

Wie wachsen Zellen auf Implantaten?

Harald Birkholz, Andreas Körtge, Bing Liu, Claudia Matschegewski, Thomas Weihe, Ulrich Beck, Patrick Elter, Konrad Engel, Jan Gimsa, Friedrich Liese, Barbara Nebe

Implantate sind im modernen Gesundheitswesen unerlässlich. Eine Erforschung des komplexen Zellverhaltens auf unterschiedlichen Materialien und Oberflächen ist notwendig, um Implantate so entwickeln zu können, dass eine hohe Akzeptanz sowie schnelle und komplikationsfreie Einheilung im Körper möglich ist. Mehrere Projekte von *welisa* haben das Studium dieses Zellverhaltens zum Inhalt. Eine Übersicht zu den einzelnen Themenbereichen ist Abbildung 1 zu entnehmen.

Wird ein Implantat mit einer Körperflüssigkeit wie Blut benetzt, wird an seiner Oberfläche fast augenblicklich die sogenannte elektrolitische Doppelschicht gebildet, welche unter anderem aus im

Blut gelösten Ionen besteht. Kurz darauf gelangen erste Proteine, die ebenfalls in der Körperflüssigkeit enthalten sind, auf die Oberfläche. Die entstehende Proteinschicht gilt als Schlüsselfaktor zur Beeinflussung der nachfolgenden Besiedlung der Oberfläche mit Zellen. Die Analyse dieser Besiedlung auf Oberflächen, die hinsichtlich topographischer sowie chemischer Eigenschaften einerseits unregelmäßig und andererseits nach verschiedenen Regeln gemustert sein können, ermöglicht das Auffinden von Gesetzmäßigkeiten der Zellentwicklung. Die Zellen und vor allem das Zellskelett aus Aktinfilamenten werden in ihren unterschiedlichen Entwicklungsstadien unter anderem mittels konfokaler Mikroskopie erfasst. In dem

dichten Netzwerk von einzelnen Fasern ist die Länge und Ausrichtung für den menschlichen Betrachter erkennbar. Die Automatisierung dieser visuellen Vermessung ermöglicht eine gemeinsame Betrachtung der Parameter mit den Charakteristiken der Biomaterial-Oberflächen. Da die beobachteten Daten stets von zufälligen Fehlern überlagert sind, könnten diese dem Experimentator Änderungen in der Filamentstruktur vortäuschen, die aber in Wirklichkeit nicht vorliegen. Eine wesentliche Hilfe liefern statistisch gesicherte Verfahren, die z. B. Aussagen über die Abhängigkeit zwischen der Ausrichtung und der Länge der Filamente machen und so die Auswertung durch objektive Kriterien unterstützen und absichern.

