. Als Ursache wurde eine zu geringe



Beladungsdosis von rh-BMP-2 auf der Titanoberfläche angenommen (Schliephake et al. 2015).

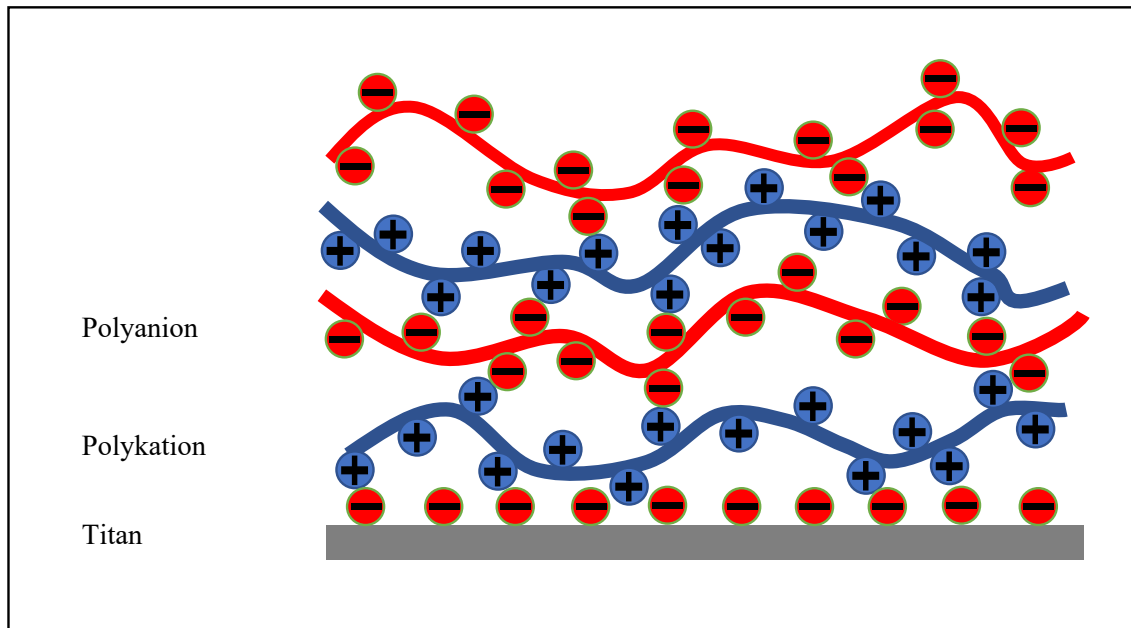
### 1.3.3 Polyelektrolyt Multilayer (PEM)

Wachstumsfaktoren binden im nativen Gewebe reversibel über spezifische Domänen an Komponenten der ECM. Das BMP-2 nutzt dafür seine *heparan sulfate binding domain* (HSBP-Bindedomäne), welche eine hohe Affinität für sulfatierte Glykosaminoglykane (sGAG) besitzt, natürliche Polyelektrolyte der ECM. Um sich dies zunutze zu machen, kann man das Anfang der 1990er Jahre von Decher, Moehwald und Lvov entwickelte Layer-by-Layer-Verfahren verwenden. Bei diesem Verfahren werden die entgegengesetzten Ladungen von Polyelektrolyten und einem Substrat genutzt, um Beschichtungen erzeugen zu können. Die elektrostatischen Anziehungskräfte führen dabei zu einer relativ starken, nicht-kovalenten Bindung der beiden Ausgangsstoffe.

Um die Polyelektrolyt Multilayerbeschichtung zu erstellen, wird die negativ geladene Titanoberfläche mit einer Schicht des Substrats, einem Polykation, benetzt und anschließend das Polyelektrolyt, ein Polyanion, als zweite Schicht aufgebracht. Nun können diese Schritte beliebig oft wiederholt werden, sodass unterschiedliche Schichtanzahlen erreicht werden. Zwischen den verschiedenen Schichtauftragungen wird die Titanoberfläche jeweils gespült, um ungebundene Bestandteile zu entfernen (Abbildung 1).

Für die Beladung der PEM-Beschichtung mit einem Wachstumsfaktor wie dem rh-BMP-2 wird der Titankörper mit der Beschichtung in einer Lösung des Wachstumsfaktors inkubiert.

Eine effektive Bindung von rh-BMP-2 auf einer Implantatoberfläche erreicht man durch die Verwendung sulfatierter Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure, Heparin oder Chondroitinsulfat als Polyanion und Poly-L-Lysin als Polykation. Diese PEM-Filme weisen biomimetische, der ECM in chemischer Komposition und Hydratisierung analoge Eigenschaften auf. PEM-Beschichtungen, in die Glykosaminoglykane (GAG) integriert sind, imitieren die ECM, weil diese viele der GAGs besitzt (Decher 1997; Boudou et al. 2010).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Polyelektrolyt-Multilayerbeschichtung**

Studien zeigten indessen einen Nachteil der GAG-PEM Beschichtungen (Richert et al. 2002; Ren et al. 2008; Grohmann et al. 2011), indem durch die unbeladene Beschichtung zytophobe Effekte auftraten. Diese Nachteile wurden auf die mangelnde Steifigkeit der Beschichtung zurückgeführt. Diese wiederum konnte in der Folge jedoch durch photochemische Vernetzung der PEM-Beschichtung verbessert werden. Bei dieser Nachvernetzung kommt es zu strukturellen Veränderungen der Schichten und Entstehung von zusätzlichen Verbindungen unter den Schichten, wodurch die gesamte Beschichtung steifer wird. Durch diese Nachversteifung konnte die Zytokompatibilität erhöht werden.

Im Unterschied hierzu kam es bei PEM-Beschichtungen, welche mit Wachstumsfaktoren beladen wurden auch ohne Nachversteifung zu einer ausreichenden Zytokompatibilität, um die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten zu fördern (Grohmann et al. 2011).

Zwei weitere große Vorteile der Polyelektrolyt Multilayerbeschichtung sind die Haltbarkeit und Sterilisierbarkeit der beschichteten Implantate, wodurch sie sich von anderen Möglichkeiten von Wachstumsfaktoren-Immobilisation unterscheidet.

Damit biofunktionalisierte Materialien eine breite Anwendung finden können, bedarf es zum einen der Haltbarkeit für eine Lagerung und zum anderen der Sterilisation.

Studien haben gezeigt, dass bei PEM-Beschichtungen die Haltbarkeit durch Lufttrocknung der beschichteten und beladenen Titanoberflächen erreicht werden kann. Dabei zeigte sich auch nach einer Lagerung von 6 Monaten keine signifikante Abnahme

der Bioaktivität des rh-BMP-2. Zudem bleibt das osteoinduktive Potenzial des Wachstumsfaktors nach einer Sterilisation durch  $\gamma$ -Bestrahlung bestehen, obwohl die Bioaktivität gesunken war. Dabei behielt das rh-BMP-2 bei einer  $\gamma$ -Bestrahlung mit 25 kGy 50% seiner Bioaktivität, während es bei einer Bestrahlung mit 50 kGy lediglich 20% waren (Guillot et al. 2013). Hier ist zu beachten, dass bei einer  $\gamma$ -Bestrahlung mit 25 kGy bereits der für Medizinprodukte erforderliche Sterilisationsgrad SAL (Sterility Assurance Level = Sterilisations-Sicherheits-Ebene) von  $10^{-6}$  erreicht wird und neuere Untersuchungen nahe legen, dass sich diese Dosis bei gleichbleibender Sterilität sogar noch reduzieren lässt (Nguyen et al. 2007).

Somit sind PEM-Beschichtungen ein vielversprechender Ansatz, Wachstumsproteine wie das BMP-2 zu binden und so die Osseointegration von Titanimplantaten in breiter klinischer Anwendung zu verbessern (Guillot et al. 2013).

## 1.4 BMP-2

Das *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) gehört zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren. Dies sind Proteine, welche die Zellproliferation und Zelldifferenzierung aus Progenitorzellen fördern, indem sie über transmembranöse Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen. Dabei gehört das BMP-2 auf Grund seiner Aminosäuresequenz zur Untergruppe der *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ -Superfamilie. Neben den verschiedenen *bone morphogenetic proteins* - der größten Gruppe - gibt es noch andere Mitglieder innerhalb der TGF- $\beta$ -Superfamilie. Dazu gehören unter anderem Activine, Inhibine, *growth and differentiation factors* (GDFs) oder die *müllerian inhibiting substance* (MIS), aber auch die TGF- $\beta$ -Proteine an sich (Massagué 1990; Böttner et al. 2000).

Für die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Versuche wurde rekombinantes humanes BMP-2 (rh-BMP-2) aus *chinese hamster ovary cells* (CHO-Zellen) verwendet.

### 1.4.1 Historie

Bereits im Jahr 1965 wies Marshall R. Urist mittels tierexperimenteller Versuche die Knochenneubildung aus implantiertem demineralisiertem Knochengewebe in muskulärem Implantatlager nach. Daraus stellte er die These auf, dass es in der ECM Proteine geben müsse, welche die De-Novo-Knochensynthese durch Autoinduktion anregen (Urist 1965; Urist et al. 1967). Diese osteoinduktiven Proteine wurden im Verlauf

*bone morphogenetic proteins* genannt (Urist et al. 1973; Urist et al. 1983), womit die charakteristische Wirkung auf Differenzierung und Proliferation von pluripotenten Stammzellen zu Knochenzellen beschrieben wird (Kübler 1997; Chen et al. 2004). Mittlerweile wurden bereits über 30 verschiedene Subtypen (Böttner et al. 2000; Ducy und Karsenty 2000) der *bone morphogenetic proteins* identifiziert, wobei lediglich das BMP-1 zu den Matrix-Metalloproteasen gezählt wird. Das BMP-2 hat innerhalb der BMP-Familie das höchste osteoinduktive Potential (Jiang et al. 2011). Die Einflüsse der einzelnen Proteine auf den Organismus unterscheiden sich; sie haben neben der Knochenneubildung unter anderem auch Auswirkungen auf die Skelettentwicklung, die embryonale Organogenese sowie die Apoptose. Sie spielen bei der Entwicklung fast aller Organe eine Rolle, insbesondere der Lungen, der Nieren, der Haut sowie der Gonaden (Hogan 1996; Ducy und Karsenty 2000). Der ursprünglich gewählte Name *bone morphogenetic protein* ist somit ein wenig irreführend, da er das Aufgabenspektrum dieser unterschiedlichen Proteine nur beschränkt abdeckt; er hat sich aber dennoch bis dato in der Wissenschaft behauptet (Hogan 1996).

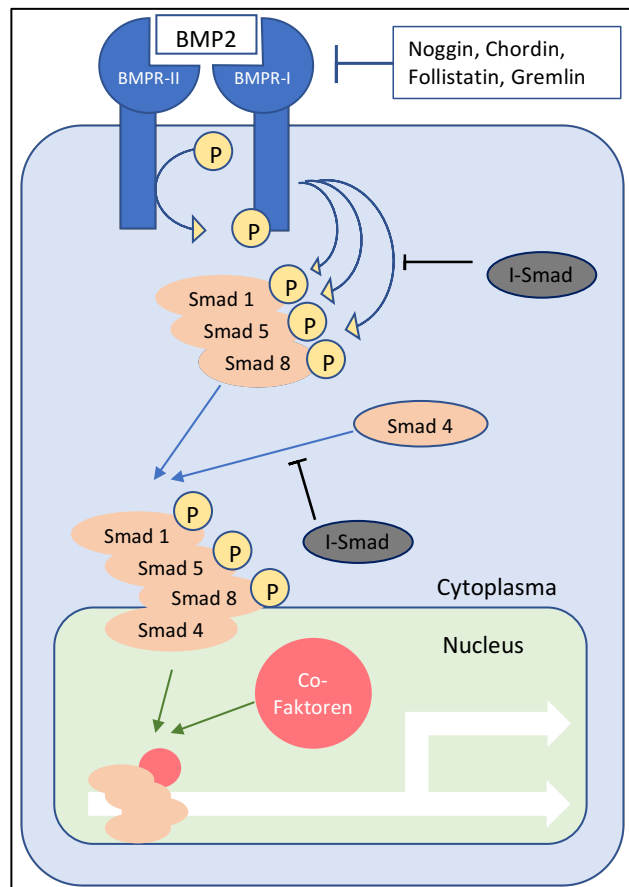
Die Voraussetzung für die weitere Erforschung und den klinischen Einsatz von einigen BMP-Subtypen wurde mit der Isolierung und rekombinanten, also biotechnologischen Herstellung der Proteine geschaffen (Kübler 1997).

#### 1.4.2 Wirkungsweise

Die Wirkung von BMP-2 wird wie bei allen Proteinen der TGF- $\beta$ -Superfamilie durch die Bindung an transmembranösen Rezeptoren ausgelöst, die eine Serin-Threonin-Kinase-Aktivität aufweisen (Mundy et al. 2001). Es gibt zwei Hauptsubtypen der *bone morphogenetic protein*-Rezeptoren, welche wiederum Untergliederungen besitzen: zum einen den Typ I-Rezeptor (BMPRI) und zum anderen den Typ II-Rezeptor (BMPRII). Beide haben jeweils wiederum Untergliederungen und sind für den ungestörten Ablauf der Signalkaskade unverzichtbar (ten Dijke et al. 1994; Rosenzweig et al. 1995; Heldin et al. 1997; Chen et al. 2004; Chen et al. 2012).

BMP-2 bindet extrazellulär an die beiden Rezeptoren, woraufhin der Typ II-Rezeptor mit dem Typ I-Rezeptor einen Komplex bildet (Abbildung 2) und diesen mittels seiner intrazellulären Kinase-Domäne phosphoryliert. Hierdurch geht der Typ I-Rezeptor in den

aktiven Zustand über und phosphoryliert wiederum intrazelluläre Proteine, so genannte Smad-Proteine (Heldin et al. 1997; Massagué 1998).



**Abbildung 2: Wirkungsweise von BMP-2.** BMP-2 = bone morphogenetic protein 2; BMPR-I = bone morphogenetic protein protein receptor I; BMPR-II = bone morphogenetic protein protein receptor II; P = Phosphatgruppe; I-Smad = inhibierendes Smad; Nach Inhalten aus Heldin et al. 1997, Massagué 1998, Lo und Massagué 1999, Tardif et al. 2004, Chen et al. 2004, Chen et al. 2012.

Der Name Smad entstand durch die Kombination der beiden Worte (ein so genanntes Portmanteauwort) bzw. deren Abkürzungen *Mad* (*Mothers against decapentaplegic*) und *Sma* (*small*), die für Gene in unterschiedlichen Spezies (*Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* (Attisano und Wrana 1998)) stehen und zur Vereinfachung der Nomenklatur zusammengefasst wurden (Attisano und Wrana 1998; Whitman 1998).

Generell gibt es verschiedene Smad-Subtypen, wobei in diesem Fall die Smads 1, 4, 5 und 8 von Relevanz sind. Der aktivierte Typ I-Rezeptor phosphoryliert die Smads 1, 5 und 8, woraufhin sich diese vom Rezeptor lösen, mit dem Smad 4 einen Komplex bilden und anschließend in den Nucleus translozieren. Nach der Translokation in den Nucleus interagiert der Smad-Komplex mit weiteren Transkriptionsfaktoren, so genannten Co-

Faktoren, und bindet schlussendlich an diese. Hierdurch wird die Transkription spezifischer Gene ausgelöst (Heldin et al. 1997; Massagué 1998; Attisano und Wrana 2002; Chen et al. 2004). Dies ist beispielsweise das Osteoblasten-spezifische Gen CBFA-1 / RUNX2 (Abe et al. 2000).

Die Aktivität der Signalkaskade ergibt sich aus dem Wechselspiel von extrazellulär vorhandenem BMP-2 und Antagonisten, welche die Aktivität von BMP-2 reduzieren oder ganz verhindern. Ein wichtiger Vertreter ist dabei das extrazelluläre Polypeptid Noggin, das mit unterschiedlicher Affinität verschiedene Vertreter der TGF- $\beta$ -Superfamilie bindet (Zimmerman et al. 1996; Abe et al. 2000; Devlin et al. 2003; Chen et al. 2004; Chen et al. 2012). Durch die Bindung an das Noggin kann kein Ligand-Rezeptor-Komplex entstehen, da BMP-2 in gebundener Form nicht an die transmembranösen Rezeptoren binden kann, sodass das Protein inaktiviert ist. Ähnliche Eigenschaften besitzen die ebenfalls extrazellulären Proteine Chordin, Follistatin und Gremlin (Tardif et al. 2004). Durch die Inhibierung der BMP-2-Wirkung ist eine Regulation durch den Organismus möglich, die sowohl in der Embryogenese als auch bei der Knochenheilung eine bedeutende Rolle spielt (McMahon et al. 1998). So kommt es durch die Aktivität von Noggin nicht zur überschießenden Proliferation von Gewebe.

Neben der extrazellulären Regulation gibt es auch die intrazelluläre Hemmung durch so genannte inhibierende Smads (I-Smads). Diese Proteine haben mehrere Möglichkeiten, die Signalkaskade zu unterbrechen. Zum einen können sie an Smad 4 binden und hierdurch dessen Smad-Komplex-Bildung mit dem Komplex der Smads 1, 5 und 8 verhindern. Zum anderen können sie die Phosphorylierung der Smads 1, 4, 5, und 8 kompetitiv hemmen, indem sie die Bindungsstellen an den membranständigen Rezeptoren blockieren. Außerdem sind sie in der Lage, den Abbau der Rezeptoren in Gang setzen (Hayashi et al. 1997; Imamura et al. 1997; Lo und Massagué 1999).

## 1.5 Aufgabenstellung

Die meisten Implantate in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Endoprothesen in der Orthopädie und Osteosynthesematerialien in der Traumatologie werden derzeit auf Grund der hervorragenden biologischen und funktionellen Eigenschaften aus Titan oder Titanlegierungen hergestellt.

Die komplikationslose Osseointegration stellt insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Knochenheilung ein erhebliches klinisches Problem dar (Palmquist et al.

2010). In mehreren Ansätzen und Studien wurde versucht, Implantaten durch Präsentation von Signalmolekülen an ihrer Oberfläche osteoinduktive Eigenschaften zu verleihen. Obwohl es in den letzten Jahren eine erhebliche Anzahl verschiedener Verankerungen von Signalmolekülen auf der Implantatoberfläche gegeben hat, waren die Auswirkungen *in vivo* bisher begrenzt. Einer der Gründe dafür lag in den mangelnden technischen Möglichkeiten, eine ausreichende Menge an Signalmolekülen zu verankern (Chaudhary et al. 2004; Stadlinger et al. 2008). Darüber hinaus zeigte sich in anderen Ansätzen eine ungünstige Freisetzungskinetik oder auch zu hohe Dosen von Wachstumsfaktoren, die Osteolysen, Hohlraumbildungen und damit verbundenen Implantatlockerungen zur Folge hatten (Leknes et al. 2008; Wikesjö et al. 2008a).

