

Aus der Berlin - Brandenburg School for Regenerative Therapies  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Altersabhängige Unterschiede der osteogenen Differenzierung von  
mesenchymalen Stammzellen nach Stimulation mit fokussiertem  
Ultraschall

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Josefine Albers

aus Magdeburg

Datum der Promotion: 16. Juni 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>7</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1 Knochen und Knochenheilung.....	10
1.2 Stammzellen.....	11
1.3 FLIPUS .....	13
1.4 Aufgabenstellung.....	15
<b>2. Material und Methodik.....</b>	<b>17</b>
2.1 Material .....	17
2.2 Methodik .....	20
2.2.1 Gruppeneinteilung .....	21
2.2.2 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen .....	22
2.2.3 Passagieren der Zellen .....	23
2.2.4 Charakterisierung von rMSCs .....	24
2.2.5 Kryokonservierung .....	26
2.2.6 Stimulation mit FLIPUS .....	27
2.2.7 Statistik.....	32
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1.2 Adipogene Differenzierung.....	35
3.1.3 Chondrogene Differenzierung .....	36
<b>3.2 Stimulation mit FLIPUS .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Osteocalcin .....	37
3.2.2 RUNX2 .....	39
3.2.3 Alizarin Red S Färbung .....	40
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 Diskussion der Methodik .....</b>	<b>43</b>
4.1.1 Auswahl der Spendertiere .....	43
4.1.2 Isolation und Kultivierung der rMSCs.....	44

4.1.3 Charakterisierung der rMSCs.....	44
4.1.4 Stimulation mit FLIPUS .....	44
4.1.5 Outcome-Parameter.....	45
<b>4.2 Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
4.2.1 Charakterisierung der rMSCs.....	45
4.2.2 Stimulation mit FLIPUS .....	46
<b>4.3 Ausblick.....</b>	<b>48</b>
<b>Literatur.....</b>	<b>50</b>
<b>Liste der Abbildungen.....</b>	<b>58</b>
<b>Liste der Tabellen.....</b>	<b>59</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>60</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>62</b>
<b>Publikationsliste.....</b>	<b>65</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>66</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Delta\text{Ct}$	Delta-Delta-Ct
4-HNE	4-Hydroxynonenal
alt	12 Monate alt
AN	Stimulation mit der angegebenen $I_{\text{SATA}}$
ANOVA	analysis of variance
AP-1	Activator protein 1
AR	Alizarin Red S Färbung
AUS	unstimulierte Kontrollgruppe
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU-F	colony forming unit-fibroblasts
Ct	Cycle threshold
Dlx5	distal-less homeobox 5
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Effizienz
EGF	epidermal growth factor
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	fetal bovine serum
FCS	Fötale Kälberserum
FI	fold induction
FLIPUS	Focused Low Intensity Pulsed Ultrasound
g	Schwerebeschleunigung
$G_0$	gap 0, Ruhephase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Guanin-Cytosin
H	hohe Intensität, 44,5 mW/cm <sup>2</sup>
HCl	Salzsäure
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
jung	3 Monate alt
LIPUS	Low Intensity Pulsed Ultrasound

MNE.....	mean normalized expression
Mo.....	Monate
mRNA.....	Boten-RNA
MSCs.....	mesenchymale Stammzellen
MW.....	Mittelwert
N.....	niedrige Intensität, 11,7 mW/cm <sup>2</sup>
OC.....	Osteocalcin
OFF.....	unstimulierte Kontrollgruppe
ON.....	Stimulation mit FLIPUS
p.....	Signifikanzwert
P/S.....	Penicillin/Streptomycin
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
PCR.....	Polymerasekettenreaktion
PFA.....	Paraformaldehyd
PPAR $\gamma$ .....	Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptors gamma
qRT-PCR.....	Quantitative Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion
R.....	Referenzgen
rMSCs.....	mesenchymale Stammzellen, aus Ratten gewonnen
RNA.....	Ribonukleinsäure
RT.....	Reverse Transkriptase
RT-PCR.....	Real Time - Polymerasekettenreaktion
RUNX2.....	Runt-Related Transcription Factor 2
SD.....	Standardabweichung
Sp1.....	Specificity protein 1
T.....	Zielgen
TEAD.....	TEA domain family mem
T <sub>M</sub> .....	Temperaturmaximum
UnC.....	undifferentiated control groups
$\alpha$ -MEM.....	ALPHA-minimal essential medium

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: *Ultrasound in Medicine and Biology*, vol. 42, no. 12, pp. 2965–2974, 2016. Genauere Angaben zur Publikation finden sich im Literaturverzeichnis, sowie in dem Kapitel „Eidesstattliche Versicherung“ auf Seite 60 unter dem Punkt „Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen“.

## Zusammenfassung

Die positive Wirkung von Low Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) auf die Frakturheilung konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden. Genaue Wirkmechanismen und optimale Stimulationsparameter sind momentan noch nicht bekannt. Ziel dieser Studie war es die Effekte von Stimulationsdauer, Intensität und Alter der Spendertiere auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen aus Ratten (rMSCs) nach Stimulation mit einem fokussierten Ultraschall (Focused Low Intensity Pulsed Ultrasound, FLIPUS) zu betrachten.

Für die Isolation der rMSCs wurden die Femurknochen von weiblichen Sprague Dawley Ratten im Alter von 3 Monaten (jung) und 12 Monaten (alt) verwendet. Nach Kultivierung der Zellen bis zur Passage 2 wurden sie pro Tag über 20 Minuten mit einer räumlich und zeitlich gemittelten Intensität von  $11,7 \text{ mW/cm}^2$  ( $I_{\text{SATA}}$ ) bzw. mit  $44,5 \text{ mW/cm}^2$  beschallt. Je nach Gruppenzuteilung erfolgte die Stimulation über 7 bzw. 14 Tage. Für alle Gruppen gab es eine entsprechende nicht stimulierte Kontrollgruppe. Folgende Stimulationsparameter wurden verwendet: Frequenz: 3,6 MHz, Pulszyklus: An/Aus-Verhältnis 27,8 %, Pulswiederholungsrate: 100 Hz. Nach Beendigung der Stimulation wurden die osteogenen Marker Osteocalcin und Runt-Related Transcription Factor 2 (RUNX2) mittels quantitativer Real Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) und die extrazelluläre Kalzifikation mit Hilfe der Alizarin Red S Färbung bestimmt. Für alle Spendertiere wurde zudem ein Charakterisierungsversuch im Hinblick auf das osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierungspotential der Zellen angelegt.

Nach 7-tägiger Stimulation mit  $11,7 \text{ mW/cm}^2$  zeigte sich die Osteocalcinexpression in jungen rMSCs signifikant erhöht. Bei alten rMSCs zeigte sich bei der gleichen Stimulationsdauer und Intensität eine um 40 % erniedrigte RUNX2-Expression, wohingegen eine 14-tägige Stimulation mit  $44,5 \text{ mW/cm}^2$  zu einer Erhöhung von RUNX2 führte. Bei einer FLIPUS-Applikation von  $11,7 \text{ mW/cm}^2$  zeigte sich sowohl nach 7 als auch nach 14 Tagen eine signifikant erhöhte Mineralisierung der Extrazellulärmatrix von jungen rMSCs, wohingegen bei alten rMSCs kein Effekt zu beobachten war.

Die Ergebnisse der Studie zeigen altersabhängige Unterschiede in den durch FLIPUS ausgelösten Effekten. Für die Zukunft und insbesondere für die klinische Anwendung wird

es notwendig sein in weiterführenden Studien optimale Stimulationsparameter für unterschiedliche Altersgruppen zu definieren.

## Abstract

A positive effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) on fracture healing was confirmed in previous studies. However the stimulation mechanisms and optimized stimulation parameters are still a matter of debate. In this study we analyzed the effects of stimulation period, intensity and donor-age on osteogenic differentiation of rat mesenchymal stromal cells (rMSCs).

For isolation of rMSCs we used femur bones from 3-month (young) and 12-month (old) female Sprague Dawley rats. Cells from each donor were tested for their osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation potentials, in order to confirm a pluripotent phenotype. After cultivation until passage 2, the cells were stimulated with focused LIPUS (FLIPUS) for 20 minutes per day with either 11.7 or 44.5 mW/cm<sup>2</sup> acoustic intensity for 7 or 14 days. Each group had its own unstimulated control. We applied the following stimulation parameters: 3.6 MHz frequency, 27.8 % duty cycle, 100 Hz pulse repetition frequency. After stimulation osteogenic markers osteocalcin (OCN) and Runt-Related Transcription Factor 2 (RUNX2) were assessed by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and degree of matrix calcification was analyzed by Alizarin Red S staining.

After FLIPUS stimulation with acoustic intensity of 11.7 mW/cm<sup>2</sup> OCN gene expression was significantly enhanced in young rMSCs on day 7, whereas old rMSCs showed a 40 % decrease in RUNX2 gene expression. However stimulation with 44.5 mW/cm<sup>2</sup> resulted in increased expression of RUNX2 on day 14. FLIPUS treatment with 11.7 mW/cm<sup>2</sup> for either 7 or 14 days enhanced extracellular matrix mineralization in young rMSCs, while old cells did not have any differences with unstimulated control.

The results of this study demonstrated age-related differences in osteogenic response of rMSCs to FLIPUS stimulation. These findings emphasize necessity to optimize stimulation parameters, depending on donor age, for successful clinical administration.

# 1. Einleitung

## 1.1 Knochen und Knochenheilung

Knochen besteht im Inneren aus der Substantia spongiosa mit dem *Cavum medullare* und außen aus der *Substantia compacta*, sowie dem bindegewebigem Periost. Als Teil des Stütz- und Bewegungsapparats ist er ständiger mechanischer Belastung ausgesetzt. Dies hat zum einen dauernde belastungsabhängige Umbauprozesse zur Folge, kann jedoch auch zu einer Fraktur des Knochens führen. Bei der Frakturheilung unterscheidet man die primäre und sekundäre Heilung [1]. Eine primäre Knochenheilung ist nur möglich, wenn die Frakturfragmente einen direkten Kontakt haben. In diesem Fall kommt es zur Heilung der Spongiosa ohne Kallusbildung. Ist eine adäquate Adaptation der Fragmente nicht gegeben bzw. besteht eine Trümmerfraktur, so kommt es zur sekundären Knochenheilung unter vorangehender Kallusbildung [2]. Bei der Kallusbildung wird der Frakturspalt zunächst durch Knorpel- und Bindegewebe überbrückt und anschließend durch enchondrale Ossifikation knöchern umgebaut. In einigen Fällen kommt es zu einer unvollständigen Knochenheilung, wofür es verschiedene Ursachen, wie beispielsweise Infektionen, endokrinologische Erkrankungen und eine mangelnde Ruhigstellung, gibt [2]. Mit zunehmendem Alter verringert sich die Fähigkeit des Knochens zur Regeneration [3] [4].

Die Knochendichte vermindert sich im Laufe des Lebens [5]. Während die Anzahl an Osteoblasten sinkt, erhöht sich die Zahl der Adipozyten im Knochenmark [6]. Stammzellen spielen eine wesentliche Rolle im Knochenstoffwechsel [7]. Mit zunehmendem Alter sinkt die Gesamtzahl der mesenchymalen Stammzellen im Knochen [8]. Vermehrter oxidativer Stress und eine Verringerung des Wnt-Signalwegs führen zu einer Minderung der Osteoblastenanzahl und somit zu einer Abnahme der Knochenmasse [9]. Almeida et al. zeigten, dass daran unter anderem eine altersabhängige Erhöhung des durch Lipidperoxidation entstandenen 4-Hydroxynonenal (4-HNE), sowie eine vermehrte Expression des Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptors PPAR $\gamma$  beteiligt ist [9].

Insbesondere Frauen sind in höherem Alter von Frakturen betroffen [10]. Ein Großteil der Frakturen entstehen in der Folge von osteoporotischen Knochenveränderungen [7]. Bei einer zunehmenden Alterung der Bevölkerung in den westlichen Ländern [11] [12] und

der damit einhergehenden Zunahme der Patienten mit Frakturen [7] steigen die direkten und indirekten Kosten für das Gesundheitssystem an [7]. Es ist daher sowohl im Sinne des Patienten, als auch aus ökonomischer Sicht sinnvoll die Knochenheilung, insbesondere bei älteren Patienten mit einer schlechteren Heilung, zu unterstützen, um eine schnellere und effizientere Frakturheilung zu erreichen.

## 1.2 Stammzellen

Multipotente Stromazellen sind seit Jahrzehnten bekannt. Als ihre klassifizierenden Eigenheiten wurden ihre Adhärenz, ihre Klonogenität, eine fehlende Phagozytose und fibroblastische Eigenschaften beschrieben [13]. Stammzellen können aus verschiedenen Organen und Geweben, wie beispielsweise Plazenta [14], Knochen [15], Fettgewebe [16] und Nabelschnurblut [17] gewonnen werden. Sie sind multipotente Vorläuferzellen [18], die sich zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten [19], aber beispielsweise auch zu Zellen des hämatopoetischen Systems [20] entwickeln können. Dabei sind mesenchymale Stammzellen (MSCs) in der Lage durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Heilung von Geweben zu beeinflussen [21].

Die Verwendung von Stammzellen nimmt zunehmend Einzug in die Therapiekonzepte verschiedener Erkrankungen und bietet neue regenerative Therapieansätze. So werden Stammzellen beispielsweise bei Patienten mit kritischer Ischämie der Extremitäten ohne Behandlungsoption [22], bei Wundheilungsstörungen der Haut [23], Patienten nach Myokardinfarkt [24], Parkinsonpatienten [25], beim Sjögren-Syndrom [26], sowie bei Arthrose [27] versuchsweise angewandt. Dabei ist zu beobachten, dass nicht alle Patienten gleichermaßen auf die Gabe von Stammzellen ansprechen [28] [29]. Verschiedene exogene und endogene Faktoren beeinflussen die Erfolgchance der Stammzelltherapie. Dazu zählen beispielsweise die Anzahl der transplantierten Zellen [30], das Krankheitsstadium [31], das Alter des Patienten [31], sowie das Alter des Donors [31] [21].

Alterungsprozesse nehmen einen negativen Einfluss auf das osteogene Differenzierungspotential [32] [33] und den therapeutischen Nutzen von MSCs [34]. Während das Potential zur osteogenen Differenzierung in alten MSCs sinkt, steigt das Ausmaß der adipogenen Differenzierung [6]. Bei der Transplantation von Stammzellen in ältere Empfängertiere wurden in den Tieren, die Stammzellen von älteren Spendertieren

erhalten hatten, eine geringere Expression von Osteocalcin und eine geringere Anzahl an Alkalischer Phosphatase positiven Zellen im Gegensatz zu jungen Spendertieren nachgewiesen [35].

Die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen wird durch verschiedene intrinsische und extrinsische Faktoren gesteuert [18]. Ältere MSCs sind insbesondere in höheren Passagen stärker anfällig für Seneszenz als junge MSCs und zeigen eine verringerte Motilität und Migrationsfähigkeit [8]. Yang et al. zeigten, dass die verminderte Migrationsfähigkeit von MSCs im Knochenmark von älteren Mäusen durch Regulation des JNK Signalwegs (JNK: C-Jun-N-terminale Kinase) erfolgt [36].

Bei den Alterungsprozessen in vivo spielt die Extrazelluläre Matrix-Umgebung der Stammzellen eine entscheidende Rolle. Mit zunehmendem Alter verändert sich das Milieu so, dass durch oxidativen Stress das Differenzierungspotential der Zellen vermindert wird [37].