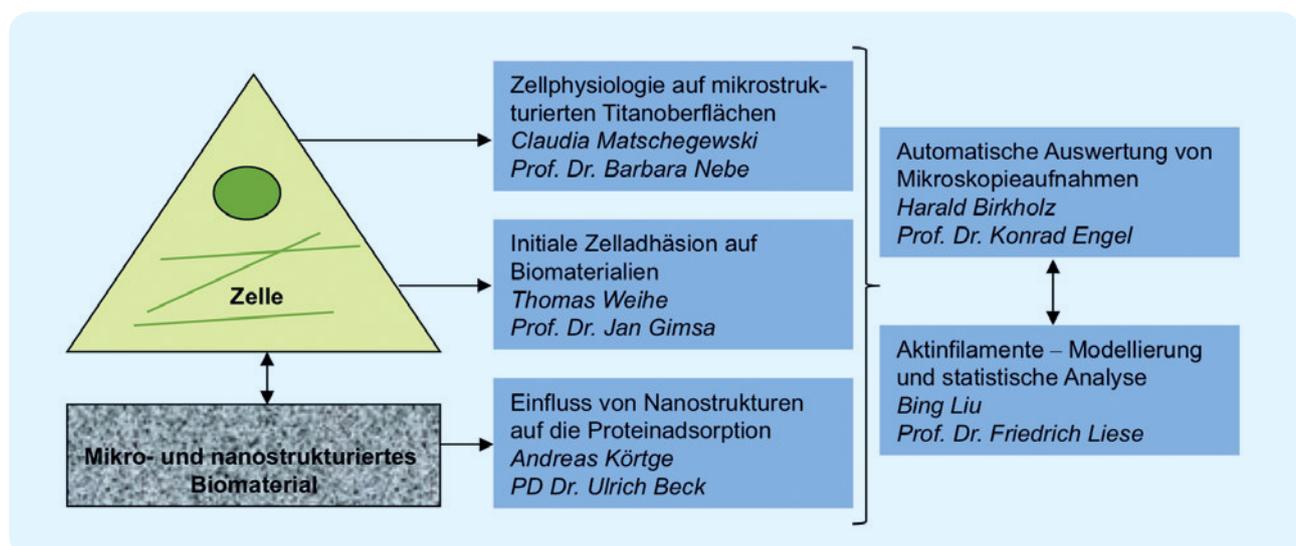


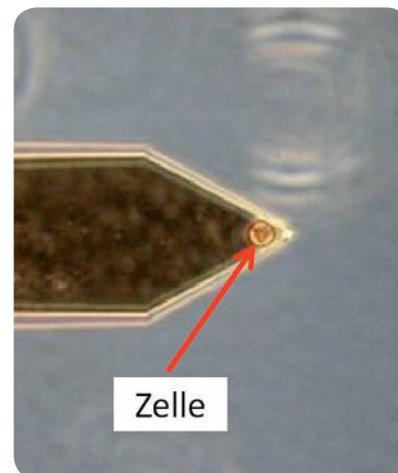
Abbildung 1: Themenbereiche der Autoren aus dem Graduiertenkolleg *welisa*

Kraftspektroskopie – Die Vermessung der Nanowelt

Obwohl die Gewebeneubildung auf einem Implantat nach dessen Einbringen in den Körper durch die sich anlagernden Körperzellen initiiert wird, müssen bei einer umfassenden Betrachtung der Implantat-Gewebe-Interaktion auch schnellere Prozesse mit einbezogen werden, die sich auf molekularer und teilweise sogar auf atomarer Ebene abspielen. Die elektrische Doppelschicht aus positiv und negativ geladenen Ionen, die sich während der Operation sofort nach Blutkontakt bildet, ist dünner als ein Hunderttausendstel des Durchmessers eines menschlichen Haares. Die Beschreibung der komplexen Wechselwirkung zwischen dieser Ionenschicht und der sich ausbildenden Proteinschicht einerseits und der Materialoberfläche andererseits ist unverzichtbar für das Verständnis der schrittweisen Prozesse der Integration eines Implantats in den Körper (Besiedlung der Oberfläche mit Zellen, Zellwachstum, Zellproliferation, Gewebewachstum).

Die zentrale Methode zur Charakterisierung der Proteinschicht und der anschließenden Zelladhäsionsprozesse sind rasterkraftmikroskopische Untersuchungen auf der Biomaterialoberfläche, die unter ähnlichen Bedingungen, wie sie auch im Körper vorliegen, durchgeführt werden. Mit der Rasterkraftmikroskopie ist es möglich, ein einzelnes Protein aufzusammeln und Informationen über dessen Eigenschaften (ortsabhängige Anlagerungswahrscheinlichkeit auf der Materialoberfläche, Faltungszustand etc.) in Abhängigkeit von den chemischen und topographischen Eigenschaften der Oberfläche zu gewinnen. Begleitet werden die Experimente durch

Abbildung 2:
Anwendungsbeispiel für die Kraftspektroskopie – Eine lebende Knochenzelle an der Spitze eines Rasterkraftmikroskop-Federbalkens (Breite 100 μm): Die Zelle wird auf eine Probe gedrückt und wieder abgezogen, um über die Auslenkung des Federbalkens die initiale Adhäsionskraft auf der Oberfläche zu messen.



Computersimulationen. Wir wollen Modelle entwickeln, die Vorhersagen über die Implantat-Protein-Wechselwirkung erlauben und so Möglichkeiten für eine weitere Optimierung der Implantatoberflächen schaffen.