Durch die Verwendung von Polyelektrolyt Multilayerbeschichtungen und deren Beladung mit BMP-2 auf Titanoberflächen von Implantaten sind erste Erfolge erzielt worden. Große Vorteile dieser Beschichtungssysteme sind zum einen die Möglichkeit der Sterilisierung durch  $\gamma$ -Bestrahlung und zum anderen die Haltbarkeit und damit mögliche Lagerfähigkeit. Beides sind unerlässliche Voraussetzungen für Medizinprodukte in der breiten klinischen Anwendung (Guillot et al. 2013).

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Freisetzungskinetik von rh-BMP-2, welches mittels Polyelektrolyt Multilayerbeschichtungen auf Titanoberflächen immobilisiert wurde. Durch die PEM-Beschichtung wird versucht, die ECM nachzuahmen und durch den Einsatz von Glykosaminoglykanen die suffiziente Bindung von rh-BMP-2 zu ermöglichen.

Entscheidend dabei ist, den Einfluss unterschiedlicher Dosen an rh-BMP-2 in den Stammlösungen und Modifikationen der Beschichtungen auf die Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

Tabelle 1: Geräte und Laborausstattung

Material	Hersteller
Pipetten	Eppendorf Peter-Henlein-Straße 2 D-50389 Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH Steinbrinksweg 27 D-31840 Hessisch Oldendorf
Mehrfachpipetten und 300µl Pipettenspitzen sowie Pipetierhilfe accu-jet	Brand GmbH Otto-Schott-Straße 25 D-97877 Wertheim
Röhrchen und serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co Sarstedtstraße 1 D-51588 Nürnbergrecht
Reaktionsgefäße	Biozym Biotech Trading GmbH Wehlinstraße 27b A-1200 Wien
Mikroplatten-Inkubator THERMOstar	BMG LABTECH GmbH Allmendgrün 8 D-77799 Ortenberg
Photometer SpectraMax M2	Molecular Devices 1311 Orleans Drive USA-Sunnyvale, CA 94089
Sterilbank Herasafe HS 18	Heraeus Holding GmbH Heraeusstraße 12-14 D-63450 Hanau
Zentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf Peter-Henlein-Straße 2 D-50389 Wesseling-Berzdorf



CASY	Casy Modell TT Roche Diagnostics Sandhoferstr. 116 D-68305 Mannheim
Kulturflaschen	Sarstedt AG & Co Sarstedtstraße 1 D-51588 Nürnberg

Tabelle 2: Material und Reagenzien

Material	Hersteller
Recombinant Human/ Murine/Rat BMP-2 (CHO derived)	PeproTech Princeton Business Park 5 Crescent Avenue P.O.Box 275 USA-Rocky Hill, NJ 08553 Katalognummer 120-02C
Human/Murin/Rat BMP-2 TMB ELISA Development Kit mit Capture Antibody Detection Antibody Human BMP-2 Standard Streptavidin-HRP ( <i>horseradish peroxidase</i> ) Conjugate	PeproTech Princeton Business Park 5 Crescent Avenue P.O.Box 275 USA-Rocky Hill, NJ 08553 Katalognummer 900-T255
TMB ELISA Buffer Kit mit Wash Buffer Block Buffer Diluent <i>Phosphate Buffer Solution</i> (PBS) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Liquid Substrate Chlorwasserstoff (HCl) Stop Solution	PeproTech Princeton Business Park 5 Crescent Avenue P.O.Box 275 USA-Rocky Hill, NJ 08553 Katalognummer 900-T00

Pierce BCA Protein-Assay Kit	Thermo Scientific 3747 N Meridian Rd USA-Rockford, IL 61101 Produktnummer 23227
Medium	DMEM, high Glucose, GlutaMAX™, pyruvate Katalognummer: 31966-047 Gibco Invitrogen Technologie Park Karlsruhe Emmy Noether Str. 10 D-76131 Karlsruhe
FCS	BiochromAG Leonorenstr. 2-6 D-12247 Berlin
Penicillin-Streptomycin	Produktnummer: P06-07050 PAN Biotech Am Gewerbepark13 D-94501 Aidenbach
Trypsin/ EDTA	Produktnummer: P10-019500 PAN Biotech Am Gewerbepark13 D-94501 Aidenbach

Tabelle 3: Zellen

Material	Hersteller
hMSC	Katalognummer: PT-2501 Lonza Parc Industriel de Petit-Rechain BE-4800 Verviers
C2C12	Bestellnummer: ACC 565 DSMZ Inhoffenstraße 7B D-38124 Braunschweig

Tabelle 4: Software

Software	Hersteller
Microsoft Office	Microsoft Corporation One Microsoft Way USA-Redmond, WA 98052-6399
Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media Department of History and Art History George Mason University 4400 University Drive, MSN 1E7 USA-Fairfax, Virginia 22030

## 2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

### 2.1.1 Präparation und Beladung der Polyelektrolyt-Multilayer

Die verwendeten gesandstrahlten und geätzten Titanplättchen hatten einen Durchmesser von 1,4 cm und somit eine Oberfläche von 1,539 cm<sup>2</sup>.

Die Auftragung der Polyelektrolyt Multilayer auf die Plättchen (sowohl Glas als auch Titan), die Vernetzung sowie die Beladung derselben mit rh-BMP-2 erfolgte durch das

Institut für Bioprozess- und Analysemesstechnik  
Rosenhof 1  
37308 Heilbad Heiligenstadt.

Der automatisierte Aufbau der Schichten auf die Plättchen wurde mittels eines Tauchroboters DR3 der Firma Rieger & Kirstein GmbH, Berlinerstraße 133, 14467 Potsdam, Deutschland, durchgeführt. Dafür erhielt dieser eine speziellen Probehalterung für bis zu 40 Glas- oder Titanplättchen mit einem Durchmesser von 14 mm und Dicke von 0,7 mm. Die Plättchenrohlinge wurden für fünf Minuten in ein definiertes Volumen der Polyelektrolytlösung von 50 ml mit 1 mg/ml Polyelektrolyt Heparin, Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat in 25 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) und 137 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7,4 und anschließend für eine Minute in eine Pufferlösung (25 mM HEPES und 137 mM NaCl, pH 7,4) getaucht. Um multiple Schichten aufzutragen, wurde dieser Vorgang je nach gewünschter Schichtanzahl mehrfach wiederholt.

Die chemischen Vernetzung erfolgte mittels EDC/NHS-Reaktion und die photochemischen Vernetzung mittels UV-*crosslinking* über eingebrachte Acrylamidgruppen.

Für die Beladung der PEM mit rh-BMP-2 wurden die Plättchen mit 200 µl Stammlösung bedeckt, sodass das rh-BMP-2 durch Diffusion in die Schichten gelangen konnte und dort gebunden wurde. Dabei gab es zwei Stammlösungen mit den unterschiedlichen Mengen von 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.

### 2.1.2 Probengewinnung

Die beschichteten und mit rh-BMP-2 beladenen Titanplättchen stellte das Institut für Bioprozess- und Analysemesstechnik her und lieferte sie anschließend nach Göttingen. Dort wurden die Plättchen in einzelne *wells* auf Polystyrol-Platten in 1 ml Medium gelegt. Nach 24 Stunden wurde das Medium einzeln entfernt, mit Proteaseinhibitor stabilisiert und dreifach aliquotiert. Die Einlagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

Anschließend wurde jedem *well* erneut 1 ml Medium zugeführt. Dieser Vorgang erfolgte identisch zu folgenden Zeitpunkten: 24 h, 48 h, 72 h, 6 d, 9 d, 12 d, 15 d, 18 d und 21 d.

### 2.1.3 Rekonstitution der Reagenzien

Alle Verdünnungen und Aliquotierungen wurden unter sterilen Bedingungen auf der Sterilbank vorgenommen.

**Capture antibody:** Das Behältnis mit dem als Feststoff gelieferten 25 µg des *Rabbit Anti-Human BMP-2* und 0,5 mg D-Mannitol wurde vor dem Öffnen zentrifugiert. Anschließend wurde der Inhalt mit 250 µl sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt und anschließend auf zehn Aliquots aufgeteilt. Bei einer Lagerung bei -20 °C sind diese bis zu sechs Monate haltbar.

**Detection antibody:** Das Behältnis mit dem als Feststoff gelieferten 25 µg des biotinyliertem *Rabbit Anti-Human BMP-2* und 0,5 mg D-Mannitol wurde vor dem Öffnen zentrifugiert. Anschließend wurde der Inhalt mit 250 µl sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt und anschließend auf zehn Aliquots aufgeteilt. Bei einer Lagerung bei -20 °C sind diese bis zu sechs Monate haltbar.

**Humaner BMP-2 Standard:** Das Behältnis mit dem als Feststoff gelieferten 1 µg des rh-BMP-2, 2,2 mg BSA und 11,0 mg D-Mannitol wurde vor dem Öffnen zentrifugiert. Anschließend wurde der Inhalt mit 1ml sterilem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt und anschließend auf zehn Aliquots aufgeteilt. Bei einer Lagerung bei -20 °C sind diese bis zu sechs Monate haltbar.

**Streptavidin-HRP Konjugat:** Das Behältnis mit den 17 µg des flüssigen Streptavidin-HRP Konjugats wurde vor dem Öffnen zentrifugiert. Im Anschluss wurde es mit 153 µl PBS verdünnt und anschließend auf zehn Aliquots aufgeteilt. Bei einer Lagerung bei 2-8 °C sind diese bis zu sechs Monate haltbar.

**Wash buffer:** 32 ml des konzentrierten *wash buffers* wurden mit 608 ml sterilem Wasser verdünnt.

**Diluent:** 2,5 ml des konzentrierten Diluents wurden mit 47,5 ml sterilem Wasser verdünnt.

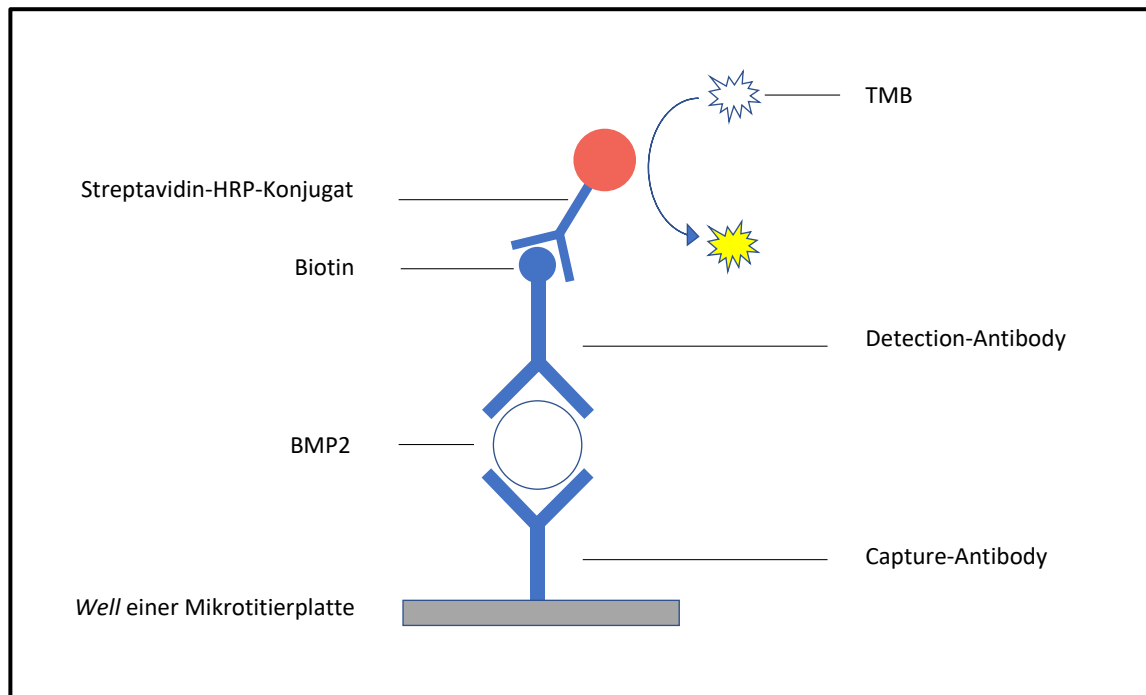
#### 2.1.4 ELISA-Durchführung

*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein quantitatives Nachweisverfahren für Proteine, das mittels Antigen-Antikörper-Reaktion funktioniert. In diesem Fall handelte es sich um die Variante eines Sandwich-ELISA. Dabei werden zwei verschiedene Antikörper benutzt, welche beide spezifisch an das Protein BMP-2 (Antigen) binden. Dies erfolgt jedoch an unterschiedlichen Stellen, weil sie sich sonst gegenseitig kompetitiv behindern würden.

Zunächst wurde der erste Antikörper, der *capture antibody*, in die *wells* der Mikrotiterplatte gegeben, wo dieser immobil verankert wurde. Es folgte die Zugabe der Lösung mit dem nachzuweisenden Antigen (BMP-2), das an dem *capture antibody* band. Nachdem das restliche ungebundene Antigen mittels *wash buffer* entfernt worden war, wurde der Ansatz inkubiert und anschließend der zweite Antikörper, der *detection antibody*, aufgetragen und erneut inkubiert. Anschließend lag ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich-ELISA) vor (Abbildung 3).

Das nun hinzugefügte Streptavidin-HRP Konjugat band durch das Streptavidin am biotinyliertem *detection antibody*. Das HRP war das Reporterenzym, welches das hinzugefügte TMB-Substrat umsetzte, und so für einen blauen Farbumschlag sorgte.

Nach einer Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zusatz einer Stopplösung beendet und die quantitative Messung der Farbintensität mittels Photometer durchgeführt.



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Sandwich-ELISA.** BMP-2 = *bone morphogenetic protein 2*; HRP = *horseradish peroxidase*; TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

#### 2.1.4.1 Coaten der ELISA-Platte

25  $\mu\text{l}$  des bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten *capture antibody* Aliquots wurden mit 10 ml PBS auf eine Konzentration von  $0,25\text{ }\mu\text{g/ml}$  verdünnt. Anschließend wurde die Lösung mit einer Mehrkanalpipette  $100\text{ }\mu\text{l}$  pro *well* auf die ELISA-Mikroplatte aufgetragen, mittels Klebefolie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der *capture antibody* abgekippt und mit einer Mehrkanalpipette die *wells* mit jeweils  $300\text{ }\mu\text{l}$  *wash buffer* gewaschen. Dabei verblieb der *wash buffer* kurze Zeit und wurde anschließend verworfen. Nach dem letzten Waschgang wurde die Platte auf Papierhandtüchern ausgeklopft, um den *washing buffer* vollständig aus den *wells* zu entfernen. Zur Blockierung wurde nun mit einer Mehrkanalpipette  $300\text{ }\mu\text{l}$  *block buffer* je *well* aufgetragen und die ELISA-Platte im Plattenschüttler bei  $400\text{ rpm}$  und Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

#### 2.1.4.2 Standards und Proben auftragen

Der BMP-2 Standard aus dem PeproTech® Kit wurde in den Konzentrationen 3000 pg/ml, 1500 pg/ml, 750 pg/ml, 375 pg/ml, 187,5 pg/ml, 93,75 pg/ml und 46,875 pg/ml mit Diluent verdünnt. Zusätzlich wurde Diluent als Nullwert (0 pg/ml) verwendet.

Der rh-BMP-2 Standard aus der Proteinlösung zur Beladung der Polyelektrolyt Multilayerbeschichtungen auf den Titanplättchen wurde in den Konzentrationen 3750 pg/ml, 1875 pg/ml, 937,5 pg/ml, 468,74 pg/ml, 234,375 pg/ml, 117,1875 pg/ml und 58,59375 pg/ml mit Diluent verdünnt. Zusätzlich wurde Diluent als Nullwert (0 pg/ml) verwendet.

Die Proben wurden mit Diluent so verdünnt, dass sie sich innerhalb der Standards befanden.

Die Mikroplatte wurde nach der Inkubation viermal mit je 300 µl *wash buffer* pro *well* gewaschen und dieser anschließend durch Abklopfen endgültig entfernt. Nun wurde in zwei *wells* 100 µl eines Standards oder einer Probe zur Doppelbestimmung aufgetragen und im Plattenschüttler bei 400 rpm und Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert.

#### 2.1.4.3 Detektion

25 µl des bei -20 °C gelagerten *detection antibody* Aliquots wurden mit 10 ml Diluent auf eine Konzentration von 0,25 µg/ml verdünnt.

Die Mikroplatte wurde nach der Inkubation viermal mit je 300 µl *wash buffer* pro *well* gewaschen und dieser anschließend durch Abklopfen endgültig entfernt. Mittels einer Mehrkanalpipette wurden 100 µl des *detection antibodies* je *well* auftragen und im Plattenschüttler bei 400 rpm und Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert.

#### 2.1.4.4 Zugabe des Streptavidin-HRP-Konjugats

5,5 µl des bei 2-8 °C gelagerten Streptavidin-HRP-Konjugats wurden mit 11 ml Diluent auf eine Konzentration von 0,05 µg/ml verdünnt.

Die Mikroplatte wurde nach der Inkubation viermal mit je 300 µl *wash buffer* pro *well* gewaschen und dieser anschließend durch Abklopfen endgültig entfernt. Mittels einer

Mehrkanalpipette wurden 100 µl des Streptavidin-HRP-Konjugats je *well* auftragen und im Plattenschüttler bei 400 rpm und Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

#### 2.1.4.5 Entwicklung

Das bei 2-8 °C gelagerte TMB-Substrat wurde zeitig aus dem Kühlschrank genommen, da es bei Raumtemperatur den Farbumschlag optimal umsetzt. Dabei wurde es wegen der hohen Lichtempfindlichkeit außerhalb des Kühlschranks in einem nicht transparenten Gefäß aufbewahrt.

Die Mikroplatte wurde nach der Inkubation viermal mit je 300 µl *wash buffer* pro *well* gewaschen und dieser anschließend durch Abklopfen endgültig entfernt. Mittels einer Mehrkanalpipette wurden 100 µl des TMB-Substrats je *well* aufgetragen und im Plattenschüttler bei 400 rpm und Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation wurde der TMB vermittelte Farbumschlag mittels 100 µl HCl *stop solution* je *well* gestoppt. Die ELISA-Platte wurde in einem Photometer bei 450 nm und 620 nm gemessen. Dabei lag das Maximum des TMB bei 450 nm und die 620 nm-Messung dienten als Hintergrundkorrektur.

