Universität Ulm

Zentrum für Chirurgie

Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik

Leiter: Prof. Dr. med. Lutz Claes

Effekte mechanischer Reize auf osteogen differenzierte Zellen in einer dreidimensionalen Kollagen Typ I Matrix

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Angela Thiel

geboren in Altötting

Ulm 2007

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus–Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Anita Ignatius
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf Brenner
Tag der Promotion:	27.04.2007

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Stammzellen . . . 1

1.1.1 Ontogenese adulter Stammzellen . . . 2

1.1.2 Lokalisation und Isolation mesenchymaler Progenitorzellen . . . 2

1.1.3 Osteogene Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen . . . 4

1.2 Mechanische Reize . . . 5

1.2.1 Einfluss auf die Expression osteoblastärer Marker . . . 5

1.2.2 Einfluss auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen . . . 8

1.2.3 Mechanotransduktion . . . 9

1.3 Tissue Engineering von Knochengewebe . . . 10

1.3.1 Zellen und Trägermaterialien . . . 10

1.3.2 Kollagenmatrices im Tissue Engineering von Knochengewebe . . . 12

1.4 Ziel der Arbeit . . . 13

2 Material und Methoden **15**

2.1 Chemikalien . . . 15

2.2 Lösungen . . . 17

2.3 Antikörper . . . 17

2.4 Oligonukleotide (Primer) . . . 18

2.5 Kits . . . 19

2.6 Geräte . . . 20

2.7 Medium zur Bakterienkultivierung . . . 21

2.8 Zellkultur . . . 21

2.8.1 Zellkulturmedien . . . 21

2.8.2 Isolation und Anzucht humaner mesenchymaler Progenitorzellen (MPC) . . . 22

2.8.3 Differenzierung von MPC . . . 23

2.8.4 Dreidimensionale Zellkultur im Kollagengel . . . 24

2.8.5 Mechanische Stimulation von Kollagengelen 25
2.9 Versuchsabläufe zur Differenzierung und mechanischen Stimulation . . . 25
2.9.1 Versuchsblock A: Differenzierung und Stimulation im Kollagengel 26
2.9.2 Versuchsblock B: Vordifferenzierung im Monolayer 28
2.9.3 Versuchsblock C: Differenzierung und Stimulation im Kollagengel bei erhöhter Zelldichte 28
2.10 Untersuchung der Genexpression auf mRNA–Ebene 30
2.10.1 Isolierung der mRNA aus Monolayerkulturen 31
2.10.2 Isolierung der mRNA aus Kollagengelen 31
2.10.3 cDNA Synthese 32
2.10.4 Standard–PCR 33
2.10.5 Gelelektrophorese 33
2.10.6 Amplifikation von PCR–Produkten in Bakterien als Standards für real–time–PCR 34
2.10.7 Real–time Polymerase–Ketten–Reaktion (real–time–RT–PCR) . . 37
2.11 Überprüfung der Genexpression auf Proteinebene 38
2.11.1 Pro–MMP-1– und pro–MMP-13–Expressionsanalyse mittels Immunoassay 38
2.11.2 Histochemische Untersuchungsmethoden 39
2.12 Rasterelektronenmikroskopie 40
2.13 Statistik 41
2.13.1 Statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen auf RNA–Ebene 41
2.13.2 Auswertung der Genexpressionsanalysen auf Protein–Ebene . . . 42

3 Ergebnisse **43**
3.1 Immunhistologische Charakterisierung der MPC 43
3.2 Rasterelektronenmikroskopie 43
3.3 Kontraktion von Kollagengelen 45
3.4 Differenzierung und mechanische Stimulation im Kollagengel (Versuchsblock A) 46
3.4.1 Einfluss der Kulturmedien 46
3.4.2 Einfluss der mechanischen Stimulation 51
3.4.3 Zusammenfassung 55

3.5 Vordifferenzierung im Monolayer, mechanische Stimulation im Kollagengel (Versuchsblock B) . . . 55
3.5.1 Einfluss der Kulturmedien . . . 56
3.5.2 Einfluss der mechanischen Stimulation . . . 61
3.5.3 Zusammenfassung . . . 64
3.6 Differenzierung und mechanische Stimulation im Kollagengel bei doppelter Zellkonzentration (Versuchsblock C) . . . 64
3.6.1 Vorversuch: Differenzierung von MPC in verschiedenen Zellkonzentrationen . . . 64
3.6.2 Einfluss der Kulturmedien . . . 67
3.6.3 Einfluss der mechanischen Stimulation . . . 72
3.6.4 Zusammenfassung . . . 77

4 Diskussion **79**
4.1 Material und Methoden . . . 79
4.1.1 Charakterisierung der MPC . . . 79
4.1.2 Eignung des Kollagengels als Zellträger für MPC . . . 79
4.1.3 Eignung des Kollagengels zur mechanischen Stimulation . . . 80
4.1.4 Genexpression von MPC in Kollagengelen . . . 80
4.2 Differenzierung von MPC . . . 82
4.2.1 Differenzierung im Monolayer . . . 82
4.2.2 Differenzierung im Kollagengel . . . 84
4.2.3 Schlussfolgerung . . . 87
4.3 Einfluss der mechanischen Stimulation . . . 88
4.3.1 Einfluss auf osteogene Marker . . . 88
4.3.2 Einfluss auf MMP´s und TIMP´s . . . 90
4.3.3 Schlussfolgerung . . . 92

5 Zusammenfasssung **95**

6 Danksagung **113**

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	activator protein-1
AP	Alkalische Phosphatase
bar	Druck
BSP	Bone sialoprotein
CD	cluster of differentiation
CFU-F	colony forming unit-fibroblasts
(c)DNA	(complementary) desoxyribonucleic acid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
DM	osteogenes Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Expansionsmedium
FCS	fötales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HCL	Salzsäure
HA	Hydroxy(l)apatit
HE	Hämatoxilin-Eosin
H_2O	Wasser
Hz	Hertz
Ihh	Indian hedgehog

LB	Luria Bertani
min	Minute(n)
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPC	mesenchymale Progenitorzelle(n)
(m)RNA	(messenger) ribonucleic acid
MW	Mittelwert
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
OC	Osteokalzin
OP	Osteopontin
Osx	Osterix
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PTH1R	type 1 parathyroid hormone receptor
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
Runx2	runt-related transcription factor 2
s	Sekunde(n)
SA	Standardabweichung
STRO-1	stromal cell surface marker
SZ	Stammzelle(n)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TCP	Trikalziumphosphat
TGF	transforming growth factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase
UV	ultraviolett
V	Volt

Abbildungsverzeichnis

1.1 Modelle zur Ontogenese von Stammzellen 3
1.2 Modell der osteoblastären Differenzierung 6
1.3 Mechanotransduktion in osteoblastären Zellen 11

2.1 Isolation von mesenchymalen Progenitorzellen 23
2.2 Verschiedene Formen von Kollagengelen 24
2.3 Zellstimulationsgerät 25
2.4 Versuchsablauf in Versuchsblock A 27
2.5 Versuchsablauf in Versuchsblock B 29
2.6 Versuchsablauf in Versuchsblock C 30
2.7 Bearbeitung der Kollagengele für die mRNA–Isolation 31

3.1 Immunhistologische Färbung MPC–typischer Oberflächenantigene 43
3.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MPC im Kollagengel . . 44
3.3 Einfluss der Gelgeometrie auf Zellmorphologie und –ausrichtung 45
3.4 Zeitlicher Versuchsablauf in Versuchsblock A 46
3.5 Einfluss der Kulturmedien auf die Genexpression osteogener Marker . . . 47
3.6 Einfluss der Kulturmedien auf die Genexpression von MMP´s und TIMP´s 49
3.7 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Genexpression osteogener Marker . . 52
3.8 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Genexpression von MMP´s und TIMP´s 53
3.9 Zeitlicher Versuchsablauf in Versuchsblock B 56
3.10 Einfluss der Kulturmedien auf die Genexpression osteogener Marker . . . 57
3.11 Einfluss der Kulturmedien auf die Genexpression von MMP´s und TIMP´s 59
3.12 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Genexpression osteogener Marker . . 61
3.13 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Genexpression von MMP´s und TIMP´s 62
3.14 von Kossa–Färbungen von Kollagengelen mit verschiedenen Zelldichten in verschiedenen Kulturmedien 66
3.15 Zeitlicher Versuchsablauf in Versuchsblock C 67

3.16 Einfluss der Kulturmedien auf die Genexpression osteogener Marker . . . 68
3.17 Einfluss der Kulturmedien auf die Genexpression von MMP´s und TIMP´s 70
3.18 von Kossa–Färbungen von Kollagengelen an Tag 14 und 21 72
3.19 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Genexpression osteogener Marker . . 73
3.20 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Genexpression von MMP´s und TIMP´s 75

Tabellenverzeichnis

2.1 Chemikalien 15
2.2 Lösungen 17
2.3 Antikörper zur MPC–Charakterisierung 17
2.4 Primer für die real–time–RT–PCR 18
2.5 Kits 19
2.6 Geräte 20
2.7 Medium zur Bakterienkultivierung 21
2.8 Expansionsmedium 21
2.9 Expansionsmedium während mechanischer Stimulation 21
2.10 Differenzierungsmedium 22
2.11 Differenzierungsmedium während mechanischer Stimulation 22
2.12 PCR–Programm der real–time–RT–PCR 37

3.1 Proteinexpression von MMP-1 an Tag 7 und Tag 14 51
3.2 Proteinexpression von MMP-13 an Tag 7 und Tag 14 51
3.3 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Proteinexpression von MMP-1 an Tag 14 54
3.4 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Proteinexpression von MMP-13 an Tag 14 55
3.5 Proteinexpression von MMP-1 an Tag 7 und Tag 14 60
3.6 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Proteinexpression von MMP-1 an Tag 7 63
3.7 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Proteinexpression von MMP-1 an Tag 14 64
3.8 Proteinexpression von MMP-1 an Tag 14 und Tag 21 71
3.9 Proteinexpression von MMP-13 an Tag 14 und Tag 21 71
3.10 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Proteinexpression von MMP-1 an Tag 14 75

3.11 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Proteinexpression von MMP-1 an Tag 21 76
3.12 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Proteinexpression von MMP-13 an Tag 14 76
3.13 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Proteinexpression von MMP-13 an Tag 21 77

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, welche die Kapazität zur Selbsterneuerung über lange Zeit besitzen und die Fähigkeit, ausdifferenzierte Zellphänotypen zu bilden [3, 96, 109]. Sie können also identische Kopien von sich mittels mitotischer Teilung über lange Zeitspannen herstellen oder auch Progenitorzellen hervorbringen, die dann begrenzte Proliferations– und Differenzierungskapazität besitzen [68, 108]. Ein Modell geht davon aus, dass diese Progenitorzellen aus asymmetrischen Teilungen (eine Tochterzelle ist wieder Stammzelle, die andere Tochterzelle ist eine Progenitorzelle) entstehen und dann die Progenitorzellen als Antwort auf äußere Signale weiter differenzieren. Beispiele für dieses Modell gibt es vor allem bei Einzellern und Wirbellosen [108]. Für Säugetier–Gewebe nimmt man eher an, dass bei den Teilungen Tochterzellen entstehen, welche zu einem bestimmten Anteil Stammzelle und Progenitorzelle sind, je nachdem, welche Umgebungsfaktoren auf sie einwirken. Vermutlich sind in manchen Geweben keine diskreten Stammzellen oder Progenitorzellen vorhanden, sondern verschiedene Übergangsstadien zwischen Stammzelle und Progenitorzelle [108].
Man unterscheidet zwischen embryonalen Stammzellen, embryonalen bzw. primordialen Keimzellen und adulten Stammzellen. Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und können daher alle somatischen adulten Gewebe ausbilden. Primordiale Keimzellen entstehen im Eizylinder–Stadium, wo sie sich absondern und zu den Genitalleisten wandern und damit einer Festlegung auf eine bestimmte Differenzierungsrichtung („lineage commitment“) entgehen. Aus ihnen erhält man in der *in vitro* Kultur sogenannte embryonale Keimzellen, die den embryonalen Stammzellen sehr ähnlich sind, aber bereits ein umfangreiches Imprinting spezifischer Gene aufweisen [68].

1.1.1 Ontogenese adulter Stammzellen

Die Herkunft adulter Stammzellen ist noch ungeklärt: Eine Theorie besagt, dass adulte Stammzellen nach der Entstehung der Keimblätter entstehen. Damit wären sie auf das Keimblatt ihrer Abstammung beschränkt (siehe Abb. 1.1). Eine weitere Theorie geht davon aus, dass sich adulte Stammzellen parallel zu den embryonalen Keimzellen entwickeln, und danach zu den spezifischen Geweben und Nischen wandern. In diesem Fall wären sie von ihrer Keimblatt–Abstammung unabhängig [68].
In adulten Geweben findet man verschiedene Stammzellpopulationen: Hämatopoietische Stammzellen, welche lymphoide und myeloide Zelltypen ausbilden, neuronale Stammzellen, welche Neurone, Oliogodendrozyten und Astrozyten bilden, und mesenchymale Stammzellen bzw. Progenitorzellen (MPC), welche unter anderem Chondrozyten, Adipozyten, Osteoblasten, Myoblasten und Fibroblasten ausbilden können [83]. Aber das Potential der Stammzellen ist nicht an ihre Herkunftsquelle gebunden, sie zeigen eine enorme Plastizität: So können beispielsweise neuronale Stammzellen *in vitro* in hämatopoietische Zellen differenzieren [67]. Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Knochenmarks–Stammzellen in neuronale Zellen differenzieren können [69].

1.1.2 Lokalisation und Isolation mesenchymaler Progenitorzellen

Einer der ersten experimentellen Beweise für die Existenz mesenchymaler Progenitorzellen (MPC) stammt von Friedenstein et al., welche als erste aus Knochenmark isolierte Zellen osteogen differenzierten [26]. Die MPC sind im Knochenmark und in einer Vielzahl weiterer Gewebe wie trabekulärem Knochen, Periost, Muskel, Dermis, Fettgewebe, Blut oder Synovialmembran lokalisiert (Übersichten in [24, 103]). Knochenmarksaspirate gelten als die am leichtesten zugängliche Quelle mit der höchsten Konzentration an Stammzellen [103]. Mit der Dichtegradienten–Zentrifugation werden die MPC aus Knochenmarksaspirat isoliert. Dabei ist eine aus 10.000 bis 100.000 Knochenmarkszellen eine MPC [21]. Die MPC adhärieren auf der Oberfläche von Zellkulturplastik und können dort vermehrt werden [33]. Es entwickeln sich nach wenigen Tagen Kolonien, die jeweils von einer einzelnen Vorläuferzelle abstammen und als colony forming unit–fibroblasts (CFU-F) bezeichnet werden [27]. Die Population von MPCs ist bis jetzt noch nicht genau charakterisiert, da ein bestimmter typischer „Stammzell–Marker“ noch nicht gefunden wurde. Daher verwendet man eine Kombination verschiedener Oberflächenmarker zur Charakterisierung von MPC, wie zum Beispiel STRO-1 (stromal cell surface marker) [31, 18], CD9, CD90, CD105 und CD166 [83]. STRO-1 gilt als der zuverlässigste Mar-

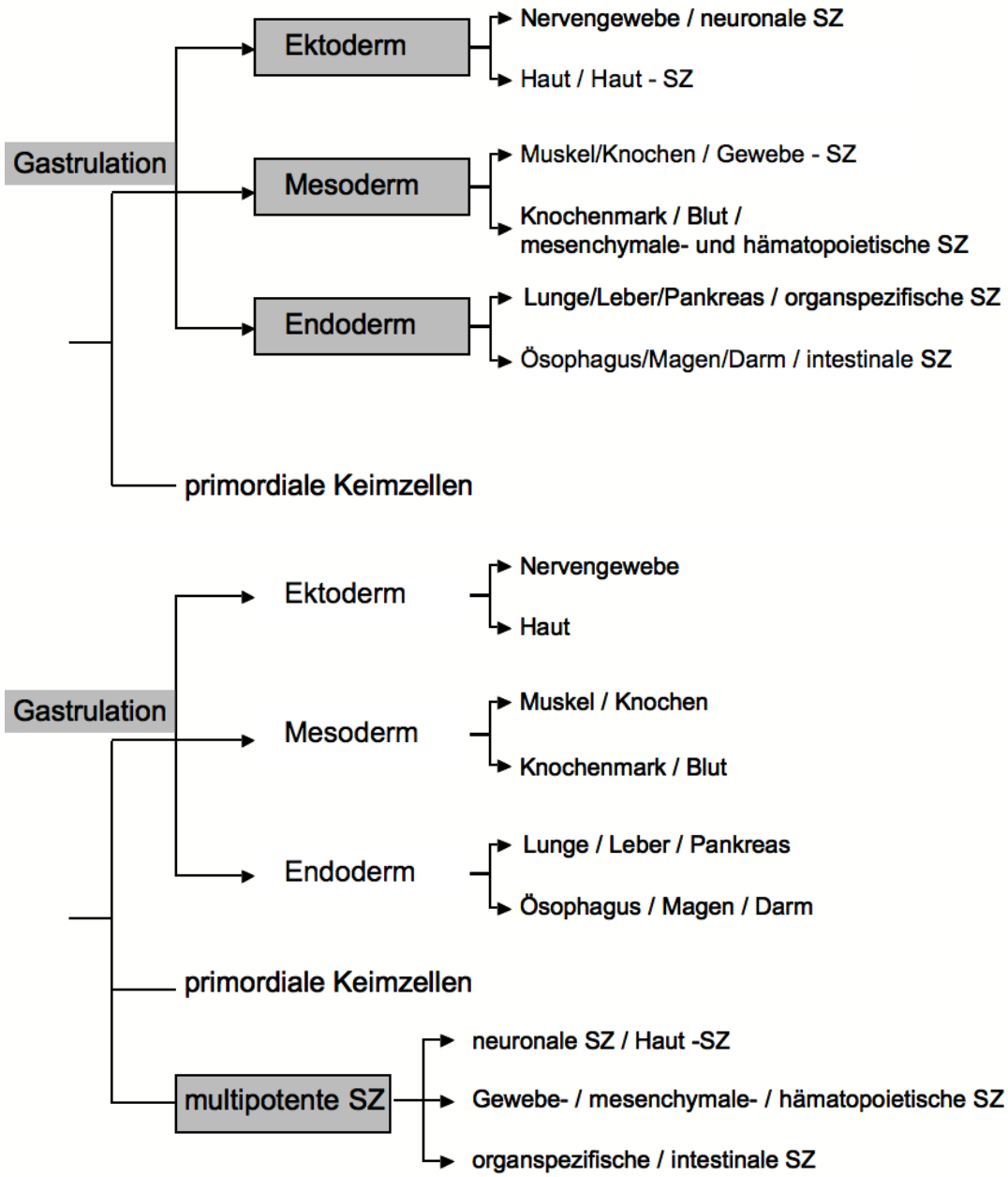


Abbildung 1.1: Modelle zur Ontogenese von Stammzellen (SZ). Im oberen Stammbaum entwickeln sich die Stammzellen nach der Ausbildung der Keimblätter und sind damit bezüglich ihrer Entwicklung auf ihr Keimblatt beschränkt. Der untere Stammbaum verdeutlicht die Möglichkeit, dass sich Stammzellen ähnlich wie Keimzellen entwickeln, dadurch keiner Differenzierungsbeschränkung während der Gastrulation unterliegen und zu den spezifischen Geweben und Organen wandern (nach [68]).

ker, da alle mit dem STRO-1–Marker selektierte MPC CFU-F´s ausbilden können und in verschiedene mesenchymale Phänotypen (Adiopozyten, Osteoblasten, Chondrozyten) ausdifferenzieren können [95, 22].

1.1.3 Osteogene Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen

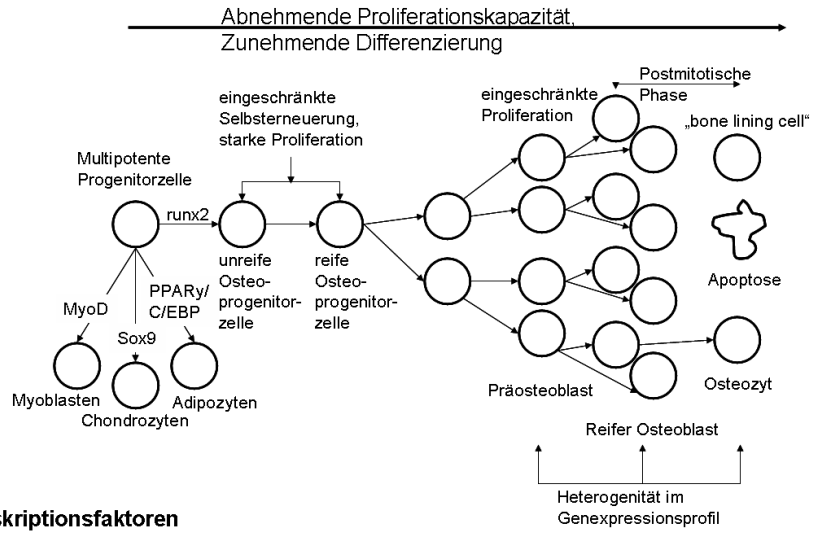
MPC können durch Zugabe entsprechender Differenzierungsfaktoren in unterschiedliche mesenchymale Zelltypen differenziert werden. Für die osteogene Differenzierung *in vitro* wird meist das synthetische Glucocorticoid Dexamethason verwendet, welches die Proliferation von MPC stimuliert und die osteogene Differenzierung fördert [103]. Meist wird noch Ascorbinsäure-Phosphat und β-Glycerophosphat zugesetzt. Diese Kombination von Differenzierungszusätzen induziert spezifisch die Expression osteogener Marker [85]. Manchmal wird für die osteogene Differenzierung 1,25-dihydroxyvitamin D3 verwendet [58].
Die verschiedenen Stadien der osteoblastären Differenzierung *in vivo* können nicht an der Zellmorphologie erkannt werden. *In vitro* zeigen die Zellen einen fibroblastären Phänotyp [50]. Das genetische Programm der osteogenen Differenzierung scheint nicht spezifisch zu sein, denn viele Proteine der osteogenen Differenzierung werden auch von anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, exprimiert.
Eine wichtige Rolle in der osteogenen Differenzierung spielt der Transkriptionsfaktor runt–related transcription factor 2 (Runx2, früher cbfa1), welcher die Expression verschiedener weiterer osteoblastärer Marker wie zum Beispiel Osteokalzin reguliert [5] (siehe auch Abb. 1.2). So führt eine Deletion des Runx2–Gens in Mäusen zu einem Skelett, das nur aus Knorpel besteht und nicht kalzifiziert. Runx2 ist zeitlich gesehen der am frühesten exprimierte Marker in der osteogenen Differenzierung. Es ist kein Mastergen im eigentlichen Sinn, denn es ist ein notwendiger, aber nicht ausreichender Faktor zur osteogenen Differenzierung. Es spielen noch weitere Faktoren wie zum Beispiel Indian Hedgehog (Ihh) eine wichtige Rolle. So wird z.B. in Osteoblasten des endochondralen Knochens von Ihh–knockout Mäusen kein Runx2 produziert, wohingegen im Wildtyp die Expression hoch ist.
Ein weiterer wichtiger Faktor in der Regulation der osteogenen Differenzierung ist Osterix (Osx), ein Transkriptionsfaktor mit Zinkfinger–Motiv, der spezifisch in Osteoblasten exprimiert wird. So finden sich in Osx–defizienten Mäusen keine Osteoblasten. Wahrscheinlich ist Osx dem Runx2 untergeordnet, da Runx2–defiziente Mäuse kein Osx exprimieren, aber in Osx–defizienten Mäusen Runx2 exprimiert wird [50].
Neben Runx2 und Osx sind zwei Transkriptionsfaktoren der AP1 (activator protein 1)

Familie, Δ-FosB und fra-1, wichtig in der Regulation der osteoblastären Differenzierung. Δ-FosB beispielsweise reguliert die Runx2–Promotor–Aktivität. Auch sekretierte Faktoren kontrollieren die osteogene Differenzierung: Neben Ihh sind auch fibroblast growth factors (FGF´s) an der Differenzierung beteiligt, unter anderem FGF-18, dessen Inaktivierung eine Verzögerung der Knochenneubildung bewirkt [50].
Ausgehend von *in vitro* Versuchen teilt man die osteogene Differenzierung in drei Abschnitte ein: (1) Proliferation, (2) Produktion und Reifung der Extrazellulärmatrix und (3) Mineralisierung. Häufig benutzte Marker zum Nachweis der osteogenen Differenzierung sind Kollagen 1, Alkalische Phosphatase (AP), Osteopontin (OP), Osteokalzin (OC), Bone sialoprotein (BSP) und PTH1R. Die Alkalische Phosphatase ist eine Esterase, die an der extrazellulären Oberfläche der Zellmembran verankert ist und Phosphorsäuremonoester spaltet. Sie wird nicht nur im Knochen von Osteoblasten, sondern auch in verschiedenen anderen Geweben exprimiert und findet sich im Knochen in einer spezifischen Isoform [91]. Im allgemeinen steigt die Expression von AP früh an und fällt im fortgeschrittenen Mineralisierungsstadium wieder ab. OP, ein Glykoprotein der Extrazellulärmatrix, ist an den Grenzflächen von Knochenzellen und Hydroxylapatit lokalisiert und kann auch an Integrine binden. Es zeigt einen Anstieg in der Proliferationsphase sowie in der späteren Phase vor BSP und OC. BSP, ein einzelsträngiges Polypeptid, wird nur in Knochen und mineralisiertem Bindegewebe exprimiert. Es wird stark von Osteoblasten bei der *de novo* Knochenbildung exprimiert und bindet ebenfalls an Hydroxylapatit [7]. OP wird sehr früh exprimiert und zeigt einen zweiten Expressionsanstieg in differenzierten Osteoblasten, während OC fast gleichzeitig mit der Mineralisierungsphase exprimiert wird. Osteokalzin, ein Polypeptid der Extrazellulärmatrix, wird von Osteoblasten, Odontoblasten und hypertrophen Chondrozyten exprimiert und kann direkt mit Hydroxylapatit interagieren. Allerdings werden alle diese Marker (außer OC) schon vor Beendigung der Proliferationsphase in osteoblastären Vorläuferzellen hochreguliert, die Differenzierung beginnt also schon in der Proliferationsphase, so dass die einzelnen Abschnitte fließend ineinander übergehen [4].

1.2 Mechanische Reize

1.2.1 Einfluss auf die Expression osteoblastärer Marker

Knochengewebe ist ein physiologisch dynamisches Gewebe, das auf seine Funktion als Lastträger optimiert ist und auf Kräfte mit einem Umbau reagiert. Bereits im 19. Jahr-



Transkriptionsfaktoren						
Runx2	+	+	+	+	+ +	?
Oberflächenmarker						
STRO-1	+	+	+/-	-	-	-
Enzyme						
Alkalische Phosphatase	-	-	-	+	++	+++	-
Kollagen und andere Proteine						
Kollagen Typ 1	?	-	+	++	++	++	-
Osteokalzin	-	-	-	-	-	- → +++	- → +++
Bone sialoprotein	-	- ↔ ++ ↔ -			- → +++	- → +++	- → +++
Osteopontin	+ ?	+/-	+/-	+/-	- → +	- → +++	- → +++

Abbildung 1.2: Modell der osteoblastären Differenzierung, basierend auf *in vivo* und *in vitro* Experimenten (nach [5]). Die Tabelle zeigt die Expression typischer osteogener Marker im Verlauf der Differenzierung. Viele Marker sind heterogen exprimiert (Pfeile). - keine detektierbare Expression, -/+ ... +++ Expressionstärke von detektierbar bis sehr hoch.

hundert wurde dieser Zusammenhang zwischen den im Knochen auftretenden Kräften und der Knochenarchitektur von Wolff beschrieben [114].
Auch *in vitro* reagieren Knochenzellen auf mechanische Stimuli wie z.B. Dehnungsreize, Flüssigkeitsströmungen, hydrostatischen Druck oder Vibration [2, 16, 43, 93, 94, 99, 111]. Auch wichtige osteogenene Marker sind mechanosensitiv: Die Runx2–Expression kann direkt über mechanische Reize induziert werden [25, 122]. Zyklische mechanische Dehnung von osteoblastären Zellen im Monolayer steigerte die Zellproliferation und die Collagen 1 Propeptid–Produktion, während die AP–Aktivität und OC–Produktion reduziert wurden [52]. Je nach mechanischem Stimulationsdesign, verwendeter Zellpopulation und Kulturbedingungen können die Reaktionen der Zellen auf mechanische Reize jedoch variieren.
Koike et al. fanden, dass kleinere Dehnungen (0.8%, 5%) die AP–Aktivität und die Runx2–mRNA–Expression erhöhten, jedoch höhere Dehnungsamplituden die AP–Aktivität verringerten [56]. Bei uniaxialer zyklischer Dehnung beeinflusste die Frequenz und Anzahl der applizierten Zyklen die Proliferation von osteoblastären Zellen [51]. Auch die Art des mechanischen Reizes kann die Zellantworten verändern: So hatten uniaxiale und äquiaxiale Dehnungen einen unterschiedlichen Einfluss auf die mRNA–Expression des smooth muscle actin–Gens bei MPC [80]. Auch Bandscheibenzellen reagieren unter hohem hydrostatischen Druck mit einer Veränderung der Genexpressionen von Matrixproteinen und matrixumbauenden Enzymen, während geringer hydrostatischer Druck kaum Genexpressionsänderungen verursachte [78]. Winter et al. verglichen kontinuierliche Dehnung mit Intervall–Dehnung und zeigten, dass osteoblastäre Zellen eine stärkere Reaktion auf den mechanischen Reiz zeigten, wenn sie in Intervallen gedehnt wurden [113].
Bisher existieren wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsstatus und der Mechanosensitivität untersucht haben. Klein-Nulend et al. verglichen Osteozyten und Osteoblasten in ihrer Reaktion auf verschiedene mechanische Reize und fanden heraus, dass nur Osteozyten, aber nicht Osteoblasten, mit einer Erhöhung von Prostaglandin E2 nach Flüssigkeitsscherung reagierten. Auch die Reaktion auf hydrostatischen Druck war bei Osteoblasten geringer als bei Osteozyten [54]. Im Gegensatz dazu zeigten in einer Studie von Naruse et al., in welcher MPC, Osteoblasten und Osteozyten in ihrer Reaktion auf Ultraschall–Stimulation verglichen wurden, Osteoblasten in einem frühen Entwicklungszustand die stärkste Reaktion. Dabei waren immediate–early Gene wie c-fos und COX-2, aber auch Differenzierungsmarker wie AP oder OC mechanisch reguliert. Bei MPC wurde bei verschiedenen Genen nur unter osteogener Differenzierung

eine Expressionsveränderung nach mechanischer Stimulation beobachtet [75]. Auch in der Studie von Thomas et al. benötigten MPC einen bestimmten Differenzierungsstatus, bevor sie auf den mechanischen Reiz mit einer Erhöhung der AP–Expression reagieren [102]. Auch die Proliferation osteoblastärer Zellen ist mechanisch beeinflussbar. So erhöhten oder erniedrigten humane fötale Osteoblasten ihre Proliferation nach mechanischer Stimulation, je nachdem ob und wie lange sie *in vitro* mit osteogenen Differenzierungsfaktoren vor der mechanischen Stimulation behandelt worden waren [111]. Einige neuere Studien zeigen, dass MPC nicht nur unter osteogenen Differenzierungszusätzen differenzieren, sondern auch bei geeigneten mechanischen Reizen, und dass Differenzierungszusätze und der mechanische Reiz synergistisch auf die osteogene Differenzierung wirken können [20, 36, 43].

1.2.2 Einfluss auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen

Die Degradation von Kollagenen aber auch anderer Proteine der Extrazellulärmatrix erfolgt über matrixabbauende Enzyme, wobei die Matrixmetalloproteinasen (MMP´s) eine wichtige Gruppe stellen. Sie sind im normalen Gewebeumbau aktiv, aber auch bei Krankheiten, bei welchen der Matrixumbau gestört ist (Gelenkarthrose, Tumorerkrankungen, usw.). MMP´s sind eine Familie proteolytischer Enzyme, welche zusammen mit den sogenannten „Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ (TIMP´s) den Abbau der Extrazellulärmatrix kontrollieren. Man weiß, dass das MMP/TIMP–Verhältnis zum Beispiel auch in der Osteogenese sehr genau reguliert ist und allgemein eine wichtige Rolle in Zellproliferation und –differenzierung spielt [60].
In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von MMP-1, -2, -3, -13 und TIMP-1 und TIMP-2 untersucht.
MMP-1, eine Kollagenase, degradiert Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X, und XI, Gelatin Typ I sowie verschiedene Proteine der Extrazellulärmatrix. Es hydrolysiert Kollagen Typ II jedoch 10–fach schneller als Kollagen Typ I [98, 112]. MMP-2, eine Gelatinase, kann Kollagen I, III, IV, V, VII, X, XI, Gelatin Typ I sowie mehrere extrazelluläre Matrixproteine degradieren, vorzugsweise aber Gelatin und Kollagen Typ X [17, 110]. MMP-3, ein Stromelysin, kann neben verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen die Kollagene Typ III, IV, V, VII, IX, X und XI degradieren [98]. MMP-13, eine Kollagenase, wird differenzierungsabhängig exprimiert [46, 47, 104] und degradiert Kollagen Typ I, II, III, VI, IX; X, und XIV und verschiedene Proteoglycane und extrazelluläre Matrixproteine, vorzugsweise aber fibrilläres Kollagen Typ II und pro–Kollagen Typ II [28, 55]. MMP13 degradiert sowohl Kollagen Typ II und Gelatin wesentlich schneller als die beiden an-

deren Kollagenasen (MMP-1 und MMP-13). Kollagen Typ I wird jedoch mit ähnlicher Effizienz degradiert wie über MMP-1 oder MMP-8 [55, 70]. Es existieren einige Studien zum Einfluss mechanischer Stimuli auf Matrixmetalloproteinasen in verschiedenen Zelltypen (Übersicht in [12]), aber sehr wenig Literatur zum Einfluss mechanischer Stimuli auf die MMP–Expression in MPC oder in osteoblastären Zellen. Murine osteoblastäre MC3T3–Zellen reagieren nach Stimulation mit sinusförmiger Dehnung mit einer Induktion von MMP-9, während andere MMP´s nicht auf den mechanischen Reiz reagierten [99]. In einer späteren Studie derselben Arbeitsgruppe mit MC3T3–Zellen in einer Kollagenmatrix unter Flüssigkeitsscherung reagierten sowohl Kollagenasen (MMP-1, -8, -13) als auch Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) mit einer Expressionserhöhung [100]. Ebenfalls in MC3T3–Zellen fanden Yang et al. nach uniaxialer Dehnung einer Erhöhung sowohl der MMP-13–mRNA und MMP-13–Aktivität. Sie konnten in Inhibitor–Experimenten zeigen, dass diese mechanisch induzierte MMP-13–Expression über den MEK–ERK–Signalweg vermittelt wird [116]. Jansen et al. fanden in immortalisierten humanen fötalen präosteoblastären Zellen nach zyklischer Dehnung eine Induktion von MMP-3 und MMP-1 sowohl auf mRNA– als auch auf Proteinebene. Hier zeigte sich auch eine Abhängigkeit der Reaktion auf den mechanischen Reiz vom Differenzierungsstadium der Osteoblasten: MMP-1 wurde während der *in vitro* Differenzierung zu allen Zeitpunkten gleich stark induziert (vierfach), jedoch MMP-3 zu Beginn der Differenzierung an Tag 7 am stärksten (25–fach), nur noch fünffach an Tag 14 und an Tag 21 nicht mehr mechanisch reguliert. Mit Inhibitoren gegen ERK konnte gezeigt werden, dass diese Mechanoregulation über den ERK–Signalweg vermittelt wird. Während damit die mechanische Induktion von MMP-1 komplett unterdrückt werden konnte, konnte die Reaktion von MMP-3 auf den mechanischen Reiz nicht vollständig unterdrückt werden, was auf die Beteiligung weiterer Signalwege in der Mechanoregulation von MMP´s hinweist [44]. In Chondrozyten beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die MMP-1– und MMP-13–Induktion nach Flüssigkeitsscherung über den transkriptionellen Ko–Regulator CITED2 und durch den TGFß Signalweg vermittelt wird [118].