Grenzflächennahe Vorgänge während der Implantat-Integration

Ähnlich wie bei der Charakterisierung der Proteineigenschaften, können die Wechselwirkungen einer einzelnen Zelle mit der Implantatoberfläche durch Rasterkraftmikroskopie bestimmt werden. Es zeigte sich eine große Komplexität der Zell-Oberflächenverbindungen: Einerseits heftet sich die Zelle durch spezifische Bindungsstellen (nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip) an die Oberfläche der Proteinschicht, andererseits ist eine Verbindung zur Oberfläche durch entgegengesetzte elektrische Ladungen realisiert. Jede Stufe der sequentiellen Abläufe auf atomarer, molekularer und zellulärer Ebene wurde innerhalb des Graduiertenkollegs in Modellversuchen nachgestellt. So konnte z. B. die gegenseitige Anziehung zweier negativ geladener Oberflächen mit dem Rasterkraftmikroskop gemessen werden (Ab-

bildung 2). Hierbei werden zwei negativ geladene Flächen (Zelle und Implantat) durch ein positiv geladenes Molekül quasi zusammengeklebt. Interessant sind außerdem Untersuchungen, die zeigen, wie das Wechselspiel zwischen Oberflächennanostruktur und aufgelaugener Proteinschicht die Stabilität der resultierenden Zelladhäsion beeinflusst.

„Mimikry bei Zellen“ – der Einfluss von Materialstrukturen

Die Interaktion zwischen Implantat und Zellen ist sehr komplex und es kommt zu einer Vielzahl von zellulären Prozessen, welche durch die spezifischen Implantateigenschaften beeinflusst werden. Dabei spielt die Oberflächentopographie des Implantates eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass Zellen dazu fähig sind, Mikro- und sogar Nanostrukturen zu erkennen und darauf mit Änderungen in ihrem Verhalten zu reagieren.

Um diese Vorgänge besser zu verstehen und Zusammenhänge zwischen dem spezifischen Zellverhalten und der Mikrostruktur eines Biomaterials aufzudecken, wird die Zellphysiologie von humanen Knochenzellen in Abhängig-

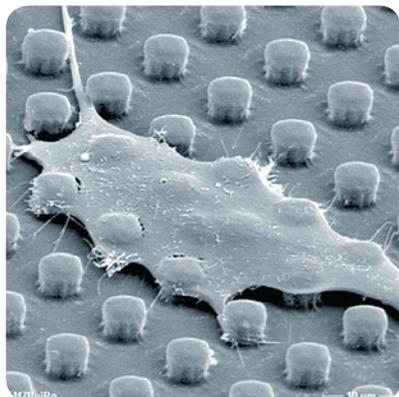
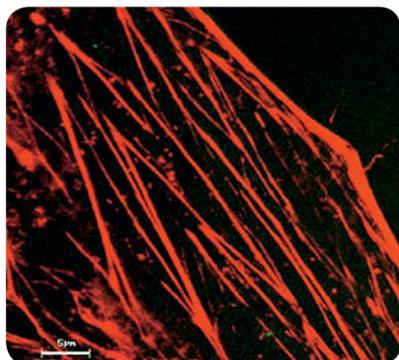


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Knochenzelle 24 h nach Kontakt mit einer mikrostrukturierten Titanoberfläche (Maßstabsbalken: 10 μm). Matschegewski et al. *Biomaterials* 31 (2010) 5729-40

keit definiert mikrostrukturierter Titanoberflächen untersucht (Abbildung 3). Durch die erzielten Ergebnisse kann ein starker Zusammenhang zwischen den topographischen Oberflächeneigenschaften, wie z. B. regelmäßige Pfosten- oder Grabenstrukturen, und diversen Zellfunktionen nachgewiesen werden. Die Zellen sind fähig, sich sowohl in der Zellform als auch in der Organisation ihrer intrazellulären Strukturen (Aktinzytoskelett) an die spezifische Topographie der Titanoberflächen anzupassen („Mimikry“; Abbildung 4). Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass auch andere zelluläre Eigenschaften, wie z. B. die Zelladhäsion, die Zellausbreitung (Spreading),



die Expression von Integrinrezeptoren und die Synthese von knochenspezifischen Matrixproteinen, positiv mit spezifischen physiko-chemischen Materialeigenschaften (u. a. Benetzbarkeit und Oberflächenenergie) assoziiert sind.