## 2.2 Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assays)

Die BCA-Assays wurden teilweise von Herrn Jens Bunzendahl nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die Proben wurden durch Entfernen der Stammlösung von den Titanplättchen gewonnen, in welcher das ungebundene rh-BMP-2 zurückblieb.

Für die Standards wurde mit Hilfe eines Diluents das bovine Serum-Albumin (BSA) auf die Konzentrationen 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml und 0 µg/ml BSA verdünnt. Die benötigte *working reagent* wurde aus den Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt.

Von jeder Probe und jedem Standard wurden 25 µl in die *wells* dupliziert vorgelegt und 200 µl der *working reagent* hinzugegeben. Nach dem Verschließen der Platte mit Folie wurde diese im Plattenschüttler bei 400 rpm für 30 s bewegt. Anschließend inkubierte die Platte im Plattenschüttler für 30 min bei 37 °C. Nach dem Abkühlen der Platte wurde diese im Photometer bei 562 nm gemessen.



## 2.3 Zellbiologische Methoden

Die Zellkulturen wurden von Herrn Jens Bunzendahl bearbeitet.

### 2.3.1 Herkunft der Zellen

Die C2C12-Zellen (Mausmyoblasten) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH und die hMSC (humane mesenchymale Stammzellen) von der Firma Lonza als kryokonservierte Zellen bezogen.

### 2.3.2 Kultivierung

Als Medium zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM mit 1% Penicillin/Streptavidin sowie 10% FCS verwendet. Alle Zellkulturmedien wurden zuvor auf 37 °C erwärmt. Die kryokonservierten Zellen wurden nach dem Auftauen in das Kulturmedium überführt und 5 min bei 1200 rpm und 4 °C (Eppendorf Zentrifuge 5415) abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer 75 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Feuchtigkeit von ca. 90%.

Bei einer Konfluenz von ungefähr 80% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden diese mit PBS gewaschen und mit 2 ml einer Trypsinlösung (0,25% Trypsin/0,02% EDTA in 1x PBS) bei 37 °C für 5 min inkubiert, damit sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen lösen können. Die Zellen wurden sodann mit Kulturmedium abgespült und in der gewünschten Dichte in neue Kulturgefäße überführt.

Die Glasplättchen wurden in 24-*well*-Platten mit jeweils 20.000 Zellen pro *well* besiedelt. Für die hMSCs wurde das bereits erwähnte Kulturmedium mit 10% FCS verwendet. Für die C2C12-Zellen wurde als serumreduziertes Differenzierungsmedium DMEM mit 2% FCS eingesetzt.

### 2.3.3 Zellzahlbestimmung mittels CASY

Für die Bestimmung der Ausgangszellzahl auf den Glasplättchen wurden die Zellen, wie oben beschrieben, trypsiniert, je nach Dichte entsprechend mit Kulturmedium verdünnt und mittels CASY ausgezählt.

Dies geschah sowohl vor dem Aussäen auf die Glasplättchen, damit sichergestellt war, dass die korrekte Anzahl an Zellen auf den Plättchen ausgesät wurde, als auch nach dem Ablauf der Kulturdauer von sechs bis sieben Tagen.

## 3 Ergebnisse

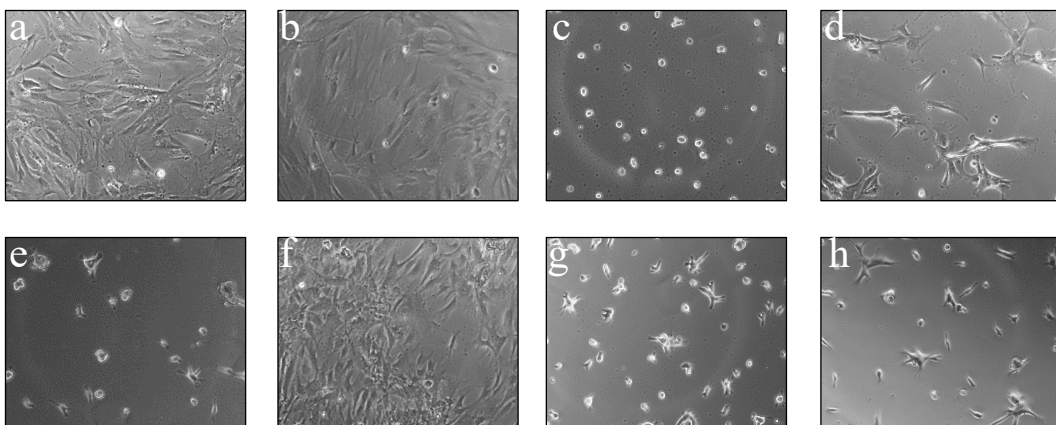
### 3.1 Vorversuche

#### 3.1.1 Zellkultur

Die Zellkulturversuche wurden vorgenommen, um das Zellwachstum und die Morphologie der Zellen auf den unterschiedlichen Beschichtungen zu untersuchen. Hierfür wurden Glasplättchen verwendet, um die Morphologie der Zellen bestimmen zu können. Die Beschichtungen waren Chondroitinsulfat-PEM, Heparin-PEM und Dermatansulfat-PEM, die sowohl mit als auch ohne Zusatz von rh-BMP-2 verwendet wurden. Als Kontrolle gab es ein *well* ohne Glasplättchen sowie ein Glasplättchen ohne Beschichtung und Protein.

##### 3.1.1.1 hMSC

Die mit 20.000 hMSC beschichteten Glasplättchen mit je 1ml DMEM Medium (+ 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FCS) wurden nach 48 Stunden mittels Phasenkontrastmikroskop fotografiert.



**Abbildung 4: Zellwachstum und Morphologie der hMSC nach 48 h.** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme 48 Stunden nach dem Aussäen von 20.000 hMSC pro Glasplättchen/*well* in zehnfacher Vergrößerung a) Kontroll-*well* ohne Glasplättchen; b) B33-Glasplättchen ohne Beschichtung; c) B-33-Glasplättchen mit Chondroitinsulfat-PEM; d) B-33-Glasplättchen mit Chondroitinsulfat-PEM und rh-BMP-2; e) B-33-Glasplättchen mit Heparin-PEM; f) B-33-Glasplättchen mit Heparin-PEM und rh-BMP-2; g) B-33-Glasplättchen mit Dermatansulfat-PEM; h) B-33-Glasplättchen mit Dermatansulfat-PEM und rh-BMP-2.

Die optische Auswertung zeigte, dass die Ansätze, bei denen Chondroitinsulfat-PEM und Dermatansulfat-PEM eingesetzt wurden, im Vergleich zur Kontrolle und dem blanken B33-Glasplättchen ein deutlich verringertes Zellwachstum aufwiesen. Kein Unterschied konnte hierbei zwischen den bloßen Polyelektrolyt Multilayern und der Beladung mit rh-BMP-2 hinsichtlich des Zellwachstums festgestellt werden. Morphologisch hingegen entwickelten sich die Zellen bei der Chondroitinsulfat-PEM mit und ohne rh-BMP-2 unterschiedlich, wobei die Morphologie bei der Beladung mit rh-BMP-2 eher der Morphologie der Zellen auf den Kontrollplättchen entsprach (Abbildung 4).

Die Heparin-PEM zeigten bei der Beladung mit rh-BMP-2 im Vergleich mit allen anderen PEMs das beste Zellwachstum, vergleichbar mit dem Kontroll-*well* und dem Kontrollglasplättchen, wobei auch die Zellmorphologie sehr ähnlich war.

Ohne rh-BMP-2 zeigte auch die Heparin-PEM-Beschichtung ein ähnlich quantitatives Zellwachstum wie die restlichen PEM-Beschichtungen ohne Zugabe des Knochenwachstumsproteins.

**Tabelle 5: Zellzählung der hMSC nach sechs Tagen**

Zelllinie	Messung				Zellzahl/ <i>well</i> Faktor 0,25
	1.	2.	3.	MW	
<b>hMSC</b>					
<b>Co</b>	477.000	472.000	467.000	472.000	118.000
<b>B33</b>	432.000	456.000	440.000	442.667	110.667
<b>CS10</b>	21.000	21.000	23.000	21.667	5.417
<b>CS10/BMP-2</b>	61.000	69.000	71.000	67.000	16.750
<b>HEP10</b>	33.000	36.000	35.000	34.667	8.667
<b>HEP10/BMP-2</b>	128.000	142.000	146.000	138.667	34.667
<b>DS10</b>	60.000	51.000	55.000	55.333	13.833
<b>DS10/BMP-2</b>	30.000	39.000	49.000	39.333	9.833

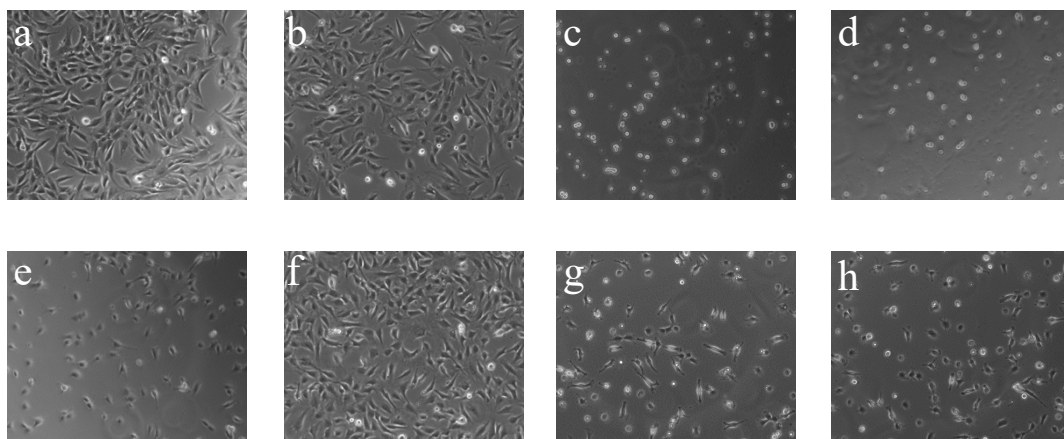
Die Zellzählung wurde nach sechs Tagen mit dem CASY in dreifacher Messung durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Im Vergleich zum Kontroll-*well* und dem unbeschichteten B33-Glasplättchen zeigte sich bei allen Beschichtungen eine geringere Anzahl an Zellen. Lediglich die Heparin-PEM-Beschichtung mit rh-BMP-2-Beladung zeigte überhaupt eine Zunahme der Zellzahl im Vergleich zur Aussaat-Zellzahl von 20.000 und war dreimal so hoch wie ohne rh-BMP-2-Beladung. Die restlichen Beschichtungen wiesen eine Verringerung der Ausgangszellzahl auf. Dabei war die Zellzahl bei der Chondroitinsulfat-PEM-

Beschichtung bei rh-BMP-2-Beladung dreimal so hoch wie ohne. Demgegenüber zeigte sich bei der Dermatansulfat-PEM-Beschichtung ohne rh-BMP-2 eine höhere Zellzahl als mit Proteinbeladung (Tabelle 1).

### 3.1.1.2 C2C12

Die mit 20.000 C2C12-Zellen beschichteten Glasplättchen mit je 1ml DMEM Medium (+ 1% Penicillin/Streptomycin + 2% FCS) wurden nach 48 Stunden mittels Phasenkontrastmikroskop fotografiert.



**Abbildung 5: Zellwachstum und Morphologie der C2C12-Zellen nach 48 h.** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme 48 Stunden nach dem Aussäen von 20.000 hMSC pro Glasplättchen/*well* in zehnfacher Vergrößerung a) Kontroll-*well* ohne Glasplättchen; b) B-33-Glasplättchen ohne Beschichtung; c) B-33-Glasplättchen mit Chondroitinsulfat-PEM; d) B-33-Glasplättchen mit Chondroitinsulfat-PEM und rh-BMP-2; e) B-33-Glasplättchen mit Heparin-PEM; f) B-33-Glasplättchen mit Heparin-PEM und rh-BMP-2; g) B-33-Glasplättchen mit Dermatansulfat-PEM; h) B-33-Glasplättchen mit Dermatansulfat-PEM und rh-BMP-2.

Die phasenkontrastmikroskopische Auswertung der C2C12-Zellen nach 48h stimmte mit den Ergebnissen der hMSC überein. Die mit rh-BMP-2 beladene Heparin-PEM-Beschichtung zeigte im Vergleich zu den anderen Beschichtungen das beste Zellwachstum und lag morphologisch optisch im Bereich des Kontroll-*wells* und dem unbeschichteten B33-Glasplättchen. Die Chondroitinsulfat- sowie Dermatansulfat-PEM Beschichtungen zeigten mit und ohne Zugabe von rh-BMP-2 sowie die Heparin-PEM-Beschichtung ohne Zugabe von rh-BMP-2 eine verringerte Zellzahl und eine veränderte Morphologie (Abbildung 5).

Tabelle 6: Zellzählung der C2C12-Zellen nach sechs Tagen

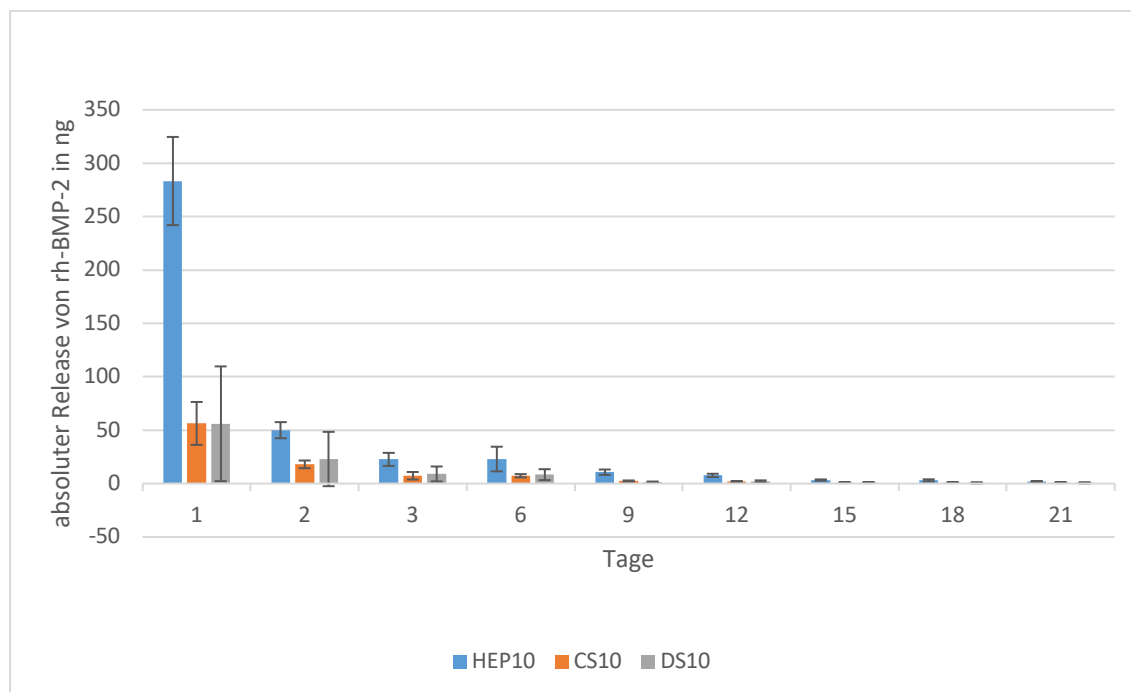
Zelllinie	Messung				Zellzahl/ <i>well</i> Faktor 0,25
	1.	2.	3.	MW	
<b>C2C12</b>					
<b>Co</b>	1.183.000	1.212.000	1.204.000	1.199.667	299.917
<b>B33</b>	460.000	479.000	471.000	470.000	117.500
<b>CS10</b>	346.000	354.000	353.000	351.000	87.750
<b>CS10/BMP-2</b>	323.000	325.000	328.000	325.333	81.333
<b>HEP10</b>	245.000	252.000	246.000	247.667	61.917
<b>HEP10/BMP-2</b>	1.070.000	1.065.000	1.080.000	1.071.667	267.917
<b>DS10</b>	218.000	219.000	231.000	222.667	55.667
<b>DS10/BMP-2</b>	468.000	470.000	501.000	479.667	119.917

Die Zellzählung wurde nach sechs Tagen mit dem CASY in dreifacher Messung durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Die Heparin-PEM-Beschichtung mit Zugabe von rh-BMP-2 zeigten nach sechs Tagen hinter dem Kontroll-*well* und dem unbeschichteten Glasplättchen die höchste Zellzahl, die im Bereich der Kontrolle lag. Die restlichen Beschichtungen zeigten eine deutlich verringerte Zellzahl. Lediglich die Dermatansulfat-PEM-Beschichtung mit rh-BMP-2 zeigte eine etwas höhere Zellzahl, wobei diese immer noch bei weniger als 50% der Heparin-PEM-Beschichtung mit rh-BMP-2 lag (Tabelle 2).

