Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

"Beeinflussung der Genexpression von Osteoprogenitorzellen durch Prädifferenzierung und mechanische Stimulation"

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Rasmus Höft aus Bremen

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. G. Matziolis 2.: Prof. Dr. med. F. Buttgereit 3.: Priv.-Doz. Dr. med. K. Labs

Datum der Promotion: 29.01.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzur	ngsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Osteogeneseförderung	2
1.2	Tissue Engineering	2
1.2.1	Zellen	4
1.2.2	Prädifferenzierung	7
1.2.2.1	Differenzierungsfaktoren und Mediumzusätze	7
1.2.2.2	Mechanische Stimulation	9
1.2.3	Matrices	10
1.3	Arbeitshypothese	12
2	Material & Methoden	13
2.1	Methodische Grundlagen	14
2.1.1	Medien und Lösungen	14
2.1.2	Zellbiologische Grundlagen	15
2.1.3	Zellherkunft und -isolation	15
2.1.4	Zellproliferation	17
2.1.5	Herstellung der Fibrinkonstrukte	17
2.1.5.1	Fibrinogenlösung	17
2.1.5.2	Herstellung der Konstrukte	17
2.1.6	Bioreaktor	18
2.1.7	Zellvitalitätstest	19
2.1.8	Statistik	20
2.2	Vorversuche	20
2.2.1	Einfluss der Zelldichte auf die Zellvitalität	20
2.2.2	O2-Messung in Abhängigkeit von Fibrinkonzentration und Zellzahl	21

Seite

2.2.3	Einfluss von mechanischer Stimulation auf die Zellvitalität	21
2.2.4	Differenzierungsversuche	22
2.2.4.1	Osteogene Differenzierung	22
2.2.4.2	Adipogene Differenzierung	23
2.3	Hauptversuch	23
2.3.1	Prädifferenzierung	23
2.3.2	Versuchsbeschreibung	24
2.3.3	RNA-Isolierung, Reinheitskontrolle und Auswertung der Genexpression	26
2.3.3.1	RNA-Isolierung	26
2.3.3.2	Quantitäts- und Qualitätskontrolle der RNA	26
2.3.3.3	Umschreibung der RNA in cDNA und Chip-Hybridisierung	27
2.3.3.4	Auswertung	28

3 Ergebnisse

4

29

3.1	Vorversuch	29
3.1.1	Charakterisierung der Fibrinkonstrukte	29
3.1.1.1	Einfluss der Zelldichte auf die Gesamtzellvitalität	30
3.1.1.2	Sauerstoffmessung in Abhängigkeit von der Zellzahl	30
3.1.1.3	Einfluss von mechanischer Stimulation auf die Gesamtzellvitalität	31
3.1.2	Differenzierungsversuche	32
3.1.2.1	Osteogene Differenzierung	32
3.1.2.2	Adipogene Differenzierung	34
3.2	Hauptversuch: RNA-Expressionsanalyse von Osteoprogenitorzellen	35
3.2.1	Einfluss von osteogenem Medium auf MSC	36
3.2.2	Beeinflussung der RNA-Expression durch mechanische Stimulation	37
3.2.3	Beeinflussung der Mechanosensitivität durch die Differenzierungsstufe	38

Diskussion	
------------	--

41

4.1	Methodenkritik	41
4.2	Diskussion der Ergebnisse	43
4.2.1	Fibrinmatrix	43
4.2.2	Zelldifferenzierung durch stimulierende Medien	44
4.2.3	Mechanosensitivität von Osteoprogenitorzellen	46

4.2.3.1	Einfluss von osteogenem Medium	47
4.2.3.2	Mechanische Stimulation	49
4.2.3.3	Mechanisch stimulierte Zellen im Gruppenvergleich	50
5	Zusammenfassung	54
5.1	Zusammenfassung (deutsch)	54
5.2	Abstract (english)	55
6	Literaturverzeichnis	57
	Anhang	
	Danksagung	А
	Erklärung	В
	Lebenslauf	С

|||

Abkürzungsverzeichnis

aP	alkalische Phosphatase
BMP	"bone morphogenetic protein"
BMP-R	BMP-Rezeptor
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSP	"bone sialoprotein"
bzw.	beziehungsweise
C/EBP	"CCAAT/enhancer binding protein"
CD	"cluster of differentiation"
cDNA	"copied" DNA
CMSC	Centrum für muskoloskeletale Chirurgie
Col	Kollagen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	"Dulbeccos modified eagle medium"
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	"epidermal growth factor"
EGF-R	EGF-Rezeptor
FBS	fötales Kälberserum
FGF	"fibroblast growth factor"
FGF-R	FGF-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICAM	"intercellular adhesion molecule"
IGF	"insulin-like growth factor"
IGF-R	IGF-Rezeptor
iSMAD	inhibitorischer SMAD
KIE	Kallidogenase-Inaktivator-Einheiten
M-CSF	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	"messenger" RNA

MSC	mesenchymale Stammzelle
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-
	sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MyoD	"myogenic differentiation"
ΝϜκΒ	"nuclear facor к В
O ₂	Sauerstoff
OPN	Osteopontin
Osx	Osterix
PBS	"phosphate buffered solution"
PDGF	"platelet derived growth factor"
PDGF-R	PDGF-Rezeptor
PMS	Phenazinmethosulfat
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor y
RNA	Ribonukleinsäure
RPL13A	ribosomales Protein L13A
rSMAD	rezeptoregulierter SMAD
RunX2	"runt-related transcription factor 2"
TGF-ß	"transforming growth factor-B"
TGF-β-R	TGF-ß-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
SMAD	"small, mothers against decapentaplegic"
SOX9	"(sex determining region Y)-box 9"
VCAM	"vascular cell adhesion molecule"
VD-R	Vitamin-D-Hormon-Rezeptor
VEGF	"vascular endothelial growth factor"
VEGF-R	VEGF Rezeptor
z.B.	zum Beispiel
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional

Knochen ist ein Gewebe, das nach Schädigung ohne Narbenbildung heilen kann. Jedoch ist seine Regenerationsfähigkeit begrenzt. Knochendefekte, die eine kritische Größe überschreiten, heilen oftmals trotz angemessener Ruhigstellung nicht. Diese Situationen entstehen unter anderem bei Tumorresektionen [1], Traumata [2, 3] und Endoprothesenwechseln [4, 5]. Sie stellen ein großes Problem in der Orthopädie, Unfall- und Kieferchirurgie dar.

Die besten klinischen Ergebnisse werden derzeit durch die Behandlung mit autogenen Knochentransplantaten erzielt [6]. Diese gelten deswegen als Goldstandard in der Behandlung von Knochendefekten [7]. Nachteilig sind aber die Entnahmemorbidität [8, 9] und die Begrenzung des zur Verfügung stehenden Materials [10].

Allogene oder xenogene Transplantate können alternativ verwendet werden [11, 12], bergen allerdings ein Risiko für immunologische Abstoßungsreaktionen und die Übertragung von Infektionskrankheiten [13, 14]. Anorganische Materialien wiederum stellen die sofortige Stabilisierung des Knochendefektes sicher, führen aber hinsichtlich Materialermüdung, Resorption und Korrosion zu Problemen [15, 16].

Aufgrund dieser Problematik wird intensiv an alternativen Biomaterialien geforscht, die nach Einbringung in den Defekt und erfolgtem Remodeling zur *restitutio ad integrum* führen.

Eine Möglichkeit ist die Erzeugung von Vitalimplantaten mit Hilfe des Tissue Engineerings. Joseph P. Vacanti definierte 1995 Tissue Engineering allgemein als "*An interdisciplinary field in which the principles of engineering and life science are applied toward the generation of biologic substitutes aimed at the creation, preservation or restoration of lost organ function*" [17]. Für die Herstellung artifizieller autologer Knochenersatzmaterialien wird eine *in-vitro-*Züchtung von dreidimensionalen Ersatzmaterialien aus einer kleinen Zahl vitaler Zellen angestrebt. Die Zellen sollen dabei durch chemische, mechanische und umgebungsspezifische Stimuli auf ihren Einsatz *in vivo* optimal vorbereitet werden [18].

1.1 Osteogeneseförderung

Materialien zur Anregung der Knochenneubildung können drei osteogenesefördernde Eigenschaften besitzen, wobei

- osteoinduktive Eigenschaften die Differenzierung von Progenitorzellen fördern.
- osteokonduktive Eigenschaften zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Einwanderung von Progenitorzellen in das zu regenerierende Gewebe führen.
- osteoplastische Eigenschaften direkt die Knochenregeneration durch das Vorhandensein von Progenitorzellen unterstützen.

Knochenersatzmaterialien zeigen diese Eigenschaften in unterschiedlicher Ausprägung.

1.2 Tissue Engineering

Bisher wurden im Rahmen des Tissue Engineerings folgende drei Verfahrensarten zur Erzeugung von Knochenersatzmaterialien eingesetzt:

- matrixbasierte Verfahren
- proteinbasierte Verfahren
- zellbasierte Verfahren

Bei matrixbasierten Verfahren wird eine reine Defektfüllung durch synthetische Materialien angestrebt. Hierzu werden meist Keramiken aus Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat oder Metalle, wie zum Beispiel Titan oder Tantal, verwendet. Diese weisen oft eine poröse osteokonduktiv wirkende Oberfläche auf. Die Nachteile dieser Materialien liegen im Fehlen von weiteren osteogenesefördernden Eigenschaften und in ihren ungünstigen physikalischen Charakteristika [15, 16, 19, 20].

In proteinbasierten Verfahren werden Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren mit osteoinduktiven Eigenschaften in den Defekt eingebracht. Die Grundlage für dieses Verfahren wurde 1965 von Urist entdeckt [21]. Er beobachtete eine ektope Knochenneubildung nach Injektion von lyophilisiertem, demineralisiertem Knochen im Kaninchenmodell. Die einzelnen Wirkbestandteile wurden in den vergangenen Jahren

genauer analysiert. Dabei wurden über 15 Faktoren isoliert, die zu einer osteogenen Differenzierung *in vivo* führen [22]. Trotz intensiver Forschung und erfolgversprechenden präklinischen Studien wurden jedoch mit diesen Faktoren, mit Ausnahme von BMP-2 [23], kaum klinische Erfolge erzielt [24].

Die zellbasierten Verfahren sind die differenziertesten Methoden. Dabei hat sich das Verfahren von der einfachen Einbringung von Zellen in einen Defekt hin zur Herstellung komplexer Konstrukte *in vitro* entwickelt. Heute kommt folgender Algorithmus zur Anwendung (Abb. 1):

Dem Patienten wird zunächst eine Gewebeprobe entnommen, aus der die gewünschten Zellen isoliert werden. Diese Zellen werden in vitro vermehrt, dann in eine dreidimensionale Matrix eingebracht, durch Prädifferenzierung auf ihren Einsatz in vivo vorbereitet und anschließend reimplantiert. Die Knochenheilung ist nach Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenarchitektur, Remodeling, dem abgeschlossen.



Abb. 1: Vorgehensweise beim zellbasierten Verfahren.

Für die Herstellung von osteogenen Konstrukten mit Hilfe des zellbasierten Verfahrens benötigt man daher

- Zellen
- Methoden zur Prädifferenzierung der Zellen
- eine Matrix.

Der folgende Abschnitt bietet einen Überblick über ausgewählte Bestandteile dieser Konstrukte.

1.2.1 Zellen

Grundlage der Konstrukte bilden osteogene Zellen. Sie müssen sich gut vermehren lassen und zur osteogenen Differenzierung fähig sein. Für die Auswahl der passenden Zellen ist das Wissen über die Zellen im Knochen und ihre Differenzierungsstufen entscheidend.

Reifer Knochen besteht aus Osteozyten, die in der sie umgebenden Matrix eingebaut sind. Osteozyten entstehen in einem kontinuierlichen Prozess aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) [25]. Die Entwicklung verläuft von der MSC über die frühe Osteoprogenitorzelle und den Präosteoblasten hin zum Osteoblasten und schließlich zum Osteozyten (Abb. 2).



Abb. 2: Differenzierung des Osteoblasten aus der mesenchymalen Stammzelle mit den jeweils typischen Expressionsmustern in den einzelnen Entwicklungsphasen, modifiziert nach Aubin [26].

Bis heute sind nur wenige osteogenesespezifische Gene bekannt. Zwei davon sind der "runt-related transcription factor 2" (RunX2) und Osterix (Osx). Beide sind Transkriptionsfaktoren mit entscheidender Bedeutung für die frühe Osteogenese. RunX2 und Osx knock-out-Mäuse entwickeln deshalb keinen bzw. kaum Knochen [27, 28]. Osx reguliert die Osteogenese stromabwärts von Runx2, da sich in Osx knock-out-Mäusen noch Runx2 positive Zellen finden lassen, umgekehrt jedoch nicht [27].

Es gibt bis heute jedoch keinen spezifischen Marker für MSC, so dass die Einteilung der Vorläuferzellen nach ihrer Differenzierungsfähigkeit sowie nach ihren Expressionsprofilen und Oberflächenmarkern erfolgt [29].

MSC und Osteoblasten haben aufgrund ihres Differenzierungs- und Proliferationspotentials für die Herstellung osteogener Konstrukte eine herausragende Bedeutung. Daher soll im folgenden auf beide besonders eingegangen werden.

Bei der Charakterisierung von MSC und Osteoblasten an Hand ihrer Syntheseprodukte und Oberflächenmarker fallen die vielen Gemeinsamkeiten auf (Abb. 3).



Abb. 3: Von MSC und Osteoblasten synthetisierte Proteine, modifiziert nach Schieker [30].

Diese Ergebnisse wurden von einer Vielzahl von Autoren erbracht. Die einzelnen Ergebnisse miteinander zu vergleichen ist schwierig, da die Arbeitsgruppen unterschiedliche Isolationsverfahren und Kulturbedingungen benutzten, wodurch Gene verschieden reguliert und Expressionsprofile anders akzentuiert werden [31, 32].

Mesenchymale Stammzellen

MSC sind die frühesten Osteoprogenitorzellen im adulten Körper. Friedenstein et al. isolierten 1968 als erste MSC aus dem Knochenmark [33], ihren Namen erhielten sie 1991 durch Caplan [34]. Haynesworth verbesserte die Isolierungsmethode durch die Einführung einer Dichtegradientenzentrifugation in den Prozess [35].

MSC konnten *in vivo* zur Knochenbildung [33, 36, 37] und *in vitro* [38-40] zur Matrixmineralisierung angeregt werden. Sie können außer in osteogene auch in chondrogene, adipogene und andere Richtungen differenziert werden [41-43]. Ihr Nachweis wird mangels spezifischer Marker zur Zeit durch Differenzierungsversuche *a posteriori* erbracht. Marker der fortgeschrittenen Osteogenese wie alkalische Phosphatase (aP) und Kollagen I werden von MSC nicht exprimiert [26, 41].

MSC sind auch nach der zehnten Zellteilung noch pluripotent [41, 44] und daher mit dieser Eigenschaft als Ausgangsmaterial für den Einsatz im Tissue Engineering besonders geeignet.

Osteoblasten

Die Funktion der Osteoblasten *in vivo* besteht in der Synthese der kollagenreichen extrazellulären Matrix (ECM), die sekundär mineralisiert. Am Ende der sekretorischen Phase der Knochenformation werden die Zellen mit kalzifizierter Matrix eingebaut und differenzieren entweder zu Osteozyten, flachen ab und werden zu "Lining-Cells" oder werden apoptotisch [26].

Osteoblasten sind im Gegensatz zu MSC nicht pluripotent. Sie exprimieren neben RunX2 und Osx zusätzliche Marker der fortgeschrittenen Osteogenese wie alkalische Phosphatase und "bone sialoprotein" [30]. Zu den synthetisierten Proteinen gehören vor allem Kollagene, Osteocalcin, Matrixmetalloproteasen (MMP) und Integrine. Osteoblasten eignen sich weniger als Ausgangsmaterial für die Herstellung osteogener Konstrukte, aufgrund ihrer geringen Proliferationsrate [31, 45]. Sie wären jedoch bei der Implantation in Knochendefekte von Vorteil, da Osteoblasten wegen ihrer weiter als bei den MSC fortgeschrittenen Differenzierung bereits extrazelluläre Matrix produzieren und dadurch schneller zur Wiederherstellung von Knochensubstanz führen könnten.

1.2.2 Prädifferenzierung

Die isolierten Zellen sollen durch Methoden der Prädifferenzierung auf ihren Einsatz *in vivo* vorbereitet werden. Diese kann durch Kulturmedien, Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie mechanische Stimulation erreicht werden [41, 46, 47].

1.2.2.1 Differenzierungsfaktoren und Mediumzusätze

Differenzierungsfaktoren wie "bone morphogenetic proteins" (BMP) [47] und "transforming growth factor-ß" (TGF-ß) [48] besitzen osteoinduktive Eigenschaften. Beide gehören zur Gruppe der TGF-ß-Superfamilie. Faktoren dieser Klasse binden an spezifische transmembranöse Rezeptoren, die an den SMAD-Signalweg ("small, mothers against decapentaplegic pathway") gekoppelt sind [49]. Dieser besteht aus einer Kaskade aktivierender und inhibitorischer SMAD (Abb. 4). Es gibt zwei Rezeptortypen die zusammenwirken. Typ II bindet den Liganden und phopsphoryliert anschließend den Rezeptor Typ I, woraufhin dieser bestimmte SMAD reguliert. Laut

Attisano und Wrana gibt es 8 verschiedene SMAD [50]. SMAD-1, -2, -3, -5 und -8 gehören zu den rezeptorregulierten SMAD (rSMAD). Diese werden vom Rezeptor Typ I direkt phosphoryliert und somit aktiviert. Die rSMAD verbinden sich mit SMAD-4, einem ubiquitären CoSMAD. Zusammen akkumulieren sie im Nukleus. Durch Bindung an DNA-Bindungsstellen, Coaktivatoren und –repressoren steuern sie die Genexpression. Eine dritte Klasse von SMAD sind die inhibitorischen SMAD (iSMAD) -6 und -7, die durch eine Verkürzung der Halbwertszeit der rSMAD den Signalweg beeinflussen [49, 50].



Abb. 4: Signaltransduktion durch den SMAD-Signalweg, modifiziert nach Attisano und Wrana [50].

Die osteoinduktive Wirkung der Differenzierungsfaktoren ist für BMP-2 am besten dokumentiert. Es vermittelt seine Wirkung über den BMP-Rezeptor Typ I, welcher SMAD-1 und -5 aktiviert [51]. Die Induktion der osteogenen Differenzierung dauert *in vitro* ungefähr 7 bis 14 Tage. Die osteogenesefördernden Eigenschaften von BMP-2 konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und in klinischen Studien nachgewiesen werden [22, 47].

Neben den Wachstumsfaktoren als Proteine können auch andere Substanzen osteoinduktiv wirken. Zu diesen gehören Dexamethason, Ascorbinsäure und ß-Glycerolphosphat. Jaiswal et al. entwickelten das Standardprotokoll für die Kultur von MSC mit diesen drei Zusätzen [40]. Dexamethason hemmt die Proliferation und fördert die Osteogenese, ß-Glycerophosphat dient als Phosphatquelle und Ascorbinsäure als Co-Faktor für die Hydroxylierung von Prolin und Lysin bei der Kollagensynthese. Für die beginnende Differenzierung in osteogene Richtung ist *in vitro* eine durchschnittliche Kulturdauer von 7 bis 14 Tagen nötig [40, 41].

Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass die Zeit bis zur Wirkungsentfaltung von Mediumzusätzen und Wachstumsfaktoren mit bis zu zwei Wochen relativ lang ist [40, 41]. Im Falle einer Implantatherstellung kann es außerdem zu allergischen Reaktionen und bei Freisetzung von Zusätzen zur Beeinflussung verschiedenster Gewebe kommen [52]. Die Suche nach anderen Methoden zur Prädifferenzierung von osteogenen Zellen stellt daher einen großen Forschungsbedarf dar.

1.2.2.2 Mechanische Stimulation

Die mechanische Stimulation von osteogenen Zellen in Konstrukten ist eine weitere Methode der Prädifferenzierung. Bereits 1892 postulierte Wolff, dass Knochen durch mechanische Belastung zum Auf- und durch Entlastung zum Abbau angeregt wird. Der Nachweis des Einflusses mechanischer Belastung auf den Knochen *in vivo* gelang. Courteix et al. zeigten zum Beispiel, dass Turner, die hohen Bremskräften ausgesetzt sind, dichtere Knochen haben als Schwimmer, auf die keine Bremskräfte wirken [53]. Junge Ratten, die sich vermehrt im Laufrad bewegten, wiesen ebenfalls ein vermehrtes Knochenwachstum auf [54]. Bei Untersuchungen des Einflusses von mechanischer Stimulation auf Osteoprogenitorzellen *in vitro* wurden Hinweise auf eine osteoinduktive Wirkung gefunden [46, 55, 56]. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Ergebnisse. Angele et al. zeigten eine verstärkt chondrogene Differenzierung von MSC unter hydrostatischer Belastung [57]. Wahrscheinlich liegt dies an den unterschiedlichen Belastungsarten. Vielversprechend scheint der Einsatz mechanischer Kompression zu sein. Matziolis et al. fanden in 3D-Konstrukten mit Osteoprogenitorzellen, die in einem neuartigen Bioreaktor (siehe 2.1.6) mechanischer Kompression ausgesetzt wurden,

9

Hinweise auf eine fortgeschrittene osteogene Differenzierung der Zellen [55]. Der Einsatz dieses Bioreaktors zur Prädifferenzierung von osteogenen Zellen liegt daher nahe. Die Dauer der Stimulation dürfte jedoch nicht wie bei Remodelingprozessen *in vivo* Monate in Anspruch nehmen. Diese Zeitspanne ist für die Herstellung von osteogenen Konstrukten unannehmbar, da zur adäquaten Behandlung von Knochendefekten Konstrukte zeitnah hergestellt werden müssen. Aus diesem Grund ist es von Interesse, die Kulturzeit bis zur endgültigen osteogenen Differenzierung möglichst kurz zu halten. Es ist jedoch noch unklar, ob auch eine kurzzeitige mechanische Stimulation *in vitro* über wenige Tage ausreichend wäre, um eine osteogene Differenzierung zu induzieren.

1.2.3 Matrices

Die verwendete Matrix interagiert direkt mit den Zellen, gibt die physikalischen Bedingungen vor und entscheidet über die Möglichkeiten der Einbringung des Konstruktes während der Operation.

Folgende Eigenschaften sollte die Matrix besitzen:

- Biokompatibilität
- Degradierbarkeit
- Resorbierbarkeit
- Porosität
- mechanische Stabilität

Da MSC physiologischerweise in einer dreidimensionalen (3D) Anordnung vorkommen, sollte ebenfalls eine 3D Anordnung Verwendung finden. In Experimenten wurde nachgewiesen, dass die Zellen sich hierdurch vor allem stärker differenzieren [58, 59]. Zahlreiche Materialien wurden in der Vergangenheit für die Kultur von MSC getestet. Hydroxylapatit kam dabei häufig zur Anwendung [19, 20, 39, 60], da es ein hartes Material ist, dessen Oberflächenbeschaffenheit der des Knochens ähnelt. Nachteilig ist jedoch die ungenügende Degradierbarkeit, wodurch noch nach Jahren die Implantate radiologisch nachgewiesen werden können [20, 61]. Hydroxylapatit ist zwar ein naturnaher Stoff, ist aber ungeeignet, um die Zellen innerhalb dieser Matrix mechanischer Kompression auszusetzen.

Fibrin ist ein Bestandteil der menschlichen Gerinnungskaskade und hat sich sowohl im Tissue Engineering [55, 62-64] als auch in der Klinik bereits bewährt [65-67]. Fibrin-Monomere entstehen durch die Spaltung von Fibrinogen durch Thrombin. Diese werden durch den aktivierten Faktor XIII kovalent über Lysin-Glutamin-Bindungen verbunden, lagern sich zu Fibrillen zusammen und bilden am Ende ein dreidimensionales Netzwerk. Die Geschwindigkeit der Degradierung des Fibrins hängt vom Gleichgewicht zwischen Plasminogen und weiteren Proteasen sowie Aprotinin, einem Proteaseinhibitor, ab.

Die Vorteile von Fibrin sind seine Biodegradierbarkeit, die Fähigkeit von Zellen an Fibrin zu adhärieren, zu proliferieren und sich zu differenzieren [63, 68, 69]. Aufgrund des humanen Ursprungs werden kaum allergische Reaktionen beim Einsatz im Menschen beobachtet. Es ist zudem elastisch und kann daher mechanische Kompression in Deformation umwandeln.

1.3 Arbeitshypothese

Im Rahmen des Tissue Engineerings von Knochenersatzmaterialien wird versucht osteogene Konstrukte zur Behandlung von Knochendefekten zu erzeugen. Diese Konstrukte enthalten Zellen, die für ihren Einsatz *in vivo* prädifferenziert werden können. Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob dies auch durch kurzzeitige mechanische Stimulation erfolgen kann. Dafür soll zunächst in Vorversuchen die optimale Dichte von humanen mesenchymalen Progenitorzellen in einer Fibrinmatrix bestimmt werden, sowie deren Eignung für die Verwendung in einem neuentwickelten Bioreaktor zur mechanischen Stimulation. Anschließend soll im Hauptversuch geklärt werden, ob unter Verzicht auf Wachstumsfaktoren schon eine dreitägige mechanische Stimulation humaner mesenchymaler Progenitorzellen in der Fibrinmatrix ausreichend ist, um eine osteogene Differenzierung der Zellen zu induzieren, die mit der von prädifferenzierten MSC und Osteoblasten vergleichbar ist. Zudem soll der Einfluss von osteogenem Medium auf MSC in diesem Versuchsaufbau bestimmt werden.

2 Material & Methoden

In den Vorversuchen wurden die optimale Zelldichte der verwendeten Fibrinmatrix und deren Eignung für ihren Einsatz in den für mechanische Stimulation entwickelten Bioreaktoren untersucht. Dafür wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Bestimmung der Gesamtzellvitalität von MSC in Abhängigkeit von der Zelldichte,
- Messung der O₂-Sättigung innerhalb der Fibrinkonstrukte in Abhängigkeit von der Zellzahl und
- Ermittlung der Gesamtzellvitalität von MSC in mechanisch stimulierten und unbelasteten Kontrollkonstrukten.

Zur Bestätigung der Differenzierungsfähigkeit der isolierten humanen MSC und Osteoblasten wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Einfluss von osteogenem Medium auf die aP-Expression und auf die Bildung von kalzifizierter Matrix.
- Phänotypisierung unter Einfluss von adipogenem Medium.

Nach Bestimmung der optimalen Parameter in der Fibrinmatrix und Sicherung der spezifischen Differenzierungsfähigkeit der MSC und Osteoblasten wurde der Hauptversuch durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst isoliert, kultiviert und prädifferenziert. Anschließend wurden die Zellen in die Fibrinmatrix eingebracht und für drei Tage in Bioreaktoren überführt und darin mechanisch stimuliert. Dann wurde die RNA isoliert und mit Hilfe von Microarrays untersucht (Abb. 5).



2.1 Methodische Grundlagen

2.1.1 Medien und Lösungen

Stammzellmedium	
"Dulbeccos modified eagle medium" (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
(4500 mg/l Glukose, 584 mg/l L-Glutamin)	
+ 10 % fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin
+ 100.000 IE/ml Penicillin	Serva, Heidelberg
+ 100 mg/ml Streptomycin	Serva, Heidelberg
Osteogenes Medium	
DMEM (4500 mg/l Glukose, 584 mg/l L-Glutamin)	Gibco, Karlsruhe
+ 10 % FBS	Biochrom, Berlin
+ 200 μM Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München
+ 7 mM B-Glycerophosphat	Calbiochem, Bad Soden
+ 0,01µM Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
Adipogenes Medium	
DMEM (4500 mg/l Glukose, 584 mg/l L-Glutamin)	Gibco, Karlsruhe
+ 10 % FBS	Biochrom, Berlin
+ 1 μM Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
+ 2 μM Insulin	Sigma-Aldrich, München
+ 200 μM Indomethacin	Sigma-Aldrich, München
+ 500 μM IsobutyImethyIxanthin	Sigma-Aldrich, München
Waschlösung 1	
1 LAqua dest	

-1	
+ 1 % Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, München
+ 1,75 ‰ Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, München
+ 0,88 ‰ Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München

Waschlösung 2

- 1 | Aqua dest.
- + 0,5 % Natriumdodecylsulfat
- + 0,88 ‰ Natriumchlorid
- + 0,44 ‰ Natriumcitrat

Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München

2.1.2 Zellbiologische Grundlagen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Größe (T75, T175, T300; Nunc, Wiesbaden) in einem Brutschrank (Heraeus/Kendro, Düsseldorf) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellkulturmedien wurden, soweit nicht anders angegeben, zweimal pro Woche gewechselt.

2.1.3 Zellherkunft und -isolation

Zellherkunft

Die humanen MSC stammten aus dem Femurmarkraum, die humanen Osteoblasten aus der Spongiosa des Femurkopfes. Beide Materialien wurden bei Hüft-Totalendoprothesen-Operationen im Centrum für muskoloskeletale Chirurgie (CMSC) der Charité gewonnen. Alle Patienten hatten der Entnahme vorher schriftlich zugestimmt. Die Materialien wurden bei 8 °C aufbewahrt und innerhalb von vier Stunden ins Labor transportiert und dort sofort weiterverarbeitet.

Isolation der MSC

Die MSC wurden nach Haynesworths Verfahren [35] durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque[®] 1077 (Sigma-Aldrich, München) isoliert.



Abb. 6: Schichten im Einweggefäß (15 ml) nach der Zentrifugation.

Es wurden 5 ml Histopaque® 1077 in ein Einweggefäß (15 ml; Becton Dickinson, Heidelberg) gegeben. Dieses wurde mit 8 ml Aspirat aus dem proximalen Femur überschichtet. Dann wurde eine Dichtegradientenzentrifugation (Rotofix 32; Hettich, Tuttlingen) bei 33 g für 20 Minuten durchgeführt, nach der im Einmalgefäß fünf Phasen erkennbar waren (Abb. 6). Als Schicht mit der geringsten Dichte befand sich oben das Fett, darunter das Plasma, danach die Interphase mit den MSC, anschließend das Histopaque und ganz unten Erythrozyten und Zelltrümmer. Das Fett wurde mit einer sterilen Einmalpipette (Sarstedt, Nümbrecht) entfernt, bevor die MSC mit einer weiteren Einmalpipette abgesaugt und in eine T75-Zellkulturflasche (75 cm²) überführt wurden. Diese wurde mit 15 ml Stammzellmedium gefüllt und im Brutschrank inkubiert. Nicht-adhärente Zellen wurden durch die Medienwechsel entfernt.

Isolation der Osteoblasten

Zur Gewinnung der Osteoblasten wurden Knochensplitter aus der Spongiosa des Hüftkopfes mit Skalpell und Pinzette gelöst. Diese wurden wiederholt gespalten, bis sie kleiner als 1 mm³ waren. Anschließend wurden diese Spongiosastücke in ein 50 ml Einweggefäß überführt. Die Entfernung von anhaftendem Knochenmark wurde durch wiederholte mechanische Reinigung mit Phosphate buffered solution (PBS; PAA Laboratories, Pasching) erzielt. Die Spongiosastücke wurden dann in eine T75-Zellkulturflasche mit Stammzellmedium gegeben und über zwei Wochen in der selben kultiviert.

2.1.4 Zellproliferation

Die Passage erfolgte bei 80 % Konfluenz. Es wurde zweimal mit 1 ml PBS/cm² Zellkulturflaschenboden gewaschen und anschließend mit 15 μ l Trypsin (Serva, Heidelberg)/cm² Zellkulturflaschenboden 3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden in Stammzellmedium aufgenommen und eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe eines Cell-Counters (Casy[®] 1; Schärfe System, Reutlingen) durchgeführt. Anschließend wurden 2,5 x 10³ Zellen/cm² Zellkulturflaschenboden ausgesät.

2.1.5 Herstellung der Fibrinkonstrukte

2.1.5.1 Fibrinogenlösung

Für die Herstellung der Fibrinogen- und Thrombinlösung wurde das Tissucol-Kit 2,0 Immuno (Baxter, Heidelberg) verwendet.

Die Fibrinogenlösung enthielt 3000 Kallidogenase-Inaktivator-Einheiten (KIE)/ml, 70-110 mg/ml Fibrinogen (ca. 9 %), 2-9 mg/ml Plasmafibronectin und 10-50 IE/ml Blutgerinnungsfaktor XIII.

Die Thrombinlösung enthielt 500 IE Thrombin/ml Kalziumchloridlösung, wobei die Kalziumchloridlösung eine Konzentration von 5,88 mg/ml hatte. Beide Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.1.5.2 Herstellung der Konstrukte

Das Medium wurde, um die Degradation der Fibrinmatrix zu verhindern, mit 240 KIE/ml Aprotinin versetzt.

Die benötigte Anzahl an Zellen wurde in einem 15 ml Einweggefäß abzentrifugiert und in 350 µl Medium resuspendiert.

Es wurden 35 μ l Fibrinogenlösung mit 265 μ l Stammzellmedium gemischt und zu den Zellen hinzugegeben. 50 μ l eines Thrombinlösung/Stammzellmedium-Gemisches

(Verhältnis 1:2; 500 IE/ml Thrombin) wurden hinzugefügt. Die Matrix härtete eine Stunde lang im Brutschrank aus. Danach wurden die Konstrukte zwischen zwei autoklavierten, humanen Spongiosascheiben platziert, in den Bioreaktor überführt und 25 ml Stammzellmedium hinzugegeben. Die Spongiosascheiben (14 mm Durchmesser, 4 mm Höhe) waren vorher für zwei Stunden in Stammzellmedium rehydriert worden.

2.1.6 Bioreaktor

Der Bioreaktor (Abb. 7) war durchsichtig, korrosionsfrei und mit Ethylenoxid sterilisierbar. Ein Gasaustausch zwischen der Umgebung und der geschlossenen zylindrischen Polyethylenkammer konnte über vier Sterilfilter (Schleicher & Schuell, Dassel) stattfinden. Das Medium konnte nach Entfernung des Aufsatzes gewechselt werden. Das Konstrukt wurde zwischen zwei flexiblen Silikonmembranen mechanisch stimuliert. Durch die pneumatisch erzeugte Verschiebung der oberen Membran wurde ein gleichmäßiger Druck auf das Konstrukt ausgeübt. Die untere Membran war über eine Injectomat[®]-Leitung (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) mit einem Druckwandler verbunden, über den die Messung der Druckänderung erfolgte. Ein in das Gerät integrierter und programmierbarer Regelkreis ermöglichte die Steuerung des Drucks. Es konnten stufenlos Drücke bis 11 kPa und Frequenzen bis 1 Hz erzeugt werden. Die Versuche wurden einheitlich mit einer Frequenz von 0,5 Hz und einem Druck von 10 kPa durchgeführt. Ziel war eine Deformation von $\Delta h/h = 20$ % der Konstruktdicke (ca. 1 mm), da dies der axialen Kompression in osteosynthetisch stabilisierten Frakturen entspricht [70].



Abb. 7: Skizze des Bioreaktors.

2.1.7 Zellvitalitätstest

Die Zellvitalität wurde mit dem CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA) untersucht. Das Prinzip des Assays ist wie folgt: 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) wird durch Dehydrogenasen, die in vitalen Zellen vorkommen, mit Hilfe von Phenazinmethosulfat (PMS) zu einem Fomazansalz umgesetzt. Dieses kann im Photometer bei λ = 490 nm gemessen werden. Die Extinktion ist dabei proportional zur Zellzahl [71, 72].

Der Zellvitalitätstest wurde zur Evaluierung der Zellzahl in Fibrinkonstrukten und in Monolayerkulturen in 96-Well-Kulturplatten (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Die Verdünnung der Ausgangslösung erfolgte mit Stammzellmedium nach Herstellerangaben, so dass in der Testlösung Konzentrationen von 333 µg/ml MTS und 16 µg/ml PMS resultierten. Die Fibrinkonstrukte wurden in eine 24-Well-Kulturplatte überführt, zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml Testlösung versetzt. Während der Inkubation im Brutschrank wurden dreimal in 30-minütigen Abständen je 80 µl

Medium abgenommen und zur Extinktionsmessung im ELISA-Reader (Dynex Technologies, UK) in eine 96-Well-Kulturplatte gegeben.

Die Monolayerkulturen in den 96-Well-Kulturplatten wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit 100 μ l Testlösung versetzt und im Brutschrank inkubiert. Nach 60 Minuten wurden einmalig 80 μ l abgenommen, in eine neue 96-Well-Kulturplatte gegeben und die Extinktion bei λ = 490 nm bestimmt.

2.1.8 Statistik

Die Daten wurden mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben mit gleicher Varianz unter SPSS 12.0.1 (SPSS, USA) ausgewertet. Die Signifikanzniveaus wurden als p < 0.05 und p < 0.01 definiert.

2.2 Vorversuche

Die Matrix wurde hinsichtlich der optimalen Zelldichte, der O₂-Sättigung innerhalb der Konstrukte und des Einflusses der mechanischen Belastung auf die Zellvitalität getestet. Die Versuche wurden mit MSC durchgeführt. Außerdem wurde die Differenzierungsfähigkeit der MSC und Osteoblasten untersucht.

2.2.1 Einfluss der Zelldichte auf die Zellvitalität

Es wurden jeweils drei Konstrukte mit folgenden Zelldichten angefertigt:

Zellen je Konstrukt	Zelldichte (Zellen/µl Matrix)
0	Ohne Zellen
1x10 ⁵	140 Zellen/µl Matrix
5x10 ⁵	700 Zellen/µl Matrix
1x10 ⁶	1400 Zellen/µl Matrix
2x10 ⁶	2800 Zellen/µl Matrix
4x10 ⁶	5600 Zellen/µl Matrix

Tabelle 1: Gesamtzellzahl und Zelldichte je Konstrukt.

Die Konstrukte wurden in 12-Well-Kulturplatten mit jeweils 7 ml Stammzellmedium, das 240 KIE/ml Aprotinin enthielt, gegeben. Im Anschluss an eine viertägige Inkubationszeit mit täglichem Mediumwechsel wurde die Zellvitalität bestimmt.

2.2.2 O₂-Messung in Abhängigkeit von Fibrinkonzentration und Zellzahl

Auch für diesen Versuch wurden jeweils drei Konstrukte pro Gruppe angefertigt. Diese enthielten keine, 1400 oder 2800 Zellen/µl Matrix.

Die Konstrukte wurden mit einer Venüle (BD Venflow[®] Pro, USA) mit 0,7 mm Außendurchmesser waagerecht durchstochen und das Mandrin anschließend entfernt. Nachdem von der Gegenseite des Kunststoffschlauchs die O₂-Meßsonde "Revoxode[®]" (GMS, Kiel) vorgeschoben worden war, wurde dieser entfernt. Die Konstrukte wurden in einen Bioreaktor mit Stammzellmedium mit 240 KIE/ml Aprotinin überführt. Wegen der Temperaturabhängigkeit der Methode erfolgten die Messungen erst nach dem Temperaturausgleich. Die Sonde wurde aus dem Konstrukt zurückgezogen und die Sauerstoffkonzentration dabei an sieben verschiedenen Messpunkten, die durch Striche auf der Sonde markiert waren, vom angeschlossenen LICOX CMP[®]-Monitor (GMS, Kiel) abgelesen und protokolliert.

2.2.3 Einfluss von mechanischer Stimulation auf die Zellvitalität

Es wurden sechs Konstrukte mit 1400 Zellen/µl Matrix hergestellt. Alle Konstrukte wurden in Bioreaktoren überführt und über drei Tage kultiviert. Drei Konstrukte wurden dabei mit einer Frequenz von 0,5 Hz und 10 kPa mechanisch belastet während die Übrigen als Kontrollen dienten. Zur Untersuchung des Einflusses der dreitägigen Kultur auf die Zellvitalität wurden am dritten Tag zusätzlich drei frische Konstrukte hergestellt. Mit allen Konstrukten wurde der Zellvitalitätstest durchgeführt.

2.2.4 Differenzierungsversuche

Zur Bestimmung des Differenzierungspotentials der MSC und Osteoblasten wurden die Zellen versuchsweise osteogen und adipogen differenziert.

Für die osteogene Differenzierung wurden die Zellen in drei Gruppen unterteilt:

Die undifferenzierten MSC der Gruppe A waren MSC, die ausschließlich mit Zellkulturmedium behandelt wurden. Die prädifferenzierten MSC der Gruppe B waren MSC, die bis zu einer 100 %igen Konfluenz gewachsen waren und anschließend mit osteogenem Medium kultiviert wurden. Gruppe C bestand aus Osteoblasten, die wie die Zellen in Gruppe B behandelt wurden. Nach 7 und 14 Tagen wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität bestimmt. Zusätzlich wurde nach 14 Tagen eine Alizarinrot-Färbung durchgeführt.

Für die adipogene Differenzierung wurden MSC und Osteoblasten ausgesät und das Zellkulturmedium nach drei Tagen durch adipogenes Medium ersetzt.

Alle Versuche wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt. Es wurden 2,6 x 10³ Zellen in 100 µl Stammzellmedium pro Well ausgesät.

2.2.4.1 Osteogene Differenzierung

Alkalische Phosphatase-Färbung (aP-Färbung)

Die Bestimmung der aP-Aktivität erfolgte nach Messung der Zellzahl durch den Zellvitalitätstest, damit diese in Bezug zueinander gesetzt werden konnten. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 200 μ l des frisch angesetzten aP-Substratpuffers, bestehend aus 1,3 mg para-Nitrophenolphosphat (Sigma-Aldrich, München) pro 1 ml 0,1 M Acetat-Puffer mit pH = 9,4 (Sigma-Aldrich, München), hinzugegeben. Die Platten wurden 30 Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 180 μ l der Lösung in eine neue 96-Well-Kulturplatte überführt und im ELISA-Reader bei λ = 405 nm gemessen.

Alizarinrot-Färbung

Die Alizarinrot-Färbung dient dem Nachweis kalzifizierter Matrix. Die Wells wurden zweimal mit 0,25 ml destilliertem Wasser pro Well gewaschen. Sie wurden mit 50 µl 0,5 % Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, München), das in Wasser gelöst war und einen pH

von 4,0 hatte, überschichtet und zehn Minuten lang inkubiert. Die Wells wurden viermal mit 0,2 ml destilliertem Wasser pro Well für jeweils fünf Minuten gewaschen. 100 μ l 10% iges Cetylpyridiniumchlorid (Merck, Darmstadt), das in Wasser gelöst war, wurde in die Wells gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Dadurch löste sich das Alizarinrot. Jeweils 10 μ l der Lösung und 10 μ l der Cetylpyridiniumchlorid-Lösung, die als Negativkontrolle diente, wurden in neue 96-Well-Kulturplatten überführt und mit jeweils 90 μ l PBS verdünnt. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei λ = 562 nm ermittelt.

2.2.4.2 Adipogene Differenzierung

Die Differenzierung der Zellen wurde regelmäßig am Phasenkontrastmikroskop kontrolliert, wobei die adipogene Differenzierung anhand der zunehmenden Fettvakuolen sichtbar war. Zum Zeitpunkt $t_1 = 1$ Woche und $t_2 = 4$ Wochen wurde eine digitale Photodokumentation (CoolPix 4500; Nikon, Düsseldorf) durchgeführt.

2.3 Hauptversuch

2.3.1 Prädifferenzierung

Es erfolgte simultan die Gewinnung von Osteoblasten und MSC von drei Patienten, zwei Frauen und einem Mann. Sie waren 71, 74 und 51 Jahre alt. Muskuloskeletale Krankheiten, mit Ausnahme der zur Operation führenden Coxarthrose, waren im Vorfeld anamnestisch ausgeschlossen worden. Die Zellen der Spender wurden nicht gepoolt. Die isolierten Zellen wurden nach Passage 4 in drei Gruppen aufgeteilt und in T300-Zellkulturflaschen (300 cm²) kultiviert:

Gruppe A (undifferenzierte MSC)

Die Gruppe A bestand aus MSC, die ausschließlich mit Stammzellmedium kultiviert wurden. Ihre Konfluenz betrug nie mehr als 90 %.

Gruppe B (prädifferenzierte MSC)

In der Gruppe B wurden MSC bis zu 100 % Konfluenz vermehrt. Anschließend wurden die Zellen durch Kultivierung mit osteogenem Medium über 7 Tage prädifferenziert.

Gruppe C (Osteoblasten)

Die Gruppe C bestand aus Osteoblasten, die wie die MSC in Gruppe B bis zu 100 % Konfluenz gezüchtet und anschließend für 7 Tage mit osteogenem Medium kultiviert wurden.

2.3.2 Versuchsbeschreibung

Nach Expansion und Prädifferenzierung der Zellen in der Monolayerkultur erfolgte die Herstellung der Konstrukte. Pro Gruppe wurden zwei Konstrukte mit 1400 Zellen/µl Matrix angefertigt und in die Bioreaktoren überführt. Ein Konstrukt wurde mechanisch stimuliert, das zweite verblieb unstimuliert als Kontrolle. Nach drei Tagen zyklischer Belastung mit 0,5 Hz und 10 kPa erfolgte die Isolation der RNA aus den Konstrukten. Nach einer Reinheitsprüfung der RNA wurde diese mit einem für die Osteogenese spezifischem Microarray (GEArray Q Series Human Gene Array: HS-026; Superarray, USA) untersucht. Mit dem Microarray konnte die Expression folgender Gene bestimmt werden (Tabelle 2): Tabelle 2: Untersuchte Gene auf dem Microarray HS-026.

		Gene
Gene	Abkürzung	(ohne verwendete
		Abkürzung)
Alkalische Phosphatase	aP	Fibronectin
"Bone morphogenetic protein"-1-8	BMP	Cyclophilin A
Glyceraldehydphosphatdehydrogenase	GAPDH	ß-Actin
ribosomales Protein L13a	RPL13A	Integrin, a1-3,5,M; B1
BMP-Rezeptor	BMP-R	Kalzium-sensibler Rezeptor
"intercellular adhesion molecule"	ICAM	"Cluster of differentiation" 36
"Insulin-like growth factor" 1, 2	IGF	"CD36 antigen-like 1"
IGF-1-Rezeptor	IGF-1-R	"CD36 antigen-like 2"
Kollagen I-III, IV α3 / 4 / 5, VII, IX α2, X- XIX	Col	Annexin V
"smal mothers against decapentaplegic"-1-7, 9	SMAD	Arylsulfatase E
Matrixmetalloprotease-2, 8-10, 13	MMP	Homeobox 7
Granulozyten-Makrophagen Kolonie	GM_CSE	"basic helix-loop-helix
stimulierender Faktor		transcription factor"
Granulozyten Kolonie stimulierender	G-CSF	"cysteine proteinase
Faktor	0-001	inhibitor" 1, 2
"epidermal growth factor"	EGF	Osteonectin
EGF-Rezeptor	EGF-R	Cathepsin K
"fibroblast growth factor" 1-3	FGF	Osteocalcin
FGF-Rezeptor 1-3	FGF-R	Decorin
VEGF-Rezeptor	VEGF-R	Biglycan
"nuclear factor k B"	NFkB	MSH homeobox homolog 2
"platelet-derived growth factor"	PDGF	pUC18 Plasmid DNA
"runt-related transcription factor 2"	RunX2	
"(sex determining region Y)-box 9"	SOX9	
Osteopontin	OPN	
"transforming growth factor-B"1-3	TGF-ß	
TGF-B-Rezeptor Typ I, II	TGF-β-R I, II	
Tumornekrosefaktor-α	TNF-α	
"vascular cell adhesion molecule"	VCAM	
Vitamin-D-Hormon-Rezeptor	VD-R	
"vascular endothelial growth factor" A, B, C	VEGF	

2.3.3 RNA-Isolierung, Reinheitskontrolle und Auswertung der Genexpression

2.3.3.1 RNA-Isolierung

Alle Arbeiten erfolgten unter Einhaltung größtmöglicher Hygiene und Sorgfalt zur Vermeidung von Kontaminationen mit Fremd-DNA und RNasen.

Bei der RNA-Isolierung wurde mittels RNeasy[®] Mini-Kit (Quiagen, Hilden) hochkonzentrierte "messenger"-RNA (mRNA) gewonnen. Das Konstrukt wurde dazu in ein 50 ml Einweggefäß gegeben, in dem 1,5 ml RLT Puffer und 15 µl ß-Mercaptoethanol vorgelegt waren. Es erfolgte die Homogenisierung mit einem Mixer (Ultra-Turbax T8; IKA Labortechnik, Staufen). Nach Aufteilung der Flüssigkeit in zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße wurde die Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Mikro 22 R; Hettich, Tuttlingen) bei 19000 g und 10 ℃ für vier Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde unter Vermeidung der Mitnahme von Fibrinresten abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben.

In den weiteren Schritten wurde mit 16600 g und 10 °C zentrifugiert. Die RNA-Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die gewonnene RNA wurde in RNase-freiem Wasser bei -140 °C gelagert.

2.3.3.2 Quantitäts- und Qualitätskontrolle der RNA

Quantitätskontrolle

Die Kontrolle der RNA-Menge wurde mit Hilfe eines UV-Photometers (Ultrospec 2100 pro; Biochrom, Berlin) bei λ = 260 nm und 280 nm durchgeführt. Der Quotient der Absorptionen bei 260 zu 280 nm und die RNA-Konzentration wurden für jede Probe dokumentiert.

Qualitätskontrolle

In Zusammenarbeit mit dem Deutsches Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) wurde am Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) die Qualität der RNA untersucht. Dabei wurde die Menge der 28S- und 18S-RNA-Untereinheiten gemessen und der 28S/18S-Quotient bestimmt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen [73, 74].

2.3.3.3 Umschreibung der RNA in cDNA und Chip-Hybridisierung

Die mRNA wurde kurz vor Verwendung aufgetaut. Die Proben wurden mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Concentrator 5301; Eppendorf, Hamburg) eingeengt, so dass 1,5 µg RNA in 9 µl Probenvolumen resultierten.

Die Umschreibung der mRNA in cDNA, das Labeling und die PCR wurden mit dem GEArray AmpoLabeling-LPR-Kit (Biomol, Hamburg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde ein Thermocycler (Mastercycler personal; Eppendorf, Hamburg) verwendet.

Im ersten Schritt fand die Anlagerung des reverse Transkriptase-Primers statt, wofür die Proben mit dem Primer für drei Minuten auf 70 °C erhitzt und anschließend zehn Minuten auf 37 °C abgekühlt wurden.

Im zweiten Schritt erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA. Dafür wurden die Proben mit der reversen Transkriptase versetzt und für 25 Minuten auf 37 °C und fünf Minuten auf 85 °C erhitzt sowie anschließend auf Eis gestellt.

Im dritten Schritt fanden das Labeling der RNA und die PCR statt. Nach Zugabe des Biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics, Penzberg) und der DNA-Polymerase wurden die Proben initial für fünf Minuten auf 85 °C erwärmt. Es folgten 30 Zyklen, in denen die Proben jeweils eine Minute auf 85 °C, 50 °C und 72 °C erhitzt wurden. Zuletzt wurden die Proben erst für fünf Minuten auf 72 °C und zwei Minuten lang auf 94 °C erwärmt und anschließend auf Eis gestellt.

Die Vorbereitung und Hybridisierung der Array-Membran wurde in einem Hybridsierungsofen (OV1, Biometra, Göttingen) bei 56 °C und 10 U/min in Schottflaschen (GL45; Schott, Mainz) durchgeführt. GEAhyb Hybridization Solution und Array-Membran stammten aus dem GEArray Q Series Human Gene Array: HS-026.

Je 3 ml der angewärmten GEAhyb Hybridization Solution wurden mit 300 µg Lachssperma-DNA (Eppendorf, Hamburg) versetzt. Die Array-Membranen wurden 1 Stunde lang mit 2 ml dieser Lösung prähybridisiert.

Die Inkubation erfolgte mit 50 µl Probelösung und 750 µl der GEAhyb Hybridization Solution über Nacht im Hybridisierungsofen.

Die Membranen wurden je zweimal mit 5 ml Waschlösung 1 und 2 15 Minuten lang gewaschen.

Alle weiteren Chemikalien stammten aus dem GEArray Chemiluminescent Detection-Kit (Sigma-Aldrich, München). Die anschließenden Schritte wurden bei Raumtemperatur und 10 U/min auf einem Rollenmischgerät (RM5; Karl Hecht KG, Sondheim) durchgeführt. Durch 40-minütige Inkubation mit 2 ml Solution Q wurde der Array gestoppt.

Der Puffer F aus dem Detection-Kit wurde im Verhältnis 1:8000 mit aP gemischt. Die Bindung der aP wurde durch Zugabe von 2 ml Puffer F mit aP zu den Arrays über zehn Minuten erreicht. Die Arrays wurden anschließend viermal mit 4 ml Puffer F ohne aP jeweils fünf Minuten, sowie zweimal mit 2 ml Puffer G eine Minute lang, gewaschen.

Zum Schluss wurde durch Einwirken von 1 ml CDP-Star (Applied Biosystems, USA) über drei Minuten das Substrat für die Chemilumineszenz-Reaktion bereitgestellt. Die Arrays wurden danach eben auf eine Folie gelegt und mit einer weiteren eingedeckt. Es wurden mehrere Aufnahmen auf Röntgenfilm (T-mat plus DG Film; Kodak, USA) mit unterschiedlichen Belichtungszeiten angefertigt und direkt entwickelt.

2.3.3.4 Auswertung

Die Röntgenfilme wurden mit 1200 dpi in Graustufen eingescannt (CanoScan LiDe 50; Canon, Krefeld) und im TIFF-Format gespeichert. Die Bilder wurden mit Adobe® Photoshop[®] Elements 2.0 (Adobe, USA) begradigt invertiert. und Die Weiterverarbeitung erfolgte mit ScanAlyze (Eisen Lab, USA), Excel und dem GEArray-Analyzer 1.3 (Superarray, USA), wobei die Negativkontrolle von den Werten subtrahiert und diese über das "Housekeeping"-Gen Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) Die Nachweisgrenze wurde normalisiert wurden. aufgrund der Testungenauigkeit auf 10 % der GAPDH-Expression festgesetzt. Es wurden nur Anderungen der RNA-Expression berücksichtigt, bei denen sich die Werte mindestens verdoppelten bzw. halbierten.

3 Ergebnisse

Die Isolation der MSC und der Osteoblasten verlief problemlos. Die erste Passage der MSC wurde nach zehn Tagen durchgeführt. Weitere Passagen erfolgten wöchentlich. Die Adhäsion der Osteoblasten aus den Spongiosastücken benötigte vier zusätzliche Tage. Daher erfolgte hier die erste Passage nach zwei Wochen. Alle weiteren Passagen wurden wie bei den MSC wöchentlich durchgeführt.

3.1 Vorversuch

3.1.1 Charakterisierung der Fibrinkonstrukte

Die hergestellten Fibrinkonstrukte waren runde Scheiben mit einem Durchmesser von 14 mm bei einer Höhe von 4 mm. Alle Konstrukte waren elastisch verformbar. Die Zellen waren bis in die Randbereiche hinein gleichmäßig verteilt. Es kam nicht zu einer Clusterbildung (Abb. 8).



Abb. 8: Randbereich eines Fibrinkonstruktes nach 3 Tagen im Bioreaktor ohne Belastung (HE-Färbung, Originalvergrößerung 10fach).
3.1.1.1 Einfluss der Zelldichte auf die Gesamtzellvitalität

Die Extinktion bei 490 nm, verursacht durch Formazansalzbildung bei der Verstoffwechselung von MTS, nahm mit der Zellzahl stetig zu (Abb. 9). Da die MTS-Verstoffwechselung ein Gradmesser für die Gesamtzellvitalität ist, kann die Extinktionskurve zur Einschätzung der Gesamtsituation der Zellen herangezogen werden.

Ab 2800 Zellen/µl Matrix konnte die Extinktion trotz täglichen Mediumwechsels nicht mehr wesentlich gesteigert werden. Deshalb wurde in den weiteren Versuchen mit Zelldichten von 1400 und 2800 Zellen/µl Matrix gearbeitet.



Abb. 9: Extinktion bei 490 nm in Abhängigkeit von der Zellzahl/ μ l Matrix mit eingetragener Standardabweichung der Stichprobenwerte nach viertägiger Kultur im Bioreaktor, n = 3.

3.1.1.2 Sauerstoffmessung in Abhängigkeit von der Zellzahl

Die Sauerstoffsättigung in den Konstrukten mit 1400 Zellen/µl Matrix betrug ab einer Entfernung von 2 mm vom Rand 81 % und bei 2800 Zellen/µl Matrix 75 % der im Medium. Dies entspricht Sauerstoffpartialdrücken von ca. 120 mmHg bzw. 112 mmHg

im Konstrukt gegenüber 150 mmHg im Medium. Damit konnte gezeigt werden, dass keine Hypoxie in den Konstrukten herrschte.



Standardabweichung, n = 3.

Im Versuch zur Bestimmung der optimalen Zelldichte konnte zwar eine Steigerung der Zellvitalität bis 2800 Zellen/µl Matrix gezeigt werden, allerdings nur bei täglichem Mediumwechsel. In den weiteren Versuchen in Bioreaktoren sollte jedoch das Medium für drei Tage verbleiben. Zur Vermeidung der verstärkten Anhäufung von Stoffwechselprodukten im Medium und den dadurch entstehenden negativen Einflüssen auf die Zellen, wurden daher für die weiteren Experimente Konstrukte mit einer Zelldichte von 1400 Zellen/µl Matrix verwendet.

3.1.1.3 Einfluss von mechanischer Stimulation auf die Gesamtzellvitalität

Die Gesamtzellvitalität von Konstrukten unmittelbar nach Herstellung und der von unstimulierten Konstrukten, die für drei Tagen in Bioreaktoren kultiviert wurden, zeigten fast identische Werte. Bei den Konstrukten nach dreitägiger mechanischer Stimulation zeigte sich eine Steigerung der Gesamtzellvitalität gegenüber den anderen beiden Versuchsgruppen, die jedoch keine Signifikanz erreichte (Abb. 11). Die Bedingungen im Bioreaktor mit und ohne mechanische Stimulation beeinträchtigten die Zellen in ihrer Vitalität offenbar nicht. Daher wurden im Hauptversuch die beschriebenen Konstrukte mit 1400 Zellen/µl Matrix eingesetzt.



Abb. 11: Extinktion bei 490 nm mit eingetragener Standardabweichung der Stichprobenwerte von Konstrukten unmittelbar nach de Herstellung und nach 3 Tagen im Bioreaktor mit und ohne mechanische Stimulation, n = 3.

3.1.2 Differenzierungsversuche

3.1.2.1 Osteogene Differenzierung

aP-Färbung

Die Zellen der Gruppe B und C konfluierten vor der Stimulation mit osteogenem Medium in allen Fällen. Die Expression der alkalischen Phosphatase, gemessen durch die Extinktion bei 405 nm und bezogen auf die Gesamtzellvitalität, war nach 7 Tagen in der Gruppe B um 80 % und in der Gruppe C um 60 % gegenüber der Gruppe A gesteigert (p < 0,05 bzw. p < 0,01; Abb. 12). Nach 14 Tagen war die aP-Expression in der Gruppe B um 350 % und in der Gruppe C um 233 % gegenüber der in der Gruppe A erhöht (p < 0,01).

Ergebnisse



Abb. 12: Extinktion bei 405 nm als Maß der aP-Expression bezogen auf die Extinktion bei 490 nm als Maß der Gesamtzellvitalität mit eingetragener Standardabweichung der Stichprobenwerte in Abhängigkeit von der Kulturdauer, n = 4; * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

Alizarinrot-Färbung

Auch beim Nachweis von Kalziumeinlagerungen konfluierten die Zellen vor der Stimulation mit osteogenem Medium in allen Fällen. Schon mikroskopisch fielen Kalziumablagerungen in den Wells der Gruppen B und C auf. In einigen Wells bildeten sich diese kaum, was auch mit niedrigeren Werten bei den Extinktionsmessungen korrelierte. Trotz der großen Standardabweichungen war die Kalziumionenkonzentration der Gruppe B im Durchschnitt 65fach und in der Gruppe C 62fach gegenüber der Gruppe A erhöht (p < 0,05; bzw. p < 0,01).



Abb. 13: Kalziumionenkonzentration in den Gruppen A, B und C, dargestellt durch den Alizarinrot-Test bei einer Extinktion von 562 nm, mit eingetragener Standardabweichung der Stichprobenwerte, n = 4; * = p < 0.05; ** = p < 0.01.

Die gesteigerte aP-Expression und der Nachweis von Kalziumioneneinlagerungen zeigen, dass sowohl die MSC als auch die Osteoblasten durch Stimulation mit osteogenem Medium zur osteogenen Differenzierung angeregt wurden.

3.1.2.2 Adipogene Differenzierung

MSC, die mit adipogenem Medium kultiviert wurden, bildeten nach 14 Tagen Fettvakuolen, was als beginnende Differenzierung hin zu Adipozyten gewertet wurde (Abb. 14). Nach 28 Tagen hatten die Vakuolen an Zahl und Größe zugenommen (Abb. 15). In den Osteoblasten dagegen bildeten sich über die gesamte Kulturdauer von 28 Tagen hinweg nur in wenigen Zellen Fettvakuolen (Abb. 16).

Ergebnisse



Abb. 14,

Abb. 15: Nativ Aufnahmen der adipogenen Differenzierung von MSC nach 14 bzw. 28 Tagen (Phasenkontrast, Originalvergrößerung: 100fach).



Abb. 16: Native Aufnahme von Osteoblasten nach 28 Tagen in Kultur mit adipogenem Medium (Phasenkontrast, Originalvergrößerung: 100fach).

3.2 Hauptversuch: RNA-Expressionsanalyse von Osteoprogenitorzellen

Es konnten durchschnittlich 4,3 µg RNA [Spanne: 1,7 bis 7,3 µg] je Konstrukt isoliert werden. Die Reinheit der Proben wurde mit Hilfe des im Bioanalyzer gemessenen Quotienten der 18s-/28s-Untereinheiten, der im Schnitt bei 1,78 lag [Spanne: 1,39; 2,58], geprüft. Bei allen eingesetzten Proben gelang die RNA-Analyse mittels Chip-Hybridisierung. Dargestellt sind im folgenden die Ergebnisse, bei denen die RNA-Expression im Durchschnitt einer Gruppe mindestens über 10 % der Expression des "Housekeeping"-Gens GAPDH lag, die Expression zwischen zwei Gruppen sich

mindestens halbierte bzw. verdoppelte und bei denen die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen signifikant waren (p < 0,05).



Abb. 17: Bioanalyzer-Auswertung einer Probe.

3.2.1 Einfluss von osteogenem Medium auf MSC

Zur Untersuchung des Einflusses von osteogenem Medium auf die MSC wurden die RNA-Expressionen der unstimulierten Gruppen A und B, also der undifferenzierten und prädifferenzierten MSC, gegenübergestellt (Abb. 18). Zum Vergleich wurden die Ergebnisse für die Osteoblasten der Gruppe C ebenfalls aufgetragen.

In der Gruppe B sank die Werte der Expression von Integrin α 3 auf 49 % und von Osteopontin auf 12 % derjenigen in der Gruppe A (p < 0,05). Weiterhin war die Expression von TNF- α in der Gruppe B um 290 % gegenüber der in Gruppe A erhöht (p < 0,05).

In der Gruppe C war das Expressionsniveau von Integrin α 3 und Osteopontin ähnlich demjenigen in Gruppe B, während sich die Werte für TNF- α parallel zu denen aus Gruppe A entwickelten.



Abb. 18: Änderung der RNA-Expression durch Kultivierung von MSC mit osteogenem Medium. Die Standardabweichung der Stichprobenwerte ist eingetragen, * = p < 0.05.

3.2.2 Beeinflussung der RNA-Expression durch mechanische Stimulation

Die RNA-Expression der mechanisch stimulierten Konstrukte wurde durch die der unbelasteten Konstrukte der selben Gruppe geteilt.

Bei den undifferenzierten MSC der Gruppe A wurde durch mechanische Stimulation die Expression von MMP-13 um 547 % gesteigert (p < 0,05). Weiterhin wurden in der Gruppe B, den prädifferenzierten MSC, die Expressionsraten von RPL13A und SMAD-7 auf 40 bzw. 43 % der Kontrollen gesenkt (p < 0,05). Die RNA-Expressionsrate der Gruppe C für RPL13A und SMAD-7 war erhöht, ähnlich der in Gruppe A, während die Expression von MMP-13 vermindert war (Abb. 19).



Abb. 19: Änderung der RNA-Expression durch mechanische Stimulation in den Gruppen A, B und C mit eingetragener Standardabweichung, * = p < 0.05.

3.2.3 Beeinflussung der Mechanosensitivität durch die Differenzierungsstufe

Es wurde die RNA-Expression den Gruppen A und B nach mechanischer Stimulation verglichen (Abb. 20). Eingezeichnet sind zum Vergleich ebenfalls die Werte für die Gruppe C nach Stimulation. Die Expression folgender zellulärer Gene unterschied sich signifikant (p < 0.05):

Für Annexin V betrug die RNA-Expression in der Gruppe B 36 %, für den EGF-Rezeptor 46 %, für Integrin ß1 36 % und für SMAD-7 28 % derjenigen der Gruppe A. Das Expressionsniveau in der Gruppe C war für alle Gene ähnlich dem in Gruppe B mit Ausnahme von Integrin ß1 das auf dem Niveau der Gruppe A lag.



Abb. 20: Unterschiede in der RNA-Expression zellulärer Proteine in den Gruppen A, B und C nach mechanischer Stimulation mit eingetragener Standardabweichung der Stichprobenwerte, * = p < 0.05.

Weitere signifikante Unterschiede (p < 0,05) bestanden in der RNA-Expression folgender, vorwiegend extrazellulärer, Proteine zwischen den Gruppen A und B (Abb. 21):

Die Expression von Cathepsin K sank in der Gruppe B gegenüber der Gruppe A auf 24 %, die von MMP-13 auf 24 %, von MMP-9 auf 36 % und diejenige von Osteopontin auf 17 %.

Die Expression von MMP-13 der Gruppe C lag auf dem Niveau der Gruppe B, während Cathepsin K auf dem von Gruppe A lag. Osteopontin und MMP-9 wurden auf einem mittleren Niveau, zwischen den Expressionsraten der Gruppe A und B, exprimiert.





4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von mechanischer Stimulation auf die RNA-Expression von Osteoprogenitorzellen unterschiedlicher Differenzierungsstufen verglichen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die undifferenzierten MSC durch mechanische Stimulation am stärksten osteogen differenzieren. Zudem gab es Anzeichen dafür, dass die nativen MSC nach Einbringung in die Fibrinmatrix stärker osteogen differenzieren als bereits osteogen prädifferenzierte MSC.

In den Vorversuchen konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich die verwendete Fibrinmatrix für den Einsatz in den beschriebenen Bioreaktoren eignet und die optimale Zelldichte bei 1400 Zellen/µl Matrix liegt.

4.1 Methodenkritik

Zellvitalitätsmessung

Der MTS Test ist eine Methode mit ausreichender Reliabilität zur Bestimmung der Zellvitalität in 2D [71, 72]. Jedoch können die Ergebnisse in dreidimensionalen Konstrukten verfälscht werden, da die Diffusionsstrecke für das MTS zu den Zellen in der Mitte des Konstrukts zunimmt. Gorodetsky konnte allerdings zeigen, dass sich der MTS Test zur Darstellung der Zellvitalität von MSC in Fibrinkonstrukten eignet [75]. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten tendenziell, aber nicht signifikant erhöhten

Werte bei den stimulierten Konstrukten könnten zudem Folge der verkürzten Diffusionsstrecke aufgrund der geringgradigen Verformung der Konstrukte durch die mechanische Stimulation sein.

RNA-Analyse

Mikroarrays eignen sich nur für den semiquantitativen Nachweis von RNA [76, 77]. Über deren Reliabilität gehen die Meinungen weit auseinander. Vascotto sieht die Methode als ein genaues, etabliertes Verfahren an [78], während sie für Bustin zu ungenau ist [79].

"Housekeeping"-Gene wie GAPDH, Cyclophilin A, ß-Actin und RPL13A werden zur Normalisierung der Ergebnisse herangezogen, um die Vergleichbarkeit verschiedener Versuche zu gewährleisten. Da GAPDH das gängigste "Housekeeping"-Gen ist [77, 78,

Diskussion

80], wurde es in dieser Arbeit zur Normalisierung der Ergebnisse verwendet. Als Problem stellte sich heraus, dass die Expression von GAPDH sehr hoch war und dadurch bei der Entwicklung der Röntgenfilme die Sättigung schnell erreicht war. Dies schränkte die Entwicklungszeiten ein, weshalb über 50 % der untersuchten Gene nicht sinnvoll ausgewertet werden konnten, da ihre Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Zudem war die Expression des "Housekeeping"-Gens RPL13A nicht ausreichend stabil. Dies wurde schon durch Tricarico und weiteren Arbeitsgruppen beschrieben [81, 82]. Da in den beschriebenen Versuchen das Screening von Genen im Vordergrund stand, kann die Reliabilität dieser Methode als angemessen betrachtet werden. Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse wurden zudem nur Änderungen berücksichtigt, bei denen sich die Werte mindestens halbierten bzw. verdoppelten.

Letztlich muss festgestellt werden, dass ein Nachweis auf RNA-Ebene noch nicht gleichbedeutend mit Menge und Aktivität fertiger Proteine ist, da die RNA posttranslational noch modifiziert wird und die Transkriptionsraten inkonstant sind. Beispielsweise kann MMP-9 in MSC zwar auf RNA-, jedoch nicht auf Protein Ebene nachgewiesen werden [83].

Statistik

Zur Auswertung der Daten wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Dieser Test ist robust gegenüber möglichen Abweichungen der Normalverteilung [84, 85]. Allerdings nehmen die falsch positiven Ergebnisse bei einer Fallzahl von n = 2 zu stark zu. Die Ergebnisse im Hauptversuch der Gruppe C wurden deshalb statistisch nicht ausgewertet, da in dieser Gruppe zwar die Anzüchtung von Zellen gelang, bei einem Versuchsansatz aber technische Probleme bei der Durchführung auftraten und somit nur zwei Datensätze vorliegen. Trotzdem wurden die verbliebenen Resultate aufgeführt, da sie der Veranschaulichung der anderen Ergebnisse dienen und zumindest Tendenzen gegenüber den anderen Gruppen zu erkennen sind.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Fibrinmatrix

Die Matrices sollten mit der höchsten Zelldichte, bei der die Zellen noch ausreichend versorgt werden, beladen werden. Durch die Kenntnis der benötigten Zellzahl kann die Expansionsphase minimiert werden. Die Expansion sollte in 2D Kulturen erfolgen, da die Zellzahlen einfacher und schneller erreicht werden als in 3D Konstrukten [59].

Die von anderen Autoren verwendeten Zelldichten variieren stark. Bensaid et al. benutzten beispielsweise eine Dichte von 25 Zellen/µl Matrix, wobei sie vor allem die Proliferation innerhalb der Fibrinmatrices untersuchen wollten [62]. Die Arbeitsgruppe um Gorodetsky hingegen arbeitete mit Ausgangszelldichten von 4000 Zellen/µl Matrix, die sie auf über 20000 Zellen/µl Matrix steigerten [64, 75]. Allerdings stammten diese Zellen aus Mäusen, denen eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zu humanen Zellen unterstellt werden kann. Zudem wurden die Konstrukte in Form von "Microbeads" hergestellt, die durch eine vergrößerte Oberfläche mehr Zellen direkten Kontakt zum Medium ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Steigerung der Zellzahl die Gesamtzellvitalität von MSC in den verwendeten Fibrinmatrices stetig zunahm. Ab einer Zelldichte von etwa 1400 Zellen/µl Matrix fiel die Zunahme geringer aus, und ab 2800 Zellen/µl Matrix war kaum noch eine Steigerung möglich. Dies wurde als Hinweis auf zunehmende negative Einflüsse auf die Vitalität der einzelnen Zellen gewertet. Dafür verantwortlich könnte eine Kontakthemmung der Zellen untereinander, eine mangelnde Nährstoffversorgung oder Apoptose sein.

Die im Rahmen der Experimente hergestellten Konstrukte wurden auf eine Höhe von 4 mm begrenzt. Um die Sauerstoffdiffusion als möglichen limitierenden Faktor ausschließen zu können, wurde die Sauerstoffsättigung in den Konstrukten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass bei einer Zelldichte von 1400 Zellen/µl Matrix Sauerstoffpartialdrücke von ungefähr 120 mmHg herrschten. Auch bei Steigerung der Zelldichte auf 2800 Zellen/µl Matrix lag der Partialdruck noch bei 112 mmHg und damit deutlich über dem *in vivo* üblichen Partialdruck von 25 mmHg. In Übereinstimmung mit Griffith et al. muss daher davon ausgegangen werden, dass andere Faktoren als die Sauerstoffversorgung limitierend für die Zelldichte sind, wie z.B. die Versorgung mit Wachstumsfaktoren und Nährstoffen [86]. Um dieses Problem zu lösen, wurde bereits

versucht, Konstrukte zu vaskularisieren oder einer Matrix neoangiogenetische Faktoren hinzuzufügen [87].

In den Experimenten zur Zelldichte wurde das Medium täglich gewechselt, wodurch Stoffwechselprodukte der Zellen aus dem Medium entfernt wurden. Da aber die Konstrukte im Bioreaktor drei Tage lang im gleichen Medium bleiben sollten, wurde zur Vermeidung einer zu starken Anreicherung von Stoffwechselprodukten die Konstrukte nur mit 1400 Zellen/µl Matrix beladen. In den Vorversuchen zur mechanischen Stimulation zeigte sich eine gleichbleibende Gesamtzellvitalität in den unstimulierten Konstrukten gegenüber frisch hergestellten. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Zellen unter diesen Bedingungen ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden und die Zelldichte von 1400 Zellen/µl Matrix für die Bedingungen optimal ist.

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben über die Reaktion der Zellen auf die mechanische Stimulation in Fibrinkonstrukten, gemessen anhand der Zellvitalität. Zhuang beschrieb eine gesteigerte Zellvitalität nach mechanischer Stimulation [88], dagegen zeigte Weyts eine Verminderung [89]. Die gegensinnigen Ergebnisse können wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie zum Beispiel Stärke und Art der Belastung, zurückgeführt werden. In den hier beschriebenen Experimenten zeigten die Zellen nach drei Tagen im Bioreaktor, mit und ohne mechanische Stimulation, eine unverändert hohe Zellvitalität. Diese nahm bei den belasteten Konstrukten teilweise sogar zu, was allerdings durch die kürzere Diffusionsstrecke für das MTS erklärbar wäre, da die Konstrukte durch die Belastung etwas an Höhe verloren hatten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die verwendeten Fibrinkonstrukte für die Kultur von Zellen mit und ohne mechanische Stimulation eignen, jedoch bei Verwendung in Zellkulturversuchen mit dreitägiger Dauer ohne Mediumwechsel nicht mit mehr als 1400 Zellen/µl Matrix beladen werden sollten.

4.2.2 Zelldifferenzierung durch stimulierende Medien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MSC und Osteoblasten aus humanem Gewebe gewonnen. Die Bezeichnung MSC ist unter vielen Autoren umstritten, da es sich häufig um heterogene Zellpopulationen handelt, die Fibroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen enthalten [31, 32, 41, 90, 91]. Um Zellen als MSC bezeichnen zu können, muss mindestens deren Multipotenz nachgewiesen werden [41].

Osteoblasten, die durch Auswachskulturen gewonnen werden, unterscheiden sich in ihrer Differenzierungsfähigkeit von MSC, die durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden [31].

In den Experimenten zur osteogenen Differenzierung konnte in Übereinstimmung mit Pittenger [41] und weiteren Autoren [26, 34, 92-95] nachgewiesen werden, dass unter Kultur mit osteogenem Medium sowohl MSC als auch Osteoblasten nach 7 bzw. 14 Tagen eine vermehrte alkalische Phosphatatse-Aktivität gegenüber den Kontrollen zeigten und ebenfalls nach 14 Tagen in beiden Zellpopulationen Kalziumeinlagerungen schon lichtmikroskopisch erkennbar waren, die mit dem Alizarinrot-Test quantifiziert werden konnten.

Die Kultur beider Zelllinien mit adipogenem Medium zeigte, dass sich die MSC zu 50 % in Adipozyten differenzierten, während in den Osteoblastenkulturen nur einzelne Adipozyten zu finden waren. Die wenigen Zellen in den Osteoblastenkulturen, die sich adipogen differenzierten, können Verunreinigungen mit anderen Zelllinien, wie zum Beispiel MSC, gewesen sein. Dieses Problem wurde schon durch Declerq et al. beschrieben [45]. Allerdings ist bei den beschriebenen Versuchen davon auszugehen, dass der Einfluss von möglichen Verunreinigungen vernachlässigbar ist, da es sich nur um einzelne Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld handelte. Es könnte sich bei diesen Zellen aber auch um Osteoblasten mit einem geringen verbliebenen Differenzierungspotential handeln.

Auf eine chondrogene Differenzierung wurde in dieser Arbeit verzichtet, da MSC, die in Adipozyten und Osteoblasten differenzieren können, ebenfalls ein chondrogenes Differenzierungspotential besitzen [91].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit isolierten MSC multipotent waren, während die Osteoblasten nur die Fähigkeit zur Osteogenese besaßen. Die MSC erfüllen somit die für die Charakterisierung geforderte Eigenschaften. Die Osteoblasten können als osteogene Zellen eingestuft werden, allerdings kann anhand dieser Ergebnisse keine definitive Aussage über ihren genauen osteogenen Differenzierungsgrad gemacht werden. Die Experimente haben aber gezeigt, dass die im Hauptversuch verwendeten Zellen der Gruppe A als undifferenzierte MSC, der Gruppe B als prädifferenzierte MSC und der Gruppe C als Osteoblasten bezeichnet werden können.

4.2.3 Mechanosensitivität von Osteoprogenitorzellen

Hinweise darauf, dass Osteoprogenitorzellen mechanosensitiv sind gibt es schon lange [46, 96]. Zur Untersuchung dieses Phänomens wurden verschiedene Bioreaktoren zur mechanischen Stimulation von Zellen angefertigt. Wichtige Parameter, die Einfluss auf die Vergleichbarkeit dieser Experimente haben, sind die verwendeten Zellen, das Material der Matrix, 2- oder 3D-Anordnungen und die Stimulationsart.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MSC, prädifferenzierte MSC und Osteoblasten in eine 3D-Fibrinmatrix eingebracht und über drei Tage zyklischer mechanischer Kompression von 10 kPa mit einer Frequenz von 0,5 Hz ausgesetzt.

In vivo Ergebnisse von Rubin et al. wiesen darauf hin, dass die Belastungsfrequenz eine wichtige Rolle bei der Adaptation von Knochen an mechanische Stimulation spielt [97]. *In vitro* zeigte sich eine Frequenz von 0,5 Hz als besonders geeignet, die Proliferationsrate von MSC zu erhöhen [98]. Zudem entsprechen zyklische Belastungen physiologischen Aktivitäten wie Gehen und Laufen [99]. Aus diesen Gründen wurde in den beschriebenen Versuchen ebenfalls eine Frequenz von 0,5 Hz gewählt.

Als Belastungsart wurde in dieser Arbeit mechanische Kompression verwendet. Dabei wurden die Konstrukte mit 10 kPa belastet, was einer Komprimierung um 20 % der Konstrukthöhe oder etwa 1 mm entsprach. Dies ist vergleichbar der Deformation des Frakturhämatoms bzw. frühen Kallus nach osteosynthetischer Versorgung von Frakturen [70]. Nagatomi und Matziolis konnten nachweisen, dass MSC durch mechanische Kompression vermehrt Kollagen I produzieren [46, 55]. Dies wurde als Hinweis auf eine fortgeschrittene osteogene Differenzierung gewertet.

Die überwiegende Zahl der Versuche wurde bisher in zweidimensionalen Anordnungen durchgeführt. Es ist bekannt, dass sich Osteoprogenitorzellen in einer 2D-Kultur anders verhalten als in einer 3D-Kultur mit Matrix [58]. So untersuchte Mauney MSC nach Besiedlung von teilmineralisierter Spongiosa, die anschließend biaxialer Dehnung ausgesetzt wurde [100]. Ignatius benutzte Osteoblasten in einer Kollagen-I-Matrix, die mit uniaxialen Zugkräften deformiert wurde [101]. In beiden Ansätzen konnte unter anderem ein Anstieg der Kollagen-I-Synthese festgestellt werden. Vorteilhaft an der in dieser Arbeit verwendeten Fibrinmatrix ist ihre nachgewiesene osteoinduktive Eigenschaft und ihre bereits verbreitete Anwendung in der Klinik [63].

Neben der Biomechanik bestimmt auch die Biologie der Zellen deren Reaktion auf mechanische Stimuli. So konnten Weyts et al. zeigen, dass Zellen mit weitergehender osteogener Differenzierung auf uniaxiale Zugkräfte mit einer gesteigerten Proliferationsrate reagieren [89]. Vergleiche zu dieser Arbeit sind jedoch wegen der unterschiedlichen mechanischen Stimuli schwierig.

4.2.3.1 Einfluss von osteogenem Medium

Durch den Vergleich der undifferenzierten MSC der Gruppe A mit den prädifferenzierten MSC der Gruppe B, jeweils ohne mechanische Stimulation, konnte der Einfluss des osteogenen Mediums auf die Genexpression der Zellen bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass Integrin α 3 in der Gruppe A verstärkt exprimiert wurde gegenüber der Gruppe B. Es gibt Hinweise dafür, dass die Wahrnehmung von mechanischer Stimulation auf zellulärer Ebene und deren osteoinduktive Wirkung durch integrinvermittelte Zell-ECM-Kontakte ermöglicht wird [102, 103]. Integrine sind Proteine, die sich aus zwei transmembranösen, nicht kovalent gebundenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzen (Abb. 22). Jedes Integrin bindet mit seinem extrazellulären Anteil an ein bestimmtes Proteinrepertoire. Integrin α 3 bindet zum Beispiel mit Integrin β 1 vor allem an Kollagene und Fibronectin [104-106]. Der intrazelluläre Anteil der β -Untereinheiten lagert sich an Ankerproteine wie Talin, α -Aktin oder Filamin an. Diese wiederum binden an Aktinfilamente, wodurch die Migration und Polarität der Zellen beeinflusst wird [107, 108].



Abb. 22: Integrinaufbau und -funktion nach Docheva [102]

Moursi zeigte für Integrin α3, dass dies für die osteogene Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* benötigt wird [106]. Die Steigerung der Integrinexpression in dieser Arbeit wird als ein Hinweis auf eine Förderung der osteogenen Differenzierung der MSC gewertet. Dafür spricht auch die vermehrte Expression von Osteopontin ebenfalls in Gruppe A. Osteopontin ist ein nicht-kollagenöses Matrixprotein [109], das in der frühen Osteogenese eine zentrale Rolle spielt [110]. Eine erhöhte Expression findet sich in der frühen Phase der Frakturheilung und wird daher u.a. von Kawahata als Trigger für die Osteogenese angesehen [111].

Die einzige Expressionserhöhung in der Gruppe B gegenüber der Gruppe A zeigte TNF-α. Es hat in verschiedenen Geweben vielfältige Aufgaben. In MSC bewirkt es eine Hemmung der durch BMP-2 induzierten Osteogenese, indem es die Aktivierung von SMAD-1, -5 und -8 verhindert und zur verstärkten Expression des inihibitorischen SMAD-6 führt [112].

Aufgrund der veränderten RNA-Expression ist eine weitergehende osteogene Differenzierung der undifferenzierten MSC gegenüber den prädifferenzierten MSC anzunehmen. Dies ist überraschend, da eine stärkere osteogene Differenzierung der prädifferenzierten MSC, die mit osteogenem Medium kultiviert wurden, angenommen worden war. In den Versuchen zur Zelldifferenzierung konnten wir, in Übereinstimmung mit anderen Autoren [26, 34, 41, 92-95], schon nach 7 Tagen eine vermehrte Aktivität der alkalischen Phosphatase feststellen. Allerdings beruhen die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse auf Untersuchungen in 2D-Experimenten. Die im Hauptversuch verwendeten Zellen wurden jedoch nach einwöchiger Stimulation mit osteogenem Medium aus den Zellkulturflaschen gelöst und in die Fibrinmatrices eingebracht. Es ist bereits beschrieben, dass die Zellen durch das Ablösen eine Dedifferenzierung erfahren [113]. Inwieweit die wiederholte Kultivierung mit osteogenem Medium zu einer erneuten Osteogenese führt, ist bisher unzureichend geklärt. Zudem waren die prädifferenzierten MSC aufgrund der längeren Verweildauer in den Zellkulturflaschen zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns wesentlich dichter gewachsen als die MSC. Für die prädifferenzierten MSC verringerte sich dadurch das Verhältnis der Zell-Zellkontakte in den Fibrinmatrices gegenüber den Bedingungen in den Kulturflaschen stärker als für die undifferenzierten MSC.

4.2.3.2 Mechanische Stimulation

In der Gruppe A konnte eine Versechsfachung der RNA-Expression von MMP-13 durch mechanische Stimulation festgestellt werden. MMPs gehören zur Gruppe der Zink abhängigen Endopeptidasen. Es wurden bisher mindestens 25 identifiziert. Neben sezernierten MMPs kommen auch membranständige vor. Durch ihre proteolytische Aktivität können sie *in vivo* Wachstumsfaktoren, die in die ECM eingebaut sind [114, 115], freisetzen, welche die Neoangiogenese und Zelldifferenzierung beeinflussen [116]. MMPs vereinfachen zudem im Zusammenspiel mit Integrinen die Migration von Zellen. Integrine induzieren Änderungen im Zytoskelett, wodurch die Zellkontraktilität erhöht wird. MMP lösen gleichzeitig ECM-Bestandteile in der Zellumgebung auf und ermöglichen dadurch einen größeren Bewegungsspielraum der Zellen [105].

Kasper et al. haben bereits eine Zunahme der MMP-Aktivität durch mechanische Stimulation beschrieben. Sie postulierten, dass MMPs von zentraler Bedeutung bei der Umsetzung mechanischer Signale in eine geänderte Funktion der MSC sind. Allerdings konnten sie keine Änderung auf RNA-Ebene feststellen [83]. Schieker nennt MMPs, insbesondere MMP-9 und -13, als Proteine von differenzierten Osteoblasten [30]. Aus

diesen Gründen deutet eine stärkere Expression von MMP-13 auf eine weitergehende Differenzierung der MSC hin.

Eine erhöhte Expression von MMP-13 könnte im Falle der Implantation eines Konstruktes die Regeneration begünstigen, indem es den Umbau der umgebenden Matrix fördert, dadurch Wachstumsfaktoren freisetzt und ein Einwachsen neuer Gefäße unterstützt.

Bei den prädifferenzierten MSC der Gruppe B war die RNA-Expression von SMAD-7 durch mechanische Stimulation halbiert. SMAD-7 spielt bei der Regulation des BMP/TGF-ß-Signalweges eine wichtige Rolle [49]. Da es sich hierbei um einen inhibitorischen SMAD handelt [49], kann dieser Signalweg vermehrt aktiviert werden und somit theoretisch die Osteogenese gefördert werden [51].

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl native als auch prädifferenzierte MSC durch mechanische Stimulation osteogen differenzieren.

4.2.3.3 Mechanisch stimulierte Zellen im Gruppenvergleich

Beim Vergleich der RNA-Expressionsprofile nach mechanischer Stimulation zeigte sich eine vermehrte Aktivierung sowohl des BMP/TGF-ß- als auch integrinabhängigen Signalweges in der Gruppe A gegenüber der Gruppe B. In der Gruppe A war ebenfalls die Expression vom EGF-Rezeptor und einiger osteoblastenspezifischer Proteine wie Osteopontin und Annexin V gesteigert.

Das am stärksten erhöht exprimierte Gen des BMP/TGF-ß-Signalweges in der Gruppe A war SMAD-7. Dieses ist ein inhibitorischer SMAD, der unter anderem die Degradierung von SMAD-2 beschleunigt [49]. Daher ist eine Hemmung des BMP/TGFß-Signalweges durch eine gesteigerte Expression von SMAD-7 anzunehmen. Jedoch wurden der TGF-ß-Rezeptor Typ I und SMAD-2 ebenfalls signifikant (p < 0,05) überexprimiert, wenn auch nicht in Höhe der geforderten Verdoppelung (Daten nicht gezeigt). Eine Erhöhung der Rezeptordichte führt bei MSC zur verstärkten Ansprechbarkeit auf die entsprechenden Liganden und in der Folge zur osteogenen Differenzierung [117]. Es kann angenommen werden, dass dieser Effekt durch SMAD-2 unterstützt wird, da es die Wirksamkeit von TGF-ß-vermittelten Signalen erhöht [118]. Welche Effekte überwiegen, kann anhand der Expressionsänderung von regulierten Genen eingeschätzt werden. Ein von einigen Autoren postuliertes Gen ist RunX2 [119, 120]. Dessen Expression war allerdings in allen Proben ähnlich hoch (Daten nicht gezeigt). Das könnte an der bereits vor der Stimulation bestehenden Differenzierung aufgrund der Kulturbedingungen in den Zellkulturflaschen oder den Fibrinkonstrukten liegen. Zohar beschrieb, dass MSC, sobald sie auf einer Oberfläche adhärieren, bereits osteogene Marker exprimieren [121] und Perka konnte die osteogenesefördernde Wirkung von Fibrinmatrices auf diese Zellen zeigen [63]. Auswirkungen einer osteogenen Stimulation müssen deshalb in anderen Markern als RunX2 gesucht werden, wie z.B. Osteopontin. Dieses wurde in der Gruppe A verstärkt exprimiert. Es ist bereits beschrieben, dass durch Stimulation mit TGF-ß die Osteopontinexpression gesteigert werden kann [122]. Osteopontin spielt in der Osteogenese eine zentrale Rolle [110, 111]. Die vorliegenden Ergebnisse deuten daher auf eine weitergehende osteogene Differenzierung der MSC hin (Abb. 23).



Abb. 23: Unterschiede im BMP/TGF-ß-Signalweg zwischen mechanisch stimulierten MSC und prädifferenzierten MSC, modifiziert nach Attisano und Wrana [50].

Diskussion

Wie beim Vergleich der unbelasteten Gruppen A und B war ein Integrin in der Gruppe A verstärkt exprimiert. Anstatt des Integrins α 3 war es in dieser Gruppe das Integrin β 1. Dieses bindet mit den Integrinen α 1-3 vor allem an Kollagene [104-106]. Gronthos zeigte, dass bei Kultivierung mit Antikörpern gegen Integrin β 1 *in vitro* die Fähigkeit der MSC zur Bildung kalzifizierter Matrix abnimmt [105], während Schmid et al. nachweisen konnten, dass eine verstärkte Epression von Integrin β 1 und α 2 zu einer gesteigerten osteogenen Differenzierung führt [103].

Die vermehrte Expression von Integrin ß1 und von Aktivatoren des BMP/TGF-ß-Signalweges lässt, wie bei den mechanisch nicht stimulierten Gruppen auch, eine stärkere osteogene Differenzierung der Zellen der Gruppe A vermuten.

Eine weitere Klasse von Proteinen, die in der Gruppe A vermehrt exprimiert wurden, waren die MMPs, insbesondere MMP-9 und -13. Außer durch mechanische Stimulation [83] können diese ebenso durch eine Aktivierung des BMP/TGF-B-Signalweges und Integrin vermittelt überexprimiert werden [123, 124]. Globus et al. stellten fest, dass die Expression von MMPs durch Änderung des Integrin B1-Anteils in der ECM reguliert wird [124]. Brakebusch et al. beschrieben eine MMP-13 Expressionssteigerung durch Stimulation von Integrin α 1/B1 [125]. Wie bei den mechanisch stimulierten MSC kann auch diese Änderung als ein Indiz für eine weitergehende osteogene Differenzierung der nativen MSC verglichen mit den prädifferenzierten MSC gewertet werden.

Weiterhin war der EGF-Rezeptor in der Gruppe A gegenüber der Gruppe B überexprimiert. Dieser unterstützt die Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen in der frühen Phase der Matrixmineralisierung [126]. Weiterhin wurde *in vivo* festgestellt, dass EGF-Rezeptor-defiziente Mäuse weniger Osteoblasten und Osteoklasten und eine daraus resultierende verzögerte Ossifikation aufweisen [127]. Beschrieben ist außerdem eine Interaktion zwischen Integrin β 1 und dem EGF-Rezeptor, die zu gesteigerten Effekten der beiden Proteine führt [128].

Cathepsin K war in der Gruppe A ebenfalls hochreguliert. Es fördert die Osteoklastenfunktion [129] und trägt zu einem schnelleren Umbau und dadurch zu einer beschleunigten Wiederherstellung des Knochengewebes bei. Weiterhin wurde in der Gruppe A Annexin V verstärkt exprimiert. Es ist als kalziumbindendes Protein für die frühe Phase der Matrixmineralisierung von Bedeutung [130] und somit einen weiteren Hinweis für die fortgeschrittene osteogene Differenzierung der nativen MSC liefert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Zellen der Gruppe A eine vermehrte Aktivierung mehrerer für die Osteogenese entscheidender Signalwege

zeigen als die osteogen prädifferenzierten MSC der Gruppe B. Undifferenzierte MSC sind daher vielversprechende Kandidaten für eine autologe Zelltherapie des Knochendefekts unter Gewährleistung adäquater biomechanischer Rahmenbedingungen zur mechanischen Stimulation der Zellen.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung (deutsch)

Bei der Therapie kritischer Knochendefekte im Rahmen des Tissue Engineerings wird versucht, mit zellbasierten Verfahren neue Behandlungsmöglichkeiten zu schaffen. Der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen (MSC) scheint aufgrund ihres Proliferationsund Differenzierungspotentials vielversprechend. Um die Zellen auf ihren Einsatz *in vivo* vorzubereiten, sollten diese prädifferenziert werden. Dazu bietet sich mechanische Stimulation an.

Ziel dieser Arbeit war es, mit einem neuartigen Bioreaktor den Einfluss mechanischer Stimulation auf die osteogene Differenzierung von verschiedenen Osteoprogenitorzellen in einer 3D-Fibrinmatrix auf RNA-Ebene zu bestimmen. In Vorversuchen sollte zudem die Eignung der Fibrinmatrix für die Verwendung in den Bioreaktoren bestimmt werden.

Bei der Untersuchung zur Zelldichte in den verwendeten Konstrukten konnte die Gesamtzellvitalität ab einer Zelldichte von 2800 Zellen/µl Matrix kaum noch gesteigert werden. Durch Messung der Sauerstoffsättigung wurde eine Hypoxie der Zellen in den Konstrukten mit bis zu 2800 Zellen/µl Matrix ausgeschlossen. Da die Konstrukte im Hauptversuch drei Tage lang im gleichen Medium verbleiben sollten, wurde in den folgenden Versuchen Konstrukte mit 1400 Zellen/µl Matrix verwendet. Die Messung der Gesamtzellvitalität nach dreitägiger mechanischer Stimulation zeigte daraufhin keine Unterschiede zwischen belasteten Konstrukten und den Kontrollen.

In den Versuchen zur Wirkung mechanischer Stimulation wurden undifferenzierte und durch siebentägige Kultur mit osteogenem Medium prädifferenzierte MSC sowie aus Auswachskulturen Osteoblasten miteinander Die stammende veralichen. Gegenüberstellung von nativen und prädifferenzierten MSC ohne mechanische Stimulation zeigte überraschenderweise eine stärkere Expression osteogener Marker bei den nativen MSC. Dies könnte durch Dedifferenzierung der prädifferenzierten MSC bei der Mobilisierung zur Konstruktherstellung erklärt werden. Bei den Untersuchungen zur Differenzierung durch mechanische Stimulation konnte festgestellt werden, dass sowohl native als auch prädifferenzierte MSC in der Osteogenese involvierte Gene, wie MMP-13 und SMAD-7, überexprimierten. Die deutlichsten Unterschiede traten beim Vergleich der verschiedenen Zellarten nach mechanischer Stimulation auf. Sowohl Gene, die im BMP/TGF-B-Signalweg eine Rolle spielen, als auch Integrin B1 und weitere wurden in mechanisch stimulierten nativen MSC vermehrt exprimiert. Diese Ergebnisse deuten auf eine bessere Ansprechbarkeit von undifferenzierten MSC auf mechanische Stimulation hin. Damit sind diese vielversprechende Kandidaten für die autologe Behandlung von Knochendefekten unter Einsatz mechanischer Stimulation zur Prädifferenzierung.

5.2 Abstract (english)

To treat critical bone defects tissue engineers try to achieve new therapeutical options by using cell-based processes. The use of mesenchymal stem cells (MSC) seems to be promising due to their proliferation and differentiation potential. To prepare these cells for use in vivo, they should be predifferentiated. This might be achieved by mechanical stimulation.

The aim of this study was to investigate the influence of mechanical stimulation on osteogenic differentiation of different osteoprogenitor cells in a 3D-fibrin-matrix on the RNA level. To generate mechanical stimuli a novel bioreactor was used. Preliminary experiments should estimate the suitability of the fibrin-matrix for its use in bioreactors. The preliminary tests showed an increase of total cell viability up to a density of 2800 cells/µL matrix which barely changed with higher cell densities. Hypoxia of the cells in constructs with up to 2800 cells/µL matrix was excluded by measurement of the oxygen saturation. During the main tests the constructs were to remain in the same solution for three days, hence constructs with 1400 cells/µL matrix were used for the following experiments. The measurement of total cell viability after three days of mechanical stimulation showed no differences between mechanical stress exposed and control constructs.

In the experiments on the effect of mechanical stimulation, native MSC, predifferentiated MSC, which had been cultured in osteogenic solution for seven-days, and osteoblasts, which were derived from outgrowth-cultures, were compared. Surprisingly, the comparison of native and predifferentiated MSC without mechanical stimulation showed a higher expression of osteogenic markers among the native MSC. This could be explained by dedifferentiation of already predifferentiated MSC during the mobilization of cells to form constructs. The studies of differentiation by mechanical stimulation showed that both native and predifferentiated MSC overexpressed genes

involved in osteogenesis, such as MMP-13 and SMAD-7. The most significant differences occurred in the comparison of the different types of cells after mechanical stimulation. Genes involved in the BMP/TGF-ß-signaling-pathway, as well as Integrin ß1 and others were higher expressed in mechanically stimulated native MSC. These results indicate a greater responsiveness of native MSC to mechanical stimulation. Therefore they are promising candidates for the autologous treatment of critical bone defects, using mechanical stimulation for predifferentiation.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Donati D, Capanna R, Campanacci D, et al. *The use of massive bone allografts for intercalary reconstruction and arthrodeses after tumor resection. A multicentric European study.* Chir Organi Mov, 1993. **78**(2): p. 81-94.
- 2. Tzioupis C und Giannoudis PV. *Prevalence of long-bone non-unions.* Injury, 2007. **38 Suppl 2**: p. S3-9.
- 3. Damany DS, Parker MJ und Chojnowski A. *Complications after intracapsular hip fractures in young adults. A meta-analysis of 18 published studies involving 564 fractures.* Injury, 2005. **36**(1): p. 131-41.
- 4. Pekkarinen J, Álho A, Lepisto J, Ylikoski M, Ylinen P und Paavilainen T. Impaction bone grafting in revision hip surgery. A high incidence of complications. J Bone Joint Surg Br, 2000. **82**(1): p. 103-7.
- 5. Slooff TJ, Gardeniers JW und de Waal Malefijt MC. [Surgical techniques used in the revision of hip prostheses]. Ned Tijdschr Geneeskd, 1998. **142**(25): p. 1438-45.
- 6. Iwamoto Y, Sugioka Y, Chuman H, et al. *Nationwide survey of bone grafting performed from 1980 through 1989 in Japan.* Clin Orthop Relat Res, 1997(335): p. 292-7.
- 7. Sen MK und Miclau T. *Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?* Injury, 2007. **38 Suppl 1**: p. S75-80.
- 8. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL und Davino NA. *Complications of iliac crest bone graft harvesting.* Clin Orthop Relat Res, 1996(329): p. 300-9.
- 9. Banwart JC, Asher MA und Hassanein RS. *Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation.* Spine, 1995. **20**(9): p. 1055-60.
- 10. Springfield D. *Autograft reconstructions*. Orthop Clin North Am, 1996. **27**(3): p. 483-92.
- 11. Ho JY und Miller SL. *Allografts in the treatment of athletic injuries of the shoulder.* Sports Med Arthrosc, 2007. **15**(3): p. 149-57.
- 12. Laurencin CT und El-Amin SF. *Xenotransplantation in orthopaedic surgery.* J Am Acad Orthop Surg, 2008. **16**(1): p. 4-8.
- 13. Delloye C, Cornu O, Druez V und Barbier O. *Bone allografts: What they can offer and what they cannot.* J Bone Joint Surg Br, 2007. **89**(5): p. 574-9.
- 14. Yang YG und Sykes M. *Xenotransplantation: current status and a perspective on the future.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 519-31.
- 15. Dottl C, Steinhauser E, Koch U, Sippel KO, Hochreiter J und Effenberger H. *Fractures of cementless thin-walled cups.* J Arthroplasty, 2006. **21**(1): p. 144-7.
- Cachinho SC und Correia RN. *Titanium scaffolds for osteointegration:* mechanical, in vitro and corrosion behaviour. J Mater Sci Mater Med, 2008. 19(1): p. 451-7.
- 17. Vacanti C MA. Letter from the Editors. Tissue Eng, 1995(1): p. 1-2.
- 18. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R und Mikos AG. *Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone.* Biomaterials, 1996. **17**(2): p. 175-85.
- 19. Walsh WR, Chapman-Sheath PJ, Cain S, et al. *A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model.* J Orthop Res, 2003. **21**(4): p. 655-61.

- 20. Brunel G, Brocard D, Duffort JF, et al. *Bioabsorbable materials for guided bone regeneration prior to implant placement and 7-year follow-up: report of 14 cases.* J Periodontol, 2001. **72**(2): p. 257-64.
- 21. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science, 1965. 150(698): p. 893-9.
- 22. Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP und Wildemann B. *Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing.* J Long Term Eff Med Implants, 2006. **16**(1): p. 61-9.
- 23. Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, et al. *Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial.* J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(7): p. 1431-41.
- 24. Garrison KR, Donell S, Ryder J, et al. *Clinical effectiveness and costeffectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review.* Health Technol Assess, 2007. **11**(30): p. 1-150, iii-iv.
- 25. Long MW. *Osteogenesis and bone-marrow-derived cells*. Blood Cells Mol Dis, 2001. **27**(3): p. 677-90.
- 26. Aubin JE, Liu F, Malaval L und Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77S-83S.
- 27. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.* Cell, 2002. **108**(1): p. 17-29.
- 28. Komori T, Yagi H, Nomura Ś, et al. *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts.* Cell, 1997. **89**(5): p. 755-64.
- 29. Marom R, Shur I, Solomon R und Benayahu D. *Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells.* J Cell Physiol, 2005. **202**(1): p. 41-8.
- 30. Schieker M. *Knochenzellbiologie II.* 4. Intensiv-Workshop 'Skelettbiologie & Skeletterkrankungen', 2006(1): p. 39-45.
- 31. Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S und Ljunggren O. *Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison.* Acta Orthop Scand, 1999. **70**(4): p. 365-73.
- 32. Vogel W, Grunebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W und Buhring HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. Haematologica, 2003. **88**(2): p. 126-33.
- 33. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI und Frolova GP. *Heterotopic of bone marrow.Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.* Transplantation, 1968. **6**(2): p. 230-47.
- 34. Caplan AI. *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
- 35. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM und Caplan AI. *Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow.* Bone, 1992. **13**(1): p. 81-8.
- 36. Meinel L, Betz O, Fajardo R, et al. *Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects.* Bone, 2006.
- 37. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA und Bruder SP. *Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro.* Cell Transplant, 1997. **6**(2): p. 125-34.

- 38. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK und Gerasimov UV. *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers.* Cell Tissue Kinet, 1987. **20**(3): p. 263-72.
- 39. Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, et al. Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. J Biomed Mater Res, 1999. **44**(1): p. 98-108.
- 40. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan Al und Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem, 1997. **64**(2): p. 295-312.
- 41. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
- 42. Tropel P, Platet N, Platel JC, et al. *Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* Stem Cells, 2006.
- 43. Liang F, Wang YF, Nan X, et al. [In vitro differentiation of human bone marrowderived mesenchymal stem cells into blood vessel endothelial cells]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2005. **27**(6): p. 665-9.
- 44. Caplan AI und Bruder SP. *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century.* Trends Mol Med, 2001. **7**(6): p. 259-64.
- 45. Declercq H, Van den Vreken N, De Maeyer E, et al. *Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source.* Biomaterials, 2004. **25**(5): p. 757-68.
- 46. Nagatomi J, Arulanandam BP, Metzger DW, Meunier A und Bizios R. *Cyclic pressure affects osteoblast functions pertinent to osteogenesis.* Ann Biomed Eng, 2003. **31**(8): p. 917-23.
- 47. Hanada K, Dennis JE und Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. J Bone Miner Res, 1997.
 12(10): p. 1606-14.
- 48. Hock JM, Canalis E und Centrella M. *Transforming growth factor-beta stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae.* Endocrinology, 1990. **126**(1): p. 421-6.
- 49. Roberts AB. *TGF-beta signaling from receptors to the nucleus.* Microbes Infect, 1999. **1**(15): p. 1265-73.
- 50. Attisano L und Wrana JL. *Signal transduction by the TGF-beta superfamily.* Science, 2002. **296**(5573): p. 1646-7.
- 51. Fujii M, Takeda K, Imamura T, et al. *Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation.* Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3801-13.
- Harwood PJ und Giannoudis PV. Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. Expert Opin Drug Saf, 2005.
 4(1): p. 75-89.
- 53. Courteix D, Lespessailles E, Peres SL, Obert P, Germain P und Benhamou CL. Effect of physical training on bone mineral density in prepubertal girls: a comparative study between impact-loading and non-impact-loading sports. Osteoporos Int, 1998. **8**(2): p. 152-8.
- 54. Iwamoto J, Yeh JK und Aloia JF. *Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat.* Bone, 1999. **24**(3): p. 163-9.

- 55. Matziolis G, Tuischer J, Kasper G, et al. *Simulation of cell differentiation in fracture healing: mechanically loaded composite scaffolds in a novel bioreactor system.* Tissue Eng, 2006. **12**(1): p. 201-8.
- 56. Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA und Mikos AG. *In vitro* generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2488-93.
- 57. Angele P, Yoo JU, Smith C, et al. *Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro.* J Orthop Res, 2003. **21**(3): p. 451-7.
- 58. Kale S, Biermann S, Edwards C, Tarnowski C, Morris M und Long MW. *Threedimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone.* Nat Biotechnol, 2000. **18**(9): p. 954-8.
- 59. Grayson WL, Ma T und Bunnell B. *Human mesenchymal stem cells tissue development in 3D PET matrices.* Biotechnol Prog, 2004. **20**(3): p. 905-12.
- 60. Yoshikawa H und Myoui A. *Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics.* J Artif Organs, 2005. **8**(3): p. 131-6.
- 61. Ramaswamy Y, Haynes DR, Berger G, et al. *Bioceramics composition modulate resorption of human osteoclasts.* J Mater Sci Mater Med, 2005. **16**(12): p. 1199-205.
- 62. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L und Petite H. *A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation.* Biomaterials, 2003. **24**(14): p. 2497-502.
- 63. Perka C, Arnold U, Spitzer RS und Lindenhayn K. *The use of fibrin beads for tissue engineering and subsequential transplantation.* Tissue Eng, 2001. **7**(3): p. 359-61.
- 64. Gurevich O, Vexler A, Marx G, et al. *Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue.* Tissue Eng, 2002. **8**(4): p. 661-72.
- 65. Dagum AB. *Peripheral nerve regeneration, repair, and grafting.* J Hand Ther, 1998. **11**(2): p. 111-7.
- 66. Schexneider KI. *Fibrin sealants in surgical or traumatic hemorrhage.* Curr Opin Hematol, 2004. **11**(5): p. 323-6.
- 67. Bhatia SS. *Ocular surface sealants and adhesives.* Ocul Surf, 2006. **4**(3): p. 146-54.
- 68. Ho W, Tawil B, Dunn JC und Wu BM. *The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: Dependence on fibrinogen concentration and clot structure.* Tissue Eng, 2006. **12**(6): p. 1587-95.
- 69. Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JC, Helgerson S und Tawil B. *Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation in Fibrin Gels in Vitro.* Tissue Eng, 2006.
- 70. Duda GN, Sollmann M, Sporrer S, et al. *Interfragmentary motion in tibial osteotomies stabilized with ring fixators.* Clin Orthop Relat Res, 2002(396): p. 163-72.
- 71. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA und Cory JG. *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture.* Cancer Commun, 1991. **3**(7): p. 207-12.
- 72. Buttke TM, McCubrey JA und Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. J Immunol Methods, 1993. **157**(1-2): p. 233-40.

- 73. Martin SJ. *Thermal stability of ribosomal ribonucleic acid from baby hamster kidney cells.* Biochem J, 1966. **101**(3): p. 721-726.
- 74. Mori N, Mizuno D und Goto S. *Increase in the ratio of 18S RNA to 28S RNA in the cytoplasm of mouse tissues during aging.* Mech Ageing Dev, 1978. **8**(4): p. 285-97.
- 75. Gorodetsky R, Clark RA, An J, et al. *Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing.* J Invest Dermatol, 1999. **112**(6): p. 866-72.
- 76. Heather Fox-Brashears GQ, Raymond Blanchard, Bill Wang and Sean Yu. *Oligo GEArrays®: The Pathway-Focused DNA Microarray System for Every Laboratory.* 2000.
- 77. Shi S, Robey PG und Gronthos S. *Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis.* Bone, 2001. **29**(6): p. 532-9.
- 78. Vascotto SG, Beug S, Liversage RA und Tsilfidis C. *Nvbeta-actin and NvGAPDH* as normalization factors for gene expression analysis in limb regenerates and cultured blastema cells of the adult newt, Notophthalmus viridescens. Int J Dev Biol, 2005. **49**(7): p. 833-42.
- 79. Bustin SA. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.* J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
- 80. Pohjanvirta R, Niittynen M, Linden J, Boutros PC, Moffat ID und Okey AB. Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. Chem Biol Interact, 2006. **160**(2): p. 134-49.
- 81. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, et al. *Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.* Anal Biochem, 2002. **309**(2): p. 293-300.
- 82. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. *Housekeeping genes as internal standards: use and limits.* J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
- 83. Kasper G, Glaeser JD, Geissler S, et al. *Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior.* Stem Cells, 2007. **25**(8): p. 1985-94.
- 84. Moran JL und Solomon PJ. *Statistics in review Part I: graphics, data summary and linear models.* Crit Care Resusc, 2007. **9**(1): p. 81-90.
- 85. Lumley T, Diehr P, Emerson S und Chen L. *The importance of the normality assumption in large public health data sets.* Annu Rev Public Health, 2002. **23**: p. 151-69.
- 86. Griffith CK, Miller C, Sainson RC, et al. *Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue.* Tissue Eng, 2005. **11**(1-2): p. 257-66.
- 87. Zwaginga JJ und Doevendans P. *Stem cell-derived angiogenic/vasculogenic cells: possible therapies for tissue repair and tissue engineering.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(11): p. 900-8.
- 88. Zhuang H, Wang W, Tahernia AD, Levitz CL, Luchetti WT und Brighton CT. Mechanical strain-induced proliferation of osteoblastic cells parallels increased TGF-beta 1 mRNA. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(2): p. 449-53.
- 89. Weyts FA, Bosmans B, Niesing R, van Leeuwen JP und Weinans H. *Mechanical* control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation. Calcif Tissue Int, 2003. **72**(4): p. 505-12.

- 90. Colter DC, Sekiya I und Prockop DJ. *Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7841-5.
- 91. Muraglia A, Cancedda R und Quarto R. *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model.* J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 7)**: p. 1161-6.
- 92. Bruder SP, Jaiswal N und Haynesworth SE. *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.* J Cell Biochem, 1997. **64**(2): p. 278-94.
- 93. McCulloch CA und Tenenbaum HC. *Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture.* Anat Rec, 1986. **215**(4): p. 397-402.
- 94. Benayahu D, Kletter Y, Zipori D und Wientroub S. *Bone marrow-derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype in vitro and osteogenic capacity in vivo*. J Cell Physiol, 1989. **140**(1): p. 1-7.
- 95. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC und Riggs BL. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. J Bone Miner Res, 1996. **11**(3): p. 312-24.
- 96. Goodman S und Aspenberg P. *Effects of mechanical stimulation on the differentiation of hard tissues.* Biomaterials, 1993. **14**(8): p. 563-9.
- 97. Rubin CT und McLeod KJ. *Promotion of bony ingrowth by frequency-specific, low-amplitude mechanical strain.* Clin Orthop Relat Res, 1994(298): p. 165-74.
- 98. Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Beck A, Claes L und Ignatius A. *Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain.* J Biomech, 2002. **35**(7): p. 873-80.
- 99. Paul JP und McGrouther DA. *Forces transmitted at the hip and knee joint of normal and disabled persons during a range of activities.* Acta Orthop Belg, 1975. **41 Suppl 1**(1): p. 78-88.
- 100. Mauney JR, Sjostorm S, Blumberg J, et al. *Mechanical stimulation promotes* osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. Calcif Tissue Int, 2004. **74**(5): p. 458-68.
- Ignatius A, Blessing H, Liedert A, et al. *Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices.* Biomaterials, 2005. 26(3): p. 311-8.
- 102. Docheva D, Popov C, Mutschler W und Schieker M. *Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system.* J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 21-38.
- 103. Schmidt C, Pommerenke H, Durr F, Nebe B und Rychly J. *Mechanical stressing* of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5081-5.
- 104. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
- 105. Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE und Robey PG. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. Bone, 2001. **28**(2): p. 174-81.
- 106. Moursi AM, Globus RK und Damsky CH. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 18)**: p. 2187-96.

- 107. Brakebusch C und Fassler R. *The integrin-actin connection, an eternal love affair.* Embo J, 2003. **22**(10): p. 2324-33.
- 108. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L und Keely PJ. *Focal adhesion regulation of cell behavior.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1692**(2-3): p. 103-19.
- 109. Mark MP, Prince CW, Oosawa T, Gay S, Bronckers AL und Butler WT. Immunohistochemical demonstration of a 44-KD phosphoprotein in developing rat bones. J Histochem Cytochem, 1987. **35**(7): p. 707-15.
- 110. Noda M, Tsuji K, Morinobu M, Ishijima M und Nifuji A. [A gene involved in angiogenesis and bone -osteopontin]. Clin Calcium, 2002. **12**(3): p. 363-7.
- Kawahata H, Kikkawa T, Higashibata Y, et al. Enhanced expression of Runx2/PEBP2alphaA/CBFA1/AML3 during fracture healing. J Orthop Sci, 2003. 8(1): p. 102-8.
- 112. Mukai T, Otsuka F, Otani H, et al. *TNF-alpha inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(4): p. 1004-10.
- 113. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS und Owen ME. *Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures.* J Cell Sci, 1992. **102 (Pt 2)**: p. 341-51.
- 114. Solheim E. *Growth factors in bone.* Int Orthop, 1998. **22**(6): p. 410-6.
- 115. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Pruss A, Haas NP und Schmidmaier G. *Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods.* Cell Tissue Bank, 2006.
- Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, et al. *Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2007.
 354(4): p. 846-51.
- 117. Centrella M, Ji C und McCarthy TL. *Control of TGF-beta receptor expression in bone.* Front Biosci, 1998. **3**: p. d113-24.
- 118. Liu F. *Receptor-regulated Smads in TGF-beta signaling.* Front Biosci, 2003. **8**: p. s1280-303.
- 119. Lee KS, Kim HJ, Li QL, et al. *Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8783-92.
- 120. Ducy P. *Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology.* Dev Dyn, 2000. **219**(4): p. 461-71.
- 121. Zohar R, Sodek J und McCulloch CA. *Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry.* Blood, 1997. **90**(9): p. 3471-81.
- 122. Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, et al. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. J Bone Miner Res, 1994. 9(6): p. 855-63.
- 123. Bischof P. *Endocrine, paracrine and autocrine regulation of trophoblastic metalloproteinases.* Early Pregnancy, 2001. **5**(1): p. 30-1.
- 124. Globus RK, Moursi A, Zimmerman D, Lull J und Damsky C. Integrin-extracellular matrix interactions in connective tissue remodeling and osteoblast differentiation. ASGSB Bull, 1995. 8(2): p. 19-28.
- 125. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T und Fassler R. *Integrins in invasive growth.* J Clin Invest, 2002. **109**(8): p. 999-1006.

- Davideau JL, Sahlberg C, Thesleff I und Berdal A. EGF receptor expression in mineralized tissues: an in situ hybridization and immunocytochemical investigation in rat and human mandibles. Connect Tissue Res, 1995. 32(1-4): p. 47-53.
- 127. Wang K, Yamamoto H, Chin JR, Werb Z und Vu TH. *Epidermal growth factor* receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53848-56.
- 128. Genersch E, Schuppan D und Lichtner RB. *Signaling by epidermal growth factor differentially affects integrin-mediated adhesion of tumor cells to extracellular matrix proteins.* J Mol Med, 1996. **74**(10): p. 609-16.
- 129. Troen BR. *The role of cathepsin K in normal bone resorption*. Drug News Perspect, 2004. **17**(1): p. 19-28.
- Plate U, Tkotz T, Wiesmann HP, Stratmann U, Joos U und Hohling HJ. *Early mineralization of matrix vesicles in the epiphyseal growth plate.* J Microsc, 1996.
 183(Pt 1): p. 102-7.

Danksagung

Meine Betreuer, PD Dr. med. Georg Matziolis und Dr. med. Jens Tuischer, haben ein großes Dankeschön für die Einarbeitung in das Thema und die stetige Motivation und Unterstützung verdient. Prof. Dr.-Ing. Georg Duda möchte ich für die Ermöglichung der Nutzung des Forschungslabors im Julius Wolff Instituts danken. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr.-Ing. Grit Kasper, die mir bei Fragestellungen im Zelllabor immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Für die unerlässliche praktische Hilfe möchte ich Marzena Princ sowie den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zelltherapie, Juliane Tiedemann, Andrea Ode und Sven Geißler, danken.

Zum Schluss danke ich meiner Freundin, Anne Weiland, für die hervorragenden Korrekturen und meinen Eltern, Ullrich und Anne Höft, sowie allen weiteren namentlich nicht aufgeführten Personen, die mich unterstützt haben.
Erklärung

"Ich, Moritz Rasmus Höft, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Beeinflussung der Genexpression von Osteoprogenitorzellen durch Prädifferenzierung und mechanische Stimulation" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Berlin, den 22.07.2008

Moritz Rasmus Höft

Lebenslauf

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