1.2.3 Mechanotransduktion

Die genauen Mechanismen, mit welchen Zellen mechanische Reize wahrnehmen, sind noch nicht bekannt. Möglicherweise sind viele verschiedene Mechanosensoren in die Übertragung mechanischer Signale involviert. An der mechanochemischen Transduktion sind sowohl die Extrazellulärmatrix, Zell–Matrix– und Zell–Zell–Adhäsionen, Membrankomponenten, spezialisierte Oberflächenfortsätze, zytoskelettale Filamente und Kern-

strukturen beteiligt [41]. Mehrere mechanosensitive Elemente wurden bereits entdeckt: mechanosensitive Ionenkanäle, membrangebundene Proteine wie Integrine und integrin–assoziierte Proteine, Connexine und G–Proteine [89, 107]. Die Veränderung der Membranspannungen verursachen den Umbau von Zelladhäsionskomplexen (lokale Adhäsionskontakte und „adherens junctions“) und es werden verschiedene Matrix–assoziierte Proteine (wie z.B. Paxillin, Catenin, Vinculin) aktiviert, die die Information von der Zellmembran zum Zytoskelett, manchmal auch zum Nukleus, weiterleiten. Weiterhin werden Signaltransduktionsmoleküle an den Adäsionskomplexen aktiviert, wie z.B. Adaptorproteine der Crk–Familie, Src–Tyrosin–Kinasen, die fokale Adhäsionskinase (FAK), MAP Kinase, Protein Kinase C und die kleinen G–Proteine Ras, Rho und Rac [81] (siehe Abb. 1.3). Wichtig in der Mechanotransduktion osteoblastärer Zellen ist vor allem der MAPK–Signalweg. Viele Studien konnten nach mechanischer Stimulation eine Aktivierung der ERK 1/2 Kinase beobachten. Durch Phosphorylierung werden verschiedene Transkriptionsfaktoren wie AP1 oder NF-κB aktiviert, welche an entsprechende Bindestellen in mechanosensitiven Genen binden [59, 107].

1.3 Tissue Engineering von Knochengewebe

1.3.1 Zellen und Trägermaterialien

Mit dem Begriff „Tissue engineering“ wird eine interdisziplinäre Wissenschaft beschrieben, die zum Ziel hat, lebende Ersatzmaterialien für die Wiederherstellung, Erhaltung und Verbesserung von Gewebefunktionen zu züchten [57].
Die MPC sind hierfür eine attraktive Zellquelle, den sie können leicht isoliert, expandiert und in verschiedene mesenchymale Gewebe differenziert werden [65]. Man verwendet sie entweder mit einem dreidimensionalen Trägermaterial, um mit diesen Konstrukten Knochendefekte zu reparieren, oder appliziert sie ohne Trägermaterial systemisch oder in das Knochengewebe, um damit degenerative Knochenkrankheiten wie Osteogenesis imperfecta oder Osteoporose zu therapieren. Erste Erfolge mit MPC gab es bereits bei der Behandlung von Osteogenesis imperfecta mit einer intravenösen Applikation von MPC bei Zwillingen [37].
Um künstliche Gewebe züchten zu können, benötigt man schnell expandierende Zellen, welche man in einem natürlichen oder synthetischen Trägermaterial in einem Bioreaktor kultiviert. Die Trägermaterialien müssen biokompatibel und bioresorbierbar sein, dürfen keine immunologischen Abwehrreaktionen oder zytotoxische Reaktionen hervor-

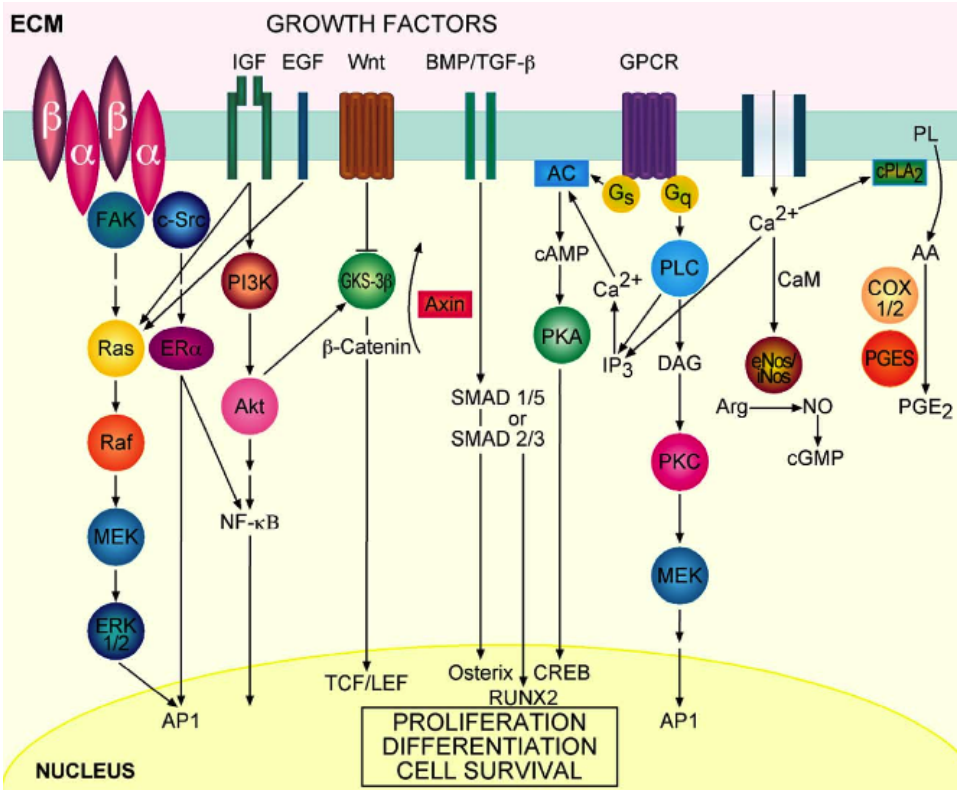


Abbildung 1.3: In die Mechanotransduktion osteoblastärer Zellen involvierte Signalwege (nach [59]). Abkürzungen: AA, Arachidonic acid; AC, adenylate cyclase: Akt/PKB, protein kinase B; AP1, activator protein 1; BMP, bone morphogenetic protein; CAM, Calmodulin; COX 1/2, cyclooxygenase 1/2; CREB, c-AMP response element–binding protein; c-Src, tyrosine protein kinase; DAG, diacylglycerol; EGF, epidermal growth factor; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ERα, estrogen receptor α; ERK1/2, extracellular signal regulated protein kinase 1/2; FAK, focal adhesion kinase; GSK-3β, glycogen synthase kinase-3β; G_s, stimulatory G–protein; GPCR seven-transmembrane-domain G–protein–coupled receptor; G_q, protein with α_q subunit (acitvates PLC; phospholipase C-β); IGF, insulin–like growth factor; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IP_3, inositol trisphophsphate; LEF, lymphoid enhancer-binding factor; MEK, mitogen-activated protein kinase extracellular signal regulated protein kinase; NF-κB, nuclear factor-κB; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PGE2, prostaglandin E2; PGES, prostaglandin synthase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PL, phospholipid; Raf, rat fibrosarcoma serin/Threonine protein kinase; SMAD, small, mother against decapentaplegic; Ras, rat sarcoma monomeric GTP-binding protein; TCF, T–cell factor; TGF-β , transforming growth factor-β; wnt, wingless; int, integration-1.

rufen und müssen Zellwachstum bzw. Zelldifferenzierung steuern [88]. Weiterhin müssen die Trägermaterialien ausreichende mechanische Stabilität besitzen. Für ein Einwachsen der Zellen und die nötige Vaskularisierung müssen die Träger eine interkonnektierende Porosität von mindestens 90% besitzen und einen Porendurchmesser von mindestens 100μm aufweisen [87]. Als natürliches Trägermaterial werden gereinigte extrazelluläre Matrixproteine verwendet wie Kollagen, Fibronektin, Laminin, Hyaluronsäure, Chitosan, Alginat oder Agarose. Diese haben den Vorteil, biokompatibel und degradierbar zu sein, haben aber bezüglich mechanischer Stabilität, ihrer Degradationsraten oder ihrer chargen–abhängigen Variabilität Nachteile. Auch devitalisierte Extrazellulärmatrices verschiedener Gewebe wie Haut, Submucosa, Blase, Dünndarm autologer, allogener oder xenogener Herkunft können verwendet werden. Die bisher verwendeten Keramiken wie Hydroxyapatit (HA) oder Trikalziumphosphat (TCP) erfüllen ebenfalls nicht alle Anforderungen: Hydroxyapatit ist ausreichend mechanisch stabil, jedoch ist die Interkonnektivität unvollständig und erschwert die Vaskularisierung. Weiterhin wird Hydroxyapatit nur sehr langsam durch körpereigenes Material ersetzt. Wegen seiner Biokompatibilität und seines Degradationsverhaltens wird häufig beta-Trikalziumphosphat verwendet. Jedoch zeigten einige Studien, dass TCP zu schnell (noch bevor neues Knochengewebe gebildet ist) oder auch zu langsam resorbiert wird und keine ausreichende mechanische Stabilität besitzt, weswegen sich die Forschung mehr auf gemischte Kalziumphosphate (TCP mit HA, TCP mit Polymeren) konzentriert. Synthetische Trägermaterialien ahmen die biologischen Eigenschaften der Extrazellulärmatrices nach und können mit verschiedenen Strukturen und verschiedenen Steifigkeiten hergestellt werden. Hier werden v.a. Polyglycolsäuren, Polymilchsäuren und Kopolymere daraus verwendet, aber auch weitere Polyhydroxyester, oder Polymere wie Polycaprolacton oder Polyethylmethacrylat [88, 30]. Der Nachteil dieser synthetischen Polymere liegt in möglichen zytotoxischen Rückständen aus dem Herstellungsprozess, schlechten Zelladhäsionseigenschaften und ihren sauren Nebenprodukten, die beim Abbau dieser Polymere entstehen. Vor allem bei größeren, komplexen dreidimensionalen Strukturen sind Bioreaktoren zur Kultivierung nötig, um das Überleben der Zellen zu ermöglichen und eine ausreichende Zellmenge zu erhalten.

1.3.2 Kollagenmatrices im Tissue Engineering von Knochengewebe

Kollagen ist das meistverbreiteste Protein in Säugetieren und stellt 30% des Gesamtprotein–Gewichts im Körper.
Diese Matrix ist auch für das Tissue Engineering von Knochen geeignet, da das Kolla-

gen 1 das Hauptkollagen im Knochen ist und die osteogene Differenzierung induzieren kann [29, 40, 53, 61, 119]. Allerdings sind die spezifischen Interaktionen zwischen Zellen und Kollagenmatrices bisher noch kaum verstanden. Zellen erkennen Kollagenfasern über Integrine, eine Familie von Transmembranproteinen, v.a. über $\alpha 2\beta 1$– und $\alpha 1\beta 1$ Integrin–Rezeptoren. Mehrere Studien zeigten, dass die Kollagen Typ I–Interaktion, v.a. mit $\alpha 2\beta 1$ Integrinen, die osteoblastäre Differenzierung und die Mineralisierung der Matrix induziert. Werden diese Bindungen geblockt, so wird beispielsweise auch die Osteokalzinexpression und die Matrix–Mineralisierung blockiert [86]. Weiterhin können diese Rezeptoren auch die Expression von MMP´s induzieren und können verschiedene pro-MMP´s aktivieren[98].

1.4 Ziel der Arbeit

Im Tissue Engineering von Knochengewebe will man neues funktionelles Knochengewebe züchten, um damit große Defekte aufzufüllen. Da mechanische Belastungen im Knochen einen großen Einfluss haben, könnte es von Vorteil sein, mechanische Reize zu applizieren, um funktionelleres Knochengewebe zu erhalten. Jedoch existieren wenige Studien darüber, wie mechanische Reize osteoblastäre Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung beeinflussen. Weiterhin ist nicht bekannt, wie sich die Zellen verschiedener osteogener Differenzierungsstadien in ihrer Mechanosensitivität unterscheiden. Die bisher erschienenen Studien zeigen, dass Osteoblasten und Osteozyten unterschiedlich auf mechanische Reize reagieren, jedoch sind oft Zellen unterschiedlicher Spezies und unterschiedlicher Art (Zelllinien und Primärzellen) miteinander verglichen worden [75, 111]. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, MPC *in vitro* in einer 3D Kollagen Typ I–Matrix zu differenzieren. Folgende Fragen sollten mit dieser Arbeit beantwortet werden:

- Wie unterscheidet sich die Genexpression osteogen differenzierter MPC von undifferenzierten MPC in einem dreidimensionalen Kollagengel?
- Reagieren unterschiedlich weit differenzierte Progenitorzellen verschieden auf mechanische Reize?
- Wie verändert eine Vordifferenzierung der Progenitorzellen im Monolayer den Differenzierungszustand und die Reaktion auf den mechanischen Reiz?
- Wie beeinflusst die Zelldichte in dreidimensionalen Kollagengelen den Differenzierungszustand und die Reaktion auf den mechanischen Reiz?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden Zellen derselben MPC–Spender parallel in osteogenem Medium und in Expansionsmedium in Kollagengelen kultiviert, um zwei verschiedene Differenzierungsstadien einer MPC–Population zu erhalten. Diese beiden Populationen wurden demselben, definierten mechanischen Reiz ausgesetzt. Der Einfluss der Kulturmedien, der Kultivierungsdauer und des mechanischen Reizes wurden auf mRNA–Expressionsebene mittels real–time–PCR und auf Proteinebene mittels ELISA und histochemischen Färbemethoden untersucht. Um verschiedene Differenzierungsstadien der MPC untersuchen zu können, wurden je nach Versuchsblock Dauer der Differenzierung, Zelldichte und Art der Differenzierung (2D und 3D) variiert.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
β-Glycerophosphat (Dinatrium–Salz)	Sigma	Deisenhofen (D)
β-Mercaptoethanol	Fluka	Buchs (CH)
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Alzarin red	Sigma	Deisenhofen (D)
Ameisensäure	Merck	Darmstadt (D)
Ampotericin B / Fungizone	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Ampicillin	Sigma	Deisenhofen (D)
Ascorbat-2-phosphat (Sesquimagnesium–Salz)	Sigma	Deisenhofen (D)
Bactotryptan	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Basenleiter (100 bp)	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Dexamethason	Sigma	Deisenhofen (D)
DMEM F0415	Biochrom	Berlin (D)
DMSO	Serva	Heidelberg (D)
EcoR1 + Puffer	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
EDTA	Merck	Darmstadt (D)
Eisessig	Merck	Darmstadt (D)
Eosin	Merck	Darmstadt (D)
Ethanol absolut, Ethanol vergällt	Merck	Darmstadt (D)
Ethidiumbromid	Serva	Heidelberg (D)
FCS (fötales Kälberserum), Charge 1SB002 Nr.: DE14–801F	BioWhittaker (Cambrex)	Verviers (Belgien)

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Formaldehyd	Merck	Darmstadt (D)
Glutamin	Biochrom	Berlin (D)
Glutaraldehyd	Sigma	Deisenhofen (D)
Hefeextrakt	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Histopaque-1077	Sigma	Deisenhofen (D)
Kollagenase 1A / Clostridiopeptidase A	Sigma	Deisenhofen (D)
Kollagengel Typ I (6 mg/ml)	ArsArthro AG	Esslingen (D)
Ladepuffer (6x)	Sigma	Deisenhofen (D)
L-Glutamin	Biochrom	Berlin (D)
Mayers Hämalaun	Merck	Darmstadt (D)
Methanol	Merck	Darmstadt (D)
Methylgrün	DAKO Corporation	Carpinteria (USA)
NaCl	Riedel–de Haen	Seelze (D)
NaOH	Merck	Darmstadt (D)
NcoI + Puffer	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Neutralisationslösung für Kollagengel	ArsArthro AG	Esslingen (D)
PBS	PAA Laboratories	Pasching (A)
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Pepton	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Protease	Sigma	Deisenhofen (D)
Ribonuclease Inhibitor	Sigma	Deisenhofen (D)
RNase–Free Dnase Set (50)	Qiagen	Hilden (D)
Select Agar	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Select Yeast Extract	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Silikon ELM4641A	Wacker	München (D)
Silikonvernetzer ELM4641B	Wacker	München (D)
SspI + Puffer	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Tris	Merck	Darmstadt (D)
Triton X–100	Merck	Darmstadt (D)
Trypan Blau	Sigma	Deisenhofen (D)

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Trypsin EDTA 0,05%/0,02%	Biochrom	Berlin (D)
Vitroclud	Langenbrinck	Emmendingen (D)
Xylol	Serva	Heidelberg (D)

2.2 Lösungen

Tabelle 2.2: Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kollagenase + Protease Lösung	115 U/ml Kollagenase IA + 38400 U/ml Protease, gelöst in Aqua bidest.
Lysispuffer (für RNA–Isolation)	Puffer RLT 143 mM β-Mercaptoethanol
TAE–Puffer (50x)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA–Lösung (5,5 M) Aqua dest. ad 1000 ml
TBS	0,05 M Tris–HCL, pH 7,6 0,15 M NaCl
Türks–Lösung	10 g/l Essigsäure 0,1 g/l Gentianaviolettlösung

2.3 Antikörper

Tabelle 2.3: Antikörper zur MPC–Charakterisierung

Bezeichnung	Hersteller
CD 9	Acris Antibodies, Hiddenhausen (D)
CD 44	R&D Systems, Wiesbaden (D)
CD 90 (Thy1)	Acris Antibodies, Hiddenhausen (D)
CD 105 (Endoglin)	Acris Antibodies, Hiddenhausen (D)
CD 166 (ALCAM)	Acris Antibodies, Hiddenhausen (D)
Stro-1	R&D Systems, Wiesbaden (D)

2.4 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 2.4: Primer für die real–time–RT–PCR

Zielgen	Produkt-größe	Nukleotidsequenzen
AP forward	224	5´–TCAGAAGCTCAACACCAACG–3´
AP reverse	224	5´–GTCAGGGACCTGGGCATT–3´
Cbfa1 forward	205	5´–CTCTTCCCAAAGCCAGAGTG–3´
Cbfa1 reverse	205	5´–CAGCGTCAACACCATCATTC–3´
GAPDH forward	224	5´–GAAGGTGAAGGTCGGAGTC–3´
GAPDH reverse	224	5´–GAAGATGGTGATGGGATTTC–3´
Kollagen I forward	197	5´–TGACCTCAAGATGTGCCACT–3´
Kollagen I reverse	197	5´–ACCAGACATGCCTCTTGTCC–3´
MMP-1 forward	234	5´–ATGCTGAAACCCTGAAGGTG–3´
MMP-1 reverse	234	5´–CTGCTTGACCCTCAGAGACC–3´
MMP-2 forward	185	5´–AAGAACCAGATCACATACAGGATCA–3´
MMP-2 reverse	185	5´–GTATCCATCGCCATGCTCC–3´
MMP-13 forward	172	5´–TTGAGCTGGACTCATTGTCG–3´
MMP-13 reverse	172	5´–GGAGCCTCTCAGTCATGGAG–3´
Osteopontin forward	177	5´–CTCAGGCCAGTTGCAGCC–3´
Osteopontin reverse	177	5´–GCCACAGCATCTGGGTATTT–3´
Osteokalzin forward	155	5´–CAGCCTTTGTGTCCAAGC–3´
Osteokalzin reverse	155	5´–GTCAGCCAACTCGTCACAGT–3´
p53 forward	174	5´–ATTTACGCGCGGAGTATTTG–3´
p53 reverse	174	5´–CCAGTGTGATGATGGTGAGG–3´
TIMP-1 forward	161	5´–AAGGCTCTGAAAAGGGCTTC–3´
TIMP-1 reverse	161	5´–GAAAGATGGGAGTGGGAACA–3´
TIMP-2 forward	223	5´–TGATCCACACACGTTGGTCT–3´
TIMP-2 reverse	223	5´–TTTGAGTTGCTTGCAGGATG–3´

2.5 Kits

Tabelle 2.5: Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller/Vertrieb	Ort
HotStarTaq Master Mix Kit (250)	PCR	Qiagen	Hilden (D)
Omniscript RT Kit (50)	cDNA–Synthese	Qiagen	Hilden (D)
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix–UDG	Real–tim–PCR	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Qiafilter Plasmid Midi Kit (25)	Klonierung	Qiagen	Hilden (D)
Qiaquick Gel Extraction Kit	DNA–Isolierung aus Agarose	Qiagen	Hilden (D)
Quantikine human pro–MMP-1 Immunoassay	ELISA	R&D Systems	Wiesbaden (D)
Quantikine human pro–MMP-13 Immunoassay	ELISA	R&D Systems	Wiesbaden (D)
RNeasy Mini Kit (50) mit Qia Shredder (50)	RNA–Isolierung	Qiagen	Hilden (D)
TOPO TA Cloning Kit	Klonierung	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I	Immunfärbung	Vector Laboratories	Wertheim–Bettingen (D)

2.6 Geräte

Tabelle 2.6: Geräte

Bezeichnung/Verwendung	Modell	Hersteller	Ort
Bildverarbeitungssoftware	AnalySIS	Soft Imaging System	Münster (D)
Brutschrank	Hera Cell 240	Heraeus	Hanau (D)
Digitale Kamera	Coolpix 950	Nikon	Düsseldorf (D)
Digitalkamera	IX70	Olympus	Hamburg (D)
DNA–Workstation	UV Cleaner, UVC/T–AR	Kisker	Steinfurt (D)
Feinwaage	Analytic AC 1205	Sartorius	Göttingen (D)
Feinwaage	EW 600–2M	Kern	Albstadt (D)
Geldokumentationsgerät	75S03227	Biorad	München (D)
Gelelektrophoresekammer	Horizon 11–14	Life Technologies	Karlsruhe (D)
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg (D)
I–Cycler	Optical Module	Biorad	München (D)
Laminar Flow	HS 12/2	Heraeus	Hanau (D)
Magnetrührer	RCT basic	IKA Werke	Staufen (D)
Mikroskop	IX 70	Olympus	Hamburg (D)
Mikroskop	Axiophot 451887	Zeiss	Oberkochen (D)
PCR–Gerät	Robocycler 96 Gradient Combo	Stratagene	Amsterdam (NL)
Spektralphotometer	Ultrospec Plus	Pharmacia LKB	Freiburg (D)
Pipetboy	Pipetus–Akku	Hirschmann	Langfeld (D)
Pipetten	diverse	Eppendorf	Hamburg (D)
Pumpe	ISM938	Ismatec	Wertheim–Mondfeld (D)
Rasterelektronenmikroskop	DSM 962	Zeiss	Oberkochen (D)
Wärmeschüttler	SM–30	EB Labortechnik	Hechingen (D)
Wasserbad	1012	GFL	Burgwedel (D)
Zellstimulationsgeräte		Eigenbau	Ulm (D)

2.7 Medium zur Bakterienkultivierung

Tabelle 2.7: Medium zur Bakterienkultivierung

Bezeichnung	Konzentration in Aqua bidest.
LB–Medium/LB–Agar	Bactotrypton 1% Select Yeast Extract 0,5% NaCl 1% Ampicillin 50 g/ml Select Agar – /1,5%

2.8 Zellkultur

2.8.1 Zellkulturmedien

Tabelle 2.8: Expansionsmedium

Expansionsmedium	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 μg/ml
Fungizone	2,5 μg/ml
L-Glutamin (Stammlösung, 200 mM)	4 mM
FCS	10%

Tabelle 2.9: Expansionsmedium während mechanischer Stimulation

Expansionsmedium während mechanischer Stimulation	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 μg/ml
Fungizone	2,5 μg/ml
L-Glutamin (Stammlösung, 200 mM)	4 mM
FCS	2%

Tabelle 2.10: Differenzierungsmedium

Differenzierungsmedium	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 μg/ml
Fungizone	2,5 μg/ml
L-Glutamin (Stammlösung, 200 mM)	4 mM
FCS	10%
β-Glycerophosphat	10 mM
Ascorbat-2-phosphat	50 μg/ml (0,2 mM)
Dexamethasone	0,1 μM

Tabelle 2.11: Differenzierungsmedium während mechanischer Stimulation

Differenzierungsmedium während mechanischer Stimulation	
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 μg/ml
Fungizone	2,5 μg/ml
L-Glutamin (Stammlösung, 200 mM)	4 mM
FCS	2%
β-Glycerophosphat	10 mM
Ascorbat-2-phosphat	50 μg/ml (0,2 mM)
Dexamethasone	0,1 μM

2.8.2 Isolation und Anzucht humaner mesenchymaler Progenitorzellen (MPC)

Für alle Versuche wurden primäre humane mesenchymaler Progenitorzellen verwendet, die aus tibialem Knochenmark isoliert wurden. Es wurden Progenitorzellen aus insgesamt 20 Spendern verwendet, davon 2 Frauen im Alter von 28 Jahren und 40 Jahren und 18 Männer im Alter von 17 Jahren bis 36 Jahren (Median=22,5, Interquartilbereich=21,75–27,25). Das Knochenmark wurde bei Operationen zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes aus der proximalen Tibia intraoperativ steril mit heparinisierten Spritzen entnommen (siehe Abb. 2.1) und innerhalb von 1 h aufgearbeitet. Die Entnahme wurde von der Ethikkomission der Universität Ulm bewilligt (Antrag Nr. 187/2002). Die Spender wurden über alle Vorgänge aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis. Die Methode der Isolation von MPC wurde ausgehend von der Methode von Haynesworth et al. in unserem Institut folgendermaßen abgewandelt [33]: 2–5 ml Knochenmarkslösung wurden im 15 ml Zentrifugenröhrchen über 5 ml Histopaque–Lösung geschichtet. Nach Dichtegradientenzentrifugation (30 min bei 600g) wurde die Fettschicht verworfen und der sichtbare

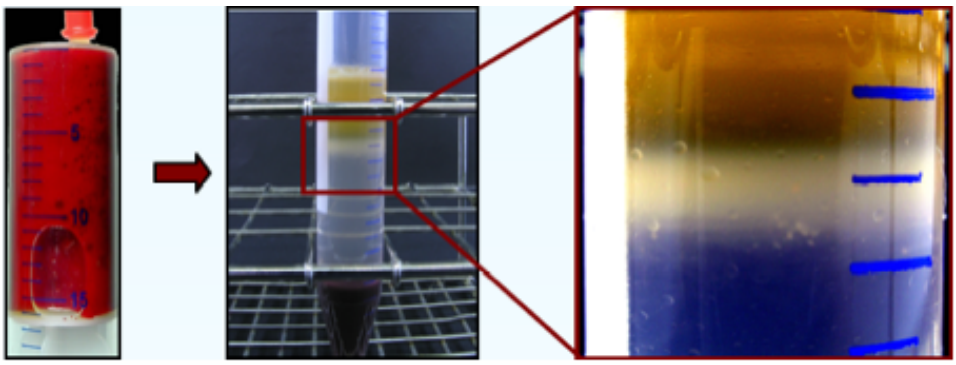


Abbildung 2.1: Isolation von MPC aus Knochenmarkaspirat (links) durch Dichtegradientenzentrifugation. Die milchig trübe Interphase (rechts) enthält die Progenitorzellen.

Zellring (Interphase) mit einer Pasteurpipette abgenommen. In dieser Interphase befinden sich mononukleäre Zellen, die zu etwa 0,01%-0,001% MPC enthalten. Nach einem Waschschritt mit 2–3 Volumen PBS wurden die resuspendierten Zellen gezählt und mit einer Zelldichte von $8x10^4$ – $1,6x10^5$ Zellen/cm^2 in eine 12,5 cm^2 Zellkulturflasche mit Expansionsmedium ausgesät. Nach 48 h wurde das Medium gewechselt und die folgenden Medienwechsel fanden zweimal pro Woche statt. Nach 8–14 Tagen entstanden die ersten so genannten „Colony Forming Units“. Nach Erreichen einer 50% – 80%–igen Konfluenz wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA abgelöst und die Zell–Trypsin–Suspension mit dem jeweils doppelten Volumen Expansionsmedium versetzt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte als Lebendzellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauerkammer und Trypanblau–Färbung. Die Vermehrung der MPC erfolgte in 175 mm^2 Zellkulturflaschen bei einer Zelldichte von 1000 Zellen/cm^2. Die Zellen wurden exemplarisch immunhistochemisch anhand ausgewählter Oberflächenmarker charakterisiert, um sicherzustellen, dass es sich bei den isolierten Zellen um Progenitorzellen handelte. Für die Versuche wurden MPC der Passage 3 bis 5 verwendet.

2.8.3 Differenzierung von MPC

MPC wurden je nach Versuchsdesign im Monolayer oder im Kollagengel differenziert. Für die Differenzierung im Monolayer wurden 5000 Zellen/cm^2 in 180 cm^2–Flaschen (siehe Kapitel 2.9.2) ausgesät. Für die Differenzierung in Kollagengelen wurden, je nach Versuchsablauf, $4,5x10^5$ Zellen bis $2x10^6$ Zellen pro Kollagengel angesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche. In der Vorkultivierungsphase (ohne mechanische

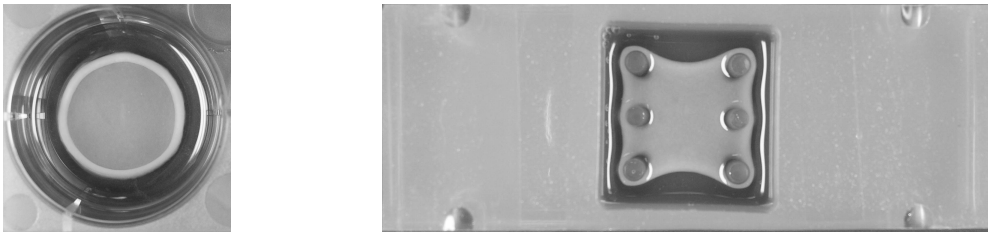


Abbildung 2.2: Verschiedene Formen von Kollagengelen. Freischwimmende Gele ohne äußere Belastung dienten in allen Versuchen als Kontrolle (links). Auf Silikonnoppen aufgespannte Gele wurden zur mechanischen Stimulation verwendet (rechts).

Stimulation) wurden im Monolayer wie auch im Kollagengel 10% FCS verwendet, in den Phasen der mechanischen Stimulation wurde sowohl in Expansionsmedium als auch Differenzierungsmedium der Serumgehalt auf 2% reduziert (siehe auch Kapitel 2.8.1).

2.8.4 Dreidimensionale Zellkultur im Kollagengel

Für die mechanische Stimulation wurden die expandierten Zellen in ein dreidimensionales Kollagen Typ I–Gel eingesät. Das Kollagen Typ I–Gel ist ein Zweikomponentensystem, das nach Mischen von zwei Anteilen (Kollagengel/Neutralisationslösung) polymerisiert und somit in beliebige Formen gegossen werden kann. Nach Abtrypsinieren und Zählen der Zellen wurden diese in der entsprechenden Menge gekühlter Neutralisationslösung aufgenommen. Pro Gel wurden 1,5 ml Neutralisationslösung mit Zellen zu 1,5 ml Kollagengel gemischt. In den Versuchsblöcken A und B wurden jeweils $4{,}5 \times 10^5$ Zellen pro Gel ($1{,}5 \times 10^5$ Zellen/ml) verwendet, im Vorversuch zu Versuchsblock C entsprechend 5×10^5 Zellen pro Gel ($1{,}7 \times 10^5$ Zellen /ml), 1×10^6 Zellen pro Gel ($3{,}3 \times 10^5$ Zellen/ml) und 2×10^6 Zellen pro Gel ($6{,}7 \times 10^5$ Zellen/ml) und in Versuchsblock C 1×10^6 Zellen pro Gel ($3{,}3 \times 10^5$ Zellen/ml). Neutralisationslösung und Kollagenlösung wurden auf 4°C temperiert, um eine zu schnelle Polymerisation zu verhindern. Es wurden immer drei Gele auf einmal aus einem Gemisch von 4,5 ml Neutralisationslösung mit 4,5 ml Kollagengel gegossen, um eine gute Durchmischung bei möglichst geringer Luftblasenbildung zu gewährleisten. Nach dem Gießen in entsprechende Silikonformen oder Petrischalen (siehe Abb. 2.2) wurden diese im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Polymerisieren des Gels (ca. 30 min) wurde 2 ml Nährmedium pro Gel zugegeben.

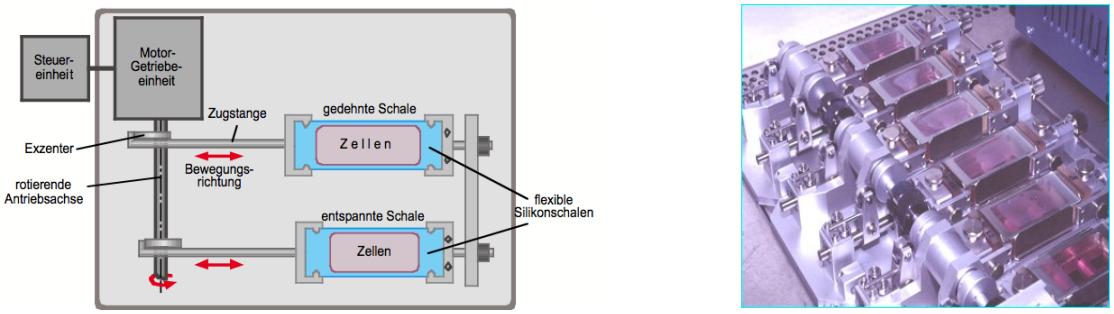


Abbildung 2.3: Gerät zur zyklischen uniaxialen Dehnung von Silikonnoppenschalen.

2.8.5 Mechanische Stimulation von Kollagengelen

Für die Applikation von zyklischen uniaxialen Dehnungsreizen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Zellstimulationsgerät entwickelt [76], in welchem Silikonreizkammern oder zellbesiedelte Konstrukte eingespannt und mittels rotierender Exzenter gedehnt werden können. Da die gelierten Kollagengele über Verankerungsnoppen in den Silikonreizkammern fixiert sind, werden die Dehnungen auf die Konstrukte übertragen (siehe Abb. 2.2 und 2.3). Die Dehnung erfolgte motorgesteuert, wobei sowohl die Frequenz (über die Motorgeschwindigkeit) als auch die Dehnungsamplitude (über die Exzenterform) eingestellt werden konnte. Für die Dauer des Versuches verblieben Proben und Gerät im Brutschrank bei 37°C und 8,5% CO_2. In allen Versuchsblöcken wurde die Stimulation der Kollagengele mit 1800 Lastzyklen (entspricht 30 min) täglich bei einer Dehnung von 1% und einer Frequenz von 1 Hz durchgeführt. Finite Element Modell–basierte Computersimulationen deuten darauf hin, dass bei einer äußeren, mit einem 1% Exzenter applizierten Dehnung im inneren Bereich des Gels eine mittlere Dehnung von ca. 0,9% auftritt. (H. Schmidt, unveröffentliche Daten). Da im Bereich des Gels außerhalb der Noppen möglicherweise zusätzlich Druckkräfte auftreten, wurde der Bereich um die Silikonnoppen für mRNA–Isolierungen abgetrennt (siehe auch Kapitel 2.10.2).

2.9 Versuchsabläufe zur Differenzierung und mechanischen Stimulation

Ziel der Versuche war es zu untersuchen, wie die Differenzierung von MPC ihre Reaktion auf mechanische Reize beeinflusst. Dazu wurden in verschiedenen Versuchsblöcken einer-

seits die Art und Dauer der Differenzierung (Differenzierung im Monolayer und im Kollagengel, verschiedene Zelldichten) variiert, andererseits auch der Zeitraum der mechanischen Stimulation. Das Versuchsdesign für die mechanische Stimulation (1% Dehnung, 1 Hz Frequenz, 30 min täglich) war in allen Versuchen identisch. In Versuchsblock A wurden die Zellen in einer Zelldichte von 4,5x10^5 Zellen/Gel ausgesät und über 14 Tage im Kollagengel differenziert. In Versuchsblock B wurden die MPC zuerst 12 Tage im Monolayer vordifferenziert, bevor sie in einer Zelldichte von 4,5x10^5 Zellen/Gel weitere 14 Tage im Kollagengel differenziert wurden. In Versuchsblock C wurden die Zellen in einer höheren Zelldichte von 1x10^6 Zellen/Gel ausgesät und über 21 Tage im Kollagengel differenziert.

2.9.1 Versuchsblock A: Differenzierung und mechanische Stimulation der Zellen im Kollagengel

Im Monolayer expandierte MPC wurden in einer Konzentration von 4,5x10^5 Zellen/Gel ausgesät und entweder mit Expansionsmedium oder osteogenem Differenzierungsmedium über 14 Tage kultiviert. Für mechanisch unbelastete Kontrollen wurden Gele mit derselben Zellzahl in 6–well–Schalen gegossen, wo sie frei im Medium schwimmen konnten und damit keine mechanische Belastung von außen erfuhren. Gele für die mechanische Stimulation wurden in flexible Silikonschalen gegossen, wo die Verankerung an Silikonnoppen eine Übertragung der Dehnung auf das Gel ermöglichte (siehe Abb. 2.2). Nach einer Vorkultivierungsphase von 7 Tagen im 3D–Gel ohne mechanische Stimulation wurden die auf den Silikonnoppen fixierten Gele 7 Tage täglich 30 min bei 1 Hz und einer Amplitude von 1% gedehnt. Expansions– und Differenzierungsmedium in der Vorkultivierungsphase enthielten 10% FCS. Während der Stimulationsphase wurde in beiden Medien das Serum auf 2% reduziert (sowohl bei Kontrollen wie auch bei mechanisch stimulierte Proben, siehe Kapitel 2.8.1).