### 3.1.2 rh-BMP-2-Release

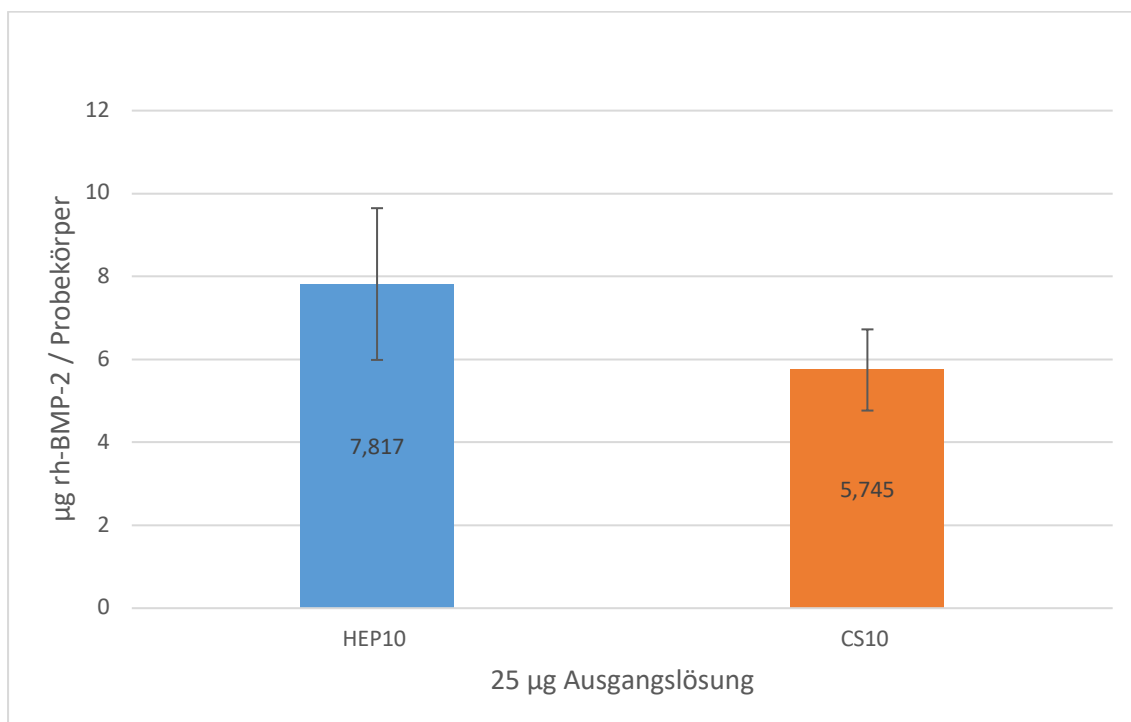
#### 3.1.2.1 Glas



**Abbildung 6: Absoluter rh-BMP-2-Release von mit Heparin-, Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-PEM beschichteten Glasplättchen.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Bei allen drei Beschichtungen zeigte sich ein ähnliches Freisetzungsverhalten, bei dem nach einem Tag bereits über die Hälfte und nach sechs Tagen über 90% der gesamten freigesetzten Menge an rh-BMP-2 abgegeben worden war. Waren die Werte bei Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-PEM nahezu gleich, zeigte sich - wie in Abbildung 6 zu sehen - bei der Heparin-Beschichtung ein Niveau, das ungefähr viermal so hoch war (Gesamtmenge von 406 ng BMP2 bei Heparin-PEM zu 102 ng (Dermatansulfat-PEM) bzw. 96 ng (Chondroitinsulfat-PEM) rh-BMP-2).

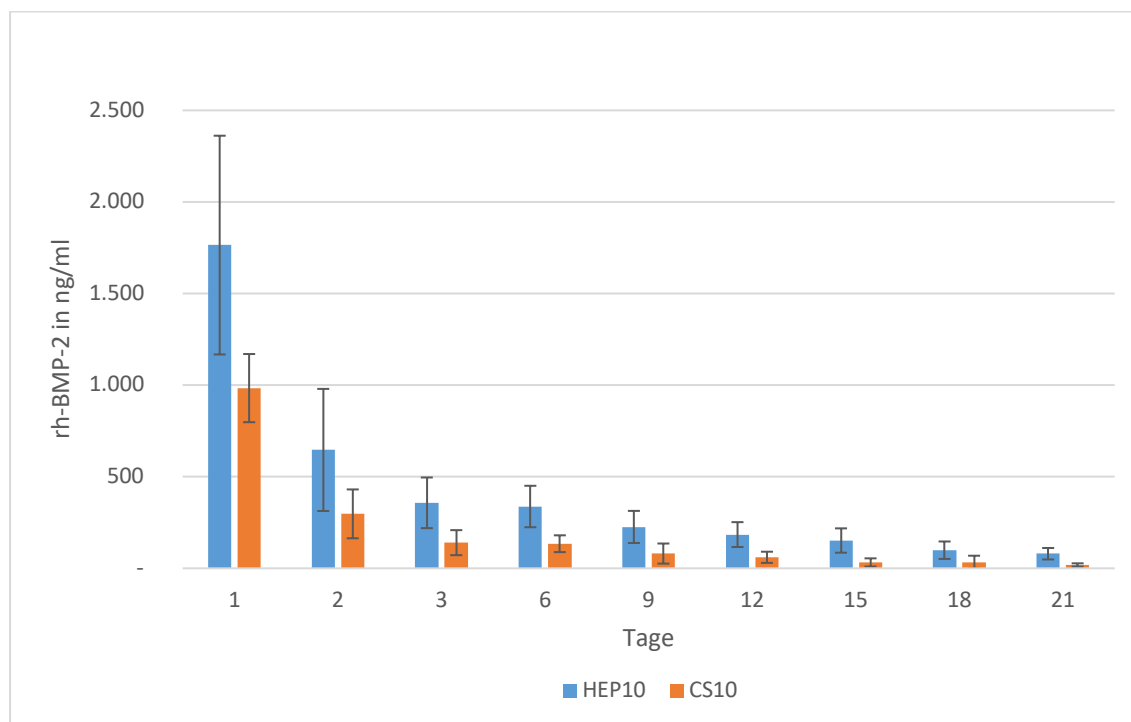
## 3.1.2.2 Titan



**Abbildung 7: Beladungsmenge auf den mit Heparin- und Chondroitinsulfat-PEM beschichteten Titanplättchen mit einer Ausgangslösung von 25 µg rh-BMP-2.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

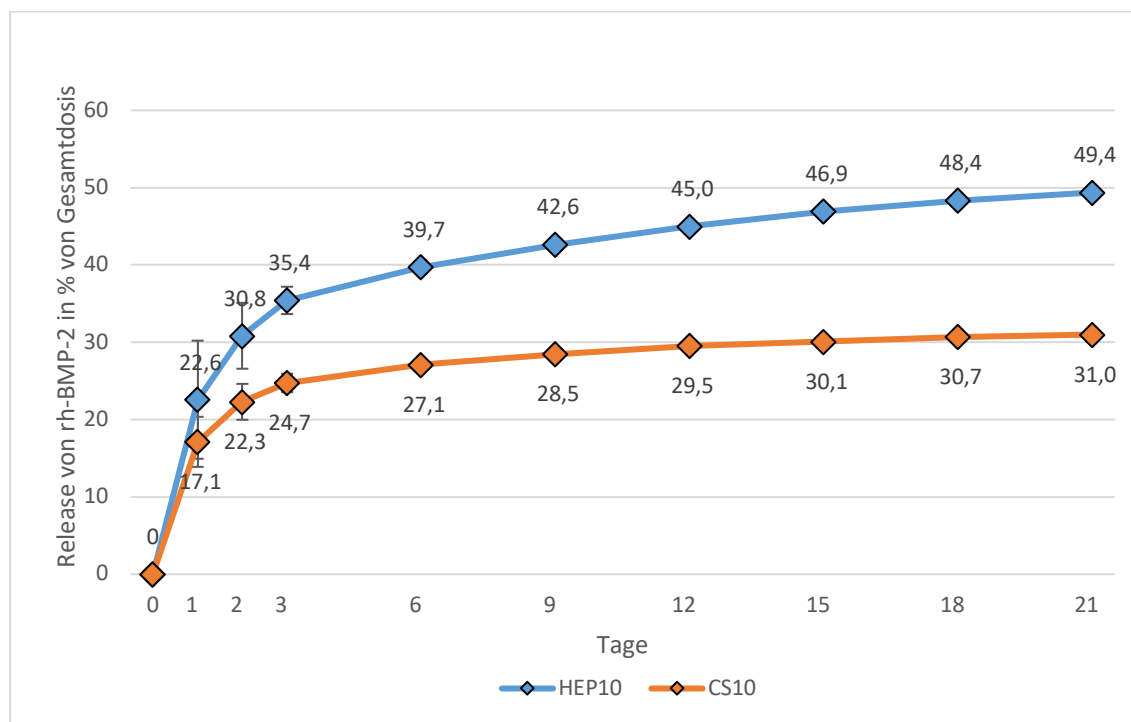
Bei der Beladung mit rh-BMP-2 ausgehend von der Stammlösung mit einer Konzentration von 25 µg zeigte sich, dass die Polyelektrolyt Multilayer mit Heparin 36,1% mehr rh-BMP-2 immobilisierten als die vergleichbare Beschichtung mit Chondroitinsulfat (Abbildung 7).





**Abbildung 8: Absoluter rh-BMP-2-Release von mit Heparin- und Chondroitinsulfat-PEM beschichteten Titanplättchen.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Beim absoluten Release von rh-BMP-2 zeigte sich bei beiden Beschichtungen ein ähnliches Freisetzungsmuster, wobei dasjenige der Heparin-PEM höher im Niveau lag (Abbildung 8). Insgesamt wurde aus der Heparin-haltigen Beschichtung (3841ng rh-BMP-2) mehr als das doppelte (216%) an rh-BMP-2 freigesetzt als aus der Chondroitinsulfat-haltigen Beschichtung (1781ng rh-BMP-2). Die Release-Kinetik war bei beiden eine exponentiell abnehmende, bei der nach 24 Stunden bereits 45,9% (Heparin-PEM) bzw. 55,2% (Chondroitinsulfat-PEM) und nach 3 Tagen 72,0% (Heparin-PEM) bzw. 79,8% (Chondroitinsulfat-PEM) der Gesamtfreisetzungsmenge innerhalb der 21 Tage abgegeben wurden.

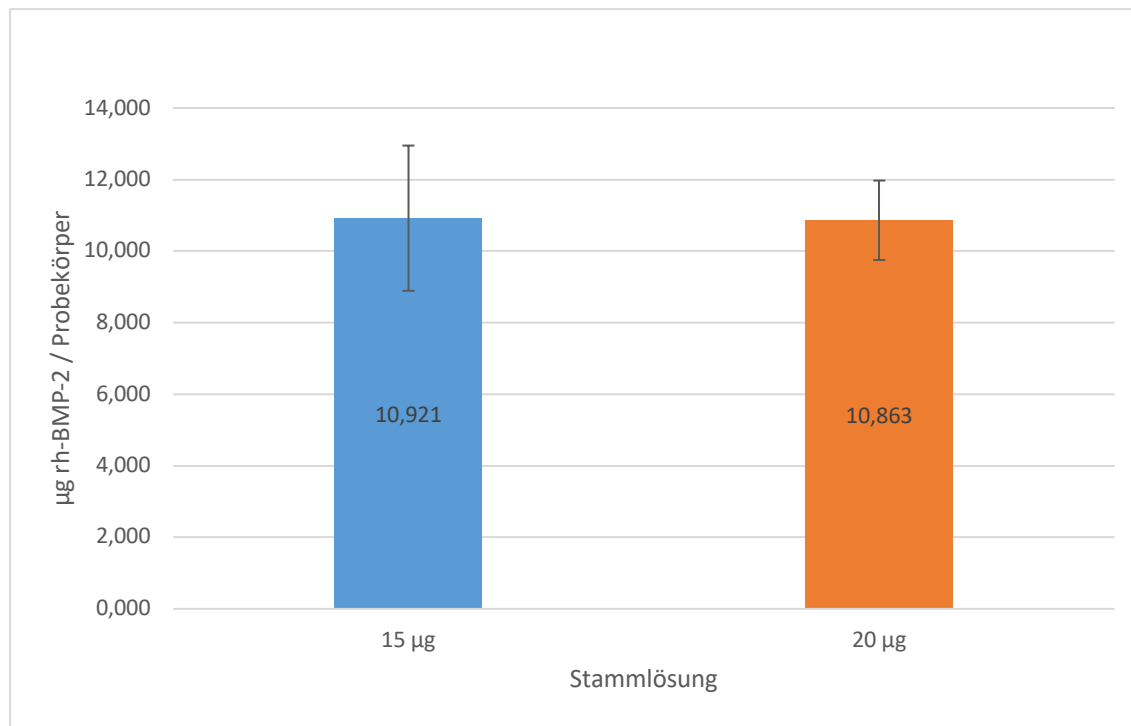


**Abbildung 9: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Heparin- und Chondroitinsulfat-PEM beschichteten Titanplättchen.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Der kumulative rh-BMP-2-Release aus den Heparin- und Chondroitinsulfat-PEM in % von der Gesamtbeladungsdosis zeigte sich bei der Heparin-haltigen Beschichtung insgesamt höher. Bereits nach einem Tag waren 22,6% abgegeben, wogegen aus der Chondroitinsulfat-haltigen Beschichtung 17,1% der Beladungsmenge freigegeben wurden. Die Differenz der anteiligen Freisetzung vergrößerte sich kontinuierlich, bis nach 21 Tagen 49,4% der Protein-Gesamtbeladungsdosis der Heparin-PEM und 31,0% der Chondroitinsulfat-PEM freigesetzt worden waren (Abbildung 9).

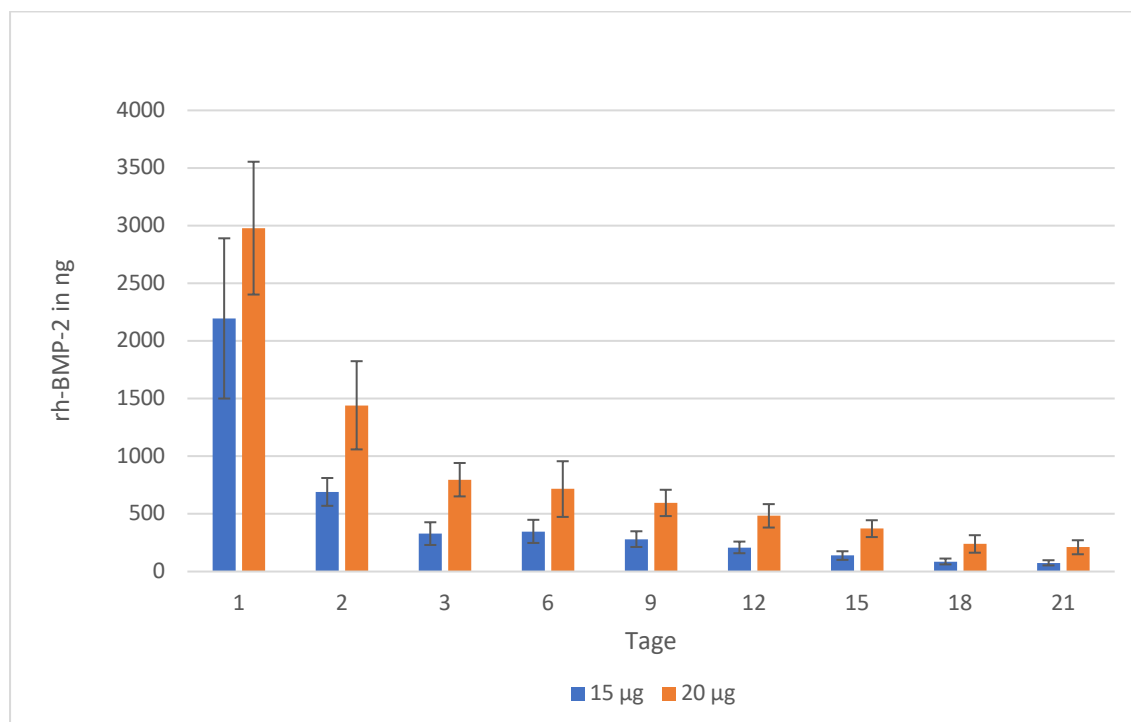
## 3.2 Hauptversuche – rh-BMP-2-Release

### 3.2.1 Heparin-Polyelektrolyt-Multilayer



**Abbildung 10: Rh-BMP-2-Beladungsmenge auf Heparin-PEM bei Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

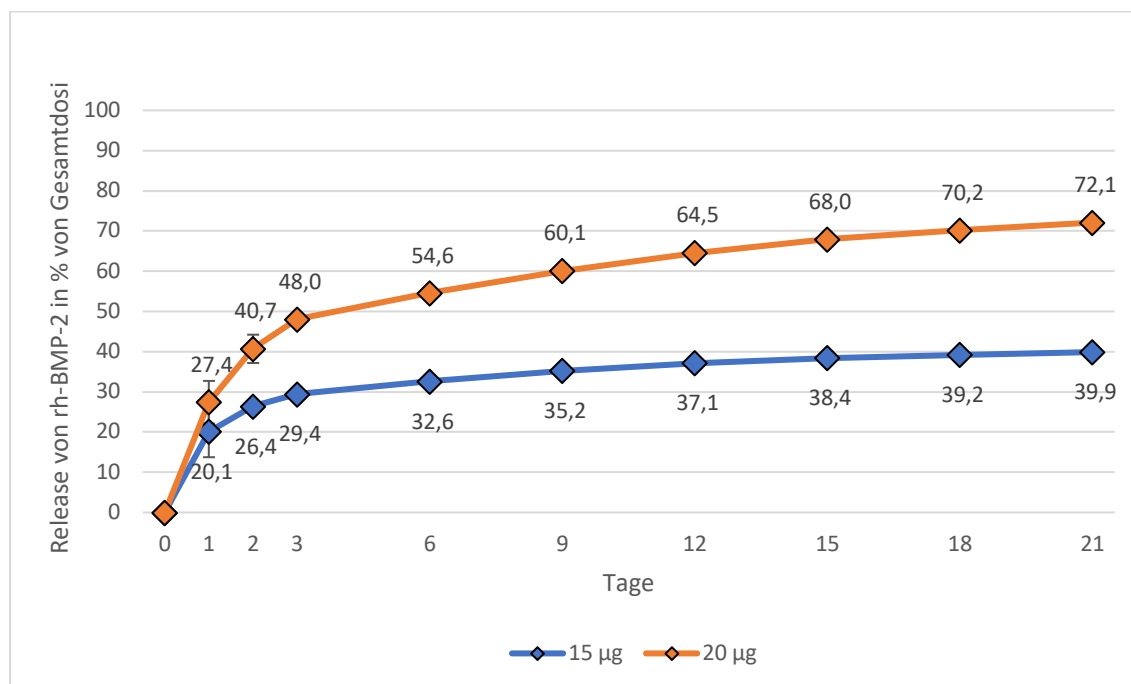
Die Gesamtbeladungsmengen auf den Heparin-PEM zeigte bei den Ausgangsstammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2 einen nur geringen Unterschied (0,53%) und waren fast identisch, wie die Abbildung 10 zeigt.



**Abbildung 11: Absoluter rh-BMP-2-Release bei Heparin-PEM und Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Beim absoluten rh-BMP-2-Release aus den Heparin-PEM zeigte sich bei beiden Ansätzen ein ähnliches und dabei exponentiell abnehmendes Freisetzungsmuster. So waren nach 24 Stunden 50,4% (15 µg Stammlösung) bzw. 38,0% (20 µg Stammlösung) der insgesamt freigesetzten Menge, nach 3 Tagen bereits 73,8% (15 µg Stammlösung) bzw. 66,6% (20 µg Stammlösung) und nach 12 Tagen 93,1% (15 µg Stammlösung) bzw. 98,5% (20 µg Stammlösung) an das Umgebungsmedium abgegeben worden (Abbildung 11).