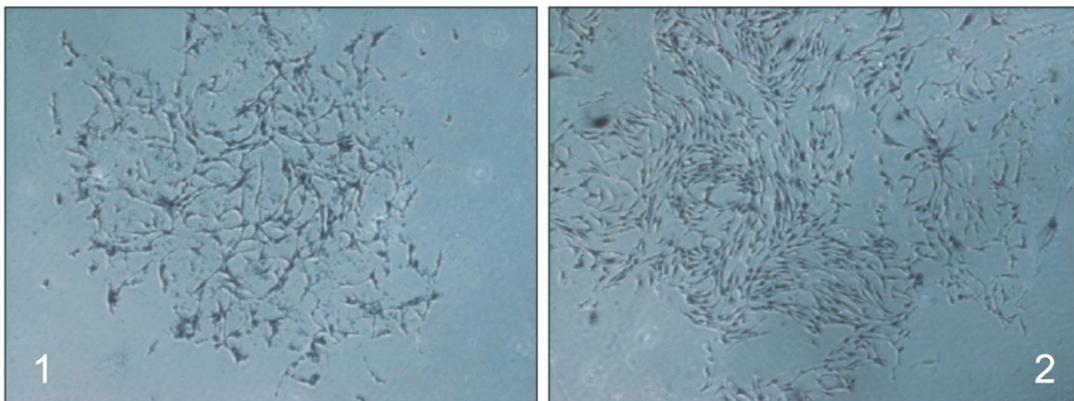


Abb. 1: CFU-F (colony forming unit-fibroblasts). Zu sehen ist die Aussaat von aus Desmodont gewonnenen Stammzellen an Tag 0 (Bild 1) und an Tag 7 (Bild 2). Die Kultivierung erfolgte mit alpha-MEM, FBS (fetal bovine serum), Ascorbinsäure-2-Phosphat, Glutamin, sowie Penicillin und Streptomycin. Die an Tag 0 bereits adhärennten Stammzellen bilden zunehmend Kolonien [38].

Während mesenchymale Stammzellen, so lange sie sich im Knochenmark befinden, in der G<sub>0</sub>-Phase verbleiben, entwickeln sich bei in vitro Kultivierung aus einzelnen Zellen Kolonien (colony forming unit-fibroblasts, CFU-F) [33].

Die Größe dieser Kolonien kann jedoch variieren, ebenso ihr Aussehen und die Expression verschiedener Enzyme [39]. Owen et al. [39] zeigten, dass diese Faktoren bei in vitro Kultivierung beeinflusst werden können. So erhöht der epidermale

Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) die Größe der Kolonien, vermindert jedoch die Expression an Alkalischer Phosphatase. Hydrocortison hingegen fördert die osteogene Differenzierung [39].

Stammzellen weisen ein hohes Differenzierungspotential auf, proliferieren schnell und lang und bieten somit eine reiche Quelle an Zellen für die Forschung [40]. Da sie leicht zu isolieren sind [41] und zudem ihr hohes Differenzierungspotential auch bei einer in-vitro Kultivierung in den ersten Passagen behalten [19], bieten sie sehr gute Voraussetzungen für in vitro und in vivo Experimente. Stammzellen werden durch mechanische Stimuli, wie beispielsweise Vibration, Kompression, Dehnung und Scherkräfte beeinflusst [42] [43]. Mit zunehmendem Alter der MSCs ändert sich ihr Verhalten auf mechanische Einflüsse [42].

Es wurde bereits gezeigt, dass durch Stimulation mit Ultraschall die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen verbessert werden konnte [44]. Die genauen Mechanismen sind dabei jedoch noch nicht vollständig verstanden.

### **1.3 FLIPUS**

Ultraschall mit einer räumlich und zeitlich gemittelten Intensität von  $< 100 \text{ mW/cm}^2$  (spatial average temporal average intensity,  $I_{\text{SATA}}$ ) wird vor allem zu diagnostischen Zwecken verwendet, wohingegen zur therapeutischen Anwendung eine höhere Intensität von  $> 100 \text{ mW/cm}^2$  genutzt wird [45].

Für die Geweberegeneration findet bisher vor allem ein Low-Intensity Pulsed Ultrasound System (LIPUS) Verwendung [46]. Es wird sowohl zur Behandlung von akuten Frakturen [47], Delayed-Union [48] und Non-Union Frakturen [49], aber auch in der Physiotherapie [50] eingesetzt. In präklinischen Studien konnte zudem ein positiver Effekt auf die Heilung von Weichteilgewebsschäden beobachtet werden [51]. Eine genaue und umfassende Erklärung der Wirkung von Ultraschall auf die Knochenheilung gibt es noch nicht, jedoch haben zahlreiche Studien gezeigt, dass unterschiedliche Signalwege beeinflusst werden, die einen positiven Effekt auf die Heilung haben [42] [44] [52] [53].

Es wurde zudem bereits gezeigt, dass mit Hilfe von Ultraschall die Proliferation und Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen gesteigert werden kann [42] [54] [55].

Bei den meisten LIPUS-Systemen werden nicht fokussierte Ultraschallwandler angewandt. Bei Stimulationsversuchen mit solchen Systemen kommt es jedoch zu

störenden Nebeneffekten, wie beispielsweise stehende Wellen und Temperaturerhöhungen in der Wellkammer durch die Erwärmung der Ultraschallwandler [45]. Diese ungewünschten Einflüsse können zu fehlerhaften Rückschlüssen von in-vitro Ergebnissen auf in-vivo durchgeführte Experimente führen [42].

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. Kay Raum hat daher ein neues LIPUS-System entwickelt [45], bei dem der Ultraschall fokussiert appliziert wird. Der Focused Low-Intensity Pulsed Ultrasound (FLIPUS) mindert die problematischen Nebeneffekte des LIPUS, lässt sich exakt fokussiert applizieren und stellt somit eine vielversprechende Methode für in-vivo und in-vitro Anwendungen dar [45]. Aufgrund der verringerten Nebeneffekte und der Möglichkeit der genauen Applikation des Ultraschalls wurde für die Durchführung der Studie das von der Arbeitsgruppe zuvor entwickelte FLIPUS-System verwendet.

### Aufbau der Stimulationseinheit

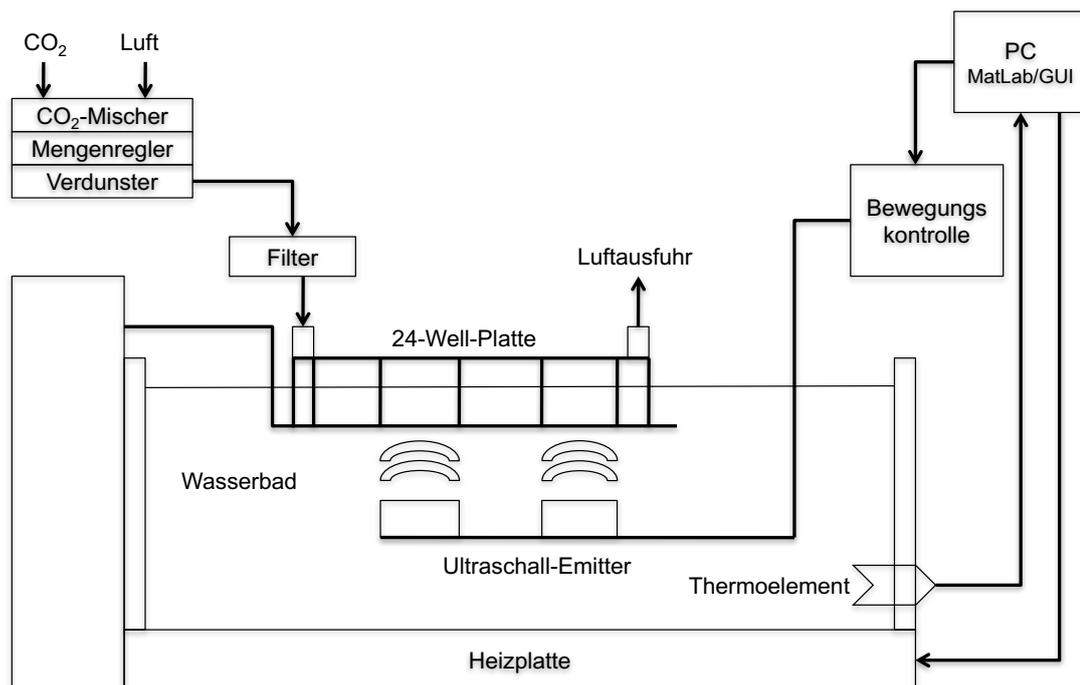


Abb. 2: Stimulationsaufbau. Die mesenchymalen Stammzellen in der 24-Well-Platte wurden von unten mittels Ultraschallwandler mit einem fokussierten Ultraschall beschallt. Die Wellplatten mit den Zellen wurden mit einer Inkubationskammer in ein 37 °C warmes Wasserbad eingesetzt. Das Programm MATLAB 2009a (MatLab/GUI) steuerte die Temperatur, sowie die Bewegung der Wandler. Den Zellen stand während der Stimulation über eine Luftzu- und -abfuhr ein gefiltertes Luftgemisch mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % bei einer Flussrate von 70 ml/min zur Verfügung.

Puts et al. zeigten, dass eine Intensität von  $44,5 \text{ mW/cm}^2$  zu einer erhöhten Expression osteogener Marker in MSCs, die aus Ratten gewonnen wurden, führte [45]. Bei dem FLIPUS-System erfolgt die Stimulation mit Hilfe eines Arrays von 4 Ultraschallwandlern, die zu jeder Zeit einen exakten Abstand zu den zu stimulierenden Wellplatten haben. Der Abstand des fokussierten Ultraschalls zu den Wellplatten betrug  $13,3 \text{ mm}$  [42]. Die Ultraschallwandler sind identisch aufgebaut (Durchmesser:  $19 \text{ mm}$ , Epoxid-Linse mit Fokussierung des Ultraschalls in  $22,8 \text{ mm}$  Entfernung, Frequenz:  $5 \text{ MHz}$ ) und können gleichzeitig 4 Zellkulturkammern einer Wellplatte stimulieren [45].

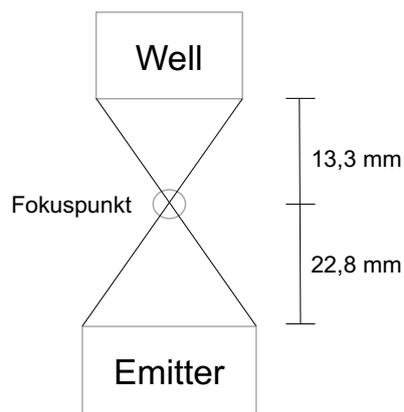


Abb. 3: Distanzen zwischen Emitter, Well und Fokuspunkt des Ultraschalls.

## 1.4 Aufgabenstellung

Mit der Entwicklung des FLIPUS-Systems und damit der Verbesserung der bisher vorherrschenden LIPUS-Anwendung wurden die Möglichkeiten der ultraschallbasierten Therapieansätze deutlich verändert. Nun ist es nötig, optimale Bedingungen für eine möglichst effiziente Stimulation zu etablieren. Einige Optimierungen, wie beispielsweise die Testung einer effektiven  $I_{\text{SATA}}$  wurden bereits durchgeführt [45]. Bislang ungeklärt ist die Frage nach altersabhängigen Unterschieden bei der Stimulation mit FLIPUS.

Da Alterungsprozesse einen negativen Einfluss auf das Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen nehmen, wurde für diese Arbeit die These aufgestellt, dass bei gleichen Stimulationsbedingungen mit FLIPUS, je nach Alter der Spendertiere, Unterschiede in der Expression von RUNX2 und Osteocalcin, sowie bei der Mineralisierung der Extrazellulärmatrix (EZM) beobachtet werden können.

Würde sich das bestätigen, müsste man in zukünftigen Projekten optimale Stimulationsparameter je nach Alter definieren. Die Beantwortung der These ist

wesentlich für die weitere Verbesserung der Ultraschall- und Stammzelltherapie bei Patienten und folgt dem Ansatz der individualisierten Therapie.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Material

#### Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
2-Propanol	Sigma Aldrich, D
Adipogenes Supplement	GIBCO <sup>®</sup> , D STEMPRO <sup>®</sup> MSC supplement
ALPHA-minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM)	Biochrom AG, D
Alcian Blue 8GX Dye content	Sigma Aldrich, D
Alizarin Red S	Sigma Aldrich, D
Cetypyridiniumchlorid	Sigma Aldrich, D
Chondrogenes Supplement	GIBCO <sup>®</sup> , D STEMPRO <sup>®</sup> MSC supplement
Dexamethason	Sigma Aldrich, D
Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM)	Biochrom AG, D
Ethanol (70 %)	Herbeta, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, D
GlutaMAX	Biochrom AG, D
Kryo-SFM	Promocell
L-Ascorbic-acid-2-phosphat	Sigma Aldrich, D
Oil Red O	Sigma Aldrich, D
Osteogenes Supplement	GIBCO <sup>®</sup> , D STEMPRO <sup>®</sup> MSC supplement
Pannexin NT	PAN Biotech, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, D
Penicillin/Streptomycin (P/S)	BIOCHROM, D
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, D
Primer für PCR	DNA TibMolBiol, D
RNA-II-Isolationskit	Machery Nagel GmbH, D
Salzsäure (HCl)	Fluka

qScript™ cDNA SuperMix	QuantaBioSciences™, USA
PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix	QuantaBioSciences™, USA
Trypanblau powder	Sigma Aldrich, D
Trypsin	Biochrom AG, D
β-Glycerophosphate disodium salt hydrate	Calbiochem®, D

Tab. 1: Reagenzien.

## Verbrauchsmaterial

Materialien	Hersteller
8-er SoftStrips für PCR	Biozym Scientific GmbH
24-Well-Platte	BD Falcon®, USA
96-Well-Platte	Sarstedt, D
Cell Strainer 100 µl Nylon	BD Falcon®, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf®, D
Eppendorfpipetten	Eppendorf®, D
Reaktionsgefäße	BD Falcon, USA
Kryogefäße	NUNC, D
Pipettenspitzen	Eppendorf®, D
Serologische Pipetten	BD Falcon®, USA
Zählkammer	DigitalBio, D
Zellkultur-Flaschen (175 cm <sup>2</sup> )	TPP, SWI

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien.

## Geräte

Geräte	Hersteller
Bewegungscontroller	Newport, D
Translationsachsen	Newport, D
cDNA-Cycler/Mastercycler (RealPlex)	Eppendorf, D
CO <sub>2</sub> -Inkubator	ThermoScientific, D
CO <sub>2</sub> -Luft-Gasmischer	Life Cell Instr., KOR

Kryoeinfrierbehälter	Nalgene, D/Nunc
Empfänger (dual pulser/receiver)	JSR Ultrasonics, USA
Fotoapparat	Nikon, D
Gefrierschrank (-22 °C)	Liebherr, D
Lichtmikroskop	Leica, D
Microplate Reader	BIORAD, D
Optischer Tisch	Newport, D
Realplex Cycler (PCR-Maschine)	Eppendorf
Sicherheitswerkbank mit Laminarfluss-Filterabzug	ThermoScientific, D
Spektrometer (Reinheit RNA)	ThermoScientific, D
Sterile Knochensäge	DREMEL
Temperaturregler	JUMO, D
Tischzentrifuge	neoLab, D
Ultraschall-Emitter	STT-Richter, D
Vakuumpumpe	Integra, D
Verstärker	ENI, D
Vortexer	VWR, D
Waveform-Generator	Agilent, USA
Wasserbad (37 °C)	Memmert, D
Zentrifuge	Eppendorf, D
Zentrifuge	Eppendorf, D

Tab. 3: Geräte.

## Software

Programm	Hersteller
MatLab R2009b	The MathWorks, USA
Microplate Manager 5.2	BIO-RAD, USA
MS-Office 2016	Microsoft, USA
PCR Software	-
Nanodrop ND-1000 v.3.7.1.	ThermoScientific, D

Tab. 4: Software.

## Primer für die PCR

Marker	Richtung	Sequenz 5'-3'	Länge (bp)	T <sub>M</sub> (°C)	GC (%)	Produkt (bp)	Effizienz
GAPDH	links	gtcgggtgtaacg gatttg	19	59,9	52,6	218	1,9
	rechts	ggaagatggtgat gggttt	20	60,2	45,0		
RUNX2	links	gccgggaatgatg agaacta	20	60,0	50,0	267	2
	rechts	gaggcggtcaga gaacaaac	20	59,8	55,0		
OC	links	agctcaaccccaa ttgtgac	20	57,3	57,9	131	1,9
	rechts	agctgtgccgtcca tacttt	20	57,3	55,0		

Tab. 5: Primer für die PCR. Oligonukleotidlänge in Basenpaaren (bp), T<sub>M</sub> = Temperaturmaximum in Grad Celsius (°C), GC = Guanin-Cytosin in Prozent (%), GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, RUNX2 = Runt-Related Transcription Factor 2, OC = Osteocalcin.

## 2.2 Methodik

Für die Isolierung der zu untersuchenden mesenchymalen Stammzellen (rMSCs) wurden 9 weibliche Sprague Dawley Ratten im Alter von 3 Monaten und 8 Ratten im Alter von 12 Monaten verwendet. Die Nutzung der Zellen dieser Tiere entsprach dem Deutschen Tierschutzgesetz §4 und wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin zugelassen (Registrierungsnummer T 137/13).

Die Tiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchow Klinikum der Charité untergebracht. Sie wurden von einer Veterinärmedizinerin fachgerecht versorgt und getötet. Nach der Tötung wurden die Tiere umgehend zur Knochenentnahme und Stammzellgewinnung ins Labor gebracht.

## 2.2.1 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden zunächst in zwei Gruppen unterteilt:

1. junge Ratten (Alter: 3 Monate, jung)
2. alte Ratten (Alter: 12 Monate, alt)

Nach der Isolation der rMSCs wurde die Zuordnung der Zellen zum Spendertier dokumentiert und die Gruppenzuordnung in den folgenden Experimenten beibehalten.

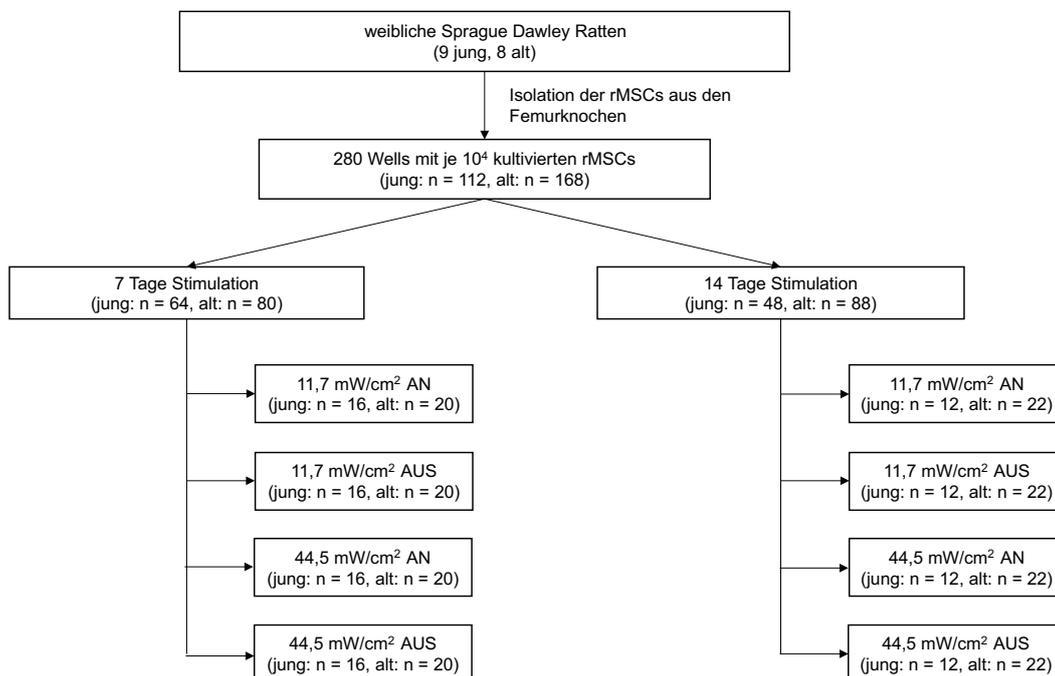


Abb. 4: Übersicht der Gruppeneinteilung. jung = 3 Monate, alt = 12 Monate, AN = Stimulation mit angegebener  $I_{SATA}$ , AUS = keine Stimulation,  $I_{SATA}$  = räumlich und zeitlich gemittelte Intensität.

Für die Versuchsdurchführung wurde in zwei weitere Gruppen unterteilt:

1. 7 Tage Stimulation
2. 14 Tage Stimulation

Über diese Zeiträume wurden folgende  $I_{SATA}$  von FLIPUS appliziert und so in weitere vier Gruppen unterteilt:

1. 11,7 mW/cm<sup>2</sup> AN (Stimulation mit der angegebenen  $I_{SATA}$ )
2. 11,7 mW/cm<sup>2</sup> AUS (unstimulierte Kontrollgruppe)
3. 44,5 mW/cm<sup>2</sup> AN
4. 44,5 mW/cm<sup>2</sup> AUS

Die Intensität von 11,7 mW/cm<sup>2</sup> wird im Folgenden als niedrig (N), die Intensität von 44,5 mW/cm<sup>2</sup> als hoch (H) angegeben.

Nach der FLIPUS-Stimulation folgte eine Auswertung der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix mittels Alizarin Red S Färbung, sowie eine Quantifizierung osteogener Marker mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR). Mit jeder isolierten rMSC-Linie einer Ratte wurde zudem ein Charakterisierungsversuch hinsichtlich des multipotenten Differenzierungspotentials durchgeführt.

### 2.2.2 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen

Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark beider Femurknochen der Tiere isoliert. Nach der Freipräparation wurden die Knochen entnommen und die rMSCs nach Protokoll [56] isoliert. Am Vortag der Isolation wurde das Kulturmedium vorbereitet und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

#### Zusammensetzung Kulturmedium

Komponente	Stock Lösung	Finale Konzentration	Volumen
DMEM	1 x	1 x	500 ml
FCS	100 %	10 %	+ 50 ml
P/S	100 %	1 %	+ 5 ml
Glutamax	100 x	1 x	+ 5 ml

Tab. 6: Zusammensetzung Kulturmedium. DMEM = Dulbeccos Minimal Essential Medium, FCS = Fötales Kälberserum, P/S = Penicillin/Streptomycin.

Verwendete Geräte, Gefäße und Instrumente wurden vor der Verwendung autoklaviert oder aus sterilen Verpackungen entnommen. Am Isolationstag wurde das Medium zunächst im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Der unsterile Arbeitsplatz wurde mit einer sterilen Unterlage, sterilisierten Pinzetten und Skalpelln vorbereitet. Die Femurknochen der Tiere wurden beidseits frei präpariert und entnommen. Beide Knochen wurden in ein beschriftetes Reaktionsgefäß (50 ml) mit PBS gegeben. Erfolgte die Präparation mehrerer Tiere (maximal 3) an einem Tag, so blieben die Knochen des ersten Tieres bei Raumtemperatur im PBS bis die Knochen des nächsten Tieres entnommen waren. Die

Präparation der Tiere erfolgte unmittelbar nacheinander. Alle weiteren Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank.

Die Knochen eines Tieres wurden in eine Petrischale mit PBS gegeben. Unter Fixierung mittels Pinzette, wurden die Knochen in der Mitte mit einer Knochensäge geteilt. Es folgte eine einminütige Zentrifugation der Knochenhälften bei 400 x g. Die entstandenen Knochenmarkpellets wurden mit je 1 ml Medium in Suspension gebracht. Die anschließende Kultivierung erfolgte in einer T175-Zellkulturflasche mit 50 ml Expansionsmedium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach 24 Stunden wurden die nun adhärennten Zellen gewaschen und erhielten 50 ml frisches Expansionsmedium. Dieses wurde jeden dritten Tag erneuert. Die Zellen wurden täglich unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Dabei wurde die Form der Zellen, sowie die Konfluenz optisch beurteilt. Ab einer Dichte von 80 % wurden die Zellen passagiert.

### **2.2.3 Passagieren der Zellen**

Das am Vortag wie unter 2.2.2 vorbereitete Kulturmedium, Trypsin, sowie PBS wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche vorsichtig abgesaugt. Zur Beseitigung von FCS-Rückständen, die die Trypsinaktivität hemmen würden, wurde die Zellkulturflasche mit 20 ml erwärmten PBS gespült. Die Zellen wurden nun mit 10 ml Trypsin bei 37 °C inkubiert. Trypsin ist eine Endoprotease, die extrazelluläre Proteine spaltet und so zu einer Ablösung der adhärennten Zellen führt. Um eine zelluläre Schädigung zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht länger als 5 Minuten trypsinisiert wurden. Waren die Zellen gelöst wurde das Trypsin mit 10 ml Kulturmedium inaktiviert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. 20 µl der Zellsuspension wurden für die Zellzahlbestimmung abgenommen und 10 µl davon mit 10 µl Trypanblau gemischt. 2 x 10 µl der 1 : 1 Mischung wurden in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellzahl ermittelt. Lebende Zellen nehmen Trypanblau nicht auf, so dass sie sich lichtmikroskopisch hell darstellten. Tote bzw. geschädigte Zellen hingegen nehmen den blauen Farbstoff auf. Die Neubauer Zählkammer hat zwei Raster mit jeweils vier Quadranten à 8 Quadrate. Pro Zählkammer wurden acht Quadrate mit einem Hand-Klick-Zähler ausgezählt. Dabei wurden die Kästchen innerhalb eines Quadrats mäanderförmig betrachtet. Lebende und tote Zellen wurden dabei getrennt gezählt und die Vitalität prozentual ermittelt.

### Berechnung:

Zellzahl / ml = Mittelwert der ausgezählten Quadrate  $\times 2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$

Zellzahl<sub>gesamt</sub> =  $V_{\text{Zellsuspension}} \times \text{Zellzahl / ml}$

Vitalität [%] =  $\text{Tote Zellen} \times 100 / \text{Vitale Zellen}$

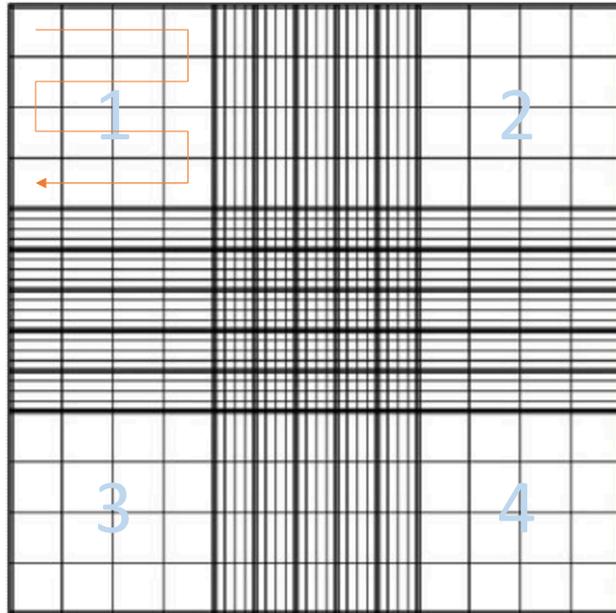


Abb. 5: mäanderförmige Zählweise der Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer.

Die verbliebene Zellsuspension wurde bei  $400 \times g$  fünf Minuten zentrifugiert und das Pellet mit 20 ml frischem Kulturmedium erneut in Suspension gebracht. Das Gemisch wurde in die bereits zuvor verwendete Zellkulturflasche gegeben und mit 15 ml Kulturmedium aufgefüllt. Durch Schwenken der Flasche wurde sichergestellt, dass die Zellen im gesamten Medium verteilt waren. Anschließend wurde die Zellkulturflasche wieder in den  $\text{CO}_2$ -Inkubator gestellt. Die Zellen befanden sich nun in Passage 1. Dieses Vorgehen wurde fortgesetzt, bis die Zellen in Passage 2 eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten.

### 2.2.4 Charakterisierung von rMSCs

Für alle isolierten rMSCs wurde eine Charakterisierung durchgeführt, um deren Potential zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung zu testen.

Für eine standardisierte Charakterisierung wurde ein kommerzielles Kit der Firma GIBCO® verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers in 48-Well-Platten. Dabei wurden in insgesamt 6 Wells Zellen kultiviert.

### Basalmedium für alle Charakterisierungen

Komponente	Stock Lösung	Finale Konzentration	Volumen
α-MEM	1 x	1 x	500 ml
Pannexin NT	100 %	10 %	+ 50 ml
P / S	100 %	1 %	+ 5 ml
Glutamax	100 x	1 x	+ 5 ml

Tab. 7: Zusammensetzung Basalmedium für alle Charakterisierungsversuche. α-MEM = ALPHA-minimal essential medium, P/S = Penicillin/Streptomycin.

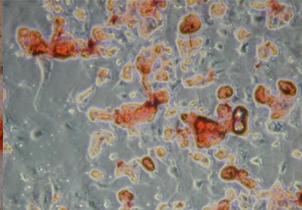
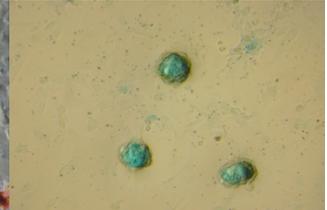
### Gegenüberstellung der Charakterisierungsversuche

	Osteogene Differenzierung	Adipogene Differenzierung	Chondrogene Differenzierung
Induktionsmedium (300 µl)	Osteogenes Medium: 270 µl	Adipogenes Medium: 270 µl	Chondrogenes Medium: 270 µl
	Basalmedium + 30 µl osteogenes Supplement	Basalmedium + 30 µl adipogenes Supplement	Basalmedium + 30 µl chondrogenes Supplement
Verwendete rMSCs in Passage	2	2	3
Anzahl der rMSCs pro Well	5 x 10 <sup>3</sup> Zellen	1,6 x 10 <sup>4</sup> Zellen	10 <sup>6</sup> Zellen
Vorkultivierung mit Expansionsmedium	24 Stunden	24 Stunden	2 Stunden
Mediumwechsel	Alle 3 Tage	einmalig	Alle 3 Tage
Kultivierungsdauer	14 Tage	7 Tage	21 Tage

Tab. 8: Gegenüberstellung der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Charakterisierungsversuche. rMSCs = mesenchymale Stammzellen (aus Ratten gewonnen).

Da für die chondrogene Differenzierung eine sehr hohe Zelldichte nötig war, wurde zunächst eine Zellsuspension mit  $2 \times 10^7$  rMSCs in 100  $\mu$ l Basalmedium hergestellt und davon jeweils 5  $\mu$ l in der Mitte der Wells positioniert. Die Zellmasse wurde für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend chondrogenes Medium bzw. Basalmedium bei den Kontrollen zugegeben.

### Auswertung der Charakterisierung

	Osteogene Differenzierung	Adipogene Differenzierung	Chondrogene Differenzierung
Methode	Alizarin Red S Färbung, rötliche Darstellung kalzifizierter Extrazellulärmatrix	Oil Red O Färbung, rote Darstellung hydrophober Lipide	Alcian Blue Färbung, blaugrüne Darstellung der Polysaccharide von Chondrozyten
Wellenlänge	560 nm	490 nm	Messung nicht möglich (lediglich optischer Nachweis)
Beispielbild der Färbung			

Tab. 9: Methodik zur Auswertung der Charakterisierungsversuche. Bilder mit 20-facher Vergrößerung.

### 2.2.5 Kryokonservierung

Überschüssige rMSCs wurden in Stickstoff eingelagert und standen so für die Experimente anderer Studien zur Verfügung. In unserer Studie verwendeten wir keine kryokonservierten Zellen.

Wurde nach der letzten Passage eine so hohe Zellzahl festgestellt, dass ausreichend Zellen für eine Kryokonservierung vorhanden waren, so wurde die überschüssige Menge abgenommen und in ein Reaktionsgefäß (50 ml) überführt. Es erfolgte die Zählung und Zentrifugation (5 Minuten, 400 x g) der Zellen.

$3 \times 10^5$  rMSCs wurden in 500  $\mu$ l Kryo-SFM gegeben, in ein Kryogefäß überführt und in einem Kryoeinfrierbehälter zunächst bei  $-80$  °C eingefroren. Der Einfrierbehälter garantierte dabei, dass die Zellen nicht schneller als  $1$  °C pro Minute abkühlten und ermöglichte ein schonendes Einfrieren der Zellen. Nach 2 Tagen wurden die rMSCs in einen Stickstofftank (Temperatur  $-186$  °C) überführt.

## 2.2.6 Stimulation mit FLIPUS

Für die Stimulation wurden in einer 24-Well-Platte pro Well  $1 \times 10^4$  rMSCs in Passage 2 mit einer Konfluenz von 80 % in 1 ml Basalmedium (siehe 2.2.4) nach folgendem Schema ausgesät.

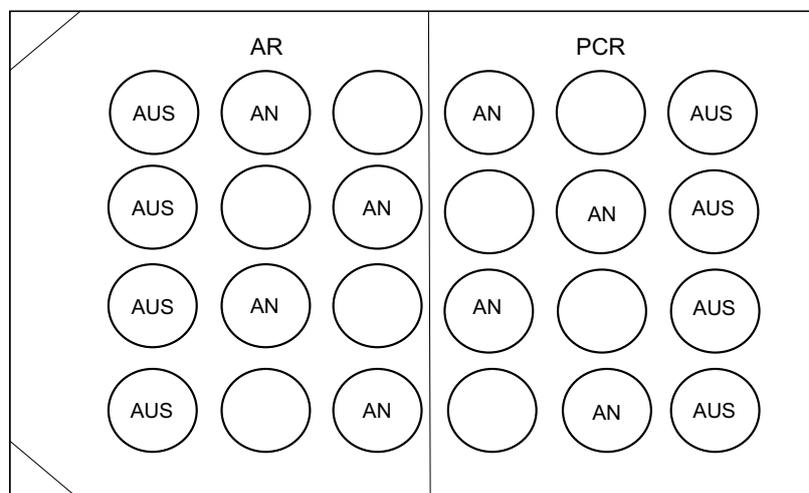


Abb. 6: Aussaat der Zellen für die Stimulation mit FLIPUS. AUS = unstimulierte Kontrollgruppe, AN = Stimulation mit FLIPUS, AR = Zellen zur Alizarin Red S Färbung genutzt, PCR = Zellen für PCR genutzt.

Die Platten blieben für 24 Stunden im  $\text{CO}_2$ -Inkubator. Am Folgetag wurde das Kulturmedium durch 1 ml osteogenes Medium pro Well ersetzt. Vor Beginn der Stimulation wurde das für den Wassertank benötigte Wasser deionisiert, sterilisiert und mit Hilfe einer Vakuumpumpe entgast. Das Wasser wurde alle 2 Tage ausgewechselt und wurde vor dem Einsetzen der 24-Well-Platten auf  $37$  °C mittels einer computergesteuerten Heizplatte erwärmt.

Für die 2D-Ultraschallstimulation wurde ein von der Arbeitsgruppe entwickeltes FLIPUS-System verwendet [45].

Die 24-Well-Platten mit den mesenchymalen Stammzellen wurden mittels einer Inkubationskammer im Wassertank fixiert. Die Konstruktion ließ kein Eindringen von Wasser in den Luftraum der Inkubationskammer zu. An die Luftzufuhr war ein automatischer CO<sub>2</sub>-Mischer angeschlossen, der einen CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % generierte. Die Temperatur der Luft wurde konstant bei 37 °C gehalten und mit einer Flussrate von 70 ml/min abgegeben [45][31]. Der Boden der Wellplatten stand in direktem Kontakt zum Wasserbad, so dass sowohl die Temperatur-, als auch die Ultraschallübertragung gesichert werden konnten. Dadurch wurde auch einer Überhitzung der Ultraschallwandler und damit einer Verfälschung der Ergebnisse entgegengewirkt.

### Osteogenes Medium

Komponente	Ursprüngliche Konzentration	Konzentration pro ml/well	Volumen
α-Basismedium	1 x	1 x	47,25 ml
Ascorbic Acid	50 mM	10 mM	+ 500 µl
β-Glycerophosphat	280 mM	10 mM	+ 1750 µl
Dexamethason	10 µM	100 nM	+ 500 µl

Tab. 10: Zusammensetzung des osteogenen Mediums.

### Stimulationsparameter

Medium pro Well:	1 ml
Zellzahl pro Well:	1 x 10 <sup>4</sup>
Ultraschallfrequenz:	3,6 MHz
Pulszyklus	2,78 ms Stimulation „an“ und 7,22 ms „aus“ (An/Aus-Verhältnis: 27,8 %)
Pulswiederholungsrate :	100 Hz
Intensität: (I <sub>SATA</sub> )	11,7 mW/cm <sup>2</sup> und 44,5 mW/cm <sup>2</sup>
SATA = spatial average, temporal average	
Stimulationsdauer pro Tag:	20 Minuten
Stimulationszeitraum:	7 Tage und 14 Tage

Tab. 11: FLIPUS-Stimulationsparameter.

Durch eine Heizplatte mit Kontrolleinheit wurde die Wassertemperatur konstant bei 37 °C gehalten. Unter die Platten wurde eine Halterung mit Ultraschallwandlern positioniert. Vier Wandler wurden direkt unter die zu stimulierenden Wells positioniert. Unter den Wells mit den Kontrollgruppen befanden sich keine Ultraschallwandler.

Die Wells wurden nun jeweils für 20 Minuten mit FLIPUS (H, N) beschallt. Die Kontrollgruppen blieben unbeschallt. Nach Ende der Stimulation wurde die Platte wieder zurück in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt.

Die Durchführung der Stimulation inklusive der Positionierung der Ultraschallemitter erfolgte mit Hilfe von MATLAB 2009a.

### **Quantitative Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)**

Die Reverse Transkriptase (RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die vorhandene Boten-RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA) umschreibt. Nicht-codierende Intron-Sequenzen fehlen bei der cDNA. Für den Schritt der RT-PCR wurde der qScript cDNA SuperMix<sup>TM</sup> verwendet.

Während der PCR wird die cDNA durch Denaturierung bei 96 °C gespalten (Denaturierung) und Vorwärts-, sowie Rückwärtsprimer lagern sich bei primerspezifischen Temperaturen an (Primerhybridisierung). Die Primer dienen der Initialisierung der Syntheseleistung der DNA-Polymerase. Bei 72 °C beginnt die DNA-Polymerase vom 3'-Ende her die komplementären Stränge der DNA-Einzelstränge zu bilden (Elongation). Eine Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt durch Fluoreszenzmessung mit dem Farbstoff SYBR Green I. Dieser bindet an Doppelstrang-DNA, was zum einen zu einer Absorption von blauem Licht bei 494 nm, zum anderen zu einer Emission von grünem Licht bei 521 nm führt. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge der PCR-Produkte. Zwar bindet der Farbstoff ebenfalls an Einzelstrang-DNA und RNA, jedoch ist dabei die Fluoreszenz deutlich geringer. Die Fluoreszenzmessung erfolgt während der exponentiellen Phase der PCR, also dem Zeitpunkt, währenddessen optimale Reaktionsbedingungen bestehen und daher eine exponentielle Vervielfältigung der PCR möglich ist.

### **RNA-Isolation**

Die Isolation der RNA erfolgte am letzten Stimulationstag (Tag 7 bzw. Tag 14) nach Herstellerprotokoll mittels des Kits NucleoSpin® RNA II. Nachdem die RNA gewonnen

wurde, wurde ihre Menge [ng/μl], sowie deren Reinheit mit Hilfe eines Spektrometers bestimmt. Hierfür wurde die RNA bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen. Dabei wurde ein 260/280-Quotient von ca. 2 als rein gewertet.

### **Reverse Transkriptase PCR**

Für die Umschreibung von mRNA in cDNA wurden jeweils 200 ng RNA dem qScript cDNA SuperMix™ zugegeben und mit RNase freiem Wasser auf 20 μl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte nach Herstellerangaben im Mastercycler. Die umgeschriebene cDNA wurde dann jeweils in beschriftete Reaktionsgefäße (1,5 ml) gegeben und bei -20 °C gelagert.

### **qPCR**

Die folgenden Schritte erfolgten auf Eis oder in einem gekühlten Plattenhalter. Die gefrorenen cDNA Proben wurden nach dem Auftauen und der ersten Zentrifugation im Verhältnis von 1 : 9 mit RNase freiem Wasser verdünnt und erneut zentrifugiert. Der Reaktionsmix wurde nach Herstellerangaben mit dem PerfeCTa®SYBR®Green SuperMix angesetzt und in einem Eppendorf real time Mastercycler inkubiert. Pro cDNA-Probe wurden die drei Marker Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Osteocalcin (OC) und Runt-Related Transcription Factor 2 (RUNX2) bestimmt. GAPDH diente als Referenzgen und wurde zur Normalisierung der Expression der Zielmarker verwendet. Dies ermöglichte eine Vergleichbarkeit der Expressionsergebnisse unabhängig von der eingesetzten RNA-Menge. Bei GAPDH handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Gen, das nicht von stimulierenden Faktoren beeinträchtigt werden sollte. Primer Designs mit gleichen Annealingtemperaturen und deren Effizienztests wurden vor der PCR-Analyse durchgeführt.

Für die quantitative Auswertung wurden die Ct-Werte (Cycle threshold) der Zielgene und GAPDH bestimmt. Der Ct-Wert gibt dabei den Wert an, ab dem das Fluoreszenzsignal des amplifizierten Gens erstmals den Schwellwert überschreitet. Die Ct-Werte wurden mittels folgender Formel berechnet:

$$\frac{E_{T_1}^{Ct}}{E_{R_1}^{Ct}} = \frac{E_{T_2}^{Ct}}{E_{R_2}^{Ct}}$$

1 = Probe (stimuliert)  
 2 = Kontrolle (unstimuliert)  
 E = Effizienz  
 T = Zielgen (OC, RUNX2)  
 R = Referenzgen (GAPDH)

Die Effizienz gibt das Ausmaß der Enzymreaktion an. Die maximale Effizienz liegt dabei bei  $2^n$ , also einer Verdopplung der Zielgene nach einem PCR-Zyklus. Anhand der Effizienz lassen sich die PCR-Läufe vergleichen. Ein Effizienzwert von 1 gibt dabei die maximal mögliche Effizienz von 100 % wieder.

Für die Berechnung des Fold Change galt dann:

$$\text{Fold Change} = \frac{E_{T_1}^{Ct}}{E_{R_1}^{Ct}} * \frac{E_{R_2}^{Ct}}{E_{T_2}^{Ct}}$$

Je höher der Wert des Fold Change war, desto geringer war die Expression des Zielgens. Betrag der Wert 1, so wurde davon ausgegangen, dass sowohl in der Probe, als auch in der Kontrolle die gleiche Genmenge enthalten war. Um die Genexpression untereinander vergleichen zu können, wurde die mean normalized expression (MNE) bestimmt:

$$\text{MNE} = \frac{E_{R_1}^{Ct}}{E_{T_1}^{Ct}}$$

Die normalisierte Zielgenexpression wurde mit der Delta-Delta-Ct-Methode ( $\Delta\Delta Ct$ ) errechnet. Dabei galt:

$$\Delta Ct_1 = Ct(\text{Probe, Zielgen}) - Ct(\text{Probe, Referenzgen})$$

$$\Delta Ct_2 = Ct(\text{Kontrolle, Zielgen}) - Ct(\text{Kontrolle, Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1(\text{Probe}) - \Delta Ct_2(\text{Kontrolle})$$

### Alizarin Red S Färbung

Die Alizarin Red S Färbung erfolgte, wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. Allerdings wurden 220  $\mu\text{l}$  10%-iges Cetylpyridiniumchlorid hinzugegeben und die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 15 Minuten (statt bei der Charakterisierung 200  $\mu\text{l}$  und 5

Minuten). Die Änderung erfolgte, da das Volumen der Wells in den 24-Well-Platten größer war, als in den 48-Well-Platten, die für die Charakterisierung genutzt wurden. Für die photometrische Messung wurden pro Well 100  $\mu\text{l}$  statt bei der Charakterisierung 90  $\mu\text{l}$  verwendet.

### **2.2.7 Statistik**

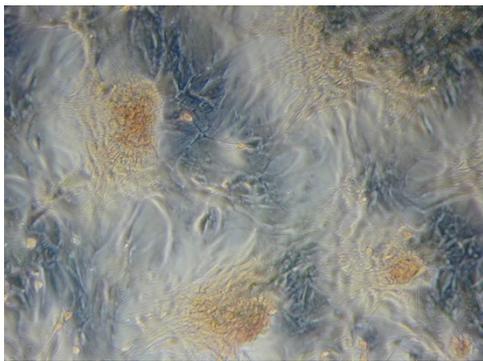
Zunächst wurden alle mit der jeweiligen Gerätesoftware ermittelten Daten in einer Excel-Tabelle (MS Office) zusammengefasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm MatLab R2009b. Zur Analyse der Daten wurde zunächst ein Ausreißertest (Abweichung 95 % vom Median) und eine Einweg-Varianzanalyse (oneway-analysis of variance, oneway-ANOVA), gefolgt von einer Mehrweg (multiway)-ANOVA durchgeführt. Im Anschluss erfolgte ein Post-Hoc Tukey-Kramer Test. Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Die Nullhypothese bestand in der Annahme, dass es keinen Unterschied der Gruppenmittelwerte gibt. Ab einem p-Wert  $< 0,05$  wurde die Nullhypothese verworfen. Zudem erfolgte die Angabe des F-Wertes. Ist der F-Wert  $> 1$ , so ist der Unterschied der Gruppenmittelwerte signifikant. Zudem gilt, dass je größer der F-Wert ist, desto größer ist der Effekt, der von einem bestimmten Parameter ausgeht. Die Diagramme wurden mit Excel erstellt.

## 3. Ergebnisse

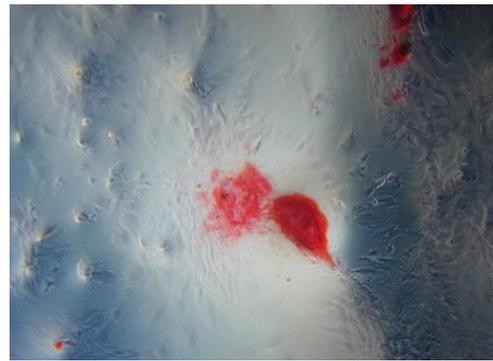
### 3.1 Charakterisierung der rMSCs

#### 3.1.1 Osteogene Differenzierung

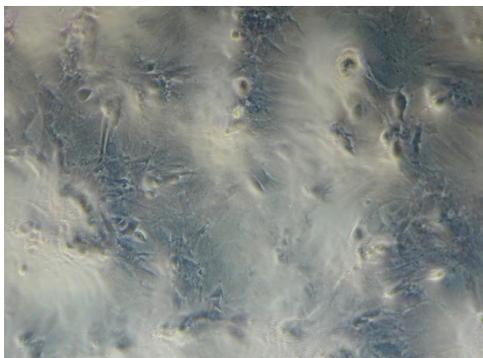
Die lichtmikroskopische Auswertung der Alizarin Red S Färbung wurde nach 14-tägiger Kultivierung mit und ohne osteogenem Supplement fotodokumentarisch erfasst (Abb. 7).



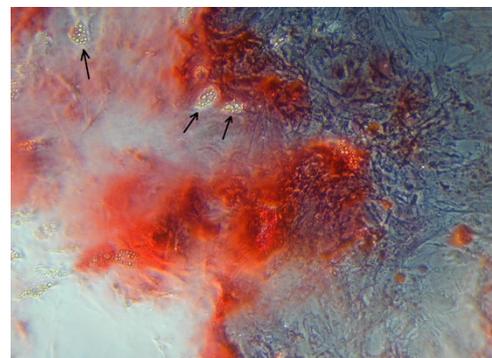
rMSCs (jung) ohne Supplement



rMSCs (jung) mit Supplement



rMSCs (alt) ohne Supplement



rMSCs (alt) mit Supplement

Abb. 7: Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin Red S Färbung nach 14-tägiger Kultivierung von rMSCs (20-fache Vergrößerung). Alt = 12 Monate, jung = 3 Monate, rMSCs = mesenchymale Stammzellen (aus Ratten gewonnen), Pfeile = Lipidtropfen [42].

Junge rMSCs zeigten bereits nach 14-tägiger Kultivierung in Expansionsmedium ohne die Zugabe von osteogenen Supplementen eine schwache Anfärbung mit Alizarin Red S und somit eine leichte Kalzifikation der Extrazellulärmatrix. Unter Zugabe von osteogenem Supplement war eine deutlich stärkere Kalzifikation zu beobachten. Alte rMSCs zeigten nur nach Kultivierung mit osteogenem Medium eine extrazelluläre

Kalzifizierung. Lichtmikroskopisch konnten bei alten rMSCs zudem einzelne Lipidzellen nachgewiesen werden ohne dass zusätzliches adipogenes Supplement hinzugefügt wurde [42].

Die Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs erfolgte durch photometrische Messung bei 560 nm. Für die Auswertung wurden die gemessenen Werte der Proben, die mit osteogenem Supplement kultiviert wurden, auf die Werte der Probe ohne osteogenem Zusatz normalisiert. In der folgenden Grafik (Abb. 8) sind die Mittelwerte beider Gruppen und deren Standardabweichung dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

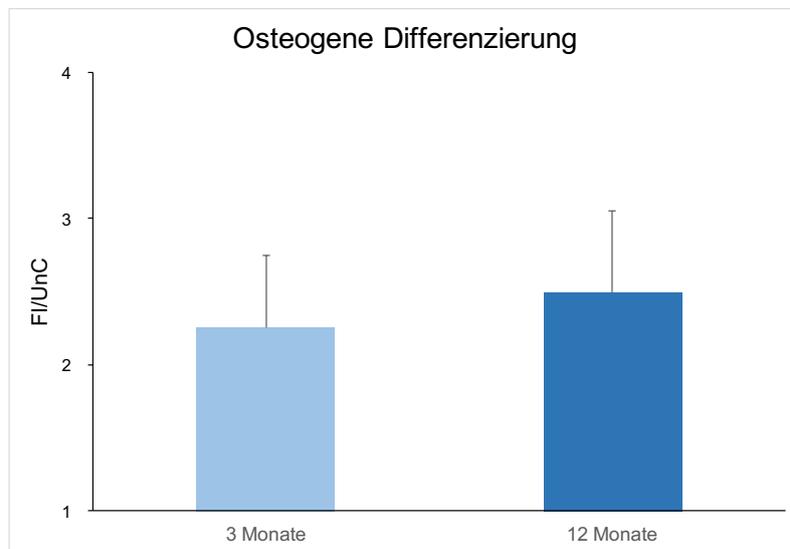


Abb. 8: Osteogene Differenzierung. Normalisierte Werte von jungen und alten rMSCs im Vergleich. FI = fold induction, UnC = undifferentiated control groups, [42].

rMSCs	3 Monate	12 Monate
Mittelwert aller normalisierten Werte	2,26	2,49
Standardabweichung	0,49	0,56
p-Wert		0,65
F-Wert		0,21

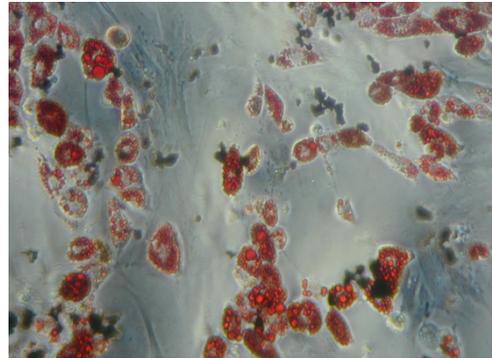
Tab. 12: Mittelwerte, Standardabweichungen, sowie p- und F-Werte der osteogenen Differenzierung. rMSCs = mesenchymale Stammzellen (aus Ratten gewonnen).

### 3.1.2 Adipogene Differenzierung

Es erfolgte zunächst eine lichtmikroskopische Dokumentation der mit Oil Red O angefärbten rMSCs nach 7-tägiger Kultivierung mit und ohne adipogenem Supplement (Abb. 9).



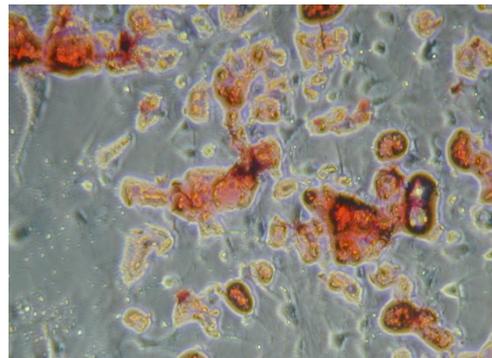
rMSCs (jung) ohne Supplement



rMSCs (jung) mit Supplement



rMSCs (alt) ohne Supplement



rMSCs (alt) mit Supplement

Abb. 9: Exemplarische Darstellung der lichtmikroskopischen Bewertung der adipogenen Differenzierung mittels Oil Red O Färbung nach 7-tägiger Kultivierung von rMSCs (20-fache Vergrößerung), jung = 3 Monate, alt = 12 Monate, rMSCs = mesenchymale Stammzellen (aus Ratten gewonnen), Pfeile = positive Oil Red O Färbung [42].

Junge rMSCs zeigten ohne die Zugabe von adipogenem Supplement keine Differenzierung in Adipozyten. Mit Zusatz von adipogenem Supplement zeigten sie hingegen eine deutliche Anfärbung mit Oil Red O. Alte rMSCs differenzierten zum Teil bereits ohne supplementäre Unterstützung in Adipozyten. Nach Kultivierung mit adipogenem Supplement war eine ausgeprägte adipozytäre Differenzierung zu beobachten. Der gebundene Farbstoff wurde mittels photometrischer Messung bei 490 nm quantifiziert. Es erfolgte eine Normalisierung der rMSCs, die mit adipogenem Supplement kultiviert wurden auf die ohne Supplement kultivierten Zellen. In der

folgenden Grafik (Abb. 10) sind die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen von jungen und alten rMSCs im Vergleich dargestellt. Alte Zellen zeigten eine signifikant höhere adipogene Differenzierung als junge rMSCs ( $p = 0,02$ ,  $F = 5,9$ ) [42].

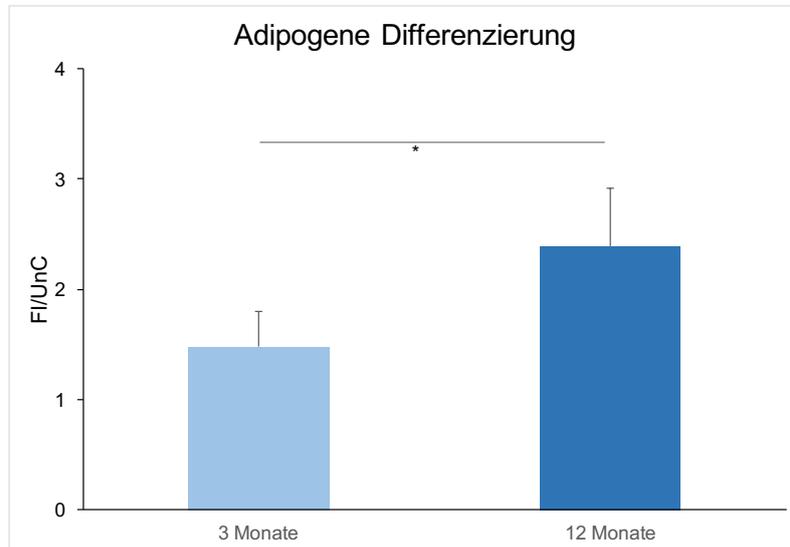


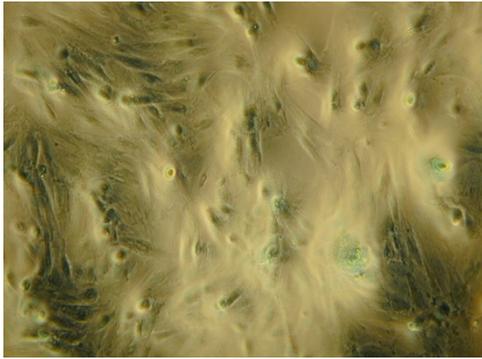
Abb. 10: Adipogene Differenzierung. Normalisierte Werte von jungen und alten rMSCs im Vergleich. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,02$ ,  $F = 5,9$ ). FI = fold induction, UnC = undifferentiated control groups, \* = signifikanter Unterschied beider Gruppen [42].

rMSCs	3 Monate	12 Monate
Mittelwert aller normalisierten Werte	1,48	2,39
Standardabweichung	0,32	0,53
p-Wert		0,02
F-Wert		5,9

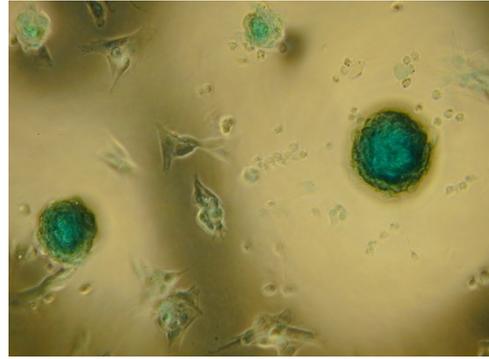
Tab. 13: Mittelwerte, Standardabweichungen, sowie p- und F-Werte der adipogenen Differenzierung. rMSCs = mesenchymale Stammzellen (aus Ratten gewonnen).

### 3.1.3 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung wurde nach 21 Tagen lichtmikroskopisch Dokumentiert (Abb. 11).



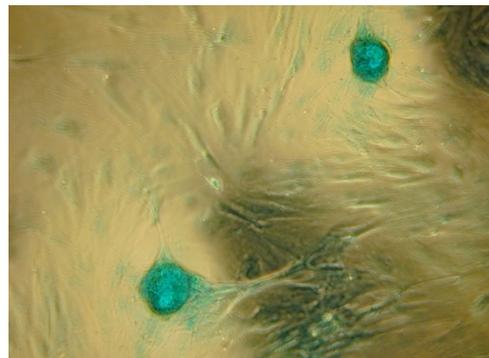
rMSCs (jung) ohne Supplement



rMSCs (jung) mit Supplement



rMSCs (alt) ohne Supplement



rMSCs (alt) mit Supplement

Abb. 11: Exemplarische lichtmikroskopische Bilder der chondrogenen Differenzierung mittels Alcian Blue Färbung junger und alter rMSCs nach 21-tägiger Kultivierung (20-fache Vergrößerung), alt: 12 Monate, jung = 3 Monate, rMSCs = mesenchymale Stammzellen (aus Ratten gewonnen) [42].

Sowohl bei den jungen, als auch bei den alten rMSCs zeigte sich nach 21-tägiger Kultivierung eine Anreicherung mit dem Farbstoff Alcian Blue. Eine stärkere oder schwächere chondrogene Differenzierung in Abhängigkeit vom Alter wurde nicht festgestellt. Auf Grund limitierter methodischer Möglichkeiten konnte eine Quantifizierung des Farbstoffes nicht erfolgen.

## 3.2 Stimulation mit FLIPUS

### 3.2.1 Osteocalcin

In den Analysen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen ( $p = 0,02$ ,  $F = 5,51$ ), sowie zwischen den Intensitäten ( $p = 0,01$ ,  $F = 4,29$ ) (Abb 12). Auch die Kombination beider Parameter zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Osteocalcinexpression ( $p = 0,03$ ,  $F = 3,57$ ) (Abb. 12). Mit der niedrigen Intensität beschallte junge rMSCs zeigten nach 7 Tagen eine erhöhte Osteocalcinexpression im

Vergleich zu der unstimulierten Kontrollgruppe, den mit höherer Intensität beschallten Zellen ( $p = 0,0003$ ,  $F = 9,4$ ) und im Vergleich zu den jungen Zellen, die über 14 Tage mit der niedrigen Intensität beschallt wurden. Zudem zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen jungen und alten rMSCs, die jeweils über 7 Tage mit  $11,7 \text{ mW/cm}^2$  beschallt wurden ( $F = 7,42$ ,  $p = 0,01$ ). An Tag 14 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet.

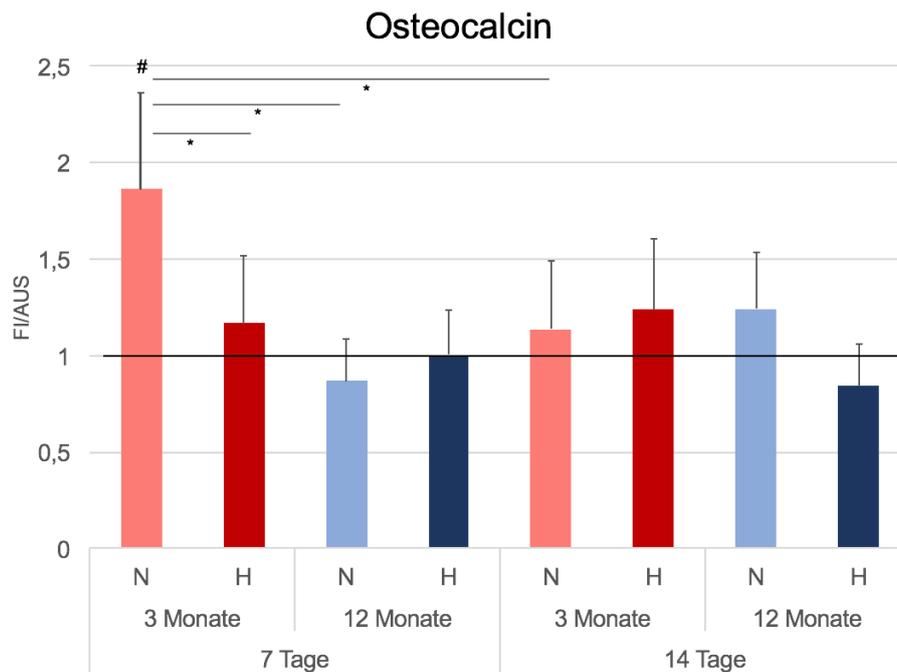


Abb. 12: Osteocalcinexpression. Alle Werte der unstimulierten (AUS) Gruppe wurden gleich 1 gesetzt und die Werte der stimulierten Gruppe auf sie normalisiert. Rot = 3 Monate alt, blau = 12 Monate alt, heller Farbton = Stimulation mit niedriger Intensität, dunkler Farbton = Stimulation mit höherer Intensität, # = Signifikanz der stimulierten Gruppe gegenüber ihrer unstimulierten Kontrollgruppe. \* = Signifikanz der zwei über eine Linie verbundenen Gruppen. N = niedrige Intensität ( $11,7 \text{ mW/cm}^2$ ), H = hohe Intensität ( $44,5 \text{ mW/cm}^2$ ), FI = fold induction [42].

	7 Tage				14 Tage			
	3 Mo		12 Mo		3 Mo		12 Mo	
	N	H	N	H	N	H	N	H
MW	1,86	1,17	0,87	1,00	1,14	1,24	1,24	0,84
SD	0,50	0,35	0,22	0,23	0,36	0,37	0,30	0,22

Tab. 14: Daten der Osteocalcinexpression: MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Mo = Monate, N = niedrige Intensität ( $11,7 \text{ mW/cm}^2$ ), H = hohe Intensität ( $44,5 \text{ mW/cm}^2$ ).

### 3.2.2 RUNX2

Bei stimulierten jungen rMSCs wurde durch keine der untersuchten Parameter ein signifikanter Effekt auf die RUNX2 Expression beobachtet. Nach 7 Tagen Stimulation mit  $11,7 \text{ mW/cm}^2$  war die RUNX2 - Expression in alten rMSCs gegenüber der Kontrollgruppe ( $p = 0,015$ ,  $F = 4,5$ ) und den jungen rMSCs runterreguliert ( $p = 0,0041$ ,  $F = 9,9$ ) (Abb. 13). An Tag 14 bewirkte die Beschallung mit  $44,5 \text{ mW/cm}^2$  in alten rMSCs, eine signifikant erhöhte RUNX2-Expression gegenüber der unstimulierten Kontrollgruppe und der mit  $11,7 \text{ mW/cm}^2$  stimulierten Gruppe ( $p = 0,0036$ ,  $F = 6,13$ ) (Abb. 13).

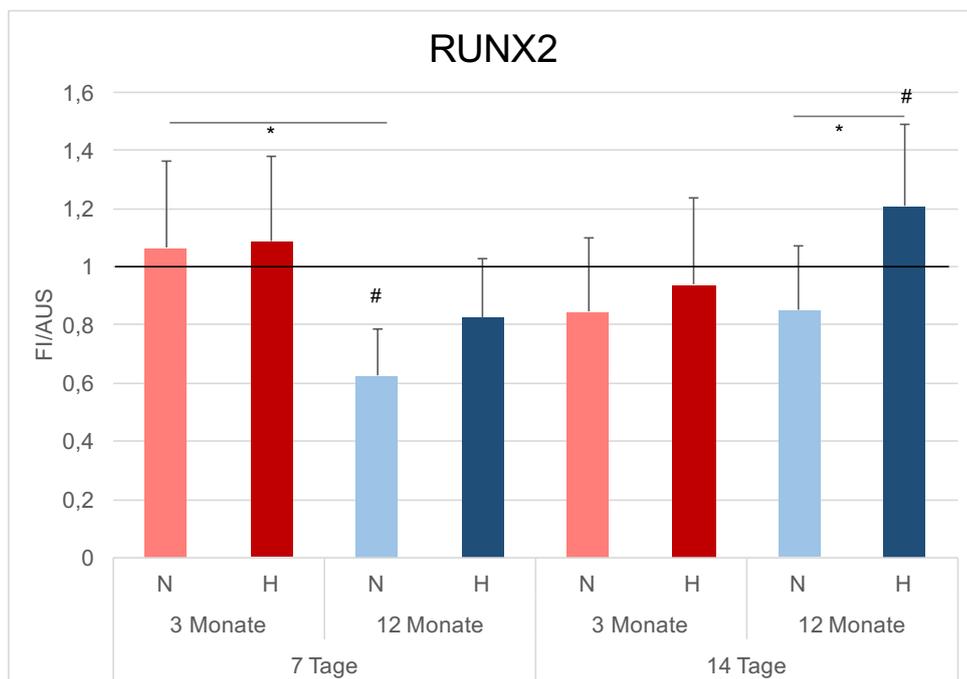


Abb. 13: RUNX2-Expression. Alle Werte der unstimulierten (AUS) Gruppe wurden gleich 1 gesetzt und die Werte der stimulierten Gruppe wurden auf sie normalisiert. Rot = 3 Monate alt, blau = 12 Monate alt, heller Farbton = Stimulation mit niedriger Intensität, dunkler Farbton = Stimulation mit höherer Intensität, # = Signifikanz der stimulierten Gruppe gegenüber ihrer unstimulierten Kontrollgruppe. \* = Signifikanz der zwei über eine Linie verbundenen Gruppen, N = niedrige Intensität ( $11,7 \text{ mW/cm}^2$ ), H = hohe Intensität ( $44,5 \text{ mW/cm}^2$ ), FI = fold induction [42].

	7 Tage				14 Tage			
	3 Mo		12 Mo		3 Mo		12 Mo	
	N	H	N	H	N	H	N	H
MW	1,07	1,09	0,62	0,83	0,85	0,94	0,85	1,21
SD	0,30	0,29	0,16	0,20	0,25	0,30	0,22	0,28

Tab. 15: Daten der RUNX2-Expression. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Mo = Monate, N = niedrige Intensität ( $11,7 \text{ mW/cm}^2$ ), H = hohe Intensität ( $44,5 \text{ mW/cm}^2$ ).

### 3.2.3 Alizarin Red S Färbung

Es konnten Unterschiede in der extrazellulären Kalzifizierung in Abhängigkeit von Alter und Intensität bei ultraschallstimulierten rMSCs beobachtet werden ( $F = 17,7$ ;  $p \leq 0,001$ ) (Abb. 14).

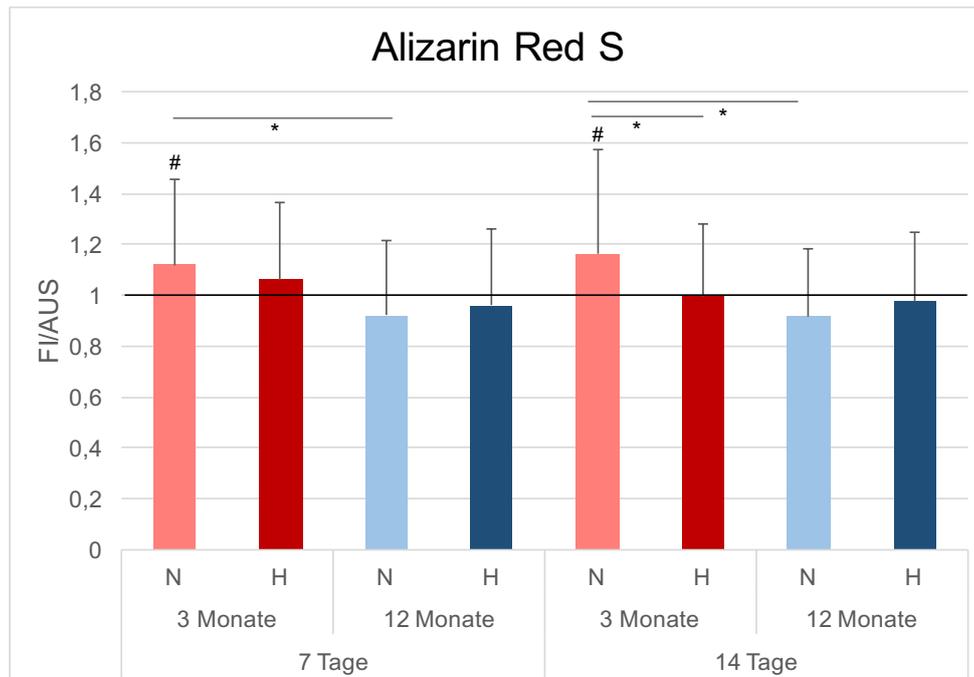


Abb. 14: Mineralisierung der Extrazellulärmatix. Nachweis mittels Alizarin Red S Färbung. Alle Werte der unstimulierten (AUS) Gruppe wurden gleich 1 gesetzt und die Werte der stimulierten Gruppe wurden auf sie normalisiert. Rot = 3 Monate alt, blau = 12 Monate alt, heller Farbton = Stimulation mit niedriger Intensität, dunkler Farbton = Stimulation mit höherer Intensität, # = Signifikanz der stimulierten Gruppe gegenüber ihrer unstimulierten Kontrollgruppe. \* = Signifikanz der zwei über eine Linie verbundenen Gruppen, N = niedrige Intensität ( $11,7 \text{ mW/cm}^2$ ), H = hohe Intensität ( $44,5 \text{ mW/cm}^2$ ), FI = fold induction [42]

	7 Tage				14 Tage			
	3 Mo		12 Mo		3 Mo		12 Mo	
	N	H	N	H	N	H	N	H
MW	1,12	1,06	0,92	0,96	1,16	1,00	0,92	0,98
SD	0,34	0,31	0,29	0,33	0,41	0,29	0,26	0,27

Tab. 16: Daten der Alizarin Red S Färbung. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Mo = Monate, N = niedrige Intensität ( $11,7 \text{ mW/cm}^2$ ), H = hohe Intensität ( $44,5 \text{ mW/cm}^2$ ).

Die Mineralisierung an Tag 7 war bei jungen rMSCs, stimuliert mit  $11,7 \text{ mW/cm}^2$ , im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $F = 7,1$ ;  $p = 0,002$ ) und alten rMSCs, stimuliert mit der

gleichen Intensität ( $F = 16,1$ ;  $p \leq 0,001$ ) (Abb. 14) signifikant erhöht. Nach 14-tägiger Stimulation mit  $11,7 \text{ mW/cm}^2$  zeigten junge rMSCs ebenfalls eine signifikant erhöhte Matrixmineralisierung gegenüber der unstimulierten Kontrollgruppe, den jungen rMSCs, die mit  $44,5 \text{ mW/cm}^2$  beschallt wurden ( $p \leq 0,001$ ,  $F = 14,6$ ), sowie gegenüber den alten rMSCs, die mit  $11,7 \text{ mW/cm}^2$  stimuliert wurden ( $F = 18,8$ ;  $p \leq 0,001$ ).

## 4. Diskussion

Die Verwendung von Ultraschall in der Medizin als therapeutischen und nicht nur diagnostischen Ansatz verbreitet sich immer weiter, was durch die zahlreichen präklinischen und klinischen Studien belegt wird. Trotz zahlreicher erfolgreicher Studien [57] [58] [59] [53] gibt es immer wieder Studien, bei denen kein Benefit durch die Applikation von Ultraschall erreicht werden kann [60]. Es wäre denkbar, dass nicht ausreichend optimierte Stimulationsparameter ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse der Ultraschallstimulation sind [42]. Die Frage, ob Ultraschall beispielsweise in der Knochenheilung eine Methode darstellt, die Einzug in die therapeutischen Leitlinien findet, bleibt daher zunächst kontrovers zu diskutieren.

Da Ultraschall jedoch eine kostengünstige, nicht ionisierende und nebenwirkungsfreie Therapieoption bietet [45], lohnt es sich in diese Methode weiter zu investieren. Standardisierte und auf den Patienten individualisierte Applikationsregimes sind noch nicht vorhanden. Es lässt sich vermuten, dass nach weiterer Optimierung der Ultraschallanwendung ein positiver Effekt auf die Knochenheilung und auch auf andere Einsatzgebiete erzielt werden kann. Würde man diesen Punkt erreichen, so hätte man eine Methode gefunden, die schonungsvoll die Heilung des Patienten vollbringt bzw. zumindest unterstützt. Die Lebensqualität der Patienten könnte so erhöht werden. Folgen, die aus einer langsamen und unvollständigen Heilung entstehen, könnten gemindert werden. Die Kosten für das Gesundheitssystem könnten sich verringern und die Arbeitskraft der Bevölkerung steigen. Die Nachfrage nach alternativen Behandlungsoptionen für Frakturen wird in Zukunft steigen [61].

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. K. Raum hat ein neuartiges FLIPUS-System entwickelt [45]. Mit Hilfe dieses Systems ist eine exaktere Applikation des Ultraschalls und eine Verminderung der störenden Nebeneffekte des herkömmlichen LIPUS-Systems für in-vitro Untersuchungen möglich [45].

Ziel dieser Studie war es zu erfassen, ob es altersabhängige Unterschiede in den Outcome-Parametern bei identischen Stimulationsbedingungen mit FLIPUS gibt. Als Parameter wurden dabei die Expression von RUNX2 und Osteocalcin bewertet, ebenso wie die Färbung der EZM mit Alizarin Red S. Pro Spendertier wurden für die

mesenchymalen Stammzellen zusätzlich Charakterisierungsversuche (adipogen, chondrogen und osteogen) durchgeführt.

Die Fragestellung dieser Studie ist nach unserem Wissen die erste ihrer Art.

## **4.1 Diskussion der Methodik**

### **4.1.1 Auswahl der Spendertiere**

Die Nutzung von Sprague Dawley Ratten ist in der Forschung weit verbreitet und erfolgt seit Jahrzehnten [62]. Die Klassifikation der 12 Monate alten Ratten als „alt“, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen, wie beispielsweise von Kasper et al. [8] so durchgeführt. Varma et al. [63] hingegen zählten die Tiere erst ab einem Alter von 56 Wochen als „alt“. Ebenso uneinheitlich ist die Grenze, bis wann die Tiere noch als jung gelten. Geißler et al. klassifizierten ebenfalls 12 Monate alte Ratten als „alt“, wohingegen die 3 Monate alten Tiere als mittel-alt und 3 Wochen alte Ratten als „jung“ definiert wurden [37]. Eine mögliche Fehlerquelle wäre an dieser Stelle die nicht ganz eindeutig übereinstimmende Festlegung auf eine bestimmte Altersgrenze, die dann als „alt“ bzw. „jung“ klassifiziert wird. Andererseits ist der Altersunterschied unserer beiden Gruppen groß genug, um eine Unterscheidung in „jung“ und „alt“ zu erlauben.

In unserer Studie wurden weibliche Tiere verwendet. Geißler et al. [37], sowie auch Kasper et al. [8] nutzten hingegen männliche Tiere für ihre Experimente. Kasper et al. begründen diese Entscheidung damit, dass sie auf diese Weise keine Beeinflussung durch schwankende Östrogenspiegel der Tiere haben [8]. Hong et al. zeigten, dass 17 $\beta$ -Östradiol und Dexamethason die Proliferation und das osteogene Differenzierungspotential von männlichen und weiblichen rMSCs erhöhen, wobei der Effekt je nach Geschlecht unterschiedlich war [64]. In der Studie von Bragdon et al., die das Differenzierungspotential von MSCs aus männlichen und weiblichen Mäusen analysierte, bestätigte sich eine Geschlechtsabhängigkeit [65]. Da die von uns genutzten Zellen ab dem Zeitpunkt der Isolation in einem stets identisch zusammengesetzten Kulturmedium gehalten wurden, ist ab diesem Zeitpunkt keine Beeinflussung durch hormonelle Unterschiede mehr möglich. Es handelte sich bei allen Tieren um weibliche Ratten, so dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Geschlechtszugehörigkeit ausgeschlossen werden kann. Da insbesondere Frauen im höheren Alter von Frakturen betroffen sind [7], ist es sinnvoll auch in den präklinischen

Experimenten weibliche Spender auszuwählen. Eine Wiederholung der Experimente mit männlichen Spendertieren unterschiedlichen Alters wäre aber durchaus denkbar.

#### **4.1.2 Isolation und Kultivierung der rMSCs**

Die Isolation der Zellen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll von Geissler et al. [56]. Zur Gewinnung der Zellen werden die Tierknochen in zwei Hälften geteilt und anschließend zentrifugiert. Bei der Zentrifugation werden sowohl mesenchymale Stammzellen, als auch Zellen des hämatopoetischen Systems gewonnen. Da jedoch nur die mesenchymalen Stammzellen adhärent sind, werden die anfänglich vorhandenen hämatopoetischen Zellen während der Waschvorgänge zwischen den Passagen entfernt [40].

#### **4.1.3 Charakterisierung der rMSCs**

Für die Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen wurden die gängigen Nachweisverfahren verwendet. Der Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde mittels Oil Red O Färbung nach dem Originalprotokoll durchgeführt [66]. Die Alizarin Red S Färbung wurde für die osteogene Differenzierung genutzt und die Alcian Blue Färbung für die chondrogene Differenzierung. Die Durchführungen erfolgten hier nach den Herstellerangaben von GIBCO™.

#### **4.1.4 Stimulation mit FLIPUS**

Die eingesetzten Wellplatten standen in direktem Kontakt mit dem Wasser. Beim Einsetzen der Inkubationskammer kam es zur Ausbildung von kleinen Luftblasen am Boden der Platten. Diese wurden jedoch vor Beginn der Stimulation mit Hilfe einer Luftabsaughilfe beseitigt [45]. Da hier jedoch lediglich eine optische Kontrolle erfolgte, besteht die Möglichkeit, dass kleinste Luftblasen nicht erkannt wurden und daher zu Verfälschungen der Ergebnisse geführt haben. Aufgrund der gleichen Behandlung und der hohen Anzahl der Proben ist diese Fehlerquelle jedoch als gering einzustufen.

Während normalerweise FCS als Medium zur Unterstützung der Zellaktivität genutzt wird, verwendeten wir PANEXIN-NTA, um eine Beeinflussung von Wachstumsfaktoren auf die Ultraschallstimulation zu verhindern [42]. So kann davon ausgegangen werden, dass alle

beobachteten Effekte nach FLIPUS-Applikation auf die Ultraschallstimulation und nicht auf andere Faktoren zurückzuführen sind [42].

Durch die Ausbreitung des Ultraschalls in Form von divergierenden Wellen wird sicher gestellt, dass es zwischen dem Boden der einzelnen Wells und der in ihnen gebildeten Luft-Flüssigkeitsgrenze nicht zu stehenden Wellen kommt [42]. Die Optimierungen dafür wurden in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe geschaffen und es konnte gezeigt werden, dass eine Ultraschallfrequenz von 3,6 MHz die geringsten Transmissionsverluste aufweist [45], so dass für alle Experimente diese Frequenz gewählt wurde. Die Anordnung von Ultraschallemitter, Fokuspunkt und Well stellte sicher, dass die einzelnen Wells mit einer konstanten, gleich verteilten Intensität an Ultraschall beschallt wurden [42].

#### **4.1.5 Outcome-Parameter**

Als Referenzgen für RUNX2 und Osteocalcin wurde GAPDH verwendet. Lowe et al. [67] zeigten eine geringere Menge an GAPDH mRNA im Muskel von älteren Ratten im Gegensatz zu jüngeren Ratten, so dass eine fälschliche Veränderung der RUNX2- und Osteocalcinexpression durch die Verwendung unterschiedlich alter rMSCs bedacht werden muss [42]. Zum anderen zeigten jedoch die Analysen von Touchberry et al. [68], dass es keinen altersbedingten Unterschied der GAPDH-Expression im menschlichen Muskel gibt und das GAPDH eines der zuverlässigsten Referenzgene ist.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Charakterisierung der rMSCs**

Alle Nachweisverfahren bestätigten ein positives Differenzierungspotential aller Zellen, so dass eine Beeinflussung der Experimente durch ein einseitiges oder fehlendes Differenzierungspotential ausgeschlossen werden kann.

Die Oil Red O Färbung zeigte, dass die adipogene Differenzierung von alten rMSCs signifikant stärker ausgeprägt war als von jungen Zellen [42]. Der Versuch der osteogenen Differenzierung konnte dies noch bekräftigen, da alte rMSCs selbst bei Kultivierung mit osteogenem Medium Lipidtropfen ausbildeten [42]. Bereits D'ippolito et al. [33] und Roura et al. [32] konnten eine geringere Expression der osteogenen Marker bei älteren MSCs im Gegensatz zu jungen MSCs nachweisen. Ross et al. zeigten, dass

dieser sogenannte adipogene Switch während des Alterungsprozesses der Zellen durch eine Inhibition des Wnt Signalwegs getriggert wird [69]. Zudem könnte an dieser Stelle auch die Wahl weiblicher Ratten als Spendertiere eine Beeinflussung ausüben. Bragdon et al. [65] fanden bei Mäusen, dass weibliche Tiere eine stärkere Tendenz zur adipogenen Differenzierung als männliche Tiere aufweisen.

Die Färbung mit Alizarin Red S zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Altersgruppen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die relativ kurze Inkubationszeit der Zellen sein [42]. In anderen Studien betrug die Inkubationszeit 3 Wochen [70]. Dennoch zeigte die Färbung, dass in beiden Gruppen eine mineralisierte Extrazellulärmatrix aufgebaut wurde [42].

#### **4.2.2 Stimulation mit FLIPUS**

Die Auswertungen des Stimulationsversuches mit FLIPUS wiesen altersabhängige Unterschiede auf [42]. Es zeigte sich, dass die Expression von RUNX2 und Osteocalcin in alten rMSCs im Gegensatz zu den jungen Zellen geringer ausfiel. Diese Beobachtung stimmt mit den Erkenntnissen von Moerman et al. [6] überein. Sie wiesen in ihren Experimenten eine verminderte Expression von RUNX2, Dlx5 (distal-less homeobox 5), Osteocalcin und Kollagen Typ I bei MSCs nach, die von älteren Spendertieren stammten [6] [42]. Gleichzeitig zeigten die alten MSCs eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors PPAR- $\gamma$ 2, der sich positiv auf die adipogene Differenzierung und negativ auf die Entwicklung von Osteoblasten auswirkt [6].

Bei der Stimulation von jungen rMSCs fiel auf, dass die Applikation der niedrigeren Intensität von 11,7 mW/cm<sup>2</sup> über 7 Tage zu einer gesteigerten Osteocalcinexpression führte [42]. Sie war sowohl signifikant höher als die Kontrollgruppe, als auch höher als die mit 11,7 mW/cm<sup>2</sup> über 14 Tage und die über 7 Tage mit 44,5 mW/cm<sup>2</sup> stimulierten Gruppen [42]. Bei älteren rMSCs war keine Erhöhung der Osteocalcinexpression aufgefallen [42].

Humane MSCs exprimieren bei geringerer Dehnung (3 %) RUNX2, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase, während sie bei stärkerer Dehnung (10 %) Kollagen Typ III und Tenascin-C produzieren, die typisch für Sehngewebe sind [71] [42]. Koike et al. beobachteten an ST2 Zellen aus dem Knochenmark, dass eine zu lang andauernde mechanische Stimulation, sowie eine zu starke Stimulierung eine Verringerung der

Expression von RUNX2 zur Folge hat [42] [72]. Es ist daher anzunehmen, dass die höhere bzw. längere Stimulation der jungen Zellen zu einer zu starken Dehnung der Zellen geführt hat und so die Expression von Osteocalcin vermindert wurde. Die unterschiedlichen Stimulationsintensitäten könnten je nach Alter der MSCs verschiedene Signalwege aktivieren und somit zu einer wesentlichen Beeinflussung der Zellantwort führen [42].

Die Arbeitsgruppe konnte in vorherigen Studien mit C2C12-Zellen zeigen, dass mechanosensitive Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise AP-1 (Activator protein 1), Sp1 (Specificity protein 1) und TEAD (TEA domain family member) bei einer Stimulation mit FLIPUS über 5 Minuten mit  $44,5 \text{ mW/cm}^2$  am höchsten waren, während eine längere Stimulation die Aktivität von AP-1 und TEAD wieder absinken ließ [73]. Auch hier wäre es denkbar, dass die längere Stimulation von 20 Minuten je nach Alter der MSCs zu unterschiedlichen Zellantworten geführt hat.

Eine Beeinflussung der RUNX2-Expression gelang bei einer 7-tägigen Stimulation der jungen Zellen weder mit der niedrigeren, noch mit der höheren ( $44,5 \text{ mW/cm}^2$ ) Intensität [42]. Bei der Stimulation der alten rMSCs fiel auf, dass die niedrige Intensität bei einer Applikation über 7 Tage zu einer signifikant erniedrigten RUNX2-Expression führt, während eine längere Stimulation mit der höheren Intensität die Expression von RUNX2 erhöht [42].

Neben der essentiellen Bedeutung von RUNX2 in der osteogenen Differenzierung spielt es auch eine Rolle in der Proliferation und skeletalen Morphogenese. So zeigten Pratap et al., dass die RUNX2-Expression während der Proliferation vermindert ist, während sie bei der Differenzierung erhöht ist [74] [42]. Die Regulation des Zellwachstums von Osteoblasten wird von RUNX2 reguliert, wobei dieser Mechanismus in Osteosarkomzellen (bspw. SAOS-2) von Ratten nicht greift [75] [42]. Es wäre vorstellbar, dass die Stimulation der alten rMSCs mit der niedrigen Intensität über 7 Tage zunächst einmal die Proliferation der Zellen angeregt hat, so dass es infolgedessen zu einer Runterregulierung von RUNX2 gekommen ist [42].

RUNX2 ist zudem auch an der Regulierung der Osteocalcinexpression beteiligt [76] [77]. Die Expression von Osteocalcin konnte nach 14 Tagen Stimulation der alten rMSCs weder mit der niedrigen, noch mit der hohen Intensität erhöht werden [42]. Da jedoch die RUNX2-Expression erst nach 14 Tagen erhöht war, könnte man erwarten, dass bei einer

noch längeren Stimulationszeit von mehr als 14 Tagen auch die Osteocalcinexpression erhöht wird [42]. Das müsste jedoch in weiterfolgenden Studien überprüft werden [42].

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stimulation mit FLIPUS je nach Alter der rMSCs über unterschiedliche Mechanismen wirkt [42]. Es wäre vorstellbar, dass es bei jungen Zellen direkt zu einer Anregung der Differenzierung kommt, während alte rMSCs zunächst zur Proliferation und verzögert zur Differenzierung angeregt werden [42].

### **4.3 Ausblick**

Die Studie konnte zeigen, dass es einen altersabhängigen Unterschied in den Outcomeparametern RUNX2, Osteocalcin und Alizarin Red S Färbung gibt.

Es konnte gezeigt werden, dass junge Zellen tendenziell einen größeren Benefit von einer kurzen Stimulation mit einer niedrigen Intensität haben, während ältere Zellen von einer langen Stimulation mit einer höheren Intensität profitieren [42]. Eine genaue Definition altersabhängig optimaler Stimulationsparameter wird zur Verbesserung der Ultraschall- und Stammzelltherapie notwendig sein.

Zukünftige Projekte sollten in zweierlei Hinsicht durchgeführt werden. Zum einen sollten weiterführende Studien für ein genaues Verständnis der zellulären Mechanismen sorgen, die durch die Beschallung mit Ultraschall in alten und jungen MSCs ausgelöst werden. Noch sind nicht alle zugrundeliegenden Signalwege verstanden. Desweiteren sollten exakte optimale alters- und potentiell auch geschlechtsspezifische Stimulationsparameter bestimmt werden. Die vorliegende Studie gibt dafür wesentliche Startpunkte und zeigt die Richtung auf, in die weiter optimiert werden sollte.

Als nächsten Schritt bietet es sich an, mit einem 3D-Modell zu arbeiten, um zu schauen, ob sich auch hier die Ergebnisse reproduzieren lassen. Auf lange Sicht wäre es zudem denkbar, in ein Kleintier-Osteotomie-Modell zu wechseln, um zu erforschen, ob ähnliche altersabhängige Optima bestehen, wie in den in-vitro Versuchen. Obwohl anzunehmen ist, dass sich die gewonnenen Erkenntnisse auch hier reproduzieren lassen, wäre es auch denkbar, dass durch andere Einflüsse (bspw. Vaskularisation, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen) veränderte Erkenntnisse gewonnen werden.

Das langfristige Ziel besteht in einer breiten klinischen Anwendung des FLIPUS zur Unterstützung der Frakturheilung. Die aus den in-vitro- und Kleintierversuchen gewonnenen Erkenntnisse sollen in einer kostengünstigen und auf den Patienten

individualisierten Therapieoption münden. Die Möglichkeit der exakten Applikation des Ultraschalls mittels FLIPUS erlaubt dabei einen gezielten Therapieeinsatz mit einer genauen Anpassung an den Patienten und den Frakturverlauf.

## Literatur

- [1] A. E. Goodship, "Mechanical stimulus to bone," *Ann. of Rheum. Dis.*, vol. 51, pp. 4–6, 1992.
- [2] R. M. Berg and I. Newton Kugelmass, "Calcification in Callus Formation and Fracture Repair.," *Ann. Surg.*, vol. 93, no. 5, pp. 1009–1016, 1931.
- [3] P. Strube, U. Sentuerk, T. Riha, K. Kaspar, M. Mueller, G. Kasper, G. Matziolis, G. N. Duda, and C. Perka, "Influence of age and mechanical stability on bone defect healing: Age reverses mechanical effects," *Bone*, vol. 42, pp. 758–764, 2008.
- [4] R. A. Meyer, P. J. Tsahakis, D. F. Martin, D. M. Banks, M. E. Harrow, and G. M. Kiebzak, "Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats," *J. Orthop. Res.*, vol. 19, pp. 428–435, 2001.
- [5] M. L. Gourlay, R. A. Overman, and K. E. Ensrud, "Bone Density Screening and Rescreening in Postmenopausal Women and Older Men," *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 13, no. 6, pp. 390–398, 2015.
- [6] E. J. Moerman, K. Teng, D. A. Lipschitz, and B. Lecka-Czernik, "Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: The role of PPAR- $\gamma$ 2 transcription factor and TGF- $\beta$ /BMP signaling pathways," *Aging Cell*, vol. 3, pp. 379–389, 2004.
- [7] E. Gibon, L. Lu, and S. B. Goodman, "Aging, inflammation, stem cells, and bone healing," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, pp. 1–7, 2016.
- [8] G. Kasper, L. Mao, S. Geissler, A. Draycheva, J. Trippens, J. Kühnisch, M. Tschirschmann, K. Kaspar, C. Perka, G. N. Duda, and J. Klose, "Insights into mesenchymal stem cell aging: Involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton," *Stem Cells*, vol. 27, pp. 1288–1297, 2009.
- [9] M. Almeida, E. Ambrogini, L. Han, S. C. Manolagas, and R. L. Jilka, "Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 40, pp. 27438–27448, 2009.
- [10] M. C. Hall, "REVIEW ARTICLE: Fractures," *Can. Med. Assoc. J.*, vol. 89, pp. 255–261, 1963.
- [11] K. Christensen, G. Doblhammer, R. Rau, and J. W. Vaupel, "Ageing populations :

- the challenges ahead,” *Lancet*, vol. 374, no. 9696, pp. 1196–1208, 2009.
- [12] J. Oeppen and J. W. Vaupel, “Broken Limits to Life Expectancy,” *Science (80-. )*, vol. 296, pp. 1029–1031, 2002.
- [13] P. Bianco and P. Gehron Robey, “Marrow stromal stem cells.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 12, pp. 1663–1668, 2000.
- [14] R. A. Pelekanos, V. S. Sardesai, K. Futrega, W. B. Lott, M. Kuhn, and M. R. Doran, “Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue.,” *J. Vis. Exp.*, no. 112, pp. 1–13, 2016.
- [15] C. Baustian, S. Hanley, and R. Ceredig, “Isolation, selection and culture methods to enhance clonogenicity of mouse bone marrow derived mesenchymal stromal cell precursors.,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 6:151, 2015.
- [16] C. Bony, M. Cren, S. Domergue, K. Toupet, C. Jorgensen, and D. Noël, “Adipose mesenchymal stem cells isolated after manual or water-jet-assisted liposuction display similar properties,” *Front. Immunol.*, vol. 6, pp. 1–8, 2016.
- [17] A. Malgieri, E. Kantzari, M. P. Patrizi, and S. Gambardella, “Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: State of the art,” *Int. J. Clin. Exp. Med.*, vol. 3, no. 4, pp. 248–269, 2010.
- [18] A. I. Caplan, “Mesenchymal stem cells.,” *J. Orthop. Res.*, vol. 9, pp. 641–650, 1991.
- [19] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. a. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. Marshak, “Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells,” *Science (80-. )*, vol. 284, no. April, pp. 143–147, 1999.
- [20] L. Sachs, “The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 10, pp. 4742–4749, 1996.
- [21] F. Bruna, D. Contador, P. Conget, B. Erranz, C. L. Sossa, and M. L. Arango-Rodríguez, “Regenerative Potential of Mesenchymal Stromal Cells: Age-Related Changes.,” *Stem Cells Int.*, pp. 1–15, 2016.
- [22] F. F.-P. Liu, J. J.-J. Dong, S. S.-J. Sun, W. W.-Y. Gao, Z.-W. Zhang, X.-J. Zhou, L. Yang, J.-Y. Zhao, J.-M. Yao, M. Liu, and L. Liao, “Autologous bone marrow stem cell transplantation in critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled trials.,” *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 125, no. 23, pp. 4296–4300, 2012.
- [23] D. E. Lee, N. Ayoub, and D. K. Agrawal, “Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy.,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, pp. 1–8, 2016.

- [24] J. M. Hare, J. H. Traverse, T. D. Henry, N. Dib, R. K. Strumpf, S. P. Schulman, G. Gerstenblith, A. N. DeMaria, A. E. Denktas, R. S. Gammon, J. B. J. Hermiller, M. A. Reisman, G. L. Schaer, and W. Sherman, "A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) after acute myocardial infarction," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 54, no. 24, pp. 2277–2286, 2009.
- [25] M. Canesi, R. Giordano, L. Lazzari, M. Isalberti, I. U. Isaias, R. Benti, P. Rampini, G. Marotta, A. Colombo, E. Cereda, M. Dipaola, T. Montemurro, M. Viganò, S. Budelli, E. Montelatici, C. Lavazza, A. Cortelezzi, and G. Pezzoli, "Finding a new therapeutic approach for no-option Parkinsonisms: mesenchymal stromal cells for progressive supranuclear palsy," *J. Transl. Med.*, vol. 14, pp. 1–11, 2016.
- [26] S. Khalili, Y. Liu, M. Kornete, N. Roescher, S. Kodama, A. Peterson, C. A. Piccirillo, and S. D. Tran, "Mesenchymal stromal cells improve salivary function and reduce lymphocytic infiltrates in mice with Sjögren's-like disease," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. 1–11, 2012.
- [27] J. Burke, M. Hunter, R. Kolhe, C. Isales, M. Hamrick, and S. Fulzele, "Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis," *Clin. Transl. Med.*, vol. 5, pp. 1–8, 2016.
- [28] Y. Li, J. Tang, Y. Hu, Y.-H. Peng, and J.-W. Wang, "A study of autologous stem cells therapy assisted regeneration of cartilage in avascular bone necrosis.," *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 19, pp. 3833–3837, 2015.
- [29] J. Madaric, A. Klepanec, M. Valachovicova, M. Mistrik, M. Bucova, I. Olejarova, R. Necpal, T. Madaricova, L. Paulis, and I. Vulev, "Characteristics of responders to autologous bone marrow cell therapy for no-option critical limb ischemia," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, pp. 1–8, 2016.
- [30] T. Saigawa, K. Kato, T. Ozawa, K. Toba, Y. Makiyama, S. Minagawa, S. Hashimoto, T. Furukawa, Y. Nakamura, H. Hanawa, M. Kodama, N. Yoshimura, H. Fujiwara, O. Namura, M. Sogawa, J. Hayashi, and Y. Aizawa, "Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells.," *Circ. J.*, vol. 68, pp. 1189–1193, 2004.
- [31] J. Finke, C. Schmoor, W. A. Bethge, H. D. Ottinger, M. Stelljes, A. R. Zander, L. Volin, D. A. Heim, R. Schwerdtfeger, K. Kolbe, J. Mayer, J. A. Maertens, W. Linkesch, E. Holler, V. Koza, M. Bornhäuser, H. Einsele, H. Bertz, O. Grishina, G.

- Socié, and for the A.-F. T. Group, “Prognostic Factors Affecting Outcome after Allogeneic Transplantation for Hematological Malignancies from Unrelated Donors: Results from a Randomized Trial,” *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 18, no. 11, pp. 1716–1726, 2012.
- [32] S. Roura, J. Farré, C. Soler-Botija, A. Llach, L. Hove-Madsen, J. J. Cairó, F. Gòdia, J. Cinca, and A. Bayes-Genis, “Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells,” *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 8, pp. 555–563, 2006.
- [33] G. D’Ippolito, P. C. Schiller, C. Ricordi, B. a Roos, and G. a Howard, “Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow.,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 14, no. 7, pp. 1115–1122, 1999.
- [34] L. Li, Y. Guo, H. Zhai, Y. Yin, J. Zhang, H. Chen, L. Wang, N. Li, R. Liu, and Y. Xia, “Aging increases the susceptibility of MSCs to reactive oxygen species and impairs their therapeutic potency for myocardial infarction,” *PLoS One*, vol. 9, no. 11, pp. 1–10, 2014.
- [35] J. Shen, Y.-T. Tsai, N. M. Dimarco, M. a Long, X. Sun, and L. Tang, “Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice.,” *Nat. Sci. Reports*, vol. 1, pp. 1–7, 2011.
- [36] Y.-M. Yang, P. Li, D.-C. Cui, R.-J. Dang, L. Zhang, N. Wen, and X.-X. Jiang, “Effect of aged bone marrow microenvironment on mesenchymal stem cell migration,” *Age (Omaha)*, vol. 37, pp. 1–9, 2015.
- [37] S. Geißler, M. Textor, K. Schmidt-Bleek, O. Klein, M. Thiele, A. Ellinghaus, D. Jacobi, A. Ode, C. Perka, A. Dienelt, J. Klose, G. Kasper, G. N. Duda, and P. Strube, “In serum veritas-in serum sanitas? Cell non-autonomous aging compromises differentiation and survival of mesenchymal stromal cells via the oxidative stress pathway.,” *Cell Death Dis.*, vol. 4, pp. 1–10, 2013.
- [38] S. S. Kim, D. W. Kwon, I. Im, Y. D. Kim, D. S. Hwang, L. S. Holliday, R. E. Donatelli, W. S. Son, and E. S. Jun, “Differentiation and characteristics of undifferentiated mesenchymal stem cells originating from adult premolar periodontal ligaments,” *Korean J. Orthod.*, vol. 42, no. 6, pp. 307–317, 2012.
- [39] M. E. Owen, J. Cavé, and C. J. Joyner, “Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F.,” *J. Cell Sci.*, vol. 87 ( Pt 5), pp. 731–738, 1987.
- [40] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, and P. Gehron Robey, “Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.,” *Stem Cells*, vol. 19, pp.

- 180–192, 2001.
- [41] N. K. Satija, V. K. Singh, Y. K. Verma, P. Gupta, S. Sharma, F. Afrin, M. Sharma, P. Sharma, R. P. Tripathi, and G. U. Gurudutta, “Mesenchymal stem cell-based therapy: A new paradigm in regenerative medicine,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 11–12, pp. 4385–4402, 2009.
- [42] R. Puts, J. Albers, A. Kadow-Romacker, S. Geissler, and K. Raum, “Influence of Donor Age and Stimulation Intensity on Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stromal Cells in Response to Focused Low-Intensity Pulsed Ultrasound,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, no. 12, pp. 2965–2974, 2016.
- [43] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, “Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification,” *Cell*, vol. 126, pp. 677–689, 2006.
- [44] S. R. Angle, K. Sena, D. R. Sumner, and A. S. Viridi, “Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound.,” *Ultrasonics*, vol. 51, pp. 281–288, Apr. 2011.
- [45] R. Puts, K. Ruschke, T. H. Ambrosi, A. Kadow-Romacker, P. Knaus, K.-V. Jenderka, and K. Raum, “A Focused Low-Intensity Pulsed Ultrasound (FLIPUS) System for Cell Stimulation: Physical and Biological Proof of Principle,” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 63, no. 1, pp. 91–100, 2016.
- [46] K. Sena, S. R. Angle, A. Kanaji, C. Aher, D. G. Karwo, D. R. Sumner, and A. S. Viridi, “Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) and cell-to-cell communication in bone marrow stromal cells.,” *Ultrasonics*, vol. 51, pp. 639–644, Jul. 2011.
- [47] P. Nolte, R. Anderson, E. Strauss, Z. Wang, L. Hu, Z. Xu, and R. Grant Steen, “Heal rate of metatarsal fractures: A propensity-matching study of patients treated with low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) vs. surgical and other treatments,” *Injury*, vol. 47, no. 11, pp. 2584–2590, 2016.
- [48] U. Farkash, O. Bain, A. Gam, M. Nyska, and P. Sagiv, “Low-intensity pulsed ultrasound for treating delayed union scaphoid fractures: case series.,” *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 10, p. 72, 2015.
- [49] R. Zura, G. J. Della Rocca, S. Mehta, A. Harrison, C. Brodie, J. Jones, and R. G. Steen, “Treatment of chronic (>1 year) fracture nonunion: Heal rate in a cohort of 767 patients treated with low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS),” *Injury*, vol. 46, no. 10, pp. 2036–2041, 2015.
- [50] D. Rubin, “An exercise program for shoulder disability.,” *Calif. Med.*, vol. 106, no. 1, pp. 39–43, 1967.

- [51] A. Khanna, R. T. C. Nelmes, N. Gougoulas, N. Maffulli, and J. Gray, "The effects of LIPUS on soft-tissue healing: A review of literature," *Br. Med. Bull.*, vol. 89, pp. 169–182, 2009.
- [52] J. W. Chow, a J. Wilson, T. J. Chambers, and S. W. Fox, "Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-Week-Old rats.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 1760–1767, 1998.
- [53] H. El-Mowafi and M. Mohsen, "The effect of low-intensity pulsed ultrasound on callus maturation in tibial distraction osteogenesis," *Int. Orthop.*, vol. 29, pp. 121–124, 2005.
- [54] F. Padilla, R. Puts, L. Vico, A. Guignandon, and K. Raum, "Stimulation of Bone Repair with Ultrasound," in *Therapeutic Ultrasound*, 2016, pp. 385–427.
- [55] A. Suzuki, T. Takayama, N. Suzuki, M. Sato, T. Fukuda, and K. Ito, "Daily low-intensity pulsed ultrasound-mediated osteogenic differentiation in rat osteoblasts," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 41, no. 2, pp. 108–115, 2009.
- [56] S. Geißler, M. Textor, J. Kühnisch, D. Könnig, O. Klein, A. Ode, T. Pfitzner, J. Adjaye, G. Kasper, and G. N. Duda, "Functional Comparison of Chronological and In Vitro Aging: Differential Role of the Cytoskeleton and Mitochondria in Mesenchymal Stromal Cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, pp. 1–13, 2012.
- [57] Y. Liu, X. Wei, Y. Kuang, Y. Zheng, X. Gu, H. Zhan, and Y. Shi, "Ultrasound treatment for accelerating fracture healing of the distal radius. A control study," *Acta Cir. Bras.*, vol. 29, no. 11, pp. 765–770, 2014.
- [58] K. H. Salem and A. Schmelz, "Low-intensity pulsed ultrasound shortens the treatment time in tibial distraction osteogenesis," *Int. Orthop.*, vol. 38, pp. 1477–1482, 2014.
- [59] M. D. Schofer, J. E. Block, J. Aigner, and A. Schmelz, "Improved healing response in delayed unions of the tibia with low-intensity pulsed ultrasound: results of a randomized sham-controlled trial," *BMC Musculoskelet Disord*, vol. 11, pp. 1–6, 2010.
- [60] B. Biglari, T. M. Yildirim, T. Swing, T. Bruckner, W. Danner, and A. Moghaddam, "Failed treatment of long bone nonunions with low intensity pulsed ultrasound," *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, vol. 136, pp. 1121–1134, 2016.
- [61] F. J. B. Lötters, J. P. van den Bergh, F. de Vries, and M. P. M. H. Rutten-van Mülken, "Current and Future Incidence and Costs of Osteoporosis-Related Fractures in The Netherlands: Combining Claims Data with BMD Measurements,"

- Calcif. Tissue Int.*, vol. 98, pp. 235–243, 2016.
- [62] S. Francisco, “Cellular Proliferation of Intestinal Epithelia in the Rat Two Months after Partial Resection of the Ileum \*,” 1959.
- [63] D. R. Varma and T. L. Yue, “Influence of age, sex, pregnancy and protein-calorie malnutrition on the pharmacokinetics of salicylate in rats,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 82, pp. 241–248, 1984.
- [64] L. M. D. Hong, H. M. D. Sultana, K. M. D. Paulius, and G. M. D. Zhang, “Steroid Regulation of Proliferation and Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells: A Gender Difference,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 114, pp. 180–185, 2009.
- [65] B. Bragdon, R. Burns, A. H. Baker, A. C. Belkina, E. F. Morgan, G. V. Denis, L. C. Gerstenfeld, and J. J. Schlezinger, “Intrinsic Sex-Linked Variations in Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Bone Marrow Multipotent Stromal Cells,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 230, no. 2, pp. 296–307, 2015.
- [66] K.-H. W. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, “Histochemistry,” *Histochemistry*, pp. 493–497, 1992.
- [67] D. A. Lowe, H. Degens, K. D. Chen, and S. E. Alway, “Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Varies With Age in Glycolytic Muscles of Rats,” *J. Gerontol.*, vol. 55A, no. 3, pp. B160–B164, 2000.
- [68] C. D. Touchberry, M. J. Wacker, S. R. Richmond, S. A. Whitman, and M. P. Godard, “Age-related changes in relative expression of real-time PCR housekeeping genes in human skeletal muscle.,” *J. Biomol. Tech.*, vol. 17, pp. 157–162, 2006.
- [69] S. E. Ross, N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson, and O. A. MacDougald, “Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling,” *Science (80-. )*, vol. 289, no. 5481, pp. 950–953, 2000.
- [70] K. Kadar, M. Kiraly, B. Porcsalmy, B. Molnar, G. Z. Racz, J. Blazsek, K. Kallo, E. L. Szabo, I. Gera, G. Gerber, and G. Varga, “Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering.,” *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 60 Suppl 7, no. 22, pp. 167–175, 2009.
- [71] Y. J. Chen, C. H. Huang, I. C. Lee, Y. T. Lee, M. H. Chen, and T. H. Young, “Effects of cyclic mechanical stretching on the mRNA expression of tendon/ligament-related and osteoblast-specific genes in human mesenchymal stem cells,” *Connect. Tissue Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 7–14, 2008.
- [72] M. Koike, H. Shimokawa, Z. Kanno, K. Ohya, and K. Soma, “Effects of mechanical

- strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2,” *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 23, pp. 219–225, 2005.
- [73] R. Puts, P. Rikeit, K. Ruschke, A. Kadow-Romacker, S. Hwang, K. V. Jenderka, P. Knaus, and K. Raum, “Activation of Mechanosensitive Transcription Factors in Murine C2C12 Mesenchymal Precursors by Focused Low-Intensity Pulsed Ultrasound (FLIPUS),” *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 63, no. 10, pp. 1505–1513, 2016.
- [74] J. Pratap, M. Galindo, S. K. Zaidi, D. Vradii, B. M. Bhat, J. A. Robinson, J. Y. Choi, T. Komori, J. L. Stein, J. B. Lian, G. S. Stein, and A. J. Van Wijnen, “Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts,” *Cancer Res.*, vol. 63, pp. 5357–5362, 2003.
- [75] M. Galindo, J. Pratap, D. W. Young, H. Hovhannisyan, H.-J. Im, J. Y. Choi, J. B. Lian, J. L. Stein, G. S. Stein, and A. J. Van Wijnen, “The Bone-specific Expression of Runx2 Oscillates during the Cell Cycle to Support a G1-related Antiproliferative Function in Osteoblasts,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 21, pp. 20274–20285, 2005.
- [76] P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, and G. Karsenty, “Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation,” *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 747–754, 1997.
- [77] T. M. Schroeder, R. A. Kahler, X. Li, and J. J. Westendorf, “Histone deacetylase 3 interacts with Runx2 to repress the osteocalcin promoter and regulate osteoblast differentiation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 40, pp. 41998–42007, 2004.

## Liste der Abbildungen

Abb. 1: CFU-F (colony forming unit-fibroblasts).....	12
Abb. 2: Stimulationsaufbau.....	14
Abb. 3: Distanzen zwischen Emitter, Well und Fokuspunkt des Ultraschalls.....	15
Abb. 4: Übersicht der Gruppeneinteilung.....	21
Abb. 5: mäanderförmige Zählweise der Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer.....	24
Abb. 6: Aussaat der Zellen für die Stimulation mit FLIPUS.....	27
Abb. 7: Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin Red S Färbung.....	33
Abb. 8: Osteogene Differenzierung.....	34
Abb. 9: Exemplarische Darstellung der lichtmikroskopischen Bewertung der adipogenen Differenzierung mittels Oil Red O Färbung.....	35
Abb. 10: Adipogene Differenzierung.....	36
Abb. 11: Exemplarische lichtmikroskopische Bilder der chondrogenen Differenzierung mittels Alcian Blue Färbung.....	37
Abb. 12: Osteocalcinexpression.....	38
Abb. 13: RUNX2-Expression.....	39
Abb. 14: Mineralisierung der Extrazellulärmatrix.....	40

## Liste der Tabellen

Tab. 1: Reagenzien.....	18
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien.....	18
Tab. 3: Geräte.....	19
Tab. 4: Software.....	19
Tab. 5: Primer für die PCR.....	20
Tab. 6: Zusammensetzung Kulturmedium.....	22
Tab. 7: Zusammensetzung Basalmedium für alle Charakterisierungsversuche.....	25
Tab. 8: Gegenüberstellung der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Charakterisierungsversuche.....	25
Tab. 9: Methodik zur Auswertung der Charakterisierungsversuche.....	26
Tab. 10: Zusammensetzung des osteogenen Mediums.....	28
Tab. 11: FLIPUS-Stimulationsparameter.....	28
Tab. 12: Mittelwerte, Standardabweichungen, sowie p- und F-Werte der osteogenen Differenzierung.....	34
Tab. 13: Mittelwerte, Standardabweichungen, sowie p- und F-Werte der adipogenen Differenzierung.....	36
14: Daten der Osteocalcinexpression.....	38
Tab. 15: Daten der RUNX2-Expression.....	39
Tab. 16: Daten der Alizarin Red S Färbung.....	40

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Josefine Albers, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Altersabhängige Unterschiede der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen nach Stimulation mit fokussiertem Ultraschall“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Josefine Albers hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

R. Puts, **J. Albers**, A. Kadow-Romacker, S. Geissler, and K. Raum,  
“Influence of Donor Age and Stimulation Intensity on Osteogenic  
Differentiation of Rat Mesenchymal Stromal Cells in Response to Focused  
Low-Intensity Pulsed Ultrasound,”  
*Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, no. 12, pp. 2965–2974, 2016.

Beitrag im Einzelnen:

Das veröffentlichte Paper wurde als gleichberechtigte geteilte Erstautorenschaft verfasst und eingereicht. Das Journal Ultrasound in Medicine and Biology deklariert diesen Status jedoch nicht.

Es erfolgte die Durchführung der Versuche (inklusive: Isolation der Stammzellen, Kultivierung, Charakterisierung, Stimulation mit FLIPUS, PCR, Alizarin Red S Färbung), die statistische Auswertung der Ergebnisse, sowie eine Literaturrecherche zum Thema. Die Verfassung des Papers erfolgte unter Zusammenarbeit mit den Koautoren.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Lebenslauf**

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

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

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

## Publikationsliste

R. Puts, **J. Albers**, A. Kadow-Romacker, S. Geissler, and K. Raum,  
“Influence of Donor Age and Stimulation Intensity on Osteogenic  
Differentiation of Rat Mesenchymal Stromal Cells in Response to Focused  
Low-Intensity Pulsed Ultrasound,”  
*Ultrasound Med. Biol.*, vol. 42, no. 12, pp. 2965–2974, 2016.

## Danksagung

Das Thema dieser Dissertation war ein Teilprojekt der Arbeitsgruppe Q-BAM, die zur Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies gehört und unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. K. Raum steht. Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) mit der Registrierungsnummer Ra 1380/8-1 unterstützt.

Mein außerordentlicher Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. K. Raum für die Überlassung des Forschungsthemas, für die Bereitstellung der benötigten Materialien, sowie für die Unterstützung und konstruktive Kritik.

Des Weiteren danke ich herzlich Anke Kadow-Romacker für ihre Unterstützung. Sie führte mich in die Laborarbeit ein, stand mir allzeit motivierend zur Seite und war stets eine hilfreiche Ansprechpartnerin.

Mein Dank geht zudem an Regina Puts für ihren Rat, wenn ich einmal nicht weiter wusste, für ihre Erklärungen und dass ich mit ihr immer eine helfende Ansprechpartnerin hatte.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. K. Schmidt-Bleek für die Betreuung unserer Sprague Dawley Ratten.

Zudem danke ich der gesamten AG Raum für das familiäre Arbeitsklima und den guten Zusammenhalt.