Folgende Untersuchungzeitpunkte wurden gewählt: Tag 0 (direkt vor der Aussaat nach Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche), Tag 7 (7 Tage Kultivierung in Expansionsmedium oder Differenzierungsmedium, ohne mechanische Stimulation) und Tag 14 (14 Tage Kultivierung in Expansionsmedium oder Differenzierungsmedium, mit 7–tägiger mechanischer Stimulation, siehe Abbildung 2.4). Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurden mindestens drei Gele angesetzt und vereinigt, um genügend Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen zu besitzen. Sofort nach Beendigung der mechanischen Stimulation wurden die Kollagengele in RLT–Lysispuffer aufgenommen und in flüssigem

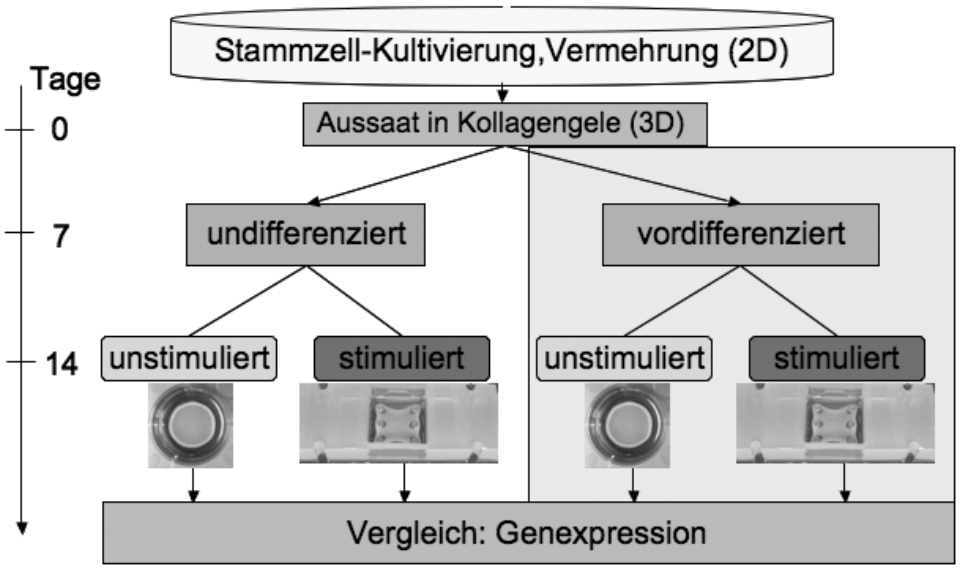


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs in Versuchsblock A

Stickstoff tiefgefroren. Es wurden sieben verschiedene Spender für diesen Versuchsblock verwendet.

2.9.2 Versuchsblock B: Zweidimensionale Vordifferenzierung der Zellen, weitere Differenzierung und mechanische Stimulation im Kollagengel

Im Monolayer expandierte MPC wurden in einer Dichte von 2000 Zellen/cm^2 für die Kultivierung unter Expansionsmedium (10% FCS) und 5000 Zellen/cm^2 für die Kultivierung in Differenzierungsmedium (10% FCS) in 180 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät und 12 Tage vorkultiviert. Für das Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen wurde für Zellkulturen in Expansionsmedium Trypsin verwendet. Für die Ablösung des Zellrasens in Zellkulturflaschen in Differenzierungsmedium wurde ein zweiminütiger Kollagenase/Protease–Verdau (768 U Clostridiopeptidase A/ml DMEM + 2,3 U Protease/ml DMEM) durchgeführt, um die Zellen trotz starker Vernetzung und Matrixbildung noch vereinzeln zu können. Sowohl undifferenzierte MPC als auch differenzierte MPC wurden nach 12 Tagen in einer Konzentration von 4,5x10^5/Gel ausgesät, wobei Gele für die mechanische Stimulation in Silikonnoppenschalen und Kontrollgele in 6–Well–Schalen gegossen wurden. Das entsprechende Medium wurde beibehalten, aber der Serumgehalt auf 2% reduziert. Die fixierten Gele wurden über 14 Tage täglich 30 min mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Amplitude von 1% gedehnt.

Folgende Untersuchungzeitpunkte wurden gewählt: Tag -12 (Versuchsbeginn, Start der Vordifferenzierung im Monolayer), Tag 0 (Aussaat ins Kollagengel 12 Tage nach Vorkultivierung), Tag 7 (7 Tage Kultivierung im Gel) und Tag 14 (14 Tage Kultivierung im Gel, siehe Abbildung 2.5). Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurden für die mRNA Isolierung drei Gele angesetzt und vereinigt, um genügend Ausgangsmaterial für weitere Untersuchugen zu besitzen. Sofort nach Beendigung der mechanischen Stimulation wurden die Kollagengele in RLT–Lysispuffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden sieben verschiedene Spender für diesen Versuchsblock verwendet.

2.9.3 Versuchsblock C: Differenzierung und mechanische Stimulation im Kollagengel über 21 Tage, erhöhte Zellkonzentration

In einem Vorversuch mit Zellen eines Spenders wurde der Einfluss verschiedener Zelldichten auf die Differenzierung überprüft (5x10^5 Zellen/Gel, 1x10^6 Zellen/Gel und 2x10^6 Zellen/Gel). Da sich die Zellen in höheren Zelldichten besser differenzieren ließen (Nachweis von Hydroxyapatit mit von Kossa–Färbung positiv), wurde der folgende Versuchsblock

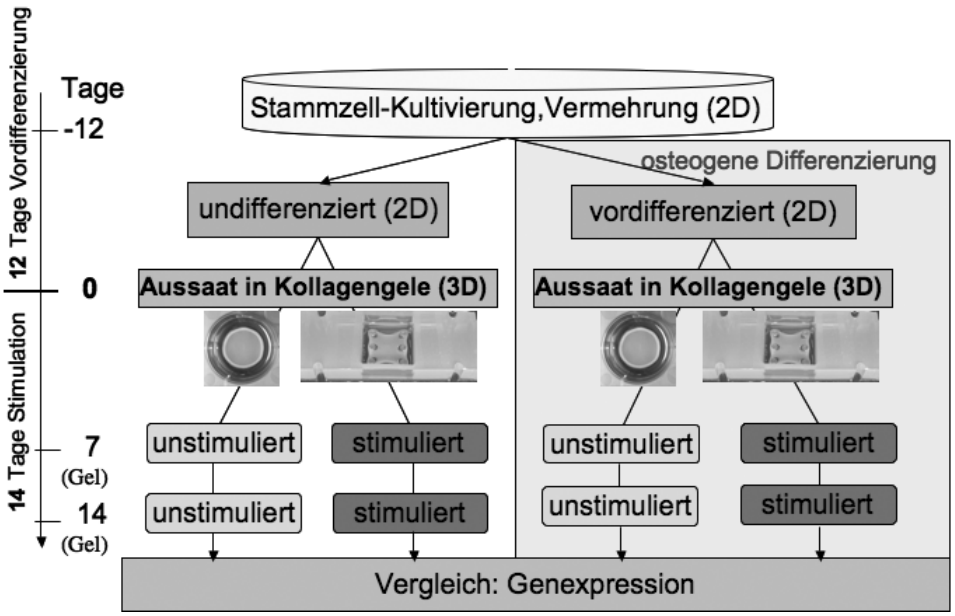


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs in Versuchsblock B

mit einer Zelldichte von 1x10^6 Zellen/Gel durchgeführt.

Für die Aussaat wurde in allen Gelen die Zellzahl 1x10^6 Zellen/Gel verwendet. Analog zu Versuchsblock A wurden im Monolayer expandierte MPC nach der Aussaat in Kollagengele entweder mit Expansionsmedium oder osteogenem Differenzierungsmedium über 7 Tage ohne mechanische Stimulation vorkultiviert. Danach erfolgte eine tägliche mechanische Stimulation über 14 Tage im jeweiligen Medium unter Serumreduktion von 10% auf 2%. Im Gegensatz zum Versuchsblock A wurde in diesem Versuchsblock die Kultivierungszeit von 14 Tage auf 21 Tage erhöht. Die zyklische mechanische Stimulation wurde wie in den Versuchsböcken A und B mit einer Amplitude von 1% und einer Frequenz von 1 Hz über 30 min durchgeführt.

Folgende Untersuchungszeitpunkte wurden gewählt: Tag 0 (Versuchsbeginn, Zeitpunkt der Aussaat), Tag 7 (7 Tage Kultivierung im Gel, ohne mechanische Stimulation), Tag 14 (14 Tage Kultivierung im Gel und einwöchige mechanische Stimulation) und Tag 21 (21 Tage Kultivierung im Gel und zweiwöchige mechanische Stimulation, siehe Abbildung 2.6). Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurden mindestens zwei Gele angesetzt und vereinigt, um genügend Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen zu besitzen. Sofort nach der mechanischen Stimulation wurden die Gele in RLT–Lysispuffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für diesen Versuchsblock wurden insgesamt sechs Spender verwendet. Da aufgrund der zu geringen Zellzahl bei einem

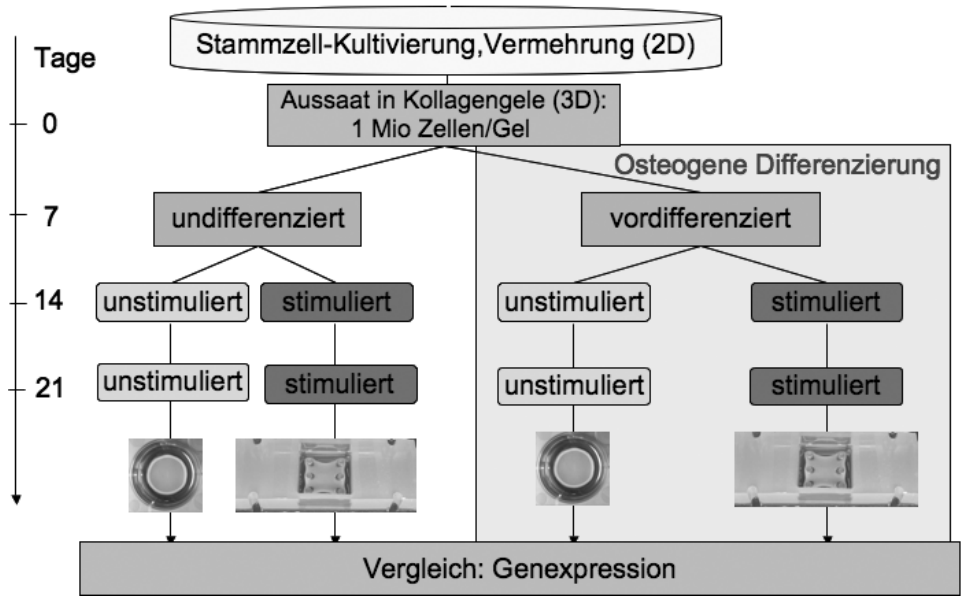


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs in Versuchsblock C

Spender nur Gele in Differenzierungsmedium angesetzt werden konnten, waren für alle Untersuchungszeitpunkte in Expansionsmedium nur Daten von fünf Spendern vorhanden.

2.10 Untersuchung der Genexpression auf mRNA–Ebene

Um eventuelle Veränderungen in der Genexpression infolge mechanischer Stimulation oder osteogener Differenzierung zu messen, wurde die mRNA einer Probe mit dem RNeasy Mini Kit isoliert. Die isolierte und quantifizierte mRNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Mit dieser cDNA wurden real–time–PCR–Untersuchungen durchgeführt. Für den Nachweis der Genexpression wurden für jedes Gen spezifische Oligonukleotide (Primer) auf der Basis publizierter Sequenzen mit Hilfe des NCBI Entrez Search System entworfen. Nach Austesten wurden diese Primer in der real–time–PCR eingesetzt, um die Stärke der Expression eines Zielgens zu bestimmen. Für Genexpressions–Vergleiche von mehreren Proben wurde die Expression des Zielgens anhand einer Eichgeraden (Standardreihe) quantifiziert und auf die, ebenfalls mit Hilfe einer Eichgeraden, quantifizierte Expression eines Housekeeping–Gens (GAPDH) normiert. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden serielle 10–fach Verdünnungen aus definierten Mengen an PCR–Amplifikationsprodukten

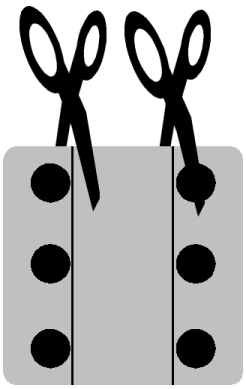


Abbildung 2.7: Abtrennung der Bereiche um und außerhalb der Noppen für die mRNA–Aufarbeitung

verwendet. Diese PCR–cDNA–Standards wurden durch Ligation des entsprechenden PCR–Stücks in einen pCR4–TOPO–Vektor (TOPO TA Cloning Kit) gewonnen, welches anschließend in kompetenten *E.coli* Bakterien vermehrt und nach Sequenzanalyse und Linearisierung als Standard für die quantitative PCR verwendet wurde.

2.10.1 Isolierung der mRNA aus Monolayerkulturen

Für die Isolation der mRNA von Monolayer-Zellkulturen (aus Zellkulturflaschen) wurden die Zellen nach Trypsinbehandlung mittels Zentrifugation pelletiert und sofort in Lysepuffer (Lysis buffer RLT + 143 mM β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie im Handbuch des Herstellers beschrieben.

2.10.2 Isolierung der mRNA aus Kollagengelen

Da nur im inneren Bereich zwischen den Fixierungsnoppen Zugdehnungen auftreten, wurden die äußeren Bereiche bis zu den Fixierungsstellen mit dem Skalpell abgetrennt (siehe Abb. 2.7). Die Gelfragmente wurden einmal mit 2-3 ml PBS pro Gel gewaschen, so trocken wie möglich mit Lysepuffer (Lysis buffer RLT + 143 mM β-Mercaptoethanol, wie im Handbuch des Herstellers beschrieben) versetzt, wobei sich eine Konzentration von 1 ml Lysepuffer pro ml Gelvolumen als optimal bewährt hatte. Da sichergestellt werden musste, dass die Aufarbeitungsprozedur an sich nicht die Genexpression beeinflusst, wurden die Kollagengele unmittelbar nach der mechanischen Stimulation in Lysepuffer aufgenommen, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte mit dem RNeasy–

Minikit. Wegen des hohen Probenvolumens und einer relativ hohen Proteinkonzentration im Vergleich zur Zellkonzentration musste das Protokoll des Herstellers zur Isolierung der mRNA verändert werden, um die mRNA–Ausbeute zu erhöhen. Zuerst wurde das Lysat mit einer sterilen Spritze und einer 0,9 mm–Kanüle, wie im Handbuch des Herstellers beschrieben, homogenisiert. Danach wurde ein Enzymverdau–Schritt eingefügt, um das Kollagenkonstrukt aufzuschließen. Um das Volumen an Enzymlösung so gering wie möglich zu halten, wurde das Homogenisat bei 2000-5000 g abzentrifugiert und nur das Kollagenpellet für den Enzymverdau verwendet, während der Homogenisat–Überstand in dieser Zeit auf 4°C gelagert wurde. Diese Aufkonzentrierung des Kollagens für den Enzymverdau hatte den Vorteil, dass nur sehr geringe Konzentrationen von Lysepuffer in die Enzymlösung gelangten und damit der Verdauvorgang nicht von den im Lysepuffer enthaltenen hohen Salzkonzentrationen gehemmt wurde. Als optimales Verhältnis erwies sich die Zugabe von 500 μl Enzymlösung, welche 1,4 U Protease und 480 U Kollagenase 1A enthielt, zu 1 ml Homogenisat–Ausgangsvolumen. Nach einer Inkubation der Kollagen–Enzymlösung bei 37°C über 2 min (maximal 10 min, bis der Großteil der Fasern zersetzt worden war) wurde der Ansatz für 3 min bei 10000 g zentrifugiert, um Zelldebris und Faserreste zu entfernen. Dieser Überstand wurde mit dem gekühlten Homogenisat–Überstand vereinigt und mit 0,5 Volumen 100% Ethanol versetzt. Die folgenden Schritte wurden wieder wie im Herstellerhandbuch beschrieben durchgeführt. Die gesamte Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und durch eine RNeasy–Affinitäts–Säule gesaugt, um die RNA zu binden. Nach einem Waschschritt mit 350 μl RW1–Puffer wurde eine DNAse Behandlung, wie im Handbuch empfohlen, durchgeführt, um eventuell gebundene DNA Reste von der Membran zu entfernen. Dazu wurden 80 μl DNase–Lösung auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden nacheinander ein Waschschritt mit 350 μl RW1–Puffer und zwei Waschschritte mit 500 μl RPE–Puffer durchgeführt und die Säule anschließend 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die RNA wurde mit 50 μl RNAse–freiem Wasser von der Säulenmembran eluiert. Die Quantifizierung der RNA erfolgte über die Messung der Absorption bei 260 nm und die Abschätzung der Reinheit über das Verhältnis der Absorbtion bei 260 nm zu 280 nm im Photometer. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.10.3 cDNA Synthese

Zur Untersuchung der Expression von Genen mittels PCR wird die mRNA als Matrize für die Synthese einer complementary–DNA (cDNA) benutzt, da diese gegenüber

einem Abbau in Lösung wesentlich stabiler ist als die mRNA. Für die Synthese wird das Enzym Reverse Transkriptase benötigt, welches ursprünglich aus Retroviren isoliert wurde. Dieses Enzym besitzt eine RNA–abhängige DNA–Polymeraseaktivität. Bei der Synthese dienen nur aus Thyminbasen bestehender Primer (Oligo–dT–Primer) die sich an das Polyadenylierungsende der mRNA anlagern, und Random–Hexamer–Primer, die sich an zufällige Komplementärstücke anlagern, als Startpunkt für die cDNA Synthese. Für die cDNA Synthese wurde der Omniscript–Kit verwendet. Für die Reaktion wurde 1μg RNA in einem 20 μl–Ansatz umgeschrieben. Zuerst wurde die RNA–Lösung (1 μg) mit Wasser auf ein Volumen von 12 μl aufgefüllt und dann 5 min bei 65°C im PCR Gerät denaturiert. Zum Reaktionsansatz wurden 2 μl Reaktionspuffer (10 fach Konzentration), 2 μl dNTPs (5 mM), 1 μl RNase Inhibitor (10 U/μl; Sigma: 40 U/ml), 1 μl Oligo–dT–Primer (0,1 mM), 1 μl Random–Hexamer–Primer (1 mM) und 1 μl Omniscript (4 U) pipettiert und sorgfältig gemischt. Die cDNA Synthese erfolgte im PCR Gerät erst 60 min bei 37°C, dann 60 min bei 42°C.

2.10.4 Standard–PCR

Für die Amplifikation spezifischer Gene wurde die Polymerase Kettenreaktion (HotStarTaq Master Mix Kit) durchgeführt. Die Standard–PCR diente als erste Überprüfung neu entworfener Primer und als Ausgangspunkt für die Amplifikation von Sequenzen für Klonierungsreaktionen. Für die PCR wurde nach Angaben des Herstellers 1 μl (10–100 ng) DNA, 5 μl PCR–Puffer (10 fach), 0,5 μl dNTPs (50 mM), 1 mM Primer und Polymerase (1 U/μl) zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde mit H_2O auf 20 μl aufgefüllt. Die Ansätze wurden gemischt, kurz abzentrifugiert und zur Amplifikation für 32 Zyklen in das PCR–Gerät gestellt. Es wurde das folgende PCR–Protokoll verwendet: Initiale Enzymaktivierung von 14 min bei 95°C, Denaturierung von 1 min bei 94°C, Annealing von 45 s bei 60°C, Extension 1 min bei 72°C und eine finale Extension für 20 min bei 72°C. Anschließend wurden Aliquots (10 μl) der erhaltenen PCR–Produkte nach Anleitung auf das vorbereitete 2%ige Agarose Gel aufgetragen und bei 85 V aufgetrennt.

2.10.5 Gelelektrophorese

Allgemein wird die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren für die qualitative oder semiquantitative Analyse genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gel–Elektrophorese genutzt, um die bei der Standard–PCR und real–time–RT–PCR erhaltenen Produkte auf ihre Reinheit zu überprüfen. Die Überprüfung der PCR–Produkte

nach einer quantitativen real–time–PCR durch Gel–Elektrophorese zeigt, wie spezifisch die Reaktion abläuft. Beim Erhalt mehrerer Banden müssen die PCR–Bedingungen optimiert werden, da mit dem hier verwendeten SYBR–Green–System in der quantitativen PCR neben dem eigentlichen Produkt auch eventuelle Nebenprodukte mit quantifiziert würden und dann die Messungen verfälschen würden. Für die PCR–Produkte, deren Größe zwischen 155 bp und 234 bp lag, wurde ein 1,5%–iges Agarose–Gel hergestellt. Dafür wurden 1,5 g Agarose abgewogen und mit 100 μl TAE in der Mikrowelle für 2 min aufgekocht bis die Agarose gelöst war. Nach Abkühlen der Agarose–Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben. Die Agarose wurde dann nach Einsetzen des gewünschten Gel–Kamms in den Gelschlitten gegossen. Nach vollständigem Gelieren wurde der Gelschlitten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und das Gel mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Die Proben wurden mit dem Gel–Lade–Puffer gemischt und nach vorsichtigem Auftragen von 10 μl Probenvolumen in die Geltaschen bei Elektrophoresebedingungen von ca. 85–120 V für 30–60 min aufgetrennt. Die DNA Banden wurden unter UV–Licht mit einem Geldokumentationsgerät analysiert.

2.10.6 Amplifikation von PCR–Produkten in Bakterien als Standards für real–time–PCR

Mit Hilfe eines Klonierungskits (TOPO TA Cloning Kit) wurde die cDNA der einzelnen Zielgene, die mit Hilfe spezifischer Primerpaare durch PCR amplifiziert wurde, in einen Plasmid–Vektor (pCR4–TOPO) eingefügt (kloniert). Die isolierte Plasmid–Vektor–DNA kann dann als Standard verwendet werden. Das Plasmid, in das das spezifische Amplifikationsprodukt kloniert wurde, enthält ein Ampizillin–Resistenzgen. Nach Aufnahme des Plasmides von Bakterien wurden diese gegen Ampizillin resistent und konnten dann auf einem ampicillinhaltigen Nährboden von negativen Klonen, die das Plasmid nicht aufgenommen hatten, unterschieden werden. Die Plasmid–DNA der positiven Klone wurde nach ihrer Vermehrung und Isolation durch Restriktions– und Sequenzanalyse auf den Einbau des Amplifikationsproduktes hin kontrolliert. Der Originalklon mit dem Insert wurde nach Vermehrung als Plasmid–DNA–Standard für die real–time–RT–PCR verwendet. Dazu wurde das Plasmid noch durch ein spezifisches Restriktionsenzym, das das enthaltene Insert nicht schneidet, linearisiert.

Amplifikation des Gens mittels PCR

Ausgangspunkt der Klonierungsreaktion war die Amplifikation des jeweiligen Gens in einer Standard–PCR mit dem HotStarTaq Master Mix Kit, wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben). Nach der PCR wurde der Ansatz elektrophoretisch in einem 2%–igen Ethidiumbromid–haltigen Agaraosegel bei 85 V aufgetrennt. In UV–Licht wurden die Größe und Reinheit des PCR–Produkts überprüft, bevor das DNA–Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurde. Durch Zugabe von 300 μl QG Puffer (Qiaquick Gel Extraction Kit) pro 100 mg Gel und Inkubation bei 50°C (10 min) wurden die Gele aufgelöst und anschließend mit einem Volumenteil Isopropanol (100%) versetzt. Die cDNA wurde mit Qiaquick–Säulen gereinigt.

Klonierungsreaktion und Transformation

Für jeden Ansatz wurde 1 μl PCR–Produkt, 1 μl TOPO–Vektor (pCR 4–TOPO), 1 μl Salzlösung und 2 μl steriles H_2O zu einem Reaktionsansatz zusammenpipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Für die sich anschließende Transformation wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt oder über Nacht bei -20°C gelagert. Für die Transformation wurde der kompetente *E.coli* Bakterienstamm (Top10 one shot chemical competent *E.coli*) vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 μl des Klonierungsansatzes zu dem Bakterienstamm und vorsichtigem Mischen wurde der Reaktionsansatz für 30–45 s bei 42°C im Heizblock inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend sofort auf Eis überführt und 250 μl SOC–Medium zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. 50 μl der transformierten Bakterien wurden anschließend auf vorgewärmten LB–Agar–Platten mit Ampicillin mit einem sterilen Drigalskispatel ausplattiert. Die Ansätze wurden im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

Herstellung des LB–Mediums und der LB–Agar–Platten mit Ampicillin

Für die Herstellung des LB–Mediums wurden 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl mit 1 l destilliertes Wasser (pH 7,0) gemischt und autoklaviert. Für die Herstellung der Agarplatten wurden zu dem gleichen Ansatz noch 15 g Bacto–Agar zugegeben. Nach Abkühlen des Mediums wurde das Antibiotikum (50 g/ml) zur selektiven Anreicherung der Ampicillin–resistenten Bakterienklone zugegeben.

Bakterienkultur

Um transformierte Bakterien zu vermehren, wurde von jeder Platte je eine Kolonie von der LB–Platte in ein Röhrchen mit 5 ml LB–Medium mit Ampicillin überführt. Die Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln bei 250 rpm über Nacht inkubiert. Um die erfolgreiche Klonierung zu überprüfen, wurde mittels der zugehörigen spezifischen Primerpaare eine PCR mit 1 μl Bakteriensuspension durchgeführt und in einem Agarose–Gel aufgetrennt. Mit erfolgreich klonierten Vorkulturen wurde 50 ml LB–Medium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Ansätze wurden bei 37°C und 250 rpm im Wärmeschütter für 12–16 h inkubiert. Aus diesen Bakterien wurde dann am nächsten Tag die Plasmid–DNA isoliert.

Isolation der Plasmid–DNA

Die Plasmid–Präparation wurde mit Hilfe eines Kits (Plasmid Midi Kit) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der DNA–Isolation wurde das erhaltene Pellet für 10 min luftgetrocknet und in H_2O aufgenommen. Um die DNA zu quantifizieren, wurde eine geeignete Verdünnung im Photometer bei 260 nm (A260) gemessen. Für jeden Ansatz wurde sowohl eine DNA–Sequenzierung in Auftrag gegeben als auch eine Standard–PCR mit geschnittenem Plasmid durchgeführt, um das Produkt auf Größe und Reinheit zu überprüfen. Zusätzlich wurde die Funktionalität der Standards für real–time–RT–PCR im iCycler überprüft.

Restriktion der Plasmid–DNA

Für die Verwendung der Plasmid–DNA als Standardreihe in der real–time–RT–PCR wurde die Plasmid–DNA mittels geeigneter Restriktionsenzyme linearisiert. Die Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt, dass die Schnittstelle im Plasmid und nicht Insert liegt. Für den Restriktionsansatz wurden bis zu 10 μg Plasmid–DNA mit 1 μl Enzym (10 U /μl), und 5 μl Reaktionspuffer (10 fach) gemischt und mit H_2O auf 50 μl Endvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden Verdünnungen bis 10^8–fach erstellt, welche dann als Standardreihe für die real–time–PCR dienten.

2.10.7 Real–time Polymerase–Ketten–Reaktion (real–time–RT–PCR)

Die Besonderheit der real–time–RT–PCR liegt in der Möglichkeit, die Menge des amplifizierten Produkts in Echtzeit zu verfolgen und dessen Zunahme über einen DNA–bindenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) zu messen. Die absolute Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der klonierten Standards (siehe Kapitel 2.10.6), die zusammen mit den zu untersuchenden Proben amplifiziert wurden. Um die Konzentration der Ziel–DNA in den Proben bestimmen zu können, wurden diese stets auf das Housekeeping–Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) normiert.

Für die Auswertung mittels real–time–RT–PCR wurde die cDNA mit Wasser 1:10 verdünnt eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers wurde der Platinum SYBR Green Supermix (Invitrogen, Karlsruhe) für die Herstellung des Reaktionsansatzes (25 μl/Well) verwendet. Dazu wurde entsprechend der Anzahl an Wells (+ 10%) ein Mix aus Platinum SYBR Green Mix (12,5 μl/Well), Fluorescein 1 M (0,25 μl/Well), Wasser (8,25 μl/Well) und Primer–Mix (2 μl/Well) hergestellt. Der Primer–Mix wurde für jede Messung nach dem Schema 1 μl forward Primer + 1 μl reverse Primer + 18 μl Wasser in der jeweils benötigten Menge frisch hergestellt. Nach Mischen der Lösung wurden 23 μl des Mixes pro Well vorgelegt und um 2 μl Versuchs–cDNA, Standard–cDNA oder Wasser ergänzt, wobei alle Proben in Doppelbestimmung aufgetragen wurden. Für die real–time–RT–PCR im i–Cycler wurde das UFB–Thermoprotokoll eingesetzt (siehe Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: PCR Protokoll (UFB Thermoprotokoll) der real–time–RT–PCR

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	2 min
2	38	90°C	30 s
		60 °C	50 s
3	1	95°C	1 min
4	1	60°C	1 min
5	76	60°C	8s
6	1	15°C	Ende

2.11 Überprüfung der Genexpression auf Proteinebene

2.11.1 Pro–MMP-1– und pro–MMP-13–Expressionsanalyse mittels Immunoassay

Um die Ergebnisse auf Proteinebene zu überprüfen, wurden die Zellkulturüberstände von drei Versuchen aus Versuchsblock A, fünf Versuchen aus Versuchsblock B und vier Versuchen aus Versuchsblock C auf ihre pro–MMP-1– und pro–MMP-13–Sekretion in einem Sandwich–Enzym–Immunoassay (ELISA) untersucht. Es wurden Immunoassays für die pro–Form des Enzyms ausgewählt, da sie die zuerst synthetisierte Form darstellen. Die aktive Form kann wieder von so genannten „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ (TIMP´s) gebunden werden und ist damit möglicherweise für die Bestätigung der RNA–Daten weniger geeignet. In eine mit einem monoklonalen Antikörper vorbeschichtete Mikroplatte werden Standards und Proben pipettiert. Dieser monoklonale Antikörper bindet jedes vorhandene MMP-1 bzw. MMP-13. Nach dem Entfernen von ungebundener Substanzen wird ein monoklonaler Antikörper zugegeben, der spezifisch ist für die pro–Form des jeweiligen Enzyms und damit weder die aktive Form noch die TIMP–gebundene Form dieses Enzyms detektiert. Dieser Antikörper ist an das Enzym Meerettich–Peroxidase gebunden. Nach weiteren Waschschritten, die ungebundene Antikörper–Enzym–Komplexe entfernen, wird eine Substratlösung zugesetzt, welche Wasserstoffperoxid und Farbstoff enthält. Die Farbintensität entwickelt sich proportional zur gebundenen pro–MMP–Menge. Für die photometrische Messung bei 450 nm wird die Farbreaktion abgestoppt. Anhand Standards, welche definierte Mengen an jeweiligem pro–MMP enthalten und die parallel zu den Proben gemessen werden, kann auf die Menge an pro–MMP in den Proben rückgeschlossen werden.

Für die pro–MMP-1 Quantifizierung wurden, wie im Herstellerprotokoll empfohlen, eine Standardreihe im Bereich von 0 bis 10 ng/ml mit vermessen, für pro–MMP-13 Standards im Bereich von 0 bis 5 ng/ml. Wenn Proben außerhalb dieses linearen Meßbereichs lagen, musste die Messung mit entsprechenden Probenverdünnungen wiederholt werden, um korrekte Konzentrationsbestimmungen zu gewährleisten.

Die zur Quantifizierung verwendeten Standardreihen mussten für jede Messung neu aus hochkonzentrierten Stocklösungen verdünnt werden, da die Proteinkonzentration in niedriger konzentrierten Lösungen verfälscht sein kann (z.B. durch unspezifische Adsorption der Proteine an den Kunststoff des Aufbewahrungsgefäßes). Weiterhin wurde auch pures Expansions– und Differenzierungsmedium mit vermessen, um sicherzustellen, dass

weder das enthaltene FCS noch andere Mediumzusätze falsch positive Resultate lieferten.

2.11.2 Histochemische Untersuchungsmethoden

Herstellung histologischer Schnitte

Für alle histochemischen und immunhistologischen Färbungen, die an Kollagengelen durchgeführt wurden, wurden Dünnschnitte dieser Gele angefertigt. Dazu wurden die Zell–besiedelten Kollagengele in Formalin 4% fixiert und über einen Alkoholgradienten entwässert (Ethanol 70% 1x, 80% 1x, 90% 1x, 100% 3x, Xylol 2x für jeweils 2 h). Nach Einbettung in Paraffin (53°C, 3 h) wurden Dünnschnitte angefertigt, die vor den Färbungen hitzebehandelt (37°C/10 h oder 70°C/15 min) und anschließend in Waschgängen entparaffiniert wurden. Zum Waschen wurden die Proben zunächst zweimal für je 5 min in Xylol gebracht, bevor sie eine absteigende Alkoholreihe durchliefen (Ethanol 100% 2x, 96% 2x, 70% 1x für je 5 min).

Hämatoxilin–Eosin Färbung (HE–Färbung)

Die Proben wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Mayers Hämalaun 5 min im Dunkeln inkubiert und anschließend unter fließendes Leitungswasser gehalten (10 min), wodurch die Blaufärbung zustande kam. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Proben 5 min in destilliertes Wasser getaucht, danach folgte die Inkubation mit Eosin 0,5% (5 min im Dunkeln). Die Schnitte wurden erneut mit destilliertem Wasser gewaschen, über einen aufsteigenden Alkoholgradienten entwässert (Ethanol 70% 1x, 96% 1x, 100% 2x, Xylol 2x für je 5 min) und versiegelt (Vitroclud).

Kombinierte Safranin–O/von Kossa Färbung

Die Färbung nach von Kossa ist eine Färbetechnik, bei der Kalzium in Karbonaten und Phosphaten gegen Silberionen ausgetauscht wird, welche anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Somit werden kalziumhaltige Strukturen braunschwarz angefärbt. Mit dieser Färbung konnte überprüft werden, ob die Zellen in den Kollagengelen neues Hydroxyapatit synthetisieren. Das Safranin–O färbt verschiedene Zellstrukturen an und diente als Gegenfärbung.

Dazu wurden die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen und 5 min in Silbernitratlösung inkubiert. Nach dreimaligem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte die

zweiminütige Reduktions–Reaktion mit einer Natriumkarbonat–Formaldehyd–Lösung, während dieser sich die schwarze Färbung entwickelte. Anschließend wurde die Probe 10 min in Leitungswasser gewässert, kurz mit destilliertem Wasser gespült und 8 min in Safranin–O Lösung gefärbt. Danach wurden die Proben mit einem aufsteigenden Alkoholgradienten entwässert (2x 90% Ethanol, 2x 100% Ethanol) und das Präparat mit Vitroclud versiegelt.

Immunhistologische Charakterisierung der Zellen anhand der Epitope der Zellmembran

Der Nachweis bestimmter „stammzell–typischer“ Oberflächenmarker (Tabelle 2.3) auf der Zelle diente zur Charakterisierung der aus dem Knochenmark isolierten MPC und wurde stichprobenartig durchgeführt. Die MPC wurden für den Nachweis der Oberflächenmarker für 24 h auf Objektträgern kultiviert und mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit Methanol absolut fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen. Pro Objektträger wurde ein Bereich als Negativkontrolle (nur Sekundärantikörper + Substrat) und ein Bereich zum eigentlichen Nachweis (Primärantiköper + Sekundärantikörper + Substrat) mit Fettstift umkreist. Dort wurden 150 ml Primärantikörper (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) aufgetragen und 60 min in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS gewaschen. Auf beide Bereiche wurde 150 ml Sekundärantikörper aufgetropft und 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit TBS gewaschen. Um die Oberflächenmarker nachzuweisen, wurde der Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I verwendet. Das Chromogen Konjugat wurde nach Angaben des Herstellers hergestellt, 150 ml davon auf die markierten Stellen gegeben und ca. 20 min unter dem Mikroskop inkubiert, um die Reaktion zu verfolgen. Die positiven Zellen färbten sich rötlich. Anschließend wurde wieder dreimal mit TBS gespült. Bei schlechten Kontrasten wurden die Objektträger 3 min in Methylgrün–Lösung getaucht, anschließend zweimal mit 100%igem Ethanol, zweimal mit 95% igem Ethanol und zuletzt zweimal mit Xylol gewaschen. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und mit Vitroclud unter dem Deckglas konserviert.

2.12 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde mittels einer beheizten Kathode ein Elektronenstrahl erzeugt, der Punkt für Punkt über die Probenoberfläche geführt wurde.