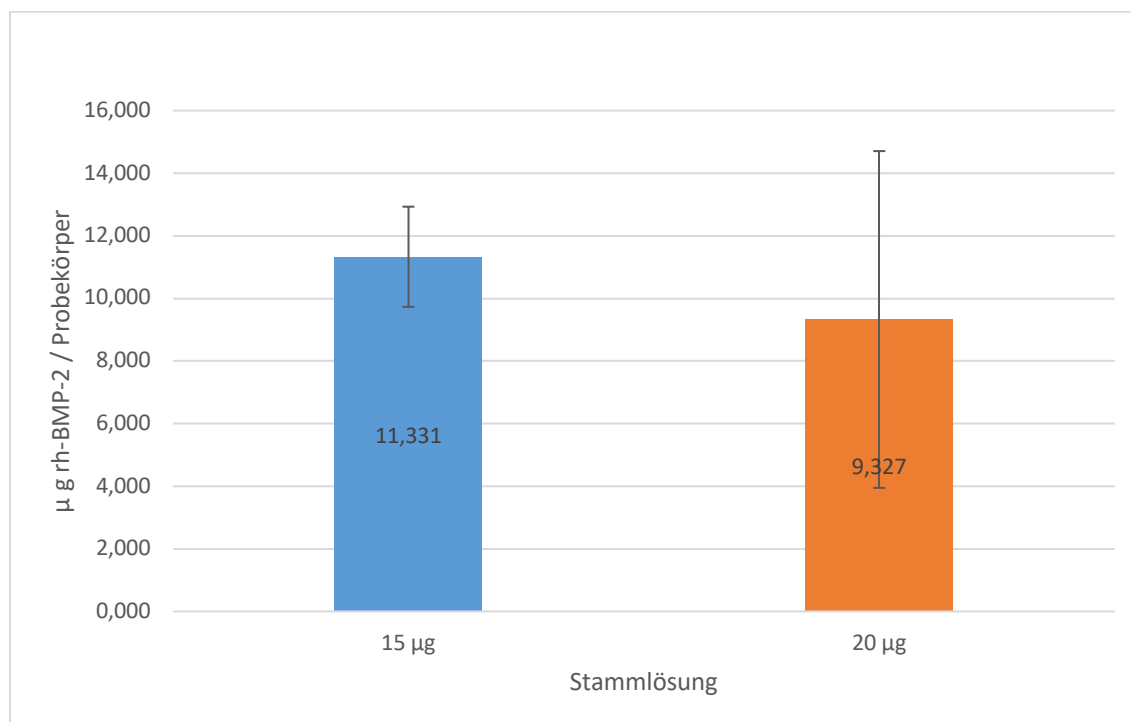
Unterschiedlich zeigte sich hingegen das Mengenniveau, wobei das Niveau bei den Plättchen mit einer Ausgangsstammlösung mit 20 µg rh-BMP-2 zu jedem Zeitpunkt höher und die freigesetzte Gesamtmenge an Protein um 79,9% höher war als bei den Plättchen mit einer Ausgangsstammlösung mit 15 µg rh-BMP-2.



**Abbildung 12: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Heparin-PEM beschichteten Titanplättchen und Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

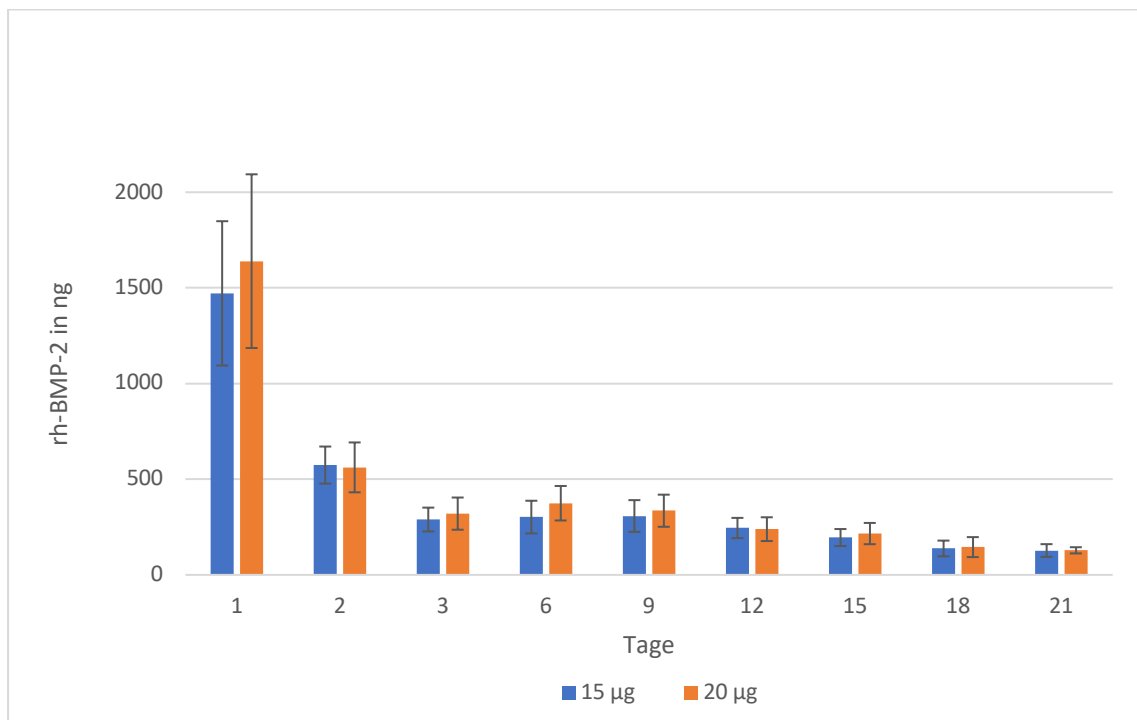
Der von der Gesamtbladungsdosis prozentuale kumulative Release von rh-BMP-2 war bei den Versuchen mit einer Stammlösung mit 20 µg rh-BMP-2 durchweg höher als bei den Versuchen mit einer Stammlösung mit 15 µg rh-BMP-2. Betrag der Unterschied nach 24 Stunden 7,3 Prozentpunkte (20,1% bei 15 µg und 27,4% bei 20 µg), so vergrößerte sich die Differenz zunehmend, bis diese nach 21 Tagen 32,2 Prozentpunkte (39,9% bei 15 µg und 72,1% bei 20 µg) betrug (Abbildung 12).

### 3.2.2 Collagen-Heparin-Polyelektrolyt-Multilayer



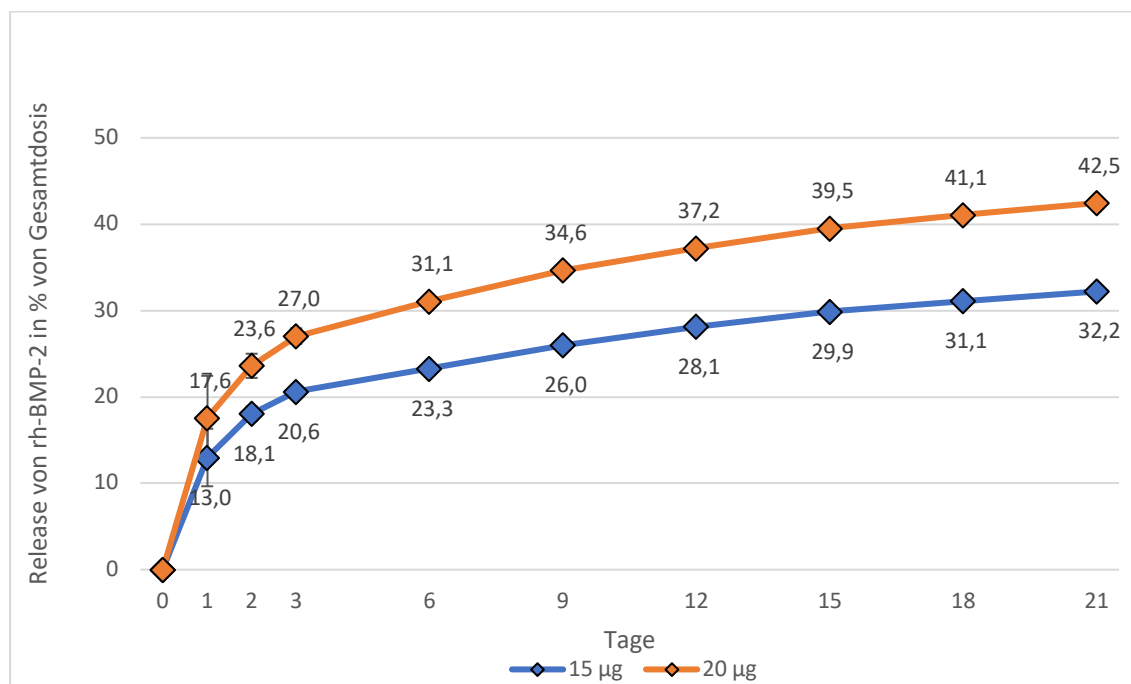
**Abbildung 13: Rh-BMP-2-Beladungsmenge auf Collagen-Heparin-PEM bei Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Die Gesamtbeladungsmenge von rh-BMP-2 auf den Collagen-Heparin-PEM zeigte sich bei einer Ausgangsstammlösung mit 15 µg um 21,5% höher als bei einer Ausgangsstammlösung mit 20 µg (Abbildung 13).



**Abbildung 14: Absoluter rh-BMP-2-Release bei Collagen-Heparin-PEM und Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Der Release zeigte - wie Abbildung 14 verdeutlicht - bei beiden Ausgangsstammlösungen ein ähnliches, erneut exponentiell abnehmendes Muster. Zudem zeigte sich hier auch ein ähnliches absolutes Niveau an Freisetzung, bei dem der Release bei der Ausgangsstammlösung mit 20 µg zu den jeweiligen Zeitpunkten im Durchschnitt um 7,4% höher war. Die absolut freigesetzte Menge an rh-BMP-2 war bei der Stammlösung mit 20 µg rh-BMP-2 um 8,5% (3960 ng) höher als bei der Stammlösung mit 15µg rh-BMP-2 (3650 ng).

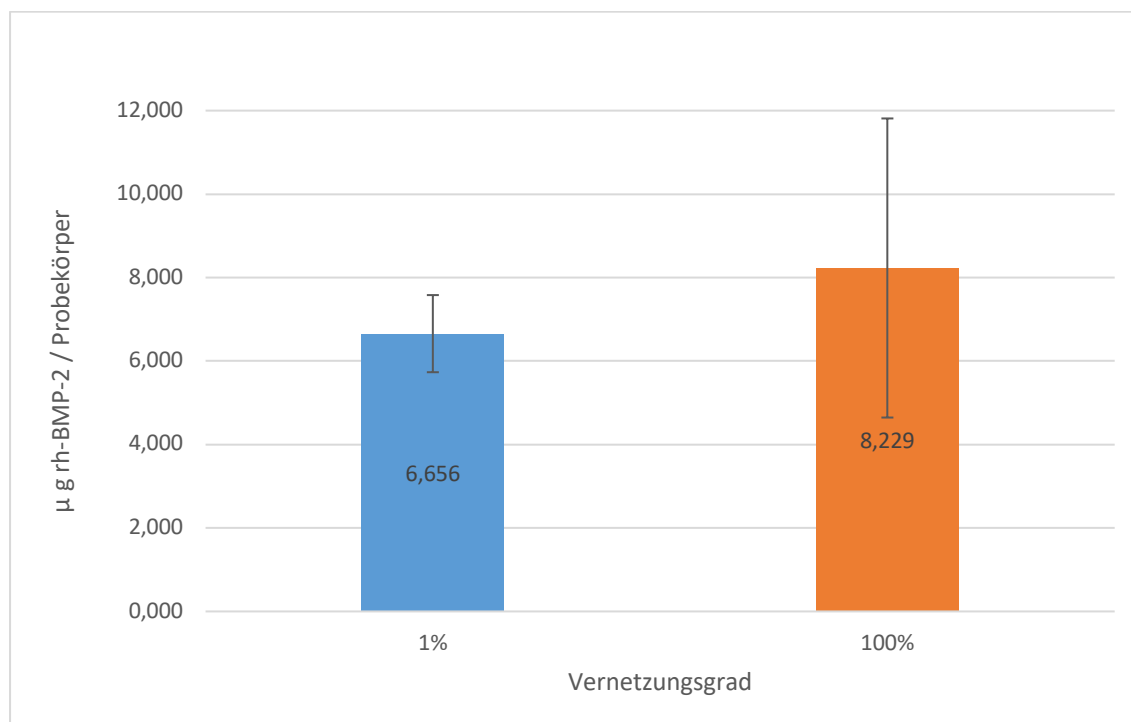


**Abbildung 15: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Collagen-Heparin-PEM beschichteten Titanplättchen und Stammlösungen mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Bei dem prozentualen kumulativen Release von rh-BMP-2 in Abhängigkeit von der Gesamtbeladungsmenge zeigte sich, wie in Abbildung 15 abgebildet, dass bei den Versuchen mit einer Stammlösung mit 20 µg rh-BMP-2 zu jedem Zeitpunkt ein höheres Niveau vorhanden war als bei den Versuchen mit einer Stammlösung mit 15 µg rh-BMP-2. Dabei nahm die Differenz von der Messung nach 24 Stunden mit 4,6 Prozentpunkten durchschnittlich um 0,7 Prozentpunkte zu, bis nach 21 Tagen ein Unterschied von 10,3 Prozentpunkten vorlag.

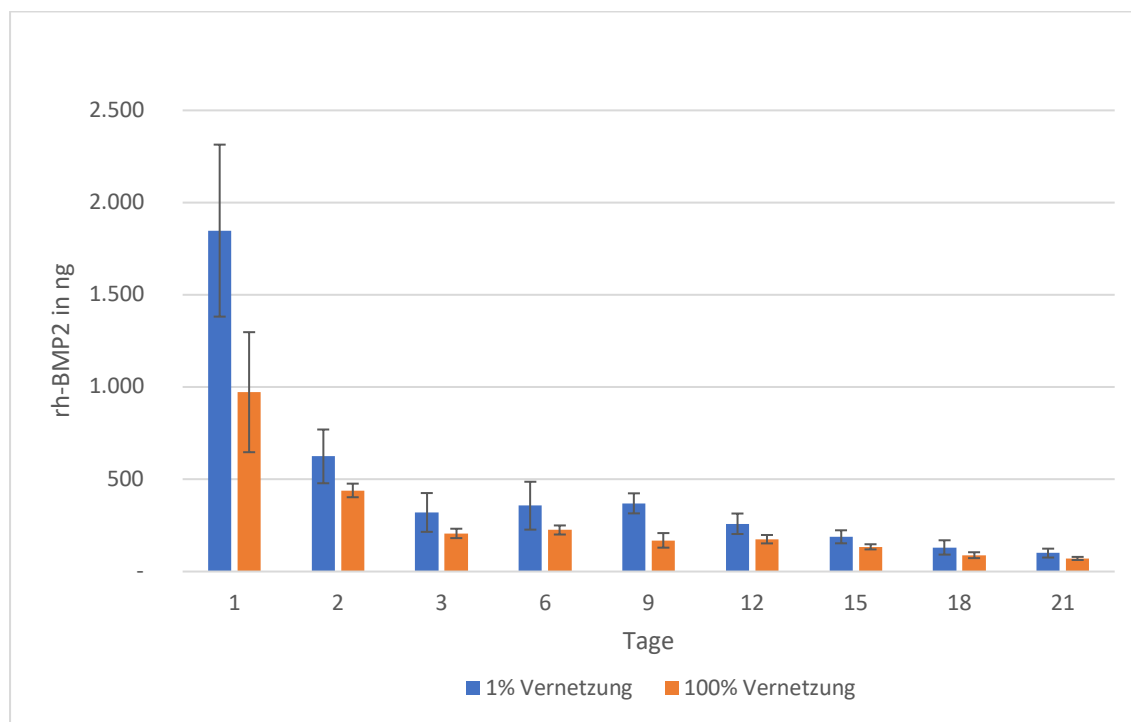


### 3.2.3 Collagen-Heparin-Polyelektrolyt-Multilayer chemisch vernetzt



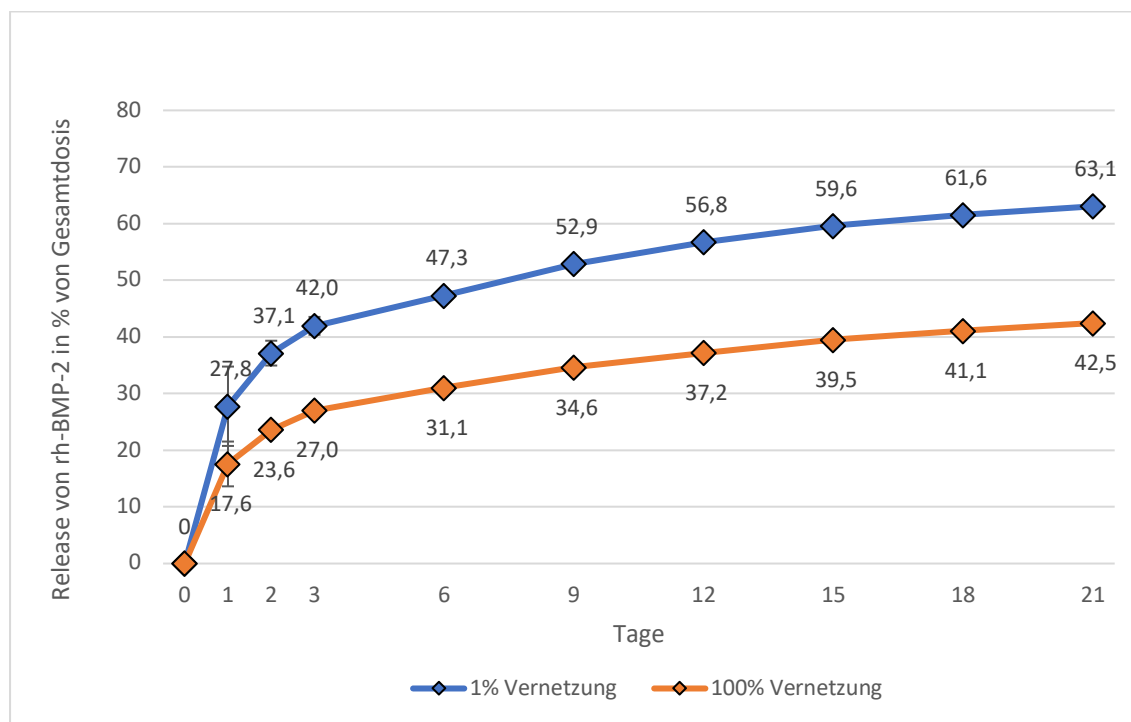
**Abbildung 16: Rh-BMP-2-Beladungsmenge auf Collagen-Heparin-PEM bei chemischer Vernetzung von 1% und 100%.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Bei einer Ausgangsstammlösung mit 20 µg rh-BMP-2 in beiden Ansätzen war die Gesamtbeladungsmenge von rh-BMP-2 auf den Collagen-Heparin-PEM mit einem chemischen Vernetzungsgrad von 100% um 23,6% höher als bei einem Vernetzungsgrad von 1% (Abbildung 16).