Durch die Anwendung der neu innerhalb von *welisa* entwickelten Software FilaQuant ist es möglich, die beobachteten topographisch-induzierten Veränderungen der Aktinfilament-Formation in den Zellen, basierend auf der Auswertung konfokalmikroskopischer Aufnahmen, automatisch zu quantifizieren (Abbildung 5). Dies ermöglicht die Erhöhung des Pools an quantifizierbaren zellbiologischen Daten für zukünftige computerorientierte Modellierungen von Zell-Material-Interaktionen. Die systematische Modifikation von Strukturparametern von Biomaterialien kann einen entscheidenden Beitrag für Simulationen von Zell-Material-Interaktionen leisten, um zukünftig das Verhalten von Zellen gezielt zu beeinflussen oder gar vorhersagen zu können.

Gratwanderung im Helligkeitsrelief

Das Aktinzytoskelett besteht in der frühen Besiedlung nach 30 bis 180 Minuten aus wohldefinierten Fasern, die bei der Oberflächenbesiedlung weitgehend in

einer Ebene liegen. Mit konfokaler Mikroskopie kann diese intrazelluläre Struktur in dieser Ebene abgebildet werden. Das aufgenommene digitale Bild ist als ein Relief vorstellbar, bei dem große Helligkeit als große Höhe interpretiert wird. Die Kammlinien oder Grate in diesem Relief sind dann die Mittellinien des zu vermessenden Filaments. Die durch uns entwickelte Software FilaQuant bietet die Algorithmen und die Schnittstelle für diese Auswertung. Die Idee ist eine schrittweise Konkretisierung des Merkmals und dessen Trennung von zufälligen Störungen.

Die Inhalte eines digitalen Bildes sind im Allgemeinen ohne zusätzliche Annahmen weitgehend unzugänglich. Eine gute Modellannahme erschließt den Inhalt nicht nur theoretisch, sondern ist auch praktisch mit Daten umsetzbar. Der interessante Teil der Bilder kann mit einer Funktion beschränkter Hessematrix auf einem quadratischen Gebiet modelliert werden. Die totale Variation zweiter Ordnung definiert einen Skalenraum, der mit einer Norm eine Ordnung der Bilder herstellt. Mit der Wahl eines Niveaus in dieser Ordnung kann praktisch wie theoretisch zu jedem beliebigen digitalen Bild durch nichtlineare Optimierung ein sehr ähnliches Bild mit weniger Rauschen und den gleichen Kammlinien ermittelt werden. Damit ist das Problem vom Modell des digitalen

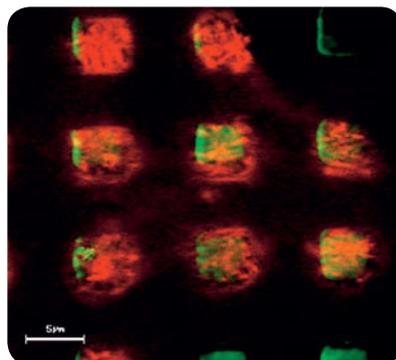


Abbildung 4: Konfokalmikroskopische Aufnahme des Aktinzytoskeletts in Knochenzellen auf glatter (links) und mikrostrukturierter Titanoberfläche (rechts) nach 24 h (rot: Aktin, grün: Reflexionsmodus der Oberfläche). Die Aktinformation passt sich an die Mikrostruktur der Oberfläche an (Maßstabsbalken: 5 μm). Matschegewski et al. *Biomaterials* 31 (2010) 5729-40

Die Autoren



vordere Reihe v. l.: Thomas Weihe, Bing Liu, Prof. Dr. Barbara Nebe, PD Dr. Ulrich Beck, Claudia Matschegewski;
hintere Reihe v. l.: Prof. Dr. Konrad Engel, Prof. Dr. Friedrich Liese, Andreas Körtge, Dr. Patrick Elter, Harald Birkholz

