

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
an der Universität Tübingen

Effekte biomechanischer Kräfte auf die Morphologie und
glatt-muskuläre Differenzierung humaner mesenchymaler
Stromazellen des Knochenmarks

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hegemann, geb. Fahlbusch, Miriam Lena

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Rolauffs
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Alexander-Friedrich

Tag der Disputation: 07.11.2016

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 8 |
| 1. Einleitung | 10 |
| 1.1. Teilprojekt I der klinischen Forschergruppe 273 | 10 |
| 1.2. Die mesenchymale Stromazelle (MSC) | 12 |
| 1.2.1. Die Knochenmarksstromazelle (bmMSC)..... | 15 |
| 1.3. Die glatte Muskelzelle (SMC)..... | 15 |
| 1.4. Kollagen I und die Muskelzellnische | 19 |
| 1.5. Einfluss von biomechanischer Stimulation auf lebende Zellen | 20 |
| 1.6. Einfluss von biomechanischer Stimulation auf MSC..... | 24 |
| 1.6.1. Einfluss von uniaxialem Stress auf die Proliferation von hbmMSC..... | 26 |
| 1.6.2. Einfluss von uniaxialem Stress auf die Differenzierung von hbmMSC | 26 |
| 1.7. Einfluss der Substratsteifigkeit auf Proliferation und Differenzierung von MSC | 26 |
| 1.7.1. Definition des Young's Modulus | 27 |
| 1.8. Einfluss der Zellform auf Proliferation und Differentierung von MSC | 28 |
| 1.9. Ziel der Arbeit..... | 28 |
| 2. Material und Methoden | 29 |
| 2.1. Chemikalien..... | 29 |
| 2.2. Verbrauchsmaterialien | 31 |
| 2.3. Geräte | 31 |
| 2.4. Verwendete Software | 32 |
| 2.5. Das Bose ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument | 33 |
| 2.6. kompaktiertes Kollagen-I-Hydrogel | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.6.1. Charakterisierung des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels | 36 |
| 2.6.1.1. Messung mit dem Zwei-Koordinaten-Mess-Gerät (ZKM 250D) zur Bestimmung der Geldicke | 36 |
| 2.6.1.2. Messungen mit dem Bose ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument zur Bestimmung der Dehnungssteifigkeit..... | 36 |
| 2.6.1.3. Messungen mit dem Atomic Force Mikroskop (AFM) zur Bestimmung des Young's Modulus..... | 37 |
| 2.6.1.4. Rasterelektronenmikroskopie (REM) zur Visualisierung der Oberflächentopographie | 40 |
| 2.7. Gewinnung und Aufbereitung der hbmMSC..... | 41 |
| 2.8. hbmMSC in der Zellkultur..... | 42 |
| 2.8.1. Passagieren der hbmMSC..... | 42 |
| 2.9. Bestimmung der optimalen Zellzahl | 43 |
| 2.10. Bildakquise mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)..... | 44 |
| 2.11. Live-Dead-Färbung | 47 |
| 2.12. Immunfluoreszenz (IF) zur Visualisierung glattmuskulärer Marker | 47 |
| 2.13. Bildverarbeitung mit ImageJ..... | 49 |
| 2.13.1. Bestimmung der Zellzahl im Mosaix-Bild..... | 49 |
| 2.13.2. Die unterschiedlichen Formfaktoren..... | 50 |
| 2.13.2.1. Bestimmung der Formfaktoren im Mosaix-Bild | 52 |
| 2.14. Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) | 54 |
| 2.15. Umschreiben der RNA in komplementäre Desoxyribonucleinsäure (cDNA) | 55 |
| 2.16. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 55 |
| 2.17. Uniaxiale Stimulation von hbmMSC auf kompaktiertem Kollagen-I-Hydrogel mit dem Bose ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument | 59 |

| | |
|--|----|
| 2.17.1. Besiedelung des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels mit hbmMSC..... | 60 |
| 2.17.2. Einbau des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels in das ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument | 61 |
| 2.17.3. kompaktiertes Kollagen-I-Hydrogel verdauen und einfrieren..... | 64 |
| 2.18. Statistische Analyse | 64 |
| 3. Ergebnisse | 65 |
| 3.1. Verhalten des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels in der Zellkultur..... | 65 |
| 3.2. PCR der Zielgene in der statischen Kultur an Tag 4 und 5..... | 65 |
| 3.3. Bestimmung der optimalen Zellzahl | 66 |
| 3.4. Charakterisierung des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels | 66 |
| 3.4.1. Messungen mit dem Zwei-Koordinaten-Mess-Gerät (ZKM 250D) zur Bestimmung der Geldicke..... | 66 |
| 3.4.2. Messungen mit dem Bose ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument zur Bestimmung der Dehnungssteifigkeit | 67 |
| 3.4.3. Messungen mit dem Atomic Force Mikroskop (AFM) zur Bestimmung des Young's Modulus | 68 |
| 3.4.4. Rasterelektronenmikroskopie (REM) zur Visualisierung der Oberflächentopographie..... | 68 |
| 3.5. Immunfluoreszenz (IF) zur Visualisierung glattmuskulärer Marker | 70 |
| 3.6. Patientencharakteristika | 71 |
| 3.7. Einfluss von uniaxialem Stretch auf die Proliferation von hbmMSC | 71 |
| 3.8. Einfluss von uniaxialem Stretch auf die Formfaktoren von hbmMSC | 72 |
| 3.8.1. Circularity/Shape Factor | 72 |
| 3.8.2. Roundness..... | 73 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.8.3. | Aspect Ratio | 74 |
| 3.8.4. | Solidity | 75 |
| 3.9. | Veränderung der Expression glattnuskulärer Marker bei uniaxialer biomechanischer Stimulation von hbmMSC | 77 |
| 3.9.1. | ACTA-2-Expression | 77 |
| 3.9.2. | TAGLN-Expression | 78 |
| 3.9.3. | CNN1-Expression | 79 |
| 4. | Diskussion..... | 80 |
| 5. | Zusammenfassung | 90 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 91 |
| | Abbildungsverzeichnis | 102 |
| | Tabellenverzeichnis | 105 |
| 7. | Erklärung zum Eigenanteil | 106 |
| | Danksagung | 108 |
| | Lebenslauf..... | 109 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| ACTA II | alpha smooth muscle actin 2 |
| AFM | Atomic force microscope |
| ANOVA | analysis of variance |
| ASC | adulte Stammzelle |
| BG | Berufsgenossenschaft |
| bmMSC | mesenchymale Knochenmarkstromazelle |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CD | Cluster of differentiation |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CFT | Cell traction forces |
| CNN 1 | Calponin 1 |
| d | Tag |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DFG | Deutsche Forschungsgesellschaft |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECM | extrazelluläre Matrix |
| FCS | fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GB | Großbritannien |
| GMP | gute Herstellungspraxis |
| h | Stunde |
| hbmMSC | humane Knochenmarksstromazellen |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure |
| HLA | humane Leukozytenantigene |
| IE | internationale Einheit |
| IF | Immunfluoreszenz |
| KFO | Klinische Forschergruppe |
| LSM | Laser-Scanning-Mikroskop |
| MSC | mesenchymale Stammzelle |
| MSCA-1 | mesenchymal stem cell antigen 1 |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| MYH 11 | myosin heavy chain 11 |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PDGF | platelet-derived growth factor |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |
| PPIA | Peptidylprolyl-Isomerase A |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen/Minute |

| | |
|-------|--|
| RT | Raumtemperatur |
| SBRY | N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine |
| SD | Standardabweichung |
| SMC | glatte Muskelzelle |
| TAGLN | Transgelin |
| Taq | Thermus aquaticus |
| TEP | Totalendoprothese |
| TGF | transforming growth factor |
| TP | Teilprojekt |
| USA | United States of America |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| VSMC | glatte Gefäßmuskelzelle |

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Teilprojekt I der klinischen Forschergruppe 273

Die Doktorarbeit wurde im Rahmen des Teilprojekt (TP) I (Fokus III) der durch die deutsche Forschungsgesellschaft (DFG) geförderten klinischen Forschergruppe (KFO) 273 durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe hat das Ziel, die Therapie der Belastungsharninkontinenz durch zellbasierte Regeneration des Harnröhrensphinkters zu untersuchen. Aufgabe in Teilprojekt I (Fokus III) ist es, den bereits in der Literatur beschriebenen Einfluss von mechanischem Stress im Differenzierungsprozess undifferenzierter mesenchymaler Stromazellen (MSC) in Kombination mit biochemischen Stimuli weiter zu untersuchen (*Abbildung 1*). Dabei werden auch die Effekte der biomechanischen Kräfte auf die Morphologie untersucht und eine Stimulationsmethode zur Expression eines glatt-muskulären Markerprofils erarbeitet.

Wilhelm K. Aicher^{1,4}, Gerd Klein^{2,4}, Bernd Rolauffs^{3,4}

¹ Zentrum für Regenerative Medizin, UKT; ² Medizinische Klinik II, UKT;

³ BG Unfallklinik, Tübingen; ⁴ Zentrum für Medizinische Forschung, Universität Tübingen.

- MSC werden aus drei Quellen isoliert, unter GMP-konformen Bedingungen expandiert und charakterisiert. Solche MSC werden allen Teilprojekten der KFO zur Verfügung gestellt.
- MSC Subsets werden mittels Antikörpern und Sortierung (MACS/FACS) angereichert.
- Die MSC / Subsets werden *in vitro* myogen differenziert. Dabei spielen lösliche Faktoren und Liganden (Fokus I), Komponenten der extrazellulären Matrix und ihre Elastizität (Fokus II) und biomechanische Stimulation (Fokus III) eine Rolle.
- In einem interaktiven, iterativen Prozeß wird ein optimales Differenzierungsprotokoll entwickelt (Abb. 1), welches aus MSC glatte und quergestreifte Muskelzellen herstellt. Deren Regenerationspotential wird in TP1 zell- und molekular-biologisch, in Q2 elektrophysiologisch, in TP3 am Großtiermodell und in TP4 am Kleintiermodell validiert.

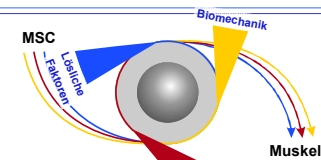


Abbildung 1: Optimierung myogener Differenzierung durch biochemische Stimuli (lösliche Faktoren, Liganden, ECM), biologische Faktoren (Kokultur) und biophysikalische Stimulation (Matrixelastizität, biomechanischer dynamischer oder kontinuierlicher Stress).

Fokus I:

1) Optimierung der Differenzierungsprotokolle: glatter Muskel

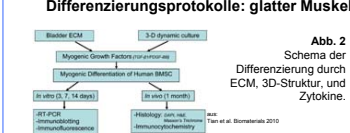


Abb. 2 Schema der Differenzierung durch ECM, 3D-Struktur, und Zytokine.

2) Optimierung der Differenzierungsprotokolle: Skelettmuskel

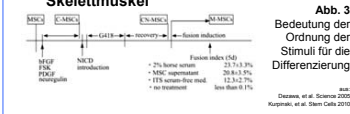


Abb. 3 Bedeutung der Ordnung der Stimuli für die Differenzierung

3) Qualitätskontrolle: Nachweis typischer Gene durch qRT-PCR, ICC, ELISA, etc.

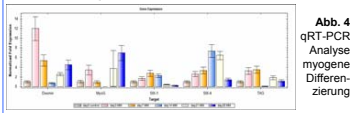


Abb. 4 qRT-PCR Analyse myogener Differenzierung

4) Validierung in TP3, TP4, Q2

Fokus II:

Myogene Differenzierung auf Lamininisoformen

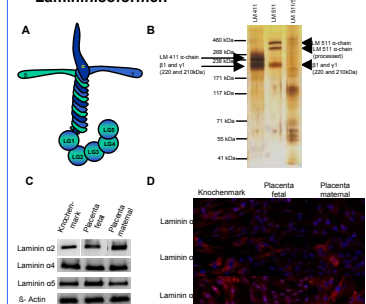


Abb. 5: (A) Strukturmodell der heterotrimeren Laminin-Isomere. (B) Silberfärbung rekombinanter Laminin-Isomere. (C) RT-PCR Analyse der Expression von Laminin alpha Ketten in humanen MSC. (D) Immunfluoreszenzfärbungen humaner MSC mit Laminin alpha Ketten-spezifischen Antikörpern.

Einfluss der Substratelastizität

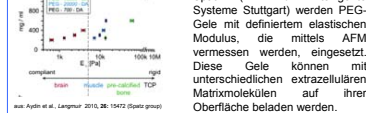


Abb. 6: In Kooperation mit Prof. Spatz (MPI für Intelligente Systeme Stuttgart) werden PEG-Gele mit definiertem elastischen Modulus, die mittels AFM vermessen werden, eingesetzt. Diese Gele können mit unterschiedlichen extrazellulären Matrixmolekülen auf ihrer Oberfläche beladen werden.

Fokus III:

Undifferenzierte MSCs: sensitiv gegenüber biomechanischen Kräften

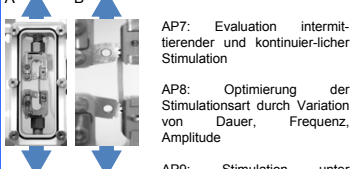


Abb. 7: Biomechanische Stimulation. A: Stimulationskammer, beispielhaft für die Applikation von Stretch eingerichtet. B: eingespanntes Trägermaterial.

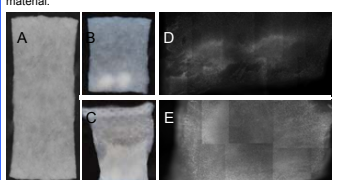


Abb. 8: Die biomechanische Streckung von MSCs führt zu einer homogenen Proliferationszunahme. A: Zelltäger; B: D: MSC-Besiedelung in der nicht stimulierten Kontrolle; C, E: MSC-Besiedelung nach Stimulation durch kontinuierlichen sinusförmigen Stretch (1Hz, 5% Amplitude, 6 Tage). Es zeigt sich eine Zunahme der MSCs in absoluter Zellzahl, Besiedelungsdichte und Fläche.

Interaktiver Prozeß zur Optimierung der Protokolle in TP1

Ausgewählte die Differenzierung fördernde ECM-Komponenten werden auf elastische Träger aufgebracht (Fokus II, AP 4 - 6), und mit MSC oder myogen differenzierenden Zellen (Fokus I, AP 1-3) besiedelt. Es wird untersucht, ob die Differenzierung der MSC auf der ECM durch lösliche Faktoren induziert (Fokus I, AP 2,3) und durch biomechanische Stimulation (Fokus III, AP 7 - 10) weiter verbessert werden kann. Der Zeitplan ist in Abb. 9, die Interaktionen von TP1 mit den anderen TP der KFO-273 in Abb. 10 zu finden.

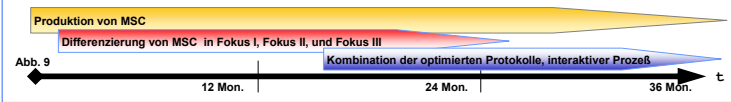


Abb. 9

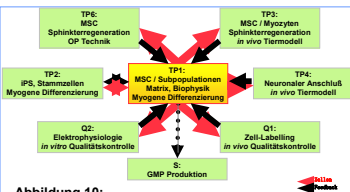


Abbildung 10: Vernetzung des TP1 im Verbund der KFO



Abbildung 1: Projektposter des Teilprojekt I der KFO 273

1.2. Die mesenchymale Stromazelle (MSC)

Die mesenchymale Stromazelle (MSC) ist eine multipotente Progenitorzelle des Binde- und Stützgewebes. Sie hat ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential (Nava et al., 2012). Erstmals ließen sich mesenchymale Stromazellen 1968 aus Knochenmark isolieren (Friedenstein et al., 1968). Später konnte man nachweisen, dass sie sich in Knochen, Knorpel-, Fett- und Muskelgewebe differenzieren lassen (Caplan, 1991), (Pittenger et al., 1999), (Zhang et al., 2008). Entwicklungsgeschichtlich entstammt sie dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm (Bentzinger et al., 2012). Während man zunächst von der mesenchymalen Stammzelle sprach, wurde der Begriff später diskutiert, da sich zeigen ließ, dass MSC Eigenschaften einer echten Stammzelle fehlen (Keating, 2006). Dennoch wird der Begriff in der Literatur oft synonym gebraucht. Den Stammbaum der mesenchymalen Stromazelle und ihren Abkömmlingen zeigt *Abbildung 2*.

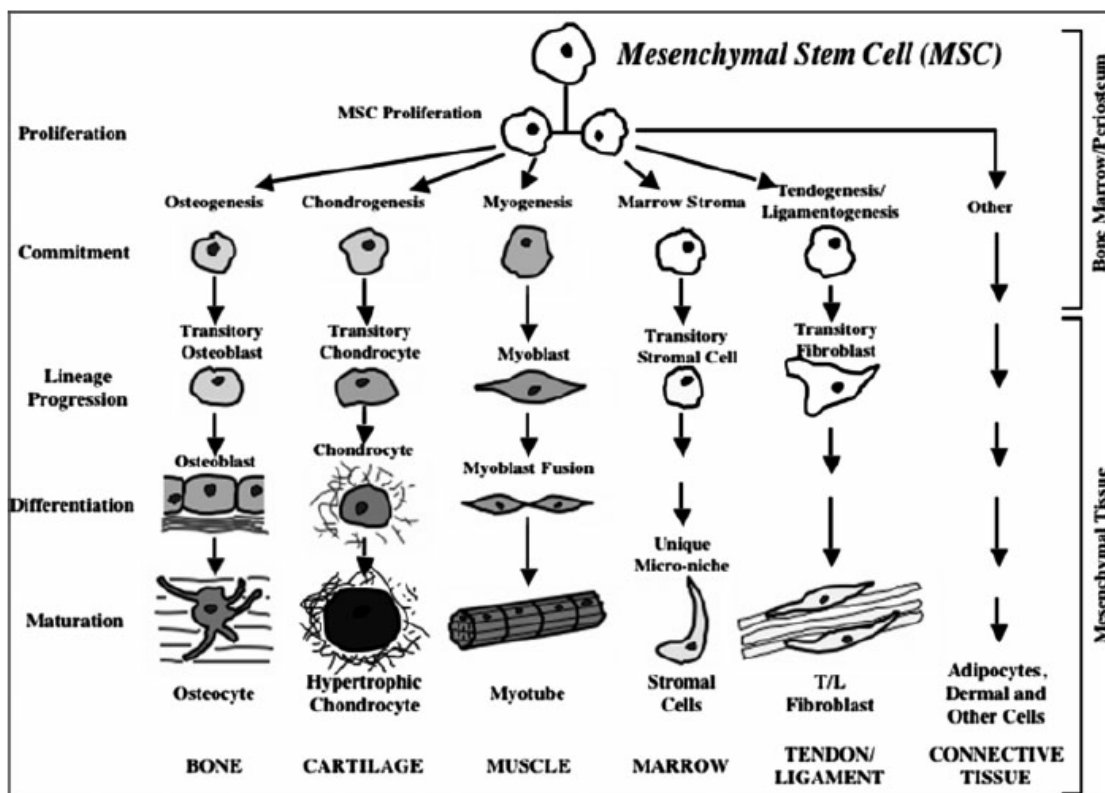


Abbildung 2: Die mesenchymale Stammzelle und ihre Abkömmlinge, aus Caplan, 2007

In verschiedenen Geweben lassen sich ruhende mesenchymale Stromazellen nachweisen, die *in vivo* z.B. im Falle einer Verletzung aktiviert werden. Bisher ließen sich MSC aus verschiedenen Geweben wie Fett (Noël et al., 2008) (Wang et al., 2010a), Muskel (Huard et al., 2003), Plazenta (Pilz et al., 2010), (Ulrich et al., 2013), Blut (Cao et al., 2005), aber auch der Prostatagewebe (Kim et al., 2014) isolieren. Außerdem gelang es *in vitro* MSC in glatte Muskelzellen (SMC) zu differenzieren (Galmiche et al., 1993) (Gong and Niklason, 2008), (Narita et al., 2008). (Tian et al., 2010), (Wang et al., 2010a). Problematisch ist, dass sich MSC nicht nur in funktionelle Gewebe differenzieren lassen, sondern diese auch zur Narbenbildung, als Entzündungszellen oder Mediatoren der Tumorneogenese beitragen (Hinz et al., 2012).

Die International Society for Cellular Therapy hat Minimalkriterien zur Definition der humanen multipotenten mesenchymalen Stromazelle aufgestellt (Dominici et al., 2006).

1. MSC adhären unter Standardkulturbedingungen an Plastik
2. MSC zeigen eine spezifische Antigenexpression (95% positiv für CD105, CD73 und CD90, negativ bzw. < 2% positiv für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR Oberflächenmoleküle)
3. MSC haben ein multipotentes Differenzierungspotenzial und lassen sich *in vitro* in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren

Trotz Bemühungen *die* mesenchymale Stromazelle zu definieren, bleibt diese eine heterogene Zellpopulation. Den einen, spezifischen Oberflächenmarker, der eine mesenchymale Stromazelle eindeutig definiert, gibt es nicht (Caplan, 2007). Beobachtet man MSC in der Zellkultur, kann man bereits makroskopisch unterschiedliche Subtypen durch ihr Aussehen unterscheiden: 1. spindelförmige Zellen mit zwei Fortsätzen in entgegengesetzte Richtungen und 2. polygonale „flat“ Zellen. Während die erste Form als unreif gilt, ist der zweite Zelltyp der ausdifferenzierte. Somit spricht man der spindelförmigen Zellform die größere Multipotenz zu (Phinney et al., 1999). Mit steigenden Passagen nimmt die Anzahl der „flat“-Zellen in der Zellkultur zu (Sekiya et al., 2002),

(Neuhuber et al., 2008), (Stolzing et al., 2008). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass sich MSC mit steigenden Passagen spontan ausdifferenzieren und weniger Multipotenz besitzen (Muraglia et al., 2000). Verschiedene Autoren beschreiben MSC bis zur 6. Passage in ihrer Multipotenz als stabil (Kern et al., 2006), (Zhang et al., 2008). Das in *Abbildung 2* gezeigte Schaubild der mesenchymalen Stammzelle und ihren Abkömmlingen ist eine stark vereinfachte Darstellung. Das aktuelle Wissen vermittelt ein deutlich komplexeres Bild, in dem sich die Progenitoren nicht nur entlang ihrer Zelllinie entwickeln, sondern sich auch verschiedene Sprünge zwischen unterschiedlichen Entwicklungslinien aufzeigen lassen (*Abbildung 3*). Dieses Konzept hat die Begriffe der „phänotypischen Plastizität“ und „Transdifferenzierung“ geprägt und weicht alte Konzepte der Linienzugehörigkeit auf (Ge et al., 2014). Darüberhinaus weisen MSC je nach ihrem Ursprungsgewebe unterschiedliche Eigenschaften auf und unterscheiden sich in ihren Subsets (Kern et al., 2006), (Baksh et al., 2007), (Hass et al., 2011), (Torensma et al., 2013).

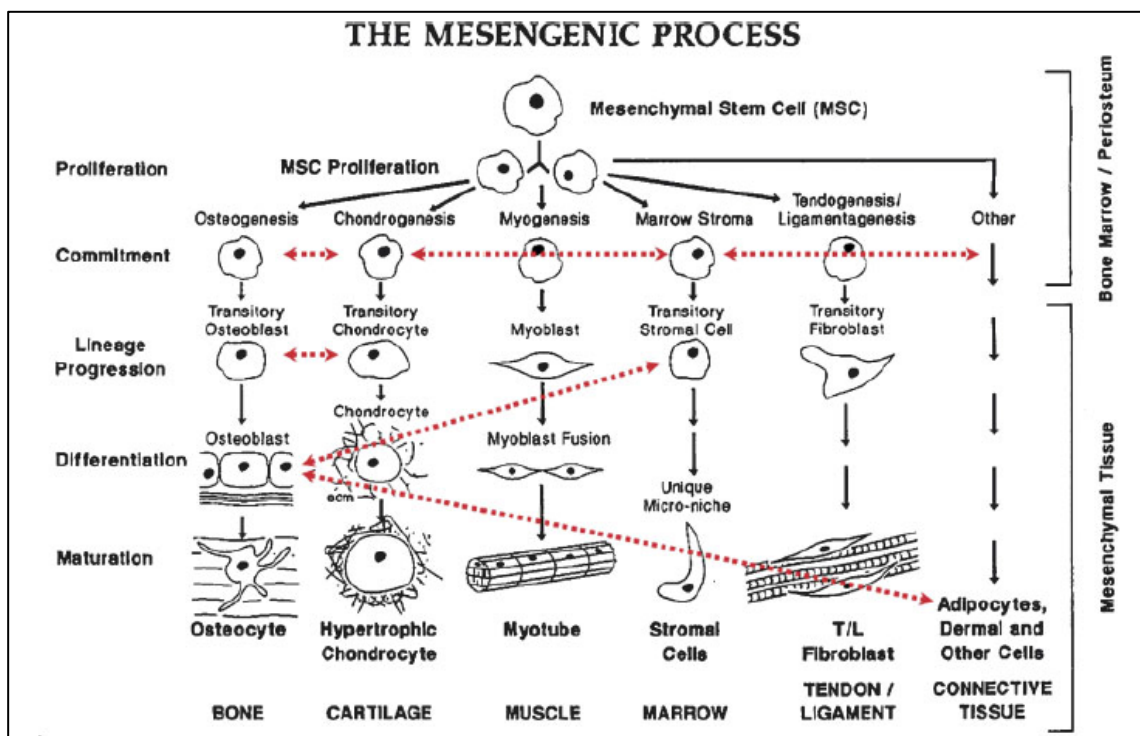


Abbildung 3: „The Mesengenic Process“ vermittelt ein komplexeres Bild der MSC-Differenzierung, aus Caplan 2007

1.2.1. Die Knochenmarksstromazelle (bmMSC)

Knochenmarksstromazellen (bmMSC) weisen ein besonders osteogenes Potential auf (Pittenger et al., 1999), (Muraglia et al., 2000), (Piliz et al., 2010). Aufgrund verschiedener Oberflächenmarker, z.B. CD 56 oder MSCA-1, lassen sie sich von anderen MSC in ihrer Herkunft unterscheiden (Bühning et al., 2009). bmMSC exprimieren besonders viel alkalische Phosphatase und CD146 (Aicher et al., 2011). In Kultur differenzieren sie spontan zu Osteozyten (Pilz et al., 2010), (Sivasubramanian et al., 2012).

Der Anteil von bmMSC liegt im Knochenmark bei 0,001-0,01% (Pittenger et al., 1999). Mit steigendem Alter finden sich nicht nur weniger MSC im Knochenmark, sie sind auch, bezogen auf ihre Multipotenz, weniger „fit“ (Stolzing et al., 2008). Auch die Proliferationsfähigkeit ist von Alter und Geschlecht abhängig. Darüber hinaus sind die MSC-Eigenschaften auch innerhalb eines Menschen extremen Schwankungen unterlegen (Phinney et al., 1999). So unterscheiden sich z.B. bmMSC aus unterschiedlichen Knochen, aber auch die zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnene bmMSC aus ein und demselben Knochen. Knochenmarksstromazellen lassen sich u.A. in quergestreifte (Dezawa et al., 2005) und glatte (Galmiche et al., 1993) Muskulatur differenzieren.

1.3. Die glatte Muskelzelle (SMC)

Die viszerale oder glatte Muskulatur entsteht aus dem Mesoderm, dem unsegmentierten viszeralem Mesoderm, auch Splanchnopleura genannt und bildet den kontraktilem Apparat der Eingeweide. Ihre Innervation ist unwillkürlich und wird über das vegetative Nervensystem vermittelt. Sie ist praktisch nicht ermüdbar. Glatte Muskelzellen können entweder bündelartig oder locker im Bindegewebe verstreut auftreten. Sie sind in aller Regel spindelförmig und wenig verzweigt. Nahezu ihr gesamtes Zytoplasma ist mit Aktin- und Myosin-Filamenten ausgefüllt.

Die glatte Muskelzelle befindet sich auch im ausdifferenzierten adulten Stadium auf einem Kontinuum zwischen kontraktilem und synthetischem Typ (*Abbildung 4*). Dieser stetige Wandel wird im Englischen „phenotypic switching“ genannt (Rensen et al., 2007), (Beamish et al., 2010). Hierbei verhalten sich synthetischer und kontraktile Phänotyp invers: Der synthetische oder proliferative Typ vermittelt Migration und Proliferation sowie die Synthese von extrazellulärer Matrix (Owens, 1995). Allerdings verliert er seine kontraktile Eigenschaften. Im Zytoplasma finden sich so entsprechend wenige Myofilamente, dafür ist der Anteil des rauhen endoplasmatischen Retikulums, der freien Ribosomen und des Golgi-Apparates größer (*Abbildung 5*) (Chamley-Campbell et al., 1979). Die Umwandlung in den synthetischen Typ wird gelegentlich auch De-Differenzierung genannt. Ein typischer Marker für synthetische glatte Muskelzelle ist Vimentin. Der kontraktile oder ruhende Typ zeichnet sich durch einen geringen proliferativen Index, aber eine hohe Expression der Proteine des kontraktilem Apparates aus (Chamley-Campbell et al., 1979). Typische Marker der kontraktilem glatten Muskelzelle sind Transgelin oder Calponin. Phänotypic Switching findet *in vivo* z.B. nach einer Verletzung während eines Reparaturprozesses in der Muskulatur statt (Kurpinski et al., 2006a).

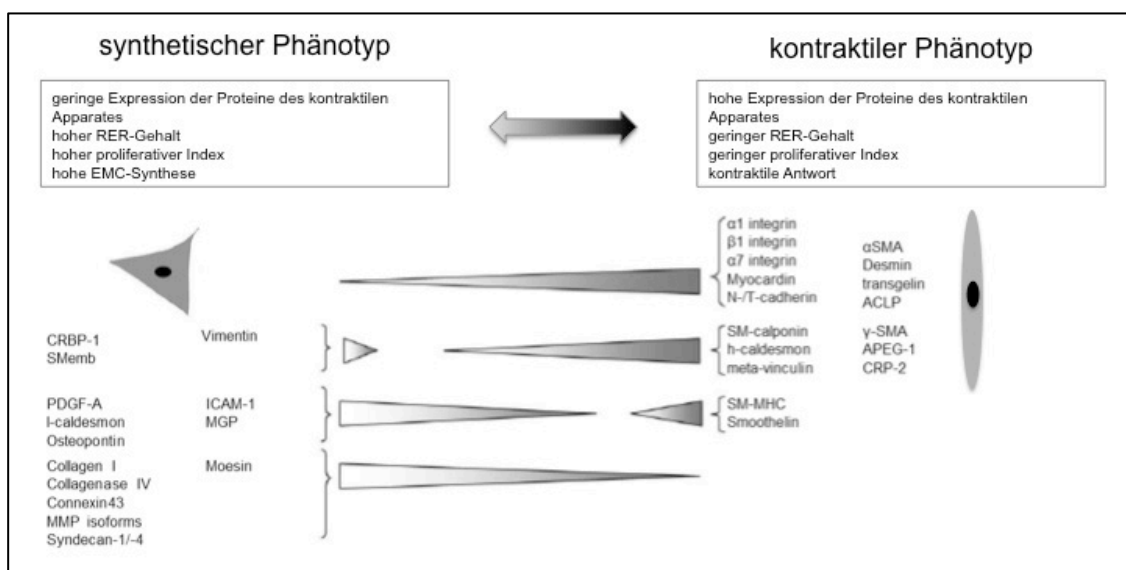


Abbildung 4: Fließende Übergänge zwischen dem synthetischen und dem kontraktilem Phänotyp, mod. nach Beamish et al., 2010 & Rensen et al., 2007

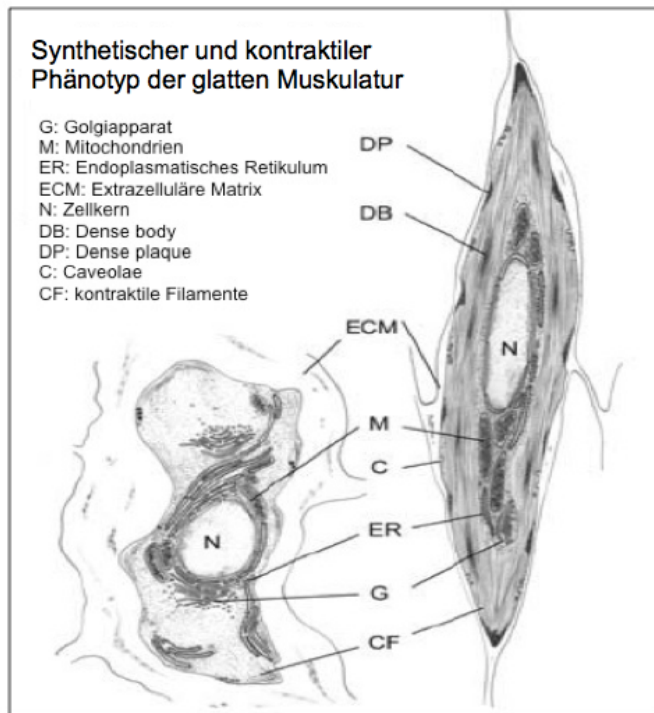


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen synthetischem (links) und kontraktilem (rechts) Phänotyp der glatten Muskelzelle, mod. aus Rensen et al., 2007

Um die fortschreitende Differenzierung in eine kontraktile glatt-muskuläre Zelle zu detektieren, sind mehrere Marker etabliert.

Smooth muscle α -Actin (auch: (α)-SMA, Gen: ACTA-II, 83 bp, 43 kDa): prädominante Actin-Isoform des dünnen Filaments des kontraktilem Apparates gilt als frühester Marker in der Differenzierung zur glatten Muskelzelle (Rensen et al., 2007), (Beamish et al., 2010); hoch-selektiv; macht 40 % des Totalzellproteins der glatten Muskelzelle aus; da sich die Expression von α -SMA allerdings in verschiedenen Zellformen induzieren lässt, reicht die alleinige Expression von α -SMA nicht aus, um eine glattmuskuläre Zelllinie nachzuweisen (Owens et al., 2004), (Gong and Niklason, 2008); 10-15 % der nicht-induzierten MSC exprimieren α -SMA; die Zunahme der Expression von α -SMA wird als Zeichen einer fortschreitenden Differenzierung gewertet (Liu et al., 2013)

Transgelin (auch: SM-22 α , Gen: TAGLN, 144 bp, 22 kDa): früh-intermediärer Marker; bindet Aktin; gehört zur Calponin-Familie (Assinder et al., 2009); wird neben glattmuskulären Zellen auch auf Kardiomyozyten exprimiert (Beamish et al., 2010); ähnlich wie α -SMA ist Transgelin auch in uninduzierten MSC nachweisbar (Wang et al., 2010a)

(Smooth muscle basic (h1)) Calponin (Gen: CNN1, 73 bp, 34 kDa): Calponin steht für die englische Abkürzung „calcium- and calmodulin-binding troponin T-like„ - Protein; bindet an Actin (Winder and Walsh, 1993), intermediär bis später Marker während der glatt-muskulären Differenzierung (Beamish et al., 2010); auch in der undifferenzierten MSC lässt sich bereits eine Baseline-Expression von Calponin nachweisen (Gong and Niklason, 2008); reguliert Signale und Kontraktion in der SMC (Owens, 1995); typischer Marker der kontraktilen glatten Muskelzelle (Liu et al., 2013)

α -SMA, Transgelin und Calponin I gelten als immature, frühe oder unreife SMC-Marker (Tang et al., 2012).

Smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC, Gen: MYH11, 4 verschiedene Proteinprodukte mit unterschiedlichen Basenpaaren, 200-204 kDa): später oder maturer Marker für SMC; höchste Spezifität für differenzierte glatte Muskulatur (Owens, 1995), insb. SM-2; gilt, neben Smoothelin, als einzig etablierter Marker für den kontraktilen Subtyp der SMC (Rensen et al., 2007); zeigt den höchsten Differenzierungsgrad an

Alle oben genannten Marker werden, mit der Ausnahme von Myh11, bereits auf undifferenzierten MSC exprimiert (Tamama et al., 2008), (Tian et al., 2010), (Liu et al., 2013). Eine schematische Abfolge der untersuchten, glattmuskulären Marker vom immaturrem zum murem Marker ist in *Abbildung 6* dargestellt.

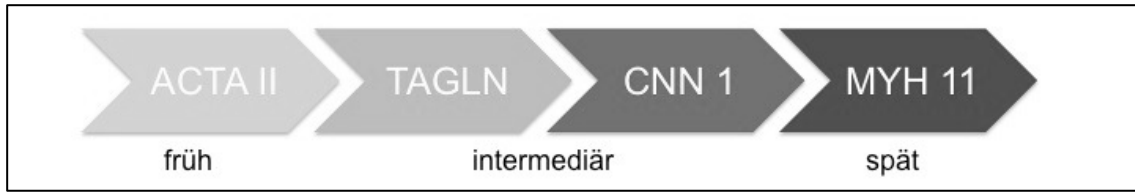


Abbildung 6: Glattmuskuläre Marker und ihre zeitliche Abfolge in der glattmuskulären Differenzierung, mod. nach Beamish et al., 2010 & Rensen et al., 2007

1.4. Kollagen I und die Muskelzellnische

Glatte Muskelzellen kommen, wie bereits beschrieben, bündelartig oder locker verstreut im Bindegewebe vor. Ein Hauptbestandteil des Bindegewebes ist Kollagen. Kollagen wird durch Fibroblasten über verschiedene Stufen gebildet. Beim Menschen sind derzeit 28 unterschiedliche Kollagen-Typen bekannt. Typ I-Kollagen ist der häufigste Typ des lockeren und dichten Bindegewebes. Kollagenfasern sind extrem zugfest und kaum flexibel.

In vivo besteht Kollagen I aus drei links-gedrehten Alpha-Helices, die zu einer rechts-gedrehten Trippelhelix vereint werden. Stabilisiert wird diese durch Wasserstoff-Brücken. Das Besondere ist das häufige Vorkommen der Aminosäuren Glycin und Hydroxyprolin. Das intrazellulär gebildete glycosylierte Tropokollagen wird von den Fibroblasten exozytiert. Im Intrazellularraum werden durch Proteinasen die Propetide abgetrennt und die Fibrillenbildungen beginnt indem sich verschiedene Trippelhelixes über die Lysyl-Oxidase verlinken (Kadler et al., 1996). Diesen natürlichen Polymerisationsprozess kann man auch *in vitro* simulieren, da sich Kollagen I temperatur- und pH-abhängig vernetzt (Elsdale and Bard, 1972), (Roeder et al., 2002).

MSC adhärieren sehr gut an Kollagen I und reagieren mit einer Vergrößerung der Zelloberfläche im Sinne einer vermehrten Ausbildung von Filopodien (Salaszyk et al., 2004). Darüber hinaus hat Kollagen I einen entscheidenden Beitrag in der Entwicklung von Myoblasten zu Myotuben (Hauschka and Konigsberg, 1966), also der Entstehung von Muskulatur aus Muskelzellen.

Man unterscheidet fibrilläres (oder polymeres) und nicht-fibrilläres (oder monomeres) Kollagen. Allein schon durch diese beiden unterschiedlichen Kollagenformen lassen sich Zellen in ihren Eigenschaften beeinflussen. So

unterstützt z.B. monomeres Kollagen I die SMC-Proliferation (Jones et al., 1997), (Elliott et al., 2003), wobei sie polymeres unterdrückt (Ichii et al., 2001), (McDaniel et al., 2007). Kollagen I ist auch ein wichtiger Einflussfaktor des „phenotypic switching“. So fördert es den synthetischen Phänotyp der glatten Muskelzellen (Hedin et al., 1988). Auch die Steifigkeit bzw. Hydratation von Kollagenfibrillen beeinflusst den Zellphänotyp. Mit zunehmender Steifigkeit lässt sich der SMC-Phänotyp in pro-proliferative Richtung beeinflussen (McDaniel et al., 2007).

Natürlicherweise findet sich in der extrazellulären Matrix ein Kollagen I-Gehalt von 30-40 mg/ml (Miller and Rhodes, 1982). Dieser Anteil steigt im Alterungsprozess, aber auch bei Entzündungen, Erkrankungen und Verletzungen an (Alexakis et al., 2007). Ein hoher Kollagengehalt ist gleichzusetzen mit Fibrose (Gillies and Lieber, 2011) und Fibrose kann die Dysregulation der mesenchymalen Stromazelle bedeuten. Somit kann Kollagen ein Faktor sein, warum muskuläre Reparatur und Regeneration gestört werden (De Lisio et al., 2014), (Antoon et al., 2012). Durch die alleinige Präsenz von Zellen oder Applikation von mechanischem Stress kann die Ultrastruktur des Kollagens auch noch nach der Polymerisationsphase entscheidend verändert werden (Vader et al., 2009). In MSC kann durch mechanischen Stress die Kollagen I-Synthese angeregt werden (Park et al., 2004), (Nieponice et al., 2007), (Zhang et al., 2008).

1.5. Einfluss von biomechanischer Stimulation auf lebende Zellen

Da jede Zelle in einem lebenden Organismus kontinuierlich mechanischen Kräften ausgesetzt ist, liegt nahe, dass der Einfluss von biomechanischer Stimulation von entscheidender Bedeutung ist. Grundsätzlich muss man zwischen Scher-, Dehnungs- und Kompressionskräften unterscheiden, welche auf Zellen wirken können.

Neben morphologisch-strukturellen Veränderungen kann durch biomechanische Stimulation auch die Genexpression verändert oder die Induktion der Differenzierung in eine bestimmte Zelllinie beeinflusst werden (Wang and

Thampatty, 2008). Hierbei scheint klar, dass Zellen in der Lage sind, bereits feine Unterschiede im applizierten Stress (z.B. in der Variation von Stressmodus, Amplitude, Frequenz oder Dauer) wahrzunehmen (Hornberger, 2004). Der Mechanismus, mit dem die Zelle mechanischen Stress in ein intrazelluläres Signal umsetzt, nennt man Mechanotransduktion. Eine zentrale Rolle wird hierbei den Integrinen, den focalen Adhaesionen und dem Zytoskelett zugesprochen (Wang and Thampatty, 2008), (Riehl et al., 2012), (Greiner et al., 2013). In *Abbildung 7* sind bereits identifizierte Protagonisten der Stress-induzierten Mechanotransduktion schematisch dargestellt.

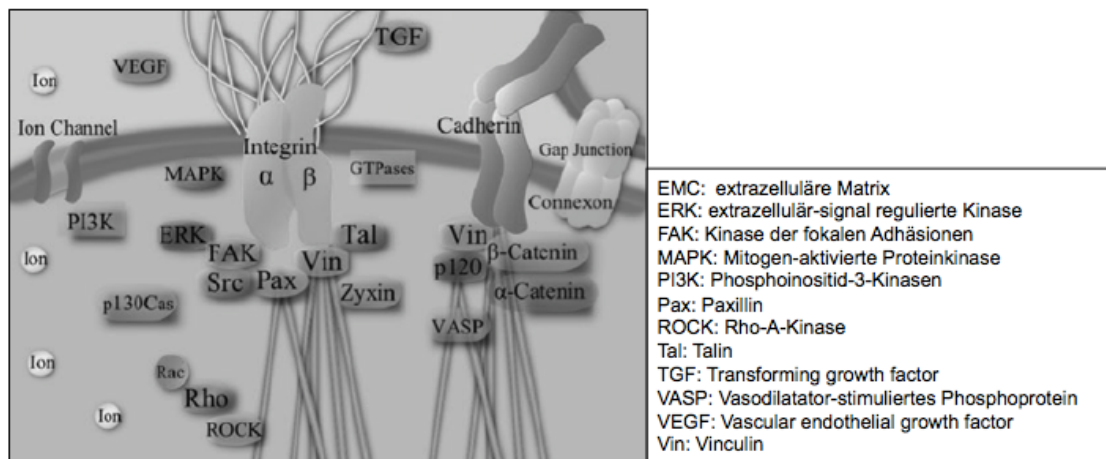


Abbildung 7: Protagonisten der Mechanotransduktion, mod. aus Riehl et al., 2012

Neben extern applizierten Stress (outside-in) ist auch die Steifigkeit des besiedelten Substrates ein bedeutender mechanischer Stimulus (inside-out) (Engler et al., 2004), (Engler et al., 2006), (Quinlan et al., 2011). Darüber hinaus üben Zellen auch untereinander mechanischen Stress aus (Wang and Thampatty, 2008). Zellinterne Kräfte werden über querverlinkte Aktin- und Myosinfilamente generiert. Adhärenente Zellen können diese an ihr Substrat weitergeben. Diese Kräfte nennt man „cell traction forces“ (CTF) (Discher et al., 2005).

In der biomechanischen Stimulation sind verschiedene Stress-Parameter zu unterscheiden: Der Modus (uniaxial vs. biaxial vs. equiaxial), der Umfang (z.B. in %-Substratelongation), die Frequenz (z.B. in Hz), der Kurvenverlauf

(sinusoidal vs. ramp vs. static) oder auch die Pausen zwischen einzelnen Stress-Phasen. Zudem ist der Zeitpunkt der Auswertung im Verhältnis zum applizierten Stress wichtig, denn neben den unmittelbaren Effekten, die sich z.B. in einer veränderten Morphologie zeigen, werden viele Effekte des Stress erst im längerfristigen Verlauf detektierbar.

Im Versuch wird uniaxialer mechanischer Stress genutzt. Uniaxialer Stress bedeutet, dass eine Seite des zu streckenden Substrates befestigt ist und an der anderen Seite gezogen wird. Hierdurch entsteht in eine Richtung Dehnung, in der senkrecht hierzu stehenden Richtung Kompression (*Abbildung 8*). Der Kompressionseffekt ist abhängig vom Substrat bzw. seiner Poisson-Zahl (Zhang et al., 2008).

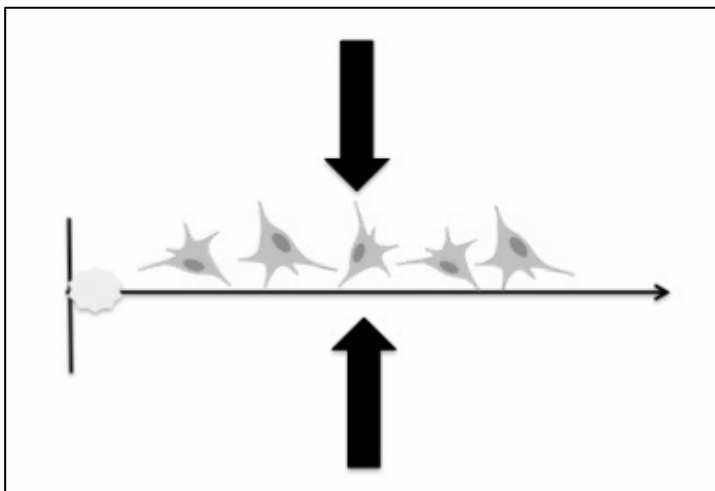


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Wirkung von uniaxialem Stress: In eine Richtung entsteht Dehnung, in der senkrecht hierzu stehenden Richtung Kompression

Die Zellen werden durch diese Art der mechanischen Stimulation zunächst spindelförmiger oder anisotrop (Lee et al., 2007), (Zhang et al., 2008). Dann richtet sich zunächst das Zytoskelett, dann die gesamte Zelle senkrecht zur Stretch-Richtung aus (Park et al., 2004), (Kurpinski et al., 2006b). Das heißt, die Zellen drehen sich bei der Applikation von uniaxialem Stress aus der Stressrichtung heraus (*Abbildung 9*) um die Kräfte auf den Zellkörper zu minimieren. Diese Veränderungen lassen sich bereits innerhalb der ersten 2 Stunden detektieren (Zhang et al., 2008), (Greiner et al., 2013). Mit höherer Amplitude

des Stretch (hier: 1-3 Hz) breiten sich die Zellen weniger aus, sind aber spindelförmiger (Greiner et al., 2013).

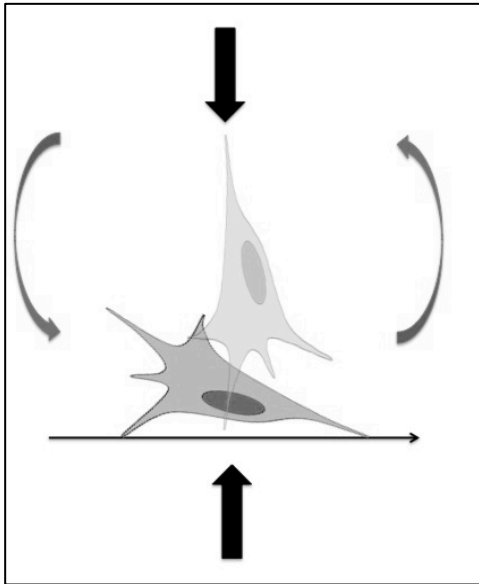


Abbildung 9: Neuausrichtung von Zellen durch mechanischen Stress, mod. nach Wang and Thampatty, 2008

Für verschiedene Zellformen z.B. Fibroblasten, ließ sich zeigen, dass sie, wenn sie in unterschiedlichen vorgegeben Zellinselformen z.B. einem Kreis oder Quadrat kultiviert werden, insbesondere an den Randbereichen der Zellinseln, auf mechanischen Stress reagieren. Steigert man allerdings den Stress, lässt sich nachweisen, dass dieser „Randeffekt“ nachlässt und schließlich die ganze Zellinsel auf den applizierten Stress reagiert. Hieraus entwickelte sich das Konzept des „window stress threshold“, welches beschreibt, dass Zellen nur in einem bestimmten Stress-Fenster definiert reagieren (Li et al., 2009). Dieses Fenster ist zum Einen von den unterschiedlichen Stretch-Parametern, aber auch von Umgebungsfaktoren (z.B. Matrix- und Wachstumsfaktoren) und zelleigenen Faktoren (Zelltyp, -zyklus und -differenzierung) abhängig (Riehl et al., 2012). Problematisch ist in fast allen Stretch-Modellen, dass sich nicht exakt bestimmen lässt, wie viel Stress bei der einzelnen Zelle ankommt.

1.6. Einfluss von biomechanischer Stimulation auf MSC

MSC sind sehr sensitiv gegenüber biomechanischer Stimulation (Friedl et al., 2007), (Maul et al., 2011). Durch unterschiedliche Formen von biomechanischer Stimulation lässt sich nicht nur glattmuskuläre (Hamilton et al., 2004), (Kurpinski et al., 2009) und quergestreifte (Haghighipour et al., 2012) Myogenese, sondern auch osteogene Differenzierung (Friedl et al., 2007) in MSC induzieren.

So konnte z.B. Jang et al. zeigen, dass durch alleinige Variation der Substratelongation die Form der Differenzierung verändert werden kann (Jang et al., 2011).

Grundsätzlich wurden diese Effekte an Maus- und Ratten- (Nieponice et al., 2007), (Jang et al., 2011), (Liu et al., 2013) Rinder - oder humanen (Park et al., 2004), (Ghazanfari et al., 2009), (Kurpinski et al., 2006a/b), (Kurpinski et al., 2009), (Khani et al., 2015) MSC unterschiedlichen Ursprungs untersucht.

Im Folgenden soll nur noch der Einfluss von uniaxialem Stress auf humane Knochenmarksstromazellen (hbmMSC) betrachtet werden.

Unterschiedliche Arbeitsgruppen haben den Einfluss von uniaxialem Stress auf hbmMSC untersucht. Bei Sichtung der verfügbaren Literatur wird allerdings schnell klar, dass jede Arbeitsgruppe, die zu diesem Thema publiziert, einen anderen Bioreaktor, unterschiedliche Stressmodi (Variation in Amplitude, Substratelongation, Stimulationszeit) oder unterschiedliche Zellquellen (Zelllinie oder isolierte hbmMSC verschiedener Patienten/Probanden) verwendet. Somit sind die Ergebnisse nicht ohne Weiteres untereinander vergleichbar.

Zur Stimulation von MSC finden sich zumeist Stretch-Protokolle mit Substratelongationen zwischen 0,1 bis 25% und Stimulationsfrequenzen von 0,5-3 Hz (Park et al., 2004), (Kurpinski et al., 2006a/b), (Kurpinski et al., 2009), (Ghazanfari et al., 2009), das der physiologischen Stimulation *in vivo*, z.B. in Blutgefäßen (Huang and Li, 2008) entspricht. Eine Literaturübersicht findet sich in *Tabelle 2*.

| Zellquelle | Substrat | Frequenz | Elongation | Stimulationsdauer | Resultate | Besonderheiten | Autor |
|----------------------------|--|----------|------------|-------------------|--|--|-------------------------------------|
| Zelllinie (Cambrex) | Kollagen-I (5 µg/cm ²) beschichtete Silikon-Membran | 1 Hz | 10% | 1-3 d | Zellausrichtung senkrecht zur Stress-Richtung transienter Anstieg von ACTA und Transgelin (2-fold) nach d1 transienter Anstieg der Kollagen I-Expression (2-fold) nach d1 | 24 h Adhärenz vor Induktion des mechanischen Stress 80-90% Konfluenz Passagen 5-9 | Park et al, 2004 |
| Zelllinie (Cambrex) | PDMS-Membranen mit parallelen „Microgrooves“, beschichtet mit Kollagen I (0,8 mg/ml in 0,1 % Essigsäure) | 1 Hz | 5% | 2-4 d | Anstieg an Calponin 1 (2.11 fold) Abfall typischer Knorpelmarker gesteigerte Proliferation bei Ausrichtung der Zellen perpendicular zur Streichrichtung keine Steigerung der Proliferation bei paralleler Zellausrichtung | 24 h Adhärenz vor Induktion des mechanischen Stress Zellausrichtung durch Microgrooves vorgegeben | Kurpinski et al., 2006a/ 2009 |
| Beckenkamm- KIM-Aspirat | Kollagen-I (5 µg/cm ²) beschichtete Silikon-Membran | 1-3 Hz | 0,1-25 % | 1,2 und 4 h | Zell- und F-Actin-Ausrichtung senkrecht zur Stress-Richtung Anstieg der SMA-Expression gesteigerte Proliferation | | Ghazanfari et al., 2009 |

Tabelle 2: Literaturübersicht zur uniaxialen Stimulation von hbmMSC

1.6.1. Einfluss von uniaxialem Stress auf die Proliferation von hbmMSC

Uniaxialer mechanischer Stress kann die Proliferation von hbmMSC stimulieren (Kurpinski et al., 2006b), (Ghazanfari et al., 2009). Dieser Effekt ist allerdings nur so lange vorhanden, bis sich die Zellen aus der Stressrichtung hinausgedreht haben. Da dies in aller Regel sehr schnell geschieht (Greiner et al., 2013), ist dieser Effekt ohne eine Ausrichtung der Zellen, nur passager. Kurpinski et al. führte hierzu Versuche mit s.g. Microgrooves durch, die die Zellen künstlich in bzw. senkrecht zur Stretchrichtung halten. Hier zeigte sich, dass hbmMSC bei uniaxialer Stimulation nicht zur Proliferation angeregt werden, wenn sie parallel zur Stretchrichtung ausgerichtet sind.

1.6.2. Einfluss von uniaxialem Stress auf die Differenzierung von hbmMSC

Uniaxialer Stress führt zu einer passageren Hochregulation der frühen glattmuskulären Differenzierungsmarker ACTA II (Park et al., 2004), (Ghazanfari et al., 2009) und Transgelin (Park et al., 2004), sowie des intermediären Markers CNN I (Kurpinski et al., 2006b), (Kurpinski et al., 2009), (O’Cearbhaill et al., 2010).

Hierbei ist der Anstieg von ACTA II und CNN1 auf 2D-Membranen größer als in 3D-Systemen (O’Cearbhaill et al., 2010). Die Expression von murenen Markeren, wie Myh 11 konnte bei alleiniger uniaxialer Stimulation nicht nachgewiesen werden (Ghazanfari et al., 2009), (O’Cearbhaill et al., 2010).

1.7. Einfluss der Substratsteifigkeit auf Proliferation und Differenzierung von MSC

Auch MSC können bereits kleine Unterschiede in der Steifigkeit ihres Substrats wahrnehmen (Engler et al., 2004), (Discher et al., 2005) und passen sich ihrem Untergrund an (Quinlan et al., 2011). So zeigen MSC auf Substraten unterschiedlicher Steifigkeiten nicht nur eine unterscheidliche Zellform (Engler

et al., 2006), sondern bilden auch Unterschiede in ihren Adäsionskomplexen aus (Discher et al., 2005). Umso fester der Untergrund ist, umso mehr breiten sich die Zellen aus (*Abbildung 10*) (Quinlan et al., 2011), umso mehr Stressfasern bilden sich aus (Park et al., 2011), umso fester sind die Adhäsionen (Engler et al., 2004) und umso höher ist die Proliferationsrate (McDaniel et al., 2007), (Park et al., 2011).

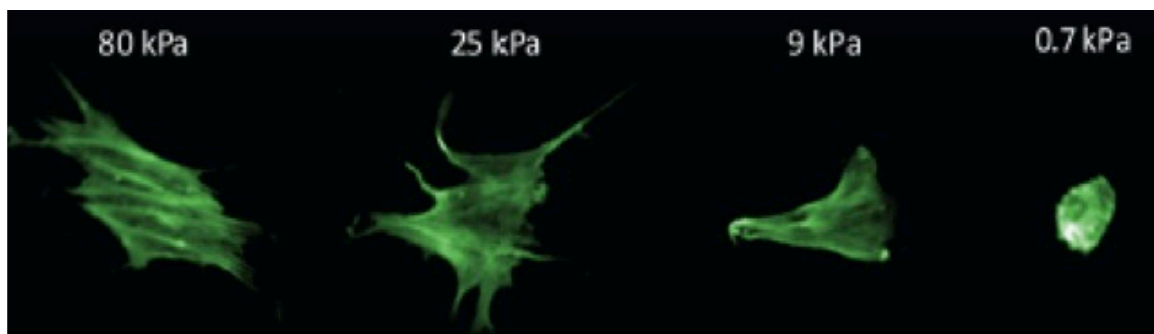


Abbildung 10: MSC auf Kollagen-I-Gelen unterschiedlicher Steifigkeit nach 24h Adhärenz, aus Quinlan et al., 2011

Außerdem ließ sich zeigen, dass die Substratsteifigkeit nicht nur einen entscheidenden Einfluss auf die Zelllinie, sondern im Falle vom Myozyten, auch auf die Formierung von Myofibrillen hat (Rowlands et al., 2008).

Die Steifigkeit eines Substrates kann u.a. mit dem Young's Modulus beschrieben werden. Engler zeigte für Muskulatur einen Young's Modulus von 8-17 kPa (Engler et al., 2006). Nach Discher liegt die Steifigkeit von einem entspannten Muskelbündel bei 10 kPa (Discher et al., 2005).

1.7.1. Definition des Young's Modulus

Der Young's Modulus (oder auch E-Modul) beschreibt den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung bei der Verformung eines festen Körpers. Er ist ein Materialkennwert. Je größer der Wert ist, umso mehr Widerstand setzt ein Material seiner Verformung entgegen. Er ist in der linearen Phase (Hookesche-Grade) der Spannung-Dehnungskurve bei quasistatischer, einachsiger Belastung definiert. Man kann ihn berechnen, indem man die Dehnungsspannung durch die Streckspannung teilt.

Es gilt:

$$E = \sigma/\varepsilon.$$

σ : Kraft/Fläche

ε : Dehnung

Der Young's Modulus wird in Pascal (Pa) = Newton (N)/m² angegeben (Bergmann, 2013). Er ist abhängig von Temperatur, Feuchte oder auch Verformungsgeschwindigkeit.

1.8. Einfluss der Zellform auf Proliferation und Differenzierung von MSC

Die Zellform ist ein potenter Regulator von Zellwachstum und -funktion. Zellen adaptieren und optimieren ihre Form, um verschiedene Funktionen ausführen zu können. Eine elongierte Zellform promotet die Myogenese (Yang et al., 1999), (McBeath et al., 2004), (Gao et al., 2010), ein eher runder Zelltyp die Chondrogenese (Thorpe et al., 2012). Auch hat eine spindelförmige Zellform, im Gegensatz zur „flat“ Zelle die größere Multipotenz, also das bessere Differenzierungspotential (Phinney et al., 1999).

1.9. Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, die Effekte biomechanischer Stimulation durch die Applikation von cyclischem, uniaxialem Stress auf die Morphologie und die glattmuskuläre Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen des Knochenmarks zu untersuchen. Hierbei sollen unterschiedliche Streckungsdauer und unterschiedliche Streckamplituden miteinander verglichen werden um ein optimiertes Streckprotokoll zu erarbeiten. Neben diesem „outside-in“ Stress, soll auch die Substatsteifigkeit („inside-out“) als wichtiger Einflussfaktor für Zellform und -Differenzierung beleuchtet werden. Endpunkte der Betrachtung sind die Expression glattmuskulärer Marker sowie die MSC-Morphologie. Dabei soll geklärt werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen MSC-Morphologie und Genexpression darstellen lässt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

| | |
|---|------------------------------------|
| (D)PBS (1x) (Dulbecco's) Phosphate-Buffered Saline) [+MgCl ₂] [+CaCl ₂] | Gibco Life Technologies, USA |
| Advantage RT-for-PCR Kit | Clontech, USA |
| Aqua dest | B Braun, Deutschland |
| Brilliantkresylblau-Lösung | Merck, Deutschland |
| BSA (bovine serum albumin), lyophilized powder | Sigma-Aldrich, USA |
| Cell Viability Imaging Kit, 5 x 96 Nr. 06432379001 (incl. Hoechst 33342, Propidiumiodid, Calcein-AM) | Roche, Schweiz |
| DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole- dihydrochloride) | Sigma-Aldrich, USA |
| Desmin-Primärantikörper #4024 | Cell Signaling Technology, USA |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) high glucose [+L-Glutamin] [+Sodium Pyruvat] | Gibco Life Technologies, USA |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) low glucose, [-Glutamin] | Sigma-Aldrich, Deutschland |
| DMSO (Dimethylsulfoxid), BC | AppliChem, Deutschland |
| Essigsäure (Eisessig) 100% | Merck, Deutschland |
| Ethanol (EthylAlkohol), 99% | SAV Liquid Production, Deutschland |
| FCS (fetal calf serum) | Biochrom, Deutschland |
| Flourescent Mounting Medium | Dako, Deutschland |
| Glutaraldehyd, Grade I, 25% in Aqua dest | Sigma-Aldrich, USA |
| Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L)-Cy3, MinX Hu (111-165-045), Sekundärantikörper | Dianova, Deutschland |
| Heparin-Natrium-Salz, ≥180 I.U./mg | Carl Roth, Deutschland |
| HEPES sodium salt solution (2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1- piperazinyl) - | Lonza, Schweiz |

| | |
|---|--|
| ethansulfonsäure), 1M | |
| Humanplasma | TCS Biosciences, GB |
| L-Glutamine, 2 mM | Lonza, Schweiz |
| LightCycler 480 Probes Master (04707494001) | Roche, Schweiz |
| LightCycler 480 SybrGreen Master (04707516001) | Roche, Schweiz |
| Methanol, AnalaR Normapur | VWR Prolab Chemicals, GB |
| Osmium tetroxide (OSO ₄) 2%, in Aqua dest | Pasel und Lorei, Deutschland |
| Partricin (Fungizid), 50 µg/ml | Biochrom, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin, 5000 U/ml | Gibco Life Technologies, USA |
| Proteinase K (recombinant, PCR grade) | Fermentas, Thermo (Fisher) Scientific, USA |
| RNA-Extraction-RNeasy Mini Kit (50) (incl. RNeasy Mini Spin Columns, gDNA Eliminator Spin Columns, Collection Tubes, RNase-Free Water, Puffer) | Quiagen, USA |
| β-Mercaptoethanol | AppliChem, Deutschland |
| Thrombozytenlysat (gepoolt, human) | 10 ⁸ Plättchen/ml Medium, Blutbank Tübingen, Deutschland |
| Transgelin-Primärantikörper, sc-50466, GPR91 Antibody (H-80) | Santa Cruz Biotechnology, Deutschland |
| Trypan Blue Solution, 0,4% | Sigma-Aldrich, USA |
| Trypsin-EDTA (1x) | Sigma-Aldrich, USA |
| Tween 20 | AppliChem, Deutschland |
| α SMA- (ACTA II) Primärantikörper, ab 5694 | Abcam, USA |

Tabelle 3: Chemikalien

2.2. Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| 6- und 96-Well-Platte, 550 x 300 x 245 mm | Cellstar, Greiner Bio-One, Österreich |
| AIOAI, All-in-one Cantilever, D | Budget Sensors, Bulgarien |
| Blue Cap, 50 ml | Cellstar Tubes, Greiner Bio-One, Österreich |
| Cryotubes Nunc Cryoflex, max. 1,8 ml | Thermo Scientific, Deutschland |
| Deckgläser, 24 x 60 mm, 0,13-0,16 | R. Langenbrink, Deutschland |
| Einwegskalpell, No. 21 | Feather, Japan |
| Filter Tipps (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) | Premium Tips, Biozym Scientific, Deutschland |
| Light Cycler 480 Multiwell Plate (04729692001) | Roche, Schweiz |
| Light Cycler 480 Probes Master (04707494001) | Roche, Schweiz |
| LightCycler 480 Multiwell 96 Plates (04729692001) | Roche, Schweiz |
| Microspheres Polybead Polystyrene 25.0 | Polysciences, Inc., USA |
| Objektträger, 76 x 26 mm | R. Langenbrink, Deutschland |
| Petrischalen, 145/200 mm | Greiner Bio-One, Österreich |
| Red Cap, 15 ml, 120 x 17 mm | Sarstedt, Deutschland |
| Serologische Pipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) | BD Biosciences, Deutschland |
| Zellkulturflaschen, 75 cm ² | BD Biosciences, Deutschland |

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

2.3. Geräte

| | |
|--|--|
| Absaugpumpe | Laboport, Neuberger, Deutschland |
| Atomic Force Mikroskop (AFM) Cell Hesion 200 | JPK Instruments AG, Deutschland |
| Brutschrank 9040-0013 (37°, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO ₂) | Binder, Deutschland |
| Canon EOS 70D, Spiegelreflexkamera | Canon, Japan |
| ElectroForce® 5210 BioDynamic® | Bose Corporation, ElectroForce Systems Group, USA |
| Light Cycler 480 | Roche, Schweiz |

| | |
|--|-----------------------------------|
| Schieblehre, 150 mm | Projahn, Deutschland |
| Mikroskop Leica 090-135.002 | Leica, Deutschland |
| Mikroskop Zeiss Observer.Z1 | Zeiss, Deutschland |
| Neubauer Zählkammer (0,0025 mm ²) | Assistent, Deutschland |
| Anatomische Pinzette | Aesculap, Deutschland |
| Pipettierhilfe Pipet Boy | Hirschmann, Deutschland |
| Sterilbank Hara Safe | Heraeus, Deutschland |
| Uno II Thermocycler | Biometra, Deutschland |
| Vortexer (Reax top) | Heidolph Instruments, Deutschland |
| Wasserbad W12 | Preiss-Daimler, Deutschland |
| Zentrifuge 5804 R | Eppendorf, Deutschland |
| Zwei-Koordinaten-Messgerät 250 D | Zeiss, Deutschland |

Tabelle 5: Geräte

2.4. Verwendete Software

| | |
|--------------------------------|---|
| AxioVision 4.8.2 | Bildanalyse Software für Mikroskopie, Carl Zeiss GMBH |
| ImageJ | Bildbearbeitungsprogramm NIH, Open Source Programm, plugin: shape_descriptor |
| WinTest | Mess- und Kontrollsoftware, Bose Electroforce System Group, USA |
| Excel 2010 | Tabellenkalkulation, Microsoft Windows, USA |
| PowerPoint 2010 | Grafikmodifikation, Microsoft Windows, USA |
| JPK Software (Cell Hesion 200) | JPK Instruments AG , Deutschland |
| SigmaPlot-11.0.0.77 | Systat Software, USA |

Tabelle 6: Verwendete Software

2.5. Das Bose ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument

Das ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument ist ein kommerziell verfügbarer Stretch-Apparat der Firma BOSE® welches dazu dient, Auswirkungen von uniaxialen Stretch auf verschiedene Substrate zu untersuchen. Hierbei ist es möglich, mehrere Substrate unter gleichen oder unterschiedlichen Bedingungen parallel zu stimulieren (*Abbildung 11*). Dies geschieht in speziellen Kammern, in denen jeweils das zu testende Substrat, wie hier eine zell-besiedelte Membran, über einen Klemm-Mechanismus eingespannt wird. Jedes Kammer-System ist in sich geschlossen. Bei einer längeren Versuchsdauer kann der Stretch-Apparat innerhalb eines Inkubators aufgestellt werden, so dass Parameter wie CO₂/pH oder Temperatur miteingestellt werden können. Des Weiteren ist es möglich, über ein Pumpensystem z.B. Medium durch die einzelnen Kammern strömen zu lassen, um damit auch Einflüsse wie Scherspannung zu untersuchen. Im System lassen sich in Echtzeit Distanz, Ladung oder Druck-Veränderungen überwachen. Über einen PC bzw. die Software WinTest wird das System angesteuert (*Abbildung 12*).

Die maximal applizierbare Kraft liegt bei 200 N. Das Substrat kann bis zu 6,35 mm ausgelenkt werden. Die Frequenz liegt bei 15 Hz. Eine detaillierte Gerätebeschreibung findet sich auch auf der Herstellerseite (<http://www.tainstruments.com/5200-products>), Stand: 03.05.2016. Ein Vergleich zwischen verschiedenen aktuell eingesetzten Stretch-Apparaten u.a. das oben beschriebene Gerät findet sich auch bei (Riehl et al., 2012).

In allen Versuchen wird ein sinusoidaler Stretch-Kurven-Verlauf mit der Frequenz von 1 Hz appliziert. Dabei wird die Substratelongation zwischen 2,5 % und 5 % variiert sowie zwischen Proben unterschieden, die 1/24 oder 2/48 Stunden manipuliert werden.



Abbildung 11: Das ElectroForce® 5210 BioDynamic® Test-Instrument von BOSE® mit 4 eingespannten Kammern (http://worldwide.bose.com/electroforce/en/web/5200_products/page.html, Stand: 16.10.2015)

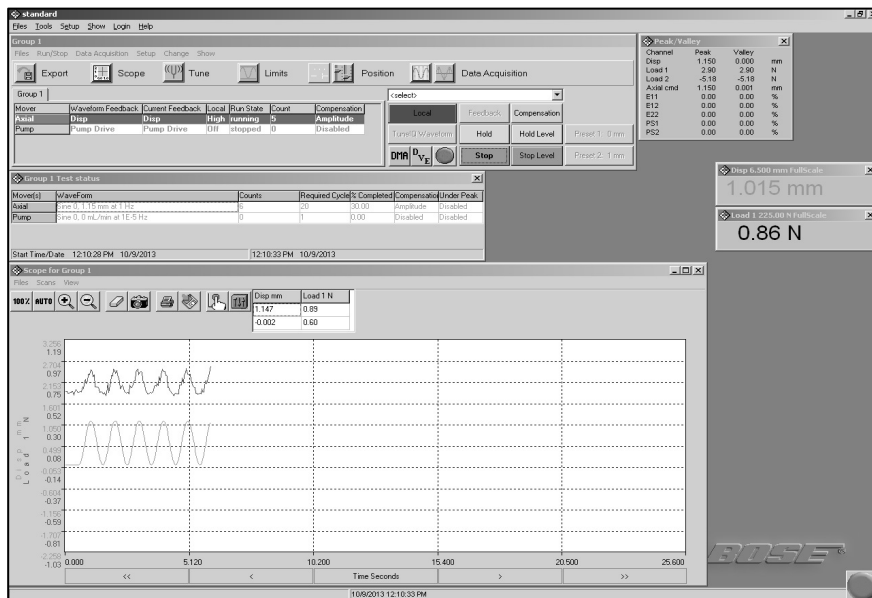


Abbildung 12: Bildschirmansicht während der laufenden Stimulation in WinTest. Die untere Kurve zeigt die Computer-generierte Stretch-Kurve, die obere Kurve zeigt das gemessene Feedback des Kollagen-I-Hydrogels

2.6. kompaktiertes Kollagen-I-Hydrogel

Die in den Stretch-Versuchen genutzte Membran besteht zu 100% aus Kollagen I, das aus enthäuteten Rattenschwänzen gewonnen wird. Nach einem Waschschrift mit Essigsäure, wird das Kollagen aufgereinigt und lyophilisiert. Durch ein geschütztes Herstellungsverfahren, welches die Firma Amedrix, Esslingen entwickelt hat, ist es möglich, Kollagen in unterschiedlichsten Steifigkeiten und Endkonzentrationen zu produzieren.

Die Ausgangskonzentration des Materials beträgt 8 mg/ml Kollagen I. Durch die Kompression in der Polycarbonatkammer werden so Kollagenstreifen mit einer Endkonzentration von z.B. 80, 160 und 240 mg/ml hergestellt. Die Kompression erfolgt über die Applikation verschiedener Gewichte, dabei kann Wasser über den porösen PTFE-Boden austreten. Um eine 80 mg/ml-Membran zu erstellen wurde so z.B. zunächst mit 2 kg über 2 Stunden, dann 4 kg über Nacht, nochmals 9,5 kg für 8 Stunden und abschließend mit 27 kg über Nacht, komprimiert.

Die Membranen werden in PBS in 3,5 x 20 cm Streifen geliefert und müssen vor den Versuchen unter sterilen Kautelen zugeschnitten werden. In den Vorversuchen wurden alle drei Membranen mit den o.g. Konzentrationen bezüglich ihres Verhaltens in der Zellkultur, aber auch ihre Handhabung in der Stretch-Kammer getestet.

Die Membran ist lichtdurchlässig, aber mit steigender Kollagenkonzentration zunehmend trübe. Durch das Fabrikationsverfahren finden sich auf der Unterseite der Membran Stempelimpressionen. Im Querschnitt ist die Membran spröde. *Abbildung 13* zeigt die makroskopische Ansicht des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels mit 80 mg/ml. Ohne Bedeckung mit Puffer oder Medium trocknet die Membran rasch aus. Hierbei verzieht sie sich die stark in ihrer Form, verliert insgesamt an Fläche, Höhe und Flexibilität. Um die Membran besser zu charakterisieren werden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. So wird die Membran mit dem Zwei-Koordinaten-Messgerät ZKM250D, im Elektronenrastermikroskop, im Atomic-Force-Mikroskop (AFM) und im Bose ElectroForce 5210 untersucht.

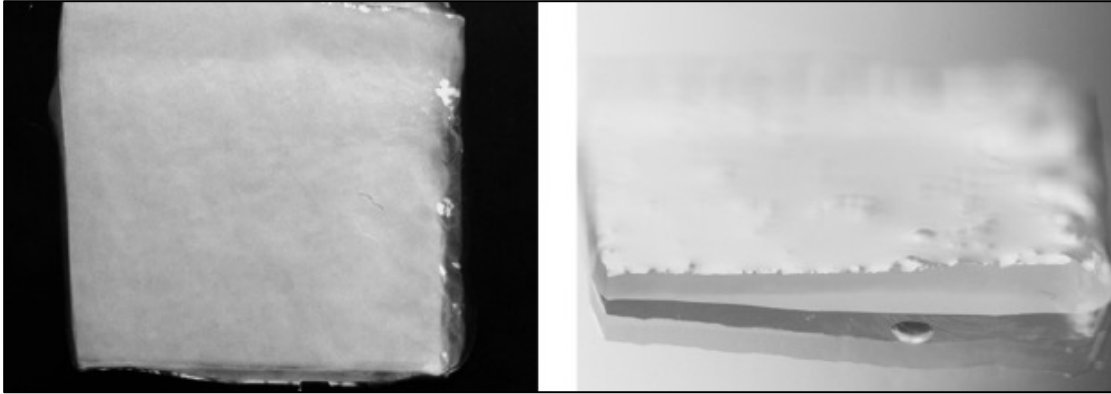


Abbildung 13: Frontal- und Seitenaufnahme eines 1 x 1 cm großen Quadrats des kompaktierten Hydrogels mit 80 mg/ml, aufgenommen mit einer Canon EOS 70D

2.6.1. Charakterisierung des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels

2.6.1.1. Messung mit dem Zwei-Koordinaten-Mess-Gerät (ZKM 250D) zur Bestimmung der Geldicke

Die Dicke des Gels wird mit dem optischen zweidimensionalen Messmikroskop, dem Zeiss ZKM250D, bestimmt.

2.6.1.2. Messungen mit dem Bose ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument zur Bestimmung der Dehnungssteifigkeit

Da bei der Stimulation mit dem Bose ElectroForce 5210 Ausrichtung und hierfür aufgewendete Kraft ausgelesen werden kann, ist es möglich, das E-Modul in den linearen Streckphasen des sinusoidalen Stretchverlaufes zu ermitteln. Zusätzlich benötigt man zur Berechnung des Young's Modulus den Querschnitt der Membran und die Fläche. Um den Young's Modulus zu berechnen werden jeweils nacheinander drei unbesiedelte Membranen (in PBS) in die Stimulations-Kammer eingespannt und mit 5 %-Substratelongation gestretched. Hierbei werden sowohl die ersten 100, als auch die letzten 100 Zyklen einer einstündigen Stimulation registriert. Hierbei werden nur die linearen Anteile der Streckung betrachtet und händisch hieraus das E-Modul berechnet.

Hier gilt:

Spannung = Load/Fläche

Epsilon = Displacement/Länge

Aus dem Verhältnis von Delta Spannung und Delta Epsilon ergibt sich das E-Modul.

2.6.1.3. Messungen mit dem Atomic Force Mikroskop (AFM) zur Bestimmung des Young's Modulus

Mit dem atomaren Rasterkraftmikroskop lassen sich Kräfte im Nanometerbereich messen. Das Herzstück des AFM, der Cantilever, wird über die Oberfläche der Probe geführt. Die hierbei auftretenden physikalischen Kräfte (z.B. Kapillar-, Coulomb- oder Van-der-Waals-Kräfte) führen zu einer Abknickung des Cantilevers und werden über einen Laserstrahl auf eine Photodiode reflektiert (Licht-Zeiger-Prinzip).

Für die Elastizitätsmessungen wird ein spektroskopisches AFM verwendet (JPK, Cell Hesion 200). Eine vereinfachte Darstellung des Funktionsprinzips des AFM findet sich in *Abbildung 14*. Statt einer Spitze wird ein Kugelcantilever zur Steifigkeitsmessung verwendet. Bei der Erstellung von sogenannten Kraft-Abstands-Kurven wird der Cantilever mit einer definierten Kraft auf die zu untersuchende Oberfläche abgesenkt und wieder angehoben (*Abbildung 15 und 16*). Über die Steigung der Kurve wird mittels Hertz-Modell (hier: JPK-Software) der Youngs Modulus berechnet (Cappella and Dietler, 1999). Bei den Messungen wird ein Tipless-Cantilever (All-in-one: AIOAI, Cantilever D) mit einer Federkonstanten von 40 N/m, welcher mit einer Kugel (Microspheres Polybead Polystyrene 25.0) versehen wird, verwendet. Die Messung erfolgt an jeweils drei Membranen und zehn unterschiedlichen Stellen.

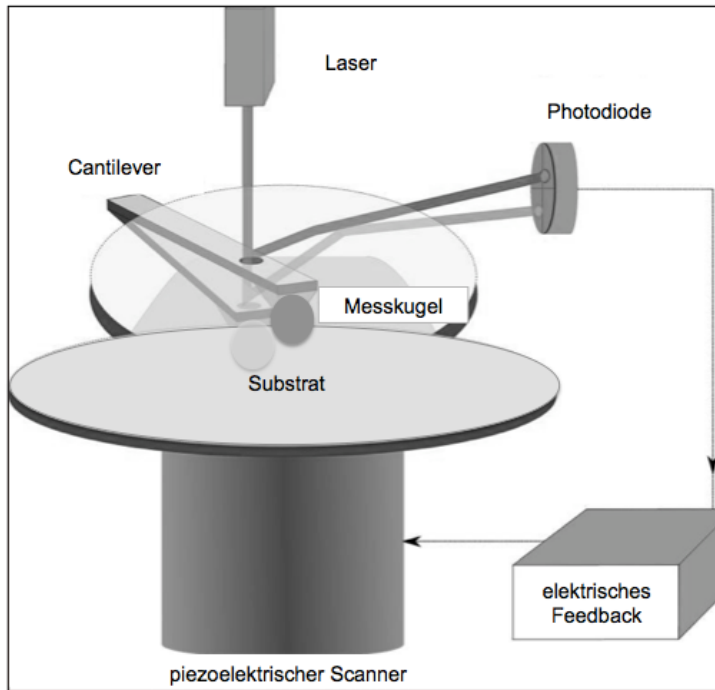


Abbildung 14: Funktionsprinzip des Atomic Force Mikroskop (AFM), mod. nach Baclayon et al., 2010

Die AFM-Messungen werden in Kooperation mit Tanja Seeger, AG Klein, Zentrum für Medizinische Forschung, Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, Universität Tübingen, durchgeführt.

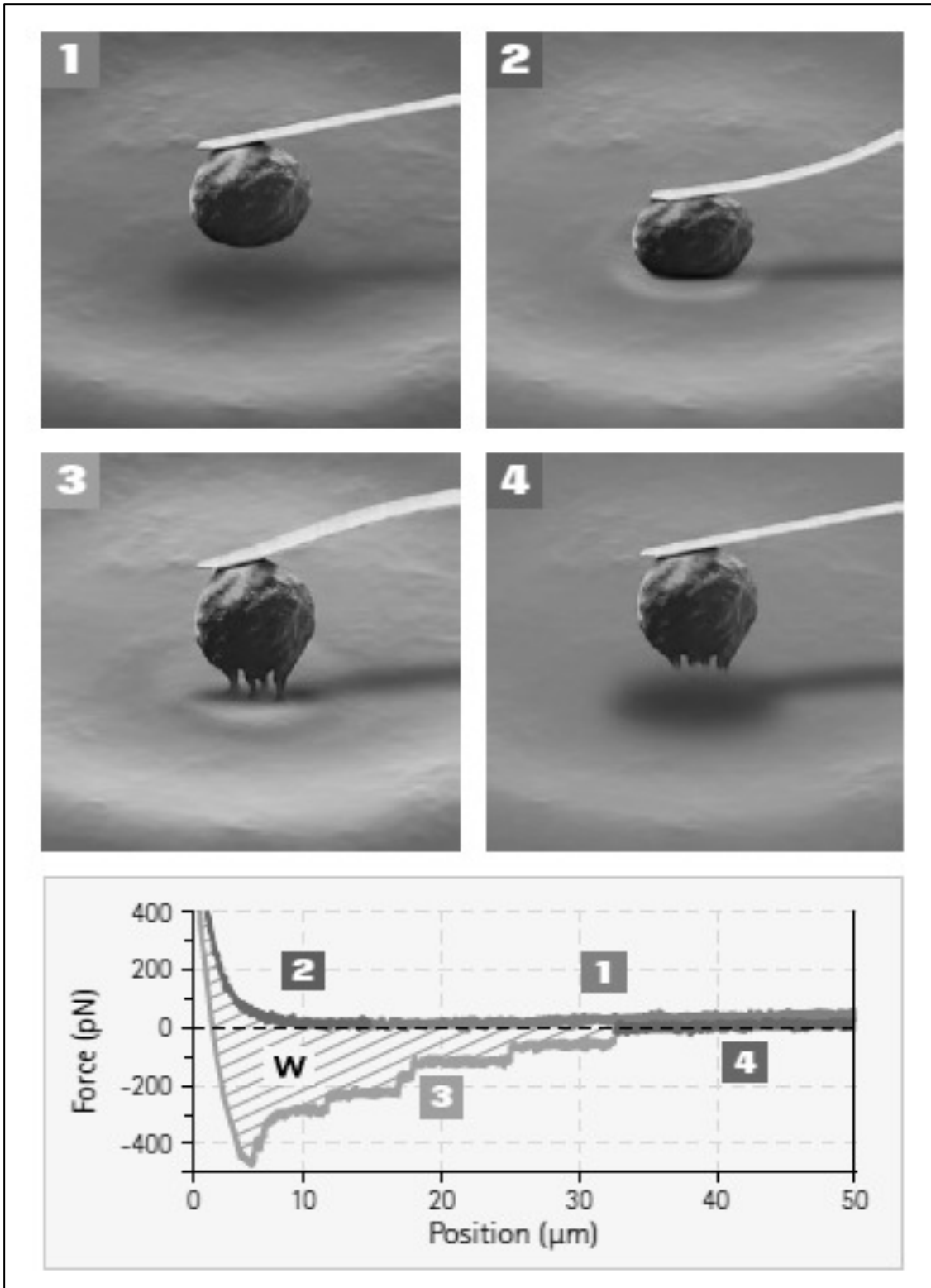


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer AFM-Messung und die Aufzeichnung einer Kraft-Abstands-Kurve: 1) Annäherung: Cantilever und Messkugel haben noch keinen Kontakt zum Substrat, 2) Kontakt: durch Applikation einer definierten Kraft resultiert die Auslenkung des Cantilevers, 3) Ablösung: ebenfalls mit definierter Kraft, 4) Entfernung: Cantilever und Messkugel haben keinen Kontakt mehr zum Substrat; aus: Product Brochure Cell Hesion 200 (<http://usa.jpk.com/cellhesion-r-200-overview.395.us.html>, Stand: 16.10.2015)

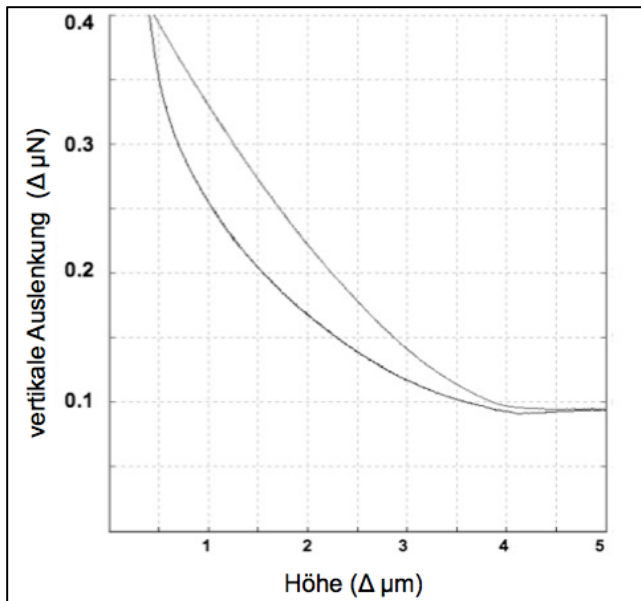


Abbildung 16: Beispiel einer Kraft-Abstands-Kurve des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels, hier 80 mg/ml: Die obere Kurve beschreibt die Annäherung, die untere das Ablösen des Cantilevers von der Membran.

Anders als bei der Untersuchung mit dem ElectroForce 5210 wird mit der Atomic Force Mikroskopie nicht die ganze Membran, sondern nur Ausschnitte der Oberfläche der Membran untersucht. Bei der Messung mit dem ElectroForce 5210 hingegen, handelt es sich um eine dynamische Untersuchung in der das gesamte Substrat gestreckt und somit auch das gesamte Substrat untersucht wird.

2.6.1.4. Rasterelektronenmikroskopie (REM) zur Visualisierung der Oberflächentopographie

Zur Visualisierung der Oberflächentopographie wird, nach Fixierung mittels 3 % Glutaraldehyd (in PBS, über Nacht, RT) und 2 % Osmium tetroxide (für 60 min, RT), eine Dehydrierung mittels Ethanolreihe durchgeführt. Nach dem Trocknen wird die Membran per Post zu Prof. Bodo Kurz, Anatomisches Institut, Universität Kiel, versendet. Dort wird sie mit Gold besputtert und mit dem REM Philips XL 20 SE aufgenommen.

2.7. Gewinnung und Aufbereitung der hbmMSC

Die verwendeten Knochenmarkstammzellen stammen von Patienten und Patientinnen, die sich der Implantation einer Hüft-Totalendoprothese (Hüft-TEP) an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik (BG) in Tübingen unterziehen. Die Knochenmarkspende erfolgt nach gesonderter Aufklärung der Patienten und mit entsprechendem Ethikvotum (623/2013BO2). Die Proben für die hier dargestellten Experimente wurden zwischen 06/2012 und 04/2014 gewonnen. In der gezeigten Versuchsreihe werden Proben von 8 Patienten, der Passagen II-V verwendet (gesamt: n=13).

Pro Patient/in wird 20 ml Knochenmark gewonnen. Dies wird in 5000 IE Heparin-Natrium (gelöst in 5 ml Phosphat buffered saline (PBS)) in einem 50 ml Blue Cap aufgenommen. Nach einem Waschschrift mit PBS wird das Zellpellet bei 150 g für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die MSC werden nach einem etablierten Dichtegradienten/Ficoll-Protokoll isoliert (Pittenger et al., 1999), hier: Dichte 1,077g/ml, 400 g, 30 min, RT (vgl. (Felka et al., 2009)). Die Zellen werden bei 80 % Konfluenz in Passage I dem TP I/Focus III in T75 Zellkulturflaschen zur Verfügung gestellt.

2.8. hbmMSC in der Zellkultur

Die Expansion der hbmMSC findet in GMP+-Medium statt. Der Mediumwechsel erfolgt 2x/Woche (Mo/Do). Die Zellen werden jeweils bei 80 % Konfluenz passagiert.

| GMP+-Medium | |
|--------------------|---------------------------------------|
| 450 ml | DMEM low glucose incl. 25 mM HEPES |
| 1 ml | Heparin, 5000 IE/ml |
| 5 ml | Glutamin 2 mM |
| 5 ml | Penicillin/Streptomycin, 5000 U/ml |
| 25 ml | Humanplasma |
| 25 ml | Thrombozytenlysat |

Tabelle 7: Zusammensetzung des GMP+-Mediums

2.8.1. Passagieren der hbmMSC

Nachdem die Arbeitsreagenzien (1 % Trypsin, 1x PBS, GMP+-Medium) auf 37° im Wasserbad aufgewärmt sind, wird unter der Sterilbank das alte Medium der Kulturflasche abgenommen und verworfen. Zunächst werden die Zellkulturflaschen 2 x mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wird 2 ml Trypsin auf den Zellrasen gegeben und die Zellkulturflasche für 5 Minuten in den Brutschrank gegeben. Das Trypsinisieren der Zellen wird unter dem Lichtmikroskop visuell kontrolliert und ggf. durch leichtes Anschlagen des Flaschenbodens unterstützt. Haben sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst, wird der Trypsinisierungsprozess durch die Hinzugabe von 4 ml GMP+-Medium abgestoppt und der gesamte Inhalt der Zellkulturflasche in ein Blue Cap überführt. Dieses wird mit einem entsprechenden Gegengewicht für 7 min bei 1500 rpm bei 7° zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Zellpellet in 1000 µl GMP+-Medium resuspendiert. Nun muss die Zellzahl bestimmt werden. Hierzu werden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in eine Kavität einer 96-

Well-Platte gegeben. 10 µl der gefärbten Lösung werden in eine Neubauerzählkammer pipettiert und die vier Quadranten ausgezählt. Anschließend wird die Zellzahl in der definierten Mediummenge von 1000 µl berechnet. Nach entsprechender Umrechnung werden 300.000 Zellen/10 ml GMP+-Medium in je eine neue Kulturflasche vorgelegt.

2.9. Bestimmung der optimalen Zellzahl

Ziel ist es im endgültigen Versuch mit einer Zellkonzentration zu arbeiten die a) eine gute Konfluenz zur Beurteilung von Zellzahl und -form in der Immunfluoreszenz bietet und b) die minimale Zellzahl zur weiteren Untersuchung in der Polymerasekettenreaktion (PCR) nicht unterschreitet. Mit mehreren Passagen werden daher verschiedene Zellkonzentrationen (1250, 2500, 5000, 7500, 10000/cm²) über eine Periode von vier Tagen kultiviert und mit einer Coomassie-Färbung ausgewertet.

Coomassie-Färbung: Vor der Versuchsdurchführung werden die Färbelösung sowie die zwei Entfärberlösungen unter dem Abzug vorbereitet. Der gesamte Färbeprozess findet bei Raumtemperatur statt.

Färbelösung: 0,2 % Brilliant Blau R250
 50 % Methanol
 10 % Essigsäure
 39,8 % Aqua dest

Entfärberlösung I: 50 % Ethanol
 10 % Essigsäure
 40 % Aqua dest

Entfärberlösung II: 10 % Ethanol
 5 % Essigsäure
 85 % Aqua dest

Zunächst wird das MSC-Kontrollmedium vorsichtig von der Membran abgesaugt und 2x mit 2 ml PBS gewaschen. Nun werden 2 ml der Färbelösung auf die Membran gegeben, einmal sanft geschwenkt und dann 15 min inkubiert. Nach dem Absaugen der Färbelösung, werden erst für 3 min 2 ml Entfärber I aufgetragen, dann abgesaugt und für 90 min 2 ml Entfärber II auf die Membran gegeben. Beim Entfärben wird die Membran immer wieder sanft von Hand geschwenkt. Nach der zweiten Entfärberstufe wird die Membran abschließend 2x mit 2 ml PBS gewaschen und unter dem Mikroskop im Weißlichtkanal ausgewertet.

2.10. Bildakquise mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)

Ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) ist ein spezielles Lichtmikroskop, das die Transformation von der Probe zum Bild punktwise realisiert. Die Probe wird seriell bestrahlt und die Fluoreszenz punktwise gemessen. Der Aufbau des Bildes geschieht Pixel für Pixel.

Bei dem verwendeten LSM (*Abbildung 17*) ist es möglich, in jedem der Einzelbilder max. vier Fluoreszenz-Farbstoffe gleichzeitig zu lokalisieren. Der Multikanal-detektor ermöglicht Mehrfachfluoreszenzuntersuchungen auch bei farblichen Überlappungen. Alle Aufnahmen werden bei zehnfacher Vergrößerung erfasst. Weitere Informationen zum Modell Zeiss Observer.Z1 finden sich auf der Homepage des Herstellers (www.zeiss.de/microscopy/de_de/produkte/lichtmikroskope/axio-observer-fuer-biologie.html, Stand: 16.10.2015).

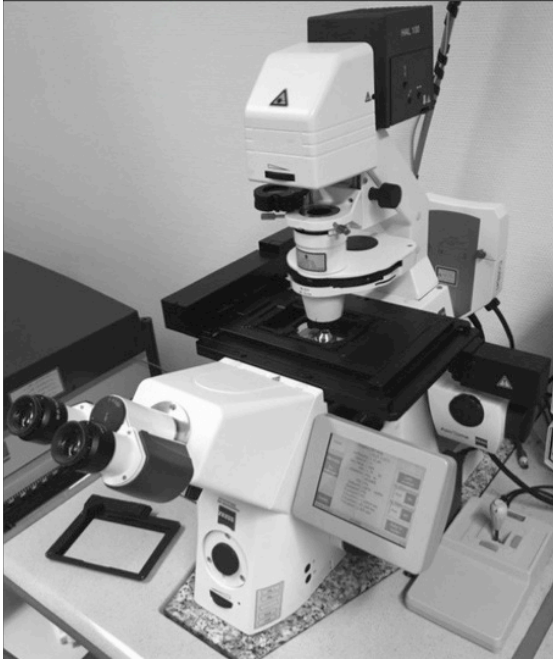


Abbildung 17: Ansicht des Zeiss Observer Z1

Durch den motorisierten Scannertisch ist es möglich zusammengesetzte Mosaik-Bilder zu akquirieren. Von jeder Membran werden so nicht nur repräsentative Detailaufnahmen gemacht, sondern auch definierte Mosaik mit 10 x 10 Kacheln bzw. 12633 x 9429 Pixel erstellt. 1 Pixel entspricht 0,65 μm , d.h. 8211,45 μm x 6128,85 μm bzw. 0,50 cm^2 . In diesem Mosaik-Modus werden jeweils der DAPI- und Calcein-Kanal aufgenommen und damit alle lebenden Zellkörper und ihre Zellkerne registriert.

Die Mosaikbilder werden in Axio-Vision zunächst als ZVI-Format und zur weiteren Auswertung getrennt nach Farbkanälen als TIFF-Format gespeichert. *Abbildung 18* zeigt Beispiele einer Live-Dead-Akquise von d4 mit 2,5 und 5% Substratelongation in Übersichts- und Detailaufnahme.

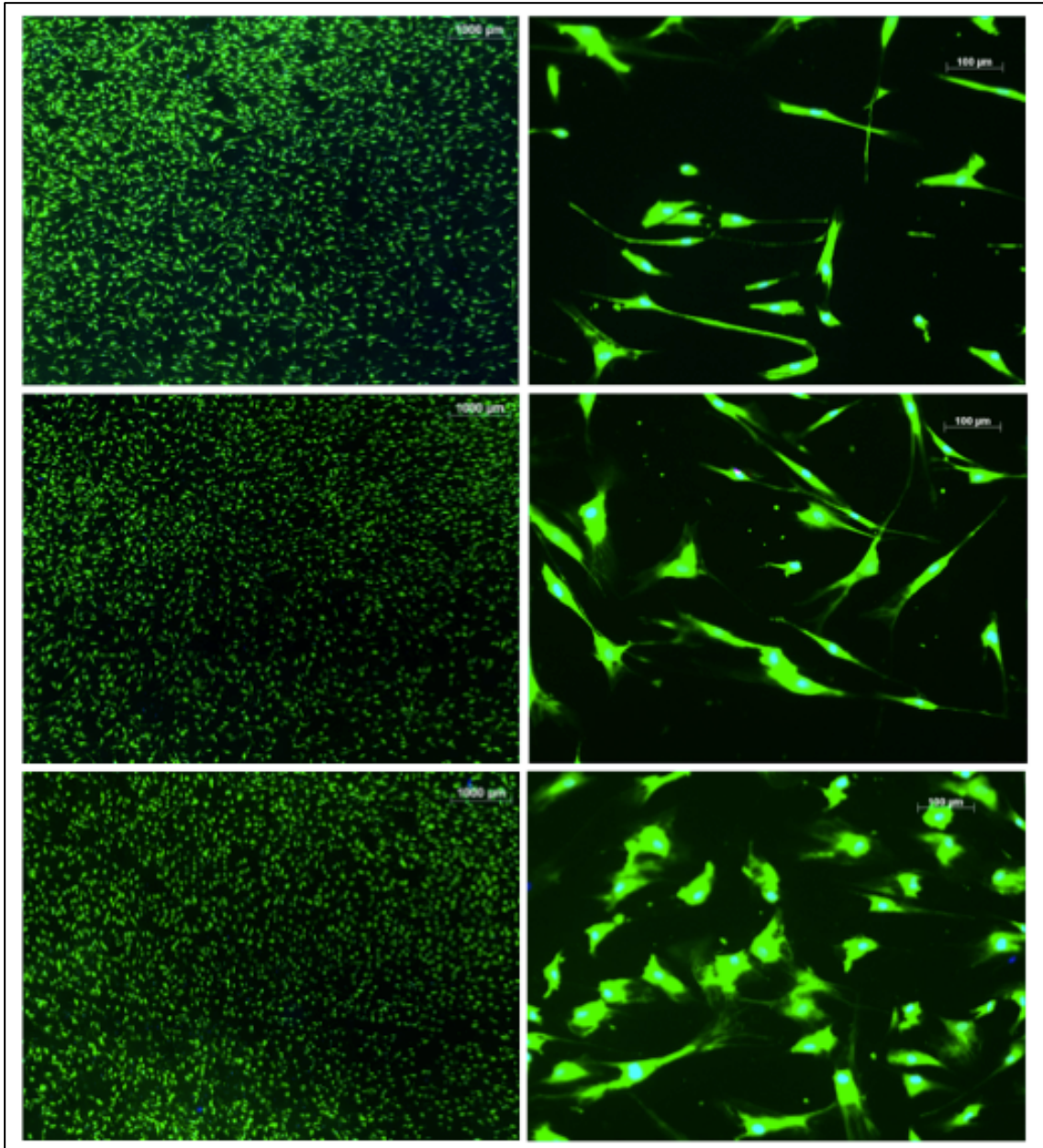


Abbildung 18: Beispiel einer Live-Dead-Bildakquise für Tag 4 (von oben nach unten): Kontrolle, 2,5%- und 5%-Stimulation (links: Mosaix-Aufnahme; Maßstabsbalken = 1000 µm, rechts: Detail-Aufnahme; Maßstabsbalken = 100 µm)

2.11. Live-Dead-Färbung

Die Live-Dead-Färbung erfolgt nach dem modifizierten Protokoll des Herstellers mit dem Cell Viability Imaging Kit (5 x 96, Nr. 06432379001) von Roche. Dieses wird im -20°-Fach im Dunkeln gelagert und unmittelbar vor der Anwendung aufgetaut. Die Zellkerne werden mit Hoechst 33342, die toten Zellkörper mit Propidium-Jodid und die lebenden mit Calcein angefärbt und mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Im Kit enthalten sind 40 µl Hoechst 33342, 150 µl Propidiumjodid und getrocknetes Calcein-AM. Das Kit ist zur Färbung von 96-Well-Platten ausgelegt. Pro Kavität werden 150 µl Färbelösung empfohlen. Zur deren Erstellung benötigt man zusätzlich PBS und DMSO. Zunächst muss das Calcein-AM 15 Sekunden im mitgelieferten Eppendorf-Tube zentrifugiert werden. Nun werden 25 µl DMSO hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Diese Stock-Lösung kann nun wieder eingefroren werden. Zur Erstellung der Färbelösung wird 1 µl Hoechst mit 1 ml PBS gemischt und gevortexed. Dann werden 5 µl Propidiumjodid hinzugegeben und erneut gemischt. Abschließend werden 0,6 µl Calcein-Lösung hinzugegeben und nochmal gevortexed. Zur Färbung der Membranen werden nun 100 µl dieser Lösung vorsichtig auf die Mitte der Membran getropft und 30 Minuten im Brutschrank bei 37° inkubiert.

2.12. Immunfluoreszenz (IF) zur Visualisierung glattmuskulärer Marker

Mit der Methode der Immunfluoreszenz lassen sich verschiedene Proteine in und auf einer Zelle nachweisen. Man unterscheidet zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenz. Bei der zweiten, auch hier verwendeten Methode, wird zunächst ein Primärantikörper an das entsprechende Antigen gebunden, dieser wird dann durch einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht (Büttner and Thomas, 2003). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lassen sich myogene Marker des kontraktiven, glattmuskulären Phänotyps einer Muskelzelle anfärben bzw. nicht anfärben um einen entsprechenden Progress

der Differenzierung vor und nach der mechanischen Stimulation nachzuweisen. Fixierung, sowie IF-Färbung erfolgt in der 6-Well-Platte.

Arbeitsschritte:

1. Methanol-Fixierung: Medium vorsichtig absaugen und verwerfen, mit 2 x 1000 µl PBS waschen, wiederum verwerfen, 1000 µl eiskaltes Methanol hinzugeben, 10 min bei -20°C inkubieren, dann restliches Methanol absaugen und Membran unter dem Abzug trocknen lassen, erneut 2x mit PBS waschen.

2. Blockierung unspezifischer Antikörperbildungen: 1000 µl/Well 0,1 % BSA in PBS für 60 min, bei RT.

3. IF-Färbung: 1000 µl/Well Erstantikörper (gelöst in 0,1 % BSA in PBS), Inkubation über Nacht bei RT, am Folgetag Erstantikörper absaugen, 2x mit PBS waschen, Labor abdunkeln, Zweitantikörper zentrifugieren (3000 g für 30 sec), Zweitantikörper für 30 min bei RT inkubieren, 2x mit PBS waschen, dann Färbung der Zellkerne mit DAPI (1:2000, 1 min, RT), erneut 2x mit PBS waschen.

4. Vorbereitung zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie: Membran umgedreht auf den Objektträger legen, einen Tropfen Mounting Medium darauf geben, Deckglas auflegen, mit der Hand vorsichtig andrücken ggf. Luftblasen mit dem Spatel vorsichtig ausstreichen.

Primärantikörper

| Antikörper | Firma | Konzentration | Herkunft |
|------------|----------------------|---------------|----------|
| αSMA | Abcam, ab5694 | 1:100 | rabbit |
| transgelin | Santa Cruz, sc-50466 | 1:100 | rabbit |

Tabelle 8: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper

| Antikörper | Firma | Konzentration |
|-------------|---------------------|---------------|
| anti-rabbit | Dianova, 11-165-045 | 1:1000 |

Tabelle 9: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

2.13. Bildverarbeitung mit ImageJ

ImageJ ist ein Bildbearbeitungsprogramm des amerikanischen National Institute of Health. Es ist unter <http://imagej.nih.gov/ij/> kostenlos downloadbar. Als zusätzliches Plugin wird zur Berechnung der Formfaktoren „shape_descriptor“ verwendet welches unter <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/descriptors.html> heruntergeladen werden kann (Stand: 16.10.2015).

2.13.1. Bestimmung der Zellzahl im Mosaix-Bild

Bevor die Analyse der Zellform vorgenommen wird, muss zunächst die Zellzahl auf dem Mosaix-Bild bestimmt werden. Hierbei nutzt man die Aufnahme der Zellkerne im DAPI-Kanal. Hierzu isoliert man den DAPI-Kanal zunächst in Axio-Vision als Einzelbild und speichert diesen im TIFF-Format ab. Das Bild kann nun in ImageJ eingelesen werden und sollte im ersten Arbeitsschritt in ein 8-bit-Bild konvertiert werden (Image>Type>8-bit). Nun benötigt man die Original-Größe des Mosaix-Bildes. Diese lässt sich aus Axio-Vision auslesen (hier: 12633 x 9429 Pixel, wobei 1 Pixel 0,65 µm entspricht). Unter Analyse>Set Scale lässt sich nun die Größe des Bildes in ImageJ definieren. Artefakte im Bild sollten mit der Pinselfunktion retuschiert werden. Da die Zellkerne oft inhomogen angefärbt sind, macht es Sinn, vor der weiteren Bearbeitung einen Weichzeichnungsfilter zu verwenden (Process>Filters>Gaussian blur (Radius: 2.0)), damit ein Zellkern nur einmal gezählt wird. Hierfür sollte außerdem ein Schwellenwert festgelegt werden (Image>Adjust>Threshold). Nun lässt sich unter Process>Find maxima die Zellzahl bestimmen. Hierzu wählt man als Output type, Point Selection und setzt einen Haken bei Preview point selection. Die Noise tolerance muss man nun von Bild zu Bild etwas variieren. Hierzu

empfeht es sich, an verschiedenen Stellen des Mosaix die Einstellungen zu validieren und ggf. neu zu adjustieren. Die angezeigte Zellzahl kann nun ausgelesen werden und ist ein guter Anhaltspunkt für die weitere Analyse der Formfaktoren.

2.13.2. Die unterschiedlichen Formfaktoren

Formfaktoren dienen dazu, das Aussehen einer Zelle mathematisch zu beschreiben und damit statistisch auswertbar zu machen. Hierbei beschreiben sie die Zellform unabhängig von ihrer Größe. Sie sind ein Maß dafür, wie sehr das Zellaussehen von der idealen Kreisform abweicht (Hartig and Hartig, 2013). In der Literatur zur biomechanischen Stimulation von MSC werden verschiedene Formfaktoren beschrieben bzw. ihre Veränderung unter Stimulation untersucht (Shape Factor/Circularity, Aspect Ratio, Roundness, Compactness/Solidity oder Cell Shape Index) (Zhang et al., 2008), (Quinlan et al., 2011)). Das ImageJ-Plugin ermöglicht die Auswertung aller o.g. Parameter. Alle Formfaktoren, mit Ausnahme der Aspect Ratio, sind dimensionslose Zahlen zwischen 0 und 1. Die mathematische Definition der Formfaktoren findet sich in *Tabelle 9*.

Alle Formfaktoren werden für die in der Calcein-Färbung dargestellten, vital-adhärenenten MSC auf der Kollagenmembran mit und ohne biomechanische Stimulation im Mosaix-Bild berechnet.

| mathematische Definition der Formfaktoren | |
|--|---|
| Shape Factor/Circularity | $4\pi \times \text{Fläche}/\text{Umfang}^2$ |
| Aspect Ratio | Hauptachse/Nebenachse |
| Roundness | $4 \times \text{Fläche}/\pi \times \text{Hauptachse}^2$ |
| Compactness/Solidity | $\sqrt{((4/\pi) \times \text{Fläche})}/\text{Hauptachse}$ |

Tabelle 10: mathematische Definition der Formfaktoren
vgl. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/descriptors.html> (Stand: 16.10.2015)

Die **Circularity** beschreibt die Rundheit eines zweidimensionalen Objektes. Der Wert 1 beschreibt den perfekten Kreis. Umso kleiner der Wert wird, umso langgestreckter ist das Objekt. Darüberhinaus gibt die Circularity auch Informationen über den Umfang einer Zelle. Ist die Zelle sehr verzweigt ausgebreitet, so wird der Wert für Circularity kleiner.

Die **Aspect Ratio** setzt Haupt- und Nebenachse in ein Verhältnis und gibt so an, wie gestreckt ein Objekt ist. Haupt- und Nebenachse stehen senkrecht zueinander. Der Wert der Aspect Ratio wird groß, wenn die Nebenachse – im Verhältnis zur Hauptachse – klein ist.

Anders als bei der Circularity wird die **Roundness** nicht durch den Umfang der Zelle beeinflusst. Ansonsten gibt auch dieser Parameter die Rundheit einer Zelle im Wertebereich von 0 bis 1 an. Auch hier ist 1 wieder ein perfekter Kreis.

Die **Solidity** setzt sich aus der Fläche eines Partikels und aus der Fläche der konvexen Hülle eines Partikels zusammen. Im Bezug auf eine Zelle beschreibt Solidity wie stark sich eine Zelle auf einer Oberfläche ausgebreitet hat und wie kompakt sich die Masse der Zelle hierauf verteilt.

Die *Abbildungen 19* und *20* illustrieren das Verhältnis der Formfaktoren untereinander. *Abbildung 21* zeigt Beispiele von Zellen unterschiedlicher Roundness-Werte auf einem kompaktierten Kollagen-I-Hydrogen mit 80 mg/ml, ohne mechanische Stimulation, nach 24 Stunden Adhärenz.

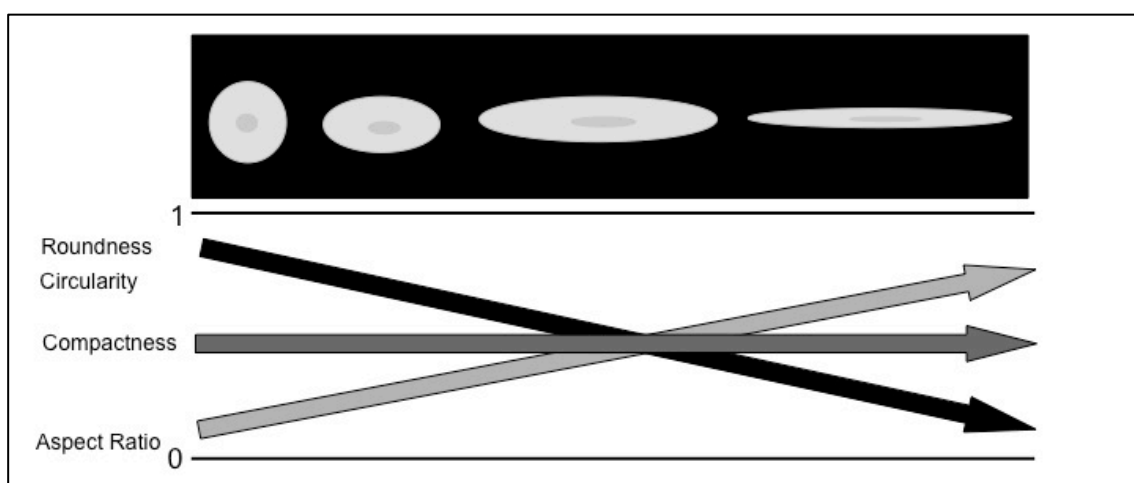


Abbildung 19: Verhältnis der Formfaktoren untereinander in einer schematischen Darstellung I: Zelle flacht sich immer weiter ab und wird länglicher, Roundness und Circularitiy nimmt ab, Compactness bleibt gleich, Aspect Ratio nimmt zu

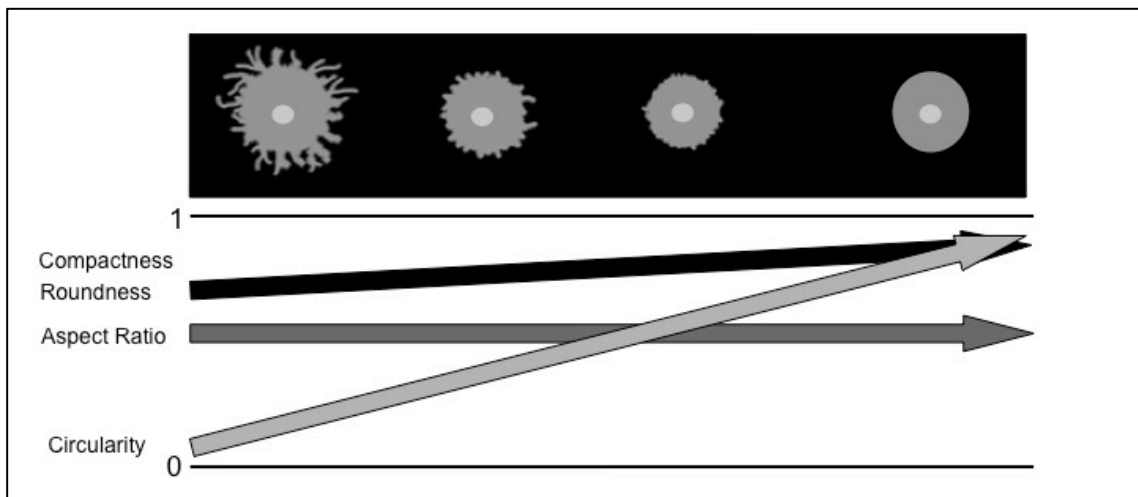


Abbildung 20: Verhältnis der Formfaktoren untereinander in einer schematischen Darstellung II: Zellausläufer werden immer weniger, die grundsätzlich runde Zellform bleibt allerdings vorhanden, Roundness und Compactness steigt von einem hohen Niveau noch weiter an, Aspect Ratio bleibt gleich, Circularity steigt

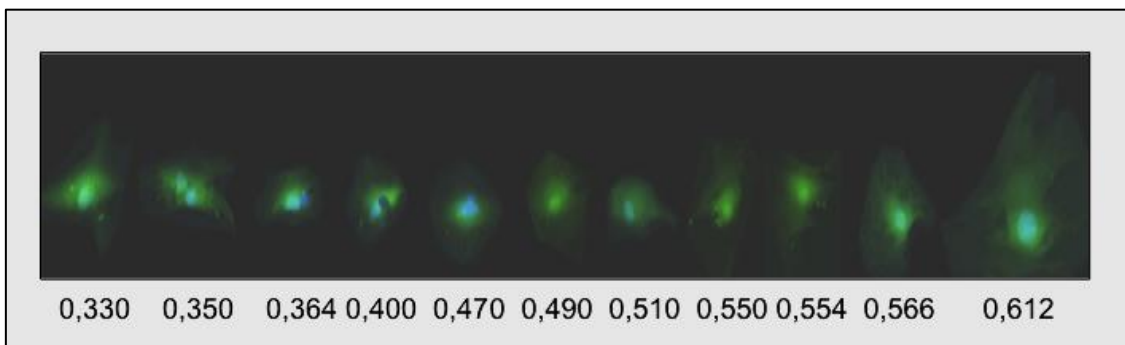


Abbildung 21: Beispiele von Zellen unterschiedlicher Roundness-Werte (hbmMSC, nach 24 h Adhaerenz, ohne mechanische Stimulation auf einem Kollagen-I-Hydrogel mit 80 mg/ml)

2.13.2.1. Bestimmung der Formfaktoren im Mosaix-Bild

Zur Bestimmung der Formfaktoren nutzt man nun den Calcein-Kanal des Mosaix-Bildes (*Abbildung 22*). Wie oben bereits beschrieben lässt sich dieser Kanal in Axio Vision isolieren und wird wiederum als TIFF-Format abspeichern. Das Bild kann nun in ImageJ eingelesen werden und sollte im ersten Arbeitsschritt in ein 8-bit-Bild konvertiert werden (Image>Type>8-bit). Nun benötigt man die Original-Größe des Mosaix-Bildes.

Diese lässt sich aus Axio-Vision auslesen (hier: 12633 x 9429 Pixel, wobei 1 Pixel 0,65 µm entspricht). Unter Analyse>Set Scale, lässt sich nun die Größe des Bildes in ImageJ definieren.

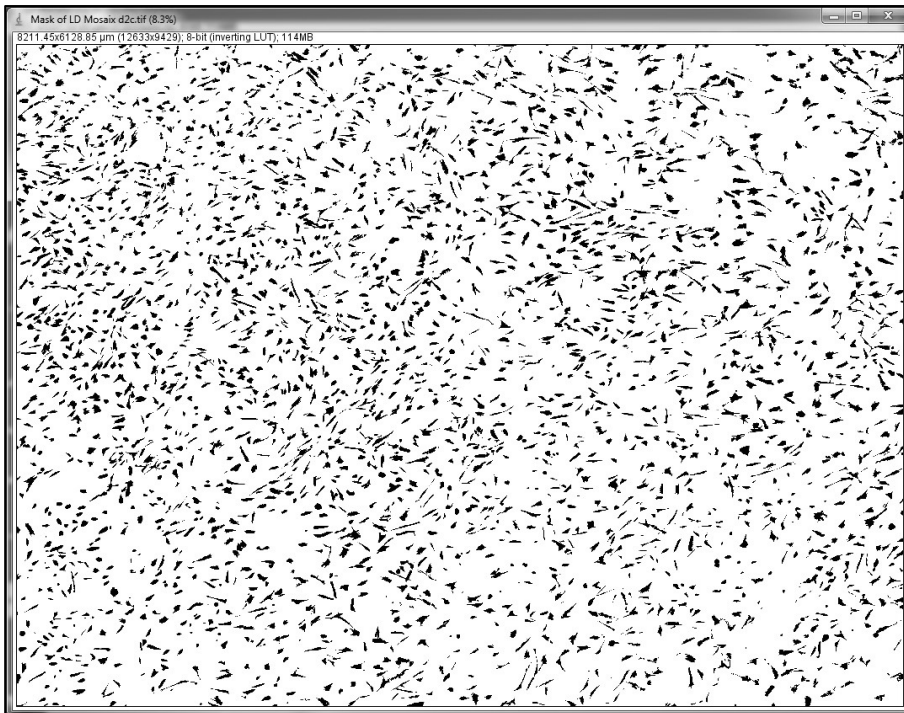


Abbildung 22: Beispiel eines bearbeiteten Calcein-Kanal-Mosaik-Bildes vor Analyse der Formfaktoren

Nun öffnet man das shape_descriptor Plugin (Plugins>Shape descriptor). Jetzt wählt man Single Particle Detail sowie Show mask, Display results, Clear results und Summarize. Des Weiteren muss man das Kleinste noch zu detektierende Partikel festlegen (hier: 250). Diese Untergrenze wird an verschiedenen Bildern validiert und dann bei der Auswertung aller Bilder verwendet. Eine Abweichung der Zellzahl zwischen DAPI- und Calcein-Analyse von +/- 2 % wird toleriert. Die obere Grenze wird auf Infinity gesetzt. Die akquirierten Daten können nun aus ImageJ ausgelesen und in eine Excel-Tabelle überführt werden (*Abbildung 23*).

| | A | B | C | D | E | F | G |
|----|-------|---------|-----------|--------------|-------------|-----------|--------------|
| 1 | Count | Area | Perimeter | Aspect Ratio | Compactness | Roundness | Shape Factor |
| 2 | 1 | 166.46 | 69.74 | 40390 | 0.96 | 0.93 | 0.43 |
| 3 | 2 | 130.98 | 75.99 | 41333 | 0.56 | 0.32 | 0.29 |
| 4 | 3 | 1587.76 | 237.08 | 45291 | 0.88 | 0.78 | 0.35 |
| 5 | 4 | 1547.62 | 363.66 | 11870 | 0.37 | 0.14 | 0.15 |
| 6 | 5 | 817.11 | 169.92 | 42766 | 0.67 | 0.45 | 0.36 |
| 7 | 6 | 384.48 | 113.52 | 31443 | 0.59 | 0.34 | 0.37 |
| 8 | 7 | 1663.38 | 275.35 | 44957 | 0.66 | 0.44 | 0.28 |
| 9 | 8 | 389.55 | 116.66 | 26664 | 0.75 | 0.56 | 0.36 |
| 10 | 9 | 366.31 | 207.64 | 42429 | 0.56 | 0.31 | 0.11 |
| 11 | 10 | 1983.21 | 323.63 | 29251 | 0.59 | 0.35 | 0.24 |

Abbildung 23: Beispiel eines in Excel überführten Read-outs des Shape-Descriptor Plugins

2.14. Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA)

Die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) erfolgt mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen. In diesem Kit befinden sich alle benötigten Reaktionsgefäße und Chemikalien. Das Extraktionsprotokoll folgt in weiten Teilen dem Firmen-eigenen Protokoll. Für jede Probe werden 10 µl DNase benötigt. Diese wird zunächst aufgetaut und mit je 70 µl/Probe RDD-Puffer gemischt. Parallel wird β-Mercaptoethanol mit RLT-Lysis-Puffer im Verhältnis 1:100 angesetzt. Das abzentrifugierte Zellpellet wird zunächst in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Nun wird 350 µl 70% Ethanol hinzugegeben und ebenfalls vermischt. Das Gesamtvolumen wird nun auf die Extraktionssäule gegeben. Diese wird 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nun werden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben, nochmals wie o.g. zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. 80 µl der DNase-Mischung werden auf die Säule gegeben und 15 min bei RT gewartet. Anschließend wird 350 µl RW1 auf die Säule gegeben. Die Säule wird nun in ein sauberes Tube umgesetzt. Hinzugabe von 500 µl RPE-Puffer und neuerliches Abzentrifugieren. Gleichen Arbeitsschritt wiederholen und bei max. Zentrifugengeschwindigkeit nochmals zentrifugieren. Nach Verwerfen des

Überstandes leere Membran nochmals zentrifugieren. Die Membran wird wiederum in sauberes Tube überführt. 30 µl dH₂O hinzugeben. Eine Minute warten. Dann 1 min bei 10000 rpm zentrifugieren. Überstand bei -70° einfrieren. Im nächsten Schritt muss die RNA in Desoxyribonucleinsäure (DNA) bzw. komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

2.15. Umschreiben der RNA in komplementäre Desoxyribonucleinsäure (cDNA)

Auch das Umschreiben von RNA von cDNA erfolgt mit einem standardisierten Kit, hier: Advantage RT-for-PCR Kit (Clontech), das alle benötigten Chemikalien enthält. Man benötigt 5f-Reaktions-Puffer, dNTPMix, RNase-Inhibitor, Transcriptase, Oligo-DT-Primer und Random Hexamer Primer. Nun erstellt man einen Mastermix aus Reaktions-Puffer, dNTP Mix, RNase-Inhibitor und MMLV. Die unterschiedlichen Temperaturverläufe incl.-Dauer sind bereits im Uno II Biometra hinterlegt. 12,5 µl RNA und insg. 1 µl Primer (1:1) werden vermischt und für 2 min auf 70° erhitzt (hier: Programm 22). Dann wird das Reaktionsgefäß sofort auf Eis gestellt und der vorbereitete Mastermix hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wird wieder zurück in den Uno II gestellt und das Programm 23 angewählt. In diesem wird das Reaktionsgefäß zunächst 1h auf 42° gehalten und dann 5 min auf 94° erhitzt. Die cDNA kann nach Beendigung des Programms bei -20° gelagert werden und steht nun der PCR zur Verfügung.

2.16. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. An aufgebroschene DNA werden Primer, bekannte Oligonukleotide, angelagert, so dass durch die DNA-Polymerase der komplementäre Strang neu synthetisiert werden kann.

Dieser Prozess erfolgt in einem dreischrittigen Zyklus: Trennung des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung der Primer (Annealing) und der eigentlichen

Replikation des DNA-Strangs (Elongation) (Saiki et al., 1985). Die verschiedenen Reaktionen laufen bei unterschiedlichen Temperaturen ab. Im Thermocycler (hier: Roche Light Cycler 480) laufen diese Schritte nach einem zuvor programmierten Protokoll immer wieder hintereinander ab. Da sich durch das Aufbrechen des DNA-Doppelstranges zwei Einzelstränge ergeben, nutzt man immer zwei Primer: Einen, der an den sense (5') Strang der zu amplifizierenden DNA-Sequenz bindet und einen zweiten, der an den anti-sense (3') Strang der zu amplifizierenden DNA-Sequenz bindet. Da das Expressionsmuster von myogenen Oberflächenmarkern untersucht wird, wird zunächst RNA isoliert und dann mit Hilfe des viralen Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die PCR werden der Ready-to-use-Reaktionsmix Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I und Taq Man Master-Set verwendet. Hiermit ist die Durchführung einer quantitativen PCR (qPCR) möglich. Das heißt, es lässt sich nicht nur nachweisen, dass ein bestimmtes DNA-Amplifikat vorliegt, sondern es lassen sich auch Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge ziehen. So ist es möglich, die Höhe der Expression der myogenen Marker vor und nach der Stimulation zu vergleichen. Beim SYBR Green erfolgt die Quantifizierung mit einem an Doppelstrang-DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff. Die Fluoreszenz im exponentiellen Stadium der PCR ermöglicht eine Aussage über die Menge des amplifizierten Produktes, da die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional mit der Menge des gebildeten Produktes ansteigt (Higuchi et al., 1992). Problematisch bei diesem Verfahren ist allerdings, dass die Fluoreszenz nur Doppelstrang-DNA nachweist und so Primer-Dimere nicht ausschließt. Durch die abschließende Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse lassen sich spezifische und unspezifische Signale auseinanderhalten. Bei der Verwendung von Taq Man oder Hydrolyse-Sonden wird hingegen ein Fluoreszenzfarbstoff an eine Sonde gebunden. Wenn diese Sonde durch die DNA-Polymerase bei der Synthese des 5'-Stranges abgebaut wird, wird Fluoreszenz frei, die jeweils einmal im Zyklus gemessen wird (Holzapfel and Wickert, 2007). Die Auswertung der PCR erfolgt über die „Relative Quantifizierung“. Man führt hier die Real-Time PCR mit einem sogenannten Referenzgen durch. Dies ist ein Gen, dass in allen Zellen in

konstant vorhanden ist. Hier sind die Referenzgene die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die Peptidylprolylisomerase A (PPIA). Die untersuchten Zielgene werden auf diese GAPDH und PPIA normalisiert. Als Positiv-Kontrolle für die Target-Marker dienen humane, glatte Muskelzellen aus der Blase (human bladder SMC, HITB5, Promocell), Passage 5+6, bzw. das RNA-Isolat einer Detrusor-Biopsie (für Desmin und Myh 11).

| Gen | Hersteller | Forward Primer | Reverse Primer | Sonde |
|------------|---|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| GADPH | 101128 Roche, Schweiz | CTCTGCTCCTCCTGTTCG | ACGACCAAAATCCGTTGACTC | N60 (04688589001) |
| PPIA | CHPS-1 Biomol, Deutschland | TTCATCTGCACTGCCAAGAC | TCGAGTTGTCCACAGTCAGC | SYBR Green |
| ACTA II | via http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ Eurofins, MediGenomix, Deutschland | TTGCCCTGATGGGCAAGTGAT | TACATAGTGGTGCCCCCTGA | N58 (04688554001) |
| Transgelin | Hs_TAGLN_2_SG (QT01678516) Qiagen, USA | nicht angegeben | nicht angegeben | SYBR Green |
| CNN1 | via http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ Eurofins, MediGenomix, Deutschland | AGARGGCATCATCTCTTTGCCGA | GCTGGTGCCAATTTTGGGTT | N71 (04688945001) |

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primer und Sonden

2.17. Uniaxiale Stimulation von hbmMSC auf kompaktiertem Kollagen-I-Hydrogel mit dem Bose ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument

Die Versuche erfolgen in MSC-Kontrollmedium. Die Versuchsreihe beginnt pro Patient und Passage bei 80 % Konfluenz.

| MSC-Kontrollmedium | |
|---------------------------|------------------------------------|
| 450 ml | DMEM low glucose |
| 50 ml | FCS |
| 10 ml | Penicillin/Streptomycin, 5000 U/ml |
| 5 ml | Partricin, 50 µg/ml |

Tabelle 12: Zusammensetzung des MSC-Kontrollmediums

Der eigentliche Stretch-Versuch erfolgt an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (d4 und d5). Davor liegt eine Adhärenz- und Wachstumsphase von vier Tagen (d0-4), in denen sich die Zellen bereits auf dem kompaktierten Hydrogel befinden. Pro Versuch/Patient/Passage werden jeweils zwei unterschiedliche Substratelongationen getestet (2,5 und 5 %). Dementsprechend werden pro Versuch sechs Membranen benötigt.

Unter sterilen Kautelen werden die Kollagenstreifen auf 4 x 1 cm zugeschnitten und so in eine 6-Well-Platte gelegt, dass 3 cm des Streifens plan auf dem Well-Boden liegt und je 5 mm beidseits nach oben geklappt ist. Um ein Austrocknen der Membranen bis zur Besiedlung zu verhindern, werden die Membranen mit 2 ml Kontrollmedium bedeckt und in den Brutschrank gestellt, um diese optimal auf die Besiedlung vorzubereiten.

Die sechs Membranen werden für die weitere Versuchsreihe wie folgt benannt:

- d4c = Tag 4 Kontrollmembran, keine Stimulation
- d4s 2,5 % = Tag 4 Stimulationsmembran, 2,5 % Substratelongation
- d4s 5 % = Tag 4 Stimulationsmembran, 5 % Substratelongation
- d5c = Tag 5 Kontrollmembran, keine Stimulation
- d5s 2,5 % = Tag 5 Stimulationsmembran, 2,5 % Substratelongation an Tag 4 & 5
- d5s 5 % = Tag 5 Stimulationsmembran, 5 % Substratelongation an Tag 4 & 5



Abbildung 24: Versuchsablauf pro Patient

2.17.1. Besiedelung des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels mit hbmMSC

Tag 0: Nach dem Trypsinisieren und Zählen der Zellen, erfolgt die Aussaat mit 5000 Zellen/cm². Bei der Gesamtgröße einer Kavität einer 6-Well-Platte von 960 mm² werden entsprechend 48.000 Zellen ausgesät. Die Zellen werden, anders als bei der Zellpassagierung, nach der Zentrifugation nun mit dem MSC-Kontrollmedium in Suspension genommen und in einem Mastermix mit je 2 ml Kontrollmedium/well auf die Membran gegeben. In den folgenden vier Tagen wachsen die Zellen in der Well-Platte. Ein nochmaliger Medienwechsel erfolgt nicht.

Tag 4: Da sich die Zellaussaat auf der Kollagenmembran nicht sicher im Lichtmikroskop kontrollieren lässt, wird als erster Schritt an einer ½ Membran (d4c) eine Live/Dead-Färbung (siehe 2.11 Live-Dead-Färbung) durchgeführt und mit dem Mikroskop dokumentiert. Hierbei wird beachtet, dass bei jeder Membran ein repräsentatives Quadrat von 0,50 cm² im DAPI und Calcein-Kanal dokumentiert und später auch ausgewertet werden kann.

Die zweite Hälfte von Membran d4c wird parallel für die RNA-Extraktion (siehe 2.14 RNA-Extraktion) vorbereitet und eingefroren, so dass die Umschreibung in cDNA (siehe 2.15 Umschreiben der RNA in cDNA) und die eigentliche PCR (siehe 2.16) erfolgen kann.

2.17.2. Einbau des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels in das ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument

Nun erfolgt der Einbau von jeweils einer Kollagenmembranen (d4s 2,5 % und d4s 5 %) in die Stimulation-Kammer. Für jeden Versuch stehen zwei Stimulationkammern zur Verfügung. Die Kammern werden jeweils vor dem Versuch komplett demontiert und mit Tween 20 (10 ml/10 l) gewaschen. Nach dem Detergenzschritt werden sie mehrfach mit Aqua dest. gespült. Alle Dichtungen und Gummis werden vor der Remontage auf ihre Unversehrtheit überprüft und ggf. getauscht. Nach dem Zusammenbau wird die Kammer doppelt verpackt und autoklaviert. Dabei werden die Fuß- und Deckplatte separat verpackt und autoklaviert. Vor der Benutzung wird die Kammer unter der Sterilbank final montiert. Hierzu wird die Bodenplatte der Kammer befestigt und die Kammer mit 200 ml PBS gefüllt, um diese auf Dichtigkeit zu überprüfen. Ist die Kammer funktionsbereit, baut man die Membran in PBS ein. Beim Einbau muss sorgfältig darauf geachtet, dass die Membran nicht unnötig mit der Pinzette angefasst wird. Außerdem sollte die Membran beim Ein- wie Ausbaurvorgang nicht akzidentell gestreckt werden. Die Membran wird so in die Kammer eingebaut, dass der Zellrasen oben auf liegt. Mindestens 2 cm der Membran sollen frei zwischen beiden Befestigungsklampen in PBS bzw. im

Kammermedium hängen. Ist die Membran eingespannt, wird das PBS verworfen und die Kammer vorsichtig mit 200 ml vorgewärmtem MSC-Kontrollmedium aufgefüllt. Dieses wird zur Aquilibrierung des pHs und der Temperatur zuvor in den Brutschrank gestellt. Nach Einbau der Membran in die Kammer wird diese nun nochmals, mit geöffnetem Ventil, für eine Stunde im Brutschrank gelagert. Nun wird die erste Kammer (d4s 2,5 %) in den Stretch-Apparat eingebaut (*Abbildung 25*). Nachdem Server und PC des Stretch-Apparates gestartet wurden, wird die Kammer vorsichtig eingesetzt. Zunächst wird die Kammer mit Klammern fixiert, dann erfolgt die sorgfältige Ausrichtung von Sonden und Membran. Die Länge der freihängenden Membran wird mit einem Messschieber abgenommen. Nun wird das Programm WinTest gestartet und das Stimulationsprotokoll geöffnet. Distanz und Ladung werden genullt. Die Substrat-Elongation wird im Bezug auf die freihängende Membranlänge berechnet und als Zieldistanz in WinTest definiert (Beispiel: Die Membran soll mit 2,5 %-Substratelongation stimuliert werden. Die Länge der freihängenden Membran beträgt 2 cm, dann wird die Distanz 2, die in WinTest definiert wird $2 \times 0,025 = 0,05$ gesetzt.) Des Weiteren werden 1 Hz bzw. 3600 Wiederholungen pro Stunde angewählt.

Ist die Stimulation nach einer Stunde beendet, befindet sich die Membran wieder in der 0-Position. Nun werden zunächst die Sicherungen an der Kammer angebracht, so dass die Membran in der Kammer nicht mehr beweglich ist. Dann wird die Kammer aus dem Stretch-Apparat ausgebaut. Die Membran d4s 2,5 % wird in der Sterilbank aus der Kammer ausgebaut. Hierbei ist wiederum darauf zu achten, dass die Membran nicht unnötig gestreckt und die Membran nicht mit der Pinzette beschädigt wird. Nun wird die Membran in der Mitte mit dem Skalpell geteilt. Die Membrananteile, die unter den Befestigungskrampen waren, werden abgetrennt und verworfen. Die erste Hälfte der Membran wird, wie bereits die Kontrollmembran d4c, mit der Live-Dead-Färbung gefärbt. Der zweite Teil dient der RNA-Gewinnung. Parallel wird die zweite Membran d4s 5% in die Kammer eingespannt und stimuliert. Die frei gewordene Kammer wird mit der Membran d5s 2,5 % beschickt und im Brutschrank gelagert. Eine Stunde später erfolgt erneut ein Wechsel: Membran d4s 5 % wird ausgewertet

und Membran d5s 2,5 % wird stimuliert. Wiederum eine Stunde später wird die Membran d5s 2,5 % zurück in den Brutschrank gestellt und die Membran d5s 5 % als letzte Membran des stimuliert. Am Ende der Stimulation wird diese genauso wie Membran d5s 2,5 % über Nacht in den Brutschrank gestellt. Das heißt, alle vier Membranen (d4s 2,5 %, d4s 5 %, d5s 2,5 % und d5s 5 %) an Tag 4 stimuliert werden. Nur die beiden erstgenannten sowie d4c werden auch an Tag 4 ausgewertet. Die Membranen d5s 2,5 % und d5s 5 % werden an Tag 5 erneut biomechanisch stimuliert. Da die Distanzen zwischen den Befestigungsklampen variieren, müssen diese immer wieder neu ausgemessen und die Substratelongation berechnet werden. In der 0-Position soll die Membran in der Kammer so eingespannt sein, dass sie gerade hängt, aber nicht unter Spannung steht.

Tag 5: Beide Membranen (d5s 2,5 % und d5s 5 %) werden an diesem Tag nacheinander, wie oben beschrieben, stimuliert und genau wie an Tag 4, unmittelbar nach der Stimulation aus der Kammer ausgebaut und gefärbt.

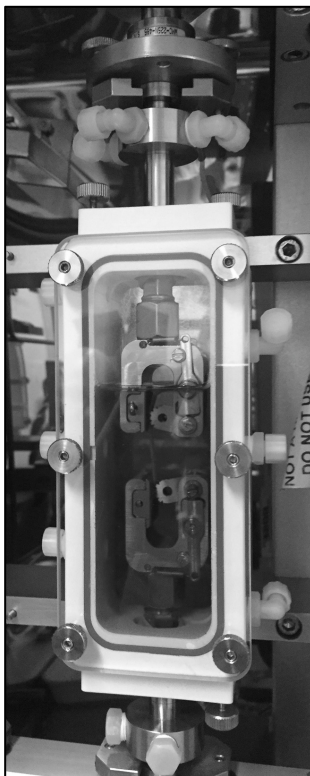


Abbildung 25: Stimulationskammer mit Kontrollmedium und eingespanntem kompaktiertem Kollagen-I-Hydrogel

2.17.3. kompaktiertes Kollagen-I-Hydrogel verdauen und einfrieren

Um mehrere Proben gemeinsam per PCR analysieren zu können, werden sowohl die Kontrollmembranen als auch die stimulierten Proben zunächst eingefroren. Hierzu wird Membran zuvor verdaut. Die halbe Membran wird unter sterilen Kautelen nochmals mit dem Skalpell geviertelt. Die Membranstücke werden in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und mit 60 µl RNase-freiem (DEPC-treated) Wasser (Teil des RNA-Extraction-RNeasy Mini Kit, Quiagen) bedeckt. Nun wird 5 µl Proteinase K hinzugegeben. Im auf 55° vorgewärmten Thermomix wird die Membran bei 600 rpm innerhalb von 4 Minuten aufgelöst. Nun wird in das Tube 350 µl RLT-Puffer (Lysis-Puffer mit einem hohen Anteil an Guanidin Isothiocyanat, prämixed mit β-Mercaptoethanol, Verhältnis 1:100, ebenfalls Teil des o.g. Kits, vgl. <https://www.qiagen.com/de/resources/faq?id=2acb974c-4cca-4744-a2cf-60b5f483339b&lang=en>, Stand: 16.10.2015) gegeben. Im Anschluss können die Proben bei -70° eingefroren werden bevor die Ribonucleinsäure (RNA) in einem späteren Schritt extrahiert wird.

2.18. Statistische Analyse

Die Zellzahlen, Werte der Formfaktoren, Mittelwerte, Standardabweichung und -fehler werden mit Hilfe von Microsoft Excel 2011 berechnet und dargestellt. Die weiteren statistischen Berechnungen werden mit SigmaPlot 11.0.0.77 durchgeführt.

Die Daten werden auf Normalverteilung überprüft (Kolmogorov-Smirnov-Test). Normalverteilte Daten werden mittels Student's T-Test, nicht normalverteilte mit dem Mann-Whitney-Rank-Sum-Test ausgewertet. Mehr als zwei Gruppen werden mittels ANOVA verglichen und angemessene post-hoc tests durchgeführt. Unterschiede und Korrelationen werden bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

Bei den Boxplots werden der Median, die 10., 25., 75. und 90. Perzentile mit Fehlerbalken sowie Ausreißern gezeigt.

3. Ergebnisse

3.1. Verhalten des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels in der Zellkultur

Auf allen drei kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen adhäreren die hbmMSC innerhalb von einer Stunde und lassen sich auch mehrere Tage in Kultur halten. Die maximal untersuchte Zeitspanne beträgt 10 Tage.

Das Gel mit der niedrigsten Kollagen-Konzentration (80 mg/ml) lässt sich in der Stimulationskammer und auch in der Zellkultur am besten Handhaben.

3.2. PCR der Zielgene in der statischen Kultur an Tag 4 und 5

Die PCR wird zunächst auf unstimulierten, kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen etabliert. Hierfür werden Hydrogele mit 80 und 160 mg/ml nach Besiedlung mit hbmMSC an Tag 1, 4 und 5 auf die Expression der myogenen Ziel-Marker untersucht. Hier zeigt sich, dass ACTA II bei einer Kollagenkonzentration von 80 mg/ml an Tag 4 signifikant höher exprimiert wird, als auf Gelen mit 160 mg/ml ($p < 0,001$, $2,202 \pm 0,212$ vs. $0,892 \pm 0,161$). Zwischen Tag 4 und 5 nimmt die ACTA II-Expression auf beiden Gelen ab ($p < 0,001$, $1,730 \pm 0,220$ vs. $0,706 \pm 0,083$). Dennoch bleibt die Zunahme der ACTA II-Expression im Vergleich zu Tag 1 - ebenfalls auf beiden Gelen - statistisch signifikant erhöht ($p < 0,001$). Es zeigen sich keine Unterschiede der relativen Genexpression von TAGLN und CNN1 auf den unterschiedlichen, unstimulierten kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen zwischen den Tagen 1, 4 und 5 ($n=3$). Zum Vergleich werden hbmMSC an Tag 5 in den Zellkulturflaschen mit denen auf kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen (80 mg/ml) verglichen. hbmMSC exprimieren auf den Kollagen-I-Hydrogelen 7,4 x mehr ACTA II, 2,2 x mehr TAGLN und 40,8 x mehr CNN1 als auf Plastik ($n=1$). Vergleicht man diese Expressionsraten wiederum mit den Positiv-Kontrollen, also SMC, entspricht die ACTA II-Expression 30 % der Positivkontrollen.

3.3. Bestimmung der optimalen Zellzahl

Bei 5000 Zellen/cm² zeigt sich eine homogene Zellaussaat. Auch nach der Adhärenzphase von vier Tagen wird eine Zellkonfluenz von 80% nicht überschritten, so dass eine IF-Auswertung gut möglich ist (n=3). *Abbildung 26* zeigt den Ausschnitt einer repräsentativen Coomassie-Färbung von hbmMSC im Vergleich von d1 und d4.

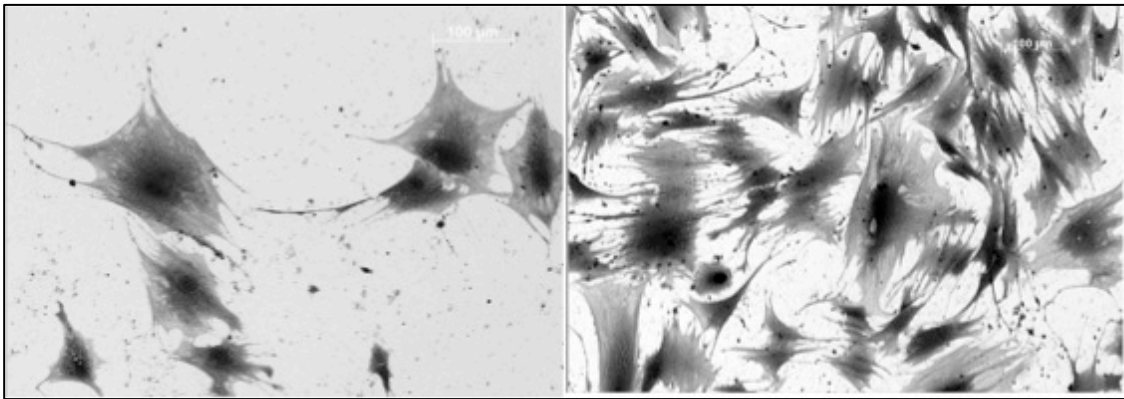


Abbildung 26: Coomassie-Färbung zur Bestimmung der optimalen Zellzahl: 5000 Zellen/cm²
d1= links, d4= rechts; Maßstabsbalken: 100 µm

3.4. Charakterisierung des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels

3.4.1. Messungen mit dem Zwei-Koordinaten-Mess-Gerät (ZKM 250D) zur Bestimmung der Geldicke

Die Messung wird an 10 Gelproben unterschiedlicher Chargen durchgeführt. Die zulässige Messunsicherheit liegt bei 2,3 µm. Die Streuung der Einzelmessungen beträgt maximal 0,08 mm. Der Mittelwert wird aus zehn Einzelmessungen ermittelt. Hierbei ergibt sich eine Dicke des 80 mg-Gels von 0,54 mm.

3.4.2. Messungen mit dem Bose ElectroForce 5210 BioDynamic® Test-Instrument zur Bestimmung der Dehnungssteifigkeit

Für das kompaktierte Kollagen-I-Hydrogel mit 80 mg/ml ergeben sich folgende Messergebnisse: erste 100 Zyklen 2,67 ($\pm 0,01$) MPa, letzte 100 Zyklen 2,58 ($\pm 0,01$) MPa ($p < 0,001$). Das bedeutet, dass das Hydrogel trotz der stattgehabten Substratelongation nach 3600 Zyklen 96,7 % seiner Dehnungssteifigkeit behalten hat.

Im Vergleich hierzu behält das 160 mg/ml Kollagen-I-Hydrogel 62,4 % und das 240 mg/ml Kollagen-I-Hydrogel 36 % seiner ursprünglichen Dehnungssteifigkeit. *Abbildung 27* zeigt den Vergleich aller drei Membranen zwischen den ersten und den letzten 100 Stimulationszyklen.

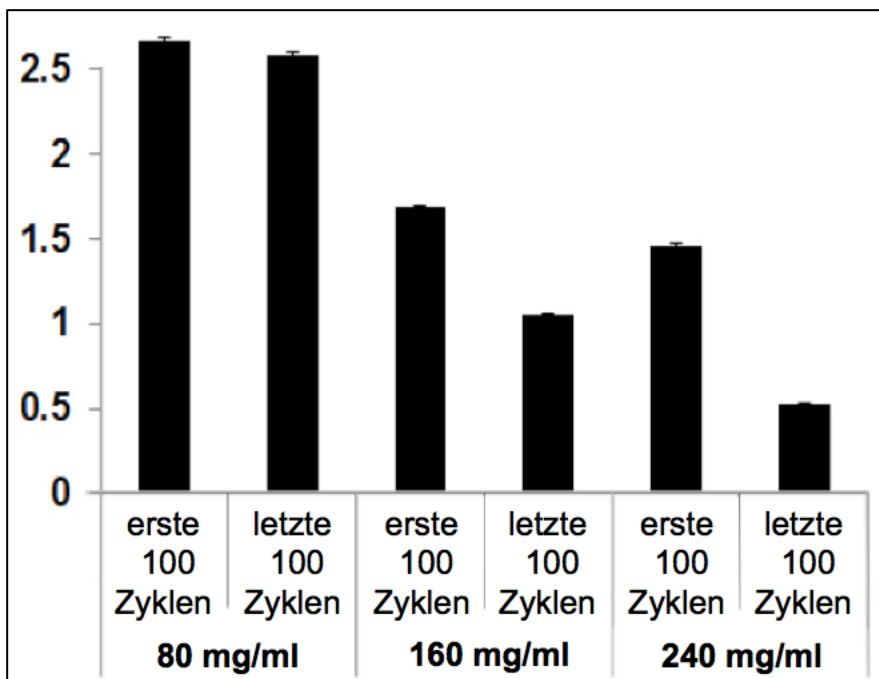


Abbildung 27: Veränderung des Young's Modulus (in MPa) zwischen den ersten 100 bzw. den letzten 100 Zyklen bei einer 1-stündigen Stimulation mit 5 %-Substratelongation im Bose ElectroForce 5210: Kollagen-I-Hydrogele mit den Konzentrationen von 80, 160 und 240 mg/ml (n=3)

Des Weiteren zeigt sich im WinTest-Readout, dass bei den ersten mechanischen Stimulationszyklen die Kraft, die nötig war, um das gewünschte Displacement zu erreichen, deutlich größer ist, also in den Folgezyklen. Nach rund 100 Zyklen stellt sich ein Setzverhalten ein.

3.4.3. Messungen mit dem Atomic Force Mikroskop (AFM) zur Bestimmung des Young's Modulus

Das kompaktierte Kollagen-I-Hydrogel mit 80 mg/ml weist einen Young's Modulus von 10,2 kPa (SD: 0,8 kPa) auf. Im Vergleich hierzu die Young's-Moduli der 160 und 240 mg/ml Gele in *Abbildung 28*.

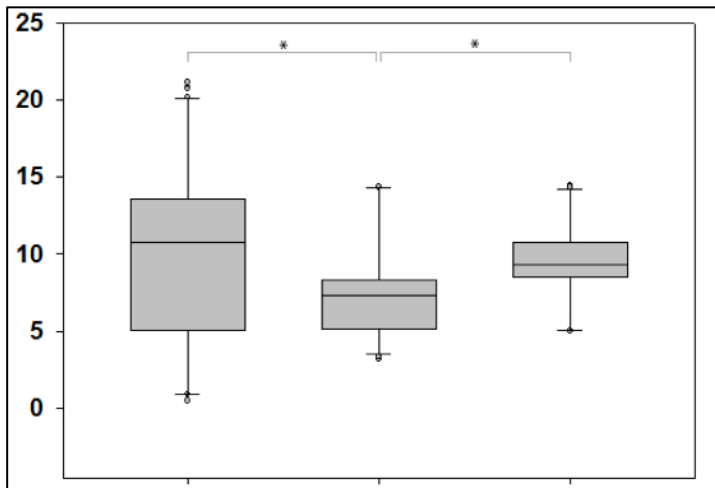


Abbildung 28: Vergleich der unterschiedlichen Young's Moduli bei Kollagen-I-Hydrogelen mit 80, 160- und 240 mg/ml (v.l.n.r.)

3.4.4. Rasterelektronenmikroskopie (REM) zur Visualisierung der Oberflächentopographie

Die Oberfläche des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels stellt sich in den kleinen Vergrößerungen in der REM-Bildgebung unregelmäßig dar. Erst ab einer Vergrößerung von 6160x (*Abbildung 29, D*) imponiert die Oberfläche glatt und homogen. In den sehr großen Vergrößerungen (*Abbildung 29, E, 10769x* und *F, 21538x*) lassen sich einzelne Kollagenfasern darstellen.

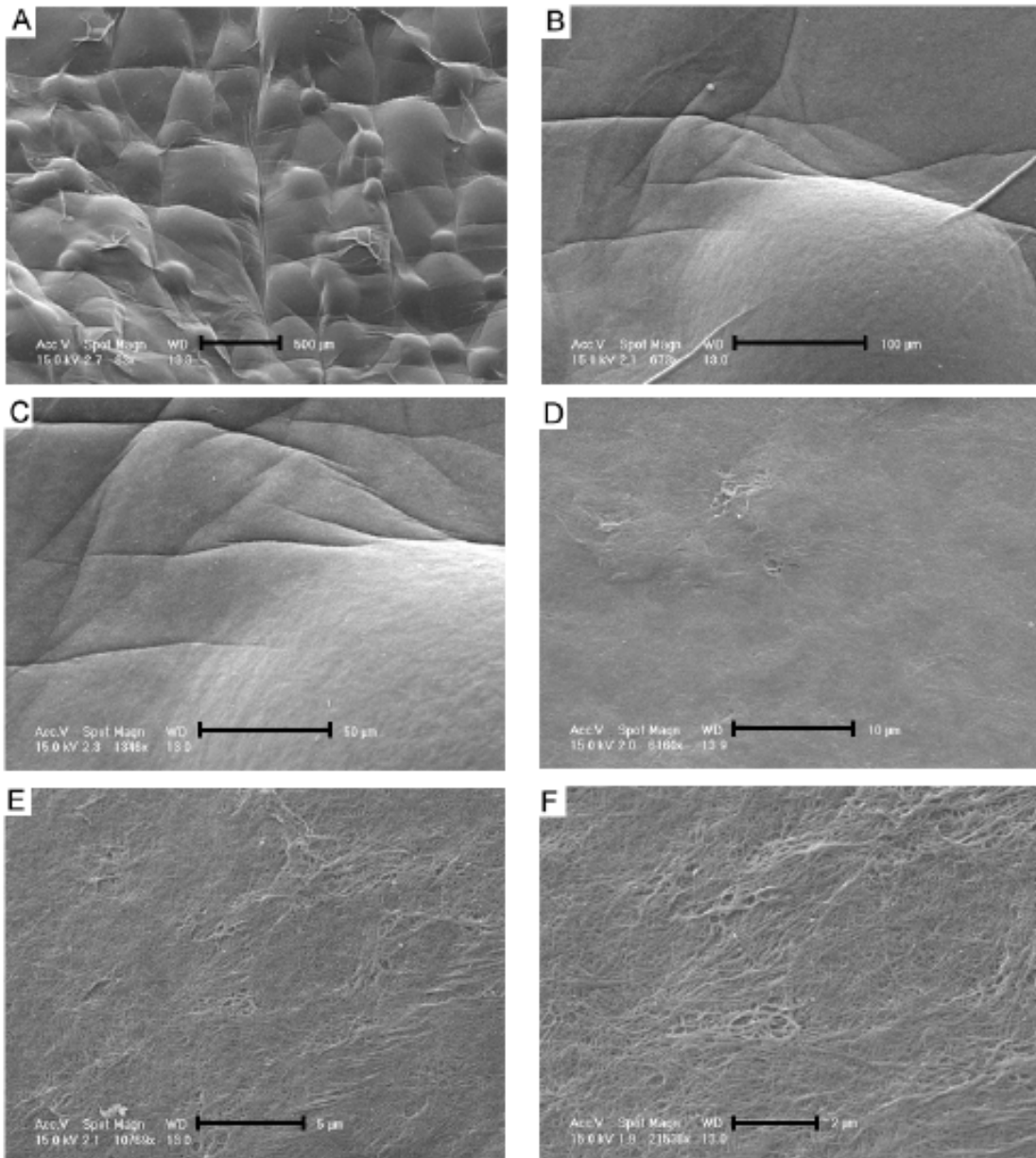


Abbildung 29: REM-Aufnahmen des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels mit 80 mg/ml
(Maßstabsbalken: A=500 µm, B=100 µm, C= 50 µm, D= 10 µm, E= 5 µm, F= 2 µm)

3.5. Immunfluoreszenz (IF) zur Visualisierung glattmuskulärer Marker

Grundsätzlich sind IF-Färbungen auf den kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen möglich. Aufgrund der Struktur der Kollagenmembran gibt es allerdings viel unspezifische Fluoreszenz, die sich nach der Stimulation verstärkt und somit die Bildqualität maßgeblich beeinflusst. Die glattmuskulären Marker ACTA II und Transgelin lassen sich bereits auf uninduzierten MSC von verschiedenen Patienten und Passagen nachweisen (n=3). Der Nachweis von Desmin war bei keiner Probe möglich. Auch aus Ermangelung einer adäquaten Positiv-Kontrolle in der Zellkultur, wird die PCR als quantitative Methode zum Nachweis glattmuskulärer Marker ausgewählt. Ein Beispiel für eine IF-Färbung mit ACTA II zeigt *Abbildung 30*.

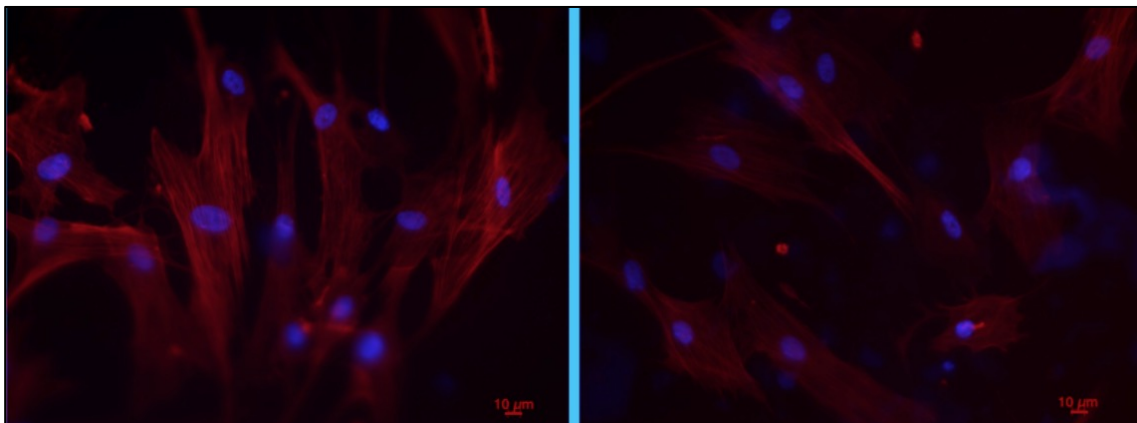


Abbildung 30: Beispiel einer IF-Färbung (ACTA II) von unstimulierten (links) bzw. stimulierten (rechts, nach 5% Substratlongation für 1 Stunde) hbmMSC auf kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen, Maßstabsbalken: 10 μm

3.6. Patientencharakteristika

| laufende Patienten Nr. | Alter | Geschlecht | Passage |
|------------------------|-------|------------|---------|
| 23 | 61 | m | IV |
| 24 | 68 | w | II, IV |
| 25 | 62 | w | II |
| 26 | 65 | w | III, IV |
| 27 | 67 | m | II, V |
| 28 | 78 | m | III, IV |
| 29 | 71 | w | II, IV |
| 31 | 81 | m | II |

Tabelle 13: Patientencharakteristika

Im Patientenkollektiv der o.g. 8 Patienten werden insgesamt dreizehn Passagen untersucht. Hierbei werden die Passagen II-V getestet: Passage II wird fünf Mal, Passage III zwei Mal, Passage IV fünf Mal und Passage V wurde ein Mal untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei 69,13 (61-81) Jahren. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Probanden ist 1:1.

3.7. Einfluss von uniaxialem Stretch auf die Proliferation von hbmMSC

Zunächst wird die absolute Zellzahl auf der Kontrollmembran an Tag 4 und 5 sowie die biomechanisch stimulierte Membran mit 2,5 und 5 %-Substratelongation untersucht. Hier zeigt sich nach vier Tagen Adhärenz im Mittelwert eine absolute Zellzahl von $4785 \pm 3183 / 0,50 \text{ cm}^2$ sowie nach fünf Tagen 4483 ± 2961 Zellen/ $0,50 \text{ cm}^2$. Nach biomechanischer Simulation von 2,5 % an Tag 4 liegt die Zellzahl bei $3516 \pm 1614 / 0,50 \text{ cm}^2$, mit 5 %-Substratelongation ist diese bei $4389 \pm 1882 / 0,50 \text{ cm}^2$. An Tag 5 kann bei Stimulation mit 2,5 % eine Zellzahl von $3757 \pm 1994 / 0,50 \text{ cm}^2$ registriert werden, bei 5 % Stimulation eine Zellzahl von $4687 \pm 2012 / 0,50 \text{ cm}^2$ (Abbildung 31). Insgesamt unterliegen die Zellzahlen sehr großen Schwankungen. Eine Korrelation der Proliferationsfähigkeit zwischen den unterschiedlichen

Passagen, männlichen und weiblichen Spendern oder dem Alter der Spender lässt sich nicht ermitteln.

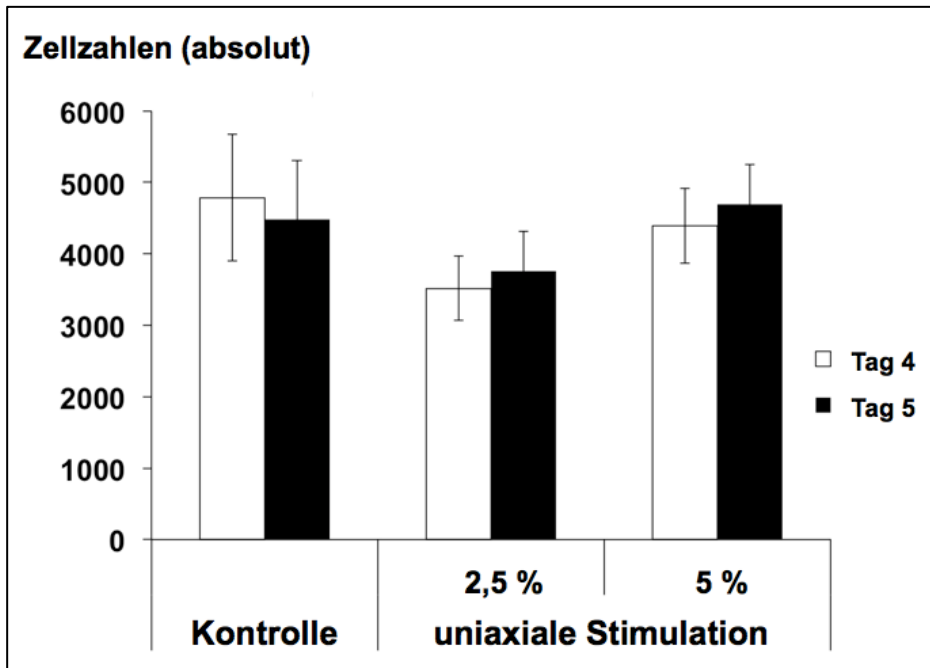


Abbildung 31: Vergleich der absoluten Zellzahlen zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC

3.8. Einfluss von uniaxialen Stretch auf die Formfaktoren von hbmMSC

3.8.1. Circularity/Shape Factor

Bereits in der statischen Kultur zeigt sich zwischen Tag 4 und 5 eine zunehmende Abkuglung der Zellen, die durch die Stimulation erhöht wird. Hierbei fällt auf, dass der Effekt bei 2,5 % Substratelongation an Tag 5 größer ist als bei 5 %. An Tag 4 ist der Abkuglungseffekt für beide Substratelongationen nahezu identisch.

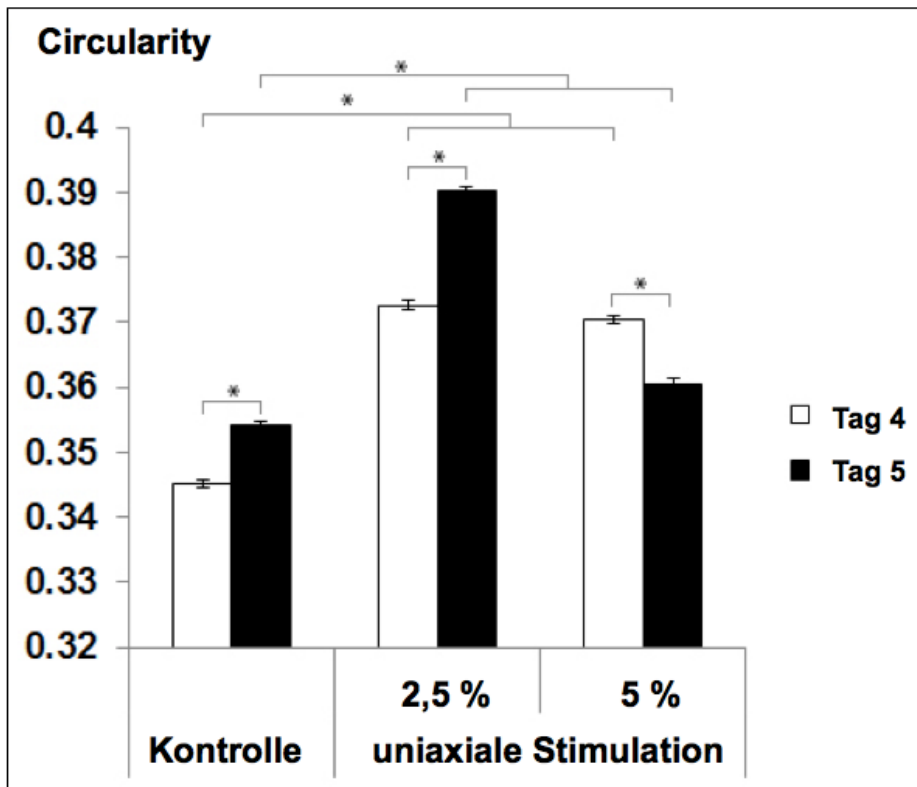


Abbildung 32: Veränderung der Circularity zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC

3.8.2. Roundness

Auch die Roundness lässt sich durch biomechanische Stimulation erhöhen. Die Roundness der Kontrolle nimmt zwischen Tag 4 und Tag 5 zu, wohingegen die Roundness der stimulierten Proben bei 2,5 und 5 % Substratelongation zwischen Tag 4 und Tag 5 abnimmt.

Im Vergleich zu Versuchen mit beschichteten Silikon-Membranen ist die Roundness auf den Kollagen-Membranen signifikant kleiner ($p < 0,001$) (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

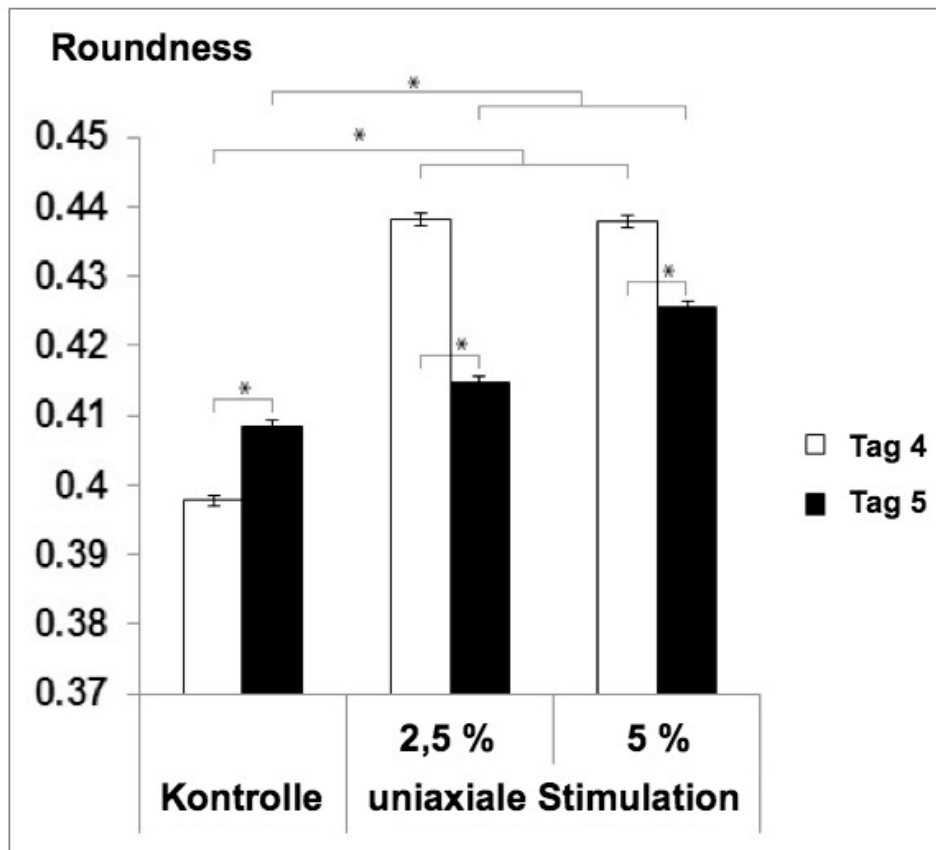


Abbildung 33: Veränderung der Roundness zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC

3.8.3. Aspect Ratio

Die Aspect Ratio nimmt durch die biomechanische Stimulation ab und verhält sich somit invers zu Roundness und Circularity, an Tag 4 allerdings deutlicher als an Tag 5.

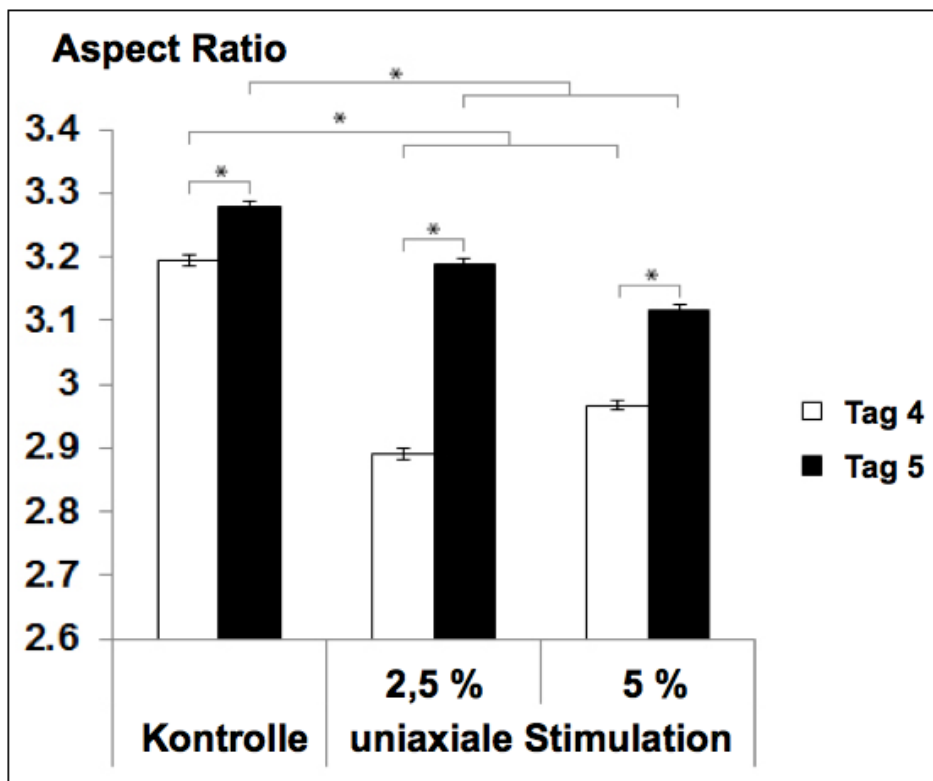


Abbildung 34: Veränderung der Apect Ratio zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC

Die Solidity nimmt zwischen Tag 4 und Tag 5 bei den Kontrollen zu. Die Solidity wird an Tag 4 bei beiden Substratelongationen größer. An Tag 5 fällt die Solidity bei 5 % Substratelongation unter den Wert der Kontrollen und unter den Wert von Tag 4.

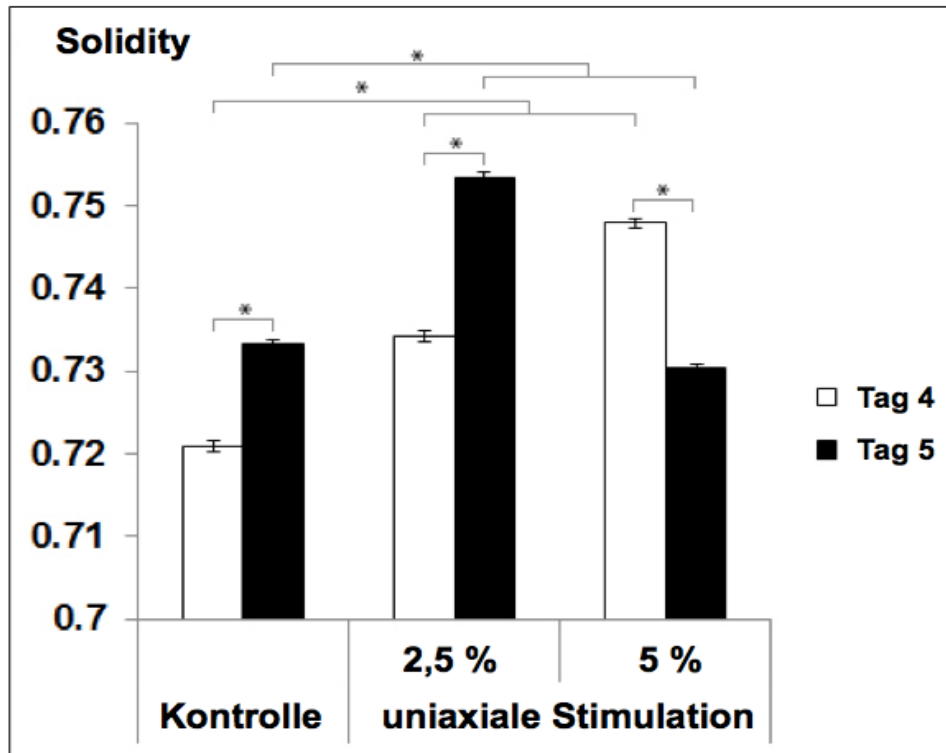


Abbildung 35: Veränderung der Solidity zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC

Es lässt sich somit zeigen, dass unter Stress alle vier oben beschriebenen Formfaktoren beeinflusst werden. Bereits nach einer Stunde sind die Zellen unter Stimulation runder und weniger ausgebreitet sowie kompakter.

3.9. Veränderung der Expression glattmuskulärer Marker bei uniaxialer biomechanischer Stimulation von hbmMSC

3.9.1. ACTA II-Expression

Die ACTA II-Expression steigt bei beiden Simulationsmodi und an beiden Tagen im Vergleich zu den statischen Kontrollen an. Insbesondere lässt sich an Tag 5 unter 5 %-Stretch, im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen ein statistisch signifikanten Anstieg nachweisen ($p < 0,05$, $1,49 \pm 0,14$ -fach).

Vergleicht man die ACTA II-Expression an Tag 5 und 5 %-Substratelongation, mit der Positiv-Kontrolle der glatten Harnblasenmuskulatur, so erreicht diese 41 % der ACTA II-Expression.

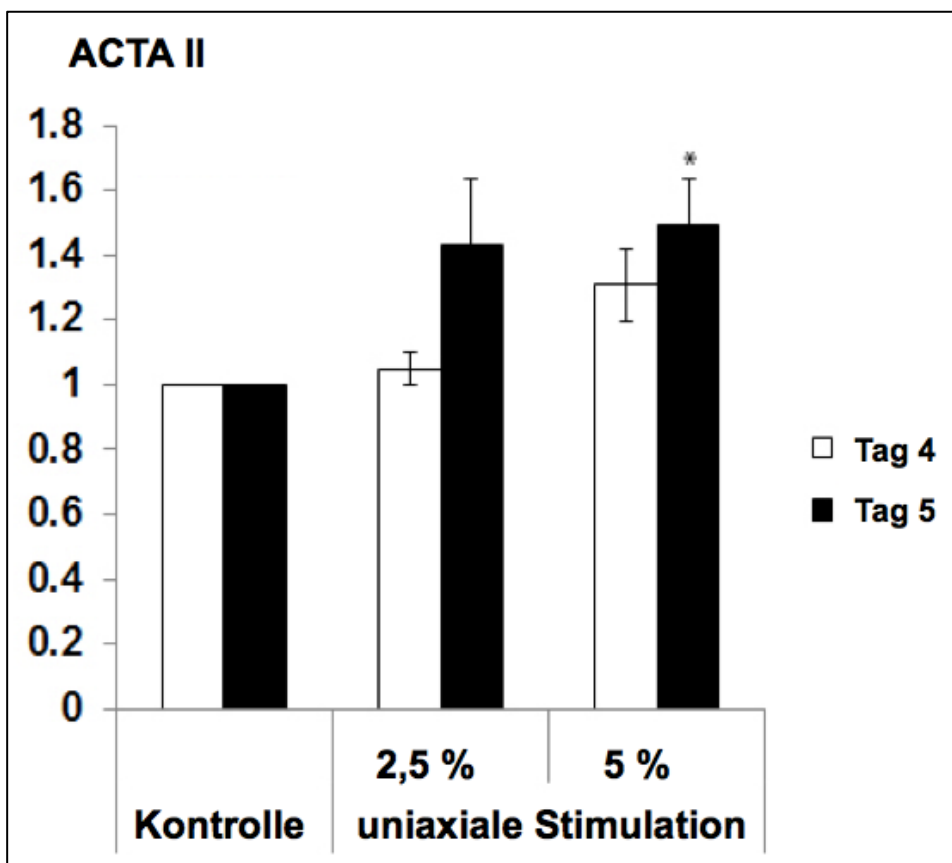


Abbildung 36: Veränderung der relativen mRNA-Expression von ACTA II zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC

3.9.2. TAGLN-Expression

Die Transgelin-Expression nimmt an Tag 4 und 5 unter 2,5 % und 5 %-Stretch zu ($p < 0,05$, $1,22 \pm 0,11$ -fach bzw. $1,71 \pm 0,14$ -fach). An Tag 5 stärker als an Tag 4 und bei 5 % stärker als bei 2,5 %.

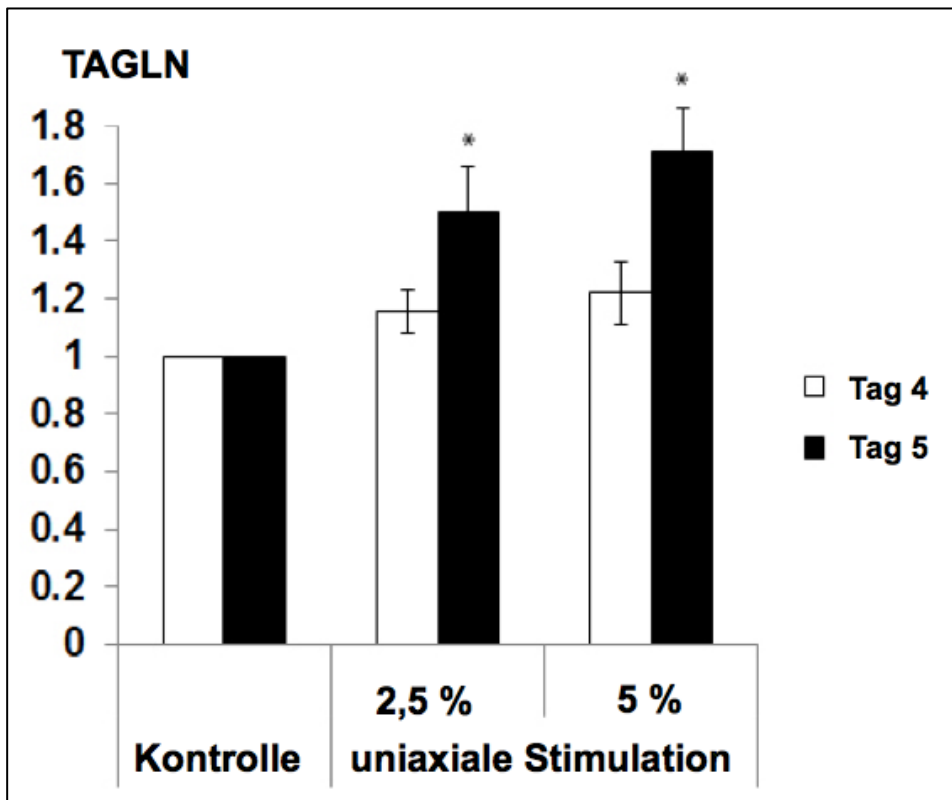


Abbildung 37: Veränderung der relativen mRNA-Expression von TAGLN zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC

3.9.3. CNN1-Expression

Ein signifikanter Anstieg der CNN1-Expression lässt sich an Tag 4 unter 5 %-Stretch nachweisen ($p < 0,05$, $1,93 \pm 0,45$ -fach). Allerdings ist dieser Anstieg nur transient. An Tag 5 sinkt die CNN1-Expression im Vergleich zu Tag 4 ab, bleibt allerdings über dem Wert der Kontrollen.