**Abbildung 17: Absoluter rh-BMP-2-Release bei Collagen-Heparin-PEM und Graden der chemischen Vernetzung von 1% und 100%.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

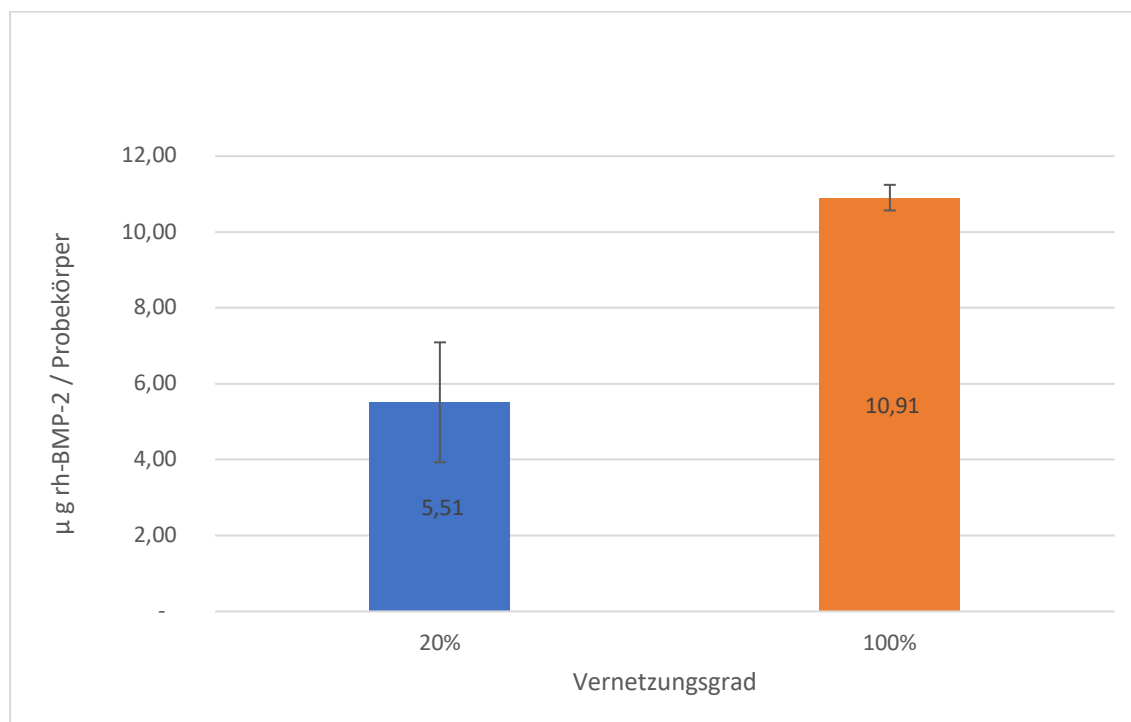
Beim absoluten Release von rh-BMP-2 zeigte sich, dass die Beschichtung, welche 1% chemisch vernetzt worden war, deutlich mehr Protein abgab als die Beschichtung mit 100% Vernetzung: insgesamt 69,2% mehr (4198 ng bei 1% Vernetzung und 2480 ng bei 100% Vernetzung). Dabei war das Muster der Freisetzungskinetik bei beiden Vernetzungsgraden sehr ähnlich; so waren nach 24 Stunden 44% (1% Vernetzung) bzw. 39,2% (100% Vernetzung), nach drei Tagen 75,0% (1% Vernetzung) bzw. 74,3% (100% Vernetzung) und nach 6 Tagen 90% (1% Vernetzung) bzw. 88,2% (100% Vernetzung) der insgesamt freigesetzten Menge rh-BMP-2 abgegeben worden. Auch die späteren Zeitpunkte waren ähnlich und unterschieden sich um höchstens 2,6 Prozentpunkte (Abbildung 17).



**Abbildung 18: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Collagen-Heparin-PEM beschichteten Titanplättchen und Graden der chemischen Vernetzung von 1% und 100%.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

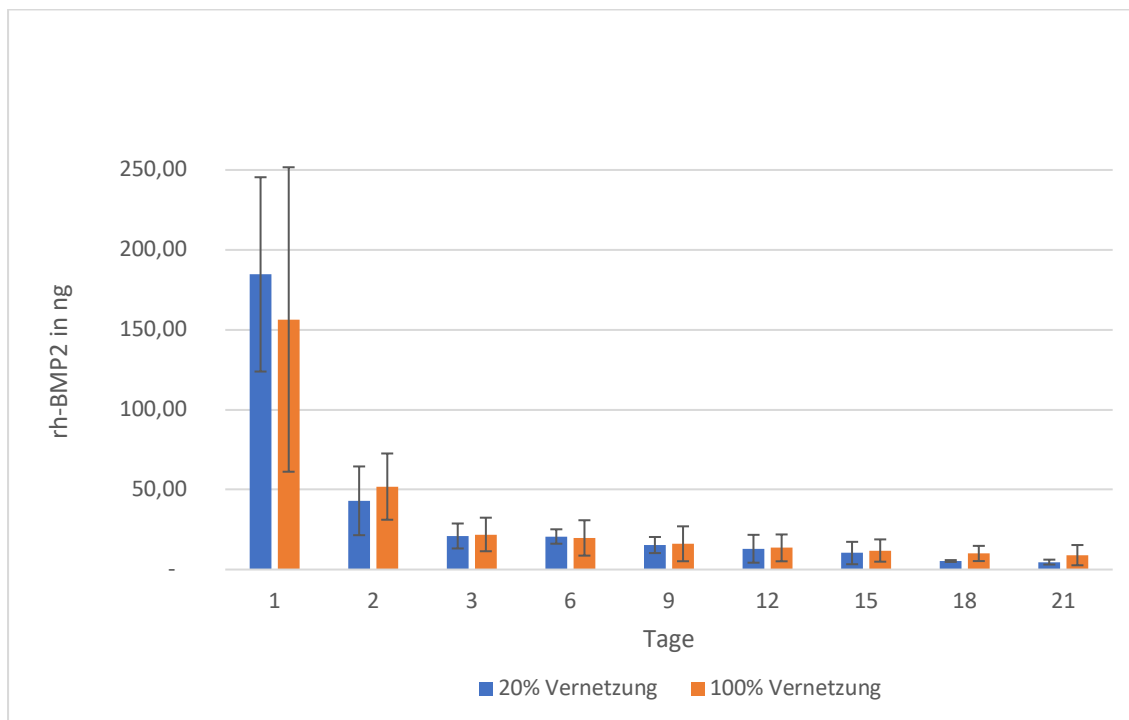
Bei dem prozentualen kumulativen Release von rh-BMP-2 in Abhängigkeit von der Gesamtbeladungsmenge zeigte sich, dass bei einer chemischen Vernetzung von 1% deutlich mehr Protein in Relation zur Beladungsmenge freigesetzt wurde als bei einer Vernetzung von 100%. Die Differenz stieg dabei von 10,2 Prozentpunkten nach 24 Stunden bis zum Tag 12 an (19,4 Prozentpunkte) und verblieb wie in Abbildung 18 zu sehen ist bei ca. 20 Prozentpunkten Unterschied (20,1; 20,5; 20,6 Prozentpunkte).

### 3.2.4 Heparin-Polyelektrolyt-Multilayer photochemisch vernetzt



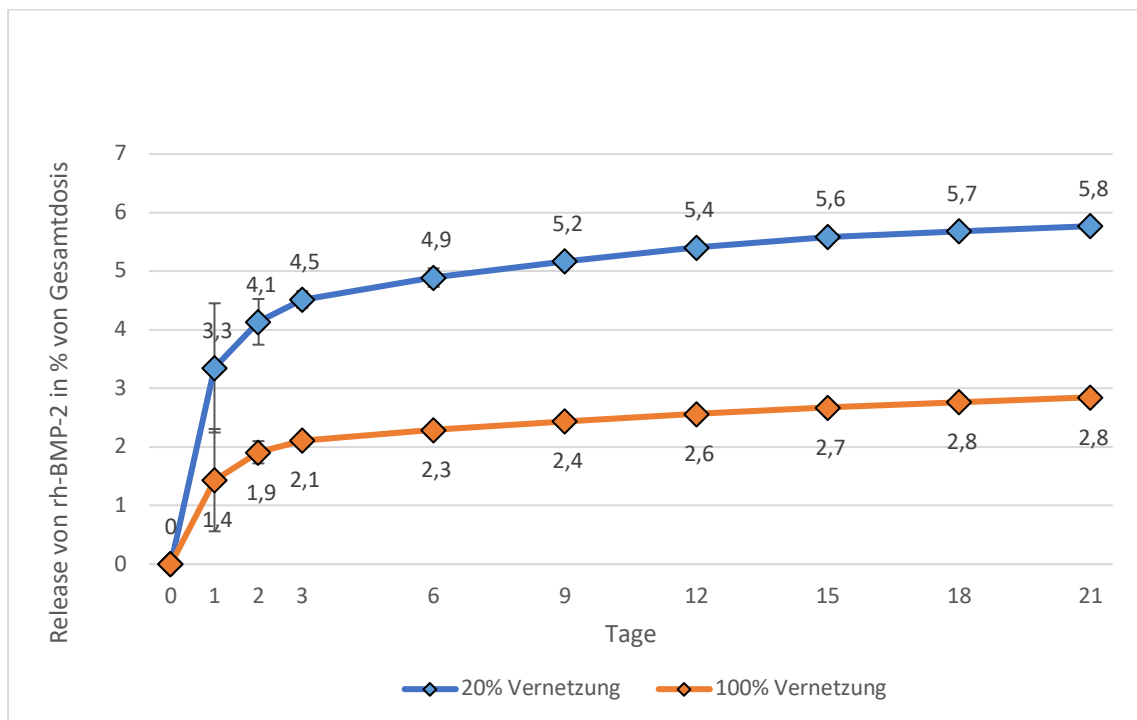
**Abbildung 19: Rh-BMP-2-Beladungsmenge auf Heparin-PEM bei photochemischer Vernetzung von 20% und 100%.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Bei einer Ausgangsstammlösung von 15  $\mu\text{g/ml}$  rh-BMP-2 in beiden Ansätzen war die Gesamtbeladungsmenge von rh-BMP-2 auf den Heparin-PEM mit einem chemischen Vernetzungsgrad von 100% fast doppelt so hoch wie bei einem Vernetzungsgrad von 20% (98,0% mehr gebundenes rh-BMP-2; Abbildung 19).



**Abbildung 20: Absoluter rh-BMP-2-Release bei Heparin-PEM und Graden der photochemischen Vernetzung von 20% und 100%.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Der absolute Release bei der photochemischen Vernetzung befand sich generell auf einem sehr niedrigen Niveau im Nanogramm-Bereich, wobei die 20% photochemisch vernetzten PEM 2,5% mehr Protein freisetzen (Abbildung 20). Auch von der Freisetzungskinetik waren beide Vernetzungsgrade miteinander vergleichbar; so lagen die Unterschiede beim prozentualen Anteil von der gesamten freigesetzten Menge rh-BMP-2 bei höchstens 4,6% (24 Stunden-Wert).



**Abbildung 21: Kumulativer Release von rh-BMP-2 in % von der Beladungsmenge bei Heparin-PEM beschichteten Titanplättchen und Graden der photochemischen Vernetzung von 20% und 100%.** Die Balken repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen.

Das Niveau des kumulativen Protein-Releases, prozentual gemessen an der rh-BMP-2-Gesamtbeladungsmenge, befand sich bei beiden Graden der photochemischen Vernetzung im einstelligen Prozentbereich, wobei bei der 20% Vernetzung anteilig mehr Protein abgegeben wurde (Abbildung 21). So stieg der Unterschied von 1,9 Prozentpunkten nach 24 Stunden (3,3% bei 20% Vernetzung und 1,4% bei 100% Vernetzung) auf 3,0 Prozentpunkte nach 21 Tagen (5,8% bei 20% Vernetzung und 2,8% bei 100% Vernetzung).

## 4 Diskussion

Aktuell findet sich in der Literatur eine Vielzahl an unterschiedlichen Ansätzen zur Verbesserung der Osseointegration von Implantaten. Dabei ist es jedoch bisher nicht gelungen, ein befriedigendes Verfahren zu entwickeln, Titanimplantate mit rh-BMP-2 zu beladen, um so die Osseointegration speziell im vorgeschädigten Knochen zu verbessern. Die bisherigen Ansätze benötigten große Mengen von dem kostspielig rekombinant hergestellten rh-BMP-2, deren Freisetzung in Menge und/oder Freisetzungsmuster nur eine begrenzt positive Auswirkung auf die Einheilung des Implantates aufwies. Daher besteht auf dem Gebiet der Implantatbeschichtung mit Wachstumsfaktoren ein großer Forschungsbedarf.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Freisetzungskinetik von eukaryotischem rh-BMP-2, welches auf sterilisierbaren Polyelektrolyt Multilayerbeschichtungen auf Titanoberflächen aufgebracht wurde. Hierfür wurden in Vorversuchen Polyelektrolyt Multilayerbeschichtungen mit unterschiedlichen sulfatierten Glykosaminoglykanen untersucht, um den Fokus auf die vielversprechendsten zu legen. Dabei wurde sowohl die Release-Kinetik von rh-BMP-2 als auch das Zellwachstum auf den unterschiedlichen Beschichtungen untersucht.

In den Hauptversuchen wurde die ausgewählte Beschichtung mit unterschiedlichen Dosen beladen, modifiziert und vernetzt. Dies hatte das Ziel, die ECM besser zu imitieren sowie verschiedene Freisetzungsmuster zu erzielen.

### 4.1 Diskussion der Methode

#### 4.1.1 Titan als Implantatmaterial

Die Grundvoraussetzung eines Implantatmaterials ist die Biokompatibilität, also sowohl die lokale, als auch die systemische Verträglichkeit des Implantates im Implantatlager. Dabei dürfen die Implantate weder allergene noch toxische noch kanzerogene Reaktionen auslösen.

Titan als Werkstoff für Implantate sowohl in der Orthopädie als auch in der dentalen Chirurgie bietet jene geforderte Biokompatibilität. Diese wird durch die Reaktionsfreudigkeit des Titans mit Sauerstoff ermöglicht, wodurch auf der

Titanoberfläche eine passivierende Oxidschicht entsteht und das Implantat gegen Einflüsse der Umgebung und Reaktionen mit dieser isoliert. Selbst nach einer Beschädigung der Passivierungsschicht wird diese innerhalb kürzester Zeit erneut ausgebildet und garantiert somit eine dauerhafte Biokompatibilität (Päßler 1997; Hosoki et al. 2018).

Neben der Biokompatibilität spielen auch die Funktionalität, die Belastbarkeit und die Praktikabilität eine wichtige Rolle. Die hohe Festigkeit von Titan in Kombination mit der Elastizität bietet eine hohe Belastbarkeit der Implantate, welche durch Titanlegierungen noch verbessert werden kann (Päßler 1997).

Durch die Modifizierung der Implantatoberfläche kann das Titan den verschiedenen Ansprüchen angepasst und die Einheilung verbessert werden (Kieswetter et al. 1996; Boyan et al. 1998; Schliephake und Scharnweber 2008; Wennerberg und Albrektsson 2009). Ein weiterer Vorteil des Titans besteht aus der vielfältigen Verwendbarkeit im Bereich der Implantate. Nicht nur hat sich der Werkstoff in Reinform und Legierungen als Goldstandard für enossale Implantate in der Zahnmedizin etabliert (Albrektsson et al. 2008), auch spielt er bei Implantaten in der orthopädischen Versorgung wie Prothesenschäfte bei Hüft-Endoprothesen eine wichtige Rolle.

#### 4.1.2 Wachstumsfaktor rh-BMP-2

Auf dem Gebiet der Wachstumsfaktoren, also Proteinen, die an der Erneuerung und Regeneration von knöchernem Gewebe in Defektzonen mitwirken können (Urist et al. 1973; Schliephake 2015), wurde in den vergangenen Jahren intensiv geforscht und insbesondere in Hinsicht auf die Regeneration knöchernen Gewebes eine Vielzahl dieser Proteine beschrieben (Schliephake 2002).

Bei den Proteinen der Familie der *bone morphogenetic proteins* als meist erforschte Repräsentanten der Wachstumsfaktoren (Giannoudis und Einhorn 2009) macht man sich die morphogenetischen Eigenschaften zunutze, mesenchymale Stammzellen chemotaktisch anzulocken und deren Ausdifferenzierung zu Osteoblasten zu fördern (Lind 1996; Kübler 1997; Chen et al. 2004). Derzeit sind zwei Vertreter der BMP-Familie von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die Anwendung am Patienten zugelassen, das BMP-2 und das BMP-7 (Gautschi et al. 2007; Bessa et al. 2008).



In der vorliegenden Arbeit wurde rekombinantes humanes BMP-2 aus CHO-Zellen verwendet. Das BMP-2 aus CHO-Zellen zeigte im Vergleich zu BMP-2 aus E. coli, dass äquivalente Dosen auf dem gleichen Träger als Bioimplantat eine bessere Knochenneusynthese beeinflussten (Aileen et al. 2016). Durch die höhere biologische Wirkung des eukaryotischen rh-BMP-2 sind geringere Freisetzungsmengen an Knochenwachstumsprotein für eine gleichwertige Verbesserung der Osseointegration notwendig. In vielen Publikationen wird nicht explizit angegeben, welches BMP-2 verwendet wird, wobei dies eine entscheidende Information für die Vergleichbarkeit der Studien wäre.

#### 4.1.3 Polyelektrolytmultilayer (PEM)

Die Bindung von Knochenwachstumsproteinen ist ein wichtiger Ansatz zur Verbesserung der Osseointegration von Titanimplantaten, insbesondere im vorgeschädigten Knochen.

Die kovalente Bindung oder die direkte Adsorption des rh-BMP-2 auf der Titanoberfläche sind dabei keine erfolgsversprechenden Ansätze, da man entweder eine nur sehr kleine Menge an Protein binden kann oder eine zu schnelle Abgabe des rh-BMP-2 auf Grund der geringen Affinität zur Metalloberfläche hat (Becker et al. 2006; Wikesjö et al. 2008b).