Stipendiaten von welisa

Harald Birkholz

Studium der Mathematik an der Universität Rostock von 2003 bis 2008

Promotionsthema:

Mathematical Methods for the Quantification of Actin-Filaments in Microscopic Images
Mail harald.birkholz@uni-rostock.de

Andreas Körtge

Studium der Physik an der Universität Rostock von 2005 bis 2011

Promotionsthema:

Einfluss nanostrukturierter Materialoberflächen auf das Verhalten adsorbierter Biomoleküle
Mail andreas.koertge@uni-rostock.de

Bing Liu

Studium der Mathematik an der Universität Rostock von 2003 bis 2008

Promotionsthema:

Statistische Modellierung und Analyse von Aktin-Filamenten
Mail bing.liu@uni-rostock.de

Claudia Matschegewski

Studium der Biowissenschaften an der Universität Rostock von 2000 bis 2006

Promotionsthema:

Analyse der Zellfunktion von humanen Osteoplasten in Abhängigkeit definiert mikrostrukturierter Titanoberflächen
Mail claudia.matschegewski@uni-rostock.de

Thomas Weihe

Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz von 1997 bis 2005

Promotionsthema:

Stimulation humaner Osteoplasten in vitro
Mail thomas.weihe@uni-rostock.de

Betreuer

Prof. Dr. rer. nat. Konrad Engel

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Mathematik
Fachgebiete Diskrete Mathematik und Optimierung
Mail konrad.engel@uni-rostock.de

PD Dr. sc. nat. Ulrich Beck Dr. Patrick Elter

Fakultät für Informatik und Elektrotechnik
Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik
Fachgebiete Metallische Biomaterial-Grenzflächen, Dünne Schichten
Mail ulrich.beck@uni-rostock.de
Mail patrick.elter@uni-rostock.de

Prof. Dr. rer. nat. Friedrich Liese

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Mathematik
Fachgebiete Wahrscheinlichkeitstheorie und Statistik
Mail friedrich.liese@uni-rostock.de

Prof. Dr. med. J. G. Barbara Nebe

Medizinische Fakultät
Biomedizinisches Forschungszentrum / Arbeitsbereich Zellbiologie
Fachgebiet Zellbiologie
Mail barbara.nebe@med.uni-rostock.de

Prof. Dr. rer. nat. Jan Gimsa

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biowissenschaften
Fachgebiete Zell-Biophysik, elektrische Zellcharakterisierung, Mikrosysteme
Mail jan.gimsa@uni-rostock.de

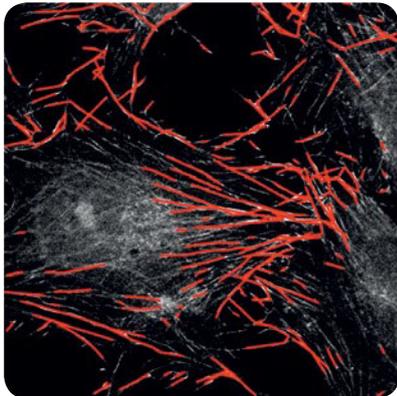


Abbildung 5: Konfokal-mikroskopisch abgebildete Knochenzellen mit Graufärbung des Aktinzytoskeletts und roter Markierung der automatisch detektierten Filamente

Bildes auf ein Modell einer Funktion beschränkter Hesse-Matrix zurückgeführt.

Eine weitere sinnvolle Annahme ist, dass Filamente in der Ebene höchstens eine einbeschriebene Kreisscheibe mit einem maximalen Radius enthalten. Der konkrete Wert hängt vom Abbildungsmaßstab ab. Die modellierte Realität ist die linienartige Erscheinung von Fasern. Durch die Zylinderhut-Transformation mit einer Kreisscheibe kann so das Filament von anderen Lichtquellen in der Antwort des Farbstoffes auf die Laseranregung getrennt werden. Dabei wird durch Subtraktion einer groben Darstellung des Bildes die Helligkeit der Details verhältnismäßig aufgewertet.

Zur Erfassung der so isolierten Kammlinien kann man davon ausgehen, dass sich das Filament aus einzelnen Faserstücken zusammensetzt, die in sich gering gekrümmt und miteinander überlagert oder verknüpft sind und dass jedes gerade Stück eines Filaments entlang des Verlaufes eine minimale mittlere Konkavität des Bildreliefs hat. Die Helligkeit ist direkt bei der Faser maximal und fällt mit dem Abstand ab. Weiterhin

hat jeder Verzweigungs- oder Endpunkt eines Filaments eine punktweise Konkavität des Bildreliefs über einer festen Schwelle. Somit können im ersten Schritt mögliche Endpunkte und im zweiten Schritt mögliche Polygonzüge gerader Teilstücke dazwischen ermittelt werden und einzeln auf Länge und Ausrichtung hin untersucht werden. Die Lösung ist im Allgemeinen fehlerbehaftet. Durch Auswertung künstlich erzeugter Bilder ist aber dieser Fehler kontrollierbar.

Aktinfilamente – Modellierung und statistische Analyse

Die Aufdeckung wesentlicher Effekte im Aktinskelett ist nur mit Hilfe eines geeigneten statistischen Modells und der auf dieser Basis entwickelten mathematisch-statistischen Verfahren möglich, weil bestimmte Effekte immer durch zufällige Fehler überlagert werden. Die auf der Grundlage eines Regressionsmodells mit dem Computer erzeugten Filamente weisen qualitativ eine hohe Ähnlichkeit mit den Bildern von Aktinfilamenten auf, die mit Hilfe von Methoden der Bildverarbeitung gewonnen wurden.

Abbildung 6 zeigt Computersimulationen für Aktinfilamente für ein Eincluster-

bzw. Zweiclustermmodell. Ein Vergleich dieser Bilder mit den Bildern der Aktinfilamente aus den gemessenen Daten belegt die Adäquatheit des Modells. Mit diesem kann man untersuchen, ob es eine bestimmte Richtung gibt, in der die mittlere Länge der Filamente besonders groß ist. Im Sinne der Hauptkomponentenanalyse geht es also um die Frage, ob bei Wahl eines geeigneten Koordinatensystems die eine Komponente des Filaments im Durchschnitt größer als die andere Komponente ist.

Ebenfalls kann mit Hilfe dieses Modells überprüft werden, ob es wesentliche Änderungen hinsichtlich der Längen und der Richtungen der Filamente gibt, wenn ursprüngliche Materialien, auf denen die Zellen kultiviert wurden, durch neue Materialien oder durch neu strukturierte Oberflächen bekannter Materialien ersetzt werden. Hier kann man dann mit Hilfe von Signifikanztests entscheiden, ob diese Änderungen der Oberflächen zu wesentlichen Änderungen der Länge und der Orientierung der Aktinfilamente führen. Sind diese Änderungen klein, so wird man diese nur mit sehr großen Datensätzen erkennen. Durch Computersimulationen kann man notwendige Stichprobenumfänge planen und so wesentlich zur systematischen Planung von Versuchsserien beitragen. ■

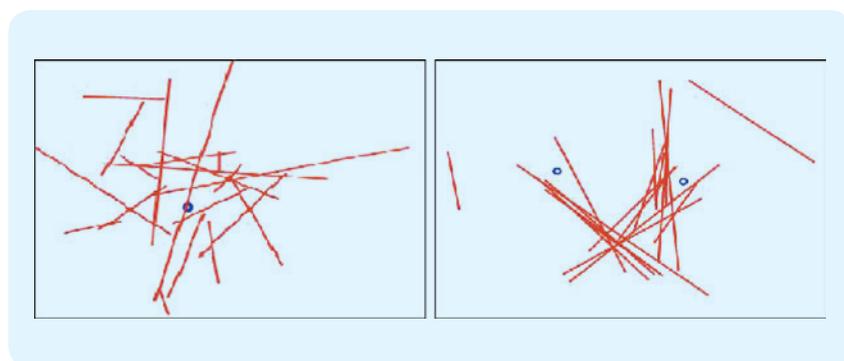


Abbildung 6: Aktinfilamente für ein Eincluster- bzw. Zweiclustermmodell