Die von diesen Punkten gestreuten Elektronen wurden von einem Detektor gesammelt und das so entstehende Signal auf einer Bildröhre abgebildet. Die Proben wurden in 2,5% Glutaraldehyd, 0,1 M Phosphatpuffer und 1% Saccharose bei pH 7 für ca. 12 h fixiert und dann dreimal für 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70% und 90% Ethanol für je 30 min, je nach Größe des Konstruktes auch länger) entwässert. Schließlich wurden sie in 100% Ethanol dreimal 30 min eingelegt. Danach erfolgte die kritische–Punkt–Trocknung bei 37°C und 75 bar. Nachdem die Proben getrocknet waren, wurden diese mit einer 20 nm Gold–Palladium–Schicht bedampft um die Probenoberfläche leitfähig zu machen. Die Präparate wurden dann mit einem Elektronenmikroskop betrachtet und dokumentiert.

2.13 Statistik

Für die statistischen Überprüfung des mechanischen Stimulationseffekts und des Effekts durch Differenzierungsmedium wurde der Wilcoxon–Vorzeichen–Rangsummen–Test verwendet, ein nichtparametrisches Verfahren, das für nicht normalverteilte, gepaarte Variablen und kleine Stichproben geeignet ist. Ein nichtparametrisches Verfahren ist bei kleinen Stichproben, wie es in diesen Experimenten der Fall war (n=5 bis n=7) geeigneter: Wird ein parametrisches Verfahren verwendet, obwohl keine Normalverteilung vorhanden ist, sind die erhaltenen Resultate nicht mehr zuverlässig.

2.13.1 Statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen auf RNA–Ebene

Die mittels real–time–RT–PCR ermittelte Expression der ausgewählten Gene wurde immer zuerst auf die Expression des Housekeeping–Gens GAPDH normiert. Um die Genexpression von stimulierten Ansätzen und Kontrollansätzen verschiedener Zeitpunkte und Versuche zu vergleichen, wurde pro Spender der Quotient aus der Genexpression von Stimulation und zugehöriger Kontrolle gebildet. Die Nullhypothese (Annahme, dass kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen besteht), musste hierfür also gleich 1 gesetzt werden, da sich Unterschiede in den zu vergleichenden Gruppen als Abweichungen von 1 ergeben würden. Um mechanische Effekte unter Differenzierungsbedingungen mit mechanischen Effekten unter Expansionsbedingungen vergleichen, wurde pro Spender der Zahlenwert des mechanischen Effekts unter Expansionsbedingungen vom Zahlenwert des mechanischen Effekts unter Differenzierungsbedingungen subtra-

hiert und die Nullhypothese dementsprechend gleich 0 gesetzt. Die Hypothese wurde mit dem Wilcoxon–Vorzeichen–Rangsummen–Test beurteilt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt, d.h. bei einem p–Wert von <0,05 wurde die Nullhypothese abgelehnt. Wurde die für die Durchführung des Wilcoxon–Vorzeichen–Rangsummen–Tests erforderliche Mindestanzahl von fünf Versuchen nicht erreicht, so wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet und die Ergebnisse einzelner Spender als Absolutwerte gezeigt. Bei Versuchen mit fünf oder mehr Spendern wurde zur Darstellung der Ergebnisse der Box–plot gewählt. Im Boxplot ist der Bereich von der 25. bis zur 75. Perzentile als Box (entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Messwerte liegen) mit dem Median als waagrechten Balken dargestellt, die Endpunkte der senkrechten Linien stellen meist die Messwerte von Maximum und Minimum dar, manchmal auch stattdessen das 10. und 90. Perzentil. In dieser Arbeit wurden im Boxplot–Diagramm das Maximum, der Bereich vom 75. Perzentil zum 25. Perzentil, der Median und das Minimum dargestellt.

2.13.2 Auswertung der Genexpressionsanalysen auf Protein–Ebene

Die in den ELISA´s (enzyme-linked immunosorbent assay) in den Zellkulturüberständen gemessenen Konzentrationen an pro–MMP-1 und pro–MMP-13 wurden absolut dargestellt und nicht normiert. Die Normierung der ELISA–Daten ist nur sinnvoll, wenn der zur Normierung verwendete Parameter mit einem ähnlich genauen Verfahren gemessen wird. Am besten hierfür geeignet wäre eine Normierung des gemessenen pro-MMP-Gehalts im Überstand auf den DNA–Gehalt der Zellen oder auf die Zellzahl an diesem Zeitpunkt. Beide Daten waren jedoch, bedingt durch das Versuchsdesign, nicht gleichzeitig erfassbar. Eine Gesamtproteinbestimmung im Überstand wäre nicht geeignet, da einerseits die Messmethode an sich zu ungenau wäre und andererseits das enthaltene bovine FCS im Überstand die Proteinmenge verfälscht.

Alle ELISA–Daten wurden absolut dargestellt und bei Mehrfachmessungen Mittelwert und Standardabweichung mit angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Immunhistologische Charakterisierung der MPC

Vier Spender wurden zu Beginn des Versuchs, d.h. nach ca. 12–14 Tagen Expansion im Monolayer, exemplarisch auf das Vorhandensein einiger typischer Oberflächenmarker getestet, die als charakteristisch für MPC gelten: CD 9, 44, 90, 105, 166 und Stro-1. Die Zellen aller Spender waren zu 100% positiv für die Marker CD 9, 44, 90, 105 und 166 (siehe Abb.3.1). Der Oberflächenmarker Stro-1 war durchschnittlich auf 70% der Zellen exprimiert, was auf eine heterogene MPC–Population hindeutet.

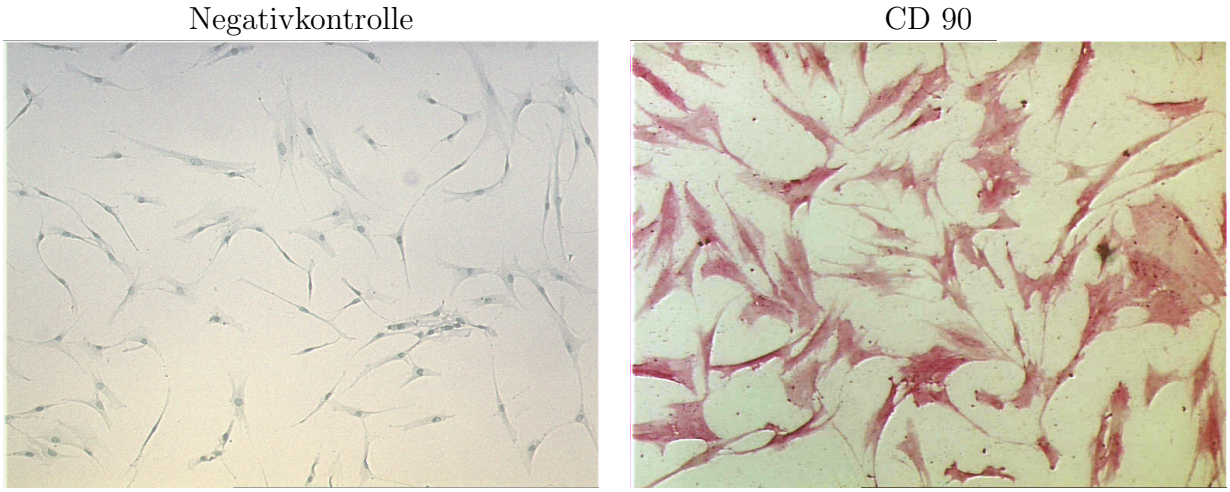


Abbildung 3.1: Immunhistologische Färbung MPC–typischer Oberflächenantigene mit monoklonalen Antikörpern. Links Negativkontrolle, rechts CD9–Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahmen, Vergrößerung 50–fach.

3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronischen Untersuchungen zeigten eine Besiedelung der Kollagenmatrix im Inneren des Kollagengels und auf der Oberfläche. Die Zellen zeigten meist eine

längliche, flache Morphologie. Auf der Oberfläche des Kollagengels war eine dichte, zusammenhängende Zellschicht zu erkennen, während im Inneren die Zelldichte deutlich geringer war (sowohl bei einer Zelldichte von $5x10^5$ Zellen/Gel als auch $1x10^6$ Zellen/Gel). Die Zellen auf der Oberfläche von Kontrollen und mechanisch stimulierten Konstrukten zeigten eine zufällige Orientierung. Ein Unterschied in der Zellmorphologie zwischen Zellen in mechanisch stimulierten Konstrukten und Kontrollen oder zwischen in EM oder DM kultivierten Gelen war nicht zu erkennen (siehe Abb.3.2).

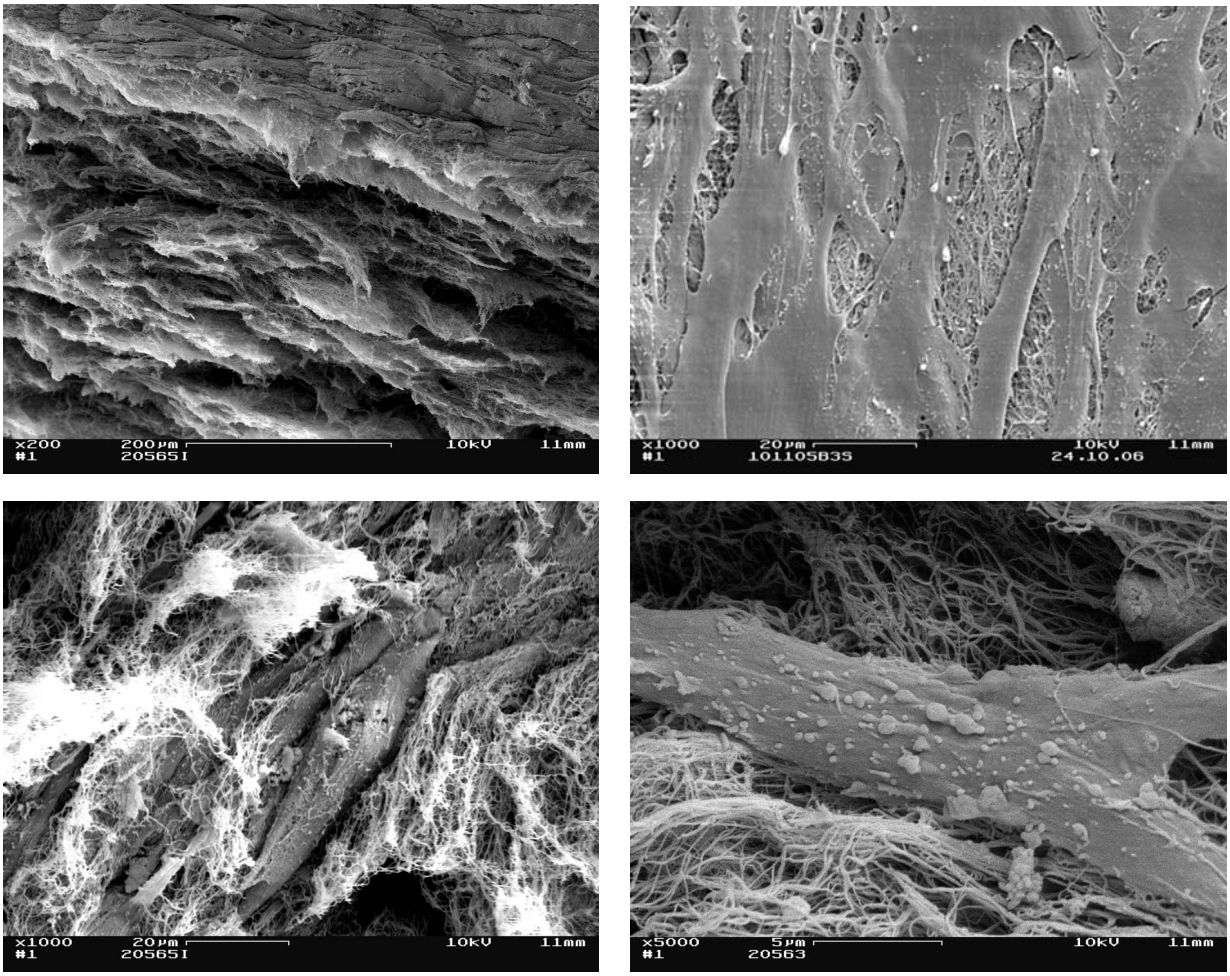


Abbildung 3.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von MPC im Kollagengel nach 21 Tagen Kultivierung in den Vergrößerungen 200–fach bis 5000–fach. Links oben: Aufsicht auf die Oberfläche des Gels (rechte obere Bildhälfte) und ins Innere des Gels (linke untere Bildhälfte). Rechts oben: Aufsicht auf die dicht bewachsene Oberfläche des Gels. Links unten: Ansammlung mehrerer Zellen im lnneren des Kollagengels. Rechts unten: Aufsicht auf die Zelloberfläche einer einzelnen Progenitorzelle

3.3 Kontraktion von Kollagengelen

Die Kultivierung von MPC in Kollagengelen führte bei frei schwimmenden Kontrollen zu einer Kontraktion der Kollagengele und somit zu einem Volumenverlust und einer Verdichtung der Matrix. Diese Schrumpfung fand hauptsächlich im Zeitraum von 3 bis maximal 14 Tage statt und war Spender–abhängig unterschiedlich stark, aber immer in DM stärker als in EM. Die Kollagengele mit einer Zelldichte von $5x10^5$ Zellen/Gel kontrahierten ähnlich wie die Gele mit $1x10^6$ Zellen/Gel. Die Gele für die mechanische Stimulation zeigten, bedingt durch ihre Verankerung, keine Schrumpfung, sondern eine Taillierung an den Rändern, die wahrscheinlich zu multidirektionalen Spannungen im Gel führte. Hier war keine Ausrichtung der Zellen zu beobachten (siehe Abb.3.3).

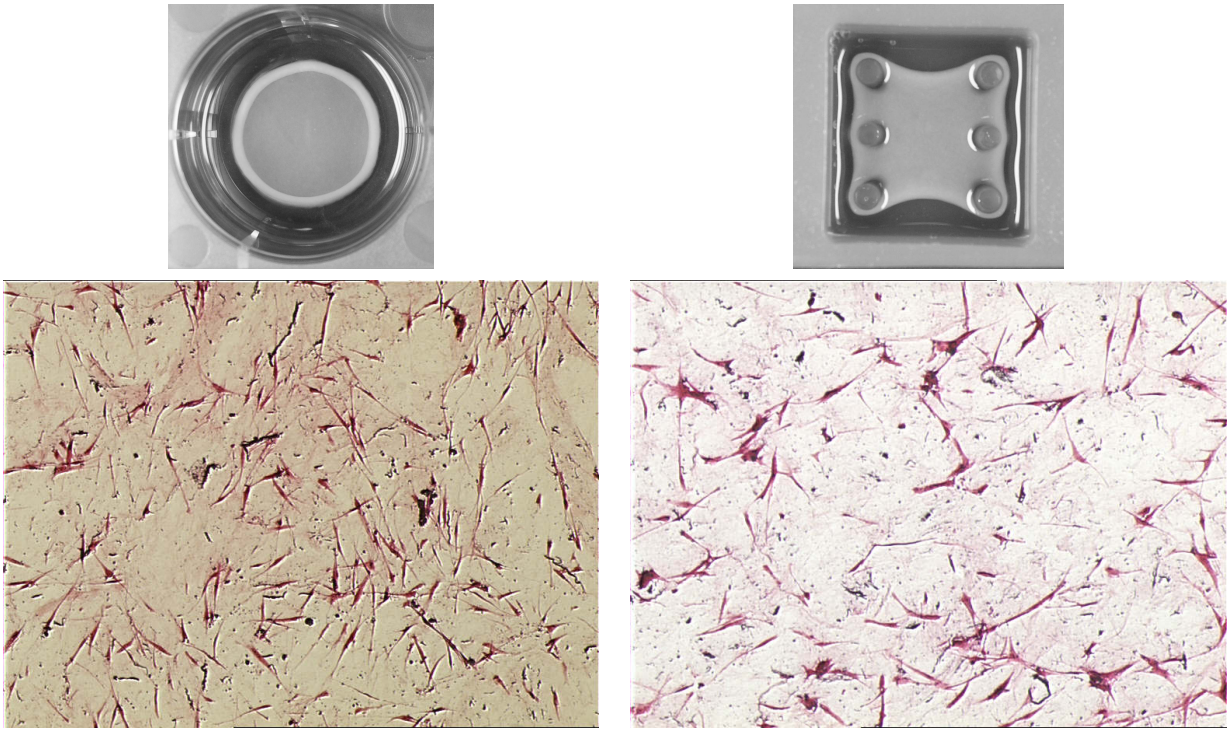


Abbildung 3.3: Einfluss der Gelgeometrie auf Zellmorphologie und –ausrichtung der Zellen. Sowohl frei schwimmende Gele als auch auf Silikonnoppen verankerte Gele kontrahieren und zeigen keine Ausrichtung der Zellen. Vergrößerung der von Kossa–gefärbten Paraffinschnitte 50–fach.

3.4 Differenzierung und mechanische Stimulation im Kollagengel (Versuchsblock A)

In Versuchsblock A wurde untersucht, ob Progenitorzellen, die über 14 Tage in Differenzierungsmedium (DM) im Kollagengel kultiviert wurden, anders auf mechanische Reize reagieren als Progenitorzellen, die 14 Tage in Expansionsmedium (EM) im Kollagengel kultiviert wurden. Dazu wurden Zellen in einer Zelldichte von 4,5x10^5 Zellen/Gel in Kollagengele eingebracht. Nach einer 7–tägigen Kultivierungsphase ohne mechanische Stimulation im jeweiligen Medium wurden die Gele an den folgenden 7 Tagen täglich mechanisch stimuliert. Als Untersuchungszeitpunkte für die Genexpression wurden der Tag 0 (Versuchsbeginn, Zeitpunkt der Aussaat der Zellen in Kollagengele), der Tag 7 (7 Tage Kultivierung im Gel ohne mechanische Stimulation) und der Tag 14 (7 Tage mechanische Stimulation) gewählt (siehe Abb.3.4). Es wurden 7 Versuche mit verschiedenen MPC– Spendern durchgeführt. Die Proteinexpression von pro–MMP-1 und pro–MMP-13 wurde exemplarisch an drei Spendern am Tag 7 und Tag 14 im Zellkultur–Überstand gemessen.

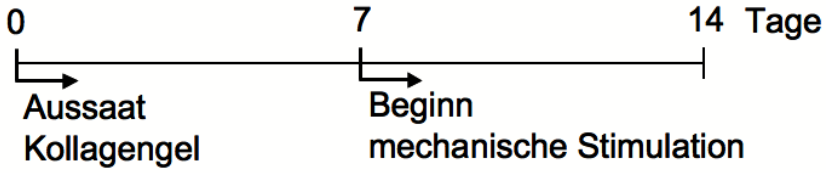


Abbildung 3.4: Übersicht des zeitlichen Versuchsablaufs in Versuchsblock A

3.4.1 Einfluss der Kulturmedien

Genexpression osteogener Marker

Es wurde die Expression der osteogenen Marker Kollagen 1 (Col 1) Runx2, Alkalische Phosphatase (AP), Osteopontin (OP) und Osteokalzin (OC) untersucht (siehe Abb.3.5).

- Kollagen 1 war zu allen Zeitpunkten sehr stark exprimiert (2–fach bis 10–fach von GAPDH). Die Expression von Kollagen 1 veränderte sich über den Zeitverlauf nicht. Unter Differenzierungsbedingungen wurde Kollagen 1 sowohl am Tag 7 wie auch am Tag 14 stärker exprimiert als in EM.

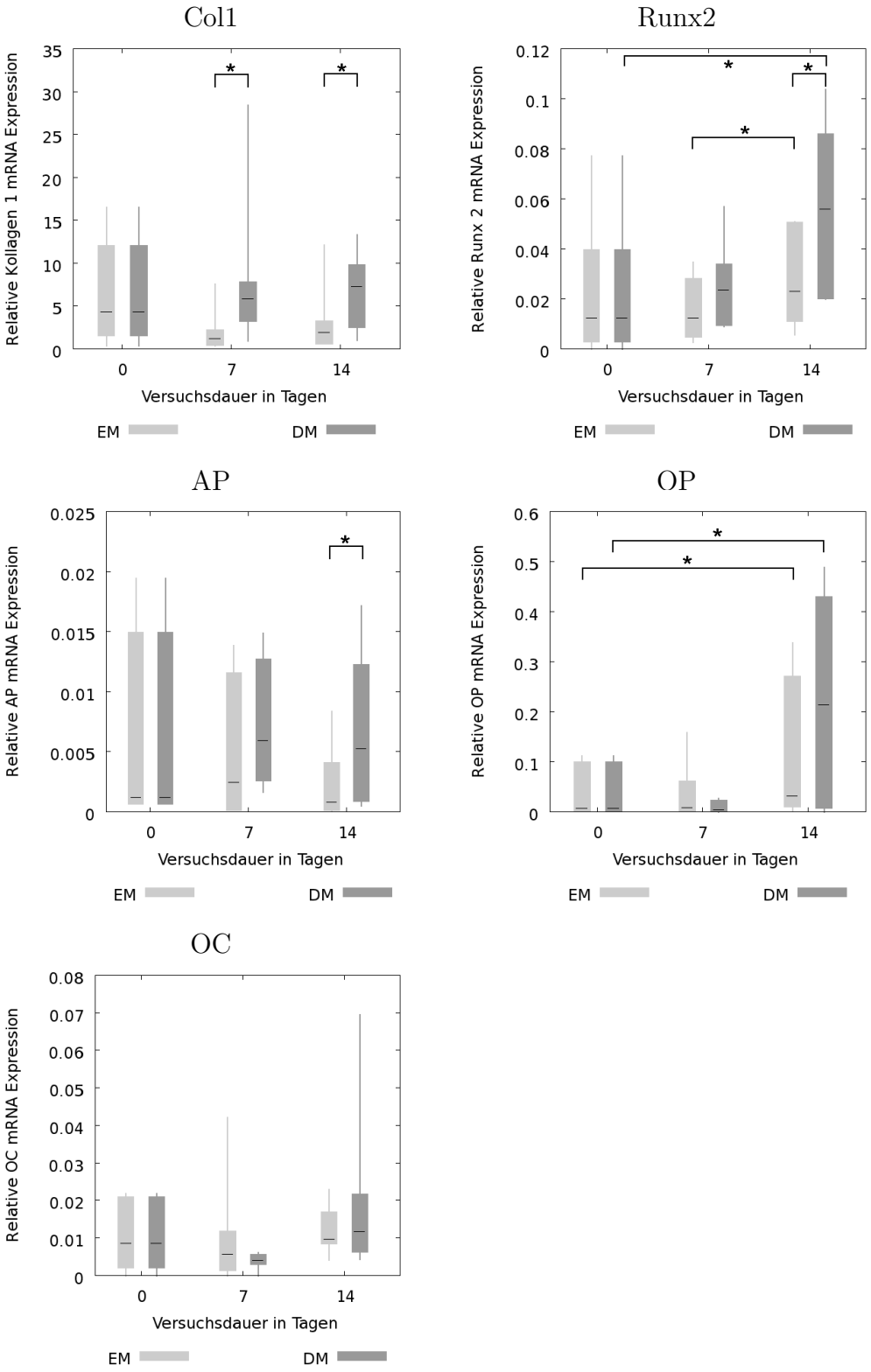


Abbildung 3.5: Einfluss des Kulturmediums auf die relative Genexpression von Kollagen1, Runx2, AP, OP und OC in Boxplotdarstellung, n=7. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. * $p \leq 0{,}05$

- Runx2 war relativ schwach exprimiert und erhöhte sich über die Kultivierungszeit in beiden Medien signifikant. Das Expressionsniveau von Runx2 lag nach 14 Tagen unter Differenzierungsbedingungen signifikant höher als unter Expansionsbedingungen.

- Die Expression von AP war ebenfalls schwach und zeigte in EM nur schwache Veränderungen im Zeitverlauf, während die Expression in Differenzierungsmedium anstieg. Am Tag 14 war das Expressionsniveau von AP unter Differenzierungsbedingungen signifikant höher als unter Expansionsbedingungen.

- Auch OP war schwach exprimiert und erhöhte sich in beiden Medien signifikant erst am Tag 14. Die Genexpressionen in Differenzierungsmedium und Expansionsmedium unterschieden sich nicht voneinander.

- Das geringe Expressionniveau von OC veränderte sich im Zeitverlauf weder in EM noch in DM und die Expressionsniveaus in beiden Medien unterschieden sich nicht.

Genexpression matrixabbauender Proteine

Die Expression der Matrixabbauenden Proteine MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1 und TIMP-2 wurde zu Versuchsbeginn und am Tag 7 und 14 in beiden Medien untersucht (siehe Abb.3.6)

- Die Expression von MMP-1 war zu Versuchsbeginn schwach und erhöhte sich in beiden Medien am Tag 7 und 14 signifikant. Unter Expansionsbedingungen war MMP-1 am Tag 14 signifikant 8–fach stärker exprimiert als unter Differenzierungsbedingungen.

- MMP-2 wurde auf einem hohen Level exprimiert. Die Expression von MMP-2 erhöhte sich in beiden Medien am Tag 14 auf das 4-fache von GAPDH. Das Differenzierungsmedium hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression.

- MMP-3 wurde schwach exprimiert und veränderte sich in beiden Medien über den Zeitverlauf nicht, sank aber am Tag 7 unter Differenzierungsbedingungen stark ab. Tendenziell war MMP-3 in DM schwächer exprimiert als in EM (p=0,062 bzw. p=0,078).

- Die Expression MMP-13 war zu Versuchsbeginn ebenfalls schwach exprimiert, stieg jedoch über die Kultivierungszeit in beiden Medien sehr stark an und war am Tag

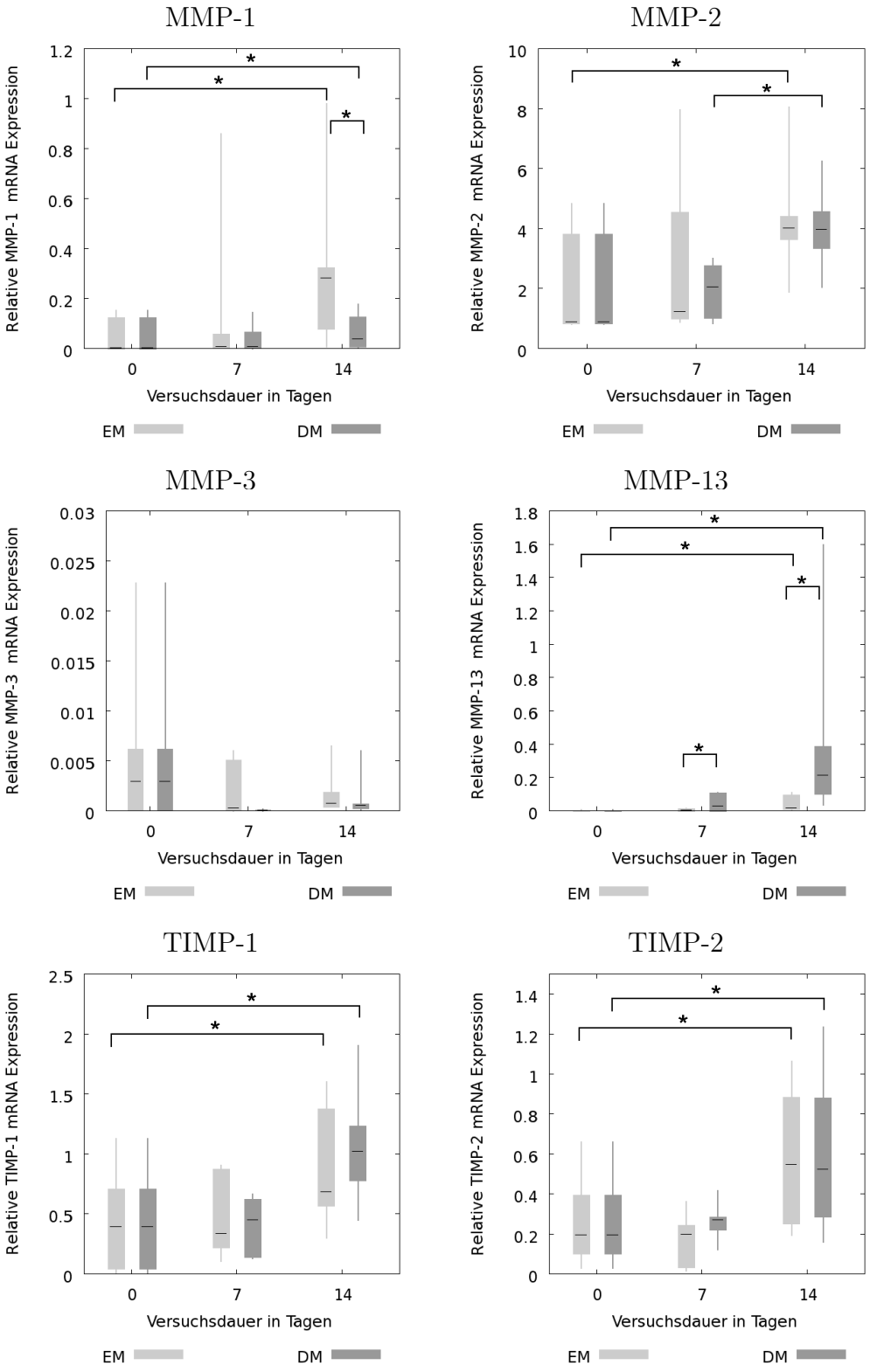


Abbildung 3.6: Einfluss der Kulturmedien auf die relative Genexpression von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1 und TIMP-2 in Boxplotdarstellung, n=7. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. * $p \leq 0{,}05$

14 in beiden Medien signifikant erhöht. MMP-13 war an beiden Zeitpunkten unter Differenzierungsbedingungen signifikant stärker exprimiert als unter Expansionsbedingungen (7–fach am Tag 7 und 12–fach am Tag 14).

- TIMP-1 war relativ stark exprimiert und stieg in beiden Kultivierungsmedien signifikant an. Das Differenzierungsmedium hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression.

- TIMP-2 war etwas schwächer exprimiert als TIMP-1 und stieg ebenfalls in beiden Kulturmedien an. Die Genexpressionen unter Differenzierungsbedingungen und unter Expansionsbedingungen unterschieden sich nicht.

Proteinexpression der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13

An drei Spendern wurde exemplarisch die pro–MMP-1– und pro–MMP-13–Expression an den Tagen 7 und 14 im Zellüberstand gemessen (siehe Tabellen 3.1 und 3.2). Die Konzentrationen an pro–MMP-1 im Überstand variierten stark (von 0 ng/ml bis zu 400 ng/ml Protein), es zeigten sich unterschiedliche Expressionsniveaus von pro–MMP-1 sowohl zwischen den Spendern als auch innerhalb eines Spenders unterschiedliche starke Reaktionen auf die Medien. Bei zwei von drei Spendern zeigte sich wie auf mRNA–Ebene eine höhere Expression unter Expansionsbedingungen als unter Differenzierungsbedingungen. Eine generelle Erhöhung des Expressionslevels von Tag 7 zu Tag 14 wurde auf mRNA–Ebene in beiden Medien gefunden, konnte auf Proteinebene jedoch nur unter Expansionsbedingungen bestätigt werden.

Auch pro–MMP-13 war auf Proteinebene stark exprimiert (5–60ng/ml Protein), hier variierten die Expressionsniveaus von pro–MMP-13 ebenfalls sehr stark zwischen den Spendern und an den verschiedenen Zeitpunkten. Eine höhere Expression unter Differenzierungsbedingungen, wie auf mRNA–Ebene gemessen, konnte auf Proteinebene am Tag 7 bei allen drei Spendern bestätigt werden, wurde am Tag 14 jedoch nur bei zwei von drei Spendern gemessen.

Nachweis von Hydroxylapatit durch von Kossa–Färbung

Ultradünnschnitte von Gelen eines Spenders wurden am Tag 7 und Tag 14 der Kultivierung in Expansions– und Differenzierungsmedium auf Mineralisierung überprüft. Am Tag 7 und am Tag 14 konnte weder unter Expansions– noch unter Differenzierungsbedingungen Mineralisierung nachgewiesen werden.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3
EM	Tag 7	27,84 ± 0,15	0 ± 0,00	15,83 ± 0,04
	Tag 14	52,48 ± 4,31	26,99 ± 1,41	376,95 †
DM	Tag 7	5,72 ± 0,00	2,10 ± 0,01	30,08 ± 0,10
	Tag 14	39,32 ± 10,58	2,33 ± 0,20	20,10 ± 9,47

Tabelle 3.1: Proteinexpression von pro–MMP-1 in ng/ml in drei Spendern am Tag 7 und 14 der Kultur. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Dargestellt sind die Mittelwerte und ± Standardabweichung (MW ± SA) aus 2-6 Messungen. † Einzelmessung

		Spender 1	Spender 2	Spender 3
EM	Tag 7	5,03 ± 0,17	24,36 ± 0,03	13,12 ± 0,00
	Tag 14	6,66 ± 1,08	3,60 ± 0,07	14,45 ± 5,36
DM	Tag 7	5,37 ± 0,01	107,16 ± 0,23	43,03 ± 0,06
	Tag 14	10,00 ± 2,03	57,90 ± 0,25	3,09 ± 1,39

Tabelle 3.2: Proteinexpression von pro–MMP-13 in ng/ml in drei Spendern am Tag 7 und 14 der Kultur. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Dargestellt sind MW ± SA aus 2-6 Messungen.

3.4.2 Einfluss der mechanischen Stimulation

Der Effekt zyklischer mechanischer Dehnung wurde am Tag 14 untersucht (7 Tage Vorkultur, dann 7 Tage mechanische Dehnung, siehe Abb. 3.7 und Abb. 3.8).

Genexpression osteogener Marker

- Kollagen 1 wurde in Expressionsmedium nach mechanischer Stimulation unverändert exprimiert, während sich in unter Differenzierungsbedingungen die Expression durch mechanische Stimulation signifikant erniedrigte.
- Die Expression von Runx2 wurde durch mechanische Stimulation in Expansionsmedium signifikant auf das 1,4-fache, in Differenzierungsmedium tendenziell auf das 1,5-fache erhöht.
- Die Expression von AP erhöht sich nur in DM signifikant auf das 2,3-fache nach

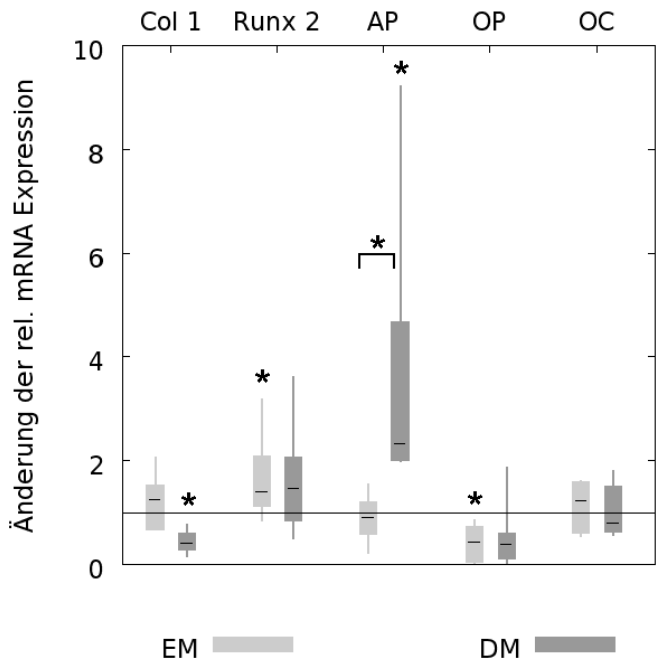


Abbildung 3.7: Einfluss zyklischer Dehnung auf die relative Genexpression von Col 1, Runx2, AP, OP und OC, n = 7. EM = Expansionsmedium, DM = Differenzierungsmedium. Boxplot–Darstellung der Genexpression stimulierter Zell–Kollagen–Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert y=1 repräsentiert unstimulierte Kontrollen. * $p \leq 0{,}05$

mechanischer Stimulation. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Effekten unter Differenzierungsbedingungen und Expansionsbedingungen.

- Die OP–Expression erniedrigte sich durch mechanische Stimulation in EM signifikant und in DM tendenziell auf das 0,4-fache.
- Die OC–Expression veränderte sich nicht durch mechanische Stimulation.

Genexpression matrixabbauender Proteine

- Die MMP-1–Expression erhöhte sich nach mechanischer Stimulation nur in Differenzierungsmedium signifikant um das 3,4-fache, aber nicht in Expansionsmedium. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Effekten unter Differenzierungsbedingungen und Expansionsbedingungen.
- MMP-2 reagierte auf mechanische Stimulation nur in Expressionsmedium mit einer schwachen, aber signifikanten Erniedrigung der Expression auf das 0,9-fache.

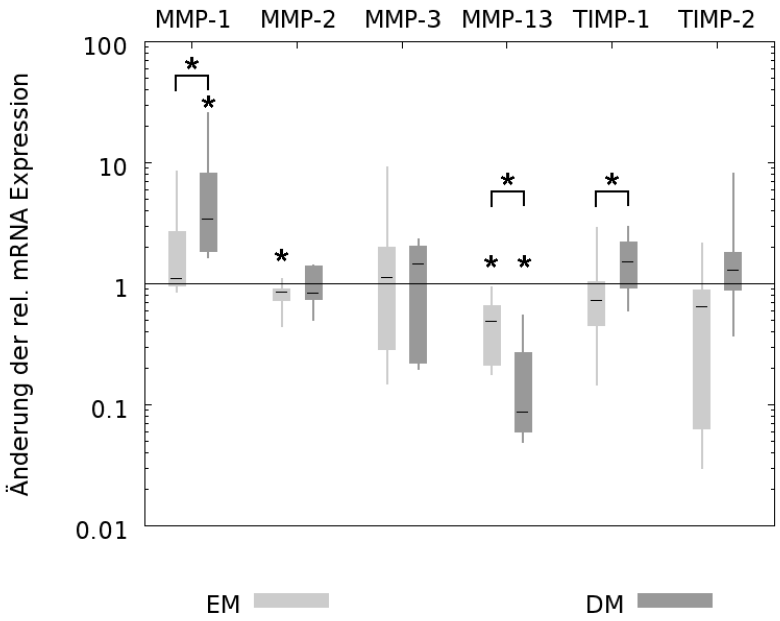


Abbildung 3.8: Einfluss zyklischer Dehnung auf die relative Genexpression von MMP-1, -2, -3, -13, TIMP-1 und TIMP-2, n=7. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Logarithmische Boxplot–Darstellung der Genexpression stimulierter Zell–Kollagen–Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert y=1 repräsentiert unstimulierte Kontrollen. * $p \leq 0{,}05$

- Die MMP-3–Expression blieb in beiden Medien von der mechanischen Stimulation unbeeinflusst.

- Die Expression von MMP-13 wurde durch die mechanische Stimulation in EM auf das 0,5-fache, in DM sogar auf das 0,1-fache erniedrigt. Hier war der Effekt in Differenzierungsmedium signifikant stärker als der Effekt unter Expansionsmedium.

- Die TIMP-1–Expression wurde unter Expansionsmedium tendenziell erniedrigt, unter Differenzierungsmedium tendenziell erhöht, so dass sich ein signifikanter Unterschied in den Effekten unter Differenzierungsbedingungen und Expansionsbedingungen zeigte.

- Den gleichen Trend zeigte auch TIMP-2, hier war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Expansions– und Differenzierungsbedingungen festzustellen.

Proteinexpression der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13

Die pro–MMP-1–Expression stieg nach mechanischer Stimulation in allen drei untersuchten Spendern in DM an (siehe Tabelle 3.3). Dieser Anstieg nach mechanischer Stimulation wurde auch auf mRNA–Ebene beobachtet. In Expansionsmedium stieg die pro–MMP-1–Expression in zwei von drei Spendern an. Wie bereits auf mRNA–Ebene beobachtet, variierten die mechanisch induzierten Effekte stark von Spender zu Spender (1,1-facher Anstieg bis 121-facher Anstieg).

Der Effekt der mechanischen Stimulation auf die pro–MMP-13–Expression stimmte teilweise mit dem Effekt auf mRNA–Ebene überein: Die pro–MMP-13–Expression erniedrigte sich in EM und DM in zwei von drei Spendern nach mechanischer Stimulation, ein Spender zeigte in beiden Medien keine Reaktion nach mechanischer Stimulation (siehe Tabelle 3.4). Auf mRNA–Ebene zeigten alle Spender in beiden Medien eine Erniedrigung der Expression nach mechanischer Stimulation.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3
EM	Kontrolle	52,48 ± 4,31	26,99 ± 1,43	376,95 †
	Stimulation	87,78 ± 25,52	26,04 ± 0,57	413,37 †
	S/K	**1,67**	**0,96**	**1,23**
DM	Kontrolle	39,32 ± 10,58	2,33 ± 0,20	20,10 ± 9,48
	Stimulation	73,88 ± 7,76	261,38 ± 64,10	113,85 †
	S/K	**1,88**	**112,18**	**5,67**

Tabelle 3.3: Proteinexpression von pro–MMP-1 in ng/ml nach mechanischer Stimulation bei drei Spendern am Tag 14 der Kultur (Tag 7 der mechanischen Stimulation). EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Dargestellt sind die MW ± SA aus 2-6 Messungen. † Einzelmessung

		Spender 1	Spender 2	Spender 3
EM	Kontrolle	6,66 ± 1,0	3,60 ± 0,06	14,45 ± 5,36
	Stimulation	5,30 ± 0,34	2,32 ± 0,12	14,51 ± 0,88
	S/K	**0,80**	**0,64**	**1,00**
DM	Kontrolle	10,00 ± 2,03	57,90 ± 0,25	3,09 ± 1,39
	Stimulation	1,37 ± 0,08	32,33 ± 17,94	9,95 ± 3,76
	S/K	**0,14**	**0,56**	**3,22**

Tabelle 3.4: Proteinexpression von pro–MMP-13 in ng/ml nach mechanischer Stimulation bei drei Spendern am Tag 14 der Kultur (Tag 7 der mechanischen Stimulation). EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Dargestellt sind die MW ± SA aus 2-6 Messungen.

3.4.3 Zusammenfassung

Unter Differenzierungsbedingungen erhöhte sich die Expression von Runx2 und AP, die sehr früh in der osteogenen Differenzierung exprimiert werden, während OC, ein Marker, der erst in der Mineralisierungsphase exprimiert wird, nicht durch Differenzierungsmedium induziert wurde. Da unter Differenzierungsbedingungen keine Mineralisierung nach 14 Tagen nachzuweisen war, befanden sich die Zellen wahrscheinlich in einem sehr frühen Differenzierungsstadium.

Der Effekt der mechanischen Stimulation war abhängig vom Differerenzierungsstatus der Zellen, v.a. die Kollagenasen MMP-1 und MMP-13 reagierten unter Differenzierungsbedingungen stärker auf den mechanischen Reiz als unter Expansionsbedingungen.

3.5 Vordifferenzierung im Monolayer, mechanische Stimulation im Kollagengel (Versuchsblock B)

In diesem Versuchsblock wurden MPC 12 Tage im Monolayer in EM und DM vorkultiviert, ebenfalls mit dem Ziel, unterschiedlich weit differenzierte Zellen auf ihre Mechanosensitivität untersuchen zu können. Die Genexpression der untersuchten Marker wurde zu Versuchsbeginn vor dem Beginn der Differenzierung (Tag -12), nach 12 Tagen Kultivierung im Monolayer in EM oder DM vor der Aussaat ins Kollagengel (Tag 0), sowie am Tag 7 und Tag 14 nach der Aussaat ins Kollagengel sowohl in EM als auch in DM bei

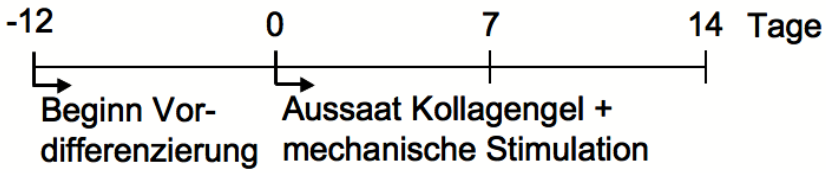


Abbildung 3.9: Übersicht des zeitlichen Versuchsablaufs in Versuchsblock B

7 verschiedenen Spendern untersucht (siehe Abb.3.9. Die Zellen wurden mit derselben Zelldichte wie in Versuchsblock A (4,5x10^5 Zellen/Gel) in das Kollagengel eingebracht. Die Expression von pro–MMP-1 wurde bei fünf verschiedenen Spendern am Tag 7 und 14 nach Aussaat ins Kollagengel gemessen.

3.5.1 Einfluss der Kulturmedien

Genexpression osteogener Marker

Untersucht wurde die Expression der Gene Col 1, Runx2, AP, OP und OC (siehe Abb. 3.10).

- Col 1 war sehr stark exprimiert und veränderte sich in der Monolayerkultur in beiden Medien nicht. In der weiteren Kultivierungszeit im Kollagengel sank die Col 1–Expression aber im Vergleich zu Monolayerkultur signifikant ab. Unter Differenzierungsbedingungen wurde Col 1 am Tag 7 signifikant stärker exprimiert als unter Expansionsbedingungen.

- Runx2 war relativ schwach exprimiert und veränderte sich nach 12 Tage Monolayerkultur in EM nicht, während die Expression unter Differenzierungsbedingungen im Monolayer leicht anstieg. Damit war nach 12 Tagen Monolayerkultivierung Runx 2 unter Differenzierungsbedingungen signifikant stärker exprimiert als unter Expansionsbedingungen. Über die Kultivierungszeit im Kollagengel stieg in beiden Medien die Runx2–Expression in beiden Medien signikfikant an. Dieser Anstieg war unter Differenzierungsbedingungen wesentlich stärker als unter Expansionsbedingungen und somit war nach 14 Tagen im Kollagengel Runx2 unter Differenzierungsbedingungen signifikant stärker exprimiert als unter Expansionsbedingungen.

- AP war zu Versuchsbeginn sehr schwach exprimiert und veränderte sich nach 12 Tagen in EM im Monolayer nicht, während in DM ein tendenzieller Anstieg statt-

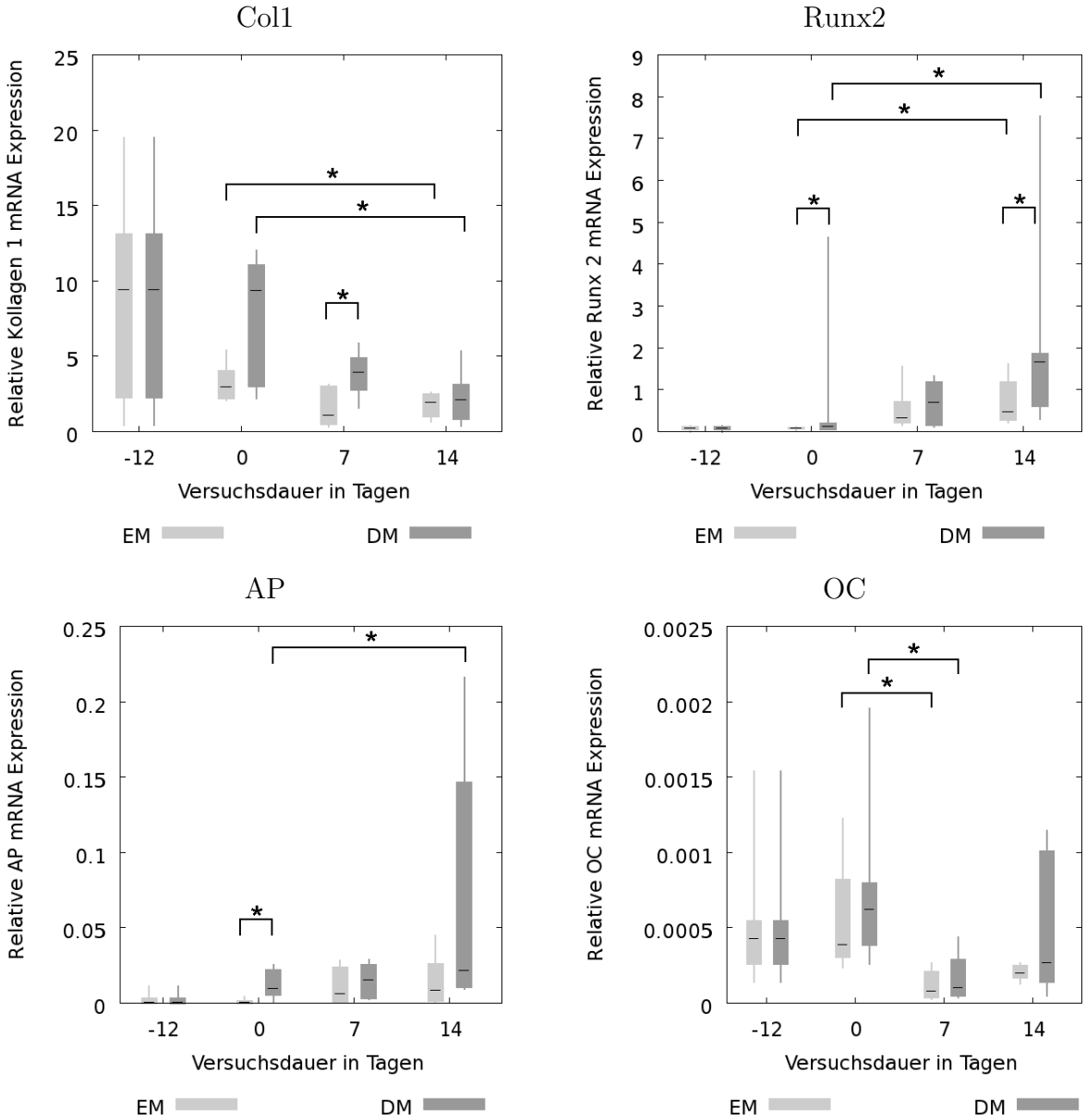


Abbildung 3.10: Einfluss der Kulturmedien auf die relative Genexpression von Col 1, Runx2, AP und OC in Boxplot–Darstellung, n=7. Am Tag 0 wurden die Zellen in das Kollagengel ausgesät. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. * $p \leq 0{,}05$

fand. Im Kollagengel stieg vor allem am Tag 14 das Expressionsniveau in DM stark an.

- Die Expression von OP war schwach und es zeigten sich Nebenprodukte in der real–time–PCR, so dass die real–time–PCR Ergebnisse nicht auswertbar waren.

- Die Expression von OC war ebenfalls schwach. Die Expression in beiden Medien veränderte sich im Monolayer über 12 Tage nicht. Im Kollagengel sank das Genexpressionsniveau im Vergleich zur Monolayer–Expression im Monolayer zuerst signifikant ab und erhöhte sich dann in beiden Medien wieder. Die Expressionsniveaus in EM und DM unterschieden sich nicht.

Genexpression matrixabbauender Proteine

Es wurde die Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1 und TIMP-2 untersucht (siehe Abb.3.11).

- MMP-1 wurde zu Versuchsbeginn schwach exprimiert und erhöhte sich in der Monolayerkultur tendenziell in Expansionsmedium. Im Kollagengel erhöhte sich die Expression auch unter Differenzierungsbedingungen. Die Expressionsniveau in beiden Medien unterschieden sich nicht.

- Die MMP-2–Expression war stark und veränderte sich in Monolayerkultur in beiden Medien nicht. Im Kollagengel sank sie in beiden Medien am Tag 7 signifikant ab und stieg am Tag 14 wieder an. Die Expression unter Differenzierungs– und Expansionsbedingungen war an allen Zeitpunkten ähnlich.

- MMP-3 war schwach exprimiert, die Genexpression verlief ähnlich der MMP-2–Expression. Während sie in beiden Medien im Monolayer unverändert blieb, sank das Expressionsniveau im Kollagengel in beiden Medien signifikant ab und stieg am Tag 14 wieder an. Die Expression unter Differenzierungs– und Expansionsbedingungen war an allen Zeitpunkten ähnlich.

- Die MMP-13 Genexpression war zu Versuchsbeginn sehr schwach und veränderte sich im Monolayer nicht. Mit der Kultivierung im Kollagengel erhöhte sich die Expression in beiden Medien am Tag 7 und am Tag 14 signifikant, wobei der Anstieg unter Differenzierungsbedingungen wesentlich höher war als unter Expansionsbedingungen.

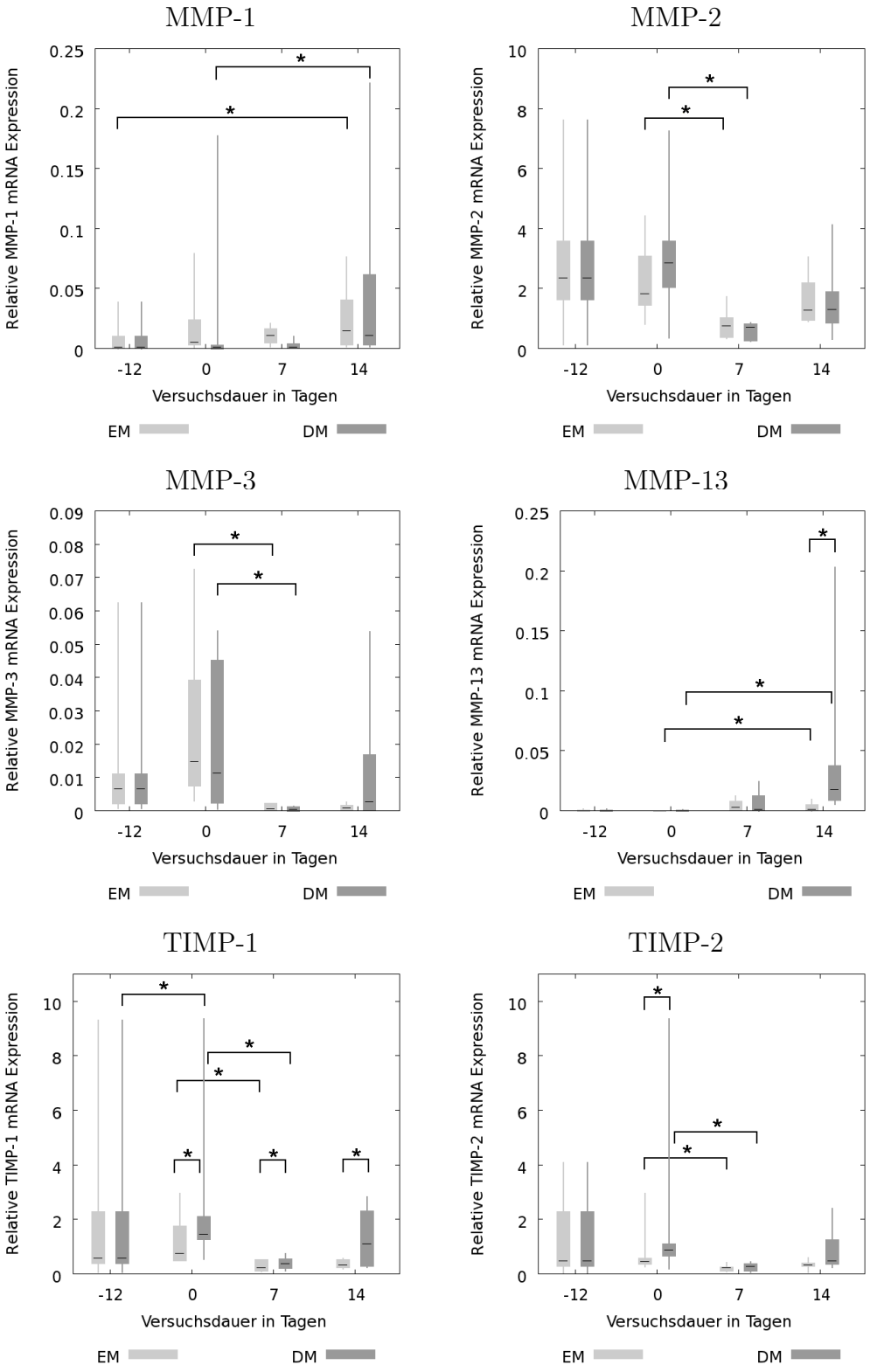


Abbildung 3.11: Einfluss der Kulturmedien auf die Relative Genexpression von MMP-1, -2, -3, -13, TIMP-1 und TIMP-2 in Boxplot–Darstellung, n=7. Am Tag 0 wurden die Zellen in das Kollagengel ausgesät. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. * $p \leq 0{,}05$

- TIMP-1 war relativ stark exprimiert und stieg während der Kultivierung im Monolayer nur in Differenzierungsmedium an. Durch die Kultivierung im Kollagengel sank die Expression am Tag 7 in beiden Medien signifikant ab und stieg am Tag 14 in beiden Medien wieder an (p=0,047 in EM und p=0,094 in DM). An allen untersuchten Zeitpunkten lag die Expression unter Differenzierungsbedingungen höher als unter Expansionsbedingungen.

- Das Expressionsniveau von TIMP-2 verhielt sich ähnlich zu TIMP-1 und stieg während der Kultivierung im Monolayer nur in Differenzierungsmedium an. Am Tag 7 im Kollagengel sank in beiden Medien das Expressionsniveau signifikant ab. Im Gegensatz zu TIMP-1 war TIMP-2 nur am Tag 0 unter Differenzierungsbedingungen stärker exprimiert als unter Expansionsbedingungen.

Proteinexpression der Kollagenase MMP-1

Die Expression von MMP-1 wurde am Tag 7 und 14 (nur im Kollagengel) überprüft (siehe Tabelle 3.5). Die Expression variierte in einem großen Bereich von 0,16 ng/ml Protein bis 62 ng/ml Protein, abhängig von Kulturmedium und Spender. Der tendenzielle Anstieg von MMP-1 von Tag 7 zu Tag 14 in DM, der auf mRNA–Ebene beobachtet wurde, ließ sich auf Proteinebene nicht bestätigen.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4	Spender 5
EM	Tag 7	7,21 ± 0,39	1,83 ± 0,11	5,05 ± 0,17	4,67 ± 0,04	11,25 ± 0,02
	Tag 14	9,25 ± 0,12	1,15 ± 0,05	6,47 ± 0,10	3,36 ± 0,00	8,08 ± 0,07
DM	Tag 7	0,22 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,76 ± 0,02	9,89 ± 0,02	61,94 ± 0,19
	Tag 14	2,88 ± 0,23	8,31 ± 0,09	3,42 ± 0,04	9,48 ± 0,01	55,95 ± 0,13

Tabelle 3.5: Proteinexpression von pro–MMP-1 in ng/ml in fünf Spendern am Tag 7 und 14. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Dargestellt sind die MW ± SA, n=2.

Nachweis von Hydroxylapatit durch von Kossa–Färbung

Zwei Spender wurden am Tag 7 und 14 der Kultivierung im Kollagengel in beiden Medien auf Mineralisierung überprüft. Am Tag 7 und Tag 14 war weder unter Expansions– noch unter Differenzierungsbedingungen Mineralisierung nachzuweisen.

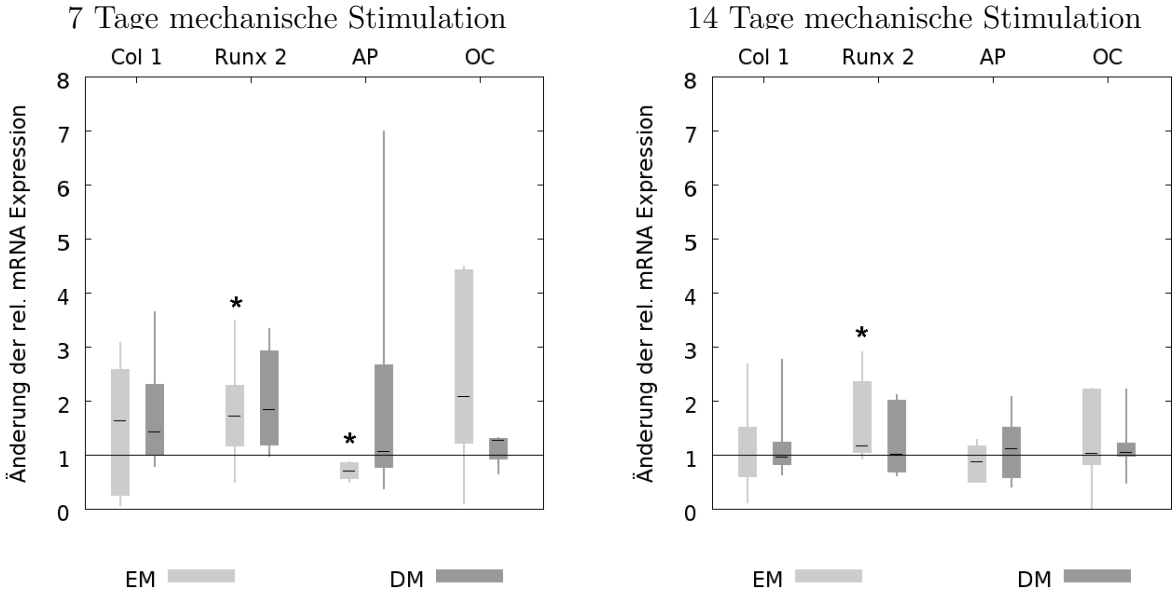


Abbildung 3.12: Einfluss zyklischer Dehnung auf die relative Genexpression von Col 1, Runx2, AP und OC nach 7 Tagen (Tag 14 der Kultur, links) und 14 Tagen (Tag 21 der Kultur, rechts) mechanischer Stimulation. EM=Expansionsmedium, DM = Differenzierungsmedium. Boxplot–Darstellung der Genexpressionen stimulierter Zell–Kollagen–Konstrukte, bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert y=1 repräsentiert unstimulierte Kontrollen. n=7. * $p \leq 0{,}05$

3.5.2 Einfluss der mechanischen Stimulation

Der Effekt zyklischer mechanischer Dehnung wurde an zwei Zeitpunkten untersucht: Am Tag 7 im Kollagengel (12 Tage Monolayerkultur plus 7 Tage Kultivierung mit mechanischer Stimulation im Kollagengel) und am Tag 14 im Kollagengel (12 Tage Monolayerkultur plus 14 Tage Kultivierung mit mechanischer Stimulation im Kollagengel).

Genexpression osteogener Marker

- Die Expression von Runx2 erhöhte sich aufgrund mechanischer Stimulation sowohl am Tag 7 als auch Tag 14 signifikant in Expansionskultur. Unter Differenzierungsbedingungen stieg die Expression durch mechanische Stimulation am Tag 7 tendenziell an, nicht jedoch am Tag 14 (Abb. 3.12).

- Die Expression von AP erniedrigte sich am Tag 7 unter Expansionsbedingungen durch mechanische Stimulation um 30%, während unter Differenzierungsbedingungen kein Effekt durch mechanische Stimulation zu beobachten war. Am Tag 14

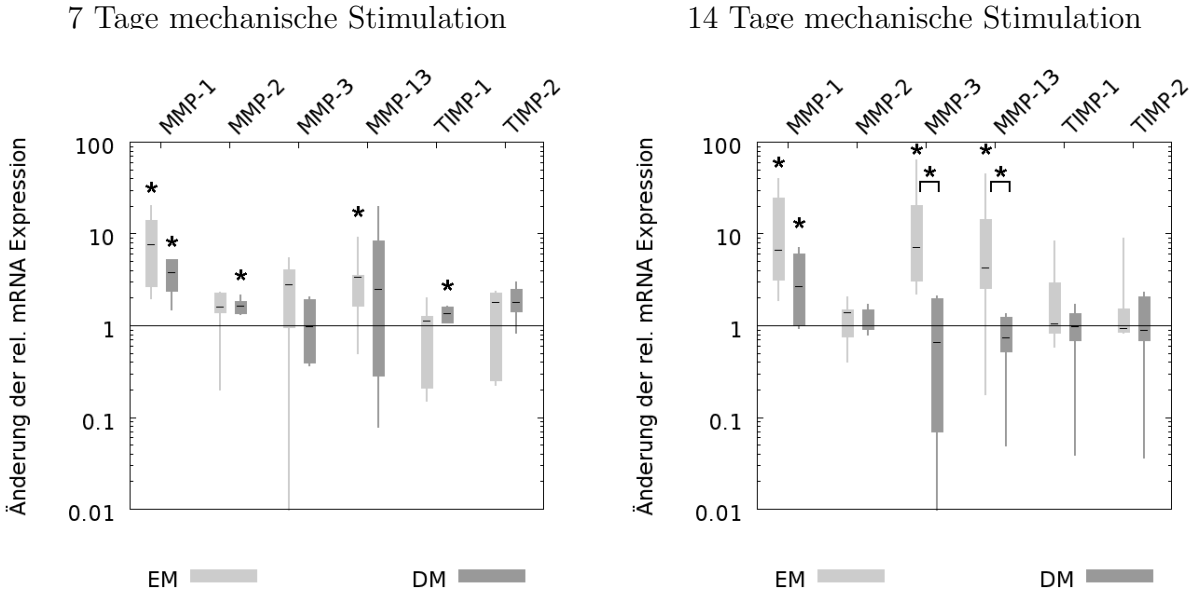


Abbildung 3.13: Einfluss zyklischer Dehnung auf die relative Genexpression von MMP-1, -2, -3, -13, TIMP-1 und TIMP-2 nach 7 Tagen (Tag 14 der Kultur, links) und 14 Tagen (Tag 21 der Kultur, rechts) mechanischer Stimulation. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Logarithmische Boxplot–Darstellung der Genexpressionen stimulierter Zell–Kollagen–Konstrukte, bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert y=1 repräsentiert unstimulierte Kontrollen. n=7. * $p \leq 0{,}05$

zeigte die mechanische Stimulation keinen Effekt in beiden Medien.

- Die Expression von Col 1 und OC war in beiden Medien weder am Tag 7 noch am Tag 14 von der mechanischen Stimulation beeinflusst.

Genexpression matrixabbauender Proteine

- Die Expression von MMP-1 erhöhte sich aufgrund mechanischer Stimulation signifikant sowohl am Tag 7 wie auch am Tag 14 in beiden Medien (siehe Abb. 3.13).

- Die Expression von MMP-2 erhöhte sich am Tag 7 nach mechanischer Stimulation signifikant nur unter Differenzierungsbedingungen. Am Tag 14 war die Expression von MMP-2 in beiden Medien nicht von der mechanischen Stimulation beeinflusst.

- Die Expression von MMP-3 veränderte sich am Tag 7 in beiden Medien nicht. Am Tag 14 erhöhte sich die Expression von MMP-3 in Expansionsmedium. Somit

unterschied sich die Reaktion auf den mechanischen Reiz am Tag 14 unter Expansionsbedingungen und Differenzierungsbedingungen signifikant voneinander.

- Die Expression von MMP-13 zeigte eine ähnliche Reaktion auf den mechanischen Reiz wie MMP-3. Am Tag 7 war MMP-13 nach mechanischer Stimulation nur in EM erhöht. Am Tag 14 war die MMP-13–Expression ebenfalls nur in EM signifikant erhöht, während sie in DM unbeeinflusst blieb. Somit unterschieden sich die Reaktionen auf den mechanischen Reiz am Tag 14 in EM und DM signifikant voneinander.

- Die Expression von TIMP-1 erhöhte sich am Tag 7 nach mechanischer Stimulation unter Differenzierungsbedingungen, jedoch nicht unter Expansionsbedingungen. Am Tag 14 hatte die mechanische Stimulation keinen Einfluss in beiden Medien.

- Die Expression von TIMP-2 erhöhte sich am Tag 7 nach mechanischer Stimulation unter Differenzierungsbedingungen tendenziell (p=0,062) während die Expression in Expressionsmedium unbeeinflusst blieb. Am Tag 14 hatte die mechanische Stimulation keinen Einfluss in beiden Medien.

Proteinexpression der Kollagenase MMP-1

Die Expression von pro–MMP-1 erhöht sich nach mechanischer Stimulation in EM in allen Spendern am Tag 7 und 14 (2,9-fache bzw. 5,4-fache Erhöhung) und zeigt damit die gleiche Tendenz wie auf mRNA–Ebene (siehe Tabellen 3.6 und 3.7). In DM war sowohl am Tag 7 wie auch am Tag 14 auf Proteinebene keine signifikante Veränderung zu beobachten, während auf mRNA–Ebene die Expression an beiden Zeitpunkten durch mechanische Stimulation anstieg.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4	Spender 5
EM	K	7,21 ± 0,39	1,83 ± 0,11	5,05 ± 0,17	4,67 ± 0,04	11,25 ± 0,02
	S	21,16 ± 0,04	5,36 ± 0,04	20,71 ± 0,01	9,35 ± 0,02	25,28 ± 0,05
	S/K	**2,94**	**2,93**	**4,10**	**2,00**	**2,25**
DM	K	0,22 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,76 ± 0,02	9,89 ± 0,02	61,94 ± 0,19
	S	0,71 ± 0,14	0,56 ± 0,00	0,83 ± 0,03	12,47 ± 0,07	13,12 ± 0,12
	S/K	**3,23**	**3,50**	**1,09**	**1,26**	**0,21**

Tabelle 3.6: Proteinexpression von pro–MMP-1 in ng/ml bei fünf Spendern nach 7 Tagen mechanischer Stimulation. K=Kontrolle, S=Stimulation, EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Alle Werte sind Doppelmessungen.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4	Spender 5
EM	K	9,25 ± 0,12	1,15 ± 0,05	6,47 ± 0,10	3,36 ± 0,00	8,08 ± 0,07
	S	49,74 ± 0,02	8,90 ± 0,69	20,19 ± 0,04	12,07 ± 0,13	71,55 ± 0,06
	S/K	**5,38**	**7,74**	**3,12**	**8,86**	**2,25**
DM	K	2,88 ± 0,23	8,31 ± 0,10	3,42 ± 0,04	9,48 ± 0,01	55,95 ± 0,13
	S	2,54 ± 0,04	5,38 ± 0,48	7,96 ± 0,46	3,01 ± 0,01	91,38 ± 0,05
	S/K	**0,88**	**0,65**	**2,33**	**0,32**	**1,63**

Tabelle 3.7: Proteinexpression von pro–MMP-1 in ng/ml nach 14 Tagen mechanischer Stimulation bei fünf Spendern. am Tag. K=Kontrolle, S=Stimulation, EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Alle Werte sind Doppelmessungen.

3.5.3 Zusammenfassung

Die 12–tägige Vordifferenzierung der Zellen im Monolayer erhöhte die Expression von Runx2, AP und TIMP-1 und TIMP-2, während die Expression anderer untersuchter Marker nicht beeinflusst wurde. Einen stärkeren Einfluss auf die Genexpression hatte der Übergang von der Monolayer– in die 3D–Kultur (Erhöhung von Runx2, AP und Absinken von MMP-2, -3, TIMP-1 und TIMP-2). Die Reaktion auf die mechanische Stimulation war bezüglich der osteogenen Marker ähnlich wie in Versuchsblock A, jedoch reagierten einige matrixabbauende Enzyme wie MMP-3 und -13 anders auf durch mechanischen Stimulation. Die Zellen befinden sich wahrscheinlich in einem frühen Differenzierungszustand, da zu Versuchsende unter Differenzierungsbedingungen keine Mineralisierung nachgewiesen werden konnte.

3.6 Differenzierung und mechanische Stimulation im Kollagengel bei doppelter Zellkonzentration (Versuchsblock C)

3.6.1 Vorversuch: Differenzierung von MPC in verschiedenen Zellkonzentrationen

In diesem Vorversuch sollte untersucht werden, inwiefern die Zelldichte die Expression ausgewählter osteogener Marker und Matrixmetalloproteinasen beeinflusst. Dazu wurden die Zellen eines Spenders parallel in den Zelldichten $5x10^5$ Zellen/Gel, $1x10^6$ Zellen/Gel und $2x10^6$ Zellen/Gel über drei Wochen sowohl in EM als auch in DM kultiviert.

Als Untersuchungszeitpunkte wurden folgende Zeitpunkte gewählt: Tag 0 (Versuchsbeginn, vor Ausaat der Zellen in Kollagengele), Tag 7, Tag 14 und Tag 21 nach Aussaat im Kollagengel. Am Tag 21 wurden zu allen drei Zellkonzentrationen in EM und DM von Kossa–Färbungen an Ultradünnschnitten angefertigt, um den Einfluß der Zelldichte auf die Mineralisierung zu untersuchen. Es wurde die Expression von Runx2, OC, MMP-1 und MMP-13 untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt).

- Bei allen Zellkonzentrationen stieg die Runx2 Expression im Vergleich zum Versuchsbeginn in der 3D–Kultivierung stark an. Bei einer Zellkonzentration von $5x10^5$ Zellen/Gel wurde ein kontinuierlicher Anstieg von Runx2 in DM gemessen, bei einer Konzentration von $1x10^6$ Zellen/Gel und $2x10^6$ Zellen/Gel wurde die höchste Expression am Tag 7 gemessen. Bei einer Zelldichte von $5x10^5$ Zellen/Gel und $1x10^6$ Zellen/Gel war Runx2 unter Differenzierungsbedingungen stärker exprimiert als unter Expansionsbedingungen, in der höchsten Zellkonzentration mit $2x10^6$ Zellen/Gel nur am Tag 7. Bei dieser Konzentration hatte das Differenzierungsmedium am Tag 14 und Tag 21 keinen Einfluss auf die Runx2–Expression.

- OC war schwach exprimiert und die Unterschiede in der Genexpression unter Expansionsbedingungen und Differenzierungsbedingungen in allen Zelldichten zu allen Zeitpunkten sehr gering.

- MMP-1 war bei allen Zellkonzentrationen ähnlich exprimiert und zu allen Zeitpunkten unter Expansionsbedingungen stärker exprimiert als unter Differenzierungsbedingungen.

- Die MMP-13–Expression war bei allen Zellkonzentrationen zu allen Zeitpunkten unter Differenzierungsbedingungen höher als unter Expansionsbedingungen. Auffallend waren die starken Expressionssteigerungen im Kollagengel in Differenzierungsmedium bei allen Zelldichten. Unter Expansionsbedingungen veränderte sich die Expression von MMP-13 bei allen Zelldichten nur schwach.

Von je einem Kollagengel pro Zellkonzentration und Medium wurde am Tag 21 ein Ultradünnschnitt angefertigt und von Kossa gefärbt, um die Mineralisierung in den Kollagengelen zu untersuchen. Unter Expansionsbedingungen zeigten alle drei Zellkonzentrationen keine Mineralisierung. Eine Mineralisierung war nur unter Differenzierungsbedingungen und nur bei den höheren Zelldichten $1x10^6$ Zellen/Gel und $2x10^6$ Zellen/Gel nachzuweisen, erkennbar an den schwarzen gefärbten Bereichen (siehe Abb. 3.14). Dabei zeigte sich in der Konzentration von $2x10^6$ Zellen/Gel eine wesentlich stärkere und

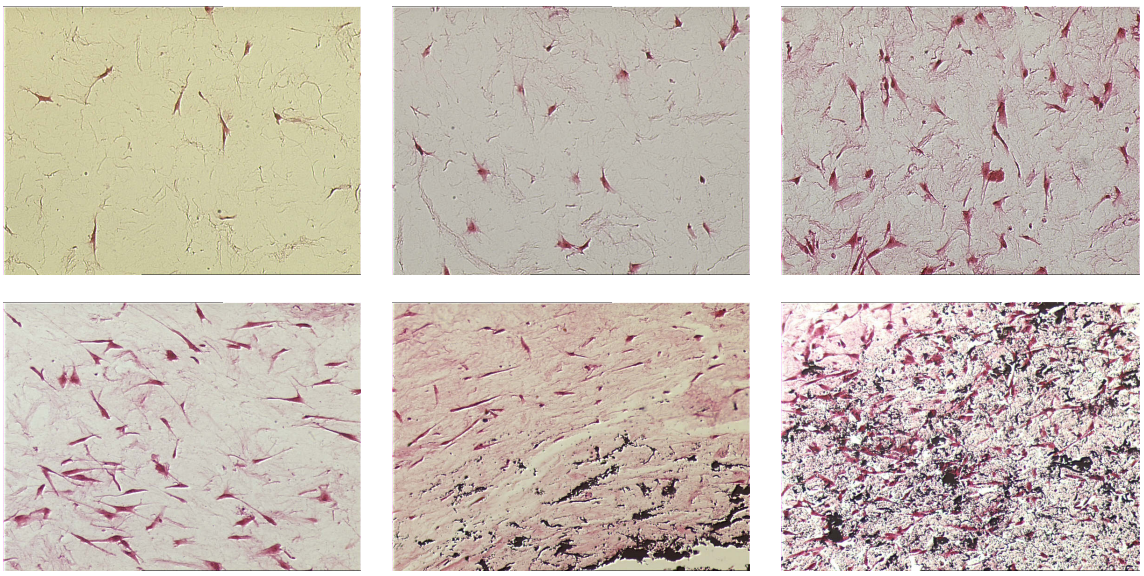


Abbildung 3.14: von Kossa–Färbung histologischer Schnitte von Kollagengelen mit Zelldichten 5x10^5 Zellen/Gel (linke Spalte), 1x10^6 Zellen/Gel (mittlere Spalte) und 2x10^6 Zellen/Gel (rechte Spalte) am Tag 21. Obere Reihe: Kollagengele in EM, untere Reihe: Kollagengele in DM. Lichtmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 100–fach.

homogenere Mineralisierung (rechte Spalte, unteres Bild), als die Konzentration 1x10^6 Zellen/Gel, wo einzelne Bereiche des Gels stark angefärbt waren (mittlere Spalte, unteres Bild, unterer Bildrand) und andere Bereiche negativ waren (oberer Bildrand). In den Gelen aller Aussaatdichten war am Tag 21 unter Differenzierungsbedingungen eine höhere Zelldichte vorzufinden wie in den Gelen identischer Aussaatdichte, die unter Expansionsmedium kultiviert wurden. Dies war wahrscheinlich auf die stärkere Kontraktion der Gele in Differenzierungsmedium zurückzuführen, welche die Zelldichte weiter erhöht.

Da der Vorversuch zeigte, dass höhere Zelldichten und das Differenzierungsmedium für eine Mineralisierung in den Kollagengelen Vorraussetzung sind, wurde für Versuchsblock C die Zelldichte von 1x10^6 Zellen/Gel ausgewählt, da die Zelldichte 2x10^6 Zellen/Gel aufgrund des damit verbundenen hohen Zellbedarfs für das Versuchsdesign nicht realisierbar gewesen wäre. Der zeitliche Versuchsablauf (siehe Abb. 3.15) war bis auf den zusätzlichen Untersuchungszeitpunkt an Tag 21 identisch mit Versuchsblock A. Die Genexpression der untersuchten Marker wurde zu Versuchsbeginn, nach 7, 14 und 21 Tagen nach der Aussaat ins Kollagengel in EM bei fünf Spendern und in DM bei sechs Spendern untersucht. Die Expression von pro–MMP-1 und pro–MMP-13 wurde bei drei Spendern in Expressionsmedium und vier Spendern in DM am Tag 14 und 21 gemessen.

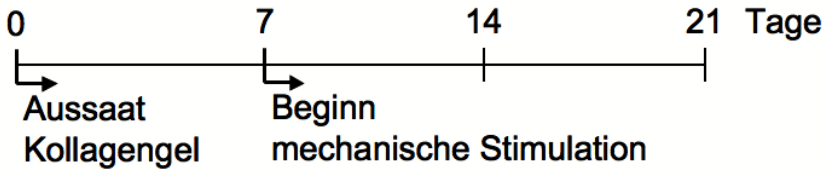


Abbildung 3.15: Übersicht des zeitlichen Versuchsablaufs in Versuchsblock C

3.6.2 Einfluss der Kulturmedien

Genexpression osteogener Marker

Es wurde die Expression der osteogenen Marker Col 1, Runx2, AP, OP und OC untersucht (siehe Abb. 3.16).

- Die Expression von Col 1 war zu Versuchsbeginn stark exprimiert (1,7-fache GAPDH–Expression) und veränderte sich jedoch im Zeitverlauf kaum. Nur am Tag 7 war die Col 1–Expression unter Differenzierungsbedingungen in allen Spendern erhöht (p=0,062), jedoch bestand kein Unterschied mehr am Tag 14 und Tag 21.

- Die Expression von Runx2 erhöhte sich im Vergleich zu Versuchsbeginn tendenziell sowohl in EM als auch in DM. Da nur einer von sechs Spendern sowohl in EM als auch in DM mit einer Reduzierung der Expression reagierte, war diese Erhöhung nicht signifikant. Die Expressionsniveaus in DM und EM unterschieden sich nicht.

- Die Expression von AP veränderte sich in EM nicht signifikant, während sie in DM in fünf von sechs Spendern am Tag 7 und am Tag 14 tendenziell anstieg. Dieser Anstieg war nicht signifikant, da ebenfalls ein Spender nicht mit einer Erhöhung sondern einer Erniedrigung in DM reagierte. Die Expressionsniveaus in Differenzierungsmedium unterschieden sich nicht signifikant von denen unter Expressionsmedium.

- Die OC–Expression war sehr schwach und veränderte sich im Zeitverlauf nicht signifikant. Am Tag 14 war bei allen fünf Spendern OC unter Expansionsbedingungen höher exprimiert als unter Differenzierungsbedingungen (p=0,062), jedoch nicht am Tag 7 und Tag 21.

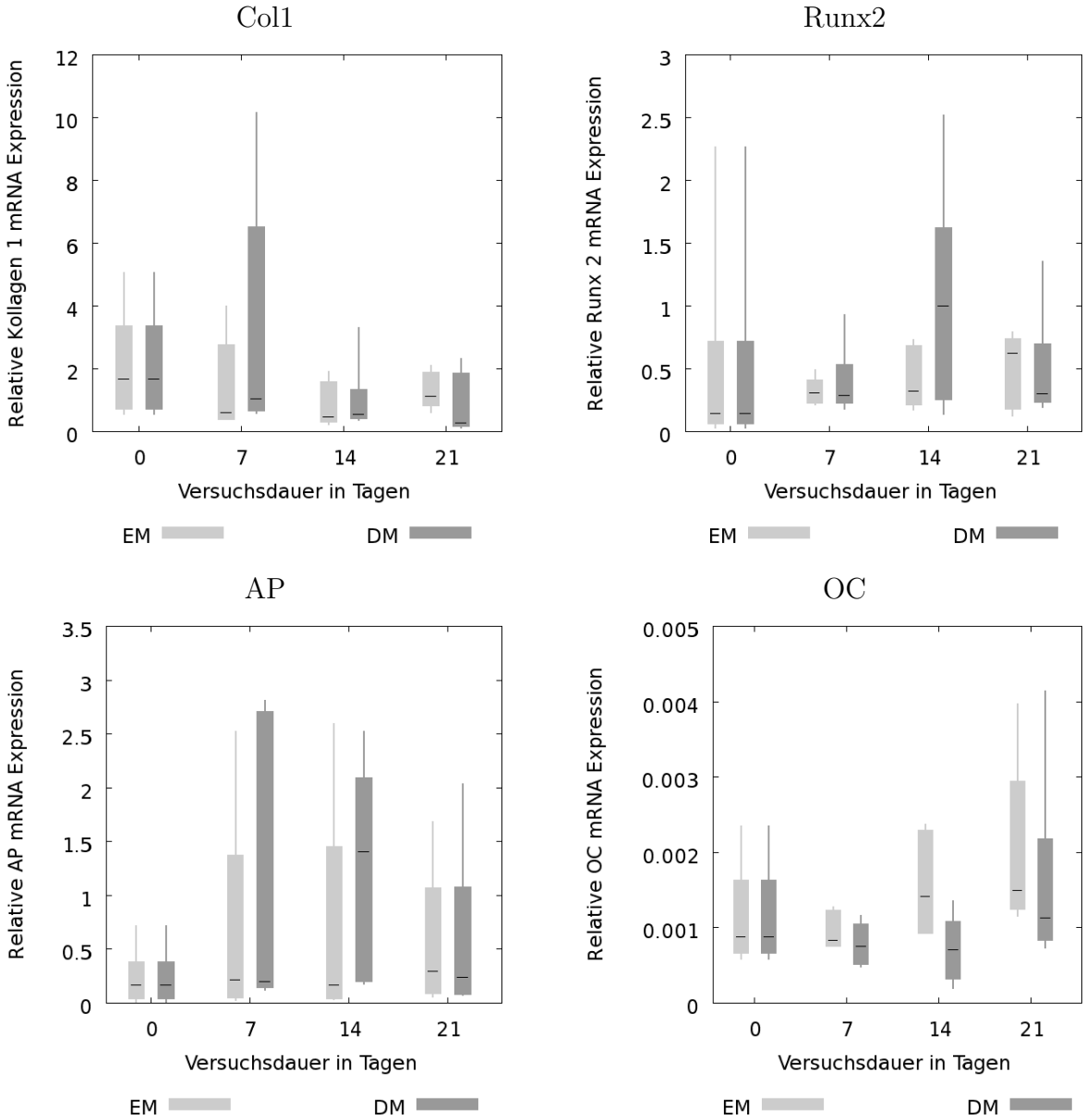


Abbildung 3.16: Einfluss der Kulturmedien auf die relative Genexpression von Col 1, Runx2, AP und OC in Boxplot–Darstellung, Zelldichte $1x10^6$ Zellen/Gel, n=5 (EM), n=6 (DM). EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. * $p \leq 0{,}05$

Genexpression matrixabbauender Proteine

Es wurde die Expression der Matrix–umbauenden Enzyme MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, TIMP-1 und TIMP-2 untersucht (siehe Abb 3.17).

- Das Expressionsniveau von MMP-1 erhöhte sich in vier von fünf Spendern unter Expansionsbedingungen, während unter Differenzierungsbedingungen keine Änderung des Expressionsniveaus zu beobachten war. Am Tag 21 lag in allen fünf untersuchten Spendern die Expression von MMP-1 in EM höher als in DM (p=0,062).
- MMP-2 war allgemein stark exprimiert (3,4-fache GAPDH–Expression) und erhöhte sich tendenziell in EM (vier von fünf Spendern), in DM war keine Tendenz zu erkennen. Am Tag 7 und 14 lag bei allen Spendern die Expression in EM höher als in DM (p=0,062) und am Tag 21 in vier von fünf Spendern (p=0,188).
- MMP-3 war schwach exprimiert und sank am Tag 7 im Kollagengel unter Differenzierungsbedingungen signifikant ab. Sonst hatte das Differenzierungsmedium keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression.
- Das Expressionsniveau von MMP-13 war zu Versuchsbeginn schwach und erhöhte sich unter Expansionsbedingungen in allen Spendern über den Zeitverlauf (p=0,062). Unter Differenzierungsbedingungen erhöhte sich die Expression in nur vier (Tag 7 und Tag 21) bzw. fünf von sechs Spendern (Tag 14). Das Differenzierungsmedium hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression.
- TIMP-1 und TIMP-2 war gleich stark exprimiert und veränderten sich im Zeitverlauf nicht. Die Expressionsniveaus in beiden Medien unterschieden sich nicht.

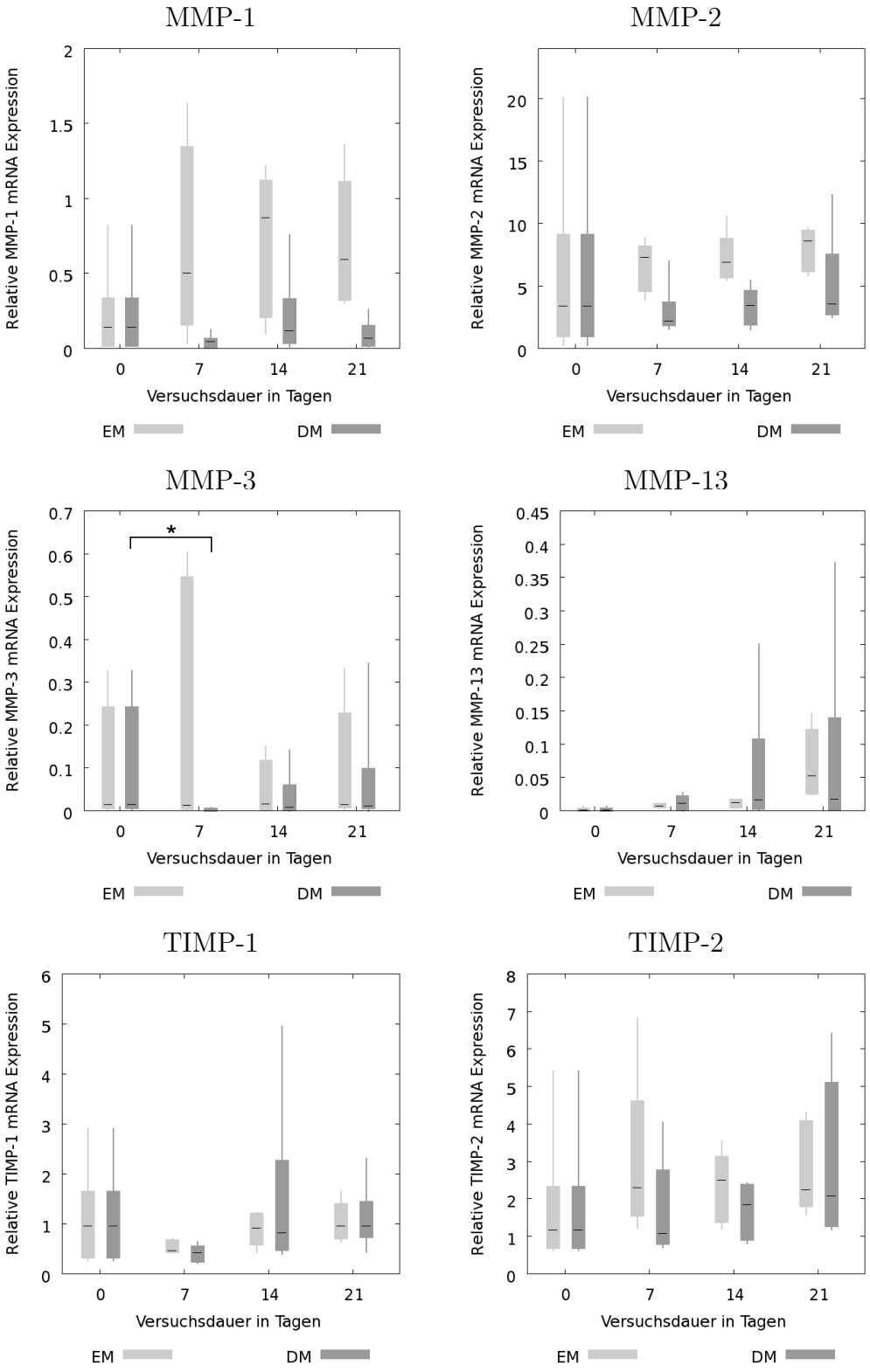


Abbildung 3.17: Einfluss der Kulturmedien auf die relative Genexpression von MMP-1, -2, -3, -13, TIMP-1 und TIMP-2 in Boxplot–Darstellung, Zellzahl 1x10^6 Zellen/Gel, n=5 (EM), n=6 (DM). EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. * $p \leq 0{,}05$

Proteinexpression der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13

Die Expression von pro–MMP-1 variierte stark Spender-abhängig in einem Bereich von 10–100 ng/ml Protein (siehe Tabelle 3.8). In allen drei Spendern stieg in Expansionsmedium die pro–MMP-1–Expression von Tag 14 auf Tag 21 stark an auf ca. 50–130 ng/ml Protein. Unter Differenzierungsbedingungen war in allen Spendern pro–MMP-1 wesentlich schwächer exprimiert als unter Expansionsbedingungen (6–8 ng/ml Protein) und fiel am Tag 21 auf 1–4 ng/ml Protein ab. Diese Unterschiede wurden auf mRNA–Ebene nicht beobachtet.

Die Expression von pro–MMP-13 lag im Bereich von 0,2–6 ng/ml Protein in beiden Medien (siehe Tabelle 3.9). Zwei von drei Spendern zeigten unter Expansionsmedium eine Erhöhung des Expressionsniveaus von Tag 14 auf Tag 21, während auf mRNA–Ebene alle Spender eine Erhöhung zeigten. In Differenzierungsmedium zeigten drei von vier untersuchten Spendern eine Erniedrigung der Expression, ein Spender nur eine leichte Erniedrigung. Auf mRNA–Ebene zeigte sich keine einheitliche Tendenz.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
EM	Tag 14	26,49	9,74	97,06	–
	Tag 21	50,01	12,30	129,79	–
DM	Tag 14	6,57	5,14	8,47	6,31
	Tag 21	0,58	1,39	3,55	2,86

Tabelle 3.8: Proteinexpression von pro–MMP-1 in ng/ml in vier Spendern am Tag 14 und 21 der Kultivierung. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Alle Messungen sind Einzelmessungen.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
EM	Tag 14	5,24	5,00	1,89	–
	Tag 21	9,77	3,59	2,98	–
DM	Tag 14	1,72	5,92	1,61	0,16
	Tag 21	0,18	2,62	0,27	0,11

Tabelle 3.9: Proteinexpression von pro–MMP-13 in ng/ml in vier Spendern am Tag 14 und 21 der Kultivierung. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Alle Messungen sind Einzelmessungen.

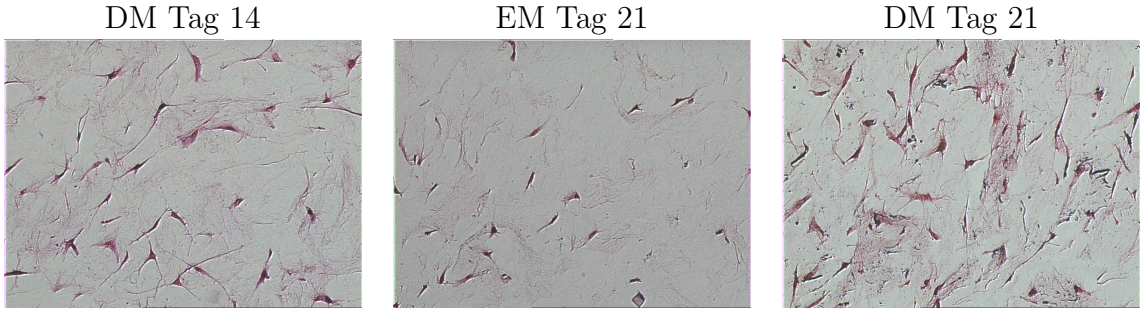


Abbildung 3.18: von Kossa–Färbung histologischer Schnitte von Kollagengelen mit der Zelldichte 1x10^6 Zellen/Gel am Tag 14 (linke Spalte) und Tag 21 (mittlere und rechte Spalte). Frei schwimmende Kontrollen, positive von Kossa–Färbung nur am Tag 21 in DM. Lichtmikroskopische Aufnahmen, Vergrößerung 100–fach.

Nachweis von Hydroxylapatit durch von Kossa–Färbung

Am Tag 21 wurden drei Spender (EM) beziehungsweise vier verschiedene Spender (DM) auf Mineralisierung untersucht. Von einem Spender wurde zusätzlich die Mineralisierung nach 14 Tagen in Differenzierungsmedium und in Expansionsmedium geprüft. Unter Differenzierungsbedingungen war am Tag 21 in Gelen aller vier Spender eine Mineralisierung nachzuweisen, sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Gelen (siehe Abb. 3.18). Unter Expansionsbedingungen zeigten jedoch die Gele aller drei untersuchten Spender zu diesem Zeitpunkt keine Mineralisierung. Am Tag 14 war in den Gelen (ein Spender) weder unter Expansionsbedingungen noch unter Differenzierungsbedingungen Mineralisierung nachzuweisen.

3.6.3 Einfluss der mechanischen Stimulation

Der Einfluss der mechanischen Stimulation wurde nach einer 7–tägigen Stimulationsphase (von Tag 7 bis Tag 14) am Tag 14 gemessen und nach einer 14–tägigen mechanischen Stimulationsphase (von Tag 14 bis Tag 21) am Tag 21 gemessen.

Genexpression osteogener Marker

- Die Expression von Kollagen 1 erhöhte sich unter Expansionsbedingungen in allen fünf Spendern sowohl am Tag 7 und Tag 14 der mechanischen Stimulation (p=0,062). Dieser Trend war in DM nicht zu beobachten (siehe 3.19).

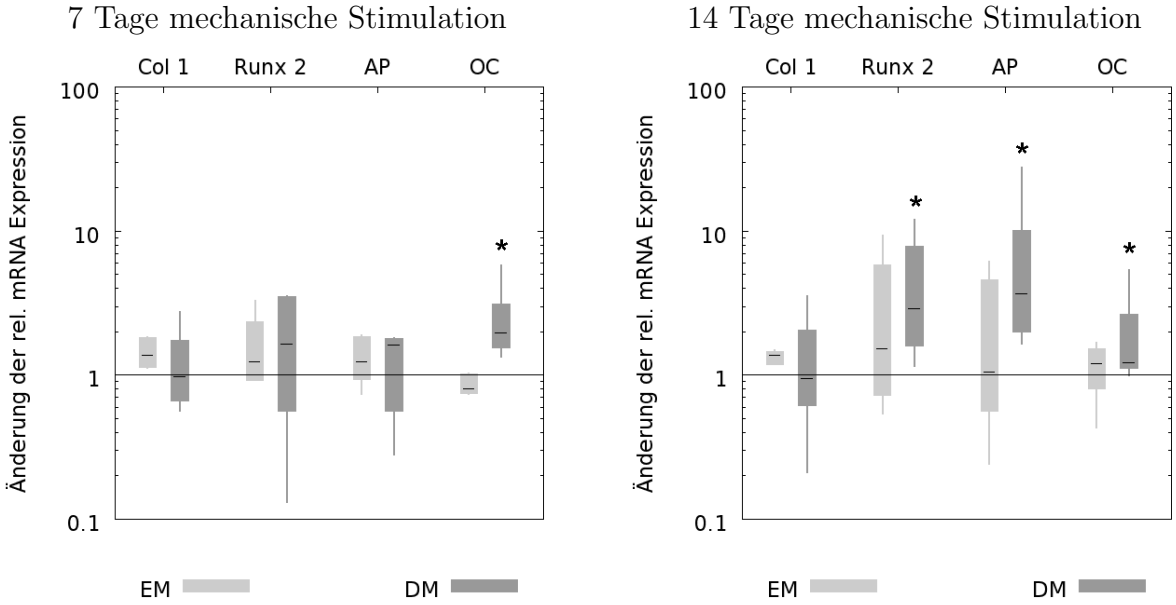


Abbildung 3.19: Einfluss zyklischer Dehnung auf die relative Genexpression von Col 1, Runx 2, AP und OC nach 7–tägiger (Tag 14 der Differenzierung, links) und 14–tägiger (Tag 21 der Differenzierung, rechts) mechanischer Stimulation. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Logarithmische Boxplot–Darstellung der Genexpressionen stimulierter Zell–Kollagen–Konstrukte, bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert y=1 repräsentiert unstimulierte Kontrollen. n=5 (EM) und n=6 (DM). * $p \leq 0{,}05$

- Die Expression von Runx2 erhöhte sich nur am Tag 14 der mechanischen Stimulation signifikant in Differenzierungsmedium, jedoch nicht am Tag 7. In EM veränderte sich die Expression unter mechanischer Stimulation zu beiden Zeitpunkten nicht.

- Die Expression von AP veränderte sich am Tag 7 der mechanischen Stimulation weder in DM noch in EM. Am Tag 14 der mechanischen Stimulation erhöhte sich die AP–Expression unter Differenzierungsbedingungen signifikant, während unter Expansionsmedium AP nicht mechanisch induziert war.

- Die OC–Expression erhöhte sich sowohl am Tag 7 als auch am Tag 14 der mechanischen Stimulation signifikant unter Differenzierungsbedingungen, in EM war jedoch kein Effekt zu beobachten.

Genexpression matrixabbauender Proteine

- Die Expression von MMP-1 erhöhte sich bei allen Spendern sowohl in EM als auch in DM am Tag 7 und Tag 14 der mechanischen Stimulation (p=0,062 bei fünf Spendern bzw. p=0,031 bei sechs Spendern, Abb. 3.20).
- Die MMP-2–Expression erhöhte sich durch mechanische Stimulation am Tag 7 wie auch am Tag 14 in beiden Medien, war aber unter Expansionsbedingungen nicht signifikant. Unter Differenzierungsbedingungen stieg die Expression durch mechanische Stimulation an beiden Zeitpunkten stärker an.
- Die Expression von MMP-3 erhöhte sich durch mechanische Stimulation weder in EM noch in DM.
- Die Expression von MMP-13 erhöhte sich in EM in allen Spendern durch mechanische Stimulation am Tag 7 (n=5, p=0,062), aber nicht am Tag 14. In DM veränderte sich die Genexpression durch mechanische Stimulation nicht.
- Die Expression von TIMP-1 zeigte weder am Tag 14 noch am Tag 21 eine Veränderung nach mechanischer Stimulation.
- Die Expression von TIMP-2 erhöhte sich in EM am Tag 14 in allen fünf Spendern, jedoch nur gering (p=0,062). In DM war die Erhöhung am Tag 14 aufgrund mechanischer Stimulation stärker und signifikant. Am Tag 21 zeigte die mechanische Stimulation unter Differenzierungsbedingungen keinen Einfluss auf die Genexpression.

Proteinexpression der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13

Die Expression von pro–MMP-1 erhöhte sich durch mechanische Stimulation an allen Untersuchungszeitpunkten in beiden Medien bei allen Spendern (siehe Tabellen 3.10 und 3.11). Diese Erhöhung bestätigt die Ergebnisse auf mRNA–Ebene. Die Expression von pro–MMP-13 erhöhte sich in Expressionsmedium nach mechanischer Stimulation bei allen untersuchten Spendern am Tag 7 und 14 (siehe Tabellen 3.12 und 3.13). Unter Differenzierungsbedingungen zeigten drei von vier Spendern eine Erhöhung, ein Spender eine Erniedrigung an beiden Zeitpunkten. Auf mRNA–Ebene dagegen wurde unter Differenzierungsbedingungen kein Einfluss der mechanischen Stimulation beobachtet, unter Expansionsbedingungen war die Expression nur am Tag 7 erhöht und am Tag 14 kein mechanisch induzierter Effekt zu erkennen.

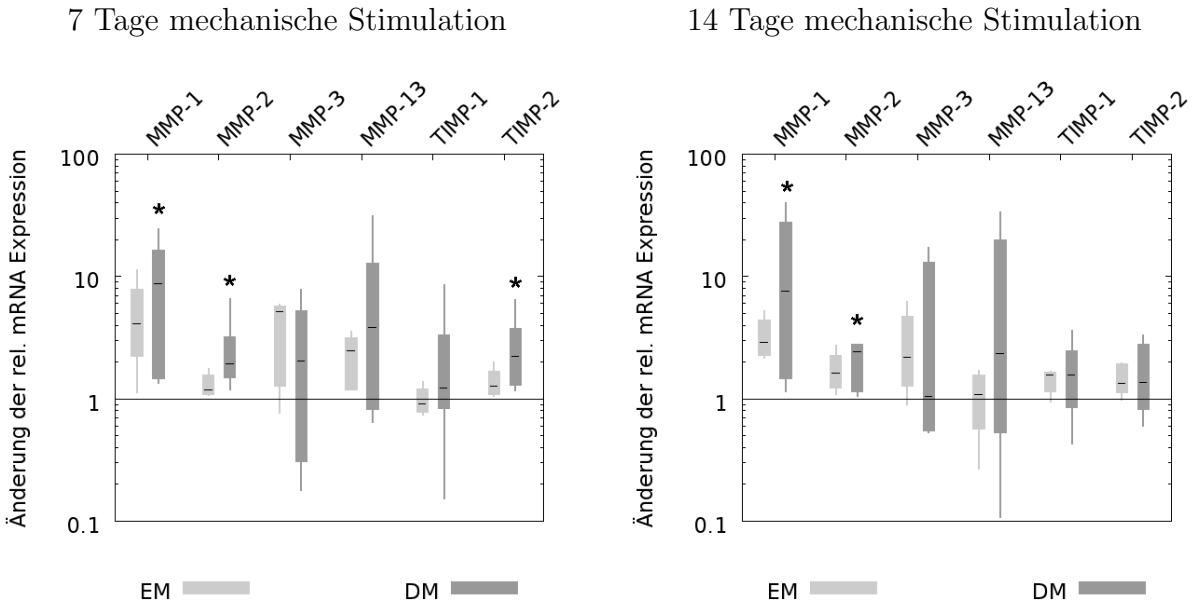


Abbildung 3.20: Einfluss zyklischer Dehnung auf die relative Genexpression von MMP-1, -2, -3, -13, TIMP-1 und TIMP-2 nach 7 Tagen (links) und 14 Tagen (rechts) mechanischer Stimulation. EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Logarithmische Boxplot–Darstellung der Genexpressionen stimulierter Zell–Kollagen–Konstrukte, bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert y=1 repräsentiert unstimulierte Kontrollen. n=7. * $p \leq 0{,}05$

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
EM	Kontrolle	26,49	9,74	97,06	–
	Stimulation	147,48	47,92	258,48	–
	S/K	**5,57**	**4,92**	**2,66**	–
DM	Kontrolle	6,57	5,4	8,47	6,31
	Stimulation	60,77	12,06	18,83	71,95
	S/K	**9,25**	**2,23**	**2,22**	**11,40**

Tabelle 3.10: Expression von pro–MMP-1 in ng/ml in drei Spendern (EM) und 4 Spendern (DM) nach 7 Tagen mechanischer Stimulation (Tag 14 der Kultur). EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Alle Messungen sind Einzelmessungen.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
EM	Kontrolle	50,01	12,30	129,79	–
	Stimulation	159,95	85,43	307,43	–
	S/K	**3,19**	**6,95**	**2,37**	–
DM	Kontrolle	0,54	1,39	3,55	2,86
	Stimulation	13,95	3,94	27,43	16,31
	S/K	**25,833**	**2,835**	**7,727**	**5,703**

Tabelle 3.11: Expression von pro–MMP-1 in ng/ml in drei Spendern (EM) und 4 Spendern (DM) nach 14 Tagen mechanischer Stimulation (Tag 21 der Kultur). EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Alle Messungen sind Einzelmessungen.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
EM	Kontrolle	5,24	5,0	1,89	–
	Stimulation	18,32	7,24	2,79	–
	S/K	**3,50**	**1,45**	**1,48**	–
DM	Kontrolle	1,72	5,92	1,61	0,16
	Stimulation	8,75	2,19	4,13	0,66
	S/K	**5,10**	**0,37**	**2,57**	**4,13**

Tabelle 3.12: Expression von pro–MMP-13 in ng/ml in drei Spendern (EM) und vier Spendern (DM) nach 7 Tagen mechanischer Stimulation (Tag 14 der Kultur). EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Alle Messungen sind Einzelmessungen.

		Spender 1	Spender 2	Spender 3	Spender 4
EM	Kontrolle	9,77	3,59	2,98	–
	Stimulation	20,57	8,07	6,57	–
	S/K	**2,11**	**2,25**	**2,21**	–
DM	Kontrolle	0,18	2,62	0,27	0,11
	Stimulation	0,92	0,71	1,0	0,27
	S/K	**5,11**	**0,27**	**3,70**	**2,46**

Tabelle 3.13: Expression von pro–MMP-13 in ng/ml in drei Spendern (EM) und vier Spendern (DM) nach 14 Tagen mechanischer Stimulation (Tag 21 der Kultur). EM=Expansionsmedium, DM=Differenzierungsmedium. Alle Messungen sind Einzelmessungen.

3.6.4 Zusammenfassung

Die veränderte Zelldichte beeinflusste vor allem die Expression matrixumbauender Enzyme und veränderte die Reaktion auf den mechanischen Reiz verschiedener Gene. Die Expression von Runx2 und AP stieg wie in Versuchsblock A unter Differenzierungsbedingungen an, jedoch wurden an Tag 21 keine Unterschiede in der Genexpression zwischen Expansions– und Differenzierungsbedingungen gemessen. MMP-2 und MMP-13 zeigten einen anderen Genexpressionsverlauf als in Versuchsblock A. Neben Runx2 und AP reagierte hier auch OC auf den mechanischen Reiz. Im Gegensatz zu Versuchsblock A zeigte MMP-13 keine Reaktion auf den mechanischen Reiz, jedoch wurde die Expression von MMP-2 induziert. Alle untersuchten Kollagengele unter Differenzierungsbedingungen wiesen an Tag 21, nicht aber an Tag 14, eine Mineralisierung auf. Somit findet wahrscheinlich in diesem Zeitraum die Matrixreifung statt und die Zellen sind wesentlich stärker osteogen differenziert als in Versuchblock B und C.

4 Diskussion

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Charakterisierung der MPC

Die MPC wurden anhand einer Auswahl von in der Literatur beschriebenen typischen Oberflächenantigenen, CD 9, 90, 44, 105, 166 und Stro-1, auf ihren Stammzellcharakter überprüft [18, 83, 84]. Anders als bei hämatopoietischen Stammzellen existieren für die Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen keine eindeutigen Oberflächenantigene, da diese auch auf der Oberfläche anderer Zelltypen nachweisbar sind. Diese Marker werden zudem variabel exprimiert, da diese Zellen eine heterogene Population darstellen, die aus einer Mischung von multipotenten und weiter ausdifferenzierten Zellen besteht, was durch Unterschiede in der Isolationsmethode, Zellquelle und Spezies verursacht wird [9, 45, 74]. In der Literatur wird Stro-1 als der am meisten spezifische Marker für multipotente mesenchymale Knochenmarksstammzellen beschrieben [10, 13, 15]. Vergleichend wurden in der vorliegenden Arbeit die aus Hüftköpfen isolierten Zellen eines Spenders auf die oben genannten Marker getestet. Es zeigte sich, dass auch osteoblastäre Zellen für die oben genannten CD-Marker positiv waren, jedoch negativ für Stro-1 (Daten nicht gezeigt). Die aus der Tibia isolierten MPC hingegen waren für Stro-1 zu ca. 70% positiv und für die CD-Marker zu 100% positiv. Daher kann man davon ausgehen, dass in den Versuchen eine heterogene Zellpopulation vorlag, die sowohl multipotente Progenitorzellen als auch reifere, differenziertere Zellen enthielt.

4.1.2 Eignung des Kollagengels als Zellträger für MPC

Dreidimensionale Strukturen entsprechen im Gegensatz zu Monolayerkulturen mehr der *in vivo* Situation. In 3D-Strukturen sind dementsprechend Zellphysiologie, Zellmigration und Zelladhäsion im Vergleich zu Monolayerkulturen deutlich verändert [82]. Kollagen ist die hauptsächliche organische Komponente im Knochen und kann die osteogene Differenzierung von Zellen fördern [119, 40, 53, 61, 119, 29]. Es wurde bereits gezeigt, dass

die Viabilität von MPC in diesem Kollagen Typ I–Gel sehr hoch ist und am Tag 21 noch bei 83% liegt [11]. In der vorliegenden Arbeit wurde an Zellen von zwei Spendern die Expression des Apoptosemarkers p53 überprüft. Die fehlende Expression des Apoptosemarkers über 14 Tage sowie auch die generell erhöhten mRNA-Ausbeuten an Tag 14 und Tag 21 im Vergleich zu Tag 7 bestätigen die hohe Viabilität der Zellen in den Kollagengelen. In allen Versuchen wurde, vor allem unter Differenzierungsmedium, eine Kontraktion der Kollagengele beobachtet, die für MPC bereits in der Literatur von mehreren Autoren beschrieben wurde [6, 34]. Diese Schrumpfung der Gele erhöhte die Zelldichte, hatte aber offensichtlich keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Auch die Verdopplung der Zelldichte auf $1x10^6$ Zellen/cm^2 schien die Viabilität nicht zu beeinflussen, da die immunhistologischen Schnitte am Tag 21 fast ausschließlich Zellen mit einer bipolaren, spindelförmigen Morphologie und kaum abgerundete Zellen zeigten. Somit ist diese Kollagen Typ I–Matrix gut zur Kultivierung von MPC geeignet.

4.1.3 Eignung des Kollagengels zur mechanischen Stimulation

Kollagen Typ I–Gele werden häufig für die mechanische Stimulation benutzt, z.B. zur mechanischen Stimulation von Fibroblasten, Bandscheibenzellen und Osteoblasten und es konnte gezeigt werden, dass der mechanische Stimulus zu zellulären Effekten führt [39, 23, 99, 77, 1]. Die mechanischen Eigenschaften von Kollagenhydrogelen sind jedoch schwer zu bestimmen und variieren stark, denn die Matrixarchitektur hängt vom Faserdurchmesser und der Maschenweite ab, die wiederum von der Zusammensetzung des Gels und den Gelierbedingungen abhängig sind [82]. Die Fasern bilden ein lockeres Kollagengeflecht, in welchem sie mit schwachen Wasserstoffbindungen verbunden sind. Daher sind bei der Applikation von mechanischen Reizen keinen einheitlichen Belastungsverteilungen innerhalb der Matrix vorhanden. Eine Vorhersage über auftretende Kräfte innerhalb des Gels ist deshalb schwierig.

4.1.4 Genexpression von MPC in Kollagengelen

mRNA Isolierung

Die Genexpression wurde nach einer 7- oder 14-tägigen Phase der mechanischen Stimulation untersucht und die Gele sofort nach der letzten Stimulation schockgefroren. Es musste sichergestellt sein, dass die Aufarbeitung der Gele mit einer Methode erfolgt, welche die Genexpression der Zellen im Gel nicht beeinflusst. Manche Arbeitgruppen verwenden dazu einen Kollagenaseverdau nach der mechanischen Stimulation [35, 32],

jedoch ist diese Methode eigentlich ungeeignet, da der Kollagenaseverdau selbst die Genexpression der Zellen, z.B. verschiedener Integrine, verändert (J. Hannafin, persönliche Mitteilung). Daher wurde ein Aufarbeitungsprotokoll entwickelt, in welchem die Gele sofort nach der Stimulation in Lysepuffer schockgefroren und später das Kollagen-Gewebe verdaut wurde, um die Genexpression nach mechanischer Stimulation unverfälscht messen zu können.

Auswahl des Housekeeping Gens in der real–time–RT–PCR

Da Genexpressionen aufgrund verschiedener Aufarbeitungsprotokolle und verschiedener Effizienzen bei der Transkription und RT-PCR variieren, ist ein Referenzgen bzw. interne Kontrolle nötig, welche möglichst gleichmäßig exprimiert wird und vor allem nicht vom Versuchsdesign beeinflusst wird [38]. Es wurde deshalb mit dem Wilcoxon Vorzeichen Rangsummen Test überprüft, inwiefern sich die GAPDH–Expression von stimulierten Proben von Kontrollen unterschied. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied, daher wurde GAPDH als Housekeeping-Gen verwendet.

Messungenauigkeit der real–time–PCR

In einem Test, in welchem drei verschiedene Verdünnungen eines real–time–PCR–Standards von drei unterschiedlichen Personen an verschiedenen Tagen für real–time–PCR–Messungen pipettiert wurden, zeigte sich, dass der intra- und interindividuelle Fehler dieser Messung bei maximal 20% liegt. Bei sehr geringen Konzentrationen eines Gens können die Messungenauigkeiten jedoch größer werden, weshalb Daten schwach exprimierter Gene mit kleinen Effekten vorsichtig interpretiert werden müssen.

Messfehler im ELISA

Die Bestimmung der pro–MMP-1 Menge und der pro–MMP-13 Menge wurde an Zellkulturüberständen durchgeführt. Da diese Überstände Zellkulturmedium und 10% oder 2% FCS enthielten, musste zuerst ausgeschlossen werden, dass Bestandteile der Zellkulturmedien und des bovinen Serums mit den ELISA-Reagenzien interagieren. Deshalb wurde in mehreren Assays zusätzlich Expansionsmedium und Differenzierungsmedium analysiert. Da die Messwerte in beiden Medien im Bereich des Null-Standards lagen, interagierte keine der enthaltenen Substanzen mit den MMP-Antikörpern und es konnte davon ausgegangen werden, dass nur das von den Zellen sezernierte pro–MMP gemessen wurde. Die Sensitivität der ELISA´s ist sehr hoch, es können noch Konzentrationen von

21 pg/ml pro–MMP-1 bzw. 8 pg/ml pro–MMP-13 detektiert werden. Der Variationskoeffizient ist für pro–MMP-1 mit maximal 5% (Intra-Assay) bis 12% (Inter-Assay) des Messwerts und für pro–MMP-13 mit maximal 4% (Intra-Assay) und 5% (Inter-Assay) des Messwerts angegeben. Ein zusätzlicher Fehler entsteht durch die fehlende Normierung des pro–MMP-Gehalts, zum Bespiel auf den Gesamt-DNA Gehalt der Zellen im Kollagengel. Dies war jedoch, durch das Versuchsdesign bedingt, nicht möglich. Obwohl alle Matrices die gleiche Menge Medium bekamen, konnte die Menge des Überstandes, z.B. durch unterschiedlich starke Schrumpfung des Kollagengels, schwanken und damit die Konzentration des Proteins im Medium verfälschen. Um diesen Fehler benennen zu können wurde in einem Versuch das Volumen von Zellkulturüberständen verschiedener Versuchsansätze (Überstände von Kontrollen und stimulierten Gelen in Expansion- oder Differenzierungsmedium) verglichen. Der Abweichungen lagen bei 13,9% des Mittelwerts und damit nur unwesentlich höher als die Schwankungen der ELISA-Messungen selbst.

4.2 Differenzierung von MPC

Ziel der Arbeit war es, mittels der Kultivierung der MPC in zwei verschiedenen Medien unterschiedlich weit differenzierte Zellen zu erhalten, um überprüfen zu können, inwieweit das unterschiedliche Differenzierungsstadium die Mechanosensitivität der MPC beeinflusste. Dazu wurden die Zellen in Expansions- bzw. Differenzierungsmedium kultiviert. Verändert wurden die Zeit und Art der Vorkultivierung oder die Zelldichte. In Versuchsblock A und C wurde jeweils sieben Tage im Kollagengel vordifferenziert, in Versuchsblock B zwölf Tage im Monolayer. Die Versuchsblöcke A und C unterschieden sich nur darin, dass die Zelldichte verdoppelt wurde. Es zeigte sich, dass sowohl die Zelldichte, die Dauer der Differenzierung und das Zellkultivierungssystem die Genexpression der Progenitorzellen beeinflussen, was im Folgenden näher erläutert werden soll.

4.2.1 Differenzierung im Monolayer

In dieser Arbeit wurden sowohl undifferenzierte als auch differenzierte MPC aus der Monolayerkultur in ein dreidimensionales Kollagengel eingebracht. Über die Unterschiede von 2D- und 3D-Kulturen existieren bisher wenige Studien. In dreidimensionalen Matrices sind jedoch Zellphysiologie, Zellmigration und Zelladhäsion im Vergleich zur 2D Kultur verändert. So ist die Zusammensetzung der fokalen Adhäsionskontakte in einer 3D Matrix mehr dem natürlichen Gewebe ähnlich und weist Unterschiede in der Zusam-

mensetzung im Vergleich zu Adhäsionskontakten in 2D Kulturen auf [82, 19]. Weiterhin unterscheiden sich 2D- und 3D-Kulturen auch in der Zellmorphologie und im Phosphorylierungszustand der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) [115]. Auch die Matrixorganisation kann die Genexpression der Zellen beeinflussen [97], aber auch die Reaktion auf mechanische Reize kann in 2D und 3D verschieden sein, wie dies zum Beispiel für Endothelzellen beschrieben wurde [79]. Die Adhäsion von Zellen an Kollagenfasern findet hauptsächlich über Integrine statt, eine Familie heterodimerer Zelloberflächenadhäsionsrezeptoren, welche aus alpha- und beta- Untereinheiten bestehen. Kollagenbindende Integrine sind v.a. $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrine, wobei $\alpha 2\beta 1$ die höhere Affinität zu fibrillärem Typ I–Kollagen besitzt und auch bei osteogenen Zellen der hauptsächliche Adhäsionsrezeptor für die Anheftung an Kollagenfasern darstellt [86]. Der Übergang von der Expansionskultur im Monolayer zur Kollagengel-Kultivierung beeinflusste die Expression vor allem der matrixumbauender Enzyme. Die Expression der Kollagenasen (MMP-1 und -13) wurden beim Übergang ins Kollagengel unter Expansions- und Differenzierungsbedingungen hochreguliert, vor allem bei niedrigerer Zelldichte. Die Expression von Stromelysin (MMP-3) wurde durch die Kultivierung im Kollagengel, unabhängig von der Zelldichte, unter Differenzierungsbedingungen stark herunterreguliert. Die Expression der osteogenen Marker im Kollagengel veränderte sich erst über einen längeren Zeitraum von 14-21 Tagen unter Differenzierungsbedingungen. Eine zusätzliche 12-tägige osteogene Vordifferenzierung im Monolayer vor der Aussaat ins Kollagengel beeinflusste vor allem die Expression von Markern der frühen osteoblastären Differenzierung (Runx2 und AP) und einiger Matrix-modulierender Gene (TIMP-1 und TIMP-2). Runx2, AP, TIMP-1 und TIMP-2 veränderten nach 12 Tagen Monolayerkultivierung ihr Expressionsprofil, und zwar nur unter Differenzierungsbedingungen in Form einer Expressionserhöhung. Die Expression anderer Gene veränderte sich in Monolayerkultur weder unter Differenzierungs- noch Expansionsbedingungen. Die Expressionsanstiege während der 12-tägigen Vorkultivierung unter Expansions- und Differenzierungsbedingungen im Monolayer waren wesentlich geringer als die Expressionsanstiege im Kollagengel. Möglicherweise war die Vorkultivierungszeit im Monolayer mit 12 Tagen zu kurz gewählt, um auch dort einen deutlichen Effekt zu erzielen. Gründe für die veränderte Genexpression in 2D und 3D könnten die veränderten Adhäsionsoberflächen sein (Kollagen in 3D und Polystyrol in 2D) oder die Zelldichte, welche sich mit der Aussaat in die 3D-Kultur im Vergleich zur sehr dichten Monolayerkultur sehr stark verringert. Offensichtlich existieren noch zusätzliche Einflüsse, denn die Genexpression von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 verhielt sich nach der 12-tägigen Vorkultivierungszeit anders als ohne Vorkultivierungs-

zeit. So zeigte die MMP-2–Expression ebenso wie die TIMP-1– und TIMP-2–Expression nur nach 12-tägiger Vorkultivierungszeit ein Absinken der Expression im Kollagengel, während sie ohne Vorkultivierungszeit anstieg oder keine signifikante Veränderung im Gel (ohne Vorkultivierungszeit, mit erhöhter Zelldichte) stattfand. Diese Unterschiede beim Übergang von der 2D- zur 3D-Kultur in Abhängigkeit von der Vorkultivierung könnten möglicherweise auch durch die insgesamt längere Kultivierungzeit im Monolayer bedingt sein. Dadurch wurden die Zellen in einem „älteren“ Zustand in die Gele gesät. Um den direkten Unterschied zwischen Monolayerkultur und 3D-Kultur zu messen, müssten Zellen derselben Spender im gleichen Alter und gleicher Zelldichte parallel zur Monolayerkultur im Kollagengel kultiviert werden. Diese Vergleiche sind jedoch schwierig, da identische Kulturbedingungen im Monolayer und Kollagengel nicht zu erreichen sind.

4.2.2 Differenzierung im Kollagengel

Durch einen Vorversuch, in welchem Zellen eines Spenders über 21 Tage in drei verschiedenen Zelldichten im Kollagengel unter Expansions- und Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden, konnten für eine Mineralisierung in den Kollagengelen drei wichtige Faktoren identifiziert werden: (A) eine genügend hohe Zelldichte, (B) die Zugabe osteogener Differenzierungsfaktoren und (C) eine ausreichende Kultivierungszeit (21 Tage). Die MPC wurden in zwei verschiedenen Zelldichten im Kollagengel kultiviert und differenziert: 4,5x10^5 Zellen/Gel (Versuchsblöcke A und B) und 1x10^6 Zellen/Gel (Versuchsblock C). Bei niedrigerer Zelldichte erhöhte sich die mRNA–Expression der frühen osteogenen Marker Runx2 und AP unter Differenzierungsbedingungen, während die mRNA–Expression später Marker wie OC nicht beeinflusst wurde. An Tag 14 wurde keine Mineralisierung gefunden. Auch eine zusätzliche 12-tägige Vorkultivierung im Monolayer vor der Kultivierung im Kollagengel zeigte ein ähnliches Ergebnis: Unter Differenzierungsbedingungen erhöhten sich im Kollagengel nur die Expression der frühen osteogenen Marker Runx2 und AP. OC wurde nicht beeinflusst und an Tag 14 war keine Mineralisierung nachzuweisen. Demnach befanden sich die Zellen bei niedrigerer Zelldichte in einem frühen osteogenen Differenzierungszustand. Die zusätzliche osteogene Vordifferenzierung im Monolayer beeinflusste die weitere Differenzierung im Kollagengel nicht. Die Verdopplung der Zellzahl und die Verlängerung der Differenzierungszeit auf 21 Tage führte unter Differenzierungsbedingungen bei allen untersuchten Spendern zu einer Mineralisierung des Kollagengels. Auch hier war die mRNA–Expression von Runx2 und AP an Tag 14 unter Differenzierungsbedingungen tendenziell stärker als

unter Expansionsbedingungen. Nach 21 Tagen zeigte sich bei diesen frühen osteogenen Markern kein Expressionsunterschied zwischen Expansions- und Differenzierungsbedingungen mehr. Die bei allen Spendern unter Differenzierungsbedingungen beobachtete Mineralisierung an Tag 21 deutet darauf hin, dass sich die Zellen möglicherweise bereits in einem späteren Differenzierungszustand befanden und wahrscheinlich deswegen die Expression der früh in der Osteogenese exprimierten Marker wie Runx2 oder AP zu diesem Zeitpunkt schon absank. Aufgrund der Mineralisierung hätte man erwarten können, dass auch die mRNA–Expression von Osteokalzin erhöht ist, da OC als später osteogener Marker in der Mineralisierungsphase angeschaltet wird. Auf mRNA–Ebene war jedoch sowohl an Tag 14 wie auch 21 kein Expressionsunterschied zwischen Differenzierungs- und Expansionsbedingungen zu messen. Hier wäre eine ergänzende Untersuchung der Proteinexpression mittels immuhistochemischer Färbung, Western-Blot oder ELISA sinnvoll, um Aussagen über den Zusammenhang der OC–Expression mit der Differenzierung treffen zu können. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass das Kollagen Typ I die osteogene Differenzierung auch ohne Differenzierungszusätze fördern kann: Bei niedriger Zelldichte erhöhte sich Runx2 und OP im Zeitverlauf auch unter Expansionsbedingungen, wobei diese Erhöhungen unter Differenzierungsbedingungen jedoch wesentlich stärker ausfielen. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass das Kollagen Typ I–Gel die osteoblastäre Differenzierung von MPC induziert und fanden eine erhöhte Expression typischer Marker wie Bone Sialoprotein, AP, OP und OC [29, 53, 71, 119]. Andere Studien zeigten im Gegensatz dazu, dass in bzw. auf Kollagen Typ I–Matrices keine spontane Induktion osteogener, adipogener oder chondrogener Marker stattfindet [34, 64, 62]. Diese Unterschiede beruhen wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, da in den Studien unterschiedliche Kollagengel-Systeme, unterschiedliche Zellquellen, verschiedene Medienzusammensetzungen (Kulturmedien und FCS) und verschiedene Zelldichten verwendet wurden. Auch die Expression matrixumbauender Proteine war sowohl von Zelldichte als auch vom Medium beeinflusst. So wird pro MMP-13 bei niedriger Zelldichte stärker exprimiert: An Tag 14 im Kollagengel lag die Expression bei niedriger Zelldichte bei maximal 24 ng/ml Protein unter Expansionsbedingungen und 58 ng/ml Protein unter Differenzierungsbedingungen, während in der gleichen Kultivierungszeit bei höherer Zelldichte die Expression nur noch bei maximal 5 ng/ml Protein unter Expansionsbedingungen und maximal 6 ng/ml Protein unter Differenzierungsbedingungen lag. Das Expressionsniveau von pro-MMP-1 war ähnlich zelldichte-abhängig: Pro-MMP-1 wurde bei niedrigerer Zelldichte stark exprimiert (maximal 380 ng/ml Protein unter Expansionsbedingungen und 40 ng/ml Protein unter Differenzierungsbedingungen), bei

hoher Zelldichte wesentlich schwächer exprimiert (maximal 100 ng/ml Protein unter Expansionsbedingungen und 7 ng/ml Protein unter Differenzierungsbedingungen). Die mRNA–Expression von TIMP-1- und TIMP-2 stieg in der geringeren Zelldichte im Zeitverlauf an, während in der höheren Zelldichte kein Anstieg zu erkennen war. Momentan existieren keinen Studien zu einer Zelldichte-abhängigen Expression von MMP´s in Progenitorzellen oder Osteoblasten. Man kennt jedoch diesen Zusammenhang bei Tumorzellen sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultur, wo Zellen in einem lockeren Zellverband wesentlich höhere Konzentrationen an MMP´s produzieren als dichtere Zellverbände. Dort wird die zelldichte-abhängige Expression über die AP-1 (activator protein 1) Bindungsstellen und AP-1 Transkriptionsfaktoren vermittelt [8]. Auch das Kulturmedium beeinflusste die Expression der MMP´s auf mRNA- als auch auf Proteinebene. So lag die MMP-1–Expression bei beiden Zelldichten unter Differenzierungsbedingungen immer niedriger als unter Expansionsbedingungen; sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene. Dieser Unterschied verstärkte sich von Tag 14 auf Tag 21. Eine geringere Expression von MMP-1, aber auch von MMP-3, unter osteogenen Differenzierungsbedingungen konnten auch Tasevski et al. bei osteoblastären MG-63 Zellen zeigen [101]. Mizutani et al. konnten zeigen, dass unter Ascorbinsäurezugabe MMP-13 erhöht wird [72]. Der Einfluss des Differenzierungsmediums auf die MMP-13–Expression war jedoch nicht einheitlich, sondern hing wiederum von der Zelldichte ab: Während bei geringerer Zelldichte MMP-13 unter Differenzierungsbedingungen stärker exprimiert war als unter Expansionsbedingungen, gab es bei höherer Zelldichte keinen Unterschied im Expressionsniveau zwischen den beiden Medien. Da bei höherer Zelldichte die Zellen stärker differenzierten, könnte dies die MMP-13–Expression stark beeinflusst haben. Denn es gibt mehrere Hinweise darauf, dass die MMP-13–Expression differenzierungsabhängig exprimiert wird: So wird die MMP-13–Expression unter anderem auch vom Transkriptionsfaktor Runx2 reguliert, der in der osteogenen Differenzierung eine Rolle spielt [46, 47]. Auch *in vivo* zeigten Tuckermann et al., dass MMP-13 nur in spezifischen Embryonalstadien in hypertrophem Knorpelgewebe zusammen mit Kollagen 10 exprimiert wird [104]. Weiterhin verhält sich bei MMP-13 verhält sich die Expression auf mRNA–Ebene nicht konform mit der Expression auf Proteinebene: An Tag 21 beispielsweise, wo auf mRNA–Ebene weder Expressionsunterschiede zur Expression an Tag 14 oder zwischen Expansions- oder Differenzierungsbedingungen zu finden waren, sank jedoch auf Proteinebene die MMP-13–Expression im Verlgeich zu Tag 14 ab und war unter Expansionsbedingungen stärker als unter Differenzierungsbedingungen. Solche Diskrepanzen wurden für MMP-13 bereits in der Literatur beschrieben: Eine Studie konnte zeigen, dass die Expression von huma-

nem MMP-13 in mesangialen Zellen einem translationalen Silencing unterliegt, welches (trotz Anstieg des MMP-13–mRNA–Niveaus) zu einer kompletten Unterdrückung der Proteinexpression führte [121].

4.2.3 Schlussfolgerung

Die Kultivierung von MPC in Kollagengelen erhöhte die Expression einiger osteogener Marker unter Expansionsbedingungen nur leicht, während unter Differenzierungsbedingungen weitere osteogene Marker induziert wurden und die Expressionserhöhungen wesentlich stärker waren. MPC, welche in einer niedrigen Zelldichte kultiviert wurden, zeigten nach 14 Tagen osteogener Differenzierung keine Mineralisierung, aber eine Erhöhung der Expression früher osteogener Marker. Auch eine 12-tägige Vorkultivierung im Monolayer vor der 14-tägigen Kultivierung im Kollagengel in derselben Zelldichte beschleunigt die Differenzierung nicht: Auch hier wurde nur die Expression früher osteogener Marker erhöht und es fand nach 14 Tagen im Kollagengel keine Mineralisierung statt. Eine erhöhte Zelldichte hingegen führt nach 21 Tagen osteogener Differenzierung im Kollagengel zu einer Mineralisierung in allen untersuchten Spendern. Somit scheint die osteogene Differenzierung im Kollagen Typ I–Gel sehr stark von der Zelldichte abhängig zu sein. Es existieren kaum Studien darüber, wie die Zelldichte die Differenzierung von Progenitorzellen beeinflusst, aber eine Studie von McBeath et al. konnten zeigen, dass die Zelldichte bzw. auch die Adhäsionsoberfläche die Genexpression adipogener und osteogener Marker bei Progenitorzellen über Veränderungen der zytoskelettalen Spannung und der Rho-GTPase-Aktivität beeinflusst [66]. Für eine osteogene Differenzierung bis zur Mineralisierung sind jedoch auch osteogene Differenzierungszusätze notwendig: In der Vergleichsgruppe ohne Differenzierungszusätze veränderte sich die Expression der untersuchten osteogenen Marker im Monolayer nicht bzw. im Kollagengel nur gering und es fand keine Mineralisierung statt. Somit kann im Versuchszeitraum von 21 Tagen das Kollagen-1 Gel die osteogene Differenzierung leicht fördern, aber eine osteogene Ausdifferenzierung bis zur Mineralisierung ist nur mit einer hohen Zelldichte, mit einer längeren Differenzierungszeit und in Kombination mit Differenzierungszusätzen möglich. Auch in der Studie von Heckmann et al. zeigten humane MPC im Kollagen Typ I–Gel über einen Zeitraum von 14 Tagen ohne Differenzierungszusätze keine mRNA–Expressionserhöhung osteogener, adipogener und chondrogener Marker [34]. In einigen Studien wurde gezeigt, dass eine dreidimensionale Kollagenmatrix die osteogene Differenzierung fördert [14, 53, 119]. In diesen Studien jedoch fehlt der direkte Vergleich zu Zellen, die über denselben Zeitraum ohne Differenzierungsfaktoren kultiviert wurden, so dass hier der Effekt

der Matrix nicht getrennt vom Effekt der Differenzierungsfaktoren betrachtet werden konnte. Weiterhin ist der Differenzierungszustand der Progenitorzellen insgesamt schwer zu beurteilen: Die Expressionsprofile der osteogenen Marker zeigen oft nicht den „typischen“ Verlauf und die einzelnen Stadien der Differenzierung gehen fließend ineinander über. Möglicherweise sind unterschiedlich weit differenzierte Subpopulationen, welche sich in Osteoprogenitorzell-Populationen befinden, hierfür die Ursache. Es gibt auch Hinweise darauf, dass auch verschiedene Signalwege der osteogenen Differenzierung bei verschiedenen Osteoblastenpopulationen existieren, also auch eine Heterogenität in den Signalwegen der osteogenen Differenzierung und/oder der daraus resultierenden Osteoblasten vorhanden ist [5]. Die Kultivierung der MPC in Kollagen Typ I–Gelen veränderte auch die Expression der MMP´s sehr stark. Bei niedrigerer Zelldichte waren sowohl MMP-1 als auch MMP-13 stärker exprimiert als bei höherer Zelldichte. Unabhängig von der Zelldichte wurde MMP-1 unter Differenzierungsbedingungen immer schwächer als unter Expansionsbedingungen exprimiert, während die Veränderungen des Expressionsniveaus von MMP-13 stärker von der Zelldichte beeinflusst wurden und zudem auf mRNA–Ebene und Proteinebene nicht einheitlich waren. Es existieren einige wenige Studien über den Zusammenhang zwischen osteogener Differenzierung und der Expression einiger Matrixmetalloproteinasen, jedoch noch keine Studien über den Einfluss der Zelldichte auf diese Effekte.

4.3 Einfluss der mechanischen Stimulation

Der Einfluss der mechanischen Stimulation wurde an MPC verschiedener Differenzierungsstadien, die sich aus der Verwendung verschiedenen Zelldichten, Kultivierungszeiten und Kulturmedien ergaben, untersucht.

4.3.1 Einfluss auf osteogene Marker

Die Expression osteogener Marker wurde durch die mechanische Stimulation induziert. Bei niedriger Zelldichte reagierten sowohl differenzierte wie undifferenzierte MPC mit einer Erhöhung von Runx2 durch mechanische Stimulation an Tag 14. AP hingegen wurde nur unter Differenzierungsbedingungen induziert. Bei Kultivierung von MPC in höherer Zelldichte zeigten MPC unter Expansionsbedingungen keine Reaktion auf den mechanischen Reiz. Unter Differenzierungsbedingungen hingegen wurde Runx2 und AP induziert, jedoch erst an Tag 21 der Differenzierung, wo die Gele auch mineralisiert

waren. Auch OC wurde nur unter Differenzierungsbedingungen und nur bei höherer Zelldichte durch mechanische Stimulation induziert. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Expression des osteoblastären Transkriptionsfaktors Runx2 mechanisch induziert ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* [48, 105]. Ziros et al. konnten zeigen, dass die Induktion von Runx2 durch den mechanische Reiz mit einer Aktivierung der ERK1/2 Phosphorylierung und mit einer erhöhten DNA–Bindungsaffinität einhergeht. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die durch den Dehnungsreiz aktivierte ERK den Transkriptionsfaktor Runx2 phosphoryliert [122]. Wang et al. konnten diesen Zusammenhang bestätigen und zeigten in ihrer Studie, dass sowohl ERK–Aktivierung als auch Runx2–Phosphorylierung für die Mechanotransduktion in humanen MPC und Ratten–MPC erforderlich sind [106]. Die Induktion der alkalischen Phosphatase durch mechanische Reize in MPC ist in mehreren Studien beschrieben sowohl *in vitro* [43, 63, 92, 120] als auch *in vivo* an Zellen des trabekulären Knochens [73]. In einer Studie von Kaspar et al. mit osteoblastären Zellen jedoch wurde durch zyklische mechanische Dehnung die AP–Aktivität reduziert [52]. Offensichtlich sind die Reaktionen osteoblastärer Zellen und MPC auf mechanische Reize stark von den Versuchsbedingungen abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde AP nur unter Differenzierungsbedingungen durch mechanische Stimulation induziert, jedoch nicht zu jedem Zeitpunkt. Dies bestätigt auch die Studie von Sikavitsas et al., in welcher MPC in einer 3D–Titanmatrix Flüssigkeitsscherung ausgesetzt wurden. Dort reagierten die MPC nur an Tag 8 mit einer Erhöhung der AP–Aktivität auf den mechanischen Reiz, während es an Tag 4 und Tag 16 keine Erhöhung durch mechanische Stimulation gab [92]. In einer anderen Studie wurde AP je nach Dehnungsamplitude erhöht oder erniedrigt [56]. In dieser Arbeit wurde auch OC mechanisch induziert, jedoch nur unter Differenzierungsbedingung und bei höherer Zelldichte. Auch in der Literatur wird in einigen Studien eine Induktion von OC nach mechanischer Stimulation (Dehnung) beschrieben [42, 49, 117], jedoch können mechanische Reize auch die OC–Produktion reduzieren [52]. Neben unterschiedlichen Kulturbedingungen und Zellen könnten auch die unterschiedlichen Versuchsprotokolle zur mechanischen Stimulation eine Ursache für veränderte Zellantworten sein: Uniaxiale und äquiaxiale Dehnungen hatten einen unterschiedlichen Einfluss auf die mRNA–Expression des smooth muscle actin–Gens bei MPC [80]. Winter et al. verglichen kontinuierliche Dehnung mit Intervall–Dehnung und zeigten, dass osteoblastäre Zellen eine stärkere Reaktion auf den mechanischen Reiz zeigten, wenn sie in Intervallen gedehnt wurden [113].

4.3.2 Einfluss auf MMP´s und TIMP´s

Auch die Expression der MMP´s wurde durch die mechanische Stimulation unterschiedlich reguliert. Während MMP-1 (sowohl auf mRNA– wie auch auf Proteinebene) unabhängig von der Zelldichte mit einer Induktion der Expression nach mechanischer Stimulation reagierte, zeigte sich bei MMP-13 nach mechanischer Stimulation, je nach Zelldichte, eine Induktion oder Repression der Genexpression. Da das Expressionsniveau von MMP-13 sich abhängig von der Zelldichte, Medium und Kultivierungszeit veränderte, könnten diese Veränderungen auch die Reaktion auf mechanische Reize beeinflussen. Auch die Expression von MMP-2, MMP-3 und TIMP-1 und TIMP-2 war abhängig von den Kultivierungsbedingungen. So reagierte MMP-2 bei niedrigerer Zelldichte kaum auf die mechanische Stimulation, während es nach Vorkultivierung im Monolayer an Tag 7 in Differenzierungsmedium erhöht wurde. Dieser Effekt war jedoch an Tag 14 nicht mehr zu beobachten. Bei höherer Zelldichte bewirkte die mechanische Stimulation in beiden Medien an beiden Zeitpunkten eine Expressionserhöhung. MMP-3 reagierte nur nach Vorkultivierung im Monolayer und nur an Tag 14 unter Expansionsbedingungen stark auf den mechanischen Reiz, während dieser Effekt ohne Vorkultivierung nicht beobachtet wurde. Es ist bekannt, dass die Expression verschiedener MMPs und TIMPs in verschiedenen Zelltypen von mechanischen Reizen beeinflusst wird (Übersicht in [12]). Tanaka et al. konnten nach Vibrationsstimulation osteoblastärer Zellen eine Erhöhung von MMP-9, jedoch nicht von MMP-1,-3 oder -13 feststellen [99]. Yang et al. dagegen zeigten, dass MMP-13 (mRNA und Protein) durch Dehnung in osteoblastären Zellen induziert wird über den MEK–ERK–Signalweg und dass diese Induktion keine *de novo* Proteinsynthese erfordert [116]. Jansen et al. fanden in Osteoblasten ebenfalls eine Erhöhung von MMP-1 und MMP-3, die abhängig vom Differenzierungsstadium der Osteoblasten war: Während MMP-1 zu allen Zeitpunkten der Differenzierungs gleich stark induziert wurde, wurde MMP-3 zu Beginn der Differenzierung am stärksten (25–fach) und zum Ende des Experiments (Tag 21) nicht mehr mechanisch reguliert. Unter Expansionsbedingungen jedoch zeigte MMP-1 eine nur schwache Induktion und MMP-3 wurde nicht mechanisch reguliert [44]. Hier waren die MMP-13-, MMP-2-, TIMP-1- und TIMP-2 weder unter Expansions– noch unter Differenzierungsbedingungen mechanisch beeinflusst. Auch Sasaki et al. fanden eine Erhöhung von MMP-1 und MMP-3 nach uniaxialer zyklischer Dehnung, jedoch war die Expression von MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 unverändert und die Expression von MMP-13 hier nicht nachweisbar [90]. Tanaka et al. untersuchten den Einfluss von Flüssigkeitsscherung auf osteoblastäre Zellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix und fanden eine mechanisch induzierte Erhöhung sowohl

der Kollagenase– und der Gelatinase– Aktivitäten als auch der MMP-1–mRNA [100]. In Bandscheibenzellen ist die Expression von MMP´s abhängig vom mechanischen Stimulus: Unter hohem hydrostatischen Druck reagierten sie mit einer Veränderung der Genexpression von Matrixproteinen und matrixumbauenden Enzymen, während geringer hydrostatischer Druck kaum Genexpressionsänderungen verursachte [78]. Die verschiedenen Studien zeigen, dass auch die Effekte des mechanischen Reizes auf MMP´s vom Versuchsdesign abhängig sind: Je nach Art der mechanischen Stimulation, der Zellart und den jeweiligen Kulturbedingungen werden unterschiedliche MMP´s exprimiert und mechanisch induziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA–Expression der Kollagenasen MMP-1 und MMP-13 zusätzlich noch auf Proteinebene überprüft. Vergleicht man mRNA– und Protein–Expression von pro–MMP-1 der einzelner Spender, so zeigen sich mRNA Erhöhungen meist auch in einer Erhöhung der Proteinexpression (in 10 von 13 Fällen). Vergleicht man die Expression von MMP-13 auf mRNA– und Proteinebene, so fällt auf, dass Erhöhungen/Erniedrigungen auf mRNA–Ebene mit denen auf Proteinebene nicht immer übereinstimmen. Da allerdings im ELISA nur Zellkulturüberstände gemessen wurden und keine Zelllysate, ist es möglich, dass nicht die Aktivität der gesamten vorhandenen MMP–Menge detektiert wurde. Yang et al. fanden in einer zymographischen Messung von MMP-13, in welcher sowohl Zellüberstand als auch das Zellpellet untersucht wurden, den Großteil der zymographischen Aktivität im Zellpellet [116]. Weiterhin könnte ein Teil der pro–MMP–Menge bereits aktiviert und/oder von TIMP´s gebunden und damit im pro–MMP–Elisa nicht mehr detektiert worden sein. Der Vergleich von mRNA–Expression und Proteinexpression ist generell bei vielen MMP´s schwierig, da die MMP–Expression auf der transkriptionellen, posttranskriptionellen und der Protein–Ebene kontrolliert wird [98]. Auf transkriptioneller Ebene wird die MMP–Expression von verschiedenen cis–regulatorischen Elementen wie AP-1, ETS oder sogenannten Osteoblasten–spezifischen Elementen (OSE) geregelt. Auch MMP-1 und MMP-13 haben AP-1 (activator protein 1) Bindestellen in ihrer Promotorregion, an die c-fos oder c-jun binden können. Im MMP-1 Gen arbeitet diese Bindestelle mit der anliegenden ETS–Bindestelle zusammen, nicht aber bei MMP-13. Im MMP-13 Gen wurde ein osteoblast–spezifisches Element gefunden, welches mit dem Transkriptionsfaktor Runx2 interagiert [47]. Auch Wachstumsfaktoren können die Transkription von MMP´s regulieren: So unterdrückt TGF-ß die Transkription von MMP-1 und MMP-3 und induziert die Expression von MMP-13 [98]. Auf posttranskriptionaler Ebene können MMP´s durch verschiedene Moleküle wie Phorbolester bei MMP-1 oder PDGF und Glukokortikoiden im Fall des MMP-13 reguliert werden. Die Stabilität der MMP-1–mRNA

wird durch AU–reiche Sequenzen in der 3´–untranslatierten Region reguliert und vermutlich regulieren ähnliche Sequenzen die Stabilität auch anderer MMP–Transkripte. Auf Proteinebene werden MMP-1 und MMP-13 als inaktive Zymogene sekretiert und erst außerhalb der Zelle aktiviert durch andere, bereits aktivierte MMP´s oder Serinproteasen. Weiterhin aktivieren oder inhibieren auch die TIMP´s verschiedene MMP´s, indem sie an aktive oder pro–Formen verschiedener MMPs binden [98].

4.3.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit führte die zyklische mechanische Dehnung zu einer Expressionserhöhung osteoblastärer Marker in MPC, wobei AP und OC nur unter Differenzierungsbedingungen durch den mechanischen Reiz induziert wurden, Runx2 aber auch unter Expansionsbedingungen. Auch die Expression matrixumbauender Enzyme von MPC im Kollagen Typ I–Gel wurde stark vom mechanischen Reiz beeinflusst. Während die Expression der Kollagenase MMP-1 unabhängig von den Kultivierungsbedingungen immer durch den mechanischen Reiz induziert wurde, variierte die Reaktion anderer MMPs auf den mechanischen Reiz abhängig von den Versuchsbedingungen sehr stark. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Effekte der mechanischen Stimulation allgemein stark von den Versuchsbedingungen, in diesem Fall vom Medium, der Zelldichte und der Kultivierungszeit, abhängig sind. Über den Zusammenhang des Differenzierungsstatus von Progenitorzellen und ihrer Reaktion auf mechanische Reize existieren jedoch immer noch sehr wenige Arbeiten. Sie zeigen jedoch übereinstimmend, dass der Differenzierungszustand der Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Mechanosensitivität der Zellen nimmt. Thomas et al. beschrieben, dass die Reaktion auf mechanische Reize vom Differenzierungszustand der Zelle abhängt, da erst differenzierte Zellen auf den mechanischen Reiz mit einer Expressionserhöhung von AP reagierten [102]. In einer Studie von Naruse et al. wurden MPC, Osteoblasten und Osteozyten in ihrer Reaktion auf Ultraschallstimulation verglichen, wobei Osteoblasten in einem frühen Differenzierungszustand die stärkste Reaktion auf den mechanischen Stimulus zeigten, während MPC nur nach osteogener Differenzierung auf den mechanischen Reiz reagierten [75]. Jedoch wurden in dieser Studie Zellen verschiedener Spezies verwendet (primäre Rattenzellen und murine Zellinie) und sind daher in ihren Reaktionen schwer miteinander vergleichbar. Von einigen Autoren wurde beschrieben, dass die mechanische Stimulation und die osteogene Differenzierung einen synergistischen Effekt haben können [36, 43]. Dieses Er-

gebnis konnte in dieser Arbeit teilweise bestätigt werden: Das Differenzierungsmedium verstärkte nicht generell, aber bei manchen osteogenen Markern (AP, OC) und MMPs (MMP-1, -2, -13) die Reaktion auf mechanischen Reize. Weiterhin hatten ebenso andere Faktoren wie Zelldichte und Kultivierungszeit einen großen Einfluss auf die Genexpression.

5 Zusammenfasssung

Das Tissue Engineering von Knochengewebe hat zum Ziel, große Knochendefekte aufzufüllen. Dazu müssen Vorläuferzellen optimal differenzieren und funktionelle Extrazellulärmatrix auf dreidimensionalen Zellträgermaterialien ausbilden können. Da Knochen ein mechanosensitives Gewebe ist, kann der Einsatz mechanischer Reize im Tissue Engineering dazu beitragen, funktionellere Konstrukte zu erhalten. Es existiert Literatur sowohl über den Einfluss mechanischer Reize auf Progenitorzellen bzw. osteoblastäre Zellen als auch über die Reaktion dieser Zellen auf den mechanischen Reize, jedoch kaum Studien über den Zusammenhang von Mechanosensitivität und Differenzierungsstadium dieser Zellen.

Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mesenchymale Progenitorzellen (MPC) aus Knochenmark in einer dreidimensionalen Kollagen Typ I–Matrix osteogen zu differenzieren und bezüglich ihrer Reaktion auf mechanische Reize mit undifferenzierten Progenitorzellen zu vergleichen.

Dazu wurden die MPC parallel in Expansionsmedium und Differenzierungsmedium kultiviert, um zwei unterschiedlich weit differenzierte MPC-Populationen zu erhalten. Diese beiden Populationen wurden bezüglich ihrer Reaktion auf zyklische mechanische Dehnung verglichen. Es wurde der Einfluss der Kulturmedien, der Kultivierungsdauer und des mechanischen Reizes auf mRNA–Ebene mittels real–time–PCR und auf Proteinebene mittels ELISA und histochemischen Färbemethoden untersucht. Um verschiedene Differenzierungsstadien der MPC zu erhalten, wurden die Dauer der Differenzierung (7 Tage, 14 Tage und 21 Tage), die Zelldichte (4,5x10^5 Zellen/Gel und 1x10^6 Zellen/Gel) und die Art der Zellkultivierung (2D und 3D) variiert.

Die Differenzierung der MPC im Kollagengel wurde von der Differerenzierungsdauer, der Zelldichte und den Kulturmedien beeinflusst. Unter Expansionsbedingungen veränderte sich die Expresssion osteogener Marker kaum, während unter Differenzierungsbedingungen einige osteeogene Marker stärker exprimiert wurden. Bei niedriger Zelldichte war im Zeitraum des Experiments auch unter Differenzierungsbedingungen keine Mineralisierung nachzuweisen. Eine 12-tägige Vordifferenzierung im Monolayer vor

der Kultivierung im Kollagengel konnte die Differenzierung nicht beschleunigen. Eine erhöhte Zelldichte dagegen führte in allen untersuchten Spendern zu einer Mineralisierung der Kollagengele an Tag 21. Auch die Expression von Matrixmetalloproteinasen war teilweise vom Differenzierungsstadium der MPC beeinflusst.

Die mechanische Stimulation führte zu einer Erhöhung osteogener Marker, wobei manche Gene sowohl unter Expansions- als auch unter Differenzierungsbedingungen auf dem mechanischen Reiz ansprachen (Runx2), manche Gene jedoch nur unter Differenzierungsbedingungen (AP, OC). OC reagierte zudem nur unter erhöhter Zelldichte auf den mechanischen Reiz. Auch die Reaktion verschiedener Matrixmetalloproteinasen auf den mechanischen Reiz wurde durch den mechanischen Reiz moduliert: Während MMP-1 unabhängig von den Versuchsbedingungen durch den mechanischen Reiz induziert wurde, war die Reaktion von MMP-13 auf den mechanischen Reiz stark von der Zelldichte und den Differenzierungsbedingungen abhängig. Die Daten zeigen, dass sowohl die Differenzierung von MPC als auch Reaktion der MPC auf den mechanischen Reiz stark von Zelldichte und Kulturmedien beeinflusst wird. Die Daten stimmen teilweise mit Studien überein, die sowohl zur Differenzierung von MPC in Kollagengelen als auch zur Reaktion von MPC oder osteoblastären Zellen auf mechanische Reize existieren. Die Abhängigkeit der Effekte mechanischer Reize vom Differenzierungsstadium und den Kulturbedingungen erklären die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mechanische Reize die Expression v.a. früher osteogener Marker erhöhen und damit die osteoblastäre Differenzierung fördern können. Weiterhin wird die Expression Matrix-abbauender Gene durch mechanische Reize moduliert. Der Einsatz mechanischer Stimuli könnte daher beim Tissue Engineering von Knochengewebe die Ausbildung eines funktionelleren Ersatzgewebes unterstützen.

Literaturverzeichnis

[1] Akhouayri, O., M. H. Lafage-Proust, A. Rattner, N. Laroche, A. Caillot-Augusseau, C. Alexandre und L. Vico: *Effects of static or dynamic mechanical stresses on osteoblast phenotype expression in three-dimensional contractile collagen gels*. J Cell Biochem, 76(2):217–30, 1999. Journal Article.

[2] Altman, G. H., R. L. Horan, I. Martin, J. Farhadi, P. R. Stark, V. Volloch, J. C. Richmond, G. Vunjak-Novakovic und D. L. Kaplan: *Cell differentiation by mechanical stress*. Faseb J, 16(2):270–2, 2002. 1530-6860 (Electronic) Journal Article.

[3] Anderson, D. J., F. H. Gage und I. L. Weissman: *Can stem cells cross lineage boundaries?*. Nat Med, 7(4):393–5, 2001. 1078-8956 (Print) In Vitro Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.

[4] Aubin, J. E.: *Bone stem cells*. J Cell Biochem Suppl, 30-31:73–82, 1998. 0733-1959 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

[5] Aubin, J. E. und J. Triffitt: *Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation*, Bd. 1 d. Reihe *Principles of Bone Biology*. Academic Press Inc., U.S., San Diego, 2 Aufl., 2002.

[6] Awad, H. A., D. L. Butler, M. T. Harris, R. E. Ibrahim, Y. Wu, R. G. Young, S. Kadiyala und G. P. Boivin: *In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics*. J Biomed Mater Res, 51(2):233–40, 2000. 0021-9304 (Print) Journal Article.

[7] Ayad, S., R. Boot-Handford, M. J. Humphries, K. Kadler und A. Shuttleworth: *The Extracellular Matrix FactsBook*. Academic Press Ltd., Great Britain, San Diego, 1994.

[8] Bachmeier, B. E., R. Vene, C. M. Iancu, U. Pfeffer, B. Mayer, D. Noonan, A. Albini, M. Jochum und A. G. Nerlich: *Transcriptional control of cell density dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in breast cancer cell lines*. Thromb Haemost, 93(4):761–9, 2005. 0340-6245 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[9] Baksh, D., L. Song und R. S. Tuan: *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*. J Cell Mol Med, 8(3):301–16, 2004. 1582-1838 (Print) Journal Article Review.

[10] Bianco, P., M. Riminucci, S. Gronthos und P. G. Robey: *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. Stem Cells, 19(3):180–92, 2001. 1066-5099 (Print) Journal Article Review.

[11] Blessing, H.: *Tissue Engineering von Knochengewebe: Effekte mechanischer Reize auf humane osteoblastäre Vorläuferzellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix*. Dissertation, Universität Ulm, 2003.

[12] Bramono, D. S., J. C. Richmond, P. P. Weitzel, D. L. Kaplan und G. H. Altman: *Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics*. Clin Orthop Relat Res, (428):272–85, 2004. 0009-921X (Print) Journal Article Review.

[13] Byers, R. J., J. Brown, C. Brandwood, P. Wood, W. Staley, L. Hainey, A. J. Freemont und J. A. Hoyland: *Osteoblastic differentiation and mRNA analysis of STRO-1-positive human bone marrow stromal cells using primary in vitro culture and poly (A) PCR*. J Pathol, 187(3):374–81, 1999. 0022-3417 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[14] Casser-Bette, M., A. B. Murray, E. I. Closs, V. Erfle und J. Schmidt: *Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture*. Calcif Tissue Int, 46(1):46–56, 1990. 0171-967x Journal Article.

[15] Caterson, E. J., L. J. Nesti, K. G. Danielson und R. S. Tuan: *Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation*. Mol Biotechnol, 20(3):245–56, 2002. 1073-6085 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[16] Chiquet, M.: *Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress*. Matrix Biol, 18(5):417–26, 1999. Journal Article Review Review, Tutorial.

[17] Collier, I. E., S. M. Wilhelm, A. Z. Eisen, B. L. Marmer, G. A. Grant, J. L. Seltzer, A. Kronberger, C. S. He, E. A. Bauer und G. I. Goldberg: *H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen*. J Biol Chem, 263(14):6579–87, 1988. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[18] Colter, D. C., R. Class, C. M. DiGirolamo und D. J. Prockop: *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(7):3213–8, 2000. 0027-8424 Journal Article.

[19] Cukierman, E., R. Pankov, D. R. Stevens und K. M. Yamada: *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. Science, 294(5547):1708–12, 2001. 0036-8075 (Print) Journal Article.

[20] Datta, N., P. P. Q, U. Sharma, V. I. Sikavitsas, J. A. Jansen und A. G. Mikos: *In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 0027-8424 (Print) Journal article.

[21] Deans, R. J. und A. B. Moseley: *Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses*. Exp Hematol, 28(8):875–84, 2000. 0301-472X (Print) Journal Article Review.

[22] Dennis, J. E., J. P. Carbillet, A. I. Caplan und P. Charbord: *The STRO-1+ marrow cell population is multipotential*. Cells Tissues Organs, 170(2-3):73–82, 2002. 1422-6405 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[23] Eastwood, M., V. C. Mudera, D. A. McGrouther und R. A. Brown: *Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: morphological changes*. Cell Motil Cytoskeleton, 40(1):13–21, 1998. 0886-1544 (Print) Journal Article.

[24] Fibbe, W. E.: *Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair*. Ann Rheum Dis, 61 Suppl 2:ii29–31, 2002. 0003-4967 (Print) Journal Article Review.

[25] Franceschi, R. T. und G. Xiao: *Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways*. J Cell Biochem, 88(3):446–54, 2003. 0730-2312 Journal Article Review Review, Tutorial.

[26] Friedenstein, A. J.: *Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium*. Acta Anat (Basel), 45:31–59, 1961. 0001-5180 (Print) Journal Article.

[27] Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luria und I. A. Ruadkow: *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method*. Exp Hematol, 2(2):83–92, 1974. 0301-472X (Print) Journal Article.

[28] Fukui, N., A. McAlinden, Y. Zhu, E. Crouch, T. J. Broekelmann, R. P. Mecham und L. J. Sandell: *Processing of type II procollagen amino propeptide by matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 277(3):2193–201, 2002. 0021-9258 (Print) Journal Article.

[29] Gabbay, J. S., J. B. Heller, S. A. Mitchell, P. A. Zuk, D. B. Spoon, K. L. Wasson, R. Jarrahy, P. Benhaim und J. P. Bradley: *Osteogenic potentiation of human adipose-derived stem cells in a 3-dimensional matrix*. Ann Plast Surg, 57(1):89–93, 2006. 0148-7043 (Print) Journal Article.

[30] Gentleman, E. und J. M. Polak: *Historic and current strategies in bone tissue engineering: Do we have a hope in Hench?*. J Mater Sci Mater Med, 17(11):1029–35, 2006. 0957-4530 (Print) Journal Article.

[31] Gronthos, S., A. C. Zannettino, S. J. Hay, S. Shi, S. E. Graves, A. Kortesidis und P. J. Simmons: *Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow*. J Cell Sci, 116(Pt 9):1827–35, 2003. 0021-9533 (Print) In Vitro Journal Article.

[32] Hannafin, J. A., E. A. Attia, R. Henshaw, R. F. Warren und M. M. Bhargava: *Effect of cyclic strain and plating matrix on cell proliferation and integrin expression by ligament fibroblasts*. J Orthop Res, 24(2):149–58, 2006. 0736-0266 (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural.

[33] Haynesworth, S. E., M. A. Baber und A. I. Caplan: *Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies*. Bone, 13(1):69–80, 1992. 8756-3282 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[34] Heckmann, L., J. Fiedler, T. Mattes und R. E. Brenner: *Mesenchymal progenitor cells communicate via alpha and beta integrins with a three-dimensional collagen type I matrix*. Cells Tissues Organs, 182(3-4):143–54, 2006. 1422-6405 (Print) Journal Article.

[35] Henshaw, D. R., E. Attia, M. Bhargava und J. A. Hannafin: *Canine ACL fibroblast integrin expression and cell alignment in response to cyclic tensile strain in three-dimensional collagen gels*. J Orthop Res, 24(3):481–90, 2006. 0736-0266 (Print) Journal Article.

[36] Holtorf, H. L., J. A. Jansen und A. G. Mikos: *Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone*. J Biomed Mater Res A, 72(3):326–34, 2005. 1549-3296 Journal Article.

[37] Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul und T. Hofmann: *Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(13):8932–7, 2002. 0027-8424 (Print) Clinical Trial Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[38] Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin und A. Zumla: *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 6(4):279–84, 2005. 1466-4879 (Print) Journal Article Review.

[39] Ignatius, A., H. Blessing, A. Liedert, D. Kaspar, L. Kreja, B. Friemert und L. Claes: *[Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices]*. Orthopade, 33(12):1386–93, 2004. 0085-4530 (Print) Journal Article.

[40] Ignatius, A., H. Blessing, A. Liedert, C. Schmidt, C. Neidlinger-Wilke, D. Kaspar, B. Friemert und L. Claes: *Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices*. Biomaterials, 26(3):311–8, 2005. 0142-9612 (Print) Evaluation Studies Journal Article.

[41] Ingber, D. E.: *Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again*. Faseb J, 20(7):811–27, 2006. 1530-6860 (Electronic) Journal Article Re-

search Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review.

[42] Jackson, R. A., A. Kumarasuriyar, V. Nurcombe und S. M. Cool: *Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells*. J Cell Physiol, 209(3):894–904, 2006. 0021-9541 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[43] Jagodzinski, M., M. Drescher, J. Zeichen, S. Hankemeier, C. Krettek, U. Bosch und M. van Griensven: *Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells*. Eur Cell Mater, 7:35–41; discussion 41, 2004. 1473-2262 Journal Article.

[44] Jansen, J. H., H. Jahr, J. A. Verhaar, H. A. Pols, H. Chiba, H. Weinans und J. P. van Leeuwen: *Stretch-induced modulation of matrix metalloproteinases in mineralizing osteoblasts via extracellular signal-regulated kinase-1/2*. J Orthop Res, 24(7):1480–8, 2006. 0736-0266 (Print) Journal Article.

[45] Javazon, E. H., K. J. Beggs und A. W. Flake: *Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging*. Exp Hematol, 32(5):414–25, 2004. 0301-472X (Print) Journal Article Review.

[46] Jimenez, M. J., M. Balbin, J. Alvarez, T. Komori, P. Bianco, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, J. M. Lopez und C. Lopez-Otin: *A regulatory cascade involving retinoic acid, Cbfa1, and matrix metalloproteinases is coupled to the development of a process of perichondrial invasion and osteogenic differentiation during bone formation*. J Cell Biol, 155(7):1333–44, 2001. 0021-9525 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[47] Jimenez, M. J., M. Balbin, J. M. Lopez, J. Alvarez, T. Komori und C. Lopez-Otin: *Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation*. Mol Cell Biol, 19(6):4431–42, 1999. 0270-7306 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[48] Kanno, T., T. Takahashi, W. Ariyoshi, T. Tsujisawa, M. Haga und T. Nishihara: *Tensile mechanical strain up-regulates Runx2 and osteogenic factor expression in human periosteal cells: implications for distraction osteogenesis*. J Oral Maxillofac Surg, 63(4):499–504, 2005. 0278-2391 Journal Article.

[49] Kanno, T., T. Takahashi, T. Tsujisawa, W. Ariyoshi und T. Nishihara: *Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts*. J Cell Biochem, 2007. 0730-2312 (Print) Journal article.

[50] Karsenty, G.: *Cell Differentiation of the Skeleton*, Bd. 1, Embryonic Stem Cells d. Reihe *Handbook of Stem Cells*. Academic Press Inc., U.S., San Diego, 2004.

[51] Kaspar, D., W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, A. Beck, L. Claes und A. Ignatius: *Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain*. J Biomech, 35(7):873–80., 2002. Journal Article.

[52] Kaspar, D., W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, A. Ignatius und L. Claes: *Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity*. J Biomech, 33(1):45–51, 2000. Journal Article.

[53] Kinoshita, S., M. Finnegan, R. W. Bucholz und K. Mizuno: *Three-dimensional collagen gel culture promotes osteoblastic phenotype in bone marrow derived cells*. Kobe J Med Sci, 45(5):201–11, 1999. 0023-2513 (Print) Journal Article.

[54] Klein-Nulend, J., A. van der Plas, C. M. Semeins, N. E. Ajubi, J. A. Frangos, P. J. Nijweide und E. H. Burger: *Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro*. Faseb J, 9(5):441–5, 1995. 0892-6638 (Print) Journal Article.

[55] Knauper, V., C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight und G. Murphy: *Biochemical characterization of human collagenase-3*. J Biol Chem, 271(3):1544–50, 1996. 0021-9258 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[56] Koike, M., H. Shimokawa, Z. Kanno, K. Ohya und K. Soma: *Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2*. J Bone Miner Metab, 23(3):219–25, 2005. 0914-8779 (Print) Journal Article.

[57] Langer, R. und J. P. Vacanti: *Tissue engineering*. Science, 260(5110):920–6, 1993. 0036-8075 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.

[58] Leeuwen, J. P. van, M. van Driel, G. J. van den Bemd und H. A. Pols: *Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 11(1-3):199–226, 2001. 1045-4403 (Print) Journal Article Review.

[59] Liedert, A., D. Kaspar, R. Blakytny, L. Claes und A. Ignatius: *Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells*. Biochem Biophys Res Commun, 349(1):1–5, 2006. 0006-291X (Print) Journal Article Review.

[60] Mannello, F., G. A. Tonti, G. P. Bagnara und S. Papa: *Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 24(3):475–81, 2006. 1066-5099 (Print) Journal Article Review.

[61] Masi, L., A. Franchi, M. Santucci, D. Danielli, L. Arganini, V. Giannone, L. Formigli, S. Benvenuti, A. Tanini, F. Beghe und et al.: *Adhesion, growth, and matrix production by osteoblasts on collagen substrata*. Calcif Tissue Int, 51(3):202–12, 1992. 0171-967X (Print) Journal Article.

[62] Mauney, J. R., D. L. Kaplan und V. Volloch: *Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion*. Biomaterials, 25(16):3233–43, 2004. 0142-9612 (Print) Comparative Study Evaluation Studies Journal Article.

[63] Mauney, J. R., S. Sjostorm, J. Blumberg, R. Horan, J. P. O'Leary, G. Vunjak-Novakovic, V. Volloch und D. L. Kaplan: *Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro*. Calcif Tissue Int, 74(5):458–68, 2004. 0171-967x Journal Article.

[64] Mauney, J. R., V. Volloch und D. L. Kaplan: *Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion*. Biomaterials, 26(31):6167–75, 2005. 0142-9612 (Print) Journal Article.

[65] Mauney, J. R., V. Volloch und D. L. Kaplan: *Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects*. Tissue Eng, 11(5-6):787–802, 2005. 1076-3279 (Print) Journal Article Review.

[66] McBeath, R., D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju und C. S. Chen: *Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment*. Dev Cell, 6(4):483–95, 2004. 1534-5807 Journal Article.

[67] McKay, R.: *Stem cells–hype and hope*. Nature, 406(6794):361–4, 2000. 0028-0836 (Print) News.

[68] Melton, D. und C. Cowan: *„Stemness“: Definitions, Criteria, and Standards*, Bd. 2, Adult and Fetal Stem Cells d. Reihe *Handbook of Stem Cells*. Academic Press Inc., U.S., San Diego, 2004.

[69] Mezey, E., S. Key, G. Vogelsang, I. Szalayova, G. D. Lange und B. Crain: *Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(3):1364–9, 2003. 0027-8424 (Print) Journal Article.

[70] Mitchell, P. G., H. A. Magna, L. M. Reeves, L. L. Lopresti-Morrow, S. A. Yocum, P. J. Rosner, K. F. Geoghegan und J. E. Hambor: *Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage*. J Clin Invest, 97(3):761–8, 1996. 0021-9738 (Print) Journal Article.

[71] Mizuno, M., R. Fujisawa und Y. Kuboki: *Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction*. J Cell Physiol, 184(2):207–13, 2000. 0021-9541 (Print) Journal Article.

[72] Mizutani, A., I. Sugiyama, E. Kuno, S. Matsunaga und N. Tsukagoshi: *Expression of matrix metalloproteinases during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells*. J Bone Miner Res, 16(11):2043–9, 2001. 0884-0431 (Print) Journal Article.

[73] Moalli, M. R., N. J. Caldwell, P. V. Patil und S. A. Goldstein: *An in vivo model for investigations of mechanical signal transduction in trabecular bone*. J Bone Miner Res, 15(7):1346–53, 2000. 0884-0431 Journal Article.

[74] Montanaro, F., K. Liadaki, J. Schienda, A. Flint, E. Gussoni und L. M. Kunkel: *Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters*. Exp Cell Res, 298(1):144–54, 2004. 0014-4827 (Print) Journal Article.

[75] Naruse, K., A. Miyauchi, M. Itoman und Y. Mikuni-Takagaki: *Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound*. J Bone Miner Res, 18(2):360–9, 2003. 0884-0431 Journal Article.

[76] Neidlinger-Wilke, C., H. J. Wilke und L. Claes: *Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application*. J Orthop Res, 12(1):70–8, 1994. 0736-0266 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[77] Neidlinger-Wilke, C., K. Wurtz, A. Liedert, C. Schmidt, W. Borm, A. Ignatius, H. J. Wilke und L. Claes: *A three-dimensional collagen matrix as a suitable culture system for the comparison of cyclic strain and hydrostatic pressure effects on intervertebral disc cells*. J Neurosurg Spine, 2(4):457–65, 2005. 1547-5654 (Print) Journal Article.

[78] Neidlinger-Wilke, C., K. Wurtz, J. P. Urban, W. Borm, M. Arand, A. Ignatius, H. J. Wilke und L. E. Claes: *Regulation of gene expression in intervertebral disc cells by low and high hydrostatic pressure*. Eur Spine J, 15(Suppl 3):S372–S378, 2006. 0940-6719 (Print) Journal article.

[79] Ng, C. P., C. L. Helm und M. A. Swartz: *Interstitial flow differentially stimulates blood and lymphatic endothelial cell morphogenesis in vitro*. Microvasc Res, 68(3):258–64, 2004. 0026-2862 (Print) Journal Article.

[80] Park, J. S., J. S. Chu, C. Cheng, F. Chen, D. Chen und S. Li: *Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells*. Biotechnol Bioeng, 88(3):359–68, 2004. 0006-3592 Journal Article.

[81] Pavalko, F. M., S. M. Norvell, D. B. Burr, C. H. Turner, R. L. Duncan und J. P. Bidwell: *A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes*. J Cell Biochem, 88(1):104–12, 2003. 0730-2312 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.

[82] Pedersen, J. A. und M. A. Swartz: *Mechanobiology in the third dimension*. Ann Biomed Eng, 33(11):1469–90, 2005. 0090-6964 (Print) Journal Article Review.

[83] Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig und D. R. Marshak: *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 284(5411):143–7, 1999. 0036-8075 (Print) Journal Article.

[84] Pittenger, M. F., G. Mbalaviele, M. Black, J. D. Mosca und D. R. Marshak: *Mesenchymal Stem Cells*, Bd. 5 d. Reihe *Human Cell Culture*. Kluwer Academic Publishers, 2001.

[85] Qi, H., D. J. Aguiar, S. M. Williams, A. La Pean, W. Pan und C. M. Verfaillie: *Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(6):3305–10, 2003. Journal Article.

[86] Reyes, C. D. und A. J. Garcia: *Alpha2beta1 integrin-specific collagen-mimetic surfaces supporting osteoblastic differentiation*. J Biomed Mater Res A, 69(4):591–600, 2004. 1549-3296 Journal Article.

[87] Rezwan, K., Q. Z. Chen, J. J. Blaker und A. R. Boccaccini: *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 27(18):3413–31, 2006. 0142-9612 (Print) Journal Article Review.

[88] Robey, P. G. und P. Bianco: *Stem Cells in Tissue Engineering*, Bd. 2, Adult and Fetal Stem Cells d. Reihe *Handbook of Stem Cells*. Academic Press Inc., U.S., San Diego, 2004.

[89] Rubin, J., C. Rubin und C. R. Jacobs: *Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone*. Gene, 367:1–16, 2006. 0378-1119 (Print) Journal Article.

[90] Sasaki, K., M. Takagi, Y. T. Konttinen, A. Sasaki, Y. Tamaki, T. Ogino, S. Santavirta und J. Salo: *Upregulation of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and its activator MMP-3 of human osteoblast by uniaxial cyclic stimulation*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 80(2):491–8, 2007. 1552-4973 (Print) Journal Article.

[91] Seibel, J., R. Eastell, C. Gundberg, R. Hannon und H. A. Pols: *Biochemical Markers of Bone Metabolism*, Bd. 2 d. Reihe *Principles of Bone Biology*. Academic Press Inc., U.S., San Diego, 2 Aufl., 2002.

[92] Sikavitsas, V. I., G. N. Bancroft, H. L. Holtorf, J. A. Jansen und A. G. Mikos: *Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(25):14683–8, 2003. 0027-8424 Journal Article.

[93] Simmons, C. A., S. Matlis, A. J. Thornton, S. Chen, C. Y. Wang und D. J. Mooney: *Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway*. J Biomech, 36(8):1087–96, 2003. 0021-9290 Journal Article.

[94] Simmons, C. A., J. Nikolovski, A. J. Thornton, S. Matlis und D. J. Mooney: *Mechanical stimulation and mitogen-activated protein kinase signaling independently regulate osteogenic differentiation and mineralization by calcifying vascular cells*. J Biomech, 37(10):1531–41, 2004. 0021-9290 Journal Article.

[95] Simmons, P. J. und B. Torok-Storb: *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*. Blood, 78(1):55–62, 1991. 0006-4971 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[96] Smith, A. G.: *Embryo-derived stem cells: of mice and men*. Annu Rev Cell Dev Biol, 17:435–62, 2001. 1081-0706 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.

[97] Stegemann, J. P. und R. M. Nerem: *Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture*. Exp Cell Res, 283(2):146–55, 2003. 0014-4827 (Print) Journal Article.

[98] Sternlicht, M. D. und Z. Werb: *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 17:463–516, 2001. 1081-0706 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.

[99] Tanaka, S. M., J. Li, R. L. Duncan, H. Yokota, D. B. Burr und C. H. Turner: *Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts*. J Biomech, 36(1):73–80, 2003. 0021-9290 (Print) Journal Article.

[100] Tanaka, S. M., H. B. Sun, R. K. Roeder, D. B. Burr, C. H. Turner und H. Yokota: *Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix*. Calcif Tissue Int, 76(4):261–71, 2005. 0171-967X

(Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[101] Tasevski, V., J. M. Sorbetti, S. S. Chiu, N. G. Shrive und D. A. Hart: *Influence of mechanical and biological signals on gene expression in human MG-63 cells: evidence for a complex interplay between hydrostatic compression and vitamin D3 or TGF-beta1 on MMP-1 and MMP-3 mRNA levels*. Biochem Cell Biol, 83(1):96–107, 2005. 0829-8211 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[102] Thomas, G. P. und A. J. el Haj: *Bone marrow stromal cells are load responsive in vitro*. Calcif Tissue Int, 58(2):101–8, 1996. 0171-967X (Print) In Vitro Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[103] Tuan, R. S., G. Boland und R. Tuli: *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering*. Arthritis Res Ther, 5(1):32–45, 2003. 1478-6362 (Electronic) Journal Article Review.

[104] Tuckermann, J. P., K. Pittois, N. C. Partridge, J. Merregaert und P. Angel: *Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse*. J Bone Miner Res, 15(7):1257–65, 2000. 0884-0431 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[105] Van Lam, S. und A. B. Rabie: *Mechanical strain induces Cbfa1 and type X collagen expression in mandibular condyle*. Front Biosci, 10:2966–71, 2005. 1093-4715 Journal Article.

[106] Wang, F. S., C. J. Wang, S. M. Sheen-Chen, Y. R. Kuo, R. F. Chen und K. D. Yang: *Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors*. J Biol Chem, 277(13):10931–7, 2002. 0021-9258 (Print) Journal Article.

[107] Wang, J. H. und B. P. Thampatty: *An introductory review of cell mechanobiology*. Biomech Model Mechanobiol, 5(1):1–16, 2006. 1617-7959 (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Review.

[108] Watt, F. M. und B. L. Hogan: *Out of Eden: stem cells and their niches*. Science, 287(5457):1427–30, 2000. 0036-8075 (Print) Journal Article Review.

[109] Weissman, I. L., D. J. Anderson und F. Gage: *Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations*. Annu Rev Cell Dev Biol, 17:387–403, 2001. 1081-0706 (Print) Journal Article Review.

[110] Welgus, H. G., C. J. Fliszar, J. L. Seltzer, T. M. Schmid und J. J. Jeffrey: *Differential susceptibility of type X collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72-kDa type IV collagenase*. J Biol Chem, 265(23):13521–7, 1990. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[111] Weyts, F. A., B. Bosmans, R. Niesing, J. P. van Leeuwen und H. Weinans: *Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation*. Calcif Tissue Int, 72(4):505–12, 2003. Journal Article.

[112] Wilhelm, S. M., T. Javed und R. L. Miller: *Human gingival fibroblast collagenase: purification and properties of precursor and active forms*. Coll Relat Res, 4(2):129–52, 1984. 0174-173X (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[113] Winter, L. C., X. F. Walboomers, J. D. Bumgardner und J. A. Jansen: *Intermittent versus continuous stretching effects on osteoblast-like cells in vitro*. J Biomed Mater Res, 67A(4):1269–75, 2003. Journal Article.

[114] Wolff, J.: *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Hirschwald Verlag, Berlin, 1892.

[115] Yamada, K. M., R. Pankov und E. Cukierman: *Dimensions and dynamics in integrin function*. Braz J Med Biol Res, 36(8):959–66, 2003. 0100-879X (Print) Comparative Study Journal Article Review.

[116] Yang, C. M., C. S. Chien, C. C. Yao, L. D. Hsiao, Y. C. Huang und C. B. Wu: *Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells*. J Biol Chem, 279(21):22158–65, 2004. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[117] Yang, Y. Q., X. T. Li, A. B. Rabie, M. K. Fu und D. Zhang: *Human periodontal ligament cells express osteoblastic phenotypes under intermittent force*

loading in vitro. Front Biosci, 11:776–81, 2006. 1093-4715 (Electronic) In Vitro Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

[118] Yokota, H., M. B. Goldring und H. B. Sun: *CITED2-mediated regulation of MMP-1 and MMP-13 in human chondrocytes under flow shear*. J Biol Chem, 278(47):47275–80, 2003. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[119] Yoneno, K., S. Ohno, K. Tanimoto, K. Honda, N. Tanaka, T. Doi, T. Kawata, E. Tanaka, S. Kapila und K. Tanne: *Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in three-dimensional collagen gel cultures*. J Biomed Mater Res A, 75(3):733–41, 2005. 1549-3296 (Print) Journal Article.

[120] Yoshikawa, T., S. A. Peel, J. R. Gladstone und J. E. Davies: *Biochemical analysis of the response in rat bone marrow cell cultures to mechanical stimulation*. Biomed Mater Eng, 7(6):369–77, 1997. 0959-2989 Journal Article.

[121] Yu, Q., S. J. Cok, C. Zeng und A. R. Morrison: *Translational repression of human matrix metalloproteinases-13 by an alternatively spliced form of T-cell-restricted intracellular antigen-related protein (TIAR)*. J Biol Chem, 278(3):1579–84, 2003. 0021-9258 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

[122] Ziros, P. G., A. P. Gil, T. Georgakopoulos, I. Habeos, D. Kletsas, E. K. Basdra und A. G. Papavassiliou: *The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells*. J Biol Chem, 277(26):23934–41, 2002. 0021-9258 Journal Article.

6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Lutz Claes danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut anfertigen zu können.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Brenner für die Übernahme des Koreferats und die gute Zusammenarbeit innerhalb des Kompetenznetzwerkes Biomaterialien Baden-Württemberg.

Weiterhin danke ich auch den weiteren Kooperationspartnern im Kompetenznetzwerk Biomaterialien für die Zusammenarbeit und der Landesstiftung Baden-Württemberg für die Förderung dieser Studie.

Der Ars Arthro AG danke ich für ihre großzügige Bereitstellung der Kollagenmatrices.

Ein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Anita Ignatius für die Überlassung des Themas, ihre gute Anleitung und Betreuung, aber auch für ihr großes Engagement und die wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Einen herzlichen Dank auch an Frau Dr. Ludwika Kreja für die nette Zusammenarbeit über all die Jahre: Sie hatte stets ein offenes Ohr für alle auftauchenden Laborkatastrophen und wissenschaftlichen Probleme und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Beiden möchte ich auch für die wertvollen Tipps zum Anfertigen dieser Arbeit und für das schnelle und gründliche Korrekturlesen des Manuskripts danken.

Einen herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter der Zellgruppe für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor, die über so manchen Frust hinwegtrösten konnte, und für ihre Hilfsbereitschaft.

Auch allen anderen Mitarbeitern möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre am Institut danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Besonders bei meinem Freund Detlef, der mir all die Jahre mit seiner Liebe auch über schwierige Phasen hinweghalf und mich auch beim Anfertigen dieser Arbeit tatkräftig

unterstützt hat.

Meinen Eltern danke ich sehr herzlich ich für ihre Liebe, ihr Vertrauen in mich und ihre Unterstützung. Ich bin ihnen sehr dankbar, dass sie mir das Biologiestudium ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Angela Thiel
Geburtstag:	4.8.1975
Geburtsort:	Altötting

Ausbildung:

09/1986 – 07/1995:	König-Karlmann-Gymnasium in Altötting
10/1995 – 04/2002:	Studium der Biologie an der Universität Ulm
11/1999 – 05/2000:	Bachelor-Arbeit an der Coventry University, Großbritannien
05/2001–04/2002:	Diplomarbeit in der Abteilung Humangenetik, Universität Ulm
04/2002:	Abschluss des Biologiestudiums mit Diplom

Berufserfahrung:

05/2002 – 10/2002:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Biophysik, Universität Ulm
11/2002 – 08/2003:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Forschungsabteilung der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg
11/2003 – 12/2006:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Universität Ulm