Generell gibt es diverse verschiedene weitere Ansätze zur Wachstumsproteinexposition an Titanimplantatoberflächen, die bereits in der Einleitung ausführlich besprochen wurden.

Bei den verwendeten Polyelektrolytmultilayern, bestehend aus sulfatierten Glykosaminoglykanen wie Heparin oder Chondroitinsulfat und Poly-L-Lysin, macht man sich die Eigenschaften der PEM zu Nutze, dass sie der ECM ähneln. Diese Ähnlichkeit beruht unter anderem darauf, dass sGAG Bestandteil der ECM sind und die sGAG Bindungsdomänen aufweisen, zu welchen Wachstumsfaktoren wie BMP-2 eine hohe Affinität besitzen (Decher 1997; Boudou et al. 2010; Grohmann et al. 2011).

Wichtig für die Auswahl des Beschichtungsverfahrens von Titanimplantaten mit rh-BMP-2 ist neben der Freisetzung des Knochenwachstumsprotein generell die Anwendbarkeit der beschichteten und beladenen Titanprodukte im klinischen Alltag. Hervorzuhebende Aspekte sind hierbei die Verpackungs- und Lagerungsmöglichkeit sowie die Sterilisierbarkeit, da rh-BMP-2 eine geringe Proteinstabilität besitzt und schnell

denaturiert. In vorangegangenen in vitro Studien wurde gezeigt, dass in PEM-beschichteten Titanimplantaten enthaltenes rh-BMP-2 nach Lufttrocknung und Lagerung bei 4 °C für mindestens sechs Monate keine signifikante Abnahme der Bioaktivität des Proteins zeigte. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Implantatsterilisation mittels  $\gamma$ -Bestrahlung möglich ist, ohne dass eine Reduktion des osteoinduktiven Potentials erfolgte. All dies sind Eigenschaften, welche PEM-beschichtete und mit BMP-2 beladene Titanimplantate für die klinische Verwendung nutzbar machen (Boudou et al. 2010; Guillot et al. 2013).

#### 4.1.4 Messverfahren

Für die Bestimmung des freigesetzten rh-BMP-2 kamen zwei Nachweisverfahren zum Einsatz: Nach Inkubation der Titan-PEM Plättchen mit rh-BMP-2 wurde durch Bestimmung der in der Lösung verbleibenden Restproteinmenge mittels Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assays) indirekt die auf den Plättchen adsorbierte Menge bestimmt. Für die Freisetzungskinetik wurden Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) angewandt. Beides sind seit langem etablierte Nachweisverfahren zur Bestimmung von Proteinen. Die unterschiedlichen Testverfahren waren notwendig, weil die Proteinkonzentrationen im Beladungsmedium wesentlich höher waren als in den Freisetzungsmedien. Während man mittels ELISA genaue Proteinmengen bei weniger konzentrierten Lösungen messen kann, wären für eine hohe Proteinkonzentration eine hohe Verdünnung mit vielen Verdünnungsschritten notwendig, was sehr fehleranfällig wäre. Mit dem BCA-Assay lassen sich höhere Konzentrationen ohne eine solch starke Verdünnung detektieren, jedoch werden keine genauen Ergebnisse bei niedrigen Proteinkonzentrationen erzielt.

Die Messung der Beladungsmenge auf den Plättchen erfolgte indirekt, das heißt, dass die Menge an Protein in der Stammlösung nach der Beladung gemessen wurde. Die Differenz von Ausgangsmenge zur rh-BMP-2-Menge in der Stammlösung nach Beladung wurde als Beladungsmenge gewertet. Somit könnte eine Differenz zwischen indirekt nachgewiesener und realer Beladungsmenge durch Proteinzerfall und ähnliches möglich sein. Für eine genauere Bestimmung wäre eine direkte Bestimmung wie Fluoreszenzmarkierung oder Markierungen mittels Radioaktivität notwendig, was jedoch mit einem enormen finanziellen Aufwand verbunden wäre.

## 4.2 Bewertung der Ergebnisse

Die Vorversuche dienten zur Detektion des am besten geeigneten Glykosaminoglykans für die Herstellung der Polyelektrolyt Multilayer. Dabei wurde sowohl das Zellwachstum auf den PEM-Beschichtungen gemessen als auch die Release-Kinetik des Knochenwachstumsfaktors rh-BMP-2 ermittelt.

In den Zellkulturversuchen mit C2C12- und hMSC-Zellen zeigte sich, dass das Zellwachstum auf den PEM-Beschichtungen mit Heparin und Beladung mit rh-BMP-2 im Vergleich mit den anderen sGAG-Beschichtungen am besten ausfiel. Dies zeigte sich sowohl in der Morphologie der Zellen, welche der Morphologie auf den Kontrollplättchen glich (Abbildung 4 und 5), als auch in der Zellzählung nach sechs Tagen Exposition der Zellen auf den Plättchen. Die Zellzählung hatte bei den proteinbeladenen Heparin-PEM die stärkste Zunahme der Zellzahl zum Ergebnis (Tabellen 1 und 2). Auch beim rh-BMP-2-Release zeigte sich die Heparin-haltige Beschichtung als beste Variante. In den Versuchen mit Glasplättchen war der Release viermal so hoch im Vergleich zu den Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-PEM (Abbildung 6). Und auch in den Titanvorversuchen zeigte sie sich mit Vorteilen gegenüber der Chondroitinsulfat-haltigen Beschichtung. Zum einen konnte 36,1% mehr Protein auf den Heparin-PEM gebunden, zum anderen auch deutlich mehr Protein (79,8%) abgegeben werden. Zudem war der prozentual freigesetzte Anteil von der Gesamtbladungsmenge an rh-BMP-2 mit 49,4% höher als bei der Chondroitinsulfat-Beschichtung mit 31,0%, was eine höhere Effektivität hinsichtlich des eingesetzten und freigesetzten Proteins bedeutet (Abbildungen 7, 8 und 9).

Auf Grund der in den Vorversuchen ermittelten Vorteile in Bezug auf die Beladungskapazität, Freisetzungsmenge an rh-BMP-2 und des besseren Zellwachstums wurden die Hauptversuche mit Heparin-PEM-Beschichtungen durchgeführt.

Um eine Effizienzsteigerung im Bereich der Beladung zu erreichen, wurde diese bei den PEM-beschichteten Titanplättchen mit verschiedenen Ausgangsstammlösungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei den Stammlösungen mit 15 $\mu$ g und 20 $\mu$ g rh-BMP-2 die höhere Menge an Protein in der Stammlösung keinen Vorteil hinsichtlich der Beladungsmenge an Knochenwachstumsprotein auf den Plättchen mit Heparin-PEM-Beschichtung gab (Abbildung 10). Dies ist mit einer Sättigung der Polyelektrolyt Multilayer mit rh-BMP-2 zu erklären, welche nur eine bestimmte Menge an rh-BMP-2 binden können. Das vorteilhafte Resultat hierbei wäre, dass weniger des teuren rh-BMP-2

für eine vergleichbare Beladungsmenge in der Stammlösung benötigt wird, was eine Kostensenkung in einer eventuellen klinischen Anwendung ermöglichen könnte.

Die freigesetzte Menge an rh-BMP-2 war mit  $7,1 \text{ ng/cm}^2$  ( $10,9 \text{ ng}$  bei einer Fläche von  $1,539 \text{ cm}^2$ ) in dem Bereich, der in der Literatur in vorangegangenen Versuchen ( $1,4\text{-}14,3 \text{ ng/cm}^2$ ) vorbeschrieben worden ist (Guillot et al. 2013).

Das Release-Kinetik-Muster zeigte eine Sättigungskurve mit einer starken Abgabe des Proteins in den ersten drei Tagen (Abbildung 11). Dabei war das Mengenniveau bei den Plättchen bei einer Ausgangsstammlösung von  $20 \mu\text{g}$  rh-BMP-2 höher, was bei einer vergleichbaren Beladungsdosis auch zu einer prozentual höheren Abgabe ( $72,1\%$  im Vergleich zu  $39,9\%$ ) von der Beladungsmenge führte (Abbildung 12). Eine Erklärung hierfür ist schwierig zu finden, da bei einer vergleichbaren Menge an gebundenem rh-BMP-2 in einer identischen Beschichtung auch von einer ähnlichen Freisetzungsmenge ausgegangen werden kann. Eine Möglichkeit wäre ein ungenau ermitteltes Ergebnis durch die nur indirekt bestimmte Menge an adsorbiertem rh-BMP-2. Für eine genauere Untersuchung wäre eine direkte Messung der geladenen Menge an rh-BMP-2 auf den Titanplättchen sowie eine Versuchsdurchführung mit einer höheren Anzahl an Titanplättchen notwendig.

Um die ECM noch besser zu simulieren, wurde Kollagen als das vorherrschende Protein der ECM in einem weiteren Release in die Heparin-PEM integriert. Dabei sollte das Kollagen als bioaktive Substanz die Biokompatibilität allgemein und die Osseointegration speziell verbessern, was in anderen Ansätzen bereits erfolgreich nachgewiesen wurde (Rammelt et al. 2004; Sverzut et al. 2012). Zu untersuchen war, ob durch die Zugabe des Kollagens eine ähnliche ausreichende Menge an Knochenwachstumsprotein gebunden wird und sich somit die beiden Vorteile der Imitation der ECM sowie der rh-BMP-2-Freisetzung kombinieren lassen. Auch hierbei wurden die zwei verschiedenen Ausgangsstammlösungen verwendet, wobei bei der höheren Menge Protein mit  $20 \mu\text{g}$  rh-BMP-2 erneut keine größere Beladungsmenge vorlag (Abbildung 13). Auch dies unterstützt die Vermutung, dass eine Beladungssättigung der PEM mit Protein bei  $15 \mu\text{g}$  rh-BMP-2 in der Ausgangsstammlösung erreicht ist.

Bei der Freisetzungskinetik gab es keine großen Unterschiede hinsichtlich Menge oder Freisetzungsmuster, welches erneut exponentiell abnehmend war (Abbildung 14). Dies ist im Vergleich zu dem Versuch mit reiner Heparin-PEM eher zu erwarten gewesen, da

eine vergleichbare Beladungsmenge auf identischer Beschichtung eine vergleichbare Release-Kinetik und Menge generieren sollte.

Im Vergleich zur reinen Heparin-PEM-Beschichtung ohne Kollagen zeigte sich kein großer Unterschied hinsichtlich der Beladungsmenge (Abbildungen 10 und 13) oder dem Freisetzungsmuster, jedoch hinsichtlich der abgegebenen Menge an Knochenwachstumsprotein. Dabei gaben die reinen Heparin-PEM-Beschichtungen in der Summe über 21 Tage mehr rh-BMP-2 ab als die Beschichtungen mit Kollagenzusatz (Abbildungen 11 und 14).

Um eine erfolgreiche biologische Aktivität an rh-BMP-2 zu erreichen, ist eine gewisse Konzentration bzw. abgegebene Menge an Protein notwendig. Laut Hersteller des rh-BMP-2 PeproTech® ist eine Konzentration von 40-100 ng/ml erforderlich, um die biologische Aktivität des rh-BMP-2 zu erzeugen. Studien an Tieren haben belegt, dass erst ab einer Abgabe an rh-BMP-2 von 100 ng/72h über einen Zeitraum von 24 Tagen eine erfolgreiche Knochenneusynthese über einen Zeitraum von sechs Monaten induziert (Gruber et al. 2009).

Im vorliegenden Fall zeigte sich, dass die Freisetzung von rh-BMP-2 bei beiden Ausgangsstammlösungen der Kollagen-Heparin-PEM mit 15 µg und 20 µg rh-BMP-2 zu jedem Zeitpunkt über 100 ng/72 h lag, was notwendig erscheint, um eine effiziente Knochenneusynthese zu induzieren (Gruber et al. 2009). Bei den reinen Heparin-PEM war dies lediglich bei der Ausgangsstammlösung mit 20 µg, jedoch nicht mit 15 µg der Fall. Dabei ist anzumerken, dass bei den reinen Heparin-PEM mit 15 µg rh-BMP-2 in der Ausgangsstammlösung lediglich die Messungen nach 18 und 21 Tagen unter 100 ng rh-BMP-2 pro 72 Stunden lag.

Hierzu müsste in einem *in vivo* Experiment untersucht werden, ob der Vorteil des Kollagens in der Beschichtung als verbesserte Simulation der ECM zusammen mit der dauerhaften Proteinabgabe von 100 ng/72h oder ob die vermehrte Abgabe an rh-BMP-2 aus der reinen Heparin-PEM überwiegt und die Osseointegration besser stimuliert.

Um eine Veränderung der Freisetzungskinetik zu erreichen, wurden die Polyelektrolyt-Multilayer im nächsten Schritt mit unterschiedlichen Graden und Methoden vernetzt. Dabei stand die Idee im Vordergrund, durch eine Vernetzung der einzelnen Schichten untereinander das rh-BMP-2 besser zu binden und so eine regelmäßigeren, der exponentiellen Burst-Freisetzung entgegenstehenden Release-Kinetik zu erzeugen.

Dies geschah mittels zwei verschiedener Methoden: der chemischen Vernetzung mittels EDC/NHS-Reaktion und der photochemischen Vernetzung mittels UV-*crosslinking* über eingebrachte Acrylamidgruppen.

Unabhängig von der Vernetzungsform gab es Unterschiede der Beladungsmenge bei den verschiedenen Vernetzungsgraden. So wurde bei der chemischen Vernetzung der Collagen-Heparin-PEM mit 100% Vernetzung 23,6% mehr rh-BMP-2 gebunden als bei einer Vernetzung von 1% und bei der photochemischen Vernetzung der Heparin-PEM beim Vernetzungsgrad von 100% 98% mehr Protein gebunden als bei der Vernetzung von 20%. Hierbei zeigte sich, dass der jeweils höhere Vernetzungsgrad mit einer erhöhten Menge an gebundenem rh-BMP-2 verknüpft war (Abbildungen 16 und 19). Dies bestätigte bereits die in der Literatur vorbeschriebene Effekte, dass unterschiedliche Vernetzungsgrade zu unterschiedlichen Bindungsmengen an rh-BMP-2 führen, wobei ein höherer Vernetzungsgrad mit einer vermehrten Bindung an Proteinen verbunden ist (Guillot et al. 2013). Dies könnte darin begründet sein, dass durch eine höhere Vernetzung die unterschiedlichen Layer der Beschichtung stärker miteinander verbunden sind und somit nach der Diffusion der Proteine in die Beschichtung das rh-BMP-2 durch eine verringerte Permeabilität besser gebunden wird.

Bei der Beladungsmenge zeigten sich keine großen Unterschiede zwischen den Vernetzungsformen generell. So wurden unabhängig vom Vernetzungsgrad bei der chemischen Vernetzung 7,44 ng pro Plättchen gebunden, während es bei der photochemischen Vernetzung 8,21 ng waren. Unterschiedlich waren hingegen die Differenzen innerhalb einer Vernetzungsform zwischen den unterschiedlichen Vernetzungsgraden.

Bei der photochemischen Vernetzung zeigten sich größere Unterschiede in der Beladungsmenge (Abbildung 19), was durch eine stärkere Veränderung der Struktur durch die photochemische Vernetzung zu erklären wäre.

Bei der Freisetzung des rh-BMP-2 zeigte sich ein großer Unterschied zwischen den beiden Vernetzungsformen. Wurden bei den chemisch vernetzten Beschichtungen Freisetzungsmengen erreicht, die hinsichtlich der abgegebenen Menge vergleichbar waren mit denen ohne Vernetzung, so zeigten die Beschichtungen mit photochemischer Vernetzung eine sehr geringe Menge an abgegebenen rh-BMP-2. So wurden lediglich 318 ng (20% photochemisch vernetzt) bzw. 310 ng (100% photochemisch vernetzt) abgegeben, was 5,8% (20% photochemisch vernetzt) bzw. 2,8% (100% photochemisch

vernetzt) der Beladungsmenge an rh-BMP-2 entspricht (Abbildungen 20 und 21). Folglich war nach 21 Tagen noch ein Großteil des Proteins nicht ans Elutionsmedium abgegeben und vermutlich weiterhin in der Beschichtung gebunden. Daher ist die photochemische Vernetzung im vorliegenden Fall keine erfolgsversprechende Methode zur Verbesserung der Release-Kinetik.

Bei der chemischen Vernetzung zeigte sich bei der Release-Kinetik ein anderes Bild hinsichtlich der freigesetzten Menge an rh-BMP-2. So waren sowohl die absoluten Werte an freigesetztem Protein als auch das Freisetzungsmuster vergleichbar mit denen der unvernetzten Collagen-Heparin-PEM. Eine verzögerte Freisetzung, gekennzeichnet durch höhere Freisetzungsmengen an rh-BMP-2 zu späteren Zeitpunkten, war jedoch nicht zu verzeichnen, sodass die Vernetzung keinen ersichtlichen Vorteil auf die Freisetzungskinetik zeigte. Da kein Vorteil in der Freisetzungskinetik durch die Vernetzung erzielt werden konnte, muss eine Abwägung der Notwendigkeit aufgrund der Vor- und Nachteile der chemischen Vernetzung getroffen werden. Zum einen wird der Effekt der Versteifung durch die Vernetzung beschrieben, welcher eine bessere Zelladhäsion bewirken kann und somit förderlich für die Osseointegration wäre (Richert et al. 2004). Auf der anderen Seite wird mit Hinblick auf den erheblichen Mehraufwand bei der Präparation des Titans und der Möglichkeit, dass chemisch nachvernetzte Multilayer während des Remodellierungsprozesses gegebenenfalls nicht mehr abgebaut werden können, eine chemische Vernetzung in Frage gestellt. Es wäre daher in weiteren *in vivo* Versuchen zu klären, ob die chemische Vernetzung bei einer vergleichbaren Menge an gebundenem und abgegebenen rh-BMP-2 wie in dieser Studie Vor- oder Nachteile für die Osseointegration mit sich bringt.

### 4.3 Ausblick

Der Versuch, Titan durch Beladung mit Wachstumsfaktoren osseointegrativer zu gestalten, ist bisher noch nicht in zufriedenstellendem Maße geglückt. Die vielfachen Ansätze zeigen jedoch das große Interesse auf diesem Gebiet, zumal Titan nach wie vor eines der führenden Materialien im Bereich der Implantatmaterialien darstellt und die Voraussetzungen für Implantationen durch den demographischen Wandel und hiermit konsekutiv häufiger einhergehender Multimorbidität verschlechtert werden.

Diese *in vitro* Studie zeigt, dass der Ansatz, rh-BMP-2 mittels Heparin Polyelektrolyt Multilayern auf Titan zu binden, vielversprechend ist. In folgenden Studien müsste mit

höherer Stückzahl untersucht werden, inwieweit sich die Ergebnisse reproduzieren lassen und welche Auswirkungen die unterschiedlichen Modifikationen der PEM *in vivo* auf die Osseointegration entfalten. Zur genauen Detektion der Beladungsmenge auf den Titanplättchen sollte zudem ein direktes Nachweisverfahren zum Einsatz kommen.

Da der Prozess der Osteogenese eine Reihe von unterschiedlichen Zellpopulationen (Endothelzellen, mesenchymale undifferenzierte Zellen, Osteoblasten und Fibroblasten) sowie entsprechende Signalsysteme involviert, die Proliferation, Angiogenese, Matrixbildung und osteogene Differenzierung steuern, stellt eine kombinierte Beladung mit weiteren Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung des Einheilungsprozesses dar.

Zukünftige Ansätze einer Beschichtung von Implantatoberflächen mit Wachstumsfaktoren müssen daher einer differenzierteren Strategie folgen, bei der nicht nur eine ausreichende Dosis verschiedener Wachstumsfaktoren auf der Oberfläche verankert wird, sondern auch in einem biologisch angemessenen Profil präsentiert bzw. freigesetzt werden kann. Diese Arbeit gibt einen ersten Ansatz über die Steuerung der Freisetzung über ein PEM-Beschichtungssystem mit dem Wachstumsfaktor rh-BMP-2 und kann durch zusätzliche vielfache Variationen als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen.



## 5 Zusammenfassung

Ziel der hier vorliegenden *In-vitro*-Studie war es, die Freisetzungskinetik von rh-BMP-2 aus Polyelektrolyt Multilayern auf Titanplättchen unterschiedlicher Modifikationen zu untersuchen. Die Heparin-PEM zeigten die suffiziente Beladung an rh-BMP-2 und vergleichbare Freisetzungsmengen und -kinetik wie vorangegangene Studien (Guillot et al. 2013). Nach dem Hinzufügen von Kollagen in die Beschichtung zur besseren Simulation der ECM zeigte sich zwar eine etwas geringere Menge an freigesetztem rh-BMP-2, die jedoch über 21 Tage eine Freisetzungsmenge von mindestens 100 ng/72h aufwies, was notwendig erscheint, um eine effiziente Knochenneusynthese zu induzieren (Gruber et al. 2009).

Die Vernetzung der Polyelektrolyt Multilayer führte nicht zu der erhofften verzögerten Freisetzungskinetik. Dabei zeigte sich, dass die chemische Vernetzung mittels EDC/NHS-Reaktion zu einer vergleichbaren Freisetzung bezogen auf Menge an Protein und Freisetzungsmuster wie die unvernetzten Beschichtungen führte, wohingegen die photochemische Vernetzung mittels *UV-crosslinking* zu einer sehr geringen, unbrauchbaren BMP-2-Freisetzung führte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC (2000): Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 15, 663–673
- Adden N, Gamble LJ, Castner DG, Hoffmann A, Gross G, Menzel H (2006): Phosphonic Acid Monolayers for Binding of Bioactive Molecules to Titanium Surfaces. *Langmuir* 22, 8197–8204
- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI (1981): A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 10, 387–416
- Aileen Z, Sylvie DL, Cameron C, Sean P (2016): How the source and carrier affect BMP activity: InFuse vs. the Cowell BMP implant. *Front Bioeng Biotechnol* 4, 2389
- Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J (1981): Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52, 155–170
- Albrektsson T, Sennerby L, Wennerberg A (2008): State of the art of oral implants. *Periodontol* 2000 47, 15–26
- Attisano L, Wrana JL (1998): Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol* 10, 188–194
- Attisano L, Wrana JL (2002): Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646–1647
- Becker J, Kirsch A, Schwarz F, Chatzinikolaïdou M, Rothamel D, Lekovic V, Laub M, Jennissen HP (2006): Bone apposition to titanium implants biocoated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A pilot study in dogs. *Clin Oral Investig* 10, 217–224
- Beldar A, Bhongade ML, Byakod G, Buregoni C (2013): Early loading of single-piece implant for partially edentulous posterior arch: a prospective one-year case report. *Case Rep Dent* 2013, 854062
- Bergkvist G, Sahlholm S, Nilner K, Lindh C (2004): Implant-supported fixed prostheses in the edentulous maxilla. A 2-year clinical and radiological follow-up of treatment with non-submerged ITI implants. *Clin Oral Implants Res* 15, 351–359

- Bernhardt R, van den Dolder J, Bierbaum S, Beutner R, Scharnweber D, Jansen J, Beckmann F, Worch H (2005): Osteoconductive modifications of Ti-implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR muCT and histology. *Biomaterials* 26, 3009–3019
- Bessa PC, Casal M, Reis RL (2008): Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2, 81–96
- Bierbaum S, Douglas T, Hanke T, Scharnweber D, Tippelt S, Monsees TK, Funk RHW, Worch H (2006): Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: characterization and influence on osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res A* 77, 551–562
- Böttner M, Kriegelstein K, Unsicker K (2000): The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75, 2227–2240
- Boudou T, Crouzier T, Ren K, Blin G, Picart C (2010): Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications. *Adv Mater Deerfield Beach Fla* 22, 441–467
- Boukari A, Francius G, Hemmerlé J (2006): AFM force spectroscopy of the fibrinogen adsorption process onto dental implants. *J Biomed Mater Res A* 78, 466–472
- Boyan BD, Batzer R, Kieswetter K, Liu Y, Cochran DL, Szmuckler-Moncler S, Dean DD, Schwartz Z (1998): Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alpha,25-(OH)2D3. *J Biomed Mater Res* 39, 77–85
- Brånemark PI (1983): Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent* 50, 399–410
- Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A (1969): Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3, 81–100
- Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A (1977): Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 16, 1–132
- Brauner H (1992): Titan als Dentalwerkstoff – eine Standortbestimmung. *Quintessenz Zahntech* 18, 221–239
- Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP (1998): Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13, 611–619

- Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, Brånemark PI (1986): Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthop Scand* 57, 285–289
- Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA (2004): Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone* 34, 402–411
- Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004): Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors Chur Switz* 22, 233–241
- Chen G, Deng C, Li Y-P (2012): TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8, 272–288
- Claes L, Hutzschenreuter P, Pohler O (1976): The dependence of the removal torque of a leg screw a screw surface and implantation time. *Arch Orthop Unfallchir* 85, 155–159
- Cochran DL, Buser D, ten Bruggenkate CM, Weingart D, Taylor TM, Bernard J-P, Peters F, Simpson JP (2002): The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clin Oral Implants Res* 13, 144–153
- Cordioli G, Majzoub Z, Piattelli A, Scarano A (2000): Removal torque and histomorphometric investigation of 4 different titanium surfaces: an experimental study in the rabbit tibia. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15, 668–674
- Cutler SM, García AJ (2003): Engineering cell adhesive surfaces that direct integrin  $\alpha 5\beta 1$  binding using a recombinant fragment of fibronectin. *Biomaterials* 24, 1759–1770
- Decher G (1997): Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 277, 1232–1237
- Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, Canalis E (2003): Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology* 144, 1972–1978
- Ducy P, Karsenty G (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57, 2207–2214
- Friberg B, Dahlin C, Widmark G, Ostman P-O, Billström C (2005): One-year results of a prospective multicenter study on Brånemark System implants with a TiUnite surface. *Clin Implant Dent Relat Res* 7 Suppl 1, S70-75
- Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R (2007): Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 77, 626–631

- Giannoudis PV, Einhorn TA (2009): Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury* 40 Suppl 3, 1–3
- Grohmann S, Rothe H, Frant M, Liefelth K (2011): Colloidal force spectroscopy and cell biological investigations on biomimetic polyelectrolyte multilayer coatings composed of chondroitin sulfate and heparin. *Biomacromolecules* 12, 1987–1997
- Gruber R, Weich HA, Dullin C, Schliephake H (2009): Ectopic bone formation after implantation of a slow release system of polylactic acid and rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res* 20, 24–30
- Guillot R, Gilde F, Becquart P, Sailhan F, Lapeyrere A, Logeart-Avramoglou D, Picart C (2013): The stability of BMP loaded polyelectrolyte multilayer coatings on titanium. *Biomaterials* 34, 5737–5746
- Hall J, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UME (2007): Bone formation at rhBMP-2-coated titanium implants in the rat ectopic model. *J Clin Periodontol* 34, 444–451
- Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M (2015): Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 94, 3–12
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Wrana JL, Falb D (1997): The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89, 1165–1173
- Healy KE, Reznia A, Stile RA (1999): Designing biomaterials to direct biological responses. *Ann N Y Acad Sci* 875, 24–35
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471
- Hogan BL (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10, 1580–1594
- Hösch A, Strietzel R (1994): Korrosion von Titan in thiocyanat-, chlorid- und flouridhaltigen künstlichen Speicheln. *Dtsch Zahnärztliche Z* 49, 767–769
- Hosoki M, Nishigawa K, Tajima T, Ueda M, Matsuka Y (2018): Cross-sectional observational study exploring clinical risk of titanium allergy caused by dental implants. *J Prosthodont Res* 62, 426–431
- Iezzi G, Degidi M, Scarano A, Perrotti V, Piattelli A (2005): Bone response to submerged, unloaded implants inserted in poor bone sites: a histological and histomorphometrical study of 8 titanium implants retrieved from man. *J Oral Implantol* 31, 225–233

- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K (1997): Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389, 622–626
- Ivanoff CJ, Hallgren C, Widmark G, Sennerby L, Wennerberg A (2001): Histologic evaluation of the bone integration of TiO(2) blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clin Oral Implants Res* 12, 128–134
- Jiang J, Fan C-Y, Zeng B-F (2011): Experimental construction of BMP2 and VEGF gene modified tissue engineering bone in vitro. *Int J Mol Sci* 12, 1744–1755
- Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA (2009): Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4, 185–206
- Kanczler JM, Oreffo ROC (2008): Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15, 100–114
- Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boyan BD (1996): The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol* 7, 329–345
- Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Caputo A, Davies JE, Nishimura RD (2001): Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 12, 350–357
- Koeck B, Wagner W: Einleitung. In: Koeck B, Wagner W (Hrsg.): *Implantologie*, 2. Auflage. Elsevier, München 2005, 1–7
- Kübler NR (1997): Osteoinduction and -reparation. *Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie MKG* 1, 2–25
- Kuchling H: *Taschenbuch der Physik*. 20. Auflage; Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München 2011
- Ledermann P (1979): Bar-prosthetic management of the edentulous mandible by means of plasma-coated implantation with titanium screws. *Dtsch Zahnärztliche Z* 34, 907–911
- Lehmann KM, Hellwig E, Wenz HJ: *Zahnärztliche Propädeutik: Einführung in die Zahnheilkunde*. 12. Auflage; Dt. Zahnärzte-Verlag, Köln 2012
- Leknes KN, Yang J, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Wikesjö UME (2008): Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: radiographic observations. *Clin Oral Implants Res* 19, 1027–1033
- Lind M (1996): Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 67, 407–417

- Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T (1996): A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res* 7, 329–336
- Lo RS, Massagué J (1999): Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nat Cell Biol* 1, 472–478
- Madrid C, Abarca M, Bouferrache K (2010): Osteoradionecrosis: an update. *Oral Oncol* 46, 471–474
- Massagué J (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597–641
- Massagué J (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753–791
- Matsuura T, Hosokawa R, Okamoto K, Kimoto T, Akagawa Y (2000): Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium. *Biomaterials* 21, 1121–1127
- McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP (1998): Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 12, 1438–1452
- Michael J, Beutner R, Hempel U, Scharnweber D, Worch H, Schwenzer B (2007): Surface modification of titanium-based alloys with bioactive molecules using electrochemically fixed nucleic acids. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80, 146–155
- Migliorati CA (2003): Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 21, 4253–4254
- Mundy GR, Chen D, Zhao M, Dallas S, Xu C, Harris S (2001): Growth regulatory factors and bone. *Rev Endocr Metab Disord* 2, 105–115
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 13, 9–22
- Nguyen H, Morgan DAF, Forwood MR (2007): Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? *Cell Tissue Bank* 8, 81–91
- Palmquist A, Omar OM, Esposito M, Lausmaa J, Thomsen P (2010): Titanium oral implants: surface characteristics, interface biology and clinical outcome. *J R Soc Interface* 7 Suppl 5, S515-527
- Park JY, Davies JE (2000): Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 11, 530–539

- Päßler K: Titan in der Zahnmedizin. In: Wirz J, Bischoff H (Hrsg.): Titan in der Zahnmedizin: ein Basiswerk über den biologischen Werkstoff Titan, seine Verarbeitung und seinen klinischen Einsatz. Quintessenz-Verlag-GmbH, Berlin 1997, 42–62
- Petrie TA, Capadona JR, Reyes CD, García AJ (2006): Integrin specificity and enhanced cellular activities associated with surfaces presenting a recombinant fibronectin fragment compared to RGD supports. *Biomaterials* 27, 5459–5470
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1984): Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 30–33
- Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, Montagnani S, Salzano S, Di Meglio F, Sbordone L, Vitale M, Rossi G (2003): Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *J Dent Res* 82, 692–696
- Rammelt S, Schulze E, Bernhardt R, Hanisch U, Scharnweber D, Worch H, Zwipp H, Biewener A (2004): Coating of titanium implants with type-I collagen. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 22, 1025–1034
- Ren K, Crouzier T, Roy C, Picart C (2008): Polyelectrolyte multilayer films of controlled stiffness modulate myoblast cells differentiation. *Adv Funct Mater* 18, 1378–1389
- Richert L, Lavallo P, Vautier D, Senger B, Stoltz J-F, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C (2002): Cell interactions with polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules* 3, 1170–1178
- Richert L, Boulmedais F, Lavallo P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, Schaaf P, Voegel J-C, Picart C (2004): Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* 5, 284–294
- Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K (1995): Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7632–7636
- Schliephake H (2002): Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31, 469–484
- Schliephake H (2010): Application of bone growth factors—the potential of different carrier systems. *Oral Maxillofac Surg* 14, 17–22
- Schliephake H (2015): Clinical efficacy of growth factors to enhance tissue repair in oral and maxillofacial reconstruction: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res* 17, 247–273
- Schliephake H, Scharnweber D (2008): Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. *J Mater Chem* 18, 2404–2414



- Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Rössler S, Sewing A, Meyer J, Hoogestraat D (2002): Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 13, 312–319
- Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaum S, Roessler S, Sewing A (2005a): Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation. *Clin Oral Implants Res* 16, 563–569
- Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S (2005b): Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 73, 88–96
- Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaum S, Sewing A (2009): Effect of modifications of dual acid-etched implant surfaces on peri-implant bone formation. Part I: organic coatings. *Clin Oral Implants Res* 20, 31–37
- Schliephake H, Bötel C, Förster A, Schwenzer B, Reichert J, Scharnweber D (2012): Effect of oligonucleotide mediated immobilization of bone morphogenic proteins on titanium surfaces. *Biomaterials* 33, 1315–1322
- Schliephake H, Rublack J, Aeckerle N, Förster A, Schwenzer B, Reichert J, Scharnweber D (2015): In vivo effect of immobilisation of bone morphogenic protein 2 on titanium implants through nano-anchored oligonucleotides. *Eur Cell Mater* 30, 28–40
- Schwartz-Arad D, Kidron N, Dolev E (2005): A long-term study of implants supporting overdentures as a model for implant success. *J Periodontol* 76, 1431–1435
- Stadlinger B, Pilling E, Huhle M, Mai R, Bierbaum S, Scharnweber D, Kuhlisch E, Loukota R, Eckelt U (2008): Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37, 54–59
- Steffens GCM, Yao C, Prével P, Markowicz M, Schenck P, Noah EM, Pallua N (2004): Modulation of angiogenic potential of collagen matrices by covalent incorporation of heparin and loading with vascular endothelial growth factor. *Tissue Eng* 10, 1502–1509
- Strietzel R, Hösch A, Kalbfleisch H, Buch D (1998): In vitro corrosion of titanium. *Biomaterials* 19, 1495–1499
- Sverzut AT, Crippa GE, Morra M, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL (2012): Effects of type I collagen coating on titanium osseointegration: histomorphometric, cellular and molecular analyses. *Biomed Mater Bristol Engl* 7, 035007
- Tardif G, Hum D, Pelletier J-P, Boileau C, Ranger P, Martel-Pelletier J (2004): Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin

- and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 50, 2521–2530
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K (1994): Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269, 16985–16988
- Urist MR (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893–899
- Urist MR, Silverman BF, Büring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967): The bone induction principle. *Clin Orthop* 53, 243–283
- Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, Chien C (1973): Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 3511–3515
- Urist MR, Sato K, Brownell AG, Malinin TI, Lietze A, Huo YK, Prolo DJ, Oklund S, Finerman GA, DeLange RJ (1983): Human bone morphogenetic protein (hBMP). *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* 173, 194–199
- Watzek G, Fühäuser R, Mailath-Pokorny G: Zahnärztliche Implantate. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.): *Zahnärztliche Chirurgie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009, 227–274
- Weingart D, Steinemann S, Schilli W, Strub JR, Hellerich U, Assenmacher J, Simpson J (1994): Titanium deposition in regional lymph nodes after insertion of titanium screw implants in maxillofacial region. *Int J Oral Maxillofac Surg* 23, 450–452
- Wennerberg A, Albrektsson T (2009): Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4, 172–184
- Whitman M (1998): Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev* 12, 2445–2462
- Wikesjö UME, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Shanaman RH, Rohrer MD, Wozney JM, Hall J (2008a): Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol* 35, 1001–1010
- Wikesjö UME, Huang Y-H, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Rohrer MD, Prasad HS, Wozney JM, Hall J (2008b): Bone formation at recombinant human bone morphogenetic protein-2-coated titanium implants in the posterior maxilla (Type IV bone) in non-human primates. *J Clin Periodontol* 35, 992–1000
- Zamuner A, Brun P, Scorzeto M, Sica G, Castagliuolo I, Dettin M (2017): Smart biomaterials: Surfaces functionalized with proteolytically stable osteoblast-adhesive peptides. *Bioact Mater* 2, 121–130

Zimmerman LB, De Jesús-Escobar JM, Harland RM (1996): The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86, 599–606

Zwicker U: Titan und Titanlegierungen. Springer, Berlin - Heidelberg - New York 1974

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake für die Überlassung des Promotionsthemas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. med. Dr. med. dent. Philipp Kauffmann für die wissenschaftliche Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.

Außerdem möchte ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung, vor allem Frau Dr. rer. nat. Christina Behrens und Herrn Jens Bunzendahl für die mühevollen Einarbeitung und Unterstützung danken.