

**MECHANISCH INDUZIERTE UND
ADHÄSIONSSUBSTRATABHÄNGIGE
BIOLOGISCHE ANTWORT
VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Annika Kasten

geb. am 18.07.1980 in Bernau bei Berlin
aus Rostock

Rostock, Mai 2012

Gutachter:

Prof. Dr. J. Rychly
Universitätsmedizin Rostock
Arbeitsbereich Zellbiologie
Schillingallee 70
18057 Rostock

Prof. Dr. B. Piechulla
Universität Rostock
Institut für Biowissenschaften - Biochemie
Albert-Einstein-Str. 3
18059 Rostock

Datum der Einreichung: 04. Mai 2012

Datum der Verteidigung: 26. November 2012

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Zusammenfassung	8
2 Einleitung	9
2.1 Mesenchymale Stammzellen	9
2.2 Mechanobiologie	13
2.2.1 Molekulare Mechanismen der Mechanotransduktion	13
2.2.2 Methoden der mechanischen Stimulation <i>in vitro</i>	16
2.2.3 Das Konzept der Mechano-Nische	18
2.3 Biomaterialien	19
2.3.1 Oberflächenfunktionalisierung von Biomaterialien durch Anbindung von Proteinen und Peptiden	21
2.3.2 Mikrostrukturierung von Biomaterialien	23
2.4 Zielstellung	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	25
3.1.2 Puffer und Lösungen	27
3.1.3 Antikörper	28
3.1.4 Kits und Assays	29
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	30
3.1.6 Sonden-/Primerpaare für die Analyse mittels Real-Time quantitative PCR	31
3.1.7 Geräte	31
3.1.8 Oberflächenfunktionalisierungen	32
3.2 Methoden	33
3.2.1 Zellkultur	33
3.2.2 Mechanische Stimulation	34
3.2.3 Assays zur Untersuchung der biologischen Antwort von MSC	36
3.2.4 Durchflusszytometrie	39
3.2.5 Real-Time quantitative PCR	40
3.2.6 Bio-Plex Suspension Array System	43

3.2.7	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	45
3.2.8	Weitere mikroskopische Untersuchungen	47
3.2.9	Statistische Analysen	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen (MSC)	49
4.1.1	Minimalkriterien der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie	49
4.1.2	Expression von Zelladhäsionsrezeptoren	52
4.2	Methodische Untersuchungen zur mechanischen Stimulation	53
4.2.1	Bindung paramagnetischer Partikel an MSC	53
4.2.2	Internalisierung der paramagnetischen Partikel	54
4.2.3	Zellvitalität nach mechanischer Stimulation an β 1-Integrinen	55
4.3	Einfluss der mechanischen Stimulation auf die intrazelluläre Signaltransduktion der MSC	57
4.4	Einfluss der mechanischen Stimulation auf die biologische Antwort der MSC	58
4.4.1	Metabolische Aktivität und Proliferationsverhalten	58
4.4.2	Expression von Differenzierungsmarkern	59
4.4.3	Freisetzung des bioaktiven Faktors VEGF	60
4.5	Einfluss einer wiederholten mechanischen Stimulation auf die biologische Antwort der MSC	62
4.5.1	Expression von Differenzierungsmarkern	62
4.5.2	Expression des bioaktiven Faktors VEGF	63
4.6	Einfluss der mechanischen Stimulation auf die biologische Antwort der MSC in Abhängigkeit von homogenen Oberflächenfunktionalisierungen	64
4.6.1	Mechanische Eigenschaften der homogenen Oberflächenfunktionalisierungen	64
4.6.2	Metabolische Aktivität und Proliferationsverhalten	65
4.6.3	Expression von Differenzierungsmarkern	66
4.6.4	Expression des bioaktiven Faktors VEGF	69
4.7	Einfluss homogener Oberflächenfunktionalisierungen auf das Zellverhalten	71
4.7.1	Expression von Differenzierungsmarkern	71
4.7.2	Freisetzung des bioaktiven Faktors VEGF	72
4.7.3	Osteogene Differenzierungsfähigkeit	73
4.7.4	Adhäsionsverhalten	75
4.8	Einfluss von Oberflächenfunktionalisierungen in Streifenform auf das Zellverhalten	80
4.8.1	Visualisierung der Streifenstrukturen	80
4.8.2	Morphologie der MSC	81
4.8.3	Ausrichtung der MSC	83
4.8.4	Form und Größe der Zellen bzw. der Zellkerne	83

4.8.5 Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte	85
4.9 Schematische und zusammenfassende Ergebnisdarstellung	88
5 Diskussion	89
Literaturverzeichnis	105
Danksagung	123
Eidesstattliche Erklärung	124

Abbildungsverzeichnis

1	Schematisches Modell der molekularen Architektur von Fokalkontakten	14
2	Techniken der mechanischen Stimulation	17
3	Mechano-Nische	19
4	Modulare Struktur von Fibronectin	22
5	Schema der Methode zur mechanischen Stimulation von Zellen	35
6	Versuchsaufbau zur mechanischen Stimulation	36
7	Adhärenz mesenchymaler Stammzellen auf Plastik	49
8	Expression von Oberflächenantigenen zur Charakterisierung der MSC	50
9	Osteogene Differenzierungsfähigkeit der MSC	51
10	Adipogene Differenzierungsfähigkeit der MSC	51
11	Expression von Adhäsionsrezeptoren	52
12	Anbindung paramagnetischer Partikel an die Zelloberfläche	54
13	Internalisierung paramagnetischer Partikel	55
14	Zellvitalität nach wiederholter mechanischer Stimulation	56
15	Vitalität der MSC nach mechanischer Stimulation auf homogener RGD-Beschichtung als Adhäsionssubstrat	56
16	Aktivierung der intrazellulären Signalproteine AKT und ERK nach mechanischer Stimulation von MSC	57
17	Einfluss der mechanischen Stimulation auf die metabolische Aktivität und das Proliferationsverhalten von MSC	58
18	Einfluss der mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression von Differen- zierungsmarkern	59
19	Einfluss der mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression und Freisetzung von VEGF	61
20	Einfluss der wiederholten mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern	62
21	Einfluss der wiederholten mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression von VEGF	63
22	Bestimmung des Elastizitätsmoduls von funktionalisierten Oberflächen	65
23	Einfluss von mechanischer Stimulation und RGD-Beschichtung auf die metaboli- sche Aktivität und das Proliferationsverhalten der MSC	66
24	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression der Alkali- schen Phosphatase nach mechanischer Stimulation	67

25	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von SOX 9 nach mechanischer Stimulation	68
26	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von PPAR γ nach mechanischer Stimulation	68
27	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von Kollagen 1a nach mechanischer Stimulation	69
28	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von VEGF nach mechanischer Stimulation	70
29	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern	71
30	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von VEGF	73
31	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Alkalische Phosphatase-Aktivität der MSC unter osteogenen Differenzierungsbedingungen	74
32	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Matrixkalzifizierung unter osteogenen Differenzierungsbedingungen	74
33	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die metabolische Aktivität und das Proliferationsverhalten der MSC unter osteogenen Differenzierungsbedingungen .	75
34	Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Zellausbreitung	76
35	Organisation des Aktinzytoskeletts und der Fokalkontakte auf homogenen Oberflächenfunktionalisierungen nach 1 h	77
36	Organisation des Aktinzytoskeletts und der Fokalkontakte auf homogenen Oberflächenfunktionalisierungen nach 24 h	78
37	Quantitative Analyse der Fokalkontakte auf homogenen Oberflächenfunktionalisierungen	79
38	Visualisierung der Fibronektinstreifen	81
39	Morphologie der MSC auf Fibronektinstreifen	82
40	Orientierung der Zellen und der Zellkerne auf Fibronektin-Streifenstrukturierungen	83
41	Einfluss der Streifenbreite auf morphometrische Parameter der Zelle	84
42	Einfluss der Streifenbreite auf morphometrische Parameter des Zellkerns	85
43	Organisation des Aktin-Zytoskeletts auf Fibronektinstreifen verschiedener Breite	86
44	Quantitative Analyse der Fokalkontakte auf Fibronektinstreifen verschiedener Breite	86
45	Schematische Darstellung der Ergebnisse	88

Tabellenverzeichnis

1	Minimalkriterien zur Identifizierung von MSC	11
2	Chemikalien und Reagenzien	25
3	Puffer und Lösungen	27
4	Primäre Antikörper	28
5	Sekundäre Antikörper	29
6	Kits und Assays	29
7	Verbrauchsmaterialien	30
8	TaqMan [®] Gene Expression Assays für Real-Time quantitative PCR	31
9	Geräte	31
10	Streifen-Abstand-Kombinationen der streifenförmigen Mikrostrukturierungen . .	32
11	Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese	43
12	Programm für die Real-Time quantitative PCR	43
13	Färbeprotokoll für Immunfluoreszenzmikroskopie	47
14	Ethanolreihe zur schrittweisen Zelldehydrierung	48

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
adiDIM	adipogenes Differenzierungsmedium
AKT	<i>murine thymoma viral oncogene (protein kinase B)</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
AMPED	2-Amino-2-Methyl-1,3-Propanediol
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Art.-Nr.	Artikelnummer
ATP	Adenosintriphosphat
BMP4	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
C_t	<i>threshold cycle</i>
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
Calcein-AM	Acetomethoxy-Derivat von Calcein
CD105	Endoglin
CD14	<i>monocyte differentiation antigen</i>
CD19	<i>B-lymphocyte antigen</i>
CD29	β 1-Integrin
CD34	<i>hematopoietic progenitor cell antigen</i>
CD44	Hyaluronrezeptor
CD45	<i>receptor-type tyrosine protein-phosphatase</i>
CD49a	α 1-Integrin
CD49b	α 2-Integrin
CD49c	α 3-Integrin
CD49d	α 4-Integrin
CD49e	α 5-Integrin
CD49f	α 6-Integrin
CD51	α V-Integrin

CD61	β 3-Integrin
CD73	<i>5'-nucleotidase</i>
CD90	<i>thymocyte differentiation antigen 1</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU-F	<i>colony forming unit fibroblasts</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col1a	Kollagen 1a
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E-Modul	Elastizitätsmodul
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Expansionsmedium
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ET-1	Endothelin-1
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAM	6-Carboxyfluorescein
FE-SEM	Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FN	Fibronektin
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GRGDF	Glycin-Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Phenylalanin
GRGDNP	Glycin-Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Asparagin-Prolin

GRGDS	Glycin-Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Serin
GRGDSP	Glycin-Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Serin-Prolin
GRGDY	Glycin-Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Tyrosin
GTPase	Guanosintriphosphat-Hydrolase
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen complex on chromosome 6 region 6p21.31</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Immunoglobulin G
IL-11	Interleukin-11
IL-6	Interleukin-6
ISCT	Internationale Gesellschaft für Zelltherapie
KCl	Kaliumchlorid
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MGB	<i>minor groove binder</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCO-sP(EO-stat-PO)	sternförmiges, sechsarmiges Polyethylenglycol-Polymer mit terminalen NCO-Gruppen
ostDIM	osteogenes Differenzierungsmedium
p-AKT	phosphoryliertes AKT
p-ERK	phosphoryliertes ERK
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)-Triphosphat

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNpp	4-Nitrophenylphosphat
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>
R _n	normalisierter Reporter
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCF	<i>stem cell factor</i>
SEM	Standardfehler
Sox 9	<i>SRY(sex determining region Y)-box 9</i>
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SUN1	<i>Sad1 and UNC84 domain-containing protein 1</i>
TCP	Polystyrol
Thr	Threonin
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-Propan-1,3-diol
Tyr	Tyrosin
VASP	<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Verd.	Verdünnung
Wnt	<i>wingless int-1</i>
Ø	Durchmesser

1 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSC) kommen auf Grund ihrer gewebeerneuernden und immunmodulatorischen Eigenschaften vielfach auf dem Gebiet der Regenerativen Medizin zum Einsatz und werden bereits in klinischen Studien zur Behandlung akuter und chronischer Krankheiten eingesetzt^{31,35,212}. Durch die umfassende Aufklärung von Mechanismen wie Selbsterneuerung und Differenzierung von MSC kann deren klinischer Einsatz weiter optimiert werden. Die Mikroumgebung der Stammzellen *in vivo* weist eine hohe Komplexität und Dynamik auf, wobei insbesondere mechanische Signale von großer Bedeutung für die funktionelle Steuerung der Zellen sind, welche durch Integrine erkannt und konvertiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Integrinrezeptorsystem einerseits durch die mechanische Stimulation an $\beta 1$ -Integrinen und andererseits durch die Verwendung von RGD-Peptiden bzw. Fibronectin (FN) angesprochen. Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der biologischen Antwort von MSC sowie die Suche nach modulierenden Faktoren dieser Effekte, z.B. durch die Verwendung verschiedener Adhäsionsmatrizes. Inwieweit mikrostrukturierte Oberflächen in Streifenform zelluläre Funktionen beeinflussen und auf diese Weise zur Differenzierung beitragen können, wurde ebenfalls untersucht.

Es zeigte sich, dass sich die Expression von Differenzierungsmarkern auf Grund eines mechanischen Reizes durch den Einsatz von immobilisierten RGD-Peptiden bzw. FN als Adhäsionssubstrate modulieren ließ. Insbesondere die Expression von Kollagen 1a als osteogenen Differenzierungsmarker konnte nach Kultivierung der MSC auf RGD-Peptiden und FN durch mechanische Stimulation an $\beta 1$ -Integrinen gesteigert werden. Eine Erhöhung der Sekretion des bioaktiven Faktors VEGF in Folge der mechanischen Stimulation war ebenfalls substratabhängig und konnte nur auf der Zellkulturmatrix Polystyren, nicht aber auf RGD-Peptiden oder FN erzielt werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass neben chemischen Oberflächenfunktionalisierungen auch die mechanischen Eigenschaften des Adhäsionssubstrates das Differenzierungsverhalten beeinflussen, wobei die Matrixsteifigkeit besonders für die osteogene Differenzierung von Bedeutung war. Das Adhäsionsverhalten der MSC zeigte sich in erster Linie abhängig von der Oberflächenbeschichtung, wobei die Ausbreitung der Zellen, die Organisation des β -Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte schneller auf FN und RGD-Peptiden im Vergleich zum Kontrollsubstrat Glas erfolgte. Die Größe der Fokalkontakte hing dagegen vor allem von der Steifigkeit des Adhäsionssubstrates ab. Durch die Verwendung linienförmiger Mikrostrukturierungen des Adhäsionssubstrates erfolgten durch die schrittweise Reduktion der Streifenbreite morphologische Veränderungen der MSC, einschließlich einer Verringerung der Fläche und Elongation der Zellen. Damit einhergehend kam es zur Reorganisation des β -Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte sowie einer Reduktion der Aktin-Stressfasern.

RGD- bzw. FN-funktionalisierte Oberflächen sowie deren streifenförmige Mikrostrukturierungen können für eine gezielte Modulierung der Zellantwort eingesetzt werden und somit zur Optimierung regenerativer Therapien beitragen.

2 Einleitung

Die Regenerative Medizin befasst sich mit dem Ersatz oder der Regeneration von humanen Zellen, Geweben oder Organen zur Wiederherstellung der normalen Funktion auf Grund von Alter, Krankheit, Schädigung oder kongenitalen Defekten^{57,123}. Dabei wird sowohl auf das Konzept des *Tissue Engineering*, das die *in vitro*-Erzeugung eines funktionellen Gewebes bzw. Organs zum Ziel hat, als auch auf das Konzept der Zelltherapie durch Verabreichung von *ex vivo* manipulierten autologen, allogenen oder xenogenen Zellen zurückgegriffen¹³. Als therapeutische Ansätze werden der Ersatz (durch Transplantation), die Reparatur (durch Zelltherapie) oder die Regeneration (u.a. durch Mobilisierung eines endogenen Pools von Stammzellen) von Geweben bzw. Organen verfolgt¹⁵³. Organersetzungen sowie Zelltherapien werden im humanen System bereits seit vielen Jahren angewendet, u.a. erstmalig 1954 Nieren-¹³⁰ und seit 1968 Knochenmarktransplantationen⁹. Für die Regenerative Medizin können im Allgemeinen somatische Zellen sowie adulte oder embryonale Stammzellen¹²³ in Kombination mit natürlich vorkommenden oder synthetischen Biomaterialien verwendet werden^{20,153}. Ein grundlegender Nachteil von Biomaterialien der ersten Generation liegt in der Unfähigkeit, auf veränderte physiologische Kräfte und biochemische Stimuli während der Gewebe- bzw. Organregeneration zu reagieren⁶⁷. Durch neueste Entwicklungen kann nun gezielt die spezifische zelluläre Antwort auf der molekularen Ebene stimuliert werden. Die Immobilisierung verschiedenster Proteine, Peptide und anderer Biomoleküle an der Oberfläche erlaubt z.B. die Imitierung der extrazellulären Matrix (ECM) und somit eine maßgeschneiderte zellspezifische Adhäsion. Neben der Rekrutierung und Adhäsion geeigneter Zelltypen ist für einen optimalen Erfolg der Geweberekonstruktion auch die Berücksichtigung der mechanischen Anforderungen des umliegenden Gewebes an das Implantatkonstrukt⁶⁰ und folglich auch an die Zellen ausschlaggebend. Es gilt, die Einflüsse mechanischer Kräfte auf das Verhalten der Stammzellen, als bevorzugten Zelltyp der Regenerativen Medizin, genauer zu untersuchen, da die mechanobiologischen Mechanismen der Detektion mechanischer Stimuli durch die Zelle und die darauf resultierende Zellantwort erst zum Teil verstanden sind. Hinsichtlich ihrer Rolle in der Formierung und Erhaltung krafttragender Gewebe des Muskel-Skelett-Systems hat sich der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen für das Knochen- und Knorpel-*Tissue Engineering* etabliert^{105,204}.

2.1 Mesenchymale Stammzellen

Stammzellen werden im Allgemeinen als clonogene Zellen mit den Schlüsseleigenschaften - Potenzial zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen und unbegrenzte Selbsterneuerung - definiert^{201,137}, welche erstmalig 1961 experimentell im hämatopoetischen System beschrieben wurden¹⁹⁰.

Die **Differenzierungspotenziale von Stammzellen** sind vielfältig. Nur die befruchtete Eizelle (Zygote) und die Nachfahren der ersten zwei Zellteilungen sind totipotent. Sie sind somit in der Lage einen Embryo und das embryoversorgende Gewebe zu bilden. Nach etwa vier Tagen beginnen sich diese Zellen zu differenzieren. Sie bilden die Blastozyste, wobei aus dem Trophoblasten das extraembryonale Gewebe (z.B. Plazenta) entsteht und sich aus dem Embryoblasten (der inneren Zellmasse) der eigentliche Embryo entwickelt. Die Zellen der inneren Zellmasse sind pluripotent und stellen die Quelle für embryonale Stammzellen dar, welche erstmals 1981 im murinen^{47,122} und 1998 ebenfalls im humanen System¹⁸⁶ isoliert wurden. Sie können in alle Zelltypen der drei Keimblätter (Ento-, Meso- und Ektoderm) differenzieren, sind allerdings nicht in der Lage, einen vollständigen Embryo zu generieren, da sie sich nicht in Zellen des Trophoblasten differenzieren lassen. Adulte Gewebe besitzen multipotente Stammzellen, die ein limitiertes Differenzierungspotenzial entsprechend ihres lokalen Vorkommens aufweisen⁶. Die **Selbsterneuerung und Differenzierung der Stammzellen** werden durch Zellteilungen, die symmetrisch oder asymmetrisch verlaufen können, gesteuert. Teilt sich eine Stammzelle asymmetrisch, indem sie als Tochterzellen eine Stammzelle und eine Vorläuferzelle hervorbringt, so kann sie beide Anforderungen erfüllen und der Stammzell-Pool bleibt erhalten. Teilt sich eine Stammzelle symmetrisch, so führt dies entweder zur Vergrößerung oder zur Verkleinerung der Stammzellpopulation⁶. Differenzierte Zellen entwickeln sich aus Stammzellen nur über Zwischenstadien, die auch als *transit amplifying cells* bezeichnet werden, und mit jeder weiteren Zellteilung das Potenzial zur multiplen oder pluripotenten Differenzierung verlieren¹⁵⁹. Die Regulation der biologischen Funktionen von Stammzellen, wie Selbsterneuerung und Differenzierung, hängt von Faktoren der Mikroumgebung ab, die in definierten **Stammzellnischen** lokalisiert sind. Das prototypische Modell einer Stammzellnische beinhaltet vielfältige Komponenten⁸⁹. Sie umfasst neben den Stammzellen weitere Zellen in unmittelbarer Nähe (Kommunikation durch Zell-Zell-Kontakte und sezernierte Faktoren wie Zytokine), ECM-Proteine (Bereitstellung von Struktur und Organisation sowie mechanischen Signalen), Blutgefäße (Versorgung mit systemischen Signalen, Rekrutierung inflammatorischer und/oder zirkulierender Zellen) und eine neurale Versorgung. Daraus ergibt sich ein sehr komplexes und dynamisches System, das in der Lage ist, die Zahl und Funktion der Stammzellen optimal zu steuern⁸⁹. Das Halten der Stammzellen in einem undifferenzierten und multipotenten Stadium stellt eine wesentliche Grundlage für die Aufrechterhaltung eines Stammzellpools dar¹⁰¹.

Erstmalig wurden **mesenchymale Stammzellen (MSC)** im Knochenmark entdeckt und 1968 von Friedenstein et al. als *osteogenic stem cells* bezeichnet⁴⁹. Sie wurden als mononukleäre Zellen des Knochenmarks beschrieben, die unter *ex vivo* Kultivierungsbedingungen adhärente *colony forming unit fibroblasts* (CFU-F) bildeten⁵⁰. Weitere Untersuchungen zeigten, dass diese Zellen *in vitro* ein Potenzial zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen des Mesenchyms besitzen, darunter Knochen-, Knorpel- und Fettzellen¹⁵¹. Damit handelt es sich bei MSC um adulte

Stammzellen mit einem multipotenten Differenzierungspotenzial.

Bei *in vitro* kultivierten, plastikadhärenten Zellen aus dem Knochenmark handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation, bei der nur ein kleiner Teil zur CFU-F-Bildung in der Lage ist und Stammzeleigenschaften besitzt⁷². Eine **Identifizierung der MSC** ist daher notwendig, um Aussagen über biologische Eigenschaften der MSC und experimentelle Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen untereinander vergleichbar zu machen. Im Positionspapier der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) wurden 2006 die in Tab. 1 dargestellten Kriterien als Minimalkriterien zur Identifizierung von humanen MSC vorgeschlagen.

Tab. 1: **Zusammenfassung der Minimalkriterien zur Identifizierung von MSC** entsprechend der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie⁴³

1 Adhärenz auf Plastik unter standardisierten Kulturbedingungen	
2 Expression spezifischer Oberflächenantigene (Nachweis über Durchflusszytometrie)	
<u>positiv ($\geq 95\%$ +)</u>	<u>negativ ($\leq 2\%$ +)</u>
CD105	CD45
CD73	CD34
CD90	CD14 oder CD11b
	CD79 α oder CD19
	HLA-DR
3 Differenzierung <i>in vitro</i> in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten (Nachweis über entsprechende Färbungen der <i>in vitro</i> Zellkulturen)	

Nach den oben genannten Kriterien müssen Zellen, um als mesenchymale Stammzellen bezeichnet werden zu können, auf Plastik adhärent sein, bestimmte Oberflächenantigene exprimieren und das Potenzial zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung *in vitro* besitzen⁴³. Die Auswahl der spezifischen Oberflächenantigene stellt hierbei nur einen Konsens dar, da spezifische Marker oder Antigene für MSC im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen bislang noch nicht gefunden wurden¹⁹.

Der zu Beginn der 1990er Jahre von A. I. Caplan geprägte **Begriff der mesenchymalen Stammzelle**²³ ist indes strittig geworden, da die Bezeichnung in der Literatur sowohl für die *in vivo* Vorläufer als auch für *in vitro* kultivierte Zellen verwendet wird. Die ISCT empfiehlt daher den Begriff multipotente mesenchymale Stromazellen (Abkürzung ebenfalls MSC) für *in vitro* kultivierte Zellen und begrenzt damit die Bezeichnung Stammzelle auf *in vivo* Vorläuferzellen^{72,137}. In dieser Arbeit wird durchgehend die Bezeichnung humane mesenchymale Stammzellen (mit der Abkürzung MSC) verwendet, da in der Literatur diese Bezeichnung immer noch vorherrscht und der Begriff der Stammzelle nach Demonstration der mesenchymalen

Stammzeleigenschaften von der ISCT als korrekt angesehen wird⁷².

Konträr zu früheren Annahmen ist mittlerweile bekannt, dass MSC nicht nur aus mesodermalen Geweben isoliert werden können, sondern auch aus endodermalen (wie Thymus¹⁶⁷) und ektodermalen (wie Haut¹⁷⁷ und Pulpa¹⁴⁷) sowie pränatalen bzw. perinatalen Geweben (wie Plazenta²⁰⁶, Nabelschnur¹⁶⁹, Nabelschnurblut¹⁰⁶). Des Weiteren konnte experimentell nachgewiesen werden, dass MSC nicht nur in der Lage sind, in Zelltypen des Mesoderms sondern auch des Ektoderms (Bsp. Keratinozyten¹⁷⁰, Astrozyten¹⁰⁰) und des Endoderms (Bsp. Hepatozyten¹⁷¹) zu differenzieren. Dennoch sind diese gezeigten **Differenzierungspotenziale der MSC** nicht allgemein hin akzeptiert u.a. durch den Mangel an standardisierten Methoden zur Isolierung, Expansion und Identifizierung der MSC⁴³. Weiterhin scheint die Herkunft der Zellen einen großen Einfluss auf die Plastizität und die Selbsterneuerung zu haben, da MSC, gewonnen aus verschiedenen postnatalen und embryonalen Geweben, trotz Verwendung identischer Kultivierungsbedingungen signifikante Unterschiede in Morphologie, Differenzierungspotenzial und Genexpression zeigen¹³⁷. Der Nachweis der Differenzierung *in vivo* von MSC birgt weitere Herausforderungen und ist schwer überprüfbar. So können beispielsweise aus dem Knochenmark stammende MSC mit endogenen Zellen (Hepatozyten, Neuronen und Herzmuskelzellen) fusionieren und auf diese Weise zur Geweberegeneration beitragen, ohne den Prozess der Transdifferenzierung (Kombination aus De- und Redifferenzierung) zu durchlaufen^{7,90}.

Um die Funktion der MSC *in vivo* näher charakterisieren zu können, ist das Auffinden der mikroanatomischen **Lokalisation der MSC *in situ*** wichtig¹³⁷. Einige Studien legen den Schluss nahe, dass MSC in perivaskulären Nischen in annähernd allen adulten Geweben vorkommen, wo sie entsprechend Zugang zum Blutstrom haben und dadurch die Fähigkeit erhalten, auch über größere Distanzen in andere Gewebe bzw. Organe im Falle von Verletzung oder Erkrankung zu migrieren¹⁰¹. Der direkte Vergleich von Perizyten und MSC hat gezeigt, dass sich beide Zelltypen hinsichtlich Morphologie, Differenzierungspotenzial, Aufrechterhaltung der Multipotenz (bis in hohe Passagen während der Kultivierung *in vitro*) und Expression von Oberflächenmarkern sehr ähneln^{101,137}.

MSC finden zunehmend **Einsatz in der Regenerativen Medizin** und werden auf Grund ihrer immunmodulatorischen und -suppressiven Eigenschaften⁴¹ für therapeutische Zwecke und zur Behandlung verschiedener Krankheitsbilder wie Multiple Sklerose und Diabetes mellitus genutzt^{11,137}. Die fehlende Expression des HLA Klasse II Antigens an der Zelloberfläche macht diese Zellen zur ausgezeichneten Quelle für therapeutische Zwecke, da sie keine immunogenen Eigenschaften besitzen¹¹⁹. Allerdings sollten für eine ausgeweitete klinische Anwendung von MSC die standardisierte Isolierung und Expansion *in vitro* weiter vorangetrieben sowie die Sicherheit der zellbasierten Therapie und der Verbleib der MSC im Zielgewebe untersucht werden¹³⁷.

2.2 Mechanobiologie

Auf dem Gebiet der Mechanobiologie werden all jene Mechanismen untersucht, mit deren Hilfe Zellen mechanische Signale ihrer Umwelt detektieren und darauf reagieren¹⁰⁵. Mechanische Kräfte innerhalb eines Organismus, die u.a. auf Grund von Gravitation oder Prozessen wie Gelenkbewegungen, Muskelkontraktionen und pulsierendem Blutfluss entstehen, haben hierarchische Auswirkungen auf Organe, Gewebe, Zellen und letztendlich auf subzelluläre Strukturen^{84,94}. Die Erkennung und Konvertierung mechanischer Stimuli in biochemische Signale, die sog. Mechanotransduktion, findet dabei im molekularen Bereich mittels mechanosensitiver Strukturen wie Integrine und Ionenkanäle statt^{26,166}. Eine bedeutende Rolle spielen Integrin-basierte Adhäsionskomplexe (Fokalkontakte), welche in der Lage sind, biochemische Faktoren wie Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) in der Umgebung, aber auch physikalische und geometrische Faktoren wie Elastizität und Dimensionalität zu erkennen⁵⁵. Die Integration mechanischer Signale kann z.B. in veränderter Zellkontraktilität und -motilität sowie modifizierter Proteinexpression resultieren¹⁹⁵. Aus der Gesamtheit der Veränderungen durch Beeinflussung intrazellulärer Signalwege ergibt sich eine Anpassung des Gewebes auf die herrschenden mechanischen Anforderungen.

2.2.1 Molekulare Mechanismen der Mechanotransduktion

Integrin-basierte Adhäsionskomplexe

Integrin-basierte Adhäsionskomplexe stellen Multiproteinkomplexe dar, die die ECM über Integrine mit intrazellulären Strukturen wie dem Aktin-Zytoskelett verbinden sowie Adhäsionsrezeptoren, Signalmoleküle, verbindende Adapterproteine und zytoskelettale Elemente beinhalten^{21,210}.

Integrine bestehen aus Heterodimeren, die sich aus einer der 18 α - und einer der 8 β -Untereinheiten zusammensetzen, und binden über ihre extrazellulären Domänen an ECM-Proteine^{21,205,209}. Während der Integrinaktivierung unterscheidet man 3 Konformationen: die abgewinkelte, geschlossene Konformation mit geringer Rezeptoraffinität (inaktiv), die intermediäre, verlängerte Konformation (aktiviert) und die verlängerte, offene Konformation (aktiviert und Ligandgebunden)¹⁷⁵. Die Signalwege der Integrinaktivierung sind bidirektional und vermitteln verschiedene biologische Antworten. Eine mögliche Signalrichtung ist von außen (extrazellulär) nach innen (intrazellulär) und wird daher auch als *outside-in*-Signalweg bezeichnet. Durch die Bindung der Integrine an Proteine der ECM ändert sich deren Konformation und führt durch Multivalenzen der ECM-Proteine zum *Clustern* der Integrine, wobei sich mehrere Integrin-Heterodimere zu einem Oligomer zusammenschließen. Die Integration beider Ereignisse resultiert in Signalwegen, die die Zellpolarität, die Genexpression und das Überleben sowie die Proliferation der Zellen regulieren. Zu Beginn des *inside-out*-Signalweges (intrazellulär \rightarrow extrazellulär) bindet ein Aktivator wie Talin an die intrazelluläre Domäne der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit und führt

zur Aufrichtung und Aktivierung der Integrine, wobei sich deren Affinität zu ECM-Proteinen erhöht. Auf diese Weise werden Adhäsions- und Interaktionsstärke zwischen Integrinen und ECM-Proteinen reguliert, wodurch Integrine in die Lage versetzt werden, die z.B. für die Zellmigration benötigten Kräfte zu übertragen¹⁷⁵.

Eine Analyse des sog. Integrin-Adhäsoms durch Zaidel-Bar et al. (2007) ergab ein hochkomplexes System bestehend aus 156 Komponenten darunter 6 Adhäsionsproteine, 25 Adapterproteine, 24 zytoskelettale Proteine, 9 Aktin-bindende Proteine und 10 Serin-/Threonin-Proteinkinasen²¹⁰. Innerhalb dieses Netzwerkes bestehen 690 Verbindungen darunter 379 Bindungsinteraktionen. Die funktionelle Unterteilung in kleinere Netzwerke ergab drei große Proteinfamilien: Adapterproteine, Adhäsionsrezeptoren und Aktinregulatoren, welche gemeinsam die physikalische Struktur des Adhäsoms bilden. Alle weiteren Gruppen bestehen hauptsächlich aus Enzymen, die den Auf- und Abbau der Fokalkontakte sowie die Signalweiterleitung der Integrine ins Zellinnere regulieren²¹⁰.

Kanchanawong et al. (2010) beschrieben mit Hilfe hochauflösender 3D-Fluoreszenzmikroskopie eine räumlich organisierte, molekulare Architektur der Fokalkontakte, die schematisch in Abb. 1 dargestellt ist. Integrine und Aktin sind dabei nur ca. 40 nm voneinander entfernt⁹¹.

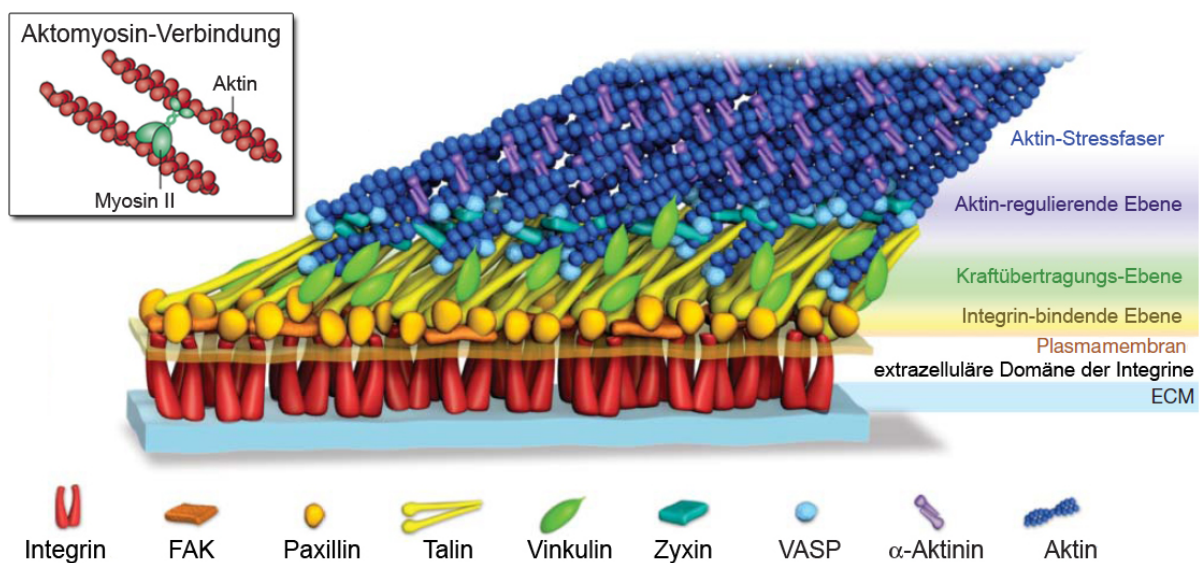


Abb. 1: **Schematisches Modell der molekularen Architektur von Fokalkontakten.** Dargestellt ist die mittels hochauflösender 3D-Fluoreszenzmikroskopie experimentell bestimmte Position der Proteine mit gleichzeitiger Einteilung in räumlich als auch funktionell voneinander getrennten Ebenen. Zusätzlich ist die Interaktion zwischen Aktin und Myosin II als Aktomyosin-Verbindung veranschaulicht (modifiziert nach Kanchanawong et al. (2010)⁹¹ und Geiger et al. (2009)⁵⁵).

Die Fokalkontakte sind laut Kanchanawong et al. (2010) in 3 sowohl räumlich als auch funktionell voneinander getrennten Kompartimenten organisiert: der Integrin-bindenden Ebene, der Kraftübertragungs-Ebene und der Aktin-regulierenden Ebene⁹¹. Demnach befinden sich die Fo-

kale Adhäsionskinase (FAK) und Paxillin in der Integrin-bindenden Ebene. Eine regulierende Funktion bei der Kraftübertragung zwischen Aktin und Integrinen wurde den Proteinen Talin und Vinkulin bereits von Galbraith et al. (2002) zugeschrieben⁵². Beide Proteine wurden hier in Abb. 1 übereinstimmend mit der Literatur als Teil der Kraftübertragungs-Ebene dargestellt. Innerhalb der Aktin-regulierenden Ebene liegen Zyxin und VASP mit Kontakt zu den Aktinfilament-Enden, die wahrscheinlich an der Verstärkung der Fokalkontakte beteiligt sind²⁰⁸. Aktinfilamente werden mit Hilfe des Vernetzungsproteins α -Aktinin gebündelt, welches antiparallele Homodimere entlang der Aktinfilamente bildet und jeweils ein Aktinfilament an einem seiner Enden bindet^{91,139,199}. Aktinfilamente können ebenfalls durch das Motorprotein Myosin II gebündelt werden (Abb. 1). Des Weiteren vermittelt Myosin II die Kontraktilität der Aktin-Stressfasern, wodurch Bewegungen entlang antiparalleler Aktinfilamente und gleichzeitiger gegenläufiger Verschiebungen stattfinden und dadurch Kraft auf das Aktin-Zytoskelett ausgeübt werden kann¹⁴³. Die ATP-abhängige Aktivität von Myosin II wird dabei durch reversible Phosphorylierungen reguliert¹⁴³.

Die Interaktionen zwischen dem Aktin-Zytoskelett und den Integrin-basierten Adhäsionskomplexen finden nach Geiger et al. (2009) in Form einer Rückkopplungsschleife statt⁵⁵. Kräfte, die durch die Myosin II-Kontraktilität oder die Aktin-Polymerisation generiert werden, haben Einfluss auf Proteine aller funktionellen Ebenen der Fokalkontakte. Die Stimulation von Signalproteinen führt u.a. zur Aktivierung von GTPase-aktivierenden Proteinen, die wiederum G-Proteine aktivieren oder inaktivieren. Die G-Proteine beeinflussen die Aktin-Polymerisation sowie die Aktomyosin-Kontraktilität durch Zytoskelett-regulierende Proteine und modulieren somit die Kraft-generierende Maschinerie⁵⁵.

Organisation von Integrin-basierten Adhäsionskomplexen während der Integrin-vermittelten Adhäsion

Beim Einsatz von Oberflächenfunktionalisierungen in Form von immobilisierten RGD-Peptiden oder Fibronectin erfolgt deren Erkennung durch die Rezeptorgruppe der Integrine. Die Integrin-vermittelte Adhäsion umfasst eine Kaskade von vier, sich teilweise überlappenden Ereignissen^{104,69}. In der initialen Adhäsionsphase wird der Kontakt zwischen Zellen und Molekülen der Matrixoberfläche auf Grund von Rezeptor-Ligand-Bindungen hergestellt, damit Zellen bereits leichten Scherkräften standhalten können. Im zweiten Schritt wird der Zellkörper flacher und die Zellmembran breitet sich auf dem Substrat aus, wodurch die Zellen im Verlauf einen zellspezifischen Phänotyp annehmen. Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts organisiert sich in Form von Stressfasern und in der letzten Phase formieren sich Fokalkontakte¹⁰⁴. Während des Adhäsionsprozesses stellt die Ausbildung von Fokalkontakten ein zentrales Element dar, da die Fokalkontakte eine strukturelle Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der ECM herstellen, um eine stabile Adhäsion und Migration der Zellen zu ermöglichen⁵³. Die Organisation des Aktin-Zytoskeletts verläuft während der Zellausbreitung sehr dynamisch, wobei zwei Typen von

Aktinstrukturen auftreten: zirkuläre Bündel und Stressfasern¹⁹³. Die zirkulären Bündel entstehen aus peripheren, bogenförmigen Strukturen, die langsam in Richtung Zellkern wandern und zu zirkulären Bündeln verschmelzen. Diese sind in einer Aktomyosin-abhängigen Weise organisiert und mit radial angeordneten dorsalen Fasern verbunden, welche in Fokalkontakten enden und die entstehenden kontraktile Kräfte auf das Adhäsionssubstrat übertragen. Beginnt eine Rotation der zirkulären Fasern, so folgt deren Abbau und eine Reorientierung der Aktinfasern. Abschließend erfolgt die Formierung der Stressfasern, welche mit einer Polarisation der Zellen durch die spezifische Regulation von Protein-Tyrosin-Kinasen und folglich mit einer zellulären Formveränderung einhergeht^{157,174}.

2.2.2 Methoden der mechanischen Stimulation *in vitro*

Die mechanischen Eigenschaften von Zellen sind bedeutend für zelluläre Prozesse wie Migration, Teilung und Morphologie von Zellen, die abhängig vom Zelltyp durch die Zellwand oder das Zytoskelett bestimmt werden¹⁰⁵. Mit Hilfe von *in vitro* Modellen lässt sich im Idealfall eine Situation *in vivo* simulieren. Je nach Fragestellung können experimentell sowohl Einzelzellen als auch Gesamtpopulationen hinsichtlich ihrer Antwort auf mechanische Reize untersucht werden (Abb. 2).

Um die mechanischen Eigenschaften von Einzelzellen und deren intrazellulären Komponenten zu charakterisieren, werden Kurzzeit-Einzelzell-Experimente, z.B. mit Hilfe von Mikropipetten, Rasterkraftmikroskopie oder *Magnetic Twist Cytometry* durchgeführt (Abb. 2A). Bei einer Vielzahl dieser Methoden wird die Zellmembran üblicherweise ein- oder herausgedrückt, wobei das Ausmaß der Deformation anschließend mit Hilfe geeigneter Messmethoden bestimmt wird.

Mit einer **Mikropipette** können suspendierte Einzelzellen angesaugt werden, bis die Oberfläche der Membran außerhalb der Mikropipette kugelförmig ist, oder auch in diese hineingesaugt werden⁷⁰. Die Auslenkung eines an der gegenüberliegenden Seite angebondenen Partikels ist dabei proportional zur ausgeübten Kraft. Die Bestimmung der Zellsteifigkeit kann mit Hilfe eines **Rasterkraftmikroskops** erfolgen. Es besteht aus einem flexiblen Hebel (*cantilever*) mit integrierter Spitze zur Abtastung der Oberfläche, einer Laser- und Photodiode zur Positionsbestimmung des *cantilever* sowie einem Piezo-Element zur Positionierung der Probe¹⁶². Durch die Kraftausübung des *cantilever* auf die Probe, wird deren Oberfläche eingedrückt und auf Grund der jeweiligen Spitzengeometrie spezifisch deformiert. Eine Weiterentwicklung der Rasterkraftmikroskopie stellt die Methode der **Zellkompression** dar, bei der anstatt einer Spitze des *cantilever* im Nanometer- eine Spitze im Mikrometerbereich auf die Zellen einwirkt und die Applikation einer konstanten Druckkraft über die Gesamtoberfläche adhärenter Zellen möglich wird¹⁰⁸. Im Falle der *Magnetic Twist Cytometry* werden mechanische Kräfte über kleine Partikel auf die Zelle ausgeübt. Dafür werden ferromagnetische Partikel mit Liganden wie ECM-

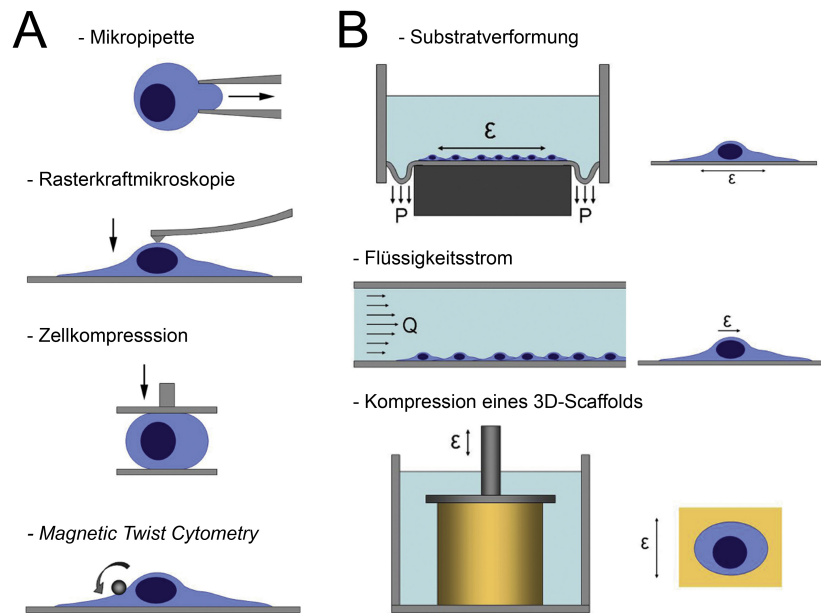


Abb. 2: **Techniken der mechanischen Stimulation.** Diese können grundsätzlich auf (A) Einzelzellsystemen oder (B) Zellpopulationen in 2D- oder 3D-Umgebungen beruhen (→ Richtung der Kraftausübung, ϵ - Verformungsrichtung, Q - Flussrichtung, P - Zugrichtung). (modifiziert nach Lee et al. (2011)¹⁰⁵)

Molekülen oder Rezeptor-spezifischen Antikörpern beschichtet und anschließend mit den Zellen inkubiert, um eine spezifische Bindung zwischen Partikel und Oberflächenrezeptoren herzustellen. Nach Induktion der magnetischen Dipole der Partikel und deren horizontaler Ausrichtung durch einen sehr kurzen magnetischen Impuls erfolgt das Anlegen eines schwachen Magnetfeldes, wodurch die Partikel gedreht und Scherkräfte auf die gebundenen Rezeptoren ausgeübt werden^{110,198}. Veränderungen dieses Ansatzes hinsichtlich Verwendung von superparamagnetischen Partikel und der Applikation des Magnetfeldes mit Hilfe einer magnetischen Nadel resultiert in einer Anziehung der Partikel senkrecht zur Nadelspitze und damit in einer großflächigeren Verformung der Zelle¹¹⁰.

Zur Analyse des Einflusses mechanischer Kräfte auf beispielsweise die Differenzierung von Stammzellen eignen sich Modelle, die die ausgedehnte Kultivierung einer gesamten Zellpopulation im Monolayer oder in 3D-Kultur beinhalten. Diese erlauben weiterhin eine umfassende Untersuchung der Zellantwort, die auf Grund von möglicherweise vorhandenen Subpopulationen oder lokalen Unterschieden mechanischer Kräfte, z.B. im Flüssigkeitsstrom, entstehen können. Als Beispiele sind hier das Einwirken von Scherkräften (durch Substratverformung) oder Zugspannungskräften (durch einen Flüssigkeitsstrom) auf einen Zellmonolayer sowie die Kompression eines mit Zellen besiedelten 3D-scaffold zu nennen (Abb. 2B).

Die Auswirkungen von Zugspannungen auf Zellen werden mit Hilfe von verformbaren und

elastischen Substraten (**Substratverformung**), an deren Oberfläche Adhäsionsmoleküle wie Kollagen I oder Fibronectin immobilisiert werden, getestet. Dabei kann eine Vielzahl von Parametern wie Orientierung der Dehnung (uni- oder biaxial), Magnitude, Frequenz und Dauer sowie die Oberflächenmodifizierung verändert werden. Während bei der Verabreichung von Zugspannungen über das Substrat die größten Kräfte entlang der basalen Zellseite entstehen, werden die Scherkräfte im **Flüssigkeitsstrom** auf der apikalen Zellseite generiert, wobei die Stärke als auch die Wahl eines dynamischen oder kontinuierlichen Flusses das Ausmaß der Zellantwort bestimmen. Durch die **Kompression eines 3D-scaffold** werden Druck- und Zugspannungen durch den *scaffold* auf die Zellen übertragen.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode der mechanischen Rezeptorstimulation^{155,172} handelt es sich um eine Abwandlung der *Magnetic Twist Cytometry*. Es werden paramagnetische, mit Antikörper gegen β 1-Integrine beschichtete Partikel an Einzelzellen gebunden und unter Einfluss eines inhomogenen Magnetfeldes bewegt (Abb. 5). Hierdurch wird lokal begrenzt ein mechanischer Stress auf die Zellen ausgeübt⁹². Der Vorteil liegt hier in der Größe des entstehenden inhomogenen Magnetfeldes, welches sich zwischen den Magnetpolen aufbaut und somit auf eine Zellpopulation angewendet werden kann. Anschließend wird das Verhalten der gesamten Zellpopulation analysiert.

2.2.3 Das Konzept der Mechano-Nische

Mechanische *in vitro* Stimulationsversuche zeigen, dass Differenzierungsprozesse die mechanischen Eigenschaften der Zellen und deren subzellulärer Komponenten beeinflussen können. Stammzellen können ihrerseits Veränderungen der mechanischen Eigenschaften in ihrer direkten Umgebung detektieren und darauf in Form von Differenzierung entsprechend ihres Differenzierungspotenzials reagieren. Die externe Applikation mechanischer Kräfte kann wiederum Differenzierungsprozesse in den Stammzellen initiieren und steuern. Auf Grund dieser Erkenntnisse entwickelten Lee et al. (2011) das Konzept der Mechano-Nische für Stammzellen (Abb. 3)¹⁰⁵.

Es wird als eine spezifische Kombination dreier Faktoren definiert, die im Zusammenspiel die Erhaltung der Stammzellpopulation bewirken. Als Faktoren werden die mechanischen Eigenschaften der Zellen und der extrazellulären Matrix sowie externe bzw. zellgenerierte mechanische Signale angesehen. Bereits Veränderungen eines Faktors können ursächlich für das Verlassen der Mechano-Nische sein und eine Differenzierung der Stammzellen nach sich ziehen. Auf Grund der engen Wechselbeziehung zwischen den Faktoren hat die Veränderung eines Faktors die Beeinflussung anderer Faktoren zur Folge, wodurch die Direktionalität der Differenzierung unterstützt wird¹⁰⁵.

Die mechanische Umgebung spielt demnach eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Stammzellen

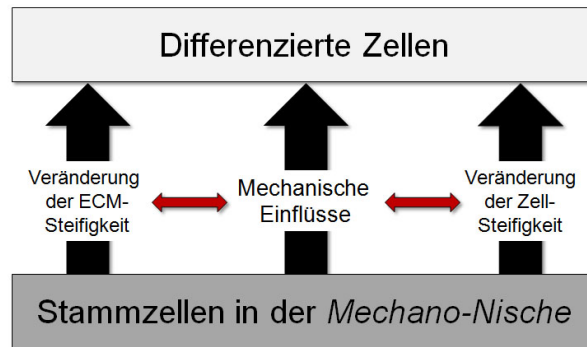


Abb. 3: **Konzept der Mechano-Nische für Stammzellen** nach Lee et al. (2011)¹⁰⁵. Es verdeutlicht die wichtige Rolle der mechanischen Umgebung für die Erhaltung der Stammzeleigenschaften sowie durch deren Veränderung ebenfalls für die Differenzierung der Stammzellen.

und deren Differenzierung.

2.3 Biomaterialien

Biomaterialien spielen eine zentrale Rolle in modernen Strategien der Regenerativen Medizin und des *Tissue Engineering* als maßgeschneiderte biophysikalische und biochemische Umgebungen zur Steuerung von Zellverhalten und -funktion^{102,117,146}. Sie wurden von den *National Institutes of Health* als Substanz bzw. als Kombination verschiedener Substanzen synthetischen oder natürlichen Ursprungs definiert, die für eine beliebige Zeitspanne zur Krankheitsbehandlung, Funktionsvermehrung oder Ersetzung von Geweben, Organen oder Körperfunktionen verwendet werden¹. Dabei kann je nach Anwendung auf 5 Klassen von Biomaterialien zurückgegriffen werden: Polymere, Metalle und Metalllegierungen, Keramiken, Komposite sowie biologische Materialien^{2,142}. Für alle Biomaterialien gleichermaßen gilt: Sie müssen in erster Linie biokompatibel sein^{8,102,117,142}, dabei dürfen sie weder akut systemisch toxisch, zytotoxisch, hämolytisch, allergen, mutagen oder pyrogen sein noch Abstoßungsreaktionen des Körpers hervorrufen¹⁴².

Generationen von Biomaterialien

Die Betrachtung der Biomaterialentwicklung der vergangenen 60 Jahre führte L. L. Hench und J. M. Polak zur konzeptionellen Einteilung der Biomaterialien in 3 Generationen, die die Entwicklung der Eigenschaften sowie jeweiligen Anforderungen an die Materialien widerspiegelt^{67,132}. Je nach Anwendung werden heutzutage Biomaterialien aller Generationen verwendet, wobei eine Übereinstimmung zwischen Anwendungsanforderungen und Materialeigenschaften unablässig ist. Die **erste Generation** von Biomaterialien, die für biomedizinische Anwendungen verwendet wurde, musste eine geeignete Kombination physikalischer Eigenschaften, die mit denen des zu ersetzenden Gewebes vergleichbar waren, aufweisen und durfte nur minimal toxische Reaktionen im Patienten hervorrufen⁶⁶. Diese Generation wird im Wesentlichen als bioinert be-

schrieben^{67,132}. Das Konzept der reduzierten Immunantwort in Reaktion auf implantierte Fremdkörper stellt bis heute eine wesentliche Anforderung an Biomaterialien dar. Ein großer Nachteil der Biomaterialien der ersten Generation ist die Unfähigkeit, im Gegensatz zum lebenden Gewebe, nicht auf physiologische und biochemische Veränderungen reagieren zu können. Diese Limitierung führte zum Konzeptwechsel, von der reinen Gewebeersatzung hin zur Geweberegeneration⁶⁸. Die folgenden Generationen von Biomaterialien tragen diesem Nachteil Rechnung. Die **zweite Generation** von Biomaterialien ist einerseits durch bioaktive und andererseits durch resorbierbare Biomaterialien gekennzeichnet. Bioaktive Biomaterialien besitzen die Fähigkeit mit der biologischen Umgebung zu interagieren, um die biologische Antwort zu verbessern und die Gewebe-Oberflächen-Bindung zu erhöhen. Dabei sollen die auf Zellen ausgeübten Interaktionen oder Effekte zu einem spezifischen Zellverhalten führen. Um eine geeignete Bioaktivität zu erreichen, können auch Oberflächen durch Proteinadsorption oder Anbindung von Polymeren oder Biomolekülen modifiziert werden, um in Abhängigkeit von der finalen Anwendung die geforderte Zellantwort zu erzielen. Durch resorbierbare Biomaterialien können auftretende Probleme an der Grenzfläche zwischen Biomaterialien und Gewebe reduziert werden, wobei das körperfremde Material im Verlauf der Regeneration durch neues Gewebe ersetzt wird⁶⁶. Die **dritte Generation** von Biomaterialien soll gezielt spezifische Zellantworten auf dem molekularen Level stimulieren. Im Fokus stehen dabei kombinierte bioaktive und bioresorbierbare Biomaterialien. In diesem Zuge wurden z.B. temporär 3-dimensionale, poröse Strukturen entworfen, die die Invasion, Anheftung sowie Proliferation der Zellen stimulieren¹³². Die gezielte Aktivierung der Oberflächen synthetischer Biomaterialien mit spezifischen Biomolekülen wie Proteinen oder Peptidsequenzen zur Nachahmung der ECM beeinflusst das Zellverhalten hinsichtlich Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung^{68,132}.

Einsatz von Biomaterialien im *Tissue Engineering*

Im Bereich des *Tissue Engineerings* sollen neue Gewebe unter Verwendung von lebenden Zellen und Biomaterialien erzeugt werden¹⁴². Diese Biomaterialien werden oft als *scaffold* bezeichnet und bestehen aus synthetisch oder natürlich vorkommenden Polymeren sowie Keramiken^{138,142}. Als *scaffold* eignen sich besonders poröse 3D-Strukturen, die die entsprechende Umgebung für die Regeneration von Geweben oder Organen bereitstellen und als eine Art Schablone für die Gewebeformierung fungieren¹³⁸. Die zelluläre Besiedlung der *scaffold* erfolgt entweder *in vitro* vor Implantation oder *in vivo* nach Implantation durch das körpereigene System. Je nach Anwendung können auch Wachstumsfaktoren sowie im Falle der *in vitro* Besiedlung Bioreaktoren zur chemischen und/oder mechanischen Stimulierung von Zellen eingesetzt werden. Die Dreierkombination von *scaffold*, Zellen und Signalen verschiedener Art wird auch als Trias des *Tissue Engineering* bezeichnet¹⁵ und kennzeichnet damit dessen fundamentales Prinzip. Die Interaktion aller drei Faktoren soll einen biologischen Ersatz für das beschädigte oder verlorene Gewebe bilden bzw. die Heilung fördern¹⁹⁴. Neben den bereits beschriebenen Biomaterialeigen-

schaften wie Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit, muss ein *scaffold* zusätzlich ähnliche mechanische Eigenschaften wie das umliegende Gewebe aufweisen^{99,138}, was besonders im Falle der Ersetzung von Knochen oder Knorpel eine große Herausforderung darstellt. Des Weiteren ist eine geeignete Architektur des *scaffold* ebenfalls von großer Bedeutung, bei der besonders auf ein interkonnektierendes Porensystem mit hoher Porosität Wert gelegt werden muss, um sowohl eine adäquate Versorgung der Zellen mit Nährstoffen sicherzustellen als auch den Abtransport von Abbauprodukten der Zellen und Degradationsprodukten des *scaffold* zu gewährleisten.

2.3.1 Oberflächenfunktionalisierung von Biomaterialien durch Anbindung von Proteinen und Peptiden

Das Hauptproblem bei der Verwendung von synthetischen Biomaterialien in der Regenerativen Medizin stellt die fehlende Interaktion zwischen Polymer und Zellen dar, die durch die Immobilisierung von Proteinen oder spezifischen Zellerkennungsmotiven entscheidend verbessert werden kann⁶⁹. Im Idealfall soll nicht nur die Zelladhäsion verbessert, sondern auch Zelltypen selektiv angesprochen sowie eine spezifische Zellantwort generiert werden.

Die Effekte von ECM-Proteinen umfassen die Übertragung mechanischer und chemischer Stimuli sowie die Beeinflussung der Zellform, der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Transkriptionsaktivität und werden über spezifische Peptidsequenzen der Proteine vermittelt^{18,29,104,111,129}. Die Verwendung von Proteinen aus natürlichen Quellen wie den ECM-Proteinen bleibt durch die mögliche Immunogenität oder Pathogen-Übertragung auf den Empfänger sowie die nötige Proteinaufreinigung problematisch. Einige dieser Limitationen können durch die Verwendung rekombinanter Proteine und der Nachbildung biologischer Eigenschaften durch synthetische Analoga überwunden werden¹¹⁷. Dennoch bringt die Verwendung von Proteinen weitere Schwierigkeiten mit sich, wie die proteolytische Degradation, was eine Langzeit-Anwendung nahezu unmöglich macht, und die zur Zelladhäsion benötigte Proteinkonformation, die auf Grund der stochastischen Orientierung auf der Zelloberfläche nur ein Teil der Proteine besitzt⁶⁹. Ein Lösungsansatz liegt hier in der Verwendung von Zellerkennungsmotiven in Form von Peptiden anstatt der Präsentation vollständiger Proteine. Da Peptide im Normalfall stabil gegenüber proteolytischer Degradation sind, bieten sie eine exzellente Langzeitstabilität. Allerdings enthalten ECM-Proteine normalerweise verschiedenste Erkennungsmotive, während kleine Peptide oft nur ein einziges Erkennungsmotiv darstellen.

Fibronektin und das RGD-Motiv

Der größte Anteil der ECM besteht aus Kollagenen, Laminen oder Glykoproteinen wie Fibronektin, die als Substrate für verschiedene Adhäsionsrezeptoren wie Integrine fungieren^{76,109}. Fibronektin spielt eine wichtige Rolle in Prozessen wie Zelladhäsion, Migration und Differenzierung¹⁴¹. Es liegt üblicherweise als Dimer bestehend aus zwei annähernd identischen Untereinheiten vor

und besitzt einen modularen Aufbau aus Domänen des Typs I, II und III (Abb. 4)^{109,141}.

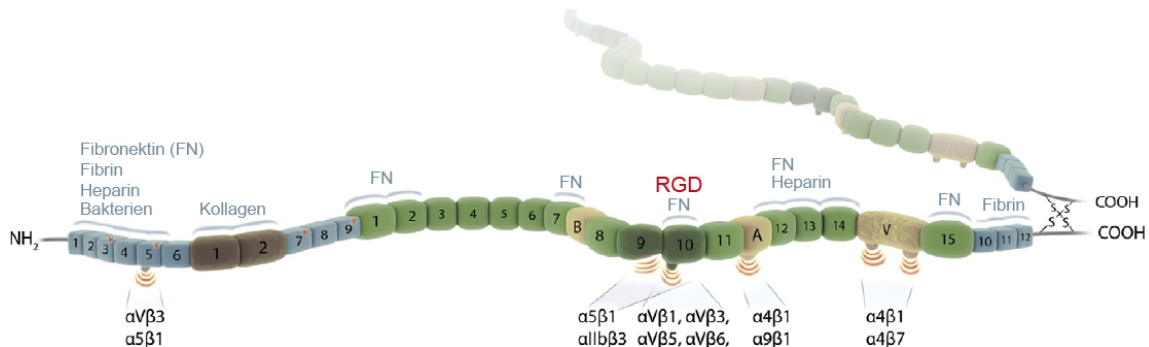


Abb. 4: **Modulare Struktur von Fibronektin.** Fibronektin besteht aus 3 Modulen: Typ I (blau), Typ II (braun) und Typ III (grün). Das Fibronektin-Dimer wird über zwei Disulfidbrücken am C-Terminus aus zwei Untereinheiten gebildet. Das RGD-Motiv befindet sich innerhalb der Typ III-Domäne. Bindungsdomänen für Integrin-Rezeptoren sind ebenso wie Bindungsdomänen für Fibronektin (FN), Kollagen, Heparin, Fibrin und Bakterien gekennzeichnet. In der variablen V-Domäne als auch in den spezifisch in cFN vorkommenden A- und B-Domänen tritt alternatives Spleißen auf (nach Leiss et al. (2008)¹⁰⁹).

Durch alternatives Spleißen treten im humanen System 20 mögliche monomerische Isoformen auf. Fibronektin liegt entweder als lösliches Plasma-Fibronektin oder als unlösliches zelluläres Fibronektin (cFN) vor, wobei besonders cFN auf Grund von zelltypspezifischem Spleißen eine heterogene Gruppe von FN-Isoformen darstellt. Die Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zelladhäsiven, ligandbindenden und Löslichkeitseigenschaften, sodass Zellen in die Lage versetzt werden, die Komposition der ECM während der Entwicklung und in einer gewebespezifischen Weise zu verändern¹⁴¹.

Die in Fibronektin enthaltene RGD-Peptidsequenz vermittelt als minimale Integrin-Erkennungssequenz neben der synergistischen Sequenz PHSRN eine spezifische Bindung an den klassischen Fibronektin-Rezeptor $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin¹⁴¹. Die intramolekulare Erkennung des Tripeptids ist äußerst komplex sowie abhängig von flankierenden Aminosäuresequenzen und der vorliegenden 3D-Präsentation. Das Vorkommen der RGD-Sequenz ist nicht auf Fibronektin beschränkt, sondern sie kommt in weiteren ECM-Proteinen wie Kollagen, Laminin und Vitronektin sowie in viralen und bakteriellen Proteinen vor, wobei sich insbesondere die flankierenden Aminosäuresequenzen unterscheiden¹⁴⁸. Gelöste RGD-Peptide sind in der Lage, die Fibronektin-induzierte Zelladhäsion zu inhibieren, und können nach Immobilisierung an der Oberfläche selbst Zelladhäsion vermitteln⁶⁹. Dabei ist eine stabile Verankerung der Peptide besonders wichtig, da sie den kontraktilen Kräften der Zelle widerstehen müssen und auch die Möglichkeit der Internalisierung der Integrinrezeptoren durch die Zellen unterbunden wird. Wie sich gezeigt hat, nimmt die adhäsionsvermittelnde Aktivität der RGD-Sequenz ab, wenn sie außerhalb des ursprünglichen Proteins präsentiert wird. Grund dafür ist die Rezeptoraffinität und -spezifität der RGD-Sequenz gegenüber Integrinen, die erst durch die flankierenden Aminosäuren erreicht wird^{148,150}. Im Allgemeinen kann eine Vielzahl von Integrin-Heterodimeren wie $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha V \beta 1$, $\alpha V \beta 3$ in einer

RGD-abhängigen Weise an ECM-Moleküle binden¹⁴⁸. Erst das Anfügen weiterer Aminosäuren an die RGD-Sequenz führt zu einer spezifischen Adhäsionsvermittlung, so vermitteln z.B. die Sequenzen GRGDSP und GRGDNP die Zelladhäsion über $\alpha 5\beta 1$, während die Sequenzen GRGDF und GRGDY eine Zelladhäsion über $\alpha V\beta 3$ und $\alpha I Ib\beta 3$ erlauben⁶⁹. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete lineare GRGDS-Sequenz weist dagegen eine vergleichbare Affinität zu den Integrinrezeptoren $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$ sowie eine verringerte Affinität zu $\alpha I Ib\beta 3$ auf¹⁴⁹.

Sowohl Fibronectin als auch die GRGDS-Sequenz eignen sich somit zur gezielten Integrinvermittelten Zelladhäsion.

2.3.2 Mikrostrukturierung von Biomaterialien

Zellen *in vivo* sind in eine hoch strukturierte Mikroumgebung eingebettet, welche die extrazelluläre Matrix sowie Nachbarzellen einschließt, die im Zusammenspiel die Architektur, Mechanik, Polarität und Funktion der Zellen beeinflussen¹⁸⁷. Allerdings gehen unter klassischen Kultivierungsbedingungen *in vitro* diese räumlichen, chemischen und mechanischen Informationen durch die Mikroumgebung in Form einer zweidimensionalen Glas- oder Plastikoberfläche verloren. Mittels *micropatterning* von Materialoberflächen können in Teilen externe Informationen der Mikroumgebung wiederhergestellt werden, wodurch den Zellen eine an den physiologischen Bedingungen nähere Umgebung geboten wird. Dadurch lassen sich die Geometrie der Zelle sowie zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration und Differenzierung regulieren^{30,44,145,181,207}.

Micropatterning-Techniken wurden vor mehr als 40 Jahren entwickelt^{25,63} und in den letzten Jahren auch vermehrt in zellbiologischen Anwendungen verwendet, wobei das *microcontact printing* die am häufigsten verwendete Methode darstellt¹⁸⁷. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibronectin-Mikrostrukturierungen in Streifenform wurden ebenfalls mittels *microcontact printing* erzeugt. Dafür wird im ersten Schritt ein sog. *waver* aus Silizium vollständig mit einem photoempfindlichen Polymer beschichtet und anschließend mit einer Maske, die die zu erhaltende Struktur enthält, bedeckt. Während der Bestrahlung mit UV-Licht wird das Polymer in seiner Struktur geschädigt und kann während des Entwicklungsprozesses abgetragen werden. Man erhält einen sog. *master* entsprechend des zu erzeugenden topographischen Musters. Im Anschluss wird der *master* mit Polydimethylsiloxan (PDMS) ausgegossen, welches sich verfestigt. Der elastische PDMS-Stempel wird mit ECM-Proteinen beschichtet, die anschließend auf die gewünschte zellabweisende Materialoberfläche gedruckt werden können^{30,176,188}. Auf diese Weise lassen sich die verschiedensten geometrischen Formen wie Streifen, Kreise, Quadrate, Dreiecke, L-/V-/U-Formen und Sterne in unterschiedlichen Dimensionen erzeugen^{5,97,126,189}.

2.4 Zielstellung

Für den optimalen Einsatz von Stammzellen in der Regenerativen Medizin ist das Wissen um die Regulation der zentralen Stammzeleigenschaften, Selbsterneuerung und Differenzierung, unabdingbar. Die Konzepte der Stammzellnische⁸⁹ sowie der Mechano-Nische¹⁰⁵ bilden die Grundlage für das Verständnis wie externe Stimuli in Form von Adhäsionssubstraten oder mechanischen Faktoren an der Regulation der Stammzeleigenschaften beteiligt sein können. Eine *in vitro* Nachbildung dieser äußerst komplexen und dynamischen Zusammenhänge ist in aller Umfassenheit kaum möglich. Den mesenchymalen Stammzellen soll daher eine reduzierte Komplexität gegenüber der *in vivo* Situation durch den Einsatz spezifischer Adhäsionsmatrizes sowie einer kontrollierten mechanischen Stimulation angeboten werden, um gezielt die biologische Antwort der Zellen hinsichtlich des Differenzierungsverhaltens und der Freisetzung bioaktiver Faktoren zu analysieren. Da Integrine als Mechanotransduktoren eine zentrale Rolle in der Erkennung sowie Konvertierung mechanischer Signale spielen, soll das Integrinrezeptor-System direkt über die mechanische Rezeptorstimulation an β 1-Integrinen als auch die Verwendung des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin bzw. des linearen GRGDS-Peptids (RGD) als Adhäsionsmatrizes angesprochen werden.

Im ersten Schritt soll der Effekt einer kurzzeitigen mechanischen Rezeptorstimulation an β 1-Integrinen auf die Aktivierung der intrazellulären Signalproteine ERK und AKT untersucht werden. Weiterhin soll geklärt werden, ob die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase und Kollagen 1a, des chondrogenen Differenzierungsmarkers Sox 9 sowie des adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ durch die mechanische Stimulation reguliert werden kann. Da die Angiogenese eine entscheidene Rolle während der Geweberegeneration spielt^{112,131,184}, soll ebenfalls die Freisetzung von VEGF analysiert werden. Es schließt sich die Frage an, ob die Verwendung von Fibronectin- bzw. RGD-funktionalisierten Oberflächen als Adhäsionssubstrate einen Einfluss auf die Zellanwort hinsichtlich der Expression von Differenzierungsmarkern als auch VEGF nach mechanischer Stimulation an β 1-Integrinen hat. Um Mechanismen aufzuspüren, die für etwaige Unterschiede im Expressionsmuster verantwortlich sein könnten, sollen ebenfalls zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Proliferation, metabolische Aktivität und Differenzierung der MSC nach Kultivierung auf Fibronectin- bzw. RGD-funktionalisierten Oberflächen untersucht werden.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Differenzierung von MSC auch von Mikrostrukturierungen der Adhäsionsmatrix abhängen kann^{126,181}, soll das Verhalten von MSC auf streifenförmigen Fibronectin-Mikrostrukturierungen hinsichtlich Morphologie, Ausrichtung sowie Organisation des β -Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte untersucht werden. Die schrittweise Reduzierung der Breite adhäsiver Fibronectinstreifen soll eine detailliertere Aussage über die gezielte Steuerung der Zellantwort ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Art.-Nr.	Hersteller
AMPED	A9754	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Antibiotikum-Antimykotium	15240062	Life Technologies GmbH
Aqua dest.	001428	Baxter S.A.
Ascorbinsäure	A4544	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
β -Glycerophosphat	G6251	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
β -Mercaptoethanol	1.15433.1000	Merck KGaA
BD CellFix™(10x Konzentrat)	340181	BD Biosciences
Bodipy® 493/503	D-3922	Life Technologies GmbH
Calcein	C0875	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Calcein-AM	ABD-22002	Biomol GmbH
CASYton	05651808001	Roche Deutschland Holding GmbH
Dexamethason (wasserlöslich)	D-2915	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
dNTP Set (100 mM)	10297018	Life Technologies GmbH
DMEM (mit GlutaMAX™)	31966021	Life Technologies GmbH
Dynabeads®M-280	112.01	Life Technologies GmbH
Essigsäure (99-100 %)	6052	J. T. Baker
Ethanol 70 %	0005316	Apomix
Ethanol 96 %	-	Universität Rostock, Klinikum-Zentralapotheke
Ethanol absolut	-	Universität Rostock, Klinikum-Zentralapotheke
Fötales Kälberserum (FKS)	3302-P281305	PAN Biotech GmbH
Glycerin (etwa 87 %)	104094	Merck KGaA
Hoechst 33342	14533	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol	9079-05	J. T. Baker
Kaliumchlorid (KCl)	104933	Merck KGaA
Kristall-Violett	61135	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Lymphozyten-Trennmedium	P-04-60125	PAN Biotech GmbH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	A4425	AppliChem GmbH

Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Chemikalien/Reagenzien	Art.-Nr.	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	3957.1	Carl Roth GmbH & CO. KG
Natronlauge (NaOH) (10 M)	01034.2000	Bernd Kraft GmbH
4-Nitrophenylphosphat (pNpp)	A1442	AppliChem GmbH
Paraformaldehyd (PFA)	158127	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PBS	H15-002	PAA Laboratories GmbH
PBS (inkl. Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	H15-001	PAA Laboratories GmbH
Phalloidin-Alexa Fluor [®] 546	A22283	Life Technologies GmbH
Phenol	206.0250	Merck KGaA
PMSF	A0999	AppliChem GmbH
Polyvinylalkohol (mol wt 30.000-70.000)	P8136	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Propidiumjodid	P-4170	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Random Primer	48190011	Life Technologies GmbH
RNase OUT [™] recombinant Ribonuclease Inhibitor	10777019	Life Technologies GmbH
Super Script [™] II Reverse Transcriptase	18064071	Life Technologies GmbH
Titanplättchen (Ø 11 mm, unbehandelt)	-	DOT GmbH
Tris	4855.2	Carl Roth GmbH & CO. KG
Triton X-100	T8532	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	L11-004	PAA Laboratories GmbH
TaqMan [®] Universal PCR Mastermix	4324018	Life Technologies GmbH
Tween-20	P1379	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Wasser für die Molekularbiologie	T143.4	Carl Roth GmbH & CO. KG

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tab. 3: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
adipogenes Erhaltungsmedium	1 % Antibiotikum-Antimykotikum (v/v) in hMSC Adipogenic Maintenance Medium inkl. SingleQuots [®] (aus hMSC Adipogenic Bullet Kit)
adipogenes Induktionsmedium	1 % Antibiotikum-Antimykotikum (v/v) in hMSC Adipogenic Induction Medium inkl. SingleQuots [®] (aus hMSC Adipogenic Bullet Kit)
Bodipy-Färbelösung	0,4 % Bodipy-Stammlösung (v/v) in 150 mM NaCl
Bodipy-Stammlösung	0,025 % Bodipy [®] 493/503 (w/v) in Ethanol absolut
Calcein-Färbelösung	5 µg/ml Calcein in Expansionsmedium
Calcein-Hoechst-Lösung	5 µg/ml Calcein-AM, 1 µg/ml Hoechst 33342 in DMEM
Einbettmedium	30 % Glycerin (w/v), 12 % Polyvinylalkohol (w/v), 0,53 mM Phenol, 60 mM Tris (pH 8,5) in Aqua dest.
Expansionsmedium	10 % FKS (v/v), 1 % Antibiotikum-Antimykotikum (v/v) in DMEM
Hoechst 33342-Lösung	1 µg/ml Hoechst 33342 in DMEM
Kristall-Violett-Lösung	0,1 % Kristall-Violett (w/v) in Aqua dest.
Lysepuffer	1 % Tween-20 (v/v), 1 mM PMSF in Aqua dest.
Messpuffer	10 mM pNpp, 100 mM AMPED, 5 mM MgCl ₂ in Aqua dest.
osteogenes Differenzierungsmedium	50 µM Ascorbinsäure, 10 nM Dexamethason, 10 mM β-Glycerophosphat in Expansionsmedium
PFA (4 %)	4 % PFA (w/v) in PBS (pH 7,4)
Propidiumjodid-Lösung	1 µg/ml Propidiumjodid in DMEM
TBS-Puffer	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 50 mM Tris in Aqua dest. (pH 7,4)
Triton X-100 (0,1 %)	0,1 % Triton X-100 (v/v) in PBS
Tween/PBS-Puffer	0,05 % Tween-20 (v/v) in PBS

3.1.3 Antikörper

Tab. 4: Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Art.-Nr.	Verd.	Spezies ¹
CD14 - FITC	BD Biosciences	347493	1:20	M
CD19	BD Biosciences	555410	1:25	M
CD29 (Lia 1/2)	Beckman Coulter GmbH	1598	1:10	M
CD34	BD Biosciences	347660	1:20	M
CD44	Beckman Coulter GmbH	0845	1:10	M
CD45RO - PE	BD Biosciences	347967	1:20	M
CD49a	BD Biosciences	559594	1:25	M
CD49b	Beckman Coulter GmbH	0717	1:10	M
CD49c	Beckman Coulter GmbH	2000	1:10	M
CD49d	Beckman Coulter GmbH	0764	1:10	M
CD49e	Beckman Coulter GmbH	0771	1:10	M
CD49f	Beckman Coulter GmbH	0769	1:10	R
CD51	Beckman Coulter GmbH	0770	1:10	M
CD61	Beckman Coulter GmbH	0540	1:10	M
CD73	BD Biosciences	550256	1:25	M
CD90 - FITC	Beckman Coulter GmbH	IM1839U	1:25	M
CD105	BD Biosciences	555690	1:25	M
Fibronectin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	F3648	1:100	K
HLA-DR - PE	Becton Dickinson	7367	1:20	M
Maus IgG1	BD Biosciences	349040	1:20	M
Paxillin	Santa Cruz Biotechnology, Inc	sc-5574	1:100	K
Vinkulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	V9131	1:100	M

¹K = Kaninchen, M = Maus, R = Ratte

Tab. 5: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Art.-Nr.	Methode ²	Verd.
Maus IgG - Alexa Fluor [®] 488	Life Technologies GmbH	A-11001	IFM	1:100
Maus IgG (F(ab') ₂ -Fragment) - FITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	F2883	FACS	1:20
Maus IgG1 - FITC	Acris Antibodies GmbH	SM10F	FACS	1:100
Maus IgG2a - PE	Acris Antibodies GmbH	SM11R	FACS	1:100
Kaninchen IgG - Alexa Fluor [®] 488	Life Technologies GmbH	A-11008	IFM	1:100

3.1.4 Kits und Assays

Tab. 6: Kits und Assays

Kit/Assay	Art.-Nr.	Hersteller
Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	G5421	Promega Corporation
Cell Lysis Kit	171-304011	Bio-Rad Laboratories GmbH
hMSC Adipogenic Bullet Kit	PT-3004	Lonza Group Ltd.
NucleoSpin [®] RNA II	740955	Macherey-Nagel GmbH
PKH 26 Red Fluorescent General Cell Linker Kit	PKH26GL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bio-Plex Human Cytokine Standards Group I	171-D50001	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex Phosphoprotein Detection Reagent Kit	171-304004	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex Phospho Akt (S473) Assay	171-V21075	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex Phospho Erk 1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187) Assay	171-V22238	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex Pro human Cytokine VEGF Set	171-B5027M	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex Pro Reagent Kit	171-304070	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex Total Akt Assay	171-V31075	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bio-Plex Total Erk 1/2 Assay	171-V32238	Bio-Rad Laboratories GmbH

²FACS = Durchflussszytometrie, IFM = Immunofluoreszenzmikroskopie

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Verbrauchsmaterialien

Material	Art.-Nr.	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäße	0030121.708	Eppendorf AG
1,5 ml Reaktionsgefäße	0030121.086	Eppendorf AG
2,0 ml Reaktionsgefäße	0030121.094	Eppendorf AG
15 ml Reaktionsgefäße	188271	Greiner Bio-One GmbH
50 ml Reaktionsgefäße	227261	Greiner Bio-One GmbH
2 ml Pipetten (serologisch)	710180	Greiner Bio-One GmbH
5 ml Pipetten (serologisch)	606180	Greiner Bio-One GmbH
10 ml Pipetten (serologisch)	607180	Greiner Bio-One GmbH
25 ml Pipetten (serologisch)	760180	Greiner Bio-One GmbH
BD Falcon 5 ml Polystyrene Round Bottom Tubes	REF352054	BD Biosciences
Cellstar 6-Wellplatte	657180	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar 24-Wellplatte	665180	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar 96-Wellplatte	655180	Greiner Bio-One GmbH
Deckgläser (#3, Ø 15 mm)	-	Paul Marienfeld GmbH
Deckgläser (#1, 20 x 20 mm)	BB020020A1	Gerhard Menzel GmbH
flexiPERM con A (Ø _i 12 mm)	76077434	Sarstedt AG & Co.
MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	N801-0560	Life Technologies GmbH
MicroAmp Optical Adhesive Film	4311971	Life Technologies GmbH
Objektträger (76 x 26 mm)	AA00000112E	Gerhard Menzel GmbH
Pasteurpipetten	FB502553	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Stripwell TM Plate, Flat Bottom, 96-Wellplatte	9102	Corning, Inc.
T25-Zellkulturflaschen	690175	Greiner Bio-One GmbH
T75-Zellkulturflaschen	658175	Greiner Bio-One GmbH

3.1.6 Sonden-/Primerpaare für die Analyse mittels Real-Time quantitative PCR

Tab. 8: TaqMan[®] Gene Expression Assays für Real-Time quantitative PCR

TaqMan [®] MGB-Sonde/Primerpaar	Art.-Nr.	Hersteller
ALP	HS_00758162_m1	Life Technologies GmbH
Colla	HS_00164004_m1	Life Technologies GmbH
GAPDH	HS_99999905_m1	Life Technologies GmbH
PPAR γ	HS_00234592_m1	Life Technologies GmbH
SOX 9	HS_00165814_m1	Life Technologies GmbH
VEGF	HS_00900054_m1	Life Technologies GmbH

3.1.7 Geräte

Tab. 9: Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM [®] 7500 Sequence Detection System	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Axiovert-Mikroskop	Carl Zeiss AG
BD FACSCalibur Flow Cytometer	BD Biosciences
Bio-Plex 200 Suspension Array System	Bio-Rad Laboratories GmbH
CASY Cell Counter	Roche Deutschland Holding GmbH
CO ₂ -Begasungsbrutschrank CB 150	Binder GmbH
Leica TCS SP2 AOBS	Leica Microsystems GmbH
Mini LabRoller Rotator	Axon Labortechnik GmbH
MyCycler - Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
NanoDrop 1000 - Spektrometer	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss AG
Pipetboy Comfort	INTEGRA Biosciences GmbH
Rosys Anthos 2010 - Photometer	Anthos Mikrosysteme GmbH
Sicherheitswerkbank Safeflow 1.2	Nunc GmbH & Co. KG
Zentrifuge 5417 R (Rotor: FA45-30-11)	Eppendorf AG
Zentrifuge 5810 R (Rotor: A-4-62)	Eppendorf AG
Vacusaft Comfort	INTEGRA Biosciences GmbH

3.1.8 Oberflächenfunktionalisierungen

Alle funktionalisierten Oberflächen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Möller des Deutschen Wollforschungsinstitutes an der RWTH Aachen e.V. als Kooperationspartner innerhalb des Sonderforschungsbereich TransRegio 37 (Teilprojekt B1) hergestellt.

Um eine unspezifische Proteinadsorption zu verhindern, wurde im ersten Schritt Polystyrol (Wells einer StripwellTMPlate) bzw. Glas (Deckgläser: #3, Ø 15 mm) mit sechsarmigen, sternförmigen NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymeren beschichtet. Die Polymersynthese wurde wie bereits beschrieben durchgeführt^{58,59}. Für eine spezifische Zelladhäsion erfolgte anschließend die Biofunktionalisierung der Polymeroberfläche durch Immobilisierung von Fibronectin (FN) bzw. der linearen GRGDS-Peptidsequenz (RGD)^{54,58,92}.

Neben den homogenen Oberflächenfunktionalisierungen wurden auch Streifenstrukturierungen für die Experimente verwendet, wobei hier nur Fibronectin als adhäsionsvermittelndes Protein eingesetzt wurde. Streifenstrukturierungen mit den in Tab. 10 angegebenen Streifen-Abstand-Kombinationen wurden mittels *microcontact printing* auf die NCO-sP(EO-stat-PO)-funktionalisierten Oberflächen aufgebracht⁵.

Tab. 10: **Streifen-Abstand-Kombinationen der streifenförmigen Mikrostrukturierungen**

Mittels *microcontact printing* wurde Fibronectin (FN) als adhäsionsvermittelndes Protein in Streifenform mit den folgenden Streifen-Abstand-Kombinationen auf die NCO-sP(EO-stat-PO)-funktionalisierten Oberflächen aufgebracht.

Bezeichnung	Breite	Abstand
FN 10/5	10 µm	5 µm
FN 10/10	10 µm	10 µm
FN 20/5	20 µm	5 µm
FN 20/10	20 µm	10 µm
FN 50/10	50 µm	10 µm
FN 50/20	50 µm	20 µm
FN 80/5	80 µm	5 µm
FN 80/20	80 µm	20 µm

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Isolierung der MSC aus Knochenmarksaspiraten

Das Knochenmark wurde während Herzoperationen aus dem Sternum entnommen und von der Gruppe von Prof. Dr. G. Steinhoff (Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Medizinische Fakultät, Universität Rostock) zur Verfügung gestellt. Es wurde direkt nach der Aspiration in den Entnahmeröhrchen mit Heparin als Antikoagulanzen gemischt. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (800 g ohne Bremse, 15 min, RT) des verdünnten Knochenmarks (1:1 mit PBS) im Lymphozyten-Trennmedium (Pancoll, Dichte: 1,077 g/l) wurden die mononukleären Zellen im sog. weißen Lymphozytenring angereichert. Diese Zellfraktion wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und dreimal mit PBS gewaschen (Zentrifugationsbedingungen: 1.000 rpm, 6 min, RT), bevor die in Expansionsmedium resuspendierten Zellen in eine kleine T25-Zellkulturflasche gegeben wurden. Nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank wurden die adhären Zellen mit PBS gewaschen, wodurch die nicht adhären hämatopoetischen Zellen entfernt wurden.

Kultivierung der MSC

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Allgemeinen in Expansionsmedium im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 d und wurde solange durchgeführt, bis die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten. Nun wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA von der Polystyrol-Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Dafür wurden die adhären Zellen mit Trypsin/EDTA versetzt und für ca. 5 min bei 37 °C inkubiert, bis sich alle Zellen vom Untergrund abgelöst hatten. Dann wurde die Zellsuspension mit Expansionsmedium gemischt und bei 1.200 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Expansionsmedium aufgenommen und es folgte eine Zellzählung. Ca. 8.000 Zellen/cm² wurden danach in eine neue Zellkulturflasche ausgesät und wieder bis zu 80 % Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden nun für einen Versuch verwendet oder erneut passagiert, wodurch sie die nächsthöhere Passage erreichten.

Zellzählung

Die Zellzählung wurde mit Hilfe des CASY Cell Counters durchgeführt. Es wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml Casy[®]ton verdünnt. Für die Messung wurden die für MSC notwendigen Messparameter geladen und die Zellzahl in der verdünnten Zellsuspension gemessen. Die Zellzahl lebender Zellen wurde pro ml unverdünnter Zellsuspension angegeben.

Induktion der osteogenen bzw. adipogenen Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung der MSC wurden 3.000 Zellen/cm² ausgesät und die Zellen über den angegebenen Zeitraum mit osteogenem Differenzierungsmedium stimuliert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 d.

Für die adipogene Differenzierung wurden 21.000 Zellen/cm² ausgesät, die einen Tag nach Aussaat alternierend 3 d mit adipogenem Induktionsmedium und 3 d mit adipogenem Erhaltungsmedium stimuliert wurden.

3.2.2 Mechanische Stimulation

Für die mechanische Integrin-Rezeptorstimulation an MSC wurde die bereits im Vorfeld durch Pommerenke et al. (1996) beschriebene Methode angewendet¹⁵⁴, die im folgenden kurz beschrieben werden soll.

Präparation der paramagnetischen Partikel

Es wurden paramagnetische Dynabeads[®] M-280 mit einem Durchmesser von 2,8 µm und einer Beschichtung mit anti-Maus IgG verwendet, an die im ersten Schritt der Antikörper gegen β1-Integrine gekoppelt wurde. Dafür wurden zuerst 100 µl der Partikel-Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 8.500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal gewaschen, wobei das Sediment jeweils mit 1 ml PBS versetzt und anschließend für 5 min bei 8.500 rpm zentrifugiert wurde. Danach wurden die Partikel in 500 µl PBS aufgenommen und es wurde 1 µg Antikörper gegen β1-Integrin hinzugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT auf dem Mini LabRoller Rotator, um eine gleichmäßige Durchmischung der Antikörper-Partikel-Lösung zu erreichen. Danach folgten vier Waschschrte mit jeweils 500 µl PBS. Zum Schluss wurde das Sediment in 1 ml DMEM aufgenommen. Die Antikörper-gekoppelten Partikel wurden bei 4 °C gelagert.

Methode der mechanischen Stimulation

Adhärente Zellen (in Wells einer 96-Wellplatte) wurden mit einer 1:100-Verdünnung der präparierten Partikellösung in Expansionsmedium versetzt und für 30 min im Brutschrank inkubiert, wonach im Durchschnitt ca. 5-10 Partikel an der Zelloberfläche gebunden hatten. Ein Well wurde, wie in Abb. 5 gezeigt, zwischen zwei Magnetpole platziert. Bedingt durch die Geometrie der Magnetpole in Form eines flachen und eines spitzen Magnetpols wurde ein inhomogenes Magnetfeld mit einer Magnetfeldintensität zwischen 10 mT und 20 mT erzeugt, wodurch die Partikel in Richtung des spitzen Magnetpols gezogen wurden und durchschnittlich eine Kraft von 0,2 nN/Partikel ausgeübt wurde⁹². Die Applikation des Magnetfeldes erfolgt für 15 min sowie zyklisch mit 1 Hz (0,5 s an, 0,5 s aus).

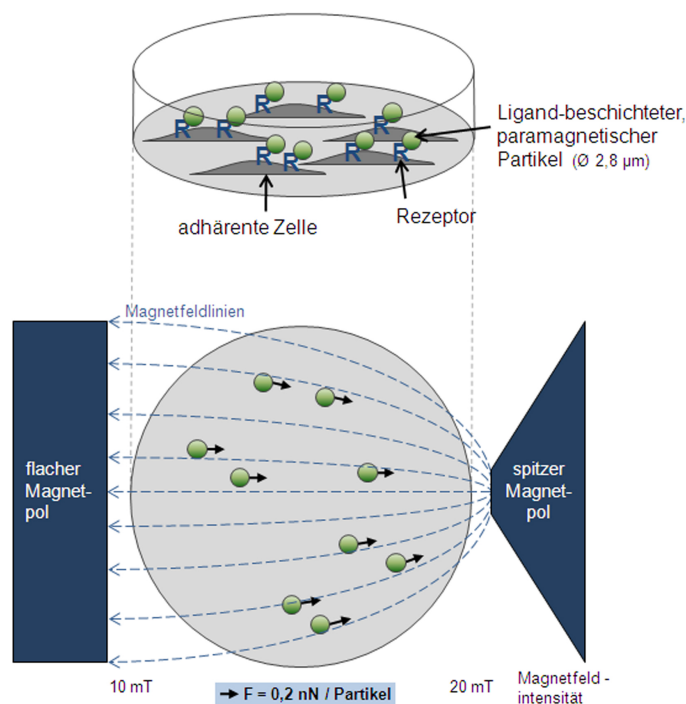


Abb. 5: **Schema der Methode zur mechanischen Stimulation von Zellen.** Ligand-beschichtete, paramagnetische Partikel binden spezifisch an die Zielstrukturen adhärenenter Zellen (Rezeptoren). Durch die Applikation eines inhomogenen Magnetfeldes unter Verwendung eines flachen und eines spitzen Magnetpols werden die Partikel entsprechend der Magnetfeldlinien ausgerichtet und in Richtung des spitzen Magnetpols bewegt. Dabei wird durchschnittlich eine Kraft von 0,2 nN/Partikel ausgeübt.

Allgemeiner Versuchsaufbau

Mit Hilfe eines Schemas soll der Versuchsaufbau erläutert werden (Abb. 6).

Unter der Versuchsbedingung **Stress** wurden die Zellen für 30 min mit den Antikörper-gekoppelten, paramagnetischen Partikel inkubiert und dann für 15 min einem zyklischen, inhomogenen Magnetfeld ausgesetzt. Als Kontrollen bzgl. dieser verwendeten Methode wurden das **Magnetfeld**, wobei Zellen nur für 15 min dem zyklischen, inhomogenen Magnetfeld ausgesetzt werden, sowie das **Clustern** eingesetzt. Die Bezeichnung *Clustern* beruht auf der Tatsache, dass die Inkubation der adhärenenter Zellen mit den beschichteten Partikeln ein *Clustern* der Integrine in der direkten Bindungsumgebung auslöst⁸⁰. Als **Kontrolle** wurden unbehandelte Zellen verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h wurde die biologische Antwort der Zellen analysiert.

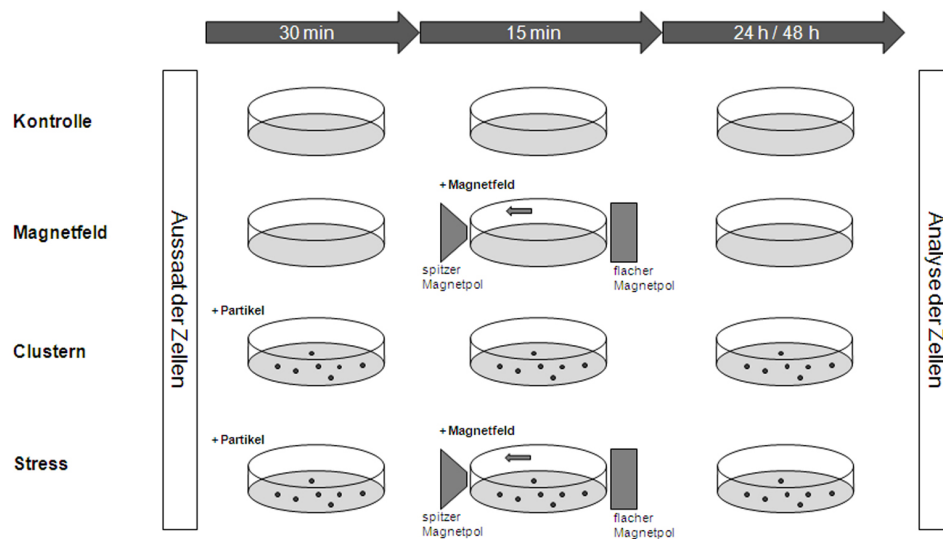


Abb. 6: **Versuchsaufbau zur mechanischen Stimulation.** Veranschaulicht wird die Versuchsbedingung Stress, bei der sowohl Partikel als auch das inhomogene Magnetfeld appliziert werden. *Clustern* bezeichnet die Inkubation der Zellen mit Partikeln sowie Magnetfeld die alleinige Applikation des Magnetfeldes. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen.

3.2.3 Assays zur Untersuchung der biologischen Antwort von MSC

a. Indirekte Zellzahlbestimmung

Der Farbstoff Kristall-Violett bindet an zelluläre DNA und wird anschließend ausgewaschen. Die Farblösung kann dann kolorimetrisch vermessen werden. Im direkten Vergleich von behandelten mit unbehandelten Zellen lässt sich somit indirekt feststellen, ob Veränderungen der Zellzahl bezogen auf die unbehandelte Kontrolle auftreten. Die Ergebnisse anderer Tests wie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase oder die metabolische Aktivität lassen sich mit Hilfe dieser Ergebnisse normieren.

Die Zellen (in Wells einer 24-Wellplatte) wurden zweimal mit PBS gewaschen und danach mit 600 μ l Isopropanol fixiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden die Zellen dreimal mit Tween/PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 300 μ l Kristall-Violett-Lösung versetzt. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei RT auf dem Schüttler. Dann wurden die Zellen solange mit Aqua dest. gewaschen bis der Überstand klar war. Das gebundene Kristall-Violett wurde mit 600 μ l 33 % Essigsäure für 10-15 min bei RT schüttelnd aus den Zellen gewaschen und anschließend wurden 210 μ l des Überstandes in ein Well einer 96-Mikrotiterplatte überführt. Die optische Dichte wurde bei $\lambda = 600$ nm mit Hilfe des Rosys Anthos 2010-Photometers gemessen.

b. Nachweis der Differenzierungsfähigkeit

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung von MSC kann sowohl die Aktivität der Alkalischen Phosphatase untersucht als auch die Mineralisierung der Zellmatrix durch die Einlagerung

von Ca^{2+} (Matrixkalzifizierung) überprüft werden. Die adipogene Differenzierungsfähigkeit der MSC wird über die Anfärbung sich entwickelnder Lipidvakuolen getestet.

Die **Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität** erfolgte mit Hilfe der Verbindung 4-Nitrophenylphosphat, die ein Substrat der Alkalischen Phosphatase darstellt und sich nach Dephosphorylierung gelb färbt. Danach folgte eine kolorimetrische Auswertung der Farbveränderung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Die Zellen wurden zweimal mit je $500 \mu\text{l}$ TBS-Puffer gewaschen und anschließend mit $250 \mu\text{l}$ Lysepuffer versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden in jedes Well 1 ml Messpuffer pipettiert und es folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von $425 \mu\text{l}$ 2 M NaOH gestoppt. $300 \mu\text{l}$ des Überstandes wurden in ein Well einer 96-Mikrotiterplatte überführt und die optische Dichte mit Hilfe des Rosys Anthos 2010-Photometers bestimmt. Anschließend wurden die Werte mit den Ergebnissen der indirekten Zellzählung mittels Kristall-Violett-Färbung normiert.

Der **Nachweis der Mineralisierung** der Zellmatrix erfolgte mit Hilfe von grün-fluoreszierendem Calcein, welches Ca^{2+} , die im Rahmen fortschreitender Mineralisierung während der osteogenen Differenzierung von MSC in die umliegende Zellmatrix eingelagert werden, komplexiert und somit eine Visualisierung ermöglicht.

Dafür wurden die Zellen mit der Calcein-Färbelösung über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Danach folgte ein Mediumwechsel mit Expansionsmedium. Die komplexierten Ca^{2+} konnten nun mit Hilfe des Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskops sichtbar gemacht werden.

Für den **Nachweis von Lipidvakuolen** wurden die in den Lipidvakuolen enthaltenen Fettsäuren mit Hilfe des lipophilen, grün-fluoreszierenden Farbstoffs Bodipy[®]493/503 angefärbt.

Die Zellen (in Wells einer 6-Wellplatte) wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit PFA (4 %) fixiert und für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS, wonach die Zellen mit $500 \mu\text{l}$ Bodipy-Färbelösung versetzt wurden. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei RT wurden die Zellen zweimal mit PBS und dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend konnten die Lipidvakuolen mit Hilfe des Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskops visualisiert werden.

c. Metabolische Aktivität

Das Cell Titer 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay stellt eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Anzahl lebender und proliferierender Zellen dar. Dabei wird eine im Assay enthaltene Tetrazolium-Komponente (MTS) durch zelluläre Dehydrogenasen in ein lösliches Formazan-Produkt umgewandelt, dessen optische Dichte bei einer Wellenlänge von

$\lambda = 490$ nm gemessen werden kann.

Um eine MTS-Arbeitslösung zu erhalten, wurde die im Assay enthaltene MTS-Lösung kurz vor Gebrauch 1:6 mit Expansionsmedium gemischt, wovon 600 μ l jeweils in ein Well einer 24-Wellplatte gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurden 300 μ l in ein Well einer 96-Mikrotiterplatte überführt und die optische Dichte mit Hilfe des Rosys Anthos 2010-Photometers bestimmt, wobei der bei $\lambda = 630$ nm gemessene Hintergrund vom Messwert abgezogen wurde. Anschließend wurden die Werte mit den Messergebnissen der indirekten Zellzählung durch die Kristall-Violett-Färbung normiert.

d. Zellvitalität

Die Zellvitalität der MSC wurde mit Hilfe eines sog. Live-Dead-Assays bestimmt, mit dem zwischen lebenden und apoptotischen Zellen unterschieden werden kann. Lebende Zellen setzen die Verbindung Calcein-AM durch ihre intrazelluläre Esterase-Aktivität in das grün-fluoreszierende Calcein um. Die DNA-Interkalanz Propidiumjodid (rot-fluoreszierend) ist in lebenden Zellen nicht membrangängig und kann sich daher nur in die DNA bereits apoptotischer Zellen mit beschädigter Zellmembran einlagern. Der Kernfarbstoff Hoechst 33342 (blau-fluoreszierend) ist über die Zellmembran permeabel und kann Kerne sowohl lebender als auch apoptotischer Zellen anfärben.

Die Zellen wurden mit 100 μ l Propidiumjodid-Lösung versetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen und es wurden 100 μ l Calcein-Hoechst-Lösung auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37 °C wurde die Lösung gegen Expansionsmedium ausgetauscht. Die Zellen konnten nun mit Hilfe des Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskops betrachtet werden.

e. Bestimmung morphometrischer Parameter (Größe, Form und Orientierung)

Als morphometrische Parameter zellulärer Komponenten wurden u.a. die Größe bzw. die Form über die Fläche bzw. einen Formfaktor bestimmt. Die Zellen wurden mit Hilfe des Membranfarbstoffs PKH 26, Zellkerne mit Hoechst 33342 und Fokalkontakte mittels Immunofluoreszenz angefärbt. Der Formfaktor, der eine Aussage u.a. über die Zellform erlaubt, wurde mit der Formel $4\pi \cdot \text{Fläche} / \text{Umfang}^2$ berechnet. Der maximale Wert des Formfaktors beträgt 1 und entspricht damit einer Kreisform. Je kleiner der Wert des Formfaktors ist, desto mehr weicht die zu beschreibende Struktur von einer runden Form ab und nimmt eine polygonale bzw. elongierte Form an. Für die Analyse der Orientierung von Zellen und Zellkernen wurde der Winkel zwischen der zellulären bzw. nukleären Längsachse und einer horizontalen Kontrolllinie bestimmt. Alle Untersuchungen wurden mit Hilfe der Bildverarbeitungs-Software ImageJ 1.44p (*National Institutes of Health*, USA) durchgeführt.

3.2.4 Durchflusszytometrie

Prinzip

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften zu analysieren¹²¹. Interagiert eine Zelle mit einem einfallenden Lichtstrahl, so führt dies zu einer Richtungsänderung des Lichts in Abhängigkeit von Zelleigenschaften wie Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazellulären Bestandteilen. Der größte Anteil des Lichts wird in die Vorwärtsrichtung gestreut und wird daher auch als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* (FSC)) bezeichnet, was ein Maß für die Zellgröße darstellt. Wird dagegen das Licht im rechten Winkel zur Einfallsrichtung gestreut, so handelt es sich um Seitwärtsstreulicht (*side scatter* (SSC)) und ist ein Maß für die intrazelluläre Granularität. Anhand dieser beiden Parameter ist bereits die Identifikation verschiedener Zellpopulationen wie Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten möglich¹²¹. Für die Analyse der Fluoreszenzeigenschaften werden z.B. Fluoreszenz-markierte Antikörper über eine spezifische Epitoperkennung an Oberflächenstrukturen der Zellen angebunden, wobei jedes Fluorochrom nach Anregung durch monochromatisches Licht ein spezifisches Muster an Wellenlängen emittiert. Als Fluorochrome werden hier das grün-fluoreszierende FITC (Fluoresceinisothiocyanat) bzw. das rot-fluoreszierende PE (Phycoerythrin) eingesetzt, die mit Hilfe eines Argon-Lasers ($\lambda = 488 \text{ nm}$) angeregt werden. Das emittierte Licht wird über ein Detektorsystem gemessen, in digitale Signale umgewandelt und als Fluoreszenzintensität ausgegeben. Während der Messung werden die Zellen hydrodynamisch fokussiert. Dazu werden die Zellen aus dem Probenröhrchen über Druckluft in eine Kapillare angesaugt, an deren sich verjüngendem Ende sich eine Quarzküvette befindet. Am Eingang zur Quarzküvette werden die Zellen von einer Mantelflüssigkeit (Sheath Fluid) umspült, wobei eine wirbelfreie Strömung zwischen dem fokussierten Probenstrahl und der Mantelflüssigkeit gewährleistet ist. Die vereinzelt Zellen können nun präzise durch den Fokus des Laser-basierten Detektionssystems geführt werden. Da sich nach der Zellpräparation auch Zelltrümmer in der Suspension befinden können, die über andere Streulichteigenschaften verfügen, sind diese im sog. *dot plot* (zweidimensionale Darstellung von FSC und SSC) eindeutig zu identifizieren. Die MSC-Population kann nun gezielt durch das Setzen eines *gate* im *dot plot* ausgewählt werden. Bei jeder Probe werden innerhalb des definierten *gate* 10.000 Zellen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die gemessene Fluoreszenz kann entweder über ein Histogramm (Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zellzahl (*counts*)) dargestellt als auch der Median der Fluoreszenzintensität kalkuliert werden. Zur Einordnung der Proben-spezifischen Fluoreszenzintensität müssen für jede Messung Negativkontrollen mitgeführt werden, um die Eigenfluoreszenz der Zellen und die unspezifische Anbindung von Antikörpern zu bestimmen. Dafür werden z.B. Antikörper gegen Maus-IgG verwendet, die unspezifisch an die Oberfläche humaner Zellen binden (IgG-Kontrolle). Wird die Expression des Antigens gemeinsam mit der Expression der IgG-Kontrolle in einem Histogramm

dargestellt, werden automatisch die gemessenen *counts* auf die maximalen *counts* normiert und als *% of max counts* dargestellt.

Die Durchflusszytometrie wurde am BD FACSCalibur Flow Cytometer durchgeführt und die Auswertung der Messergebnisse mit der FlowJo-Software Version 5.7.2 (Tree Star, Ashland, OR, USA) vorgenommen.

Präparation

In jedes 5 ml Polysterene Round Bottom Tube wurden 100.000 Zellen pipettiert und mit 1 ml PBS versetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 1.500 rpm wurde der Überstand abgesaugt und es folgte nochmals eine Waschung des Pellets mit 1 ml PBS inkl. anschließender Zentrifugation. Im Anschluß wurde das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit einem primären Antikörper von 45 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen und mit dem sekundären Antikörper in entsprechender Verdünnung versetzt. Die Zellen wurden mit einem sekundären Antikörper für 45 min bei 4 °C inkubiert, letztmalig mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 500 µl BD CellFixTM (1x) aufgenommen. Bis zur Messung konnten die Proben max. eine Woche bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.2.5 Real-Time quantitative PCR

Prinzip

Die Real-Time quantitative PCR stellt eine DNA-Verfielfältigungsmethode beruhend auf dem Prinzip der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) dar, die gleichzeitig eine Quantifizierung der PCR-Produkte in Echt-Zeit ermöglicht¹²⁰. Ein PCR-Zyklus läuft in der Regel in drei Schritten ab. Im Denaturierungsschritt werden die DNA-Stränge voneinander getrennt, damit während der Primerhybridisierung (*annealing*) die Primer an komplementäre Sequenzen der DNA binden können. In der Elongationsphase synthetisiert die DNA-Polymerase den fehlenden, komplementären DNA-Strang beginnend am 3'-Ende des Primers mit Hilfe freier Nukleotide. Mit jedem weiteren Zyklus steigt die Anzahl der PCR-Produkte exponentiell an. Da als Matrize bereits prozessierte, Intron-freie mRNA eingesetzt werden soll, muss diese zuerst mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert werden. Dafür werden sog. *random primer* bestehend aus zufällig zusammengesetzten Nukleotiden benutzt. Die ursprünglichen RNA-Stränge werden unter Verwendung einer Ribonuklease hydrolysiert und abgebaut.

Für die Real-Time quantitative PCR wurde ein TaqMan[®] Gene Expression Assay verwendet,

welches spezifische TaqMan[®] MGB-Sonden/Primerpaare enthält (Tab. 8). Eine TaqMan[®] MGB-Sonde ist ein Oligonukleotid, welches am 5'-Ende ein fluoreszierendes Reportermolekül (FAM (6-Carboxyfluorescein)) und am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher besitzt. Wird das Reportermolekül einer intakten Sonde durch eine Lichtquelle angeregt, so überträgt es seine Energie nach dem FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-Prinzip an den nahestehenden, allerdings nicht-fluoreszierenden Quencher¹²⁰. Da die Sonde innerhalb einer DNA-Region bindet, die durch das Primerpaar mit Hilfe der AmpliTaq Gold[®] DNA-Polymerase amplifiziert wird, stößt die DNA-Polymerase während der Elongation des komplementären DNA-Stranges auf die Sonde, die auf Grund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase hydrolysiert und abgebaut wird. Dadurch entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und die Reporterfluoreszenz kann nach Anregung detektiert werden. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals ist also nur dann möglich, wenn die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und die Amplifikation mit Hilfe einer DNA-Polymerase inkl. 5'-3'-Exonukleaseaktivität stattfindet. Damit ist gewährleistet, dass keine unspezifische Amplifikation am Ende der Elongationsphase in jedem Zyklus gemessen wird. Die detektierte Fluoreszenz ist proportional zur Freisetzung des Fluorophors und damit zur Menge der amplifizierten DNA-Region.

Um Fluktuationen des Fluoreszenzsignales, die auf Grund von kleinen Konzentrations- oder Volumina-Abweichungen entstehen können, zu korrigieren, wird ROX[™] (6-Carboxy-X-rhodamin) als passiver Referenzfarbstoff zur Normalisierung eingesetzt. Dabei wird die Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes durch die Emissionsintensität des Referenzfarbstoffes geteilt und man erhält das normalisierte Reportersignal (R_n). Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz spricht man von ΔR_n . Da eine korrekte Quantifizierung nur während der exponentiellen Phase stattfinden kann, wird deren Anfang mit Hilfe eines Ct-Wertes (*cycle threshold*) definiert, der anzeigt, in welchem Zyklus die Fluoreszenz das erste Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Für die Methode der relativen Quantifizierung findet sowohl die Normalisierung der Ergebnisse mit Hilfe einer internen Kontrolle als auch mit einem Kalibrator statt. Eine interne Kontrolle in Form eines Referenzgens ist idealerweise leicht zu detektieren sowie sollte dessen Expression nicht unter experimentellen Bedingungen variieren. Als Referenzgen wurde hier GAPDH verwendet sowie als Kalibrator eine unbehandelte Kontrolle eingesetzt.

Die Kalkulierung des Ergebnisses erfolgt schrittweise mit Hilfe folgender Gleichungen:

1. $\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Referenzgen})$
2. $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t(\text{Probe}) - \Delta C_t(\text{Kalibrator})$
3. Ergebnis = $2^{-\Delta \Delta C_t}$

Die Messungen wurden mit dem ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Wilmington, NC, USA) durchgeführt und die Ergebnisse mit Hilfe der 7000 System SDS Software Version 1.4 (Applied Biosystems) kalkuliert.

Präparation

RNA-Isolierung: Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des NucleoSpin[®] RNA II durchgeführt. Die Zellen (in Wells einer 96-Wellplatte) wurden im ersten Schritt mit 88 µl Lysepuffer (1 % β-Mercaptoethanol in RA1-Puffer) versetzt und lysiert. Anschließend wurde das Lysat von 4 Wells zusammengeführt, auf den NucleoSpin[®]-Filter gegeben und bei 11.000 rcf für 1 min zentrifugiert. Das gefilterte Lysat befand sich nun im unteren Gefäß und wurde mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt. Das Lysat-Ethanol-Gemisch wurde anschließend auf eine NucleoSpin[®] RNAII-Säule überführt und für 30 s bei 8.000 rcf zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Es wurden 350 µl MDB-Puffer auf den Filter pipettiert und anschließend bei 11.000 rcf für 1 min zentrifugiert. Im nachfolgenden Schritt wurde vorhandene DNA verdaut. Dafür wurden 95 µl DNase-Reaktionsmix (10 % DNase I (v/v) in DNase-Reaktionspuffer) auf den Filter pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit 200 µl RA2-Puffer, 600 µl RA3-Puffer und 250 µl RA3-Puffer gewaschen, wobei jeweils nach einem Zentrifugationsschritt der Durchfluss entfernt wurde. Zum Schluss wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA mit 35 µl Wasser bei 11.000 rcf eluiert.

Messung der RNA-Konzentration: Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000-Spektrometers gemessen. Dazu benötigt man nur 1 µl der RNA-haltigen Lösung, die auf den Detektor des Gerätes aufgebracht wird. Die Flüssigkeit wird angesaugt und analysiert. Nach Bestimmung der Adsorption wird mittels Beer-Lambert-Gleichung die RNA quantifiziert. Zur Kalibrierung des Gerätes benötigt man nur die Flüssigkeit, in der die RNA eluiert wurde. Die RNA-Konzentration wird in ng/µl angegeben.

cDNA-Synthese: Es wurden jeweils 150 ng RNA eingesetzt und mit Wasser auf ein finales Volumen von 20 µl verdünnt. Dann wurden 2 µl Random Primer ($c_f = 2,5 \mu\text{M}$) und 2 µl dNTP's ($c_f = 0,5 \text{ mM}$) hinzu pipettiert und alles gut gemischt. Es folgte eine Inkubation von 5 min bei 65 °C im MyCycler-Thermal Cycler. Danach wurden die Proben auf Eis herunter gekühlt. Zu jeder Probe wurden dann 2 µl SuperScript[™] II Reverse Transcriptase (final: 100 Einheiten/µl), 8 µl First-Strand Buffer (final: 1x), 4 µl 0,1 M DTT ($c_f = 10 \text{ mM}$) und 2 µl RNase OUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor (final: 2 Einheiten/µl) pipettiert. Die Proben wurden im MyCycler-Thermal Cycler mit folgendem Programm behandelt (Tab. 11).

Real-Time quantitative PCR: Der gesamte 40 µl cDNA-Ansatz wurde mit 60 µl Wasser verdünnt, wobei pro Ansatz 4 µl der verdünnten cDNA eingesetzt wurden. Dazu wurden 10 µl TaqMan[®] Universal PCR Mastermix, 1 µl des jeweiligen Primer/Sondenpaars und 5 µl Wasser in eine MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate pipettiert und die Platte mit einem MicroAmp Optical Adhesive Film verschlossen. Die Platte wurde kurz geschüttelt, um eine Mischung der cDNA mit dem Mastermix-Gemisch zu gewährleisten, und anschließend sehr kurz zentrifugiert.

Tab. 11: **Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese**

Schritt	Temperatur	Dauer
1	25 °C	10 min
2	42 °C	50 min
3	70 °C	15 min
4	4 °C	∞

Die Proben wurden mit dem in Tab. 12 dargestellten Programm behandelt.

Tab. 12: **Programm für die Real-Time quantitative PCR**

Nr.	Zyklen	Temperatur	Dauer	Funktion
1	1	90 °C	10 min	Aktivierung der AmpliTaq Gold [®] DNA-Polymerase
2	40	90 °C	15 s	Denaturierung
3	40	60 °C	1 min	kombiniertes <i>annealing</i> und Elongation

3.2.6 Bio-Plex Suspension Array System

Prinzip

Das verwendete Bio-Plex 200 Suspension Array System beruht auf der Luminex-xMAPTM-Technologie, die es erlaubt bis zu 100 Analyten simultan in einer Probe zu quantifizieren. Die Grundlage dieser Technologie stellen kleine sphärische Polystyrolpartikel (Mikrosphären) dar, in die zwei Fluoreszenzfarbstoffe inkorporiert sind. Durch die gezielte Kombination beider Farbstoffe lassen sich 100 spektral unterscheidbare Schattierungen herstellen, wobei jede Schattierung einer Population von Mikrosphären entspricht. Der Nachweis über die Anbindung des Analyten an die Mikrosphären erfolgt über ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltes Detektionsmolekül (Reporter), dessen Intensität des emittierten Lichtes proportional zur gebundenen Analytenmenge ist. Die Analyse der Mikrosphären basiert auf der Methode der Durchflussszytometrie, wobei die Klassifizierung der Mikrosphären durch eine Laserdiode ($\lambda = 633 \text{ nm}$) und die Quantifizierung des Analyten durch einen Yttrium-Argon-Festkörperlaser ($\lambda = 532 \text{ nm}$) erfolgt. Das emittierte Licht wird über Photodioden (Klassifizierung) bzw. einen Photomultiplier (Quantifizierung) empfangen und im Analysegerät digitalisiert.

Alle Auswertungen der Messergebnisse erfolgen mittels Bio-Plex Manager Software 4.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Herkules, CA, USA).

Präparation

Detektion von VEGF: Als Proben wurden Medienüberstände der Zellen eingesetzt und durch die Zentrifugation bei 13.200 rpm und 4 °C für 10 min von Zelltrümmern und Partikeln befreit. Für die Detektion von VEGF wurden das Bio-Plex Pro Reagent Kit sowie das Bio-Plex Pro human Cytokine VEGF Set entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde mit Hilfe des Bio-Plex Human Cytokine Standards Group I eine 8-teilige Verdünnungsreihe erstellt, wobei der lyophilisierte Standard in DMEM resuspendiert wurde und jeweils 50 µl des vorherigen Standards in 150 µl Verdünnungspuffer pipettiert wurden. Der Verdünnungspuffer dient zur Bestimmung des Leerwertes.

Die benötigte Anzahl an Wells der mitgelieferten 96-Mikrotiterplatte werden zweimal mit jeweils 100 µl Assay-Puffer gewaschen. Danach wurden 50 µl der Mikrosphären-Lösung in die Wells pipettiert und die Flüssigkeit abgesaugt. Die Mikrosphären wurden anschließend zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 50 µl der Proben bzw. die vorgemischten Standards der Verdünnungsreihe in Duplikaten in die Wells pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde aufgeschüttelt und für 30 min bei RT und mit 300 rpm inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Mikrosphären wurden dreimal mit 100 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 25 µl Detektionsantikörper für 30 min bei RT und mit 300 rpm. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Mikrosphären dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Mikrosphären mit 50 µl Streptavidin-PE für 10 min bei RT und mit 300 rpm sowie eine dreimalige Waschung der Mikrosphären mit 100 µl Waschpuffer. Zur Messung wurden die Mikrosphären mit 125 µl Assay-Puffer versetzt. Die VEGF-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe einer Standard-Verdünnungsreihe ermittelt.

Detektion von p-ERK und p-AKT: Die Zellen (in Wells einer 96-Wellplatte) wurden mit Hilfe des Cell Lysis Kits lysiert. Dafür wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 25 µl Lysepuffer versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellysate jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für einen vollständigen Aufschluss der Zellen wurden die Proben für 30 min auf Eis geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand über dem Pellet (Direktlysate) abgenommen. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Direktlysate wurde mit Hilfe des Pierce 660 nm Protein Assays durchgeführt. Dafür wurde das Direktlysate in der entsprechenden Assay-Lösung 1:7,5 verdünnt und für 5 min bei RT im Dunklen inkubiert, wobei der Ansatz in Duplikaten und inkl. eines Leerwertes (Lysepuffer in Assay-Lösung) erfolgte. Die optische Dichte der Proben wurde mittels NanoDrop 1000-Spektrometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 660$ nm gemessen, woraus mit Hilfe einer Standardkurve der Proteingehalt errechnet werden konnte. Es wurden jeweils 4,5 µg Protein pro Probe für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt.

Für die Detektion wurde das Bio-Plex Phosphoprotein Detection Reagent Kit verwendet. Die

phosphorylierten Proteine wurden mittels Bio-Plex Phospho Erk 1/2 (Thr202/Tyr204, Thr185/Tyr187) Assay und Bio-Plex Phospho Akt (S473) Assay nachgewiesen sowie der totale Proteingehalt mittels Bio-Plex Total Akt Assay sowie Bio-Plex Total Erk 1/2 Assay bestimmt. Alle Kits und Assays wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Detektion des Gehalts an Totalprotein nicht zeitgleich mit der Detektion der Phospho-Proteine erfolgen konnte und deshalb unter Benutzung desselben Protokolls separat in einem zweiten Ansatz durchgeführt werden musste.

Zunächst wurden die benötigten Wells der mitgelieferten 96-Mikrotiterplatte zweimal mit jeweils 100 μ l Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 50 μ l der Mikrosphären-Lösung in die Wells pipettiert und die Flüssigkeit abgesaugt. Die Mikrosphären wurden anschließend zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Die auf 50 μ l mit Assay-Puffer verdünnten Proben sowie die vom Hersteller mitgelieferten Kontrolllysate wurden in Duplikaten in Wells pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde aufgeschüttelt und über Nacht bei RT und mit 300 rpm inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Mikrosphären dreimal mit 100 μ l Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 25 μ l Detektionsantikörper für 30 min bei RT und mit 300 rpm. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Mikrosphären dreimal mit Waschpuffer gespült. Danach erfolgte die Inkubation der Mikrosphären mit 50 μ l Streptavidin-PE (10 min, RT, 300 rpm) sowie eine dreimalige Waschung der Mikrosphären mit 100 μ l Resuspensions-Puffer. Zur Messung werden die Mikrosphären mit 125 μ l Resuspensionspuffer versetzt. Ob die Präparation im Allgemeinen erfolgreich war, wurde durch ein positives Messergebnis der Kontrolllysate ermittelt. Im letzten Schritt wurden die Ergebnisse der Phospho-Protein-Messung mit den Ergebnissen der Messung des totalen Proteingehaltes normiert.

3.2.7 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Prinzip

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie beruht auf der Bündelung, des von einer Probe emittierten oder reflektierten Lichts in einer einzigen Ebene (Fokalebene)⁸². Sämtliches Licht, das nicht aus der Fokalebene stammt, wird nicht berücksichtigt.

Das Leica TCS SP2 AOBS zählt zu den konfokalen Laser-Scanning Mikroskopen und verwendet einen Punktscanner, bei dem der Laserstrahl auf einen einzelnen Punkt der Probe (Fokalfunkt) fokussiert und anschließend die feststehende Probe Punkt für Punkt abgerastert (Laser-Scanning) wird. Danach wird das vom Fokalfunkt emittierte Licht auf einen zweiten Punkt (Konfokalfunkt) fokussiert, wobei es zuerst eine Öffnung, das sog. *pinhole*, passieren muss, um zum Detektor (lichtempfindliche Photodiode) zu gelangen⁸². Außerfokales Licht oberhalb oder unterhalb der Fokalebene wird somit von der Detektion durch den Punktdetektor ausgeschlossen. Ein vollständiges Bild einer Fokalebene kann erst durch die Verrechnung aller Bildpunkte

konstruiert werden. Die Fokalebene kann nicht nur in der konventionellen xy-Ebene liegen, sondern es sind ebenfalls Aufnahmen der xz- oder yz-Ebene möglich. Werden mehrere Fokalebenen mit definiertem Abstand nacheinander aufgenommen, ist auch eine 3D-Darstellung der Probe generierbar.

Als Alternative zu herkömmlichen Fluorophoren wie FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder PE (Phycoerythrin) werden nun verstärkt Alexa Fluor[®]-Farbstoffe eingesetzt, die sich durch sehr intensive Fluoreszenz-Emission, hohe Photostabilität, pH-Insensitivität sowie sehr gute Wasserlöslichkeit auszeichnen. Mittlerweile wird durch diese Farbstoffe ein breites Spektrum von Exzitations- und Emissions-Wellenlängen abgedeckt vom Ultraviolett- bis Infrarot-Bereich. Die alphanumerische Namensgebung der individuellen Farbstoffe entspricht der spezifischen Anregungswellenlänge. So kann z.B. Alexa Fluor[®] 488 mit der Wellenlänge $\lambda = 488$ nm des Argonlasers angeregt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie mit Alexa Fluor[®]-Farbstoffen konjugierte sekundäre Antikörper bzw. Phalloidin verwendet.

Präparation

Die **Färbung zellulärer Strukturen** erfolgte gemäß Färbeprotokoll für die Immunfluoreszenzmikroskopie (Tab. 13). Dabei wurden die sekundären Antikörper (Tab. 5) gemäß der Spezies des primären Antikörpers gewählt sowie entsprechende Farbstoffkombinationen bei Doppelfluoreszenz-Färbungen eingesetzt. Alle Antikörperverdünnungen wurden gemäß den Angaben (Tab. 4 und Tab. 5) in PBS an- und eingesetzt. Sollte ebenfalls das Aktin-Zytoskelett visualisiert werden, so erfolgte die Zugabe von Phalloidin-Alexa Fluor[®] 546 in die Färbelösung des sekundären Antikörpers in einer finalen 1:100-Verdünnung.

Die **Anfärbung der Fibronektin-Streifen** setzte gemäß Färbeprotokoll (Tab. 13) erst mit Schritt 5 ein, allerdings betrug die Inkubationszeit des primären Antikörpers (anti-Fibronektin) nur 30 min.

Für die **Färbung der Zellmembran** wurde das PKH 26 Red Fluorescent General Cell Linker Kit verwendet, deren Farbstoff sich in die Lipidregionen der Zellmembran einlagert. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 248 μ l Diluent C mit 2 μ l Farbstoff versetzt. Es wurden 500.000 Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Die Zellen wurden in 250 μ l Diluent C aufgenommen und anschließend mit 250 μ l Färbelösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C im Brutschrank wurde die Reaktion durch einminütige Inkubation mit 500 μ l FKS bei RT abgestoppt. Die Zellsuspension wurde mit 1 ml DMEM versetzt und dann zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml PBS

Tab. 13: Färbeprotokoll für Immunofluoreszenzmikroskopie

Nr.	Schritt	Reagenz	Dauer bzw. Zyklen
1	Waschen	PBS	2x
2	Fixierung	PFA (4 %)	10 min
3	Waschen	PBS	2x
4	Permeabilisierung	Triton X-100 (0,1 %)	10 min
5	Waschen	PBS	2x
6	Färbung	primärer Antikörper	4 h
7	Waschen	PBS	2x
8	Färbung	sekundärer Antikörper	30 min
9	Waschen	PBS	1x
10	Waschen	Aqua dest.	1x
11	Einbetten	Einbettmedium	über Nacht

gewaschen und anschließend in 2 ml DMEM aufgenommen. FlexiPERM con A-Ringe mit einem Innendurchmesser von 12 mm wurden auf runde Deckgläser (\varnothing 15 mm) gesetzt und anschließend 3.000 PKH 26-gefärbte Zellen pro Ring in Expansionsmedium darauf ausgesät. 15 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die Ringe abgenommen und es folgte eine Kernfärbung mit Hoechst.

Die **Kernfärbung** unfixierter Zellen erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation der Zellen mit einer Hoechst 33342-Färbelösung.

3.2.8 Weitere mikroskopische Untersuchungen

Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FE-SEM)

Die Messungen am Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop wurden von Frau Dipl.-Ing. R. Lange (Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Universität Rostock) an einem SUPRA 25 GEMINI FE-SEM mit EDX-System QUANTAX/Xflash (Bruker AXS & Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

Präparation Auf einem Titanplättchen wurden 24 h vor Versuchsbeginn Zellen ausgesät und entsprechend den jeweils angegebenen Versuchsbedingungen behandelt. Es folgte die Fixierung der Zellen mit 4 % PFA für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen über eine Ethanolreihe (Tab. 14) dehydriert, wobei jeder Dehydrierungsschritt 20 min andauerte.

Tab. 14: **Ethanolreihe zur schrittweisen Zelledehydrierung**

Schritt	Anzahl	Reagenz
1	1x	70 % Ethanol
2	2x	80 % Ethanol
3	2x	90 % Ethanol
4	1x	96 % Ethanol
5	2x	Ethanol absolut

Rasterkraftmikroskopie

Die Messungen zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls von Adhäsionsmatrizes wurden mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie von Herrn Dr. P. Elter (Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Universität Rostock) an einem NanoWizard[®] II (JPK Instruments, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Für die Kalibrierung des optischen Hebels wurde ein unbehandeltes Deckglas (#3, Ø 15 mm) verwendet, wodurch das Elastizitätsmodul der Glasoberfläche als unendlich groß definiert werden musste.

3.2.9 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit der SPSS 15.0 Software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Daten wurden zuerst mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung untersucht.

Bei $p = 0,200$ besteht eine echte Signifikanz und die Daten sind normalverteilt. In diesem Fall wurden die Daten mittels t-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Die Darstellung normalverteilter Daten im Diagramm erfolgte durch Angabe des Mittelwertes mit Standardabweichung bzw. Standardfehler (SEM).

Wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test ein $p < 0,200$ ermittelt, waren die Daten nicht normalverteilt und mussten demzufolge mit Hilfe nichtparametrischer Tests auf signifikante Unterschiede getestet werden. Wurde für eine Datengruppe mittels Kruskal-Wallis-Tests ein Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ erreicht, so folgte die Untersuchung der Daten mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests. Die Darstellung nicht normalverteilter Daten im Diagramm erfolgte durch Angabe des Medians mit 25. und 75. Perzentile oder im *box plot* mit zusätzlicher 5. und 95. Perzentile.

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Signifikanzlevel verwendet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen (MSC)

Zu Beginn wurden die isolierten mesenchymalen Stammzellen sowohl hinsichtlich der Einhaltung der Minimalkriterien zur Charakterisierung von MSC als auch der Expression verschiedener Zelladhäsionsrezeptoren untersucht.

4.1.1 Minimalkriterien der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie

Für die Charakterisierung der MSC nach den Minimalkriterien der ISCT wurden das Adhärenzverhalten der Zellen auf Plastik (Polystyrol (TCP)), die Expression definierter Oberflächenantigene und das Differenzierungspotential getestet⁴³.

Adhärenz auf Plastik

Das erste Kriterium stellt die Adhärenz der MSC auf Plastik dar (Abb. 7).

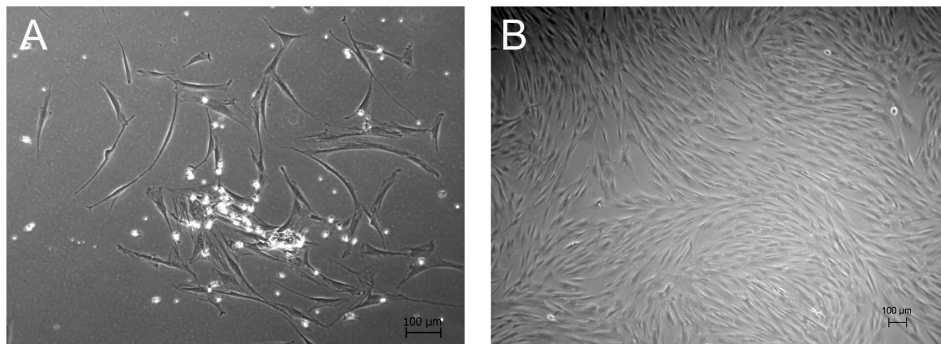


Abb. 7: **Adhärenz mesenchymaler Stammzellen auf Plastik.** Dargestellt sind aus dem Knochenmark isolierte mesenchymale Stammzellen (A) in Passage 0 und (B) als subkonfluente Kultur (Axiovert-Mikroskop).

Bereits innerhalb weniger Tage nach Isolierung waren Zellen auf Plastik adhären (Passage 0). Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Subkonfluenz kultiviert, bevor sie vereinzelt wurden und damit eine höhere Passage erreichten.

Expression von Oberflächenantigenen

Damit eine Zellpopulation nach den Minimalkriterien der ISCT als positiv bzw. negativ für einen Oberflächenmarker gelten kann, muss bzw. darf die Population nur einen bestimmten Anteil positiver Zellen enthalten, der sich nach dem jeweiligen Oberflächenmarker richtet (Tab. 1). Mittels Durchflusszytometrie wurden die isolierten mesenchymalen Stammzellen auf die positive

Expression von CD73, CD90 und CD105 sowie die negative Expression von CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR getestet (Abb. 8).

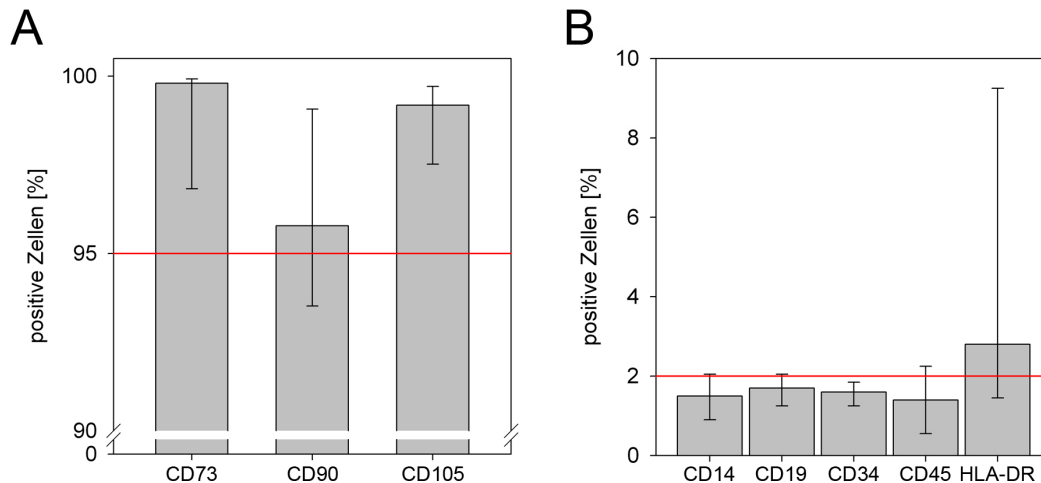


Abb. 8: **Expression von Oberflächenantigenen zur Charakterisierung der MSC.** Dargestellt ist jeweils der Anteil positiver Zellen der Gesamtpopulation für die Oberflächenantigene, der für (A) CD73, CD90 und CD105 bei 95 % bzw. für (B) CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR bei 2 % liegt. Die rote Linie kennzeichnet jeweils die laut ISCT zulässigen Maximalwerte (n=5, Median mit 25./75. Perzentile).

Der Anteil positiver Zellen für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 lag bei $\geq 95\%$ bzw. für CD14, CD19, CD34 und CD45 bei $\leq 2\%$. Für das Oberflächenantigen HLA-DR wurde ein Anteil positiver Zellen über 2 % bestimmt. Dabei konnte von den 5 untersuchten Zellpräparationen nur für eine Präparation eine negative Expression festgestellt werden, bei allen anderen Präparationen überstieg der Anteil positiver Zellen deutlich die Grenze von 2 %.

Differenzierungspotenzial *in vitro*

Das dritte Kriterium umfasst den Nachweis der Differenzierung in Zelltypen des Mesenchyms über spezifische Färbungen von *in vitro* Kulturen. Dafür wurden die Zellen mit entsprechenden Differenzierungsmedien stimuliert.

Osteogene Differenzierung

Die Untersuchung der osteogenen Differenzierung erfolgte nach 28-tägiger Stimulierung der Zellen mit einem osteogenen Differenzierungsmedium. Dafür wurden Ca^{2+} , die im Rahmen fortschreitender Mineralisierung während der osteogenen Differenzierung von MSC in die umliegende Zellmatrix eingelagert werden, durch Calcein komplexiert und visualisiert (Abb. 9).

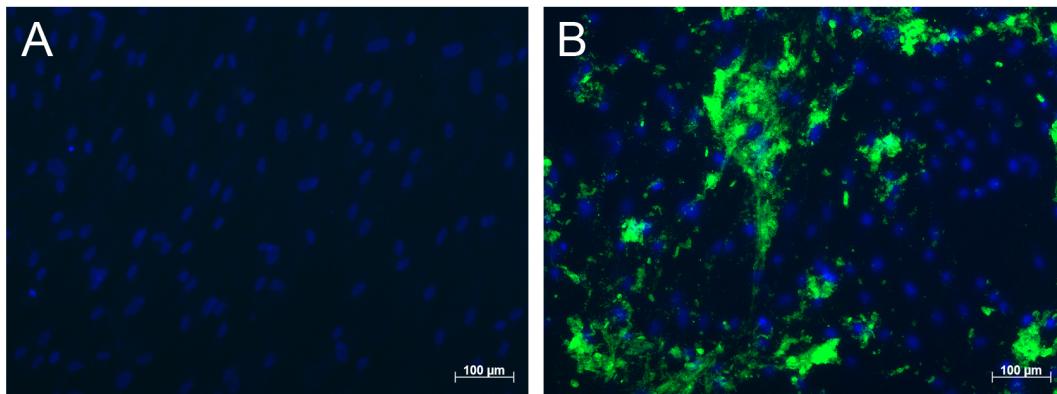


Abb. 9: **Osteogene Differenzierungsfähigkeit der MSC.** Dargestellt ist nach 28-tägiger Inkubationszeit eine (A) unstimulierte bzw. (B) osteogen stimulierte Zellkultur. Der Nachweis der kalzifizierten Zellmatrix erfolgte mit Hilfe von Calcein (grün) sowie die Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau) (Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskop).

Die Kalzifizierung der Matrix konnte hier nur in der Zellkultur nachgewiesen werden, die über 4 Wochen osteogen stimuliert wurde. Nach 4 Wochen konnte in der Zellkultur unter unstimulierten Kultivierungsbedingungen keine Einlagerung von Ca^{2+} in die umliegende Matrix detektiert werden.

Adipogene Differenzierung

Für den Nachweis der adipogenen Differenzierungsfähigkeit wurden die Zellen alternierend mit adipogenem Induktions- bzw. Erhaltungsmedium über einen Zeitraum von 21 d stimuliert. Die in Lipidvakuolen enthaltenen Fettsäuren wurden anschließend mit Hilfe des lipophilen Farbstoffs Bodipy[®] 493/503 angefärbt (Abb. 10).

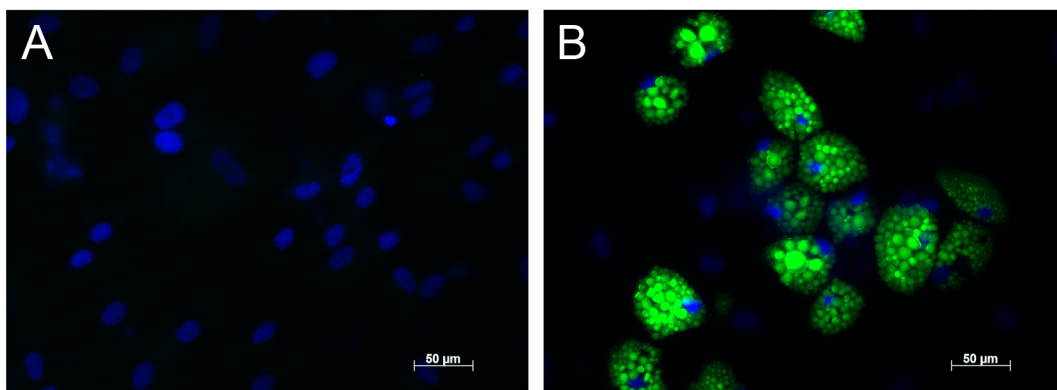


Abb. 10: **Adipogene Differenzierungsfähigkeit der MSC.** Dargestellt sind nach 21-tägiger Inkubationszeit (A) unstimulierte und (B) adipogen stimulierte Zellen. Der Nachweis der Lipidvakuolen erfolgte mit Bodipy[®] 493/503 (grün) sowie die Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau) (Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskop).

Nur unter adipogenen Differenzierungsbedingungen bildeten sich in den MSC Lipidvakuolen, die unstimulierten Zellen zeigten keinerlei Lipidvakuolenbildung.

4.1.2 Expression von Zelladhäsionsrezeptoren

Da die Methode zur mechanischen Stimulierung die Bindung paramagnetischer Partikel an die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit einschließt sowie Fibronektin und lineare RGD-Peptide als Integrin-vermittelnde Adhäsionssubstrate eingesetzt wurden, sollte zur weiteren Charakterisierung der MSC die Expression verschiedener Integrin-Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 1$ -6, αV) und die CD44-Expression mittels Durchflusszytometrie überprüft werden (Abb. 11).

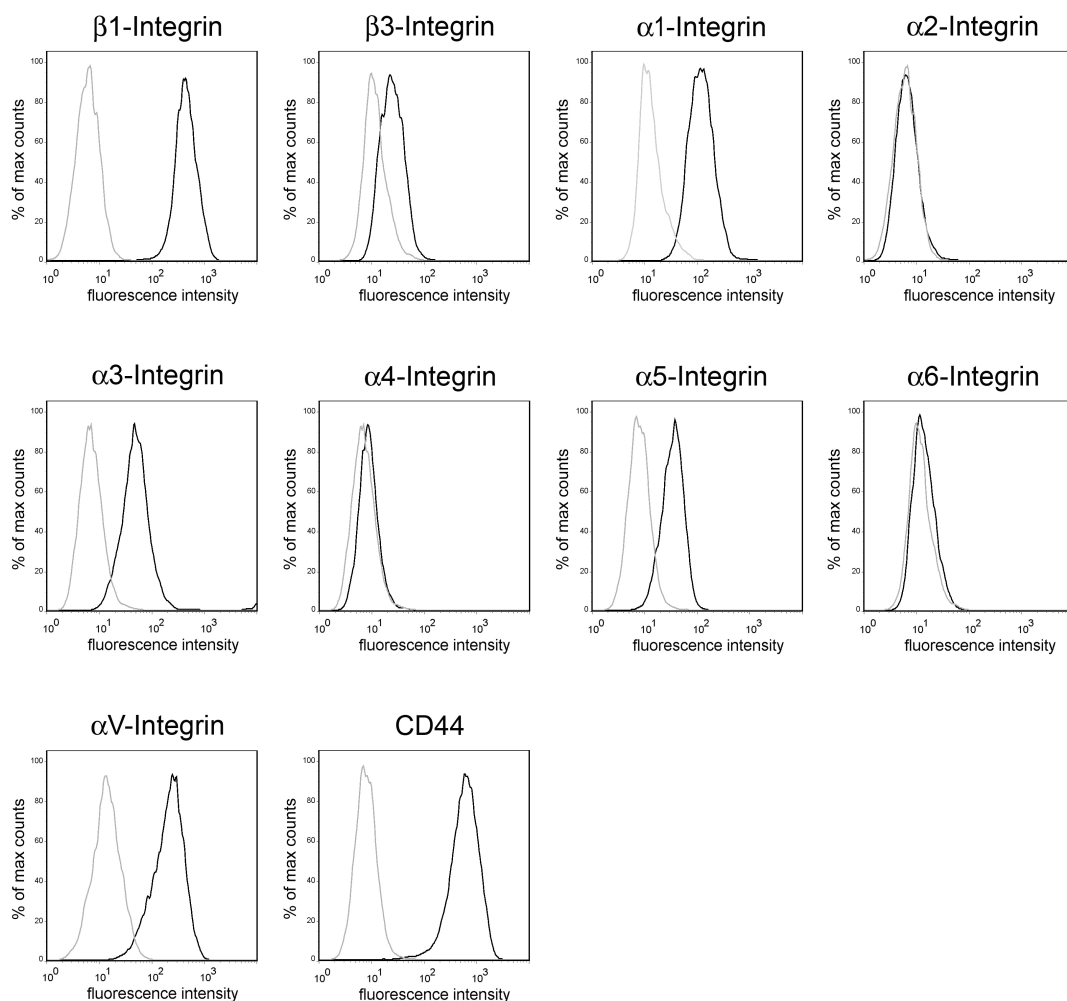


Abb. 11: **Expression von Adhäsionsrezeptoren.** Dargestellt ist die Expression der Integrin-Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 1$ -6 und αV sowie des Hyaluronrezeptors CD44 (schwarz) mit der jeweiligen IgG-Kontrolle (grau). Die gemessenen counts wurden auf die maximalen counts normiert, da die Histogramme Überlagerungen der Antigenexpression mit der Expression der IgG-Kontrolle darstellen (Durchflusszytometrie, Darstellung eines repräsentativen Beispiels).

Die Integrin-Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und αV sowie der Hyaluronrezeptor CD44 wurden von den MSC exprimiert, während die Integrin-Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 4$ und $\alpha 6$ nur minimal oder gar nicht exprimiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zellen die Minimal Kriterien der ISCT zur Charakterisierung von MSC, einschließlich Adhärenz auf Plastik, Expression spezifischer Oberflächenantigene (abweichend die Expression von HLA-DR) und osteogenes bzw. adipogenes Differenzierungspotenzial, erfüllten. Die Zellen exprimierten weiterhin die Integrin-Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αV sowie CD44.

4.2 Methodische Untersuchungen zur mechanischen Stimulation

Im initialen Schritt wurden methodische Untersuchungen zu in dieser Arbeit verwendeten Methode der mechanischen Rezeptorstimulation hinsichtlich der Anbindung und Internalisierung der paramagnetischen Partikel durchgeführt. Weiterhin wurde die Vitalität der MSC nach mechanischer Rezeptorstimulation nach Kultivierung der Zellen sowohl auf TCP als auch auf einer homogenen RGD-Beschichtung untersucht.

4.2.1 Bindung paramagnetischer Partikel an MSC

Im Folgenden wurde überprüft, ob die Anbindung der paramagnetischen Partikel an $\beta 1$ -Integrin-Untereinheiten der mesenchymalen Stammzellen und die anschließende mechanische Kraftausübung durch Anlegen eines inhomogenen Magnetfeldes einen Einfluss auf die Integrität der Zellmembran hat (Abb. 12).

Die FE-SEM-Aufnahmen zeigen, dass das Anlegen des inhomogenen Magnetfeldes eine Deformation der Zellmembran in Richtung der Kraftausübung zur Folge hatte, während das alleinige Anbinden der Partikel solche Deformationen nicht hervorrief. Die Morphologie der gesamten Zelle blieb durch die mechanische Stimulation unbeeinflusst.

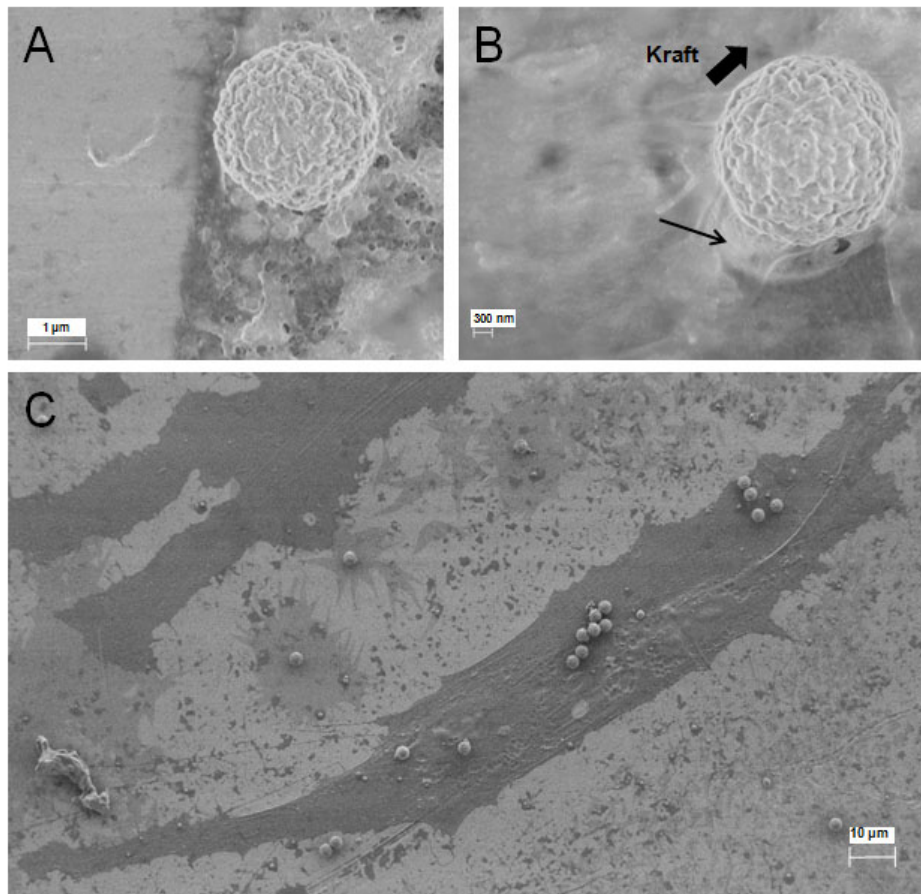


Abb. 12: **Anbindung paramagnetischer Partikel an die Zelloberfläche** über β 1-Integrine. (A) zeigt einen an die Zelloberfläche gebundenen Partikel. In (B) ist ein Partikel während der Applikation des inhomogenen Magnetfeldes dargestellt. Durch die Bewegung des Partikels wird die Zellmembran in Richtung der Kraftausübung deformiert. (C) ist die entsprechende Übersichtsaufnahme zu (B) und veranschaulicht weiterhin die Anbindung mehrerer paramagnetischer Partikel an der Zelloberfläche einer Zelle (Supra 25 GEMINI FE-SEM; FE-SEM-Aufnahmen: Dipl.-Ing. R. Lange, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Universität Rostock).

4.2.2 Internalisierung der paramagnetischen Partikel

Eine wesentliche Voraussetzung der Methode zur mechanischen Rezeptorstimulation ist die Anbindung Antikörper-beschichteter, paramagnetischer Partikel (Durchmesser: $2,8 \mu\text{m}$) an der Zelloberfläche. Mittels FE-SEM-Aufnahmen sollte die Internalisierung der Partikel in einem Zeitraum von 24 h untersucht werden (Abb. 13).

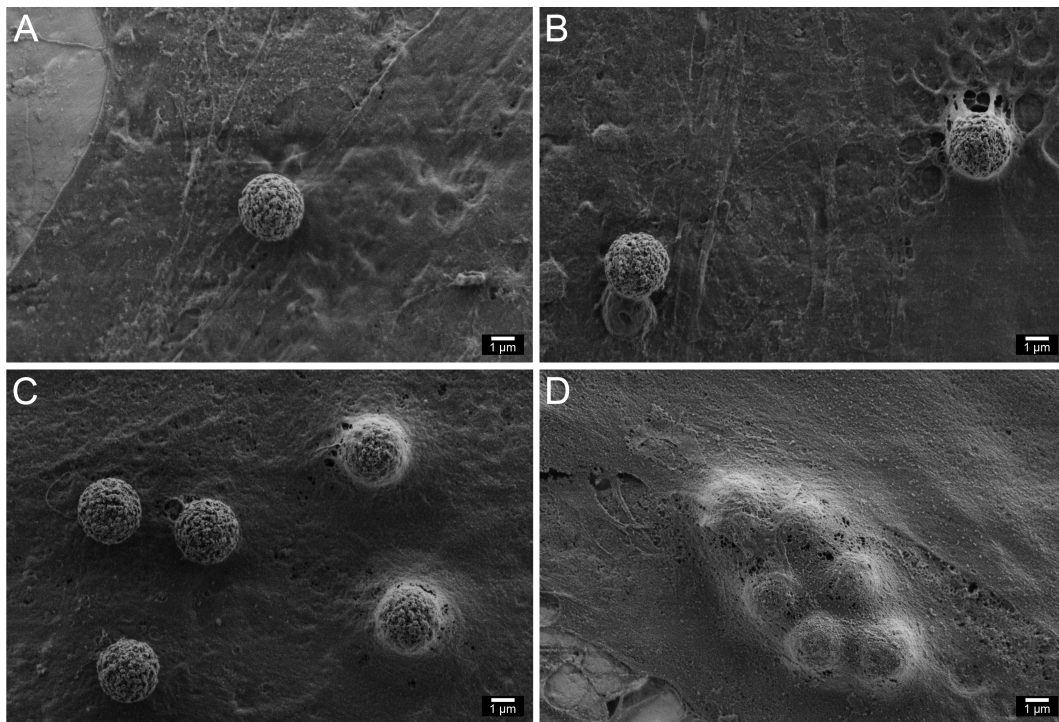


Abb. 13: **Internalisierung paramagnetischer Partikel.** Die Internalisierung der Partikel wurde an verschiedenen Zeitpunkten dargestellt: (A) zu Versuchsbeginn, nach (B) 4 h, (C) 8 h und (D) 24 h. Während die Partikel zu Versuchsbeginn an der Zelloberfläche angebunden waren, wurden sie innerhalb von 24 h vollständig internalisiert (Supra 25 GEMINI FE-SEM; FE-SEM-Aufnahmen: Dipl.-Ing. R. Lange, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Universität Rostock).

Zu Versuchsbeginn waren die Partikel an der Zelloberfläche gebunden. Nach einer Inkubationszeit der Partikel von 4 h bzw. 8 h wurden die Partikel zum Teil bereits internalisiert, während andere noch an der Zelloberfläche gebunden waren. Der Anteil internalisierter Partikel umfasste nach 8 h ca. die Hälfte der Partikel. Nach 24 h hatte eine vollständige Internalisierung der Partikel stattgefunden, wobei die Partikel nicht mehr vereinzelt sondern in kleinen Gruppen unter der Zellmembran vorlagen.

4.2.3 Zellvitalität nach mechanischer Stimulation an β 1-Integrinen

Der Einfluss einer einmaligen (15 min) bzw. wiederholten mechanischen Stimulation (15-minütige Stimulation alle 2 h, insgesamt fünfmal innerhalb von 10 h) auf die Zellvitalität nach einer Inkubationszeit von 48 h wird mit Hilfe des Live-Dead-Assays untersucht (Abb. 14). Als Adhäsionssubstrat diente Polystyrol (TCP).

Es konnten keine Unterschiede bzgl. der Zellvitalität zwischen Zellen der unbehandelten Kontrolle und den Zellen nach einmaliger (Stress 1x) bzw. (Stress 5x) wiederholter mechanischer

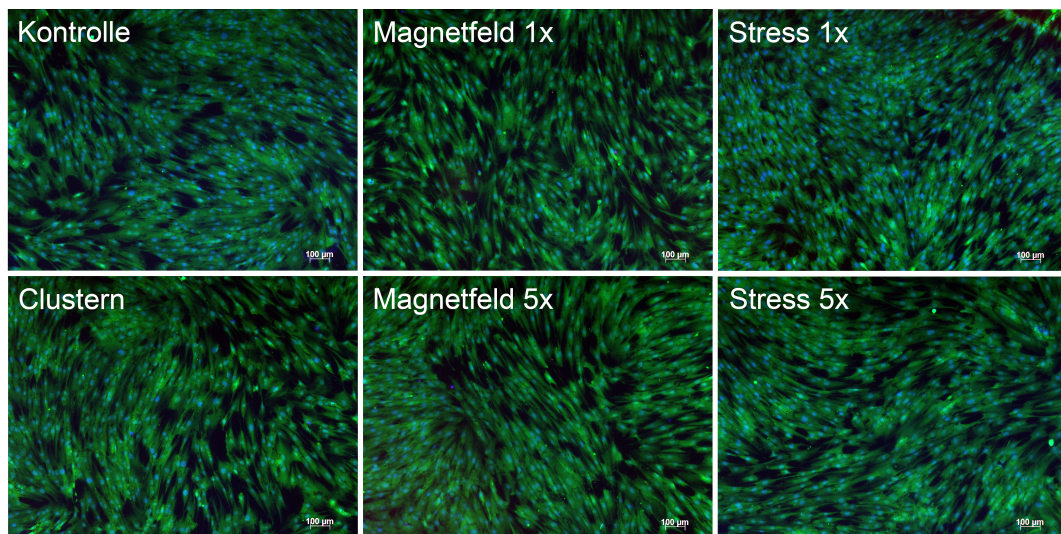


Abb. 14: **Zellvitalität nach wiederholter mechanischer Stimulation** nach 48 h. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt, wobei die Applikation des Magnetfeldes bzw. die Stressapplikation sowohl einmalig (1x) als auch wiederholt (5x) erfolgte. Der Nachweis der Zellvitalität erfolgte durch die Anfärbung des Zellkörpers lebender Zellen mit Calcein-AM (grün) sowie die Kernfärbung aller Zellen mit Hoechst 33342 (blau) sowie ggf. apoptotischer Zellen mit Propidiumjodid (rot) (Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskop).

Stimulation festgestellt werden, die Zellen waren ausnahmslos vital. Die Vitalität der Zellen blieb sowohl durch die einmalige (Magnetfeld 1x) bzw. wiederholte (Magnetfeld 5x) Applikation des Magnetfeldes als auch durch die Inkubation mit paramagnetischen Partikeln (*Clustern*) unbeeinträchtigt.

Mittels des Live-Dead-Assays wurde der Einfluss der mechanischen Stimulation auf die Zellvitalität der MSC, die auf einer homogenen RGD-Beschichtung kultiviert wurden, nach 48 h untersucht (Abb. 15).

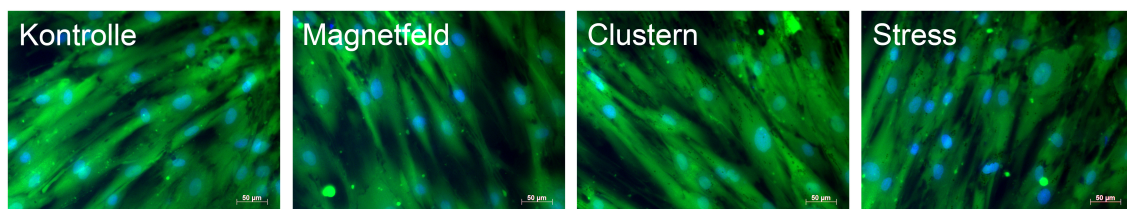


Abb. 15: **Vitalität der MSC nach mechanischer Stimulation auf homogener RGD-Beschichtung als Adhäsionssubstrat** nach 48 h. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Der Nachweis der Zellvitalität erfolgte durch die Anfärbung des Zellkörpers lebender Zellen mit Calcein-AM (grün) sowie die Kernfärbung aller Zellen mit Hoechst 33342 (blau) sowie ggf. apoptotischer Zellen mit Propidiumjodid (rot) (Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskop).

Auch nach Kultivierung der MSC auf einer homogenen RGD-Beschichtung konnten keine Unterschiede bzgl. der Vitalität zwischen Zellen der unbehandelten Kontrolle und den Zellen nach mechanischer Stimulation (Stress) festgestellt werden, die Zellen waren ausnahmslos vital. Ebenfalls vital waren die Zellen nach Applikation des Magnetfeldes sowie nach Inkubation mit paramagnetischen Partikeln (*Clustern*).

In der Zusammenfassung dieses Kapitels kann festgestellt werden, dass nach Anbindung der paramagnetischen Partikel durch die Applikation eines inhomogenen Magnetfeldes eine Deformation der Zellmembran in Richtung der Kraftausübung stattfand. Eine vollständige Internalisierung der Partikel erfolgte innerhalb von 24 h. Die Vitalität der MSC blieb nach mechanischer Rezeptorstimulation unabhängig vom verwendeten Adhäsionssubstrat im Vergleich zur Kontrolle unbeeinträchtigt.

4.3 Einfluss der mechanischen Stimulation auf die intrazelluläre Signaltransduktion der MSC

Um die Auswirkungen der mechanischen Stimulation auf intrazelluläre Signalkaskaden besser beschreiben zu können, wurde die Aktivierung von zwei wichtigen intrazellulären Signalproteinen, den Kinasen AKT und ERK, (in Form einer Phosphorylierung) sofort sowie 1 h und 6 h nach mechanischer Stimulation der MSC untersucht (Abb. 16). Die Messwerte wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

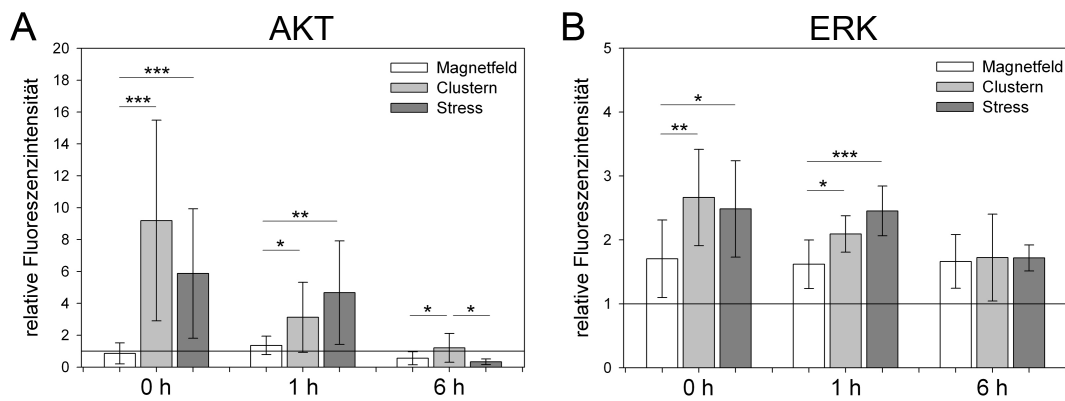


Abb. 16: **Aktivierung der intrazellulären Signalproteine (A) AKT und (B) ERK nach mechanischer Stimulation von MSC.** Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Die Messwerte wurden auf die unbehandelte Kontrolle (schwarze Linie) normiert (Bio-Plex 200 Suspension Array System) (n=3, Mittelwert \pm Standardabweichung, t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Durch die 30-minütige Inkubation der Zellen mit anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörper-beschichteten Partikeln (*Clustern*) erfolgte eine signifikante Aktivierung von AKT, die auch noch nach einer Stun-

de nachweisbar war. Diese Aktivierung konnte durch ein zusätzliches, 15-minütiges Anlegen des Magnetfeldes, also der mechanischen Stimulation an $\beta 1$ -Integrinen (Stress), nicht gesteigert werden. Die alleinige Applikation des Magnetfeldes war nicht in der Lage eine AKT-Aktivierung in MSC im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen hervorzurufen.

Die MAP-Kinase ERK konnte in MSC durch die Inkubation mit Partikeln gegenüber unbehandelten Kontrollzellen aktiviert werden, wobei auch hier im Vergleich zur mechanischen Stimulation keine Unterschiede detektiert werden konnten. Dieser Effekt blieb bis zu einer Stunde nach Stimulation erhalten. Das Magnetfeld war ebenfalls in der Lage, die Aktivierung von ERK im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hervorzurufen, allerdings nicht in dem Maße wie *Clustern* oder Stress. Innerhalb einem Zeitraum von 6 h blieb das Niveau der Aktivierung durch das Magnetfeld erhalten, zeigte aber nach 6 h keine Unterschiede zu *Clustern* oder Stress.

4.4 Einfluss der mechanischen Stimulation auf die biologische Antwort der MSC

4.4.1 Metabolische Aktivität und Proliferationsverhalten

Mit Hilfe des folgenden Versuches sollte der Einfluss der mechanischen Stimulation auf die metabolische Aktivität der MSC untersucht werden (Abb. 17A). Um die metabolische Aktivität auf die Zellzahl zu beziehen, erfolgte eine Zellzahlbestimmung, mit deren Hilfe auch das Proliferationsverhalten der MSC beschrieben werden soll (Abb. 17B).

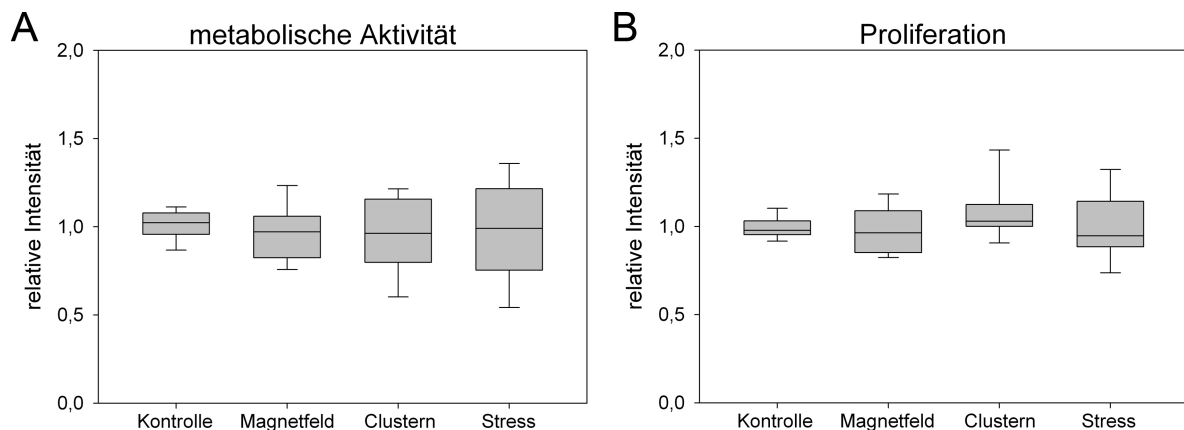


Abb. 17: Einfluss der mechanischen Stimulation auf (A) die metabolische Aktivität und (B) das Proliferationsverhalten von MSC nach 48 h. Sowohl die metabolische Aktivität als auch das Proliferationsverhalten der MSC wurde weder durch Stress noch durch *Clustern* oder das Magnetfeld gegenüber der Kontrolle beeinflusst. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Die unbehandelte Kontrolle diente als Referenz, worauf alle weiteren Messergebnisse normiert wurden (n=5, box plot, Mann-Whitney U-Test: keine signifikanten Unterschiede).

Die mechanische Stimulation hatte nach 48 h weder einen Einfluss auf die metabolische Aktivität der MSC noch auf das Proliferationsverhalten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch die Applikation des Magnetfeldes bzw. die Inkubation mit paramagnetischen Partikeln (*Clustern*) zeigten keine Unterschiede zur Kontrolle auf die zwei untersuchten Parameter.

4.4.2 Expression von Differenzierungsmarkern

Mit Hilfe dieser Experimente sollte die Frage geklärt werden, welchen Einfluss die mechanische Stimulation unter Verwendung verschiedener Medien (Expansionsmedium sowie adipogenes und osteogenes Differenzierungsmedium) auf die mRNA-Expression der osteogenen Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase und Kollagen 1a, des chondrogenen Differenzierungsmarkers SOX 9 sowie des adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ hat (Abb. 18).

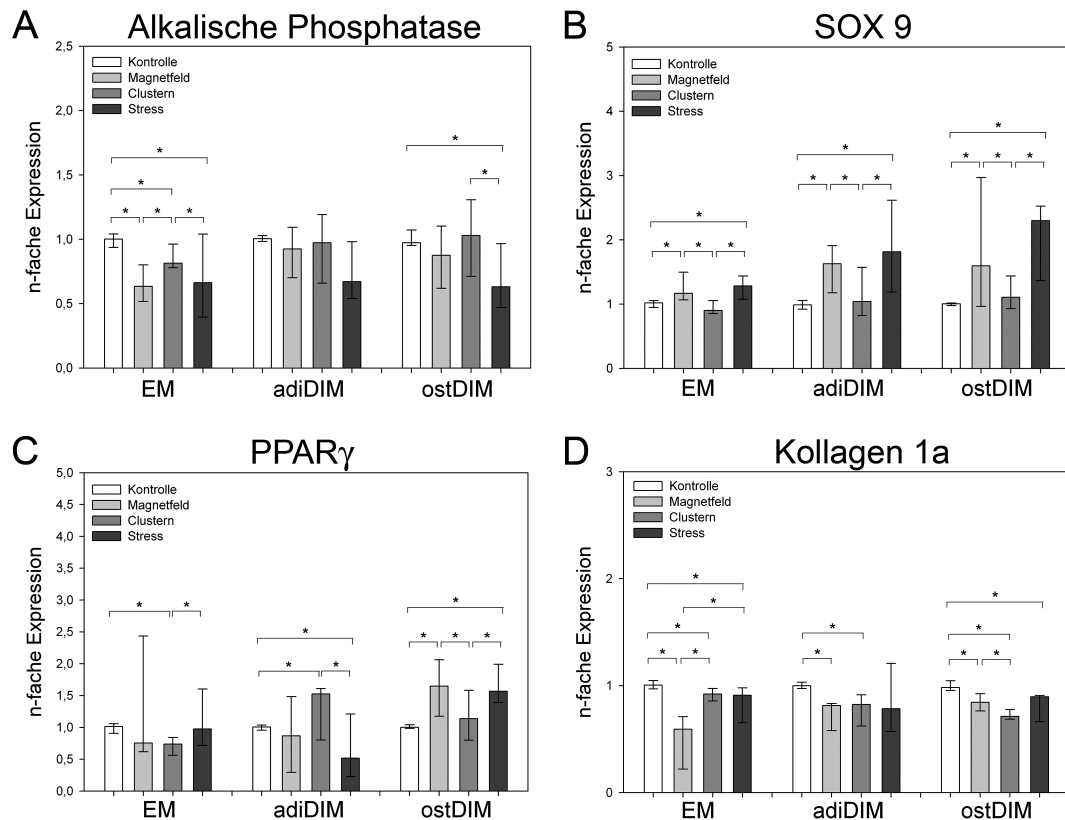


Abb. 18: Einfluss der mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern: (A) Alkalische Phosphatase, (B) SOX 9, (C) PPAR γ und (D) Kollagen 1a nach (A)-(C) 48 h bzw. (D) 24 h in Expansionsmedium (EM) sowie adipogenem (adiDIM) und osteogenem (ostDIM) Differenzierungsmedium. Die SOX 9-Expression wurde durch das Magnetfeld in allen Medien gesteigert, wohingegen die Expression von Kollagen 1a abnahm. Die Expression von PPAR γ bzw. der Alkalischen Phosphatase konnte nur im ostDIM bzw. EM durch das Magnetfeld erhöht bzw. gesenkt werden. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe normiert (Real-Time quantitative PCR) (n=4, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * $p \leq 0,05$).

Bzgl. der Auswertung der Ergebnisse in Abb. 18 ist zu berücksichtigen, dass die mechanische Stimulation der Zellen, ausgeübt durch Zugkräfte an β 1-Integrinen, unter dem Einfluss eines inhomogenen Magnetfeldes erfolgte. Es können daher sowohl Aussagen über den Einfluss des Magnetfeldes allein als auch durch das zusätzliche Einwirken mechanischer Zugkräfte durch die Bewegung der paramagnetischen Partikel (Stress) gemacht werden.

Die mRNA-Expression des chondrogenen Differenzierungsmarkers SOX 9 wurde durch das Magnetfeld erhöht, konnte allerdings nicht durch zusätzliche mechanische Stimulation gesteigert werden. Die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase bzw. Kollagen 1a wurde im Expansionsmedium bzw. allen Medien durch das Magnetfeld vermindert, wobei im Expansionsmedium die mRNA-Expression von Kollagen 1a durch zusätzliche mechanische Stimulation gegenüber dem Magnetfeld wieder erhöht werden konnte. Die mRNA-Expression des adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ konnte durch das Magnetfeld gesteigert werden. Zu beachten ist, dass diese beobachteten Effekte vom verwendeten Medium abhängen. Während die verminderte Expression der Alkalischen Phosphatase auf Grund des Magnetfeldes nur im Expansionsmedium auftrat und eine erhöhte PPAR γ -Expression durch das Magnetfeld nur im osteogenen Differenzierungsmedium nachgewiesen werden konnte, wurde sowohl der stimulierende Effekt des Magnetfeldes auf die SOX 9-Expression als auch der inhibierende Effekt des Magnetfeldes auf die Kollagen 1a-Expression in allen verwendeten Medien sichtbar.

4.4.3 Freisetzung des bioaktiven Faktors VEGF

Neben der Analyse der Expression von Differenzierungsmarkern soll auch die mRNA-Expression bzw. die Freisetzung des bioaktiven Faktors VEGF durch MSC in Abhängigkeit vom verwendeten Medium (Expansionsmedium sowie adipogenes und osteogenes Differenzierungsmedium) untersucht werden (Abb. 19), da VEGF eine Schlüsselrolle in der Gefäßneubildung spielt und somit aktiv zur Geweberegeneration beiträgt^{112,131,184}.

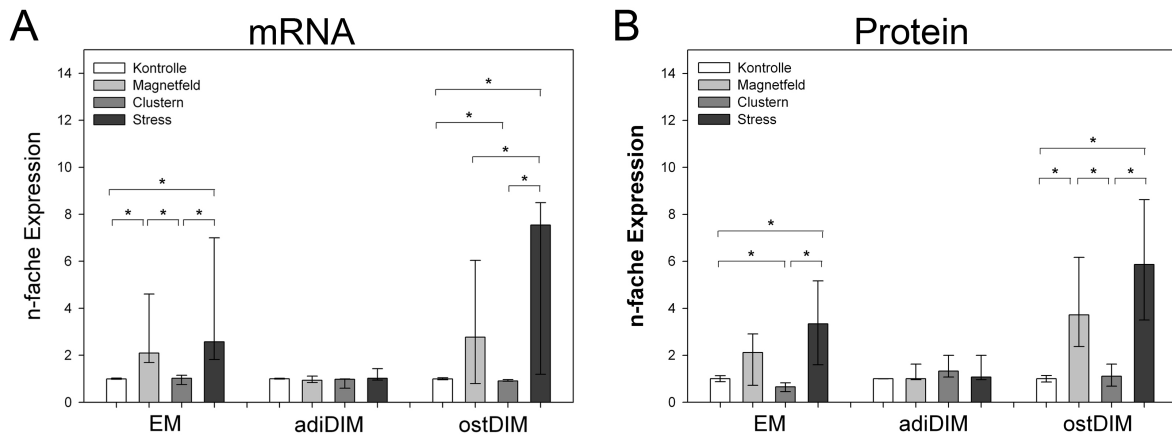


Abb. 19: **Einfluss der mechanischen Stimulation auf die mRNA- und Protein-Expression von VEGF.** (A) mRNA-Expression (Real-Time quantitative PCR) und (B) Protein-Expression (Bio-Plex 200 Suspension Array System) nach 48 h im Expansionsmedium (EM) sowie im adipogenen (adiDIM) und osteogenen (ostDIM) Differenzierungsmedium. Eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von VEGF in Folge mechanischer Stimulation konnte im ostDIM nachgewiesen werden. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe normiert. (n=4, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * $p \leq 0,05$)

Bezüglich der mRNA-Expression von VEGF und der Freisetzung von VEGF durch MSC zeigten sich ähnliche Effekte, da sowohl im Expansionsmedium als auch im osteogenen Differenzierungsmedium durch die Applikation des Magnetfeldes eine erhöhte Expression bzw. Freisetzung von VEGF in MSC im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen erreicht werden konnte. Im osteogenen Differenzierungsmedium wurde die mRNA-Expression von VEGF durch mechanische Stimulation gegenüber dem Magnetfeld gesteigert, diese Tendenz ließ sich ebenfalls bei der Freisetzung von VEGF erkennen. Im adipogenen Differenzierungsmedium wurde weder durch mechanische Stimulation noch durch *Clustern* oder die Applikation des Magnetfeldes die Expression oder Freisetzung von VEGF gegenüber der Kontrolle beeinflusst.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich sowohl die metabolische Aktivität als auch das Proliferationsverhalten der MSC durch die mechanische Stimulation nicht beeinflussen ließ. Einen starken Einfluss übte das Magnetfeld auf die mRNA-Expression der Differenzierungsmarker, wobei ein stimulierender Effekt durch zusätzliche Ausübung von Zugkräften nur auf die Kollagen 1a-Expression auszumachen war. Die SOX 9-Expression wurde durch das Magnetfeld in allen Medien gesteigert, wohingegen die Expression von Kollagen 1a abnahm. Die Expression von PPAR γ bzw. der Alkalischen Phosphatase konnte nur im osteogenen Differenzierungsmedium bzw. Expansionsmedium durch das Magnetfeld erhöht bzw. gesenkt werden. Die mRNA-Expression von VEGF konnte insbesondere im osteogenen Differenzierungsmedium signifikant durch die mechanische Stimulation gesteigert werden, ein abgeschwächter Effekt zeigte sich auch hinsichtlich der Freisetzung von VEGF.

4.5 Einfluss einer wiederholten mechanischen Stimulation auf die biologische Antwort der MSC

Ob eine wiederholte mechanische Stimulation (15-minütige Stimulation alle 2 h, insgesamt fünfmal innerhalb von 10 h) gegenüber der einmaligen mechanischen Stimulation die mRNA-Expression der Differenzierungsmarker bzw. des bioaktiven Faktors VEGF modulieren kann, wurde im Folgenden untersucht.

4.5.1 Expression von Differenzierungsmarkern

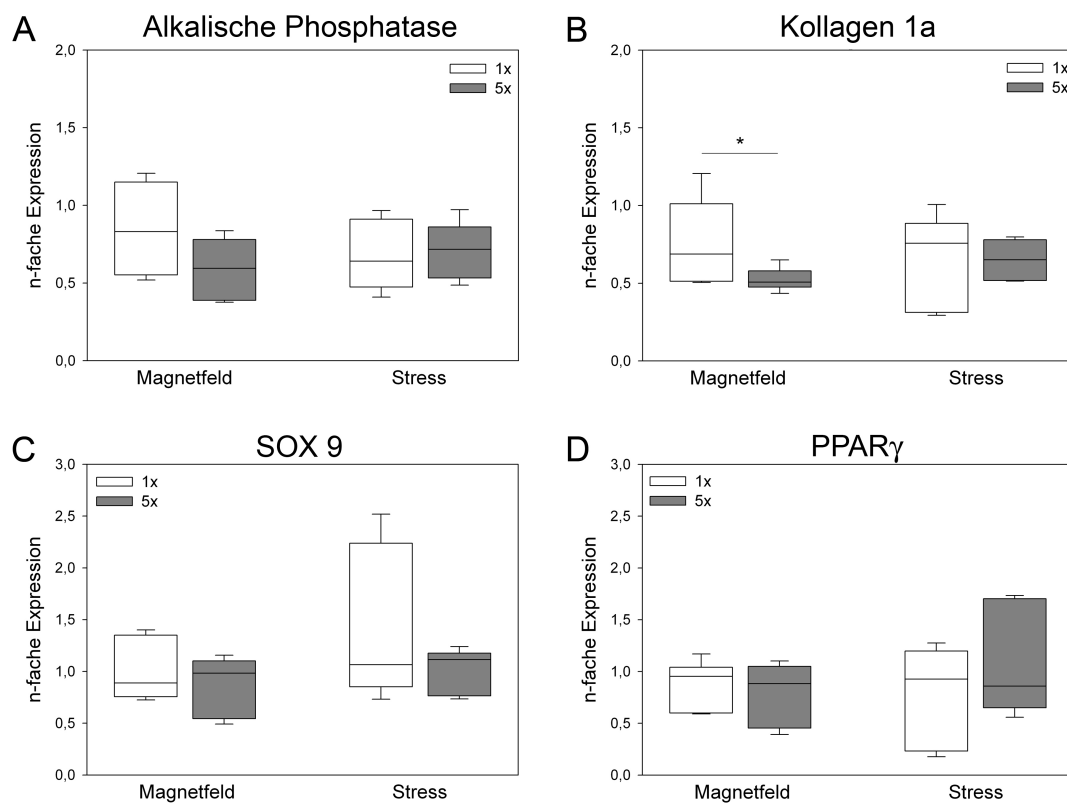


Abb. 20: Einfluss der wiederholten mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern nach 48 h: (A) Alkalische Phosphatase, (B) Kollagen 1a, (C) SOX 9 und (D) PPAR γ . Eine wiederholte Applikation des Magnetfeldes oder von Stress führte zu keiner Veränderung der Expression der Differenzierungsmarker gegenüber der einmaligen Applikation, außer bei Kollagen 1a. Dort konnte durch die wiederholte Applikation des Magnetfeldes die Expression gesenkt werden. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt, wobei die Applikation des Magnetfeldes bzw. die Stressapplikation sowohl einmalig (1x) als auch wiederholt (5x) erfolgte. Die unbehandelte Kontrolle diente als Referenz, worauf alle weiteren Messergebnisse normiert wurden (Real-Time quantitative PCR) (n=3, box plot, Mann-Whitney U-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Im Folgenden wurde die mRNA-Expression der osteogenen Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase und Kollagen 1a sowie des chondrogenen Differenzierungsmarkers SOX 9 und des

adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ 48 h nach wiederholter mechanischer Stimulation der MSC untersucht (Abb. 20). Die Expression der Differenzierungsmarker wurde jeweils auf die Expression der unbehandelten Kontrolle normiert. Da eine wiederholte mechanische Stimulation auch gleichzeitig eine wiederholte Applikation des Magnetfeldes beinhaltet, wurde hier die Applikation des Magnetfeldes als direkte Vergleichsgruppe gewählt.

Durch eine wiederholte mechanische Stimulation konnten keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression der Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase, Kollagen 1a, SOX 9 oder PPAR γ im Vergleich zur einmaligen mechanischen Stimulation hervorgerufen werden. Auch die wiederholte Applikation des Magnetfeldes verglichen mit einer einmaligen Magnetfeld-Applikation blieb bzgl. der mRNA-Expression von Alkalischer Phosphatase, SOX 9 und PPAR γ unbeeinflusst, nur die Kollagen 1a-Expression konnte durch eine wiederholte Magnetfeld-Applikation im Vergleich zur einmaligen Applikation gesenkt werden.

4.5.2 Expression des bioaktiven Faktors VEGF

Inwieweit eine wiederholte mechanische Stimulation einen Einfluss auf die mRNA-Expression von VEGF nach 48 h hat, wurde mit Hilfe des folgenden Experimentes untersucht (Abb. 21). Da es sich um denselben Versuchsaufbau wie in den vorangestellten Versuchen handelte, wurde hier ebenfalls als direkte Vergleichsgruppe die wiederholte Applikation des Magnetfeldes gewählt.

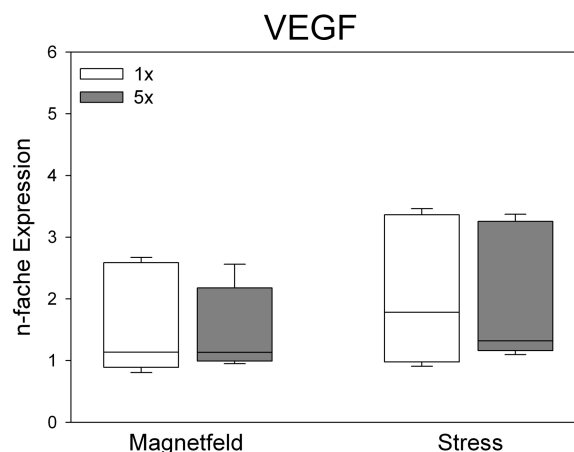


Abb. 21: **Einfluss der wiederholten mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression von VEGF** nach 48 h. Eine wiederholte Applikation des Magnetfeldes oder von Stress führte zu keiner Veränderung der VEGF-Expression gegenüber der einmaligen Applikation. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt, wobei die Applikation des Magnetfeldes bzw. die Stressapplikation sowohl einmalig (1x) als auch wiederholt (5x) erfolgte. Die unbehandelte Kontrolle diente als Referenz, worauf alle weiteren Messergebnisse normiert wurden (Real-Time quantitative PCR) ($n=3$, *box plot*, Mann-Whitney U-Test: keine signifikanten Unterschiede).

Der Vergleich zur einmaligen mechanischen Stimulation zeigt, dass die mehrmalige mechanische Stimulation keinen zusätzlichen Einfluss auf die mRNA-Expression von VEGF hatte. Die VEGF-Expression nach wiederholter Applikation des Magnetfeldes war ebenfalls mit der Expression nach einmaliger Magnetfeld-Applikation vergleichbar.

In der zusammenfassenden Betrachtung lässt sich feststellen, dass eine wiederholte mechanische Stimulation gegenüber einer einmaligen Stimulation die mRNA-Expression der Differenzierungsmarker sowie VEGF nicht beeinflussten. Derselbe Effekt ließ sich auch für die mehrmalige Applikation des Magnetfeldes bestimmen, allerdings mit der Ausnahme, dass die Kollagen 1a-Expression auf Grund einer wiederholten gegenüber der einmaligen Magnetfeld-Applikation reduziert wurde.

4.6 Einfluss der mechanischen Stimulation auf die biologische Antwort der MSC in Abhängigkeit von homogenen Oberflächenfunktionalisierungen

Nachdem im ersten Schritt Polystyrol (TCP) als Adhäsionssubstrat verwendet wurde, wurden nun homogene Oberflächenfunktionalisierungen wie Beschichtungen mit der GRGDS-Peptid-Sequenz (RGD-Peptid) sowie dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin (FN) für die folgenden Untersuchungen gewählt.

4.6.1 Mechanische Eigenschaften der homogenen Oberflächenfunktionalisierungen

Da neben der Oberflächenfunktionalisierung auch die Steifigkeit der Adhäsionsmatrizes einen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Differenzierung und Proliferation hat^{40,46,61}, wurde im Folgenden das Elastizitätsmodul (E-Modul) der verschiedenen Oberflächenmodifikationen, als Maß für die Steifigkeit von Adhäsionssubstraten, mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie bestimmt (Abb. 22). Glas wurde bei diesen Experimenten als Referenzoberfläche zum Kalibrieren des Rasterkraftmikroskops verwendet, wodurch das E-Modul von Glas für diese Versuche als unendlich groß definiert werden musste und somit nicht in der Abbildung dargestellt werden konnte. Da Fibronectin bzw. das lineare GRGDS-Peptid (RGD) auf der NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymerbeschichtung immobilisiert wurde, wurde ebenfalls der Effekt des Aufbringens der NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymerbeschichtung auf das E-Modul untersucht.

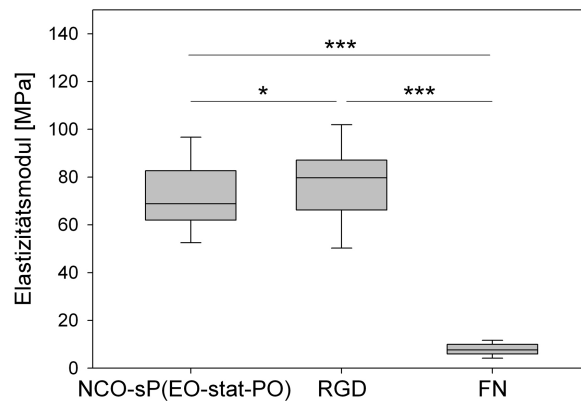


Abb. 22: **Bestimmung des Elastizitätsmoduls von funktionalisierten Oberflächen.** Dargestellt ist das Elastizitätsmodul für die RGD- und FN-funktionalisierten Oberflächen, als Kontrolle dient die NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymerbeschichtung von Glas. Die NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymerbeschichtung verringerte das Elastizitätsmodul der Glasoberfläche stark, wobei die zusätzliche Immobilisierung von Fibronectin auf der NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymerbeschichtung das Elastizitätsmodul nochmals um ein Vielfaches verringerte (Rasterkraftmikroskopie: Dr. P. Elter, Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik, Fakultät für Informatik und Elektrotechnik, Universität Rostock) (n=100 Messpunkte, *box plot*, Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Allein die (NCO-sP(EO-stat-PO))-Polymerbeschichtung der Glasoberfläche verringerte das E-Modul gegenüber reinem Glas erheblich. Im Vergleich zur RGD-Beschichtung war das E-Modul für die Fibronectin-beschichtete Oberfläche um ein Vielfaches geringer.

4.6.2 Metabolische Aktivität und Proliferationsverhalten

Mit Hilfe des folgenden Versuches sollte geklärt werden, ob die mechanische Stimulation von Zellen auf einer RGD-beschichteten Oberfläche einen Einfluss auf die metabolische Aktivität der MSC hat (Abb. 23A). Um die metabolische Aktivität auf die Zellzahl zu beziehen, erfolgte eine Zellzahlbestimmung, mit deren Hilfe auch das Proliferationsverhalten der MSC beschrieben werden soll (Abb. 23B).

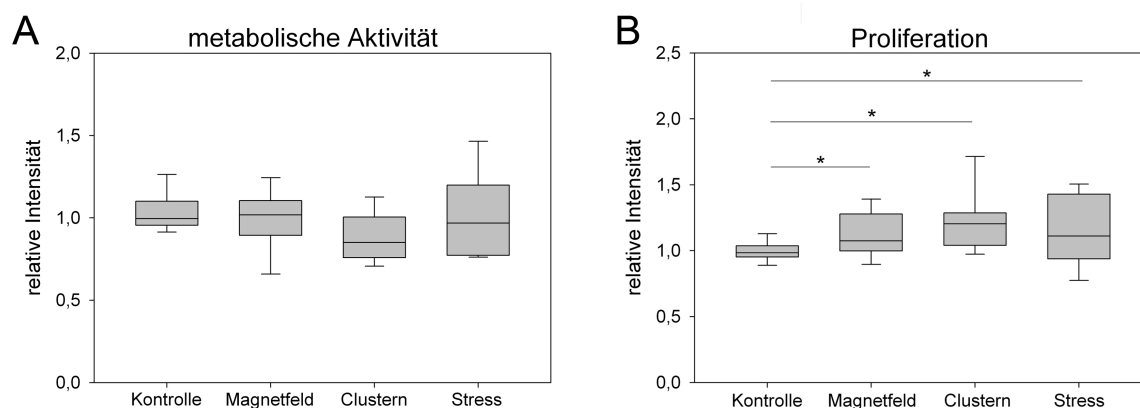


Abb. 23: **Einfluss von mechanischer Stimulation und RGD-Beschichtung auf die metabolische Aktivität (A) und das Proliferationsverhalten (B) der MSC nach 48 h.** Die metabolische Aktivität der MSC wurde weder durch Stress noch durch *Clustern* oder das Magnetfeld beeinflusst. Das Proliferationsverhalten konnte durch alle drei Versuchsbedingungen gegenüber der Kontrolle gesteigert werden. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Die unbehandelte Kontrolle diente als Referenz, worauf alle weiteren Messergebnisse normiert wurden ($n=5$, *box plot*, Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die mechanische Stimulation von Zellen auf einer homogenen RGD-Beschichtung hatte nach 48 h keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der MSC. Auch die Applikation des Magnetfeldes bzw. die Inkubation mit paramagnetischen Partikeln (*Clustern*) zeigte keinerlei Wirkung auf die metabolische Aktivität.

Bzgl. des Proliferationsverhaltens von MSC auf einer homogenen RGD-Beschichtung konnte eine Erhöhung der Proliferation durch mechanische Stimulation, Inkubation der Zellen mit Partikeln (*Clustern*) und der Applikation des Magnetfeldes gegenüber den unbehandelten Zellen (Kontrolle) erzeugt werden.

4.6.3 Expression von Differenzierungsmarkern

Mit Hilfe der nachfolgenden Experimente sollte geklärt werden, welchen Einfluss die mechanische Stimulation unter Verwendung verschiedener Adhäsionsmatrizes (RGD- bzw. FN-funktionalisierte Oberflächen) und Medien (Expansionsmedium sowie adipogenes und osteogenes Differenzierungsmedium) auf die Expression der osteogenen Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase (Abb. 24) und Kollagen 1a (Abb. 27) sowie den chondrogenen Differenzierungsmarker SOX 9 (Abb. 25) und den adipogenen Differenzierungsmarker PPAR γ (Abb. 26) hat.

Weder durch die Verwendung der RGD- noch der FN-Oberflächenfunktionalisierung ließ sich nach mechanischer Stimulation, der Applikation des Magnetfeldes oder *Clustern* der Zellen in Expansionsmedium sowie in osteogenen Differenzierungsmedium ein Unterschied in der Expression der Alkalischen Phosphatase nach 48 h gegenüber der unbehandelten Kontrolle hervorrufen (Abb. 24). Im adipogenen Differenzierungsmedium wurde durch die Applikation des Magnetfel-

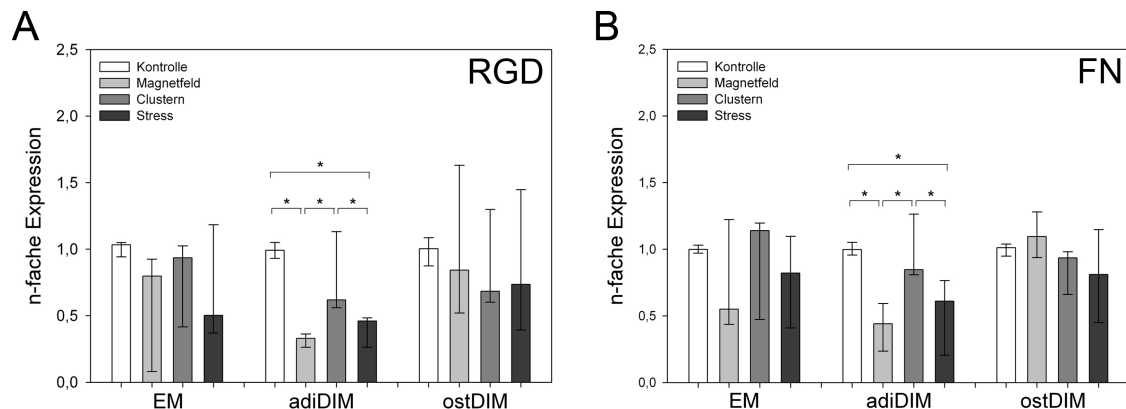


Abb. 24: **Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase nach mechanischer Stimulation** in Expansionsmedium (EM), osteogenem (ostDIM) und adipogenem (adiDIM) Differenzierungsmedium nach 48 h. Die mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase wurde im adiDIM unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung durch die Applikation des Magnetfeldes verringert. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe normiert (Real-Time quantitative PCR) (n=3, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * $p \leq 0,05$).

des die mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unabhängig von der verwendeten Oberflächenfunktionalisierung verringert.

Durch die Verwendung der RGD-funktionalisierten Oberfläche in Kombination mit Expansionsmedium konnte durch die Applikation des Magnetfeldes und des *Clustern* eine verringerte mRNA-Expression des chondrogenen Differenzierungsmarkers SOX 9 innerhalb von 48 h gegenüber der unbehandelten Kontrolle erreicht werden (Abb. 25). Auf der FN-funktionalisierten Oberfläche erfolgte im Expansionsmedium ebenfalls eine Verringerung der SOX 9-Expression nach Applikation des Magnetfeldes im Vergleich zur Kontrolle. Auf der FN-funktionalisierten Oberfläche schien das *Clustern* bereits einen stimulierenden Effekt auf die mRNA-Expression von SOX 9 auszuüben. Im osteogenen Differenzierungsmedium war dieser Effekt auch signifikant.

Sowohl auf der RGD- als auch auf der FN-funktionalisierten Oberfläche in Kombination mit adipogenem Differenzierungsmedium konnte in MSC durch Applikation des Magnetfeldes 48 h zuvor die mRNA-Expression von PPAR γ gegenüber der unbehandelten Kontrolle und der Inkubation mit beschichteten Partikeln (*Clustern*) gesenkt werden (Abb. 26). Erfolgte die mechanische Stimulation im adipogenen Differenzierungsmedium, hatte dies keinen Einfluss auf die PPAR γ -Expression. Das Expansionsmedium in Verbindung mit der FN-funktionalisierten Oberfläche führte zu einer Erhöhung des adipogenen Differenzierungsmarkers 48 h nach Applikation des Magnetfeldes, die durch den Einsatz einer RGD-funktionalisierten Oberfläche nicht erreicht werden konnte.

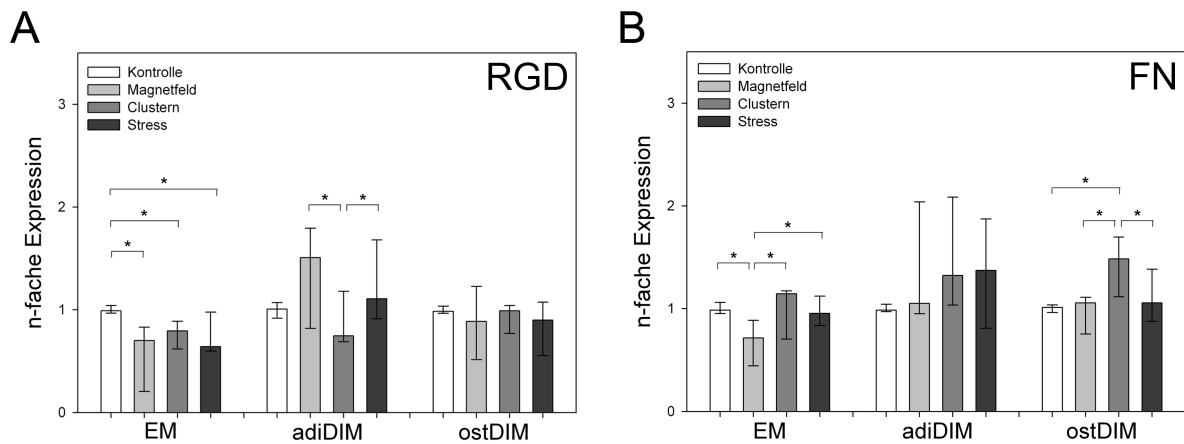


Abb. 25: Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von SOX 9 nach mechanischer Stimulation in Expansionsmedium (EM), osteogenem (ostDIM) und adipogenem (adiDIM) Differenzierungsmedium nach 48 h. Im EM wurde die mRNA-Expression von SOX 9 durch das Magnetfeld bei beiden Oberflächenfunktionalisierungen gesenkt, wobei auf FN zusätzliche Zugkräfte wieder eine Expressionsteigerung hervorriefen. Auf FN führte das Clustern zur Erhöhung der SOX 9-Expression. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe normiert (Real-Time quantitative PCR) (n=3, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * $p \leq 0,05$).

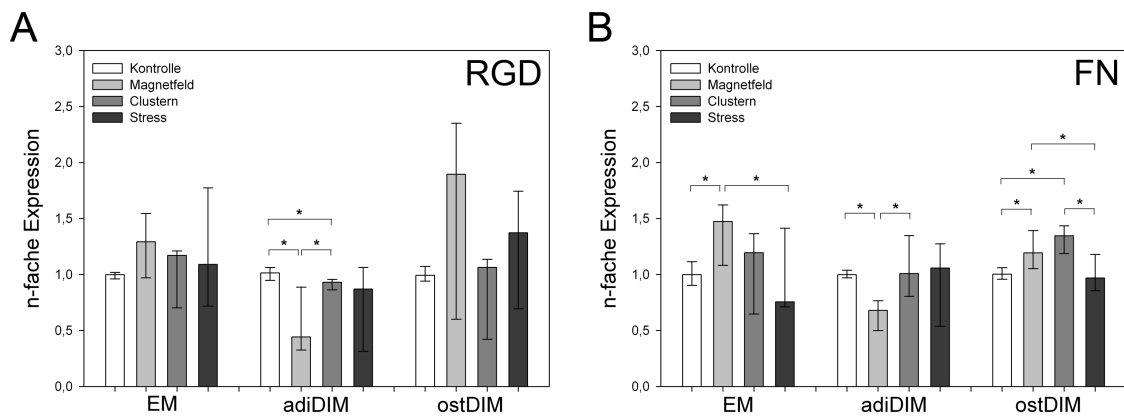


Abb. 26: Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von PPAR γ nach mechanischer Stimulation in Expansionsmedium (EM), osteogenem (ostDIM) und adipogenem (adiDIM) Differenzierungsmedium nach 48 h. Auf beiden Oberflächenfunktionalisierungen konnte im adiDIM die mRNA-Expression von PPAR γ durch das Magnetfeld reduziert werden, während auf FN im EM und ostDIM die Expression in Folge der Magnetfeld-Applikation gesteigert werden konnte. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe normiert (Real-Time quantitative PCR) (n=3, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * $p \leq 0,05$).

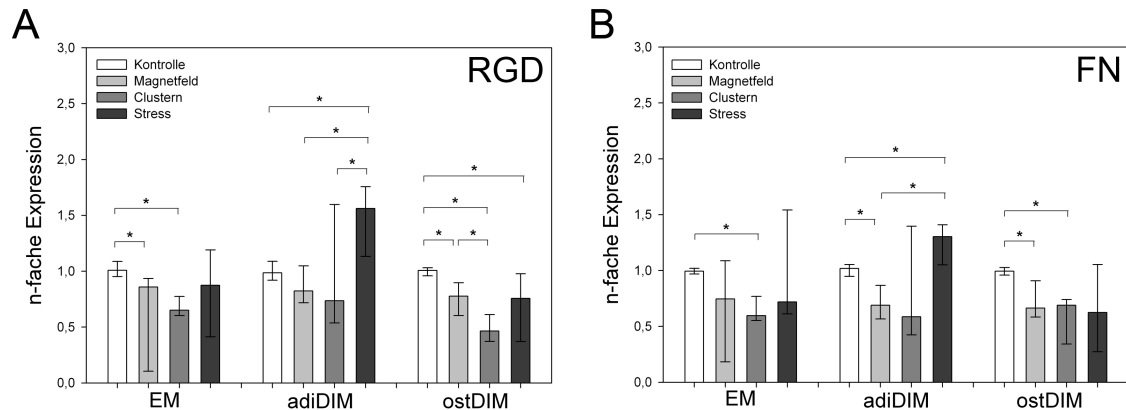


Abb. 27: **Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von Kollagen 1a nach mechanischer Stimulation** in Expansionsmedium (EM), osteogenem (ostDIM) und adipogenem (adiDIM) Differenzierungsmedium nach 24 h. Im adiDIM wurde unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung die mRNA-Expression von Kollagen 1a durch mechanische Stimulation gegen über dem Magnetfeld signifikant gesteigert. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe normiert (Real-Time quantitative PCR) ($n=3$, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * $p \leq 0,05$).

Unabhängig von der verwendeten Oberflächenfunktionalisierung ließ sich im adipogenen Differenzierungsmedium durch mechanische Stimulation innerhalb von 24 h eine erhöhte Expression des osteogenen Differenzierungsmarkers Kollagen 1a im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, der Applikation des Magnetfeldes und der Inkubation mit Partikeln (*Clustern*) hervorruhen (Abb. 27). Im Expansionsmedium sowie osteogenem Differenzierungsmedium bewirkte das *Clustern* eine verringerte Kollagen 1a-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

4.6.4 Expression des bioaktiven Faktors VEGF

Im folgenden Versuch wurde der Effekt der mechanischen Stimulation auf die mRNA-Expression von VEGF in Abhängigkeit sowohl der Adhäsionsmatrix (RGD- bzw. FN-funktionalisierte Oberflächen) als auch des verwendeten Mediums (Expansionsmedium sowie adipogenes und osteogenes Differenzierungsmedium) untersucht (Abb. 28).

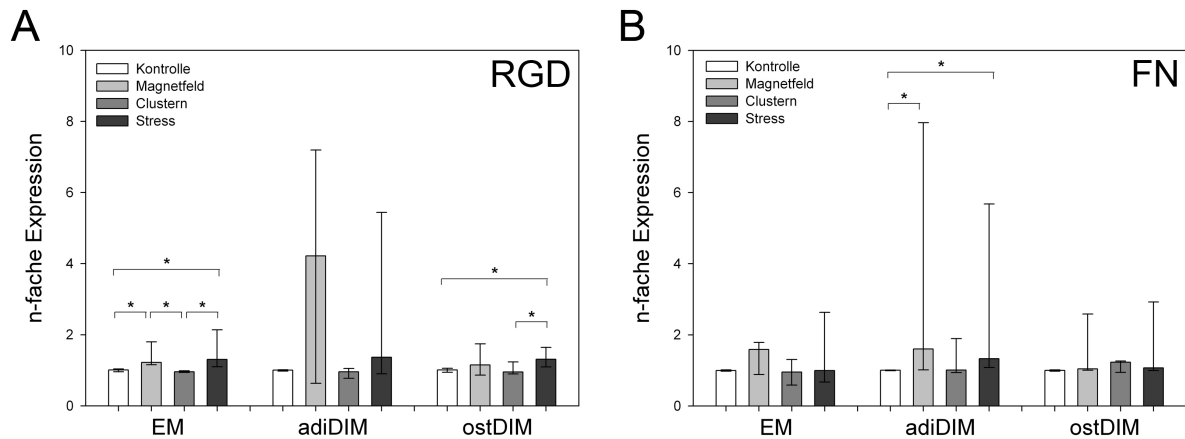


Abb. 28: **Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von VEGF nach mechanischer Stimulation** in Expansionsmedium (EM), osteogenem (ostDIM) und adipogenem (adiDIM) Differenzierungsmedium nach 48 h. Auf der RGD-funktionalisierten Oberfläche wurde im EM und ostDIM die mRNA-Expression von VEGF durch das Magnetfeld leicht erhöht, was auf FN im adiDIM detektiert wurde. Die Versuchsbedingungen wurden entsprechend S. 35 gewählt. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe normiert (Real-Time quantitative PCR) (n=3, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * p≤0,05).

Im Expansionsmedium und im osteogenen Differenzierungsmedium in Verbindung mit einer RGD-funktionalisierten Oberfläche konnte die Expression von VEGF durch die Applikation des Magnetfeldes leicht erhöht werden. Diese Effekte blieben bei Zellen auf der FN-funktionalisierten Oberfläche aus. Dort konnte dieses Expressionsmuster wiederum nur durch die Verwendung von adipogenem Differenzierungsmedium hervorgerufen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich hinsichtlich der Expression von Differenzierungsmarkern nach mechanischer Stimulation die Expressionsmuster zwischen RGD- und FN-funktionalisierten Oberflächen in Abhängigkeit des Mediums sehr ähnelten. Unabhängig vom Adhäsionssubstrat ließ sich nur die mRNA-Expression von Kollagen 1a durch mechanische Stimulation an β 1-Integrinen steigern, wobei sich dieser Effekt allerdings nur bei Verwendung von adipogenem Differenzierungsmedium zeigte. Im Gegensatz dazu wurde die mRNA-Expression von PPAR γ nach mechanischer Stimulation auf Fibronectin in Expansionsmedium und osteogenem Differenzierungsmedium vermindert, eine ähnlich Tendenz zeigte sich bei Verwendung RGD-funktionalisierter Oberflächen. Bzgl. der mRNA-Expression von VEGF konnte keine Steigerung im Vergleich zum Magnetfeld hervorgerufen werden. Grundsätzlich wurde die Matrixsteifigkeit der funktionalisierten Oberflächen durch die Aufbringung der (NCO-sP(EO-stat-PO))-Polymerbeschichtung auf der Glasoberfläche verringert, wobei durch die Immobilisierung von Fibronectin eine weitere Verringerung der Matrixsteifigkeit verzeichnet werden konnte.

4.7 Einfluss homogener Oberflächenfunktionalisierungen auf das Zellverhalten

In diesem Kapitel soll der Einfluss homogener RGD- und FN-Oberflächenfunktionalisierungen ohne zusätzliche mechanische Stimulation auf die Expression von Differenzierungsmarkern (Alkalische Phosphatase, Kollagen 1a, SOX 9 und PPAR γ) und den bioaktiven Faktor VEGF sowie das Adhäsionsverhalten und die osteogene Differenzierungsfähigkeit untersucht werden. Als Kontrollsubstrat diente je nach Anwendung entweder Polystyrol (TCP) oder Glas.

4.7.1 Expression von Differenzierungsmarkern

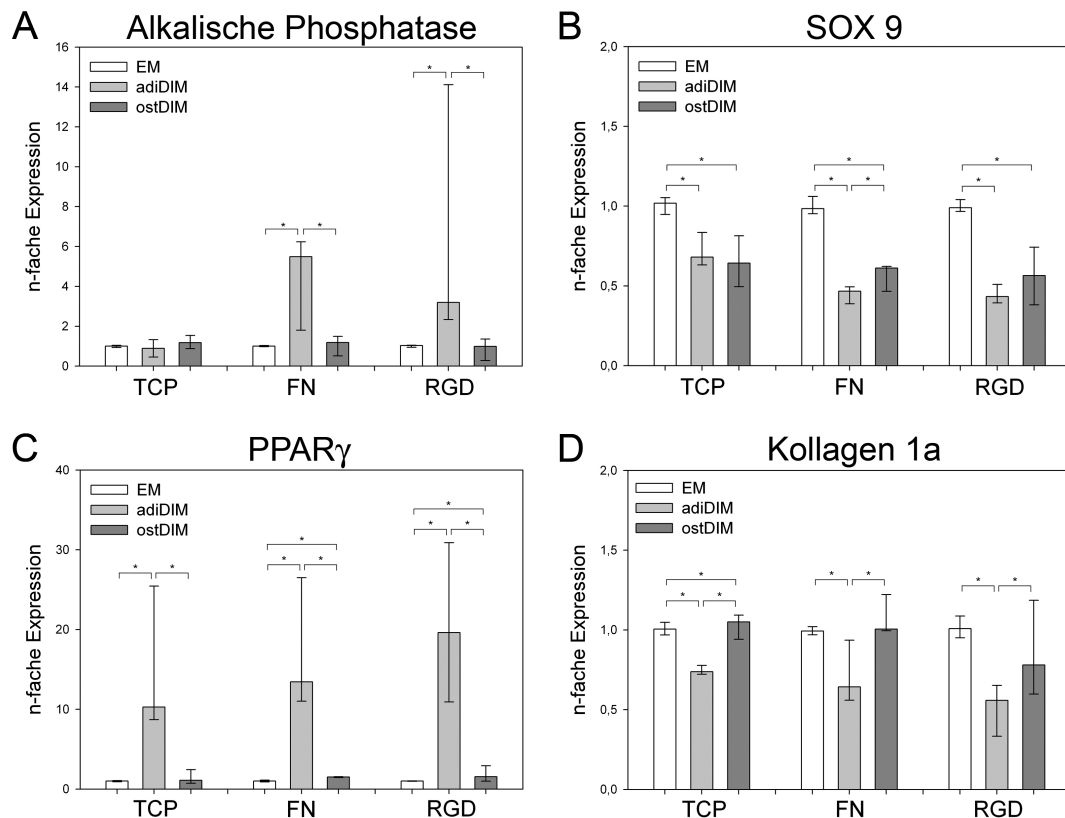


Abb. 29: Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern (A) Alkalische Phosphatase, (B) SOX 9, (C) PPAR γ und (D) Kollagen 1a nach 48 h (A)-(C) bzw. nach 24 h (D) in Expansionsmedium (EM), osteogenem (ostDIM) und adipogenem (adiDIM) Differenzierungsmedium. Während sich die Expressionsprofile von SOX 9, PPAR γ und Kollagen 1a im Hinblick auf die verwendeten Medien auf allen Oberflächen glichen, ließ sich die mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase in adiDIM auf RGD- und FN-funktionalisierten Oberflächen gegenüber TCP steigern. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe im EM normiert (Real-Time quantitative PCR) (n=3, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * p<0,05).

Mit Hilfe dieser Versuche sollte der kombinatorische Einfluss der RGD- bzw. FN-funktionalisierten Oberflächen in Verbindung mit verschiedenen Medien (Expansionsmedium sowie adipogenes

und osteogenes Differenzierungsmedium) auf die mRNA-Expression folgender Differenzierungsmarker bestimmt werden: den osteogenen Differenzierungsmarkern Alkalische Phosphatase und Kollagen 1a sowie des chondrogenen Differenzierungsmarker SOX 9 und des adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ (Abb. 29). Als Kontrollsubstrat wurde TCP verwendet.

Die mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase war auf TCP unabhängig vom verwendeten Medium, dagegen ließ sich auf RGD- und FN-funktionalisierten Oberflächen die Alkalische Phosphatase-Expression der Zellen nach 48 h in adipogenem Differenzierungsmedium signifikant gegenüber der Expression von Zellen in Expansionsmedium sowie osteogenem Differenzierungsmedium steigern (Abb. 29). Unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung konnte nur der Einsatz von adipogenem Differenzierungsmedium die mRNA-Expression von PPAR γ gegenüber dem Expansionsmedium innerhalb von 48 h steigern. Auch bei SOX 9 und Kollagen 1a waren die Effekte unabhängig von der verwendeten Oberflächenfunktionalisierung. Im Expansionsmedium war die Expression von SOX 9 bzw. Kollagen 1a am höchsten, während sie im adipogenen Differenzierungsmedium am niedrigsten war. Die mRNA-Expression von SOX 9 in osteogenem Differenzierungsmedium war vergleichbar mit der Expression in adipogenem Differenzierungsmedium, wohingegen die Kollagen 1a-Expression in osteogenem Differenzierungsmedium mit der Expression in Expansionsmedium vergleichbar war.

4.7.2 Freisetzung des bioaktiven Faktors VEGF

Die Untersuchung des kombinatorischen Einflusses der RGD- bzw. FN-funktionalisierten Oberflächen in Verbindung mit verschiedenen Medien (Expansionsmedium sowie adipogenes und osteogenes Differenzierungsmedium) auf die mRNA-Expression von VEGF innerhalb von 48 h war Ziel dieses Experimentes (Abb. 30). Als Kontrollsubstrat diente TCP.

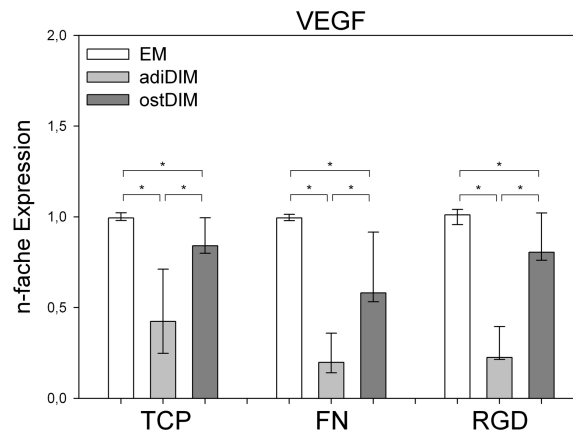


Abb. 30: Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die mRNA-Expression von VEGF nach 48 h in Expansionsmedium (EM), osteogenem (ostDIM) und adipogenem (adiDIM) Differenzierungsmedium. Das Expressionsprofil von VEGF im Hinblick auf die verwendeten Medien glich sich auf allen verwendeten Oberflächen. Alle Messergebnisse wurden jeweils auf die Kontrollgruppe im EM normiert (Real Time quantitative PCR) (n=3, Median mit 25./75. Perzentile, Mann-Whitney U-Test: * $p \leq 0,05$).

Die mRNA-Expression von VEGF war unabhängig vom verwendeten Substrat sowie abhängig vom verwendeten Medium. Durch die Verwendung von osteogenem und adipogenem Differenzierungsmedium konnte die VEGF-Expression signifikant gesenkt werden, wobei dieser Effekt im adipogenem Differenzierungsmedium stärker ausgeprägt war.

4.7.3 Osteogene Differenzierungsfähigkeit

Nach Bestimmung der mRNA-Expression von Differenzierungsmarkern innerhalb von 48 h sollte nun speziell der Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die osteogene Differenzierung der MSC innerhalb eines Zeitraums von 18 d untersucht werden. Dafür wurden die Zellen auf Glas bzw. einer homogenen RGD- oder Fibronectin-Oberflächenfunktionalisierung und unter osteogenen Differenzierungsbedingungen kultiviert. Als Parameter für den Nachweis der osteogenen Differenzierung der MSC diente sowohl die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Abb. 31) als auch die Einlagerung von Calcium-Ionen in die Matrix (Abb. 32).

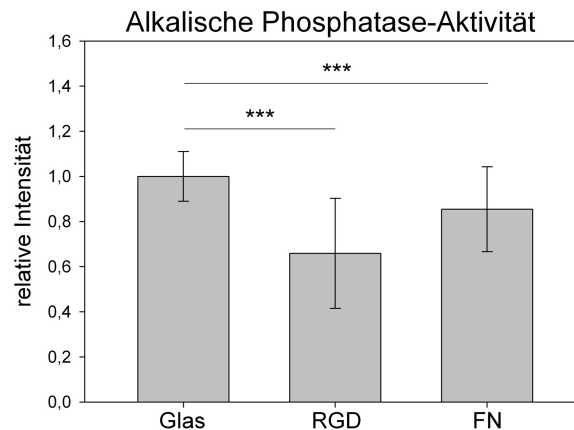


Abb. 31: **Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Alkalische Phosphatase-Aktivität der MSC unter osteogenen Differenzierungsbedingungen** nach 18 d. Es waren keine Unterschiede in der Alkalischen Phosphatase-Aktivität der Zellen zwischen RGD- und FN-Beschichtung nachweisbar. Die höchste Aktivität zeigte sich allerdings bei auf Glas kultivierten Zellen. Glas diente als Referenzoberfläche, worauf alle weiteren Messergebnisse normiert wurden (n=3, Mittelwert \pm Standardabweichung, t-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Nach einer Kultivierungsdauer von 18 d unter osteogenen Differenzierungsbedingungen konnte kein Unterschied in der Aktivität der Alkalischen Phosphatase zwischen Zellen auf einer homogenen RGD-Oberflächenfunktionalisierung und Zellen auf einer homogenen FN-Oberflächenfunktionalisierung festgestellt werden. Allerdings zeigten Zellen auf Glas eine höhere Aktivität der Alkalischen Phosphatase gegenüber Zellen, die auf funktionalisierten Adhäsionssubstraten kultiviert wurden.

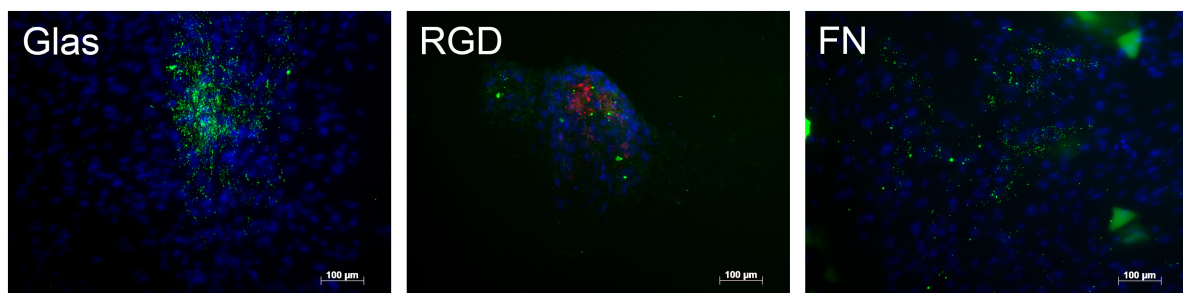


Abb. 32: **Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Matrixkalzifizierung unter osteogenen Differenzierungsbedingungen** nach 18 d. Der Nachweis der kalzifizierten Zellmatrix erfolgte mittels Calcein (grün) sowie die Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau) und ggf. Kernfärbung apoptotischer Zellen mit Propidiumjodid (rot) (Observer.Z1 Fluoreszenz-Mikroskop). Die zahlreichsten Ca^{2+} -Einlagerungen wurden auf Glas detektiert, etwas weniger auf der FN- und am wenigsten auf der RGD-Beschichtung.

Eine Einlagerung von Calcium-Ionen in die umliegende Matrix unter osteogenen Kultivierungsbedingungen (18 d) konnte auf allen verwendeten Adhäsionsmatrizes nachgewiesen werden. Be-

sonders zahlreiche Einlagerungen konnten auf Glas detektiert werden, etwas weniger waren es auf der homogenen Fibronektinbeschichtung. Die wenigsten Ca^{2+} -Einlagerungen konnten demnach auf der homogenen RGD-Beschichtung nachgewiesen werden.

Allerdings zeigte sich innerhalb der 18-tägigen Kultivierungszeit der MSC auf der homogenen RGD-Oberflächenfunktionalisierung, dass der Zellmonolayer nicht überall intakt blieb, sich haufenartige Zellstrukturen ausbildeten und nicht alle Zellen den Kontakt zum Substrat halten konnten. Im Inneren der haufenartigen Strukturen waren die Zellen teilweise apoptotisch.

Im Folgenden sollte die metabolische Aktivität der MSC unter osteogenen Differenzierungsbedingungen in Abhängigkeit von der Oberflächenfunktionalisierung nach 18-tägiger Kultivierung untersucht werden (Abb. 33A). Um die metabolische Aktivität auf die Zellzahl zu beziehen, erfolgte eine Zellzahlbestimmung, mit deren Hilfe auch das Proliferationsverhalten der MSC beschrieben werden soll (Abb. 33B).

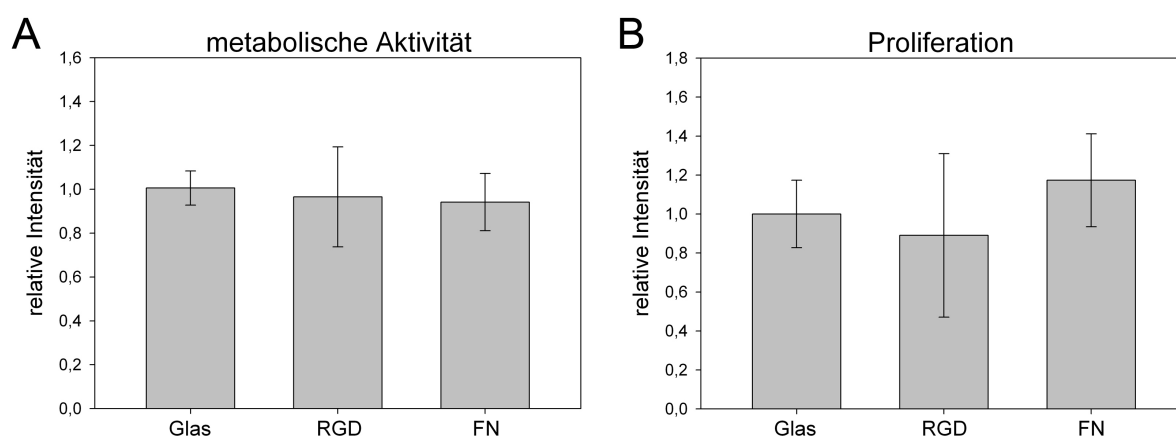


Abb. 33: Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf (A) die metabolische Aktivität und (B) das Proliferationsverhalten der MSC unter osteogenen Differenzierungsbedingungen nach 18 d. Sowohl die metabolische Aktivität als auch das Proliferationsverhalten der MSC zeigte sich unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung. Glas diente als Referenzoberfläche, worauf alle weiteren Messergebnisse normiert wurden ($n=3$, Mittelwert \pm Standardabweichung, t-Test: keine signifikanten Unterschiede).

Nach 18-tägiger Kultivierung der Zellen unter osteogenen Differenzierungsbedingungen konnten keine Unterschiede in der metabolischen Aktivität der Zellen in Abhängigkeit vom Adhäsionssubstrat detektiert werden, das gilt ebenfalls für das Proliferationsverhalten.

4.7.4 Adhäsionsverhalten

Die Zelladhäsion stellt eine essentielle Grundlage für zelluläre Prozesse wie die Differenzierung dar¹²⁶, daher soll mittels der folgenden Experimente das Adhäsionsverhalten der MSC auf homo-

genen RGD- bzw. Fibronectin-Oberflächenfunktionalisierungen bzgl. morphometrischer Parameter wie Zellgröße und -form sowie der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts und der Formierung von Fokalkontakten untersucht werden.

Ausbreitung der Zellen

Zur Beschreibung der Zellausbreitung in Abhängigkeit von der Oberflächenfunktionalisierung wurden als morphometrische Parameter Größe bzw. Form der Zellen gewählt, wofür die Zellfläche bzw. der Formfaktor bestimmt wurden (Abb. 34).

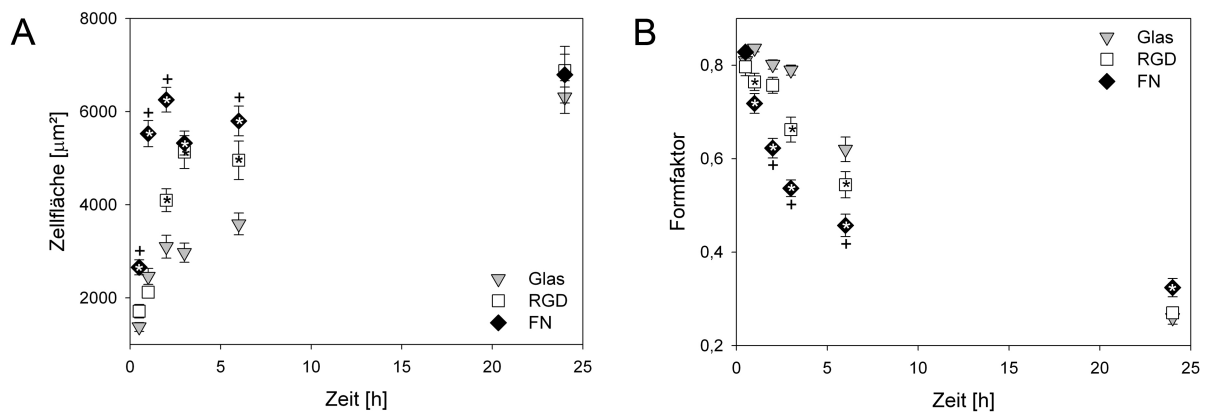


Abb. 34: **Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Zellausbreitung.** Dargestellt sind (A) Größe und (B) Form von Zellen auf Glas sowie homogenen RGD- und FN-Beschichtungen im Zeitverlauf von 24 h. Die Zellen breiteten sich am schnellsten auf Fibronectin und am langsamsten auf Glas aus sowie erreichten auf Fibronectin am schnellsten ihre endgültige Form. Nach 24 h hatten sich Größe und Form der Zellen angeglichen (n=45, Mittelwert \pm SEM, Mann-Whitney U-Test mit $p < 0,05$: * RGD oder FN gegen Glas, + RGD gegen FN).

Bis zu einer Adhäsionszeit von 6 h zeigten sich signifikante Unterschiede in der Zellfläche zwischen allen drei Oberflächen, wobei sich die Zellen auf Glas am wenigsten und auf Fibronectin am stärksten ausbreiteten. Die Unterschiede bzgl. der Zellfläche in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung glichen sich nach 24 h an. Während die Zellen auf Fibronectin bereits nach 2 h ihre maximale Fläche erreicht hatten, breiteten sich Zellen auf RGD und Glas noch innerhalb von 6 h aus.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellform zwischen den Oberflächen nach einer Adhäsionszeit von 30 min. Zu späteren Zeitpunkten nahm der Formfaktor am stärksten bei Zellen auf Fibronectin ab, was darauf hindeutet, dass die Zellen auf Fibronectin immer stärker von der runden Form abwichen und somit auch früher eine polygonale Form annahmen als Zellen auf RGD oder Glas. Nach 24 h hatten sich die anfänglichen Unterschiede hinsichtlich des Formfaktors zwischen den verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen angeglichen.

Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte

Da Unterschiede in der Zellausbreitung bereits nach einer Stunde nachzuweisen waren (Abb. 34), stellte sich anschließend die Frage, ob diese Unterschiede auch in der Organisation sowohl des Aktin-Zytoskeletts als auch der Fokalkontakte erkennbar sein würden. Dafür wurden das Aktin-Zytoskelett sowie Paxillin als ein Protein der Fokalkontakte nach einer einstündigen Adhäsionszeit der Zellen auf Glas, RGD-Peptiden und Fibronektin visualisiert (Abb. 35).

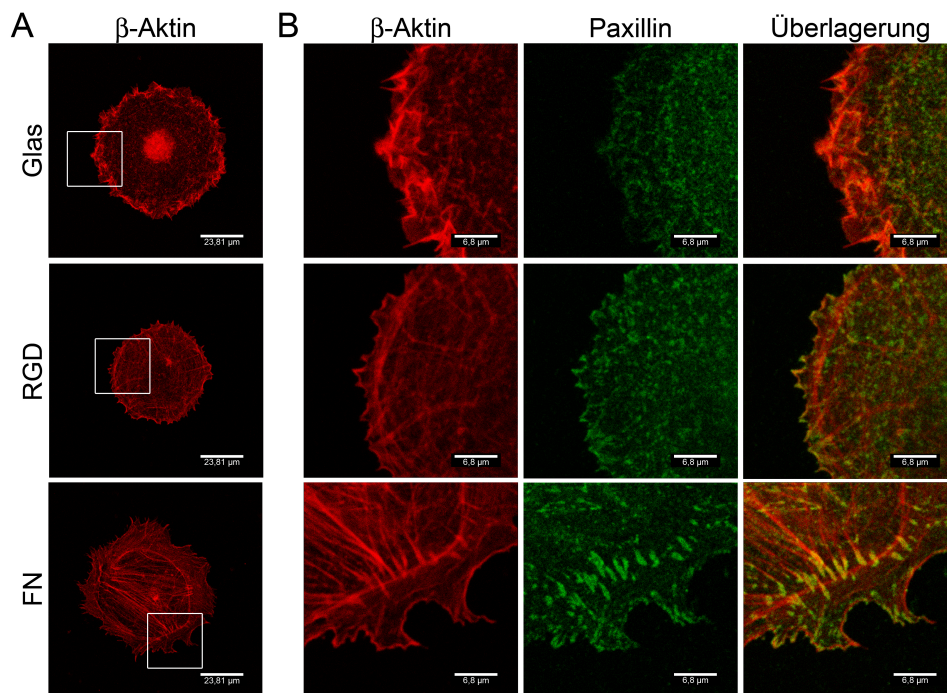


Abb. 35: **Organisation des Aktinzytoskeletts und der Fokalkontakte auf homogenen Oberflächen-funktionalisierungen nach 1 h.** (A) Dargestellt ist das Aktinzytoskelett von Zellen auf Glas, RGD und FN sowie in (B) die Ausschnittvergrößerung des weißen Quadrates aus (A) mit zusätzlicher Visualisierung der Fokalkontakte mittels Paxillin-Färbung (Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SP2 AOBS). Während sich auf Fibronektin das Aktin-Zytoskelett bereits bogenförmige und zirkuläre Fasern sowie Fokalkontakte gebildet hatten, waren Strukturen in diesem Ausmaß auf Glas und RGD noch nicht erkennbar.

Nach einstündiger Adhäsionszeit ließen sich deutliche Unterschiede in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts der Zellen auf verschiedenen Oberflächen erkennen. Zellen auf Fibronektin bildeten bereits ein gut organisiertes Aktin-Zytoskelett mit bogenförmigen und zirkulären Fasern sowie dorsale, in Fokalkontakte endende Fasern aus, erkennbar durch die Kolo-kalisation von Aktin mit Paxillin. Die Organisation von Aktin bei Zellen auf Glas war dagegen noch nicht so weit fortgeschritten. Zellen auf RGD-Peptiden bildeten schon erste bogenförmige Aktinstrukturen aus. In beiden Fällen lag Paxillin noch diffus im Zytoplasma vor.

Ausgehend vom Ergebnis, dass die Zellen unabhängig von der verwendeten Oberfläche nach 24 h keine signifikanten Unterschiede in der Zellfläche mehr aufwiesen, wurde die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte 24 h nach Zellaussaat untersucht (Abb. 36). Für die Visualisierung der Fokalkontakte wurde Vinkulin als ein Protein der Fokalkontakte nachgewiesen.

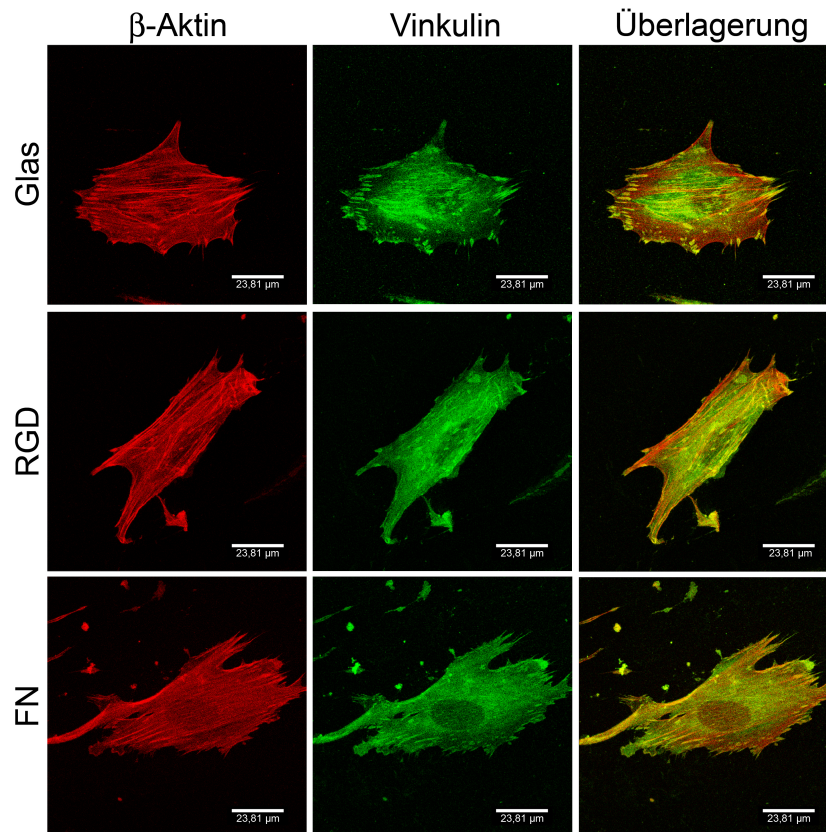


Abb. 36: **Organisation des Aktinzytoskeletts und der Fokalkontakte auf homogenen Oberflächen-funktionalisierungen nach 24 h.** Dargestellt ist das Aktinzytoskeletts von Zellen auf Glas, RGD und FN. Die Visualisierung der Fokalkontakte erfolgte mittels Vinkulin-Färbung (Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SP2 AOBS). Nach 24 h hat sich das Aktinzytoskelett der Zellen unabhängig von der Oberflächenfunktionalisierung in Stressfasern organisiert und es wurden auf allen Oberflächen Fokalkontakte ausgebildet.

Nach 24 h hatten sich anfängliche Unterschiede in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts von Zellen auf Glas, RGD und FN angeglichen. Unabhängig vom Substrat organisierte sich Aktin in allen Zellen in Form von Stressfasern, die die gesamte Zelle durchzogen und in Fokalkontakten endeten, erkennbar durch die Kolokalisation von Aktin und Vinkulin. Im Vergleich der drei Oberflächen scheinen die Fokalkontakte in Zellen auf Glas größer zu sein. Für eine gesicherte Aussage diesbezüglich erfolgte eine quantitative Analyse der Fokalkontakte (Abb. 37). Dafür wurde das Protein Vinkulin als Bestandteil der Fokalkontakte in den Zellen visualisiert und

anschließend Fläche und Form der Fokalkontakte bestimmt.

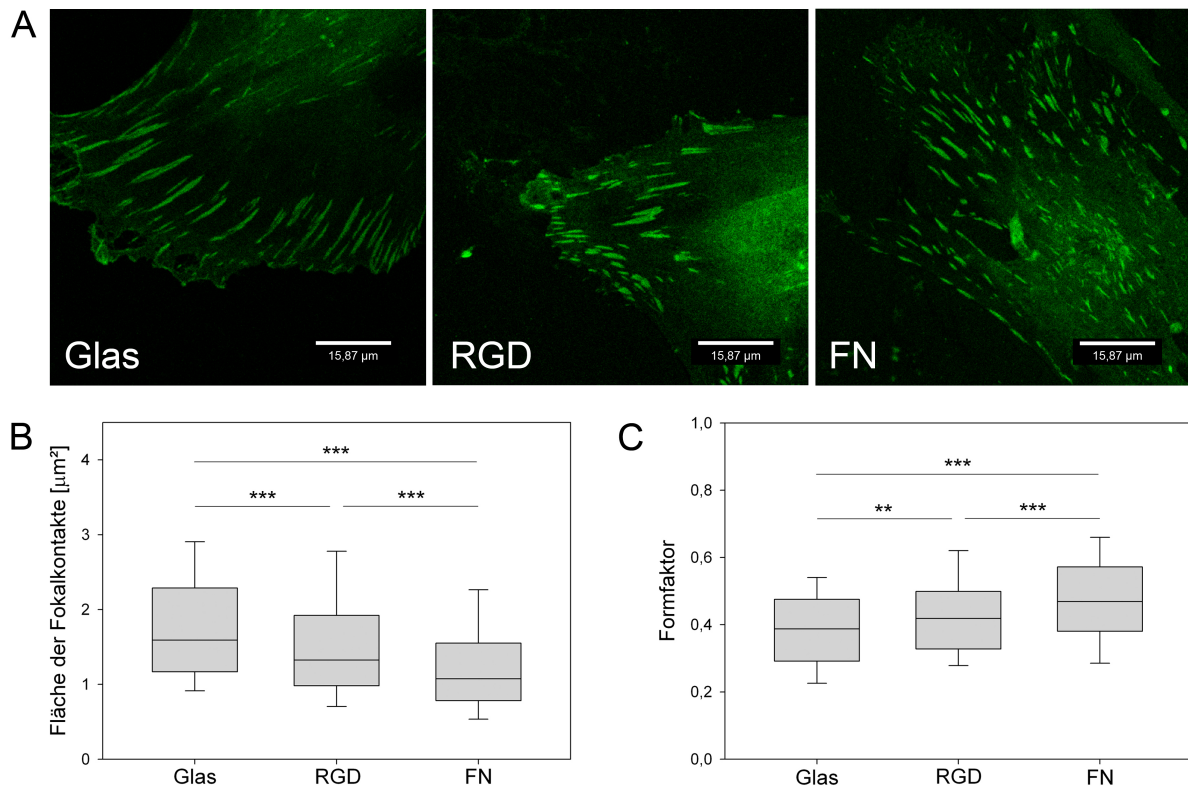


Abb. 37: **Quantitative Analyse der Fokalkontakte auf homogenen Oberflächenfunktionalisierungen** nach 24 h. (A) Die Visualisierung der Fokalkontakte erfolgte mittels Vinkulin-Färbung (Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SP2 AOBS). (B) Fläche und (C) Formfaktor der Fokalkontakte wurde in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung bestimmt (n=6 mit 40 Fokalkontakten/Zelle, *box plot*, Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Es zeigte sich, dass die Fokalkontakte auf Glas am größten bzw. auf Fibronectin am kleinsten sowie am elongiertesten bzw. rundesten waren. Bzgl. Größe und Form nahmen Zellen auf RGD immer eine Mittelstellung zwischen Glas und Fibronectin ein.

Die Fokalkontakte waren in Zellen auf Glas am größten und in Zellen auf Fibronectin am kleinsten. Neben der Größe unterschied sich auch die Form der Fokalkontakte. Im Vergleich zu Zellen auf Fibronectin waren die Fokalkontakte in Zellen auf Glas elongierter. Die Fokalkontakte der Zellen auf RGD nahmen bzgl. Fläche und Form immer eine Mittelstellung zwischen den Fokalkontakten von Zellen auf Glas und Fibronectin ein.

In der zusammenfassenden Betrachtung dieses Kapitels kann festgestellt werden, dass die Wahl sowohl des Mediums als auch des Adhäsionssubstrates einen Einfluss auf die Expression von Differenzierungsmarker hatte. Dabei zeigten besonders SOX 9, PPAR γ und Kollagen 1a ähnliche Expressionsmuster in Reaktion auf die Medien unabhängig vom Substrat, wie ebenfalls der bio-

aktive Faktor VEGF. Bezüglich der Expression der Alkalischen Phosphatase war das Substrat entscheidend für die Höhe der Expression unter adipogenen Differenzierungsbedingungen. Es wird deutlich, dass die osteogene Differenzierungsfähigkeit der MSC nach 18 d unter osteogenen Differenzierungsbedingungen, charakterisiert durch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und den Grad der Matrixkalzifizierung, auf den RGD- und FN-funktionalisierten Oberflächen niedriger als auf Glas war. Das Proliferationsverhalten und die metabolische Aktivität der MSC unter diesen Versuchsbedingungen war dagegen unabhängig vom verwendeten Adhäsionssubstrat. Das Adhäsionsverhalten der MSC, die auf Glas sowie RGD- bzw. FN-funktionalisierten Oberflächen kultiviert wurden, unterschied sich primär in frühen Zeitpunkten. Dabei adhärten die Zellen schneller auf FN als auf RGD und am schlechtesten auf Glas. Dieser Effekt spiegelte sich auch im Organisationsgrad des Aktinzytoskeletts und der Fokalkontakte wider. Nach einstündiger Adhäsionszeit bildeten nur die Zellen auf Fibronectin Aktinfilamente und Fokalkontakte aus. Allerdings schienen sich die anfänglichen Unterschiede nach 24 h anzugleichen. Die quantitative Analyse von Größe und Form der Fokalkontakte zeigte allerdings, dass es signifikante Unterschiede in Abhängigkeit der verwendeten Oberfläche gab. Die Fokalkontakte waren in Zellen kultiviert auf Glas am größten, während sie in Zellen auf Fibronectin am kleinsten waren. Die Größe der Fokalkontakte nahm in Zellen, die auf der RGD-Oberflächenfunktionalisierung kultiviert wurden, eine Mittelstellung ein. Insgesamt gilt, je größer die Fokalkontakte waren, desto elongierter waren sie.

4.8 Einfluss von Oberflächenfunktionalisierungen in Streifenform auf das Zellverhalten

Mit Hilfe der nachfolgenden Experimente sollte der Einfluss der Oberflächentopographie in Form von Streifenstrukturen mit verschiedenen Breite-Abstand-Kombinationen auf das Verhalten der MSC untersucht werden. Die Mikrostrukturierung wurde durch *microcontact printing* von Fibronectin auf die zellabweisende NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymerschicht aufgebracht.

4.8.1 Visualisierung der Streifenstrukturen

Zur Überprüfung der gewählten Breite-Abstand-Kombinationen wurden die aufgetragenen Fibronectinstreifen visualisiert. In Abb. 38 sind die Streifenbreiten 10 μm , 20 μm , 50 μm und 80 μm exemplarisch mit je einer Abstandsbreite dargestellt.

Die Fibronectinstreifen waren bei allen Breite-Abstand-Kombinationen deutlich zu erkennen und entsprachen mit geringen Abweichungen den angegebenen Streifenbreiten.

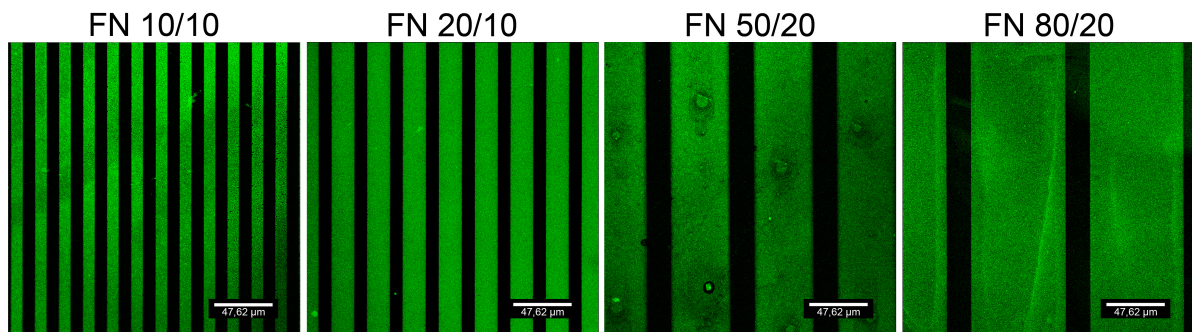


Abb. 38: **Visualisierung der Fibronectinstreifen.** Zu jeder Streifenbreite (10 μm , 20 μm , 50 μm , 80 μm) wurde exemplarisch je eine Abstandsweite ausgewählt. Die Visualisierung der Fibronectinstreifen erfolgte mittels Fibronectin-Färbung (Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SP2 AOBS).

4.8.2 Morphologie der MSC

Die Morphologie der MSC nach 24-stündiger Kultivierung auf Fibronectinstreifen verschiedenster Breite-Abstand-Kombinationen ist in Abb. 39 dargestellt. Eine homogene Fibronectinbeschichtung diente als Kontrollsubstrat.

Bei einer Streifenbreite von 80 μm und 50 μm konnten mehrere Zellen nebeneinander auf einem Streifen adhären und sich ausbreiten. Ein Überwachsen des nicht-adhäsiven Abstandes von 20 μm wurde nicht beobachtet. Wurde der Streifenabstand auf 5 μm reduziert, wurde die Zellausbreitung über mehrere Streifen ermöglicht und ging mit einem Verlust der Zellausrichtung entlang der Streifen einher. Das Phänomen der Zellausbreitung über mehrere Streifen konnte auch bei Streifenbreiten von 10 μm bzw. 20 μm beobachtet werden, allerdings schien hier die Richtung der Streifen noch maßgeblich für die Ausrichtung der Zellen verantwortlich zu sein. Bei Vergrößerung des Streifenabstandes auf 10 μm breiteten sich die Zellen vermehrt nur entlang eines Streifens aus, was in einer spindelförmigen Morphologie resultierte. Aber auch die Ausbreitung über mehrere Streifen blieb hier vereinzelt erhalten.

Für die nachfolgenden Experimente wurde der Abstand zwischen den Fibronectinstreifen größtmöglich gewählt, um ein Überwachsen des nicht-adhäsiven Zwischenraumes durch die Zellen zu reduzieren. Es wurden gezielt die Effekte der Streifenbreite auf Größe, Form und Ausrichtung der Zellen sowie der Zellkerne bestimmt. Weiterhin sollte die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte in Abhängigkeit von der streifenförmigen Oberflächentopographie untersucht werden. Für die folgenden Untersuchungen wurden nur Zellen ausgewählt, die auf einem adhäsiven Streifen adhären waren.

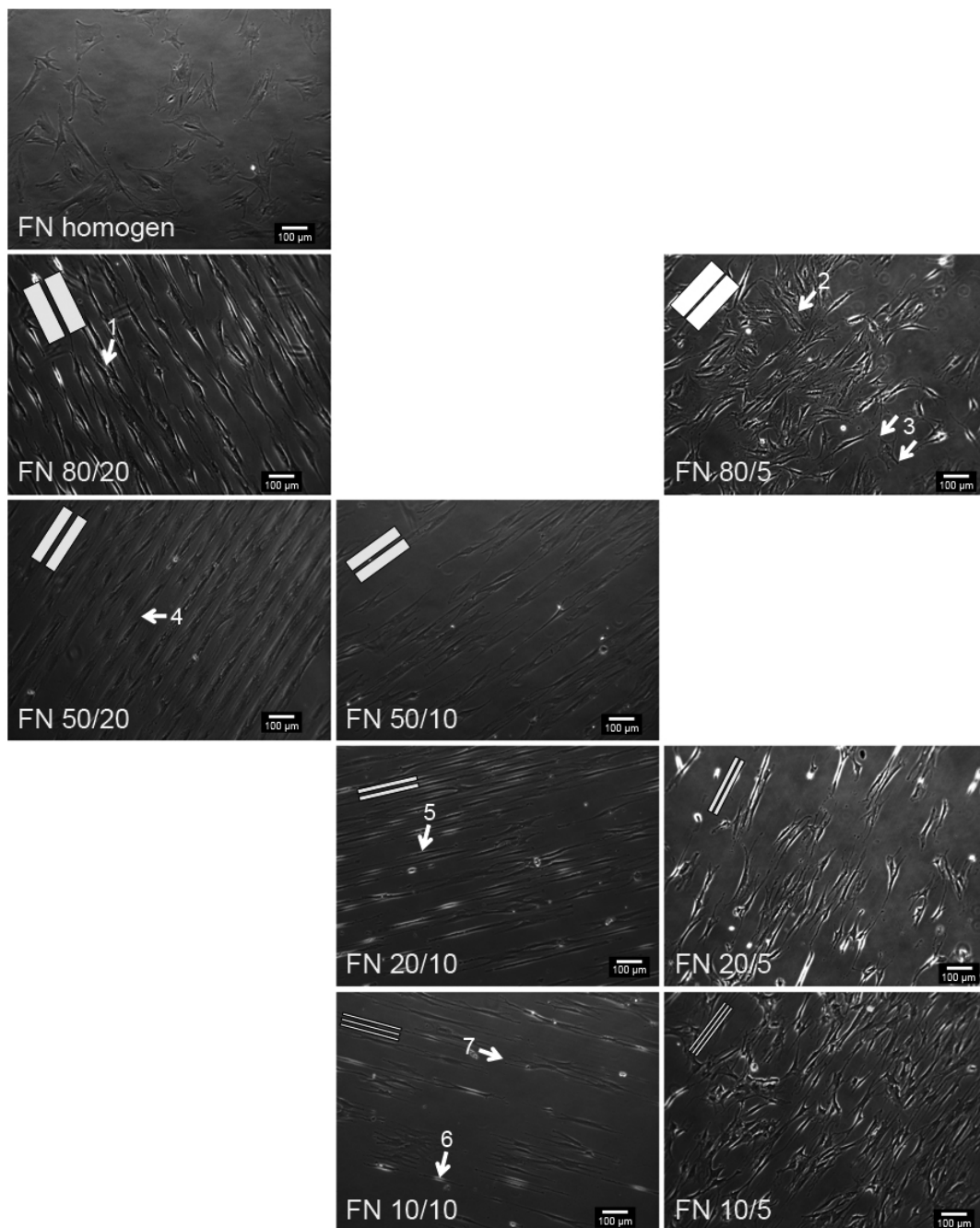


Abb. 39: Morphologie der MSC auf Fibronectinstreifen nach 24 h. Besonderheiten sind mit Pfeilen gekennzeichnet. **Pfeile 1 und 4:** Ausbreitung der Zellen nebeneinander auf einem Streifen, **Pfeil 2:** Zellausrichtung vertikal zur Streifenausrichtung, **Pfeile 3 und 7:** vermehrte Membranausstülpungen durch Adhäsion auf mehreren Streifen, **Pfeile 5 und 6:** spindelförmiges Aussehen der Zellen durch Adhäsion auf nur einem Streifen. Die weißen Balken entsprechen jeweils einer maßstabgetreuen Darstellung der Streifenbreiten (Axiovert-Mikroskop).

4.8.3 Ausrichtung der MSC

Im folgenden Experiment wurde die Ausrichtung der Zellen und der Zellkerne auf verschiedenen Streifenbreiten ($10\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$ und $80\ \mu\text{m}$) untersucht, als Kontrollsubstrate dienten homogene Fibronectin-Oberflächenbeschichtungen (Abb. 40). Zur Visualisierung der Zellen wurde das Aktin-Zytoskelett der Zellen sowie der Zellkern. Anschließend wurde die Orientierung der Zellen bzw. der Zellkerne mit Hilfe einer horizontalen Kontrolllinie bestimmt. Die Ausrichtung der Streifen betrug jeweils 90° .

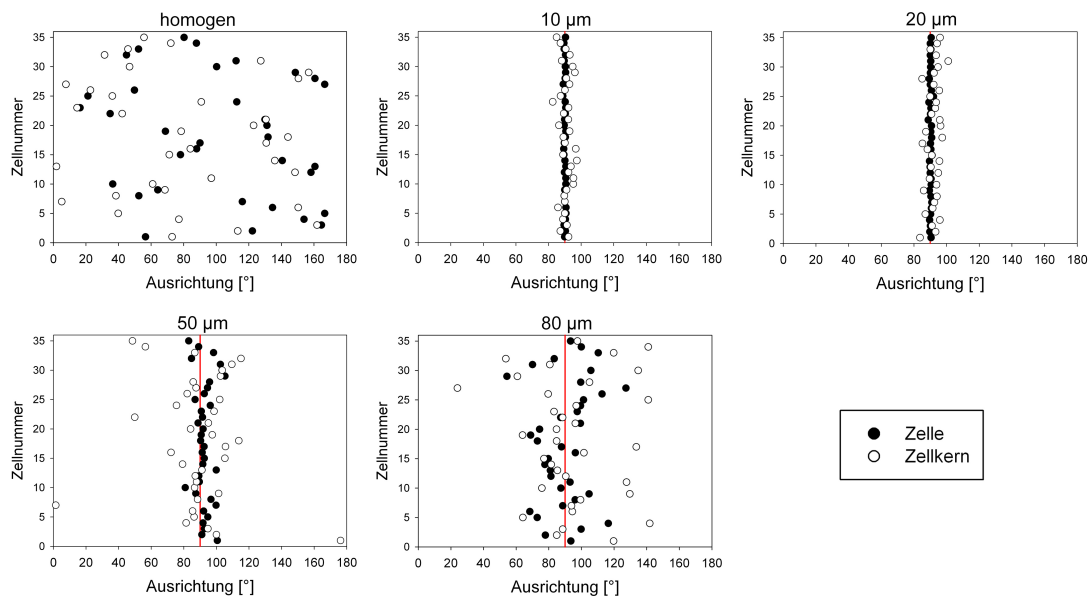


Abb. 40: **Orientierung der Zellen und der Zellkerne auf Fibronectin-Streifenstrukturierungen** mit einer Breite von $10\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$ und $80\ \mu\text{m}$ sowie als Kontrolle auf einer homogenen Fibronectin-Beschichtung. Je schmaler die Streifen, desto stärker orientierten sich die Zellen und Zellkerne an der Ausrichtung der Streifen, im Gegensatz zur zufälligen Orientierung auf der homogenen Fibronectin-Beschichtung. Die Ausrichtung der Streifen betrug 90° und wurde jeweils mittels einer roten Linie dargestellt ($n=35$).

Je schmaler die Fibronectinstreifen wurden, desto mehr orientierten sich die Zellen an der Ausrichtung der Streifen. Auffällig ist, dass die Orientierung des Zellkerns besonders bei Streifenbreiten ab $50\ \mu\text{m}$ sowie der homogenen Fibronectinbeschichtung erheblich von der Orientierung des zugehörigen Zellkörpers abweichen konnte.

4.8.4 Form und Größe der Zellen bzw. der Zellkerne

Der Einfluss der Streifenstrukturierung auf Form und Größe der Zellen (Abb. 41) bzw. der Zellkerne (Abb. 42) ist nachfolgend dargestellt. Für die Beurteilung der Formveränderung wurde als

Parameter wie schon zuvor der Formfaktor herangezogen.

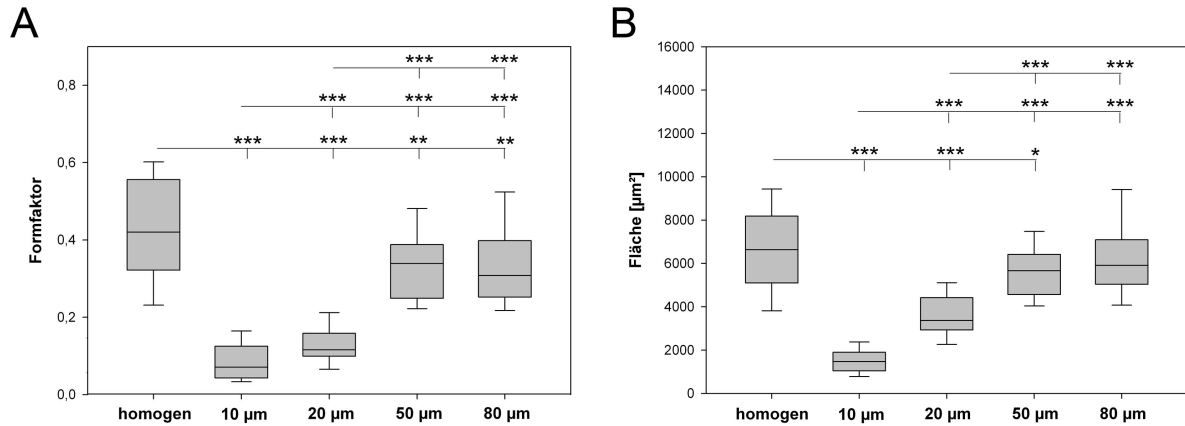


Abb. 41: **Einfluss der Streifenbreite auf morphometrische Parameter der Zelle.** (A) Formfaktor und (B) Fläche der Zellen wurde in Abhängigkeit der Fibronectin-Streifenbreiten bestimmt. Je schmaler die Streifen, desto elongierter und kleiner wurden die Zellen ($n=35$, box plot, Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Es konnte eine deutliche Abhängigkeit des Formfaktors von der vorliegenden Streifenbreite festgestellt werden. Je schmaler die Fibronectinstreifen waren, desto kleiner wurde der Formfaktor. Im Vergleich zur homogenen Fibronectinbeschichtung wiesen die Zellen auf allen möglichen Streifenbreiten einen geringeren Formfaktor auf. Generell lässt sich sagen, je schmaler die Streifen, desto geringer der Formfaktor, allerdings ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen kultiviert auf 50 μm und 80 μm breiten Streifen nachweisen.

Entsprechend der Formveränderung der Zellen ergaben sich auch deutliche Unterschiede in der Zellfläche. Die Zellfläche war bei 10 μm breiten Streifen am kleinsten und zeigte zu allen anderen Streifenbreiten sowie dem Kontrollsubstrat hoch signifikante Unterschiede, d.h. je breiter die Fibronectin-Streifen wurden, desto größer wurde die Zellfläche. Die Fläche der Zellen auf 20 μm breiten Streifen war ebenso gegen alle anderen Streifenbreiten und der homogenen Fibronectinbeschichtung signifikant verschieden. Allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellfläche bei Zellen, die auf 50 μm und 80 μm breiten Streifen sowie 80 μm und der homogenen Fibronectinbeschichtung kultiviert wurden. Die größten Zellflächen erreichten Zellen auf homogenen Fibronectinbeschichtungen.

Die Zellkerne von Zellen, die auf der homogenen Fibronectinbeschichtung als Kontrollsubstrat kultiviert wurden, besaßen den größten Formfaktor. Je schmaler die Fibronectinstreifen wurden, desto geringer wurde auch der Formfaktor. Auch hier ließ sich kein signifikanter Unterschied des Formfaktors zwischen Zellkernen von Zellen, die auf 50 μm und 80 μm breiten Streifen kultiviert wurden, feststellen.

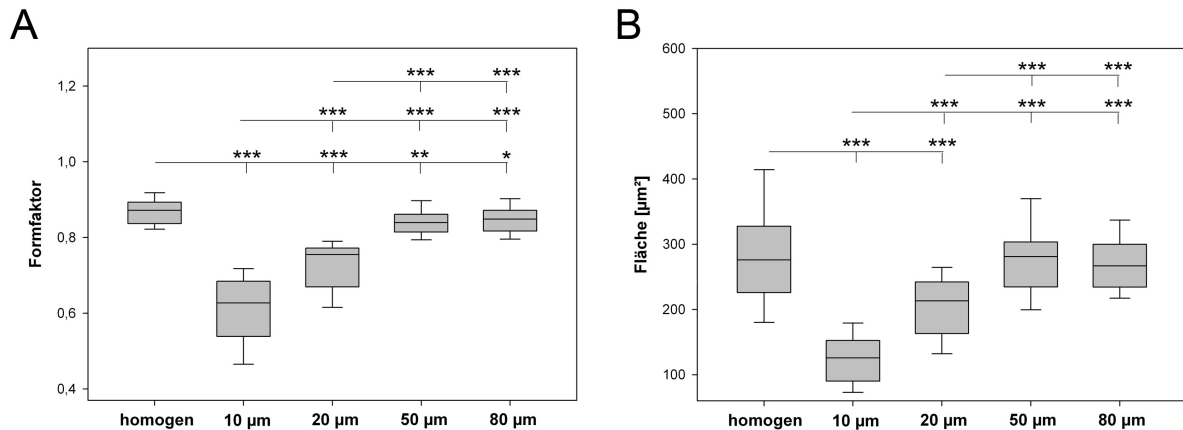


Abb. 42: **Einfluss der Streifenbreite auf morphometrische Parameter des Zellkerns.** (A) Formfaktor und (B) Fläche der Zellen wurde in Abhängigkeit der Fibronectin-Streifenbreiten bestimmt. Je schmäler die Streifen, desto elongierter und kleiner wurden die Zellkerne (n=35, box plot, Mann-Whitney U-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

Die Fläche der Zellkerne war bei Zellen auf der homogenen Fibronectinbeschichtung, den 80 µm und 50 µm breiten Streifen am größten und bei einer Streifenbreite von 10 µm am geringsten. Eine Mittelstellung nahm hier die Zellkernfläche von Zellen, die auf 20 µm breiten Streifen kultiviert wurden, ein.

4.8.5 Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte

Im Folgenden sollte der Einfluss der Oberflächentopographie in Streifenform auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 43) und der Fokalkontakte (Abb. 44) 24 h nach Zellaussaat untersucht werden. Für die Darstellung der Fokalkontakte erfolgte eine Vinkulinfärbung.

Während die Aktin-Stressfasern in Zellen auf der homogenen Fibronectin-Beschichtung keine präferenzielle Orientierung zeigten, waren die Stressfasern bei einer Streifenbreite von 10 µm gemäß der Ausrichtung der Zellen auf den Streifen in Richtung der Streifen orientiert. Je breiter die Streifen, desto weniger ausgerichtet erschienen die Stressfasern. Dabei wurde die Anzahl der Stressfasern mit abnehmender Streifenbreite zunehmend reduziert. Bei Zellen, kultiviert auf einer Streifenbreite von 10 µm, begrenzten zwei Aktin-Stressfasern den Zellkörper entlang der Streifenkanten. Die Dicke der Aktin-Stressfasern erschien unabhängig von der Oberflächentopographie.

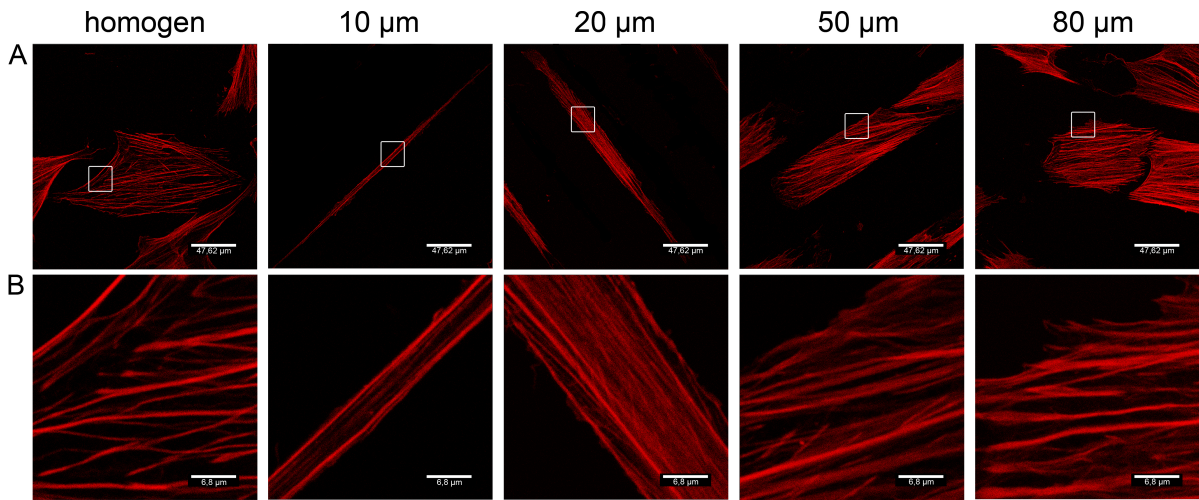


Abb. 43: **Organisation des Aktin-Zytoskeletts auf Fibronectinstreifen verschiedener Breite nach 24 h.** Dargestellt ist in (A) das Aktin-Zytoskeletts der MSC auf verschiedenen Streifenbreiten und der homogenen Fibronectin-Beschichtung sowie in (B) die Vergrößerung des in (A) gekennzeichneten Ausschnittes. Mit zunehmender Reduzierung der Streifenbreite kam es zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts in Form einer strikteren Orientierung entlang der Ausrichtung der Streifen (Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SP2 AOBS).

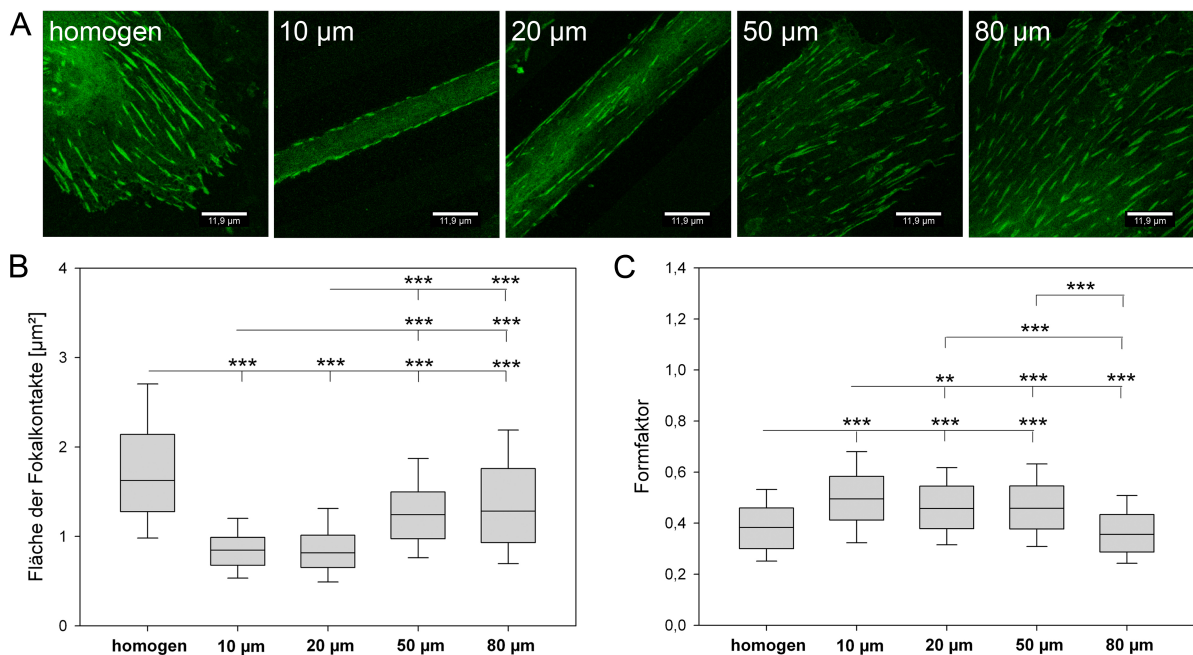


Abb. 44: **Quantitative Analyse der Fokalkontakte auf Fibronectinstreifen verschiedener Breite nach 24 h.** (A) Die Fokalkontakte wurden mittels Vinkulin-Färbung visualisiert (Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Leica TCS SP2 AOBS). (B) Fläche und (C) Formfaktor der Fokalkontakte wurde in Abhängigkeit von der Streifenbreite bestimmt (n=6 mit 40 Fokalkontakten/Zelle, box plot, Mann-Whitney U-Test: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). Je schmaler die Streifen, desto mehr orientierten sich die Fokalkontakte entlang der Ausrichtung der Streifen und desto kleiner und runder wurden die Fokalkontakte.

Entsprechend der Beobachtung, dass zwei Aktin-Stressfasern die Zellen auf 10 μm breiten Fibronektinstreifen einrahmten, waren die Fokalkontakte linienförmig entlang der Ausrichtung der Streifen angeordnet. Je breiter die Streifen, desto weniger folgte die Anordnung der Fokalkontakte der Ausrichtung der Streifen. Die Größe der Fokalkontakte war dabei abhängig von der Streifenbreite, auf der die Zellen kultiviert wurden. Je schmaler die Streifen, desto kleiner wurden auch die Fokalkontakte. Dabei ergaben sich keine Größenunterschiede der Fokalkontakte zwischen Zellen die auf Streifenbreiten von 10 μm und 20 μm bzw. 50 μm und 80 μm kultiviert wurden. Neben der Größe wurde auch die Form der Fokalkontakte beeinflusst. Entsprechend dem geringsten Formfaktor waren die Fokalkontakte auf der homogenen Fibronektinbeschichtung am länglichsten und wurden umso runder, je schmaler die Fibronektinstreifen wurden. Hierbei ergaben sich keine Formunterschiede der Fokalkontakte zwischen Zellen, die auf 20 μm und 50 μm breiten Streifen bzw. 80 μm breiten Streifen und der homogenen Fibronektinbeschichtung kultiviert wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Morphologie der Zellen durch den Einsatz von mikrostrukturierten Oberflächenflächen in Streifenform beeinflussen ließ. Dabei führte die Verringerung der Streifenbreite von 80 μm auf 10 μm zur Reduktion der Größe und einer elongierteren Form sowohl des Zellkerns als auch der Zelle selbst. Des Weiteren orientierten sich die Zellen strikter an der Ausrichtung der Streifen, je schmaler die Streifen wurden. Die morphologischen Veränderungen wurden von einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts begleitet. Hierbei gilt, je schmaler die Streifen, desto weniger Aktin-Stressfasern durchzogen die Zellen und desto mehr folgte die Orientierung der Stressfasern der Ausrichtung der Streifen. Weiterhin kam es zur Verkleinerung sowie Abrundung der Fokalkontakte mit abnehmender Streifenbreite.

4.9 Schematische und zusammenfassende Ergebnisdarstellung

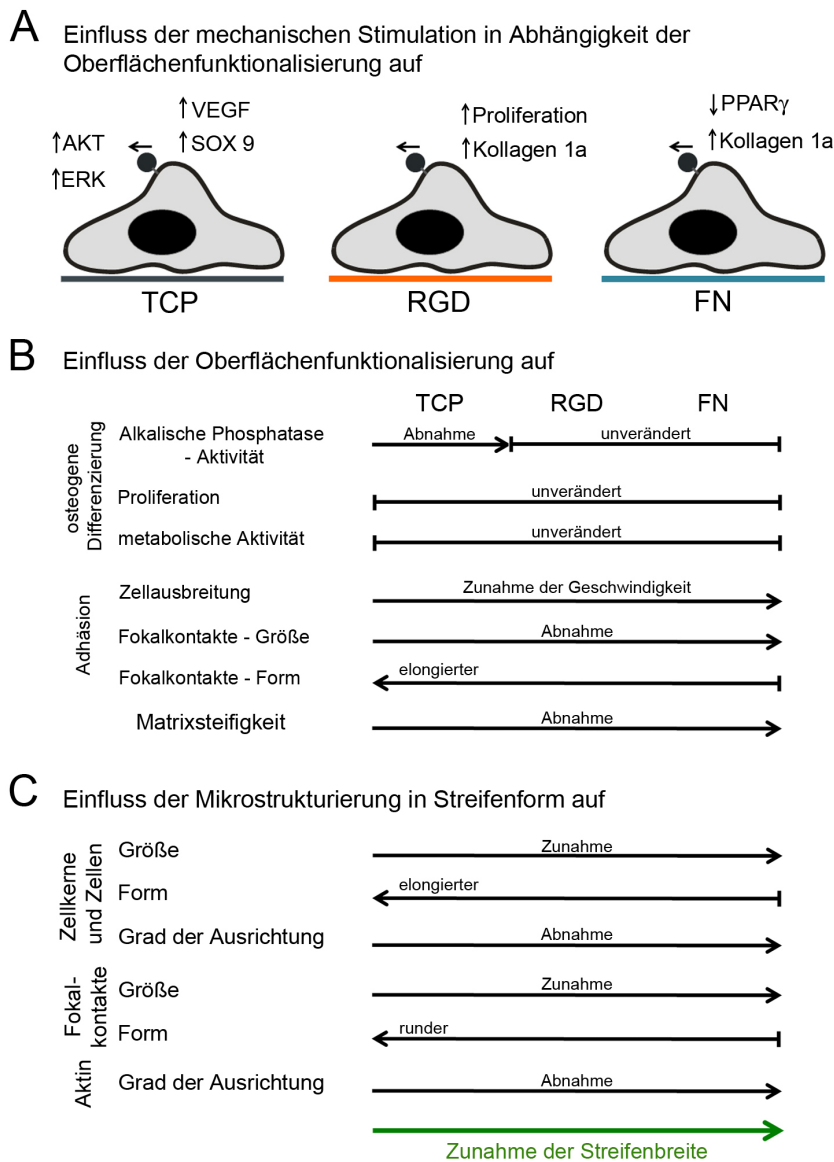


Abb. 45: **Schematische und zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse** der vorliegenden Arbeit. Skizziert sind der Einfluss der (A) mechanischen Stimulation an $\beta 1$ -Integrinen in Abhängigkeit der Oberflächenfunktionalisierung, (B) Oberflächenfunktionalisierung und (C) Mikrostrukturierung in Streifenform auf verschiedenste funktionelle Parameter.

5 Diskussion

Mesenchymale Stammzellen werden nach *ex vivo* Kultivierung bereits im Rahmen klinischer Versuchsreihen zur Behandlung verschiedenster Krankheitsbilder wie Diabetes mellitus Typ 1²¹², chronisch obstruktiver Lungenerkrankung³⁵ und akutem Myokardinfarkt³¹ eingesetzt, wobei gewebeerneuernde und/oder immunmodulatorische Effekte der MSC erwartet werden. Die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark zur Gewebereparatur bzw. -regeneration *in vivo* stellt einen komplexen mehrschrittigen Prozess dar, bestehend aus der Signalerkennung von aus dem beschädigten Gewebe stammenden Signalen durch die MSC, Freisetzung der MSC aus ihrer Nische in den Blutkreislauf (Mobilisierung), sog. *homing* der zirkulierenden MSC ins Zielgewebe sowie der Proliferation und Differenzierung der MSC *in situ* in funktionale Zellen¹¹⁵. Die Applikation *ex vivo* kultivierter MSC kann entweder intravenös oder durch Implantation im Zielgewebe erfolgen¹¹⁵. Im ersten Fall müssen die MSC erst durch den Prozess des *homing* in das Zielgewebe gelangen, während im zweiten Fall ausschließlich die Proliferation und Differenzierung *in situ* nötig ist.

Für die Verwendung von MSC in der Regenerativen Medizin ist deren Identifikation von höchster Bedeutung, da verschiedene Protokolle zur Isolierung sowie Expansion herangezogen werden können⁴³ und mittlerweile auch nicht-mesodermale Gewebearten als Quelle verwendet werden^{101,137}. Die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) hat auf Grund dieser Problematik Minimal Kriterien zur Charakterisierung von MSC vorgeschlagen⁴³. Die vorliegende Analyse der isolierten Zellen aus dem Knochenmark des Sternums ergab, dass die Zellen wie gefordert auf Plastik adhärirten und auch das Potenzial zur osteogenen bzw. adipogenen Differenzierung besaßen, was unter Verwendung entsprechender Färbungen nachgewiesen wurde. Die positive Expression der Marker CD73, CD90 und CD105 sowie die negative Expression von CD14, CD19, CD34 und CD45 konnte weitestgehend bestätigt werden. Allerdings zeigte der Marker HLA-DR einen weitaus höheren Anteil an positiven Zellen ($> 2\%$) bezogen auf die Gesamtpopulation als für einen negativ exprimierten Marker laut den Minimal Kriterien erlaubt ist. Da dieser Effekt nicht bei allen Zellpräparationen auftrat, könnte es sich hierbei um eine spenderspezifische Expression von HLA-DR handeln, die mit Begleiterkrankungen des Patienten einhergehen kann. So konnte beispielsweise durch Zhu et al. eine geringe HLA-DR-Expression von MSC bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden²¹³. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse bezeichne ich die Zellen in dieser Arbeit als MSC, da nach Dominici et al. (2006)⁴³ Zellen mit einer positiven HLA-DR-Expression trotzdem als MSC bezeichnet werden können, wenn sie alle weiteren Kriterien erfüllen.

Das Integrinrezeptorsystem soll in dieser Arbeit über zwei verschiedene Methoden adressiert werden, erstens durch die direkte mechanische Stimulierung der Zellen an $\beta 1$ -Integrinen und zweitens durch die Verwendung zweier Adhäsionsmatrizes, dem ECM-Protein Fibronectin sowie dem linearen GRGDS-Peptid. Integrine stellen eine Gruppe von Rezeptoren dar, die in vielfältige

zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Morphologie, Motilität, Proliferation und Differenzierung involviert sind⁴². Das Matrixprotein Fibronectin wird über mehrere Erkennungssequenzen durch Integrine detektiert¹⁴¹, aber auch andere Adhäsionsrezeptoren wie der Hyaluronrezeptor CD44 können Fibronectin binden⁸⁵. Nach Aktivierung der Integrinrezeptoren liegen diese als Heterodimere bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit vor, wodurch eine Bindungsspezifität gegenüber den Matrixproteinen erzielt und deren Funktion bestimmt wird. Es konnte eine Expression der β 1-, β 3-, α 1-, α 3-, α 5- und α V-Integrin-Untereinheiten sowie CD44 detektiert werden, während die Integrin-Untereinheiten α 2, α 4 und α 6 nur minimal bzw. nicht exprimiert wurden. Eine Aktivierung der Integrine durch mechanische Stimulation der β 1-Integrin-Untereinheit könnte also die Formierung der Heterodimere α 1 β 1, α 3 β 1 und α 5 β 1 zur Folge haben. Die Heterodimere α 3 β 1, α 5 β 1 und α V β 1 können an Fibronectin sowie α 1 β 1 und α 3 β 1 an Kollagene und Laminine und α V β 1 an Vitronectin binden^{42,75}. Für eine Bindung an Fibronectin kommen weiterhin das Integrin-Heterodimer α V β 3 in Frage. Die ebenfalls verwendete lineare GRGDS-Sequenz weist eine vergleichbare Affinität zu den Integrinrezeptoren α 5 β 1 und α V β 3 auf¹⁴⁹. Der direkte Vergleich der Expression von α 5 β 1 und α V β 3 in MSC mittels Durchflusszytometrie zeigte, dass das Integrin-Heterodimer α 5 β 1 stärker als α V β 3 exprimiert wird (unveröffentlichte Daten). Daher ist davon auszugehen, dass die Adhäsion stärker über α 5 β 1 vermittelt wird. Die Angaben über detektierte Integrin-Untereinheiten bei MSC variieren in der Literatur, wobei verschiedene Nachweismethoden wie Durchflusszytometrie, Real-Time quantitative PCR, Western Blot oder auch verschiedene Gewebearten als Ursprung der MSC zum Einsatz kamen^{27,42,133,197,200}. Der direkte Vergleich mit Ergebnissen anderer Gruppen, die ebenfalls die Durchflusszytometrie als Nachweismethode sowie das Knochenmark als Quelle der MSC benutzten, zeigt, dass auch der Entnahmeort einen Einfluss auf die Expression von Integrin-Untereinheiten zu haben scheint. So konnten MSC, isoliert aus dem Knochenmark der Rippen und des Femurs positiv auf die Expression von α 2 und α 4 getestet werden, wobei letztere außerdem α 6 exprimierten^{133,197,200}. Wurde das Knochenmark aus dem Beckenkamm punktiert, exprimierten die MSC zwar α 2, aber kein α 1 und β 3²⁷. Die spezifische Expression von Integrinen ist im Falle der Applikation von MSC zur Geweberegeneration von hoher Bedeutung, wenn durch die Art der Applikation ein *homing* in das Zielgewebe notwendig wird, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Integrin-Untereinheiten α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α V, β 1, β 3 und β 4 die Interaktion zwischen Endothelzellen und MSC vermitteln. Daneben sind auch die Oberflächenrezeptoren CD44 und CD105 am Prozess des *homing* beteiligt¹¹⁵. Dies verdeutlicht zusätzlich die Relevanz der Charakterisierung von MSC vor Einsatz in regenerativen Therapieansätzen.

Die Frage nach der Regulation der Stammzeleigenschaften hinsichtlich Selbsterneuerung innerhalb der Stammzellnische und Differenzierung *in situ* ist noch nicht hinreichend geklärt und Bedarf weiterer Untersuchungen. Bekannt ist, dass eine Veränderung der mechanischen Umgebungseigenschaften eine Differenzierung der Stammzellen bedingen kann^{46,105,118,124}. Dabei

stellen die Integrine in ihrer Funktion als Mechanotransduktoren die wichtigste Rezeptorgruppe dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Effekt der mechanischen Stimulation an β 1-Integrinen auf die intrazelluläre Signaltransduktion, das Differenzierungsverhalten von MSC und die Sekretion des bioaktiven Faktors VEGF analysiert. Für die verwendete Methode der mechanischen Rezeptorstimulation wurden paramagnetische Partikel mit Antikörpern gegen β 1-Integrine beschichtet und an die Zellen über eine spezifische Antikörper-Antigen-Reaktion angebunden. Anschließend wurden die Zellen einem inhomogenen Magnetfeld ausgesetzt, wobei die Partikel in Richtung des spitzen Magnetpoles bewegt wurden und auf diese Weise lokal begrenzt Zugkräfte auf die Zellen ausübten^{92,155}. Als Folge der Aktivierung der Integrine wird die zytoplasmatische Domäne der β -Untereinheit exponiert und erlaubt nun eine Interaktion mit Proteinen der Fokalkontakte, die eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen³⁸. Diese Interaktion ist sehr komplex und umfasst mehr als 50 Proteine²¹¹. Die Anbindung von Fibronectin- oder RGD-beschichteten Partikeln an die apikale Seite der Zellen löst innerhalb von 20 min die Formierung von fokalen Adhäsionskomplexen, die β 1-Integrin, Talin, Vinkulin und Aktin enthalten, aus^{32,152}. Dabei hängt deren Formierung sowohl von der Größe der Partikel als auch von der Aktivierung des Integrinrezeptorsystems durch Anbindung entsprechender ECM-Proteine, dem RGD-Peptid oder Antikörpern gegen Integrin-Untereinheiten oder -Heterodimere ab⁵². Die nach Partikel-Zell-Kontakt neu entstandenen Fokalkontakte auf der apikalen Seite werden mit denen der basalen Seite über das Aktin-Zytoskelett verbunden⁶⁴, wodurch die Struktur des Zytoskeletts auf Grund der Applikation von mechanischem Stress an Integrinen verändert werden kann⁸⁰. Die Effekte der Integrinaktivierung umfassen weiterhin Veränderungen in nachgeschalteten Signalkaskaden. Die sofortige Hochregulierung der Aktivität von Lipidkinasen hat eine Konzentrationserhöhung des *second messenger* PIP₃ zur Folge, was zu einer schnellen Phosphorylierung spezifischer Substrate wie AKT führt¹⁰⁷. Zahlreiche biologische Prozesse wie Proliferation, Angiogenese und das Überleben der Zellen können durch die Aktivierung des Signalproteins AKT reguliert werden^{22,87,86}. Durch die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) auf Grund der Formierung von fokalen Adhäsionskomplexen in Folge der Aktivierung von Integrinen kann es weiterhin zur Aktivierung von ERK kommen^{103,128}. ERK als Mitglied der MAP-Kinasen-Familie ist ein essenzieller Mediator von Zellproliferation und der Differenzierung verschiedenster Zelltypen inkl. MSC^{98,178}.

Im ersten Schritt wurde der Effekt einer spezifischen, mechanischen Stimulation der MSC an β 1-Integrinen auf die intrazelluläre Signaltransduktion hinsichtlich der Aktivierung der Signalproteine ERK und AKT untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sofort nach Reizsetzung bzw. eine Stunde danach durch die mechanische Stimulierung der β 1-Integrin-Untereinheit eine Aktivierung von ERK hervorgerufen wurde. Auch die Reizsetzung durch Anbindung der paramagnetischen Partikel (*Clustern*) reichte bereits aus, um eine ERK-Aktivierung auszulösen. Dagegen konnte ERK durch das Magnetfeld nur gering aktiviert werden und war somit nicht in

der Lage eine vergleichbar starke Aktivierung hervorzurufen wie das *Clustern* oder die mechanische Stimulation. Es ist bekannt, dass die MAP-Kinase ERK 1/2 durch verschiedenste mechanische Stimuli in mechanosensitiven Zellen wie Osteoblasten⁴⁸ und Endothelzellen¹⁰ aktiviert werden kann. Auch in MSC ist ERK 1/2 an zellulären Antworten auf mechanische Reize beteiligt^{98,178}. So führte in Versuchen von Kim et al. (2007) beispielsweise die Applikation von hydrostatischem Druck und Scherkräften zu einer ERK 1/2-abhängigen Erhöhung der Osteocalcin-Expression⁹⁸. Desweiteren wurden durch den Einsatz von ERK 1/2-Inhibitoren bei gleichzeitiger Applikation von 3 % gleichförmiger Deformation die Calcium-Einlagerungen während der Osteogenese verringert¹⁷⁸. Damit scheint die Osteogenese von mesenchymalen Stammzellen durch die kontrollierte Aktivierung von ERK 1/2 über mechanische Stimuli gefördert zu werden⁹⁸. Mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methode der mechanischen Stimulation wiesen Pommerenke et al. (2002) nach, dass die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK 2 in MG63-Zellen eine spezifische Folge der mechanischen Stimulation an der β 1-Integrin-Untereinheit im Vergleich zum Transferrinrezeptor als Kontrolle ist¹⁵⁵. Eine Aktivierung von AKT nach mechanischer Stimulation wurde in den vorliegenden Versuchen sowohl unmittelbar nach Reizsetzung als auch eine Stunde später detektiert. Die Anbindung von paramagnetischen Partikeln (*Clustern*) war ebenfalls als Stimulus ausreichend, um eine AKT-Aktivierung auszulösen. Durch das Magnetfeld wurde AKT im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht aktiviert. Dagegen lassen Ergebnisse von Sakamoto et al. vermuten, dass ein für 30 min angelegtes mit 20 Hz oszillierendes und 30 mT starkes magnetisches Feld eine AKT-Aktivierung in HUVEC-Zellen hervorrufen kann¹⁶⁸. Im Allgemeinen kann die Aktivierung von AKT ursächlich auf die zuverige Aktivierung der FAK und der PI-3-Kinase zurückgeführt werden¹⁰⁷. Bereits in früheren Versuchen zeigten Pommerenke et al., dass mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau eine FAK-Phosphorylierung erreicht werden kann¹⁵⁵. Im Allgemeinen unterscheiden sich die Signale, die durch Zugkräfte an Integrinen induziert werden gegenüber denen, die durch alleiniges Integrin-Rezeptor-*Clustern* auf Grund der Partikelanbindung ausgelöst werden⁸⁰. Beispielsweise war die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der mechanischen Stimulation an der β 1-Integrin-Untereinheit in der Lage, eine oszillierende Erhöhung des intrazellulären Calciums in MG63-Zellen zu erzeugen^{154,155}. Die Stressapplikation über Kollagen-beschichtete Partikel führte ebenfalls innerhalb von Sekunden zum Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels⁵⁶. Der über Fokalkontakte auf das Aktin-Zytoskelett applizierte Stress könnte dabei für die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle verantwortlich sein⁶⁴. Ein weiterer Grund für diese differenzierte Antwort könnte in den lokalen Deformationen liegen, die hier mittels FESEM-Aufnahmen nur bei mechanisch stimulierten Zellen nachgewiesen werden konnten. In Versuchen von Dyrda et al. (2010) führten Scherspannungs-induzierte Deformationen der Zellmembran in Erythrozyten zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels⁴⁵. Allerdings konnte in den vorliegenden Experimenten kein zusätzlicher Effekt der mechanischen Stimulation an der β 1-Integrin-Untereinheit auf die Aktivierung der MAP-Kinase ERK sowie des Signalproteins AKT gegenüber der Anbindung von

Partikeln (*Clustern*) nachgewiesen werden. Da sowohl ERK als auch AKT eine zentrale Rolle bei verschiedensten zellulären Prozessen einnehmen, ist eine differenzierte Antwort in nachgeschalteten Signalkaskaden sehr wahrscheinlich. Beispielsweise wird der Prozess der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen nicht allein durch die ERK-Aktivierung sondern auch durch Veränderungen bzgl. des Crosstalks mit anderen Proteinen reguliert, der subzellulären Kompartimentierung und einer differentiellen Substrat-Phosphorylierung¹⁹⁶.

Im nächsten Schritt wurde das Differenzierungsverhalten anhand der Expression von Differenzierungsmarkern hinsichtlich osteogener (Alkalische Phosphatase, Kollagen 1a), chondrogener (SOX 9) und adipogener (PPAR γ) Differenzierung sowie der Freisetzung des bioaktiven Faktors VEGF nach kurzzeitiger mechanischer Stimulation an β 1-Integrinen analysiert. Die MSC wurden dafür auf TCP kultiviert. Die osteogene Differenzierung der MSC wurde mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase und Kollagen 1a untersucht. Durch die mechanische Stimulation an β 1-Integrinen wurde die Expression der Alkalischen Phosphatase gesenkt, entgegen den Ergebnissen anderer Gruppen, die einen positiven Effekt verschiedener Arten mechanischer Stimulation auf die osteogene Differenzierung von MSC feststellten^{118,124}. Dabei handelte es sich allerdings um Versuchsansätze, in denen die gesamte Zelle der mechanischen Stimulation ausgesetzt war, wobei mit der hier verwendeten Methode mechanische Kräfte gezielt auf β 1-Integrine ausgeübt wurden und nur lokale Zellmembrandeformationen zur Folge hatten⁹². Während die Kollagen 1a-Expression medienunabhängig durch die Applikation des Magnetfeldes (zyklisch) reduziert wurde, war dieser Effekt auf die Expression der Alkalischen Phosphatase nur im Expansionsmedium nachweisbar. Nach der Applikation eines statischen Magnetfeldes konnten Denaro et al. (2008) in Osteoblasten eine reduzierte mRNA-Expression von Kollagen 1 nachweisen³⁹. Als chondrogener Differenzierungsmarker wurde SOX 9 gewählt, welcher als Hauptregulator der chondrogenen Differenzierung gilt und maßgeblich an der Ausbildung des Knorpelphänotyps beteiligt ist¹¹⁵. Tsuchiya et al. (2003) zeigten, dass eine exogene SOX 9-Expression in MSC funktional zu einer erhöhten Proteoglykanablagerung führt¹⁹¹. Die mechanische Stimulation an β 1-Integrinen führte medienunabhängig zu einer erhöhten mRNA-Expression von SOX 9, die ebenfalls durch die Applikation eines durchschnittlich 15 mT starken Magnetfeldes mit einer Frequenz von 1 Hz erzielt werden konnte. In Versuchen von Mayer-Wagner et al. (2011) konnte keine signifikante Steigerung der SOX 9-Expression durch die Applikation eines niedrig-frequenten Magnetfeldes (15 Hz) mit einer Stärke von 5 mT erzielt werden¹²⁵. Dagegen ließ sich in primären Chondrozyten ein positiver Effekt eines 1,8-3 mT starken Magnetfeldes mit einer Frequenz von 75 Hz auf deren Proliferationsverhalten und u.a. die Expression des chondrogenen Markers Aggrecan feststellen²⁸. Zu beachten ist an dieser Stelle, dass normalerweise das *in vitro* Modell für die chondrogene Differenzierung eine Kultivierung der Zellen in einer sog. Pelletkultur oder eine Einbettung in gelartige Biomaterialien wie Alginat beinhaltet¹⁷. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Zellen nur als Monolayer kultiviert, um eine gleichmäßige und gleichverteilte Anbindung der paramagnetischen Partikel als Grundlage der mechanischen Rezeptorstimulation

zu erreichen. Daher konnten keine optimalen Bedingungen für eine potentielle Chondrogenese hergestellt werden. Der Transkriptionsfaktor PPAR γ spielt eine zentrale Rolle während der Adipogenese hinsichtlich der terminalen Differenzierung von Adipozyten¹³⁵. Durch die gezielte mechanische Stimulation an β 1-Integrinen wurde die PPAR γ -Expression unter adipogenen Differenzierungsbedingungen vermindert. Im Allgemeinen kann die Applikation mechanischer Signale die Adipogenese unterdrücken¹¹⁸. Der Wnt-Signalweg ist dabei einer der Schlüsselwege zur Regulation der Differenzierung von MSC, durch ihn wird die Adipogenese inhibiert und die Osteoblasto- bzw. Myogenese gefördert¹³⁵. β -Catenin spielt dabei eine zentrale Rolle, insbesondere hinsichtlich der Regulierung der Adipogenese in Folge mechanischer Belastung der MSC einschließlich der Translokation von β -Catenin in den Zellkern¹⁷³.

MSC sind in der Lage, bioaktive Faktoren zu sezernieren sowie immunmodulatorische Funktionen auszuüben^{24,192}. Während des osteogenen Differenzierungsprozesses sekretierten MSC laut Haynesworth et al. (1996) G-CSF, M-CSF und SCF, wohingegen die konstitutive Sekretion von IL-6 und IL-11 stark reduziert wurde^{65,160}. Von großem Interesse ist die Sekretion des bioaktiven Faktors VEGF als zentraler Regulator der Formierung von Blutgefäßen, da die Gefäßneubildung einen unabdingbaren Prozess während der Geweberegeneration darstellt^{112,131,184}. VEGF wird von verschiedensten Zelltypen sekretiert, um Gefäßneubildung zu induzieren³. In den vorliegenden Versuchen wurde eine konstitutive Sekretion von VEGF festgestellt, die im Expansionsmedium gegenüber der Verwendung von adipogenem bzw. osteogenen Differenzierungsmedium am höchsten war. Nach mechanischer Stimulation an β 1-Integrinen konnte insbesondere unter osteogenen Differenzierungsbedingungen die VEGF-Expression signifikant im Vergleich zur Applikation des Magnetfeldes bzw. der Partikelanbindung (*Clusters*) gesteigert werden. Vergleichbare Effekte zeigten sich bei der Untersuchung der VEGF-Sekretion ins Medium. Singh et al. (2007) konnten durch die Ausübung von Zugkräften auf Osteoblasten eine erhöhte VEGF-Sekretion sowie mRNA-Expression erzielen¹⁷⁹. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass MSC sowie Osteoblasten in Folge mechanischer Stimulation durch eine erhöhte VEGF-Sekretion die Proliferation benachbarter Endothelzellen fördern und somit die Gefäßneubildung im Zuge der Geweberegeneration unterstützen können. In *in vitro* Versuchen konnte durch Ninichuk et al. (2006) gezeigt werden, dass der VEGF-haltige Überstand von MSC grundsätzlich diesen Effekt auf Endothelzellen ausüben kann¹³⁶. Ein positiver Effekt VEGF-exprimierender MSC auf die Angiogenese konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden^{14,71}. Weiterhin kann durch VEGF indirekt die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten induziert werden, indem die IGF-1- und ET-1-Produktion in Endothelzellen durch VEGF stimuliert wird¹⁸². Da VEGF einen positiven Effekt auf Osteoblasten-Vorläuferzellen hat, scheint VEGF sowohl in der Angiogenese als auch in der Osteogenese eine Rolle zu spielen⁹³.

Im Anschluss stellte sich die Frage, ob die biologische Antwort der MSC hinsichtlich der Expression von Differenzierungsmarkern durch eine wiederholte mechanische Stimulation an β 1-

Integrinen moduliert werden kann. Für eine wiederholte Stimulation wurden die Zellen insgesamt fünfmal im Abstand von 2 h für 15 min dem Magnetfeld ausgesetzt, wobei die Zellen entweder zu Beginn mit Partikeln inkubiert wurden oder ohne Partikelanbindung nur dem Magnetfeld ausgesetzt waren. Die Analyse der mRNA-Expression der Alkalischen Phosphatase, SOX 9, PPAR γ und VEGF zeigte keine Unterschiede zwischen einmaliger und wiederholter Applikation weder von mechanischem Stress noch des Magnetfeldes. Nur die mRNA-Expression von Kollagen 1a wurde durch eine wiederholte Magnetfeld-Applikation im Vergleich zur einmaligen Applikation gesenkt, wohingegen die Kollagen 1a-Expression nach wiederholter mechanischer Stimulation an β 1-Integrinen im Vergleich zur einmaligen Applikation unbeeinflusst blieb. Damit scheint laut den vorliegenden Ergebnissen eine kurzzeitige, mehrmalige Applikation eines kurzfrequenten Magnetfeldes mit einer Magnetfeldstärke von durchschnittlich 15 mT innerhalb von 8 h für eine Stimulierung der Kollagen 1a-Expression in MSC ausreichend zu sein. In Osteoblasten konnten Qiu et al. (2007) eine Stimulierung der Kollagen 1-Expression erst nach 72 h nachweisen¹⁶¹. Da die fünfte und letzte mechanische Stimulation 8 h nach Versuchsbeginn durchgeführt wurde und bekannt ist, dass angebundene Partikel durch die Zellen internalisiert werden^{29,74,127}, wurde mittels FE-SEM-Aufnahmen die Internalisierung der paramagnetischen Partikel innerhalb von 24 h nach Versuchsbeginn verfolgt. Es konnte festgestellt werden, dass bereits nach 4 h die ersten Partikel vollständig internalisiert wurden, wobei sich der Anteil nach 8 h auf ca. die Hälfte der Zellen erhöht hatte. Bekanntermaßen ist die Internalisierungszeit dabei direkt abhängig von der Partikelgröße und verläuft um so schneller, je kleiner die Partikel sind²⁹. Die Internalisierung der paramagnetischen Partikel könnte ein Grund dafür sein, dass die Expression der Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase, Kollagen 1a, SOX 9 und PPAR γ trotz wiederholter mechanischer Stimulation nicht beeinflusst werden konnte. Allerdings konnten Hughes et al. (2007) zeigen, dass die mechanische Stimulation von Osteoblasten mit 4,5 μ m großen RGD-beschichteten, internalisierten Partikeln ein vergleichbares intrazelluläres Calciumsignal im Vergleich zu extrazellulär angelegten Partikeln erzeugen konnte⁷⁴. Sie schlussfolgerten, dass die mechanische Stimulation der Zellen damit nicht auf die extrazelluläre Bindung der Partikel angewiesen ist. Auf Grund der hier vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass eine einmalige, kurzzeitige mechanische Stimulation an β 1-Integrinen der MSC bereits die maximale biologische Antwort der Zellen hinsichtlich der Expression der Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase, Kollagen 1a, SOX 9 und PPAR γ erzeugt, die durch Wiederholung innerhalb der ersten 8 h nach Partikelanbindung nicht moduliert werden kann. Die Zellvitalität blieb innerhalb von 48 h nach mechanischer Stimulation unbeeinflusst.

Durch die Kultivierung der MSC auf Fibronectin- bzw. RGD-funktionalisierten Oberflächen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Verwendung verschiedener Adhäsionssubstrate gegenüber der Kultivierung auf TCP die biologische Antwort der MSC nach mechanischer Stimulation an β 1-Integrinen modulieren können.

Die Untersuchungen zeigten, dass grundsätzlich eine Modulierung der mechanisch-induzierten biologischen Antwort möglich und vom Adhäsionssubstrat abhängig ist. Die Kollagen 1a-Expression konnte auf RGD- und FN-funktionalisierten Oberflächen nach mechanischer Stimulation signifikant gesteigert werden, was bei TCP kultivierten Zellen nicht der Fall war. Dieser Effekt war abhängig vom verwendeten Medium und trat nur unter adipogenen Differenzierungsbedingungen auf. Die Reduktion der PPAR γ -Expression unter adipogenen Differenzierungsbedingungen nach mechanischer Stimulation war ebenfalls ein substratabhängiger Effekt und trat nur bei auf TCP kultivierten Zellen auf. Die medienunabhängige Steigerung der SOX 9-Expression nach mechanischer Stimulation und der Applikation des Magnetfeldes auf TCP war bei der Verwendung von RGD- bzw. FN-funktionalisierten Oberflächen nicht mehr nachzuweisen. Die Expression der Alkalischen Phosphatase zeigte sich abhängig vom verwendeten Adhäsionssubstrat als auch vom verwendeten Medium. Trat eine Reduktion der Expression der Alkalischen Phosphatase auf Grund der mechanischen Stimulation sowie der Applikation des Magnetfeldes im Expansionsmedium bei TCP kultivierten Zellen auf, so war dieser Effekt nach Kultivierung der Zellen auf RGD- bzw. FN-funktionalisierten Adhäsionssubstraten im adipogenen Differenzierungsmedium detektierbar. Durch die Verwendung von RGD- bzw. FN-funktionalisierten Oberflächen ließ sich die VEGF-Expression nach mechanischer Stimulation modulieren. Dies bedeutete in diesem Fall, dass eine Expressionssteigerung in Folge der mechanischen Stimulation nur nach Kultivierung der MSC auf TCP möglich war und diese bei Verwendung von RGD-Peptiden oder Fibronectin nicht erreicht werden konnte. Dabei handelte es sich hinsichtlich der RGD- und FN-funktionalisierten Oberflächen um einen medienunabhängigen Effekt.

Im Hinblick auf diese Ergebnisse scheint klar, dass das Schicksal der MSC nicht nur von einem der verwendeten Faktoren (mechanische Stimulation, Adhäsionssubstrat, Differenzierungsbedingung) abhängt, sondern eine komplexe Betrachtung der Faktoren nötig ist. Es ist davon auszugehen, dass die jeweils aktivierten Signalwege untereinander vernetzt sind und auf diese Weise eine integrale Zellantwort bewirken. Durch die Verwendung verschiedener Adhäsionssubstrate kann u.a. die Integrinexpression und -aktivierung verändert und andere Signalwege aktiviert werden²⁰². Ebenfalls bekannt ist, dass die durch Wachstumsfaktoren, als Bestandteile der Differenzierungsmedien, aktivierten Signalwege mit denen durch Integrine aktivierten Signalwege übereinstimmen³³. Desweiteren ist die extrazelluläre Matrix in der Lage, Wachstumsfaktoren zu binden, welche auf diese Weise gleichermaßen wie die Integrine eine Effekt auf die Zellen ausüben können⁷⁹.

Um mögliche Gründe für diese veränderte biologische Antwort der MSC auf FN- und RGD-funktionalisierten Oberflächen gegenüber TCP nach mechanischer Stimulation an β 1-Integrinen aufzudecken, wurde ohne mechanische Stimulation die Expression der Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase, Kollagen 1a, SOX 9, PPAR γ und die Expression des bioaktiven Faktors VEGF sowie die osteogene Differenzierungsfähigkeit und das Adhäsionsverhalten der MSC

auf den funktionalisierten Oberflächen analysiert.

Die Expression der Alkalischen Phosphatase zeigte sich als einzige abhängig vom verwendeten Adhäsionssubstrat. Die Expression konnte auf RGD- und Fibronectin-funktionalisierten Oberflächen gegenüber der Expression auf TCP gesteigert werden. Dieser Effekt war weiterhin medienabhängig und trat nur in adipogenem Differenzierungsmedium auf. Abhängig vom ECM-Protein als Adhäsionssubstrat zeigte sich die Höhe der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in MSC bei Versuchen von Huang et al. (2009), wobei starke Effekte auf Fibronectin auftraten⁷³. Der selektive Effekt des adipogenen Differenzierungsmedium war dennoch unerwartet. Allerdings enthält das adipogene neben dem osteogenen Differenzierungsmedium Dexamethason, welches zur verstärkten Expression von $\alpha 5$ -Integrinen führen kann, die wiederum im aktivierten Zustand die osteogene Differenzierung begünstigen⁶². Da Kollagen 1a und die Alkalische Phosphatase zu verschiedenen Zeitpunkten während der Osteogenese reguliert werden, könnte dies ein Grund für die substratunabhängige reduzierte Kollagen 1a-Expression sein. Die Analyse der mRNA-Expression der Differenzierungsmarker ergab, dass die Expression des adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ erwartungsgemäß im adipogenen Differenzierungsmedium stark anstieg, während die Expression des chondrogenen Differenzierungsmarkers SOX 9 sowie des bioaktiven Faktors VEGF unter adipogenen und osteogenen Differenzierungsbedingungen reduziert war. Diese Effekte waren jeweils unabhängig vom Adhäsionssubstrat.

Anschließend wurde unter entsprechenden mehrtägigen Differenzierungsbedingungen sowohl die osteogene als auch die adipogene Differenzierung der MSC mit Hilfe von funktionalen Differenzierungsassays wie dem Nachweis der Matrixkalzifizierung sowie der Aktivität der Alkalischen Phosphatase bzw. der Einlagerung von Lipidvakuolen analysiert. Dabei kam es hier insbesondere auf den Vergleich zwischen funktionalisierten (RGD, FN) und nicht-funktionalisierten Oberflächen (Glas) an. Die adipogene Differenzierung der MSC auf Fibronectin war nach 7 d gegenüber den auf Glas kultivierten Zellen reduziert (unveröffentlichte Daten), da Fibronectin einen inhibitorischen Effekt auf die Adipogenese ausübt^{135,180}. Im Allgemeinen ist die Adipogenese durch einen Umbau der Fibronectin-reichen ECM zu einer Laminin-reichen Matrix gekennzeichnet, in dessen Verlauf die Expression der $\alpha 5$ -Integrine zu Gunsten der $\alpha 6$ -Integrine geändert wird¹¹⁴. SPARC, als ein Inhibitor der Adipogenese, erhöht beispielsweise die Fibronectinablagerung in die Matrix und inhibiert die Expression von $\alpha 6$ -Integrinen¹³⁵. Die 18-tägige Kultivierung der MSC unter osteogenen Differenzierungsbedingungen resultierte in einer reduzierten Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowie einer verringerten Matrixkalzifizierung auf Fibronectin und RGD im Vergleich zu Glas. Paiushina et al. (2010) hatten eine reduzierte Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowie reduzierte Calciumeinlagerungen der auf Fibronectin kultivierten mesenchymalen Stromazellen (isoliert aus Ratten) gegenüber Plastik kultivierten MSC nachgewiesen¹⁴⁰. Diesen inhibierenden Effekt auf die Osteogenese führten sie nach Fragmentanalysen auf die zellbindenden Domänen des Fibronectins zurück. Mechanische Eigenschaften der ver-

wendeten Adhäsionsmatrizes wie die Matrixsteifigkeit haben laut Engler et al. (2006) ebenfalls einen Einfluss auf die Differenzierung der MSC⁴⁶. Die osteogene Differenzierung findet demnach bei weitaus steiferen Matrizes statt, als z.B. die myogene oder neurogene Differenzierung. Um Aussagen über die Steifigkeit der verwendeten Adhäsionssubstrate machen zu können, wurde das Elastizitäts-Modul (E-Modul), als Maß für die Steifigkeit der verwendeten Adhäsionsmatrizes, mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie bestimmt. Es sei an dieser Stelle noch einmal kurz erwähnt, dass die Beschichtung der Adhäsionsmatrizes mit dem proteinabweisenden NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymer die Grundlage für die Anbindung von GRGDS-Peptiden bzw. Fibronectin darstellt. Bereits die Beschichtung von Glas mit dem NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymer führte zur Verringerung des E-Moduls, was eine Abnahme der Substratsteifigkeit anzeigt. Gegenüber der Anbindung von GRGDS-Peptiden in das NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymer konnte das E-Modul durch die Anbindung von Fibronectin auf der Polymerschicht um ein Vielfaches gesenkt werden. Somit könnte auch die geringere Steifigkeit der RGD- sowie Fibronectin-funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zu Glas für die erhöhte osteogene Differenzierung der MSC auf Glas verantwortlich sein. Obwohl bekannt ist, dass eine höhere Wahrscheinlichkeit für MSC zur Adipogenese besteht, wenn sie auf weicheren Matrizes kultiviert werden²⁰³, fand eine ausgeprägtere adipogene Differenzierung auf Glas statt. Daher ist davon auszugehen, dass in den vorliegenden Versuchen die Oberflächenfunktionalisierung in Form von Fibronectin als chemischen Bindungspartner einen übergeordneten Effekt gegenüber der Matrixsteifigkeit auf die Adipogenese hatte. Für die osteogene Differenzierung wurde dies durch Rowlands et al. (2008) beobachtet¹⁶⁵. Dort konnte nach Oberflächenfunktionalisierung der Adhäsionssubstrate mit Kollagen IV bzw. Laminin I, die jeweils nur zu einem geringen Anteil Bestandteile der ECM im Knochen darstellen, trotz geeigneter Substratsteifigkeit keine Erhöhung der Expression osteogener Differenzierungsmarker festgestellt werden.

Die Zelladhäsion bildet eine essentielle Grundlage für zelluläre Prozesse wie die Differenzierung¹²⁶. Daher wurde das Adhäsionsverhalten der MSC auf den RGD- bzw. Fibronectin-funktionalisierten Oberflächen sowie Glas charakterisiert. In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich MSC am schnellsten auf Fibronectin ausbreiteten, wobei die maximale Zellfläche bereits nach 2 h erreicht wurde. Am langsamsten breiteten sich die Zellen auf Glas aus und die Zellausbreitung auf der RGD-Beschichtung nahm eine Mittelstellung ein. Ähnliche Ergebnisse erzielten Ahmed et al. (2011), die eine bessere und schnellere Ausbreitung von Fibroblasten auf Fibronectin gegenüber einer Beschichtung mit einer RGD-haltigen Peptidsequenz feststellten, wobei die zusätzliche Präsentation der synergistischen Peptid-Sequenz PHSRN neben der RGD-Sequenz die Zellausbreitung weiter verbessert werden konnte⁴. In Abhängigkeit von der Oberflächenfunktionalisierung waren ebenfalls deutliche Unterschiede in der Organisation der Fokalkontakte und des Aktin-Zytoskeletts bereits 1 h nach Zellaussaat detektierbar. MSC auf Fibronectin wiesen bereits ein gut organisiertes Aktinzytoskelett mit bogenförmigen und zirkulären Bündeln sowie dorsalen Fasern auf, die in Fokalkontakten endeten. Zellen auf

RGD-Peptiden hingegen bildeten erst vereinzelt bogenförmige Aktinstrukturen aus, während bei Zellen auf Glas das Aktin noch keinerlei Strukturen ausbildete. In beiden Fällen lag Paxillin, als ein Bestandteil der Fokalkontakte, noch diffus im Zytoplasma vor. Die Auswertung der Größe und Form der Fokalkontakte 24 h nach Zellaussaat ergab, dass die Fokalkontakte in MSC auf Fibronectin am kleinsten und rundesten und auf Glas am größten und elongiertesten waren. Die Fokalkontakte von Zellen auf RGD nahmen eine Mittelstellung ein. Es ist bekannt, dass Veränderungen der Matrixsteifigkeit einen Einfluss auf die Struktur des Zytoskeletts und der Fokalkontakte haben, wobei die Größe der Fokalkontakte durch die Steifigkeit des Adhäsionssubstrates reguliert werden kann^{34,40,61,116}. Insgesamt kann festgestellt werden, dass Substrate mit einer hohen Steifigkeit das Wachstum und die Elongation der Fokalkontakte begünstigen⁴⁶. Dabei gilt, je steifer die Matrix, desto größere Fokalkontakte bilden sich aus⁶¹. Weiterhin kann die Elongation der Fokalkontakte durch den Einsatz weniger steifer Matrices verhindert werden¹³⁴. In den vorliegenden Versuchen lässt sich ebenfalls eine Korrelation zwischen der Steifigkeit der verwendeten Adhäsionssubstrate und der Größe bzw. Form der Fokalkontakte herstellen, da die größten bzw. kleinsten Fokalkontakte bei Zellen auftraten, die auf einer Adhäsionsmatrix mit dem höchsten bzw. niedrigsten E-Modul kultiviert wurden. Fokalkontakte stellen eine zentrale Komponente des Migrationsprozesses dar. Werden zu hohe bzw. zu niedrige Adhäsionskräfte über die Fokalkontakte ausgeübt, verringert sich die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen^{4,78}. Die Stärke der Adhäsionskraft ist wiederum u.a. abhängig von der Größe der Fokalkontakte, womit diese ebenfalls indirekt einen Einfluss auf die Zellmigration hat⁸. Noch unveröffentlichte Ergebnisse, die im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. R. E. Brenner (Universität Ulm, Abteilung und Poliklinik für Orthopädie, Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen) innerhalb des Sonderforschungsbereiches TransRegio 37 entstanden sind, konnten zeigen, dass MSC auf Glas deutlich langsamer migrierten als auf Fibronectin. Die Oberflächenbeschichtung mit RGD-Peptiden führte zu einer mittleren Migrationsgeschwindigkeit. Somit konnte hier eine Korrelation zwischen der Größe der Fokalkontakte und der Migrationsgeschwindigkeit festgestellt werden. Huttenlocher et al. (1995) hatten gezeigt, dass im Allgemeinen Zellen mit einer geringen Motilität starke Fokalkontakte ausbildeten, während in motilen Zellen weniger adhäsive Strukturen auftraten⁷⁷.

Die Nachbildung der hoch strukturierten Mikroumgebung von Zellen *in vivo* einschließlich extrazellulärer Matrix sowie benachbarter Zellen stellt für die Konzipierung und Herstellung von Implantaten derzeit eine große Herausforderung dar. Die Verwendung mikrostrukturierter Adhäsionsmatrices kann dabei zur Problemlösung beitragen, da Zellfunktionen wie Migration, Differenzierung, Proliferation und Apoptose reguliert werden können^{29,30,187,195} und somit eine kontrollierte Besiedlung von Implantaten ermöglichen. Der gezielte Einsatz von streifenförmigen Mikrostrukturierungen kann die gerichtete Zellmigration auf Implantatoberflächen erleichtern. Dabei führt die Streifenstrukturierung zur Polarisierung der Zellen, die wiederum die Migrations-

richtung der Zellen bestimmt^{88,156}. Die Migrationsgeschwindigkeit wird durch die Variation der Breite adhäsiver Streifen beeinflusst, wobei eine Verringerung der Streifenbreite bei Fibroblasten zu einer Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit führt⁴⁴. Dieses Phänomen wird u.a. durch morphologische Veränderungen der Zellen bedingt, da der zunehmende Verlust des uniaxialen Phänotyps in Verbindung mit einer zunehmenden, lateralen Zellausbreitung einer schnellen Zellmigration abträglich ist⁴⁴. Werden MSC zur Implantatbesiedlung eingesetzt, spielt neben der Zellmigration auch die Differenzierung der MSC eine wichtige Rolle, die maßgeblich durch die Zellmorphologie beeinflusst werden kann. So konnten McBeath et al. (2004) zeigen, dass MSC in Abhängigkeit der Zellform entweder die adipogene oder die osteogene Differenzierungsrichtung einschlagen. Nicht ausgebreitete Zellen auf Grund einer geringen Adhäsionsfläche werden zu Adipozyten, während stark ausgebreitete Zellen zu Osteoblasten differenzieren¹²⁶. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Kultivierung von MSC auf streifenförmigen Mikrostrukturierungen sowohl die myogene als auch die neuronale Differenzierung der MSC zur Folge haben kann, wobei gleichzeitig zellmorphologische Veränderungen nachgewiesen wurden. Durch eine Verringerung der Streifenbreite (von 10 μm bis 300 nm) stellten Yim et al. (2007) eine deutliche Hochregulierung der Expression des neuronalen Markers MAP2 fest²⁰⁷. Tay et al. (2010) detektierten bei Zellen, kultiviert auf 20 μm breiten Streifen, die Expression entsprechender Gene hinsichtlich Neuro- und Myogenese, wobei in diesen Versuchen immunhistochemisch interessanterweise nur die Expression des myogenen, kardialen MHC-Proteins nachgewiesen werden konnte¹⁸¹. Allein die Untersuchung zellmorphologischer Veränderungen auf Grund der Verwendung streifenförmiger Mikrostrukturierungen verschiedener Breiten kann somit die ersten Hinweise auf eine integrale Zellantwort liefern.

In den vorliegenden Versuchen wurde die Morphologie eindeutig durch das Adhäsionsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Streifenstrukturierung bestimmt. Grundsätzlich adhärten die MSC auf allen hier verwendeten Fibronectin-Streifenbreiten (10 μm , 20 μm , 50 μm und 80 μm). Ob die Zellen sich jedoch nur auf einem Streifen ausbreiteten oder mehrere Streifen zur Ausbreitung nutzten, war sowohl von der Streifen- als auch von der Abstandsbreite abhängig. Adhärten die Zellen nur auf einem Streifen, führte eine Verringerung der Streifenbreite gleichzeitig zu einer Verringerung sowohl der Zellfläche als auch des Formfaktors, bedingt durch die zunehmende Elongation der Zellen. Der Effekt der Zellelongation beruht laut Zimerman et al. (2004) auf der Begrenzung der Zellausbreitung in die laterale Richtung durch die Angrenzung nicht-adhäsiver Bereiche²¹⁴. Deren Versuche zeigten weiterhin, dass Fibroblasten, die auf 2 μm breiten Streifen kultiviert wurden, nur Distanzen kleiner als 6 μm überwinden und somit einen neuen Streifen zur Adhäsion nutzten. Mit Hilfe der hier vorliegenden Versuche konnte allerdings gezeigt werden, dass MSC auch in der Lage sind, nicht-adhäsive Distanzen von bis zu 10 μm zu überwinden, bei einer minimalen Streifenbreite von 10 μm . Die Verringerung der Abstandsbreite auf 5 μm führte dabei fast ausnahmslos zur Ausbreitung der Zellen über mehrere Streifen, wodurch sich die MSC der Morphologie von Zellen, die auf unstrukturierten Adhäsionssubstraten

kultiviert wurden, annäherten. Das Überspannen von nicht-adhäsiven Substratbereichen ging mit der Ausbildung von Zellausläufern einher, die von Rossier et al. (2010) als konkave Zellecken bezeichnet wurden¹⁶⁴. Dabei werden die nicht-adhärenen Zellabschnitte in zwei Regionen eingeteilt, der peripheren Region (inkl. konkaver Zellecken) und der inneren Region. Die Aktin-Fasern in der peripheren Region überspannen dabei die nicht-adhäsiven Bereiche in Form einer zur Zellmitte zeigenden Pfeilspitze, während sich die Aktin-Fasern in der inneren Region ausgehend von der Spitze parallel zur Ausrichtung der Fibronektin-Streifen anordnen¹⁶⁴.

Die schon zuvor erwähnte Elongation der Zellen in Abhängigkeit von der Streifenbreite geht in den vorliegenden Versuchen mit einer Verlängerung der Hauptachse der Zellen einher, was besonders deutlich bei Zellen zu erkennen war, die auf 10 μm bzw. 20 μm breiten Streifen adhärten. Allerdings ist bislang nicht eindeutig geklärt, wie die finale Zelllänge reguliert wird. Der Einsatz streifenförmiger Mikrostrukturierungen als Adhäsionssubstrat hat jedoch ergeben, dass einige Zelltypen über eine Längenkontrolle verfügen. So zeigten Kharitonova et al. (2004), dass Fibroblasten im Gegensatz zu Epithelzellen auf 15 μm breiten Streifen im Vergleich zum unstrukturierten Substrat vergleichbare Zelllängen aufwiesen⁹⁵. Anscheinend wird die Limitierung der transversalen Zellausbreitung in Epithelzellen durch eine erhöhte longitudinale Ausbreitung kompensiert, während diese Kompensation in Fibroblasten nicht stattfindet¹¹³. Die Aufrechterhaltung der Längenkontrolle ist nach Levina et al. (2001) dabei nur in polarisierten Zellen mit Aktin-Stressfasern möglich, da dafür anscheinend das Zusammenspiel zwischen Mikrotubuli und den parallel zur Zellachse angeordneten Aktin-Stressfasern nötig ist¹¹³. Diese Aussage steht jedoch im Widerspruch zu den hier vorliegenden Ergebnisse, da die MSC offensichtlich keine Längenkontrolle besitzen, obwohl sie eine Zellpolarisation und parallel angeordnete Aktin-Stressfasern aufweisen. Fibroblasten auf einer 3D-Mikrostrukturierung mit einer Grabenweite von 12,5 μm und -tiefe von 2,5 μm bildeten laut Dalby et al. (2003) ebenfalls eine verlängerte Hauptachse aus³⁷.

Neben der Zellmorphologie hängt auch die Orientierung der Zellen von der Breite der adhäsiven Streifen ab, auf denen die Zellen kultiviert werden. Die MSC richteten sich am stärksten entlang der Achse der Streifen aus, je schmaler die Streifen wurden. Dass es sich dabei nicht um einen kurzzeitigen Effekt handelt, zeigen Ergebnisse von Tay et al. (2010), die die Aufrechterhaltung der Zellausrichtung bei MSC während der Kultivierung auf 20 μm breiten Fibronektin-Streifen bis zu einem Zeitraum von 14 d beschrieben¹⁸¹.

Entsprechend der zunehmenden Orientierung der MSC im Zuge einer Verringerung der Streifenbreite kam es gleichzeitig zur zunehmenden Orientierung der Aktin-Stressfasern entlang der Zellachse. Dieses Phänomen tritt ebenfalls in anderen Zelltypen auf^{5,181}. In den vorliegenden Versuchen wurde neben der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts auch eine zusätzliche Reduktion der Stressfasern mit abnehmender Streifenbreite detektiert, allerdings schien die Dicke der Stressfasern davon unbeeinflusst zu bleiben. Besonders auffällig traten bei Zellen auf 10 μm breiten Streifen zwei Aktin-Stressfasern in Erscheinung, die die Zelle entlang der Fibronektin-

Streifenkante einrahmten, wobei sich gleichzeitig entlang dieser Kante die Fokalkontakte befanden. Bei einer geringen Streifenbreite von 2,5 μm beobachteten Doyle et al. (2009) in Fibroblasten eine ähnliche parallele Vinkulin-Anordnung⁴⁴. Adhärenzen Fibroblasten über mehrere 2 μm breite Streifen, kann es sich dabei auch um Fokalkontakte handeln, deren zugehörige Aktin-Fasern jeweils die nicht-adhäsiven Bereiche in der peripheren Region überspannten, wie Zimmerman et al. (2004) herausfanden²¹⁴. Auf Grund der linienförmigen Anordnung der Fokalkontakte könnte es sich bei den zwei beschriebenen Stressfasern nicht nur um zwei Einzelfasern sondern um jeweils Faser-Bündel handeln. Unabhängig von der Mikrostrukturierung des Adhäsionssubstrates bildeten die MSC in den vorliegenden Experimenten die Fokalkontakte als klar definierte Strukturen aus, was bei Tay et al. (2010) nur bei Zellen auf unstrukturierten Oberflächen möglich war¹⁸¹. Die Verringerung der Streifenbreite in den hier vorliegenden Versuchen führte sowohl zu einer Verringerung der Fläche als auch zu einer runderen Form der Fokalkontakte. Es konnten keine Unterschiede bzgl. der Fläche der Fokalkontakte bei Zellen zwischen 10 μm und 20 μm sowie 50 μm und 80 μm ausgemacht werden, wobei es zu keiner Formveränderung der Fokalkontakte bei Zellen auf 20 μm und 50 μm breiten Streifen kam. Welchen Einfluss die Größe der Fokalkontakte auf die Kräfteverhältnisse innerhalb der Zelle haben kann, wird durchaus kontrovers diskutiert. Sind die Fokalkontakte größer als 1 μm^2 , so besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der Größe der Fokalkontakte und der Höhe der ausgeübten Adhäsionskraft auf das Substrat¹². Allerdings waren die Fokalkontakte der Zellen in den vorliegenden Versuchen auf 10 μm und 20 μm breiten Streifen kleiner als 1 μm^2 . Andererseits wird auch berichtet, dass die Kräfte während der Reifung der Fokalkontakte (einhergehend mit deren Vergrößerung) abnehmen und somit höhere Kräfte an kleinen, unreifen Fokalkontakten unterstützt werden¹⁶. Intrazelluläre Kräfte und Spannungen können mit Hilfe des *Tensegrity*-Modells von D. E. Ingber beschrieben werden, wobei die Zellen durch den sog. *prestress* stabilisiert werden, der wiederum aktiv durch das kontraktile Aktin-Myosin-Zytoskelett generiert wird⁸¹. Die Kontraktilität kann wiederum einen direkten Einfluss auf die Funktionalität der Zellen wie z.B. die Differenzierung haben. So zeigten mehrere Gruppen, dass der Einsatz von Myosin-II-Inhibitoren in der Lage ist, die Differenzierung von Stammzellen zu blockieren^{46,51,144}. Mittels verschiedener geometrischer Adhäsionsmuster konnten Kilian et al. (2010) die Kontraktilität und damit die Differenzierung der MSC gezielt steuern. So erzeugten abgerundete Formen weniger Stress und führten zur Adipogenese, während spitze Ecken und Kanten die Kontraktilität und damit die Osteogenese förderten⁹⁷. Allein eine durch Mikrostrukturierungen hervorgerufenen Elongation der Zellen kann zu einer erhöhten Kontraktilität führen¹⁸⁷.

In den vorliegenden Experimenten konnte bei den MSC eine zunehmende Elongation der Nuklei mit abnehmender Streifenbreite detektiert werden, die auch mit einer deutlichen Verringerung der Kernfläche einher ging. Das dieser Trend bis zu einer Kultivierungsdauer von 14 d anhalten kann zeigten Tay et al. (2010)¹⁸¹. Weiterhin wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass gleichzeitig mit der Fläche der Zellkerne auch die Zellfläche im Zuge einer Ver-

ringung der Steifenbreite abnahm. Versuche anderer Arbeitsgruppen korrelierten bereits eine Reduktion der Zellgröße mit einem verringerten nukleären Volumen^{163,183}, was wahrscheinlich auf nukleäre Deformationen auf Grund von Zellformveränderungen zurückzuführen ist⁹⁶. Offensichtlich existiert eine starke Korrelation zwischen Formveränderungen des Zellkerns und dem Phänotyp der Zellen³⁶. Dabei könnte die strikte Ausrichtung der Aktin-Fasern gerade auf schmalen Streifen ursächlich für die Veränderung der Kernform sein¹⁵⁶, da eine molekulare Verbindung ausgehend von den Integrinen der Fokalkontakte über das Aktin-Zytoskelett bis zum Nukleus besteht¹⁹⁹. Proteine der Nesprin-Familie verbinden Aktin mit dem innernukleären Membranprotein SUN1, das wiederum mit Laminen in Verbindung steht, welche die nukleäre Lamina bilden und maßgeblich an der Formgebung des Nukleus beteiligt sind. Innerhalb von Millisekunden nach einer Deformation der Zellmembran kann die Genaktivität beeinflusst werden, da Lamine auch Chromatin und DNA binden können¹⁹⁹. Im Zuge von Differenzierungsprozessen kann es zu einer verringerten Expression von Lamin A-Komponenten kommen, was mit einer Änderung der Nukleusform sowie einer Reduktion der Chromatin-Bewegung einhergehen kann. Modifikationen der Chromatinstruktur auf Grund von Kernmembran-Deformationen können ihrerseits zu einer erhöhten Zugänglichkeit von Differenzierungs-relevanten Genen führen oder die Zugänglichkeit unnötiger Gene für Transkriptionsfaktoren unterbinden³⁶. Das legt die Annahme nahe, dass Adaptationen der Kernform und -struktur direkt mit der Funktionalität der Zelle zusammenhängen. So zeigten beispielsweise Thomas et al. (2002), dass die Kollagensynthese in Osteoblasten mit der Form der Zellkerne korrelierte¹⁸⁵. Desweiteren können Deformationen der Kernmembran in einem Ca^{2+} -Einstrom über nukleäre Ionenkanäle resultieren und im folgenden eine assoziierte Gentranskription aktivieren⁸³. Veränderungen im Aktin-Zytoskelett sind ebenfalls in der Lage, den Ionenstrom über die Kernmembran zu modulieren¹⁵⁸.

Im Hinblick auf weiterführende Experimente wäre es sehr interessant zu untersuchen, inwieweit sich das Differenzierungsverhalten der MSC durch die mechanische Stimulation an $\beta 1$ -Integrinen steuern lässt, wenn diese zuvor auf den zuvor beschriebenen linienförmigen Mikrostrukturierungen kultiviert wurden.

Die Methode der mechanischen Stimulation an $\beta 1$ -Integrinen ist geeignet, um die intrazelluläre Signaltransduktion, das Differenzierungsverhalten der MSC sowie die Sekretion des bioaktiven Faktors VEGF auf Grund mechanischer Einflüsse zu studieren. Dabei lassen sich diese biologischen Antworten durch die gezielte Anwendung von RGD- bzw. Fibronectin-funktionalisierten Adhäsionsmatrizes modulieren, wohingegen eine wiederholte gegenüber einer einmaligen, kurzzeitigen mechanischen Stimulation keine Regulation zur Folge hatte. Weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der Verwendung von RGD-Peptiden bzw. Fibronectin, deren Anbindung über das zellabweisende NCO-sP(EO-stat-PO)-Polymer erfolgte, ergaben, dass sowohl die mechanischen Eigenschaften der Substrate als auch die chemischen Oberflächenfunktionalisierungen gleichermaßen zum Differenzierungs- und Adhäsionsverhalten der MSC beitragen. Die Verände-

rung der homogenen Oberflächenstrukturierung in linienförmige Mikrostrukturierungen verschiedener Dimensionen hat einen ursächlichen Einfluss auf die Morphologie sowie morphometrische Parameter der Zellen und Zellkerne, was in einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts und der Fokalkontakte resultiert und letztlich sehr wahrscheinlich ebenfalls das Differenzierungsverhalten beeinflussen wird.

Literaturverzeichnis

- [1] Clinical applications of biomaterials. *NIH Consensus Statement Online*, 4(5):1–19, 1982.
- [2] S. Abramson, H. Alexander, S. Best, J. C. Bokros, J. B. Brunski, A. Colas, S. L. Cooper, J. Curtis, A. Haubold, L. L. Hench, R. W. Hergenrother, A. S. Hoffman, J. A. Hubbell, J. A. Jansen, M. W. King, J. Kohn, N. M. K. Lamba, R. Langer, C. Migliaresi, R. B. More, N. A. Peppas, B. D. Ratner, S. A. Visser, A. von Recum, S. Weinberg, and I. V. Yannas. Classes of materials used in medicine. In B. D. Ratner, A. S. Hoffmann, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, editors, *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, pages 67–236. Elsevier Academic Press, 2004.
- [3] M. Affolter, R. Zeller, and E. Caussinus. Tissue remodelling through branching morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(12):831–842, 2009.
- [4] S. Ahmed, H.-K. Yang, A. E. Ozcam, K. Efimenko, M. C. Weiger, J. Genzer, and J. M. Haugh. Poly(vinylmethylsiloxane) elastomer networks as functional materials for cell adhesion and migration studies. *Biomacromolecules*, 12(4):1265–1271, 2011.
- [5] W. W. Ahmed, T. Wolfram, A. M. Goldyn, K. Bruellhoff, B. A. Rioja, M. Möller, J. P. Spatz, T. A. Saif, J. Groll, and R. Kemkemer. Myoblast morphology and organization on biochemically micro-patterned hydrogel coatings under cyclic mechanical strain. *Biomaterials*, 31(2):250–258, 2010.
- [6] M. R. Alison and S. Islam. Attributes of adult stem cells. *J Pathol*, 217(2):144–160, 2009.
- [7] M. Alvarez-Dolado, R. Pardal, J. M. Garcia-Verdugo, J. R. Fike, H. O. Lee, K. Pfeffer, C. Lois, S. J. Morrison, and A. Alvarez-Buylla. Fusion of bone-marrow-derived cells with purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425(6961):968–973, 2003.
- [8] K. Anselme. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7):667–681, 2000.
- [9] F. R. Appelbaum. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med*, 357(15):1472–1475, 2007.
- [10] N. Azuma, S. A. Duzgun, M. Ikeda, H. Kito, N. Akasaka, T. Sasajima, and B. E. Sumpio. Endothelial cell response to different mechanical forces. *J Vasc Surg*, 32(4):789–794, 2000.
- [11] L. Bai, D.P. Lennon, V. Eaton, K. Maier, A.I. Caplan, S.D. Miller, and R.H. Miller. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*, 57(11):1192–1203, 2009.

- [12] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3(5): 466–472, 2001.
- [13] F. Baron and R. Storb. Stem cell therapy: Past, present, and future. In D. J. Polak, S. Mantalaris, and S. E. Harding, editors, *Advances in tissue engineering*, pages 561–591. Imperial College Press, 2008.
- [14] B. M. Beckermann, G. Kallifatidis, A. Groth, D. Frommhold, A. Apel, J. Mattern, A. V. Salnikov, G. Moldenhauer, W. Wagner, A. Diehlmann, R. Saffrich, M. Schubert, A. D. Ho, N. Giese, M. W. Büchler, H. Friess, P. Büchler, and I. Herr. Vegf expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*, 99(4):622–631, 2008.
- [15] E. Bell. Tissue engineering in perspective. In R. Lanza, R. Langer, and J. P. Vacanti, editors, *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier Academic Press, 2000.
- [16] K. A. Beningo, M. Dembo, I. Kaverina, J. V. Small, and Y. L. Wang. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol*, 153(4):881–888, 2001.
- [17] P. Bernstein, M. Dong, D. Corbeil, M. Gelinsky, K.-P. Günther, and S. Fickert. Pellet culture elicits superior chondrogenic redifferentiation than alginate-based systems. *Biotechnol Prog*, 25(4):1146–1152, 2009.
- [18] R. J. Blaschke, A. R. Howlett, P. Y. Desprez, O. W. Petersen, and M. J. Bissell. Cell differentiation by extracellular matrix components. *Methods Enzymol*, 245:535–556, 1994.
- [19] A. H. Brivanlou, F. H. Gage, R. Jaenisch, T. Jessell, D. Melton, and J. Rossant. Stem cells. setting standards for human embryonic stem cells. *Science*, 300(5621):913–916, 2003.
- [20] L. Buttery and K. M. Shakesheff. A brief introduction to different cell types. In D. J. Polak, S. Mantalaris, and S. E. Harding, editors, *Advances in tissue engineering*, pages 16–32. Imperial College Press, 2008.
- [21] I. D. Campbell. Studies of focal adhesion assembly. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 2):263–266, 2008.
- [22] L. C. Cantley. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573):1655–1657, 2002.
- [23] A. I. Caplan. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5):641–650, 1991.

- [24] A. I. Caplan. Why are mscs therapeutic? new data: new insight. *J Pathol*, 217(2):318–324, 2009.
- [25] S. B. Carter. Haptotactic islands - a method of confining single cells to study individual cell reactions and clone formation. *Exp Cell Res*, 48:189–193, 1967.
- [26] A. B. Castillo and C. R. Jacobs. Mesenchymal stem cell mechanobiology. *Curr Osteoporos Rep*, 8(2):98–104, 2010.
- [27] C.-F. Chang, M.-W. Lee, P.-Y. Kuo, Y.-J. Wang, Y.-H. Tu, and S.-C. Hung. Three-dimensional collagen fiber remodeling by mesenchymal stem cells requires the integrin-matrix interaction. *J Biomed Mater Res A*, 80(2):466–474, 2007.
- [28] C.-H. Chang, S.-T. Loo, H.-L. Liu, H.-W. Fang, and H.-Y. Lin. Can low frequency electromagnetic field help cartilage tissue engineering? *J Biomed Mater Res A*, 92(3):843–851, 2010.
- [29] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber. Geometric control of cell life and death. *Science*, 276(5317):1425–1428, 1997.
- [30] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog*, 14(3):356–363, 1998.
- [31] G. Chen, M. Nayan, M. Duong, J.-F. Asenjo, Y. Ge, R. C.-J. Chiu, and D. Shum-Tim. Marrow stromal cells for cell-based therapy: the role of antiinflammatory cytokines in cellular cardiomyoplasty. *Ann Thorac Surg*, 90(1):190–197, 2010.
- [32] M. E. Chicurel, R. H. Singer, C. J. Meyer, and D. E. Ingber. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mrna and ribosomes to focal adhesions. *Nature*, 392(6677):730–733, 1998.
- [33] E. A. Clark and J. S. Brugge. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 268(5208):233–239, 1995.
- [34] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, and K. M. Yamada. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294(5547):1708–1712, 2001.
- [35] B. D’Agostino, N. Sullo, D. Siniscalco, A. De Angelis, and F. Rossi. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Biol Ther*, 10(5):681–687, 2010.
- [36] K. N. Dahl, A. J. S. Ribeiro, and J. Lammerding. Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ Res*, 102(11):1307–1318, 2008.

- [37] M. J. Dalby, M. O. Riehle, S. J. Yarwood, C. D. W. Wilkinson, and A. S. G. Curtis. Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography. *Exp Cell Res*, 284(2):274–282, 2003.
- [38] I. Delon and N. H. Brown. Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 19(1):43–50, 2007.
- [39] V. Denaro, A. Cittadini, S. A. Barnaba, L. Ruzzini, L. Denaro, A. Rettino, B. De Paola, N. Papapietro, and A. Sgambato. Static electromagnetic fields generated by corrosion currents inhibit human osteoblast differentiation. *Spine (Phila Pa 1976)*, 33(9):955–959, 2008.
- [40] D. E. Discher, P. Janmey, and Y. Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751):1139–1143, 2005.
- [41] F. Djouad, C. Bouffi, S. Ghannam, D. Noel, and C. Jorgensen. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 5(7):392–399, 2009.
- [42] D. Docheva, C. Popov, W. Mutschler, and M. Schieker. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med*, 11(1):21–38, 2007.
- [43] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, and E. M. Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317, 2006.
- [44] A. D. Doyle, F. W. Wang, K. Matsumoto, and K. M. Yamada. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J Cell Biol*, 184(4):481–490, 2009.
- [45] A. Dyrda, U. Cytlak, A. Ciuraszkiewicz, A. Lipinska, A. Cueff, G. Bouyer, S. Egee, P. Bennekou, V. L. Lew, and S. L. Y. Thomas. Local membrane deformations activate Ca^{2+} -dependent K^{+} and anionic currents in intact human red blood cells. *PLoS One*, 5(2):e9447, 2010.
- [46] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–689, 2006.
- [47] M. J. Evans and M. H. Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154–156, 1981.

-
- [48] J. T. Ferraro, M. Daneshmand, R. Bizios, and V. Rizzo. Depletion of plasma membrane cholesterol dampens hydrostatic pressure and shear stress-induced mechanotransduction pathways in osteoblast cultures. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286(4):C831–C839, 2004.
- [49] A. J. Friedenstein, K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova. Heterotopic of bone marrow. analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2):230–247, 1968.
- [50] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4):393–403, 1970.
- [51] J. Fu, Y.-K. Wang, M. T. Yang, R. A. Desai, X. Yu, Z. Liu, and C. S. Chen. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*, 7(9):733–736, 2010.
- [52] C. G. Galbraith, K. M. Yamada, and M. P. Sheetz. The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol*, 159(4):695–705, 2002.
- [53] A. J. Garcia and C. D. Reyes. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J Dent Res*, 84(5):407–413, 2005.
- [54] P. Gasteier, A. Reska, P. Schulte, J. Salber, A. Offenhauser, M. Moeller, and J. Groll. Surface grafting of peo-based star-shaped molecules for bioanalytical and biomedical applications. *Macromol Biosci*, 7:1010–1023, 2007.
- [55] B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(1):21–33, 2009.
- [56] M. Glogauer, J. Ferrier, and C. A. McCulloch. Magnetic fields applied to collagen-coated ferric oxide beads induce stretch-activated ca^{2+} flux in fibroblasts. *Am J Physiol*, 269(5 Pt 1):C1093–C1104, 1995.
- [57] H. L. Greenwood, P. A. Singer, G. P. Downey, D. K. Martin, H. Thorsteinsdottir, and A. S. Daar. Regenerative medicine and the developing world. *PLoS Med*, 3(9):e381, 2006.
- [58] J. Groll, J. Fiedler, E. Engelhard, T. Ameringer, S. Tugulu, H.-A. Klok, R. E. Brenner, and M. Moeller. A novel star peg-derived surface coating for specific cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*, 74(4):607–617, 2005.
- [59] H. Götz, U. Beginn, C. F. Bartelink, H. J. M. Grünbauer, and M. Möller. Preparation of isophorone diisocyanate terminated star polyethers. *Macromol Mater Eng*, 287:223–230, 2002.

-
- [60] F. Guilak. Functional tissue engineering: the role of biomechanics in reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci*, 961:193–195, 2002.
- [61] W. Guo, M. T. Frey, N. A. Burnham, and Y. Wang. Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. *Biophys J*, 90(6):2213–2220, 2006.
- [62] Z. Hamidouche, O. Fromigue, J. Ringe, T. Häupl, P. Vaudin, J.-C. Pages, S. Srouji, E. Livne, and P. J. Marie. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(44):18587–18591, 2009.
- [63] A. Harris. Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness. *Exp Cell Res*, 77:285–297, 1973.
- [64] K. Hayakawa, H. Tatsumi, and M. Sokabe. Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels. *J Cell Sci*, 121(Pt 4):496–503, 2008.
- [65] S. E. Haynesworth, M. A. Baber, and A. I. Caplan. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and il-1 alpha. *J Cell Physiol*, 166(3):585–592, 1996.
- [66] L. L. Hench. Biomaterials. *Science*, 208(4446):826–831, 1980.
- [67] L. L. Hench and J. M. Polak. Third-generation biomedical materials. *Science*, 295(5557):1014–1017, 2002.
- [68] L. L. Hench and I. Thompson. Twenty-first century challenges for biomaterials. *J R Soc Interface*, 7 Suppl 4:S379–S391, 2010.
- [69] U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler. Rgd modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24(24):4385–4415, 2003.
- [70] R. M. Hochmuth. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech*, 33(1):15–22, 2000.
- [71] H. S. Hong, Y. H. Kim, and Y. Son. Perspectives on mesenchymal stem cells: Tissue repair, immune modulation, and tumor homing. *Arch Pharm Res*, 35(2):201–211, 2012.
- [72] E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, R. J. Deans, D. S. Krause, A. Keating, and International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for msc: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5):393–395, 2005.
- [73] C.-H. Huang, M.-H. Chen, T.-H. Young, J.-H. Jeng, and Y.-J. Chen. Interactive effects of mechanical stretching and extracellular matrix proteins on initiating osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 108(6):1263–1273, 2009.

-
- [74] S. Hughes, J. Dobson, and A. J. El Haj. Magnetic targeting of mechanosensors in bone cells for tissue engineering applications. *J Biomech*, 40 Suppl 1:S96–104, 2007.
- [75] J. D. Humphries, A. Byron, and M. J. Humphries. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, 119(Pt 19):3901–3903, 2006.
- [76] M. J. Humphries, M. A. Travis, K. Clark, and A. P. Mould. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 5):822–825, 2004.
- [77] A. Huttenlocher, R. R. Sandborg, and A. F. Horwitz. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 7(5):697–706, 1995.
- [78] A. Huttenlocher, M. H. Ginsberg, and A. F. Horwitz. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol*, 134(6):1551–1562, 1996.
- [79] R. O. Hynes. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957):1216–1219, 2009.
- [80] D. E. Ingber. Tensegrity i. cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*, 116 (Pt 7):1157–1173, 2003.
- [81] D. E. Ingber. Tensegrity ii. how structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci*, 116(Pt 8):1397–1408, 2003.
- [82] S. Inoue. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In J. B. Pawley, editor, *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
- [83] N. Itano, S. Okamoto, D. Zhang, S. A. Lipton, and E. Ruoslahti. Cell spreading controls endoplasmic and nuclear calcium: a physical gene regulation pathway from the cell surface to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9):5181–5186, 2003.
- [84] C. R. Jacobs, S. Temiyasathit, and A. B. Castillo. Osteocyte mechanobiology and pericellular mechanics. *Annu Rev Biomed Eng*, 12:369–400, 2010.
- [85] S. Jalkanen and M. Jalkanen. Lymphocyte cd44 binds the cooh-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol*, 116(3):817–825, 1992.
- [86] B.-H. Jiang and L.-Z. Liu. Pi3k/pten signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1784(1):150–158, 2008.
- [87] Bing-Hua Jiang and Ling-Zhi Liu. Akt signaling in regulating angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, 8(1):19–26, Feb 2008.

-
- [88] X. Jiang, D. A. Bruzewicz, A. P. Wong, M. Piel, and G. M. Whitesides. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4):975–978, 2005.
- [89] D. L. Jones and A. J. Wagers. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1):11–21, 2008.
- [90] C. Jopling, S. Boue, and J. C. I. Belmonte. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(2):79–89, 2011.
- [91] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, and C. M. Waterman. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323):580–584, 2010.
- [92] A. Kasten, P. Müller, U. Bulnheim, J. Groll, K. Bruellhoff, U. Beck, G. Steinhoff, M. Möller, and J. Rychly. Mechanical integrin stress and magnetic forces induce biological responses in mesenchymal stem cells which depend on environmental factors. *J Cell Biochem*, 111(6):1586–1597, 2010.
- [93] N. C. Keramaris, G. M. Calori, V. S. Nikolaou, E. H. Schemitsch, and P. V. Giannoudis. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of vegf. *Injury*, 39 Suppl 2:S45–S57, 2008.
- [94] A. J. Keung, K. E. Healy, S. Kumar, and D. V. Schaffer. Biophysics and dynamics of natural and engineered stem cell microenvironments. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(1):49–64, 2010.
- [95] M. A. Kharitonova and J. M. Vasiliev. Length control is determined by the pattern of cytoskeleton. *J Cell Sci*, 117(Pt 10):1955–1960, 2004.
- [96] S. B. Khatau, C. M. Hale, P. J. Stewart-Hutchinson, M. S. Patel, C. L. Stewart, P. C. Searson, D. Hodzic, and D. Wirtz. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(45):19017–19022, No 2009.
- [97] K. A. Kilian, B. Bugarija, B. T. Lahn, and M. Mrksich. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(11):4872–4877, 2010.
- [98] S.-H. Kim, Y. R. Choi, M. S. Park, J. W. Shin, K. D. Park, S.-J. Kim, and J. W. Lee. Erk 1/2 activation in enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells in poly(lactic-glycolic acid) by cyclic hydrostatic pressure. *J Biomed Mater Res A*, 80(4):826–836, 2007.
- [99] J. Kohn. New approaches to biomaterials design. *Nat Mater*, 3(11):745–747, No 2004.

-
- [100] G. C. Kopen, D. J. Prockop, and D. G. Phinney. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(19):10711–10716, 1999.
- [101] N. Z. Kuhn and R. S. Tuan. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol*, 222(2):268–277, 2010.
- [102] R. Langer and D. A. Tirrell. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428(6982):487–492, 2004.
- [103] M. Larsen, V. V. Artym, J. A. Green, and K. M. Yamada. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5):463–471, 2006.
- [104] R. G. LeBaron and K. A. Athanasiou. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials. *Tissue Eng*, 6(2):85–103, 2000.
- [105] D. A. Lee, M. M. Knight, J. J. Campbell, and D. L. Bader. Stem cell mechanobiology. *J Cell Biochem*, 112(1):1–9, 2011.
- [106] O. K. Lee, T. K. Kuo, W. Chen, K. Lee, S. Hsieh, and T. Chen. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5):1669–1675, 2004.
- [107] K. R. Legate, S. A. Wickström, and R. Fässler. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev*, 23(4):397–418, 2009.
- [108] N. D. Leipzig and K. A. Athanasiou. Unconfined creep compression of chondrocytes. *J Biomech*, 38(1):77–85, 2005.
- [109] M. Leiss, K. Beckmann, A. Giros, M. Costell, and R. Fässler. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol*, 20(5):502–507, 2008.
- [110] T. P. Lele, J. E. Sero, B. D. Matthews, S. Kumar, S. Xia, M. Montoya-Zavala, T. Polte, D. Overby, N. Wang, and D. E. Ingber. Tools to study cell mechanics and mechanotransduction. In Y.-L. Wang and D. E. Discher, editors, *Cell Mechanics*, pages 443–472. Elsevier Academic Press, 2007.
- [111] S. A. Lelievre, V. M. Weaver, J. A. Nickerson, C. A. Larabell, A. Bhaumik, O. W. Petersen, and M. J. Bissell. Tissue phenotype depends on reciprocal interactions between the extracellular matrix and the structural organization of the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25):14711–14716, 1998.

- [112] D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935):1306–1309, 1989.
- [113] E. M. Levina, M. A. Kharitonova, Y. A. Rovensky, and J. M. Vasiliev. Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate. *J Cell Sci*, 114(Pt 23):4335–4341, 2001.
- [114] J. Liu, S. M. DeYoung, M. Zhang, M. Zhang, A. Cheng, and A. R. Saltiel. Changes in integrin expression during adipocyte differentiation. *Cell Metab*, 2(3):165–177, 2005.
- [115] Z.-J. Liu, Y. Zhuge, and O. C. Velazquez. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 106(6):984–991, 2009.
- [116] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1):144–152, 2000.
- [117] M. P. Lutolf and J. A. Hubbell. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 23(1):47–55, 2005.
- [118] Y. K. Luu, J. E. Pessin, S. Judex, J. Rubin, and C. T. Rubin. Mechanical signals as a non-invasive means to influence mesenchymal stem cell fate, promoting bone and suppressing the fat phenotype. *Bonekey Osteovision*, 6(4):132–149, 2009.
- [119] C. A. Lyssiotis, L. L. Lairson, A. E. Boitano, H. Wurdak, S. Zhu, and P. G. Schultz. Chemical control of stem cell fate and developmental potential. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50(1):200–242, 2011.
- [120] D. L. Leslie M. A. Lee, D. J. Squirrell and T. Brown. Homogeneous fluorescent chemistries for real-time pcr. In K. Edwards M. A. Lee and N. A. Saunders, editors, *Real-time PCR: current technology and applications*. Caister Academic Press, 2009.
- [121] M. G. Macey. Principles of flow cytometry. In M. G. Macey, editor, *Flow cytometry: principles and applications*. Humana Press Inc, 2007.
- [122] G. R. Martin. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12):7634–7638, 1981.
- [123] C. Mason and P. Dunnill. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med*, 3(1):1–5, 2008.

- [124] T. M. Maul, D. W. Chew, A. Nieponice, and D. A. Vorp. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation. *Biomech Model Mechanobiol*, 10(6):939–953, 2011.
- [125] S. Mayer-Wagner, A. Passberger, B. Sievers, J. Aigner, B. Summer, T. S. Schiergens, V. Jansson, and P. E. Müller. Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics*, 32(4):283–290, 2011.
- [126] R. McBeath, D. M. Pirone, C. M. Nelson, K. Bhadriraju, and C. S. Chen. Cell shape, cytoskeletal tension, and rhoa regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*, 6(4):483–495, 2004.
- [127] C. Metzner, C. Raupach, C. T. Mierke, and B. Fabry. Fluctuations of cytoskeleton-bound microbeads—the effect of bead-receptor binding dynamics. *J Phys Condens Matter*, 22(19):194105, 2010.
- [128] C. K. Miranti and J. S. Brugge. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol*, 4(4):E83–E90, 2002.
- [129] D. Mooney, L. Hansen, J. Vacanti, R. Langer, S. Farmer, and D. Ingber. Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 151(3):497–505, 1992.
- [130] G. Murray and R. Holden. Transplantation of kidneys, experimentally and in human cases. *Am J Surg*, 87(4):508–515, 1954.
- [131] A. Nauth, P. V. Giannoudis, T. A. Einhorn, K. D. Hankenson, G. E. Friedlaender, R. Li, and E. H. Schemitsch. Growth factors: beyond bone morphogenetic proteins. *J Orthop Trauma*, 24(9):543–546, 2010.
- [132] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, and J. A. Planell. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*, 5(27):1137–1158, 2008.
- [133] S. Neuss, E. Becher, M. Wöltje, L. Tietze, and W. Jahnen-Dechent. Functional expression of hgf and hgf receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells*, 22(3):405–414, 2004.
- [134] A. Nicolas, B. Geiger, and S. A. Safran. Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(34):12520–12525, 2004.
- [135] J. Nie and E. H. Sage. Sparc functions as an inhibitor of adipogenesis. *J Cell Commun Signal*, 3(3-4):247–254, 2009.

- [136] V. Ninichuk, O. Gross, S. Segerer, R. Hoffmann, E. Radomska, A. Buchstaller, R. Huss, N. Akis, D. Schlöndorff, and H-J. Anders. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4a3-deficient mice. *Kidney Int*, 70(1):121–129, 2006.
- [137] C. Nombela-Arrieta, J. Ritz, and L. E. Silberstein. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(2):126–131, 2011.
- [138] F. O’Brien. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 2011.
- [139] C. A. Otey and O. Carpen. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton*, 58(2):104–111, 2004.
- [140] O. V. Paiushina, O. N. Khnykova, N. N. Butorina, E. I. Bueverova, A. A. Minin, and V. I. Starostin. Influence of primary adhesive interactions with fibronectin on clonal growth and osteogenic potential of rat mesenchymal stromal cells. *Tsitologiya*, 52(4):326–333, 2010.
- [141] R. Pankov and K. M. Yamada. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*, 115(Pt 20):3861–3863, 2002.
- [142] J. Park and R. S. Lakes. *Biomaterials: An introduction*. Springer Science+Business Media, LLC, 2007.
- [143] J. T. Parsons, A. R. Horwitz, and M. A. Schwartz. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(9):633–643, 2010.
- [144] R. J. Pelham and Y. Wang. High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol Biol Cell*, 10(4):935–945, 1999.
- [145] R. Peng, X. Yao, and J. Ding. Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion. *Biomaterials*, 32(32):8048–8057, 2011.
- [146] N. A. Peppas and R. Langer. New challenges in biomaterials. *Science*, 263(5154):1715–1720, 1994.
- [147] B. C. Perry, D. Zhou, X. Wu, F. Yang, M. A. Byers, T. G. Chu, J. J. Hockema, E. J. Woods, and W. S. Goebel. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods*, 14(2):149–156, 2008.
- [148] M. Pfaff. Recognition sites of rgd-dependent integrins. In J. A. Elbe, editor, *Integrin-Ligand Interaction*, pages 101–121. Heidelberg: Springer-Verlag, 1997.

-
- [149] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, and J. Engel. Selective recognition of cyclic rgd peptides of nmr defined conformation by alpha iib beta 3, alpha v beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem*, 269(32):20233–20238, 1994.
- [150] M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309(5963):30–33, 1984.
- [151] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411):143–147, 1999.
- [152] G. E. Plopper, H. P. McNamee, L. E. Dike, K. Bojanowski, and D. E. Ingber. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell*, 6(10):1349–1365, 1995.
- [153] D. J. Polak. Regenerative medicine. opportunities and challenges: a brief overview. *J R Soc Interface*, 7 Suppl 6:S777–S781, 2010.
- [154] H. Pommerenke, E. Schreiber, F. Dürr, B. Nebe, C. Hahnel, W. Möller, and J. Rychly. Stimulation of integrin receptors using a magnetic drag force device induces an intracellular free calcium response. *Eur J Cell Biol*, 70(2):157–164, 1996.
- [155] H. Pommerenke, C. Schmidt, F. Dürr, B. Nebe, F. Lüthen, P. Muller, and J. Rychly. The mode of mechanical integrin stressing controls intracellular signaling in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 17(4):603–611, 2002.
- [156] F. Pouthas, P. Girard, V. Lecaudey, T. B. Nga Ly, D. Gilmour, C. Boulin, R. Pepperkok, and E. G. Reynaud. In migrating cells, the golgi complex and the position of the centrosome depend on geometrical constraints of the substratum. *J Cell Sci*, 121(Pt 14):2406–2414, 2008.
- [157] M. Prager-Khoutorsky, A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, B. Geiger, and A. D. Bershadsky. Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat Cell Biol*, 13(12):1457–1465, 2011.
- [158] A. G. Prat and H. F. Cantiello. Nuclear ion channel activity is regulated by actin filaments. *Am J Physiol*, 270(5 Pt 1):C1532–C1543, 1996.
- [159] S. L. Preston, M. R. Alison, S. J. Forbes, N. C. Direkze, R. Poulson, and N. A. Wright. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol*, 56(2):86–96, 2003.

- [160] K. L. Pricola, N. Z. Kuhn, H. Haleem-Smith, Y. Song, and R. S. Tuan. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an erk1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem*, 108(3):577–588, Oct 2009.
- [161] L.-H. Qiu, M. Zhong, X.-N. Tang, and Z.-Y. Wang. Effect of static magnetic field on bone morphogenetic protein 2 and collagen type i of osteoblast cell. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 16(1):33–35, 2007.
- [162] M. Radmacher. Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy. In Y.-L. Wang and D. E. Discher, editors, *Cell mechanics*, pages 347–372. Elsevier Academic Press, 2007.
- [163] P. Roca-Cusachs, J. Alcaraz, R. Sunyer, J. Samitier, R. Farré, and D. Navajas. Micropatterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in g1 and proliferation. *Biophys J*, 94(12):4984–4995, 2008.
- [164] O. M. Rossier, N. Gauthier, N. Biais, W. Vonnegut, M.-A. Fardin, P. Avigan, E. R. Heller, A. Mathur, S. Ghassemi, M. S. Koeckert, J. C. Hone, and M. P. Sheetz. Force generated by actomyosin contraction builds bridges between adhesive contacts. *EMBO J*, 29(6):1055–1068, 2010.
- [165] A. S. Rowlands, P. A. George, and J. J. Cooper-White. Directing osteogenic and myogenic differentiation of mscs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(4):C1037–C1044, 2008.
- [166] J. Rubin, C. Rubin, and C. R. Jacobs. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene*, 367:1–16, 2006.
- [167] A. A. Rzhaninova, S. N. Gornostaeva, and D. V. Goldshtein. Isolation and phenotypical characterization of mesenchymal stem cells from human fetal thymus. *Bull Exp Biol Med*, 139(1):134–140, 2005.
- [168] N. Sakamoto, T. Ohashi, and M. Sato. Effect of magnetic field on nitric oxide synthesis of cultured endothelial cells. *Int J Appl Electrom*, 14(1-4/2001/2002):317–322, 2002.
- [169] R. Sarugaser, D. Lickorish, D. Baksh, M. M. Hosseini, and J. E. Davies. Human umbilical cord perivascular (hucpv) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, 23(2):220–229, 2005.
- [170] M. Sasaki, R. Abe, Y. Fujita, S. Ando, D. Inokuma, and H. Shimizu. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*, 180(4):2581–2587, 2008.

- [171] Y. Sato, H. Araki, J. Kato, K. Nakamura, Y. Kawano, M. Kobune, T. Sato, K. Miyanishi, T. Takayama, M. Takahashi, R. Takimoto, S. Iyama, T. Matsunaga, S. Ohtani, A. Matsuura, H. Hamada, and Y. Niitsu. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106(2):756–763, 2005.
- [172] C. Schmidt, H. Pommerenke, F. Dürr, B. Nebe, and J. Rychly. Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J Biol Chem*, 273(9):5081–5085, 1998.
- [173] B. Sen, Z. Xie, N. Case, M. Ma, C. Rubin, and J. Rubin. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology*, 149(12):6065–6075, 2008.
- [174] Y. Senju and H. Miyata. The role of actomyosin contractility in the formation and dynamics of actin bundles during fibroblast spreading. *J Biochem*, 145(2):137–150, 2009.
- [175] S. J. Shattil, C. Kim, and M. H. Ginsberg. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4):288–300, 2010.
- [176] K. Shen, J. Qi, and L. C. Kam. Microcontact printing of proteins for cell biology. *J Vis Exp*, 22, 2008.
- [177] D. T. Shih, D. Lee, S. Chen, R. Tsai, C. Huang, C. Tsai, E. Shen, and W. Chiu. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*, 23(7):1012–1020, 2005.
- [178] C. A. Simmons, S. Matlis, A. J. Thornton, S. Chen, C. Y. Wang, and D. J. Mooney. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (erk1/2) signaling pathway. *J Biomech*, 36(8):1087–1096, 2003.
- [179] S. P. Singh, E. I. Chang, A. K. Gossain, B. J. Mehara, R. D. Galiano, J. Jensen, M. T. Longaker, G. C. Gurtner, and P. B. Saadeh. Cyclic mechanical strain increases production of regulators of bone healing in cultured murine osteoblasts. *J Am Coll Surg*, 204(3):426–434, 2007.
- [180] B. M. Spiegelman and C. A. Ginty. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3t3-adipocytes. *Cell*, 35(3 Pt 2):657–666, 1983.
- [181] C. Y. Tay, H. Yu, M. Pal, W. S. Leong, N. S. Tan, K. W. Ng, D. T. Leong, and L. P. Tan. Micropatterned matrix directs differentiation of human mesenchymal stem cells towards myocardial lineage. *Exp Cell Res*, 316(7):1159–1168, 2010.

- [182] A. Tezcaner and D. Kershin. *Active Implants and Scaffolds for Tissue Engineering.*, chapter Bioactive Agent Delivery in Bone Tissue Engineering. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- [183] R. G. Thakar, Q. Cheng, S. Patel, J. Chu, M. Nasir, D. Liepmann, K. Komvopoulos, and S. Li. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophys J*, 96(8):3423–3432, 2009.
- [184] M. M. Thi, D. A. Iacobas, S. Iacobas, and D. C. Spray. Fluid shear stress upregulates vascular endothelial growth factor gene expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*, 1117:73–81, 2007.
- [185] C. H. Thomas, J. H. Collier, C. S. Sfeir, and K. E. Healy. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4):1972–1977, 2002.
- [186] J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391):1145–1147, 1998.
- [187] M. Théry. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci*, 123(Pt 24):4201–4213, 2010.
- [188] M. Théry and M. Piel. Adhesive micropatterns for cells: a microcontact printing protocol. *Cold Spring Harbor Protoc*, 4(7):1–11, 2009.
- [189] M. Théry, A. Pepin, E. Dressaire, Y. Chen, and M. Bornens. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton*, 63(6):341–355, 2006.
- [190] J. E. Till and E. A. McCulloch. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14:213–222, 1961.
- [191] H. Tsuchiya, H. Kitoh, F. Sugiura, and N. Ishiguro. Chondrogenesis enhanced by overexpression of sox9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(2):338–343, 2003.
- [192] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8(9):726–736, 2008.
- [193] J. M. Vasiliev. Spreading of non-transformed and transformed cells. *Biochim Biophys Acta*, 780(1):21–65, 1985.

- [194] P. Vavken. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative medicine.*, chapter Tissue Engineering of ligaments and tendons., pages 317–326. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [195] V. Vogel and M. Sheetz. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(4):265–275, 2006.
- [196] A. von Kriegsheim, D. Baiocchi, M. Birtwistle, D. Sumpton, W. Bienvenut, N. Morrice, K. Yamada, A. Lamond, G. Kalna, R. Orton, D. Gilbert, and W. Kolch. Cell fate decisions are specified by the dynamic erk interactome. *Nat Cell Biol*, 11(12):1458–1464, 2009.
- [197] S. Walsh, G. R. Jordan, C. Jefferiss, K. Stewart, and J. N. Beresford. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*, 40(1):74–83, 2001.
- [198] N. Wang, J. P. Butler, and D. E. Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111):1124–1127, 1993.
- [199] N. Wang, J. D. Tytell, and D. E. Ingber. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(1):75–82, 2009.
- [200] K. Warstat, D. Meckbach, M. Weis-Klemm, A. Hack, G. Klein, P. de Zwart, and W. K. Aicher. Tgf-beta enhances the integrin alpha2beta1-mediated attachment of mesenchymal stem cells to type i collagen. *Stem Cells Dev*, 19(5):645–656, 2010.
- [201] I. L. Weissman. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1):157–168, 2000.
- [202] K. J. Wilschut, H. P. Haagsman, and B. A. J. Roelen. Extracellular matrix components direct porcine muscle stem cell behavior. *Exp Cell Res*, 316(3):341–352, 2010.
- [203] J. P. Winer, P. A. Janmey, M. E. McCormick, and M. Funaki. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. *Tissue Eng Part A*, 15(1):147–154, 2009.
- [204] J. K. Wise, A. L. Yarin, C. M. Megaridis, and M. Cho. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on oriented nanofibrous scaffolds: engineering the superficial zone of articular cartilage. *Tissue Eng Part A*, 15(4):913–921, 2009.
- [205] T. J. Yeatman. A renaissance for src. *Nat Rev Cancer*, 4(6):470–480, 2004.

- [206] B. L. Yen, H. Huang, C. Chien, H. Jui, B. Ko, M. Yao, C. Shun, M. Yen, M. Lee, and Y. Chen. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells*, 23(1):3–9, 2005.
- [207] E. K. F. Yim, S. W. Pang, and K. W. Leong. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. *Exp Cell Res*, 313(9):1820–1829, 2007.
- [208] M. Yoshigi, L. M. Hoffman, C. C. Jensen, H. . Yost, and M. C. Beckerle. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol*, 171(2):209–215, 2005.
- [209] R. Zaidel-Bar and B. Geiger. The switchable integrin adhesome. *J Cell Sci*, 123(Pt 9):1385–1388, 2010.
- [210] R. Zaidel-Bar, S. Itzkovitz, A. Ma’ayan, R. Iyengar, and B. Geiger. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*, 9(8):858–867, 2007.
- [211] E. Zamir and B. Geiger. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, 114(Pt 20):3583–3590, 2001.
- [212] M. M. Zanone, E. Favaro, I. Miceli, G. Grassi, E. Camussi, C. Caorsi, A. Amoroso, M. Giovarelli, P. C. Perin, and G. Camussi. Human mesenchymal stem cells modulate cellular immune response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(8):3788–3797, 2010.
- [213] H. Zhu, X. Jiang, Y. Wu, Y. Liu, X. Li, Y. Zhang, and N. Mao. Identification of mesenchymal stem cells derived from rheumatoid arthritis synovial fluid and their regulatory effect on osteoblast formation. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 17(4):977–980, 2009.
- [214] B. Zimmerman, M. Arnold, J. Ulmer, J. Blümmel, A. Besser, J. P. Spatz, and B. Geiger. Formation of focal adhesion-stress fibre complexes coordinated by adhesive and non-adhesive surface domains. *IEE Proc Nanobiotechnol*, 151(2):62–66, 2004.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Rychly für die Bereitstellung meines Promotions-themas sowie die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung, insbesondere in der Endphase des Entstehungsprozesses dieser Arbeit.

Desweiteren danke ich Frau Prof. Dr. B. Piechulla für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit innerhalb des Sonderforschungsbereiches SFB TransRegio 37 - Teilprojekt B1 bei Herrn Prof. Dr. M. Möller (RWTH Aachen) und Herrn Prof. Dr. R. E. Brenner (Universität Ulm) einschließlich allen Mitarbeitern, insbesondere Frau Dipl.-Biol. K. Bruellhoff und Dipl.-Chem. T. Naser, bedanken.

Frau Dr. P. Müller danke ich sehr für die enge Zusammenarbeit innerhalb unseres Forschungsprojektes und ihre unermüdliche Unterstützung wie auch Frau Dipl.-Ing. (FH) A. Peters, Frau Dipl.-Ing. (FH) P. Seidel und Dr. U. Bulnheim.

Bei Frau PD Dr. K. Peters bedanke ich mich herzlich für die einmonatige Hilfeleistung sowie zahlreiche lebhaftige Diskussionen.

In der Gesamtheit spreche ich allen derzeitigen und früheren Mitarbeitern des Arbeitsbereiches Zellbiologie meinen Dank für die alltägliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor aus.

Insbesondere danke ich Frau Dipl.-Biol. C. Matschegewski, Frau Dr. D. Thiem-Martin und Frau Dr. L. Wittmer für ihre stetige Motivation, den Erfahrungsaustausch und ihre Ideen sowie darüber hinaus Frau Dipl.-Biol. D. Killian, Frau Dr. C. Ganz und Frau Dr. K. John für ihre Lesebereitschaft.

Herrn Dipl.-Inf. S. Ohl gilt mein Dank als Retter in der Latex-Not.

Ein besonders lieber Dank geht an alle weiteren bedachten Personen!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe nur die von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet sowie die inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen der benutzten Werke als solche gekennzeichnet.

Rostock, den 01. Mai 2012

Annika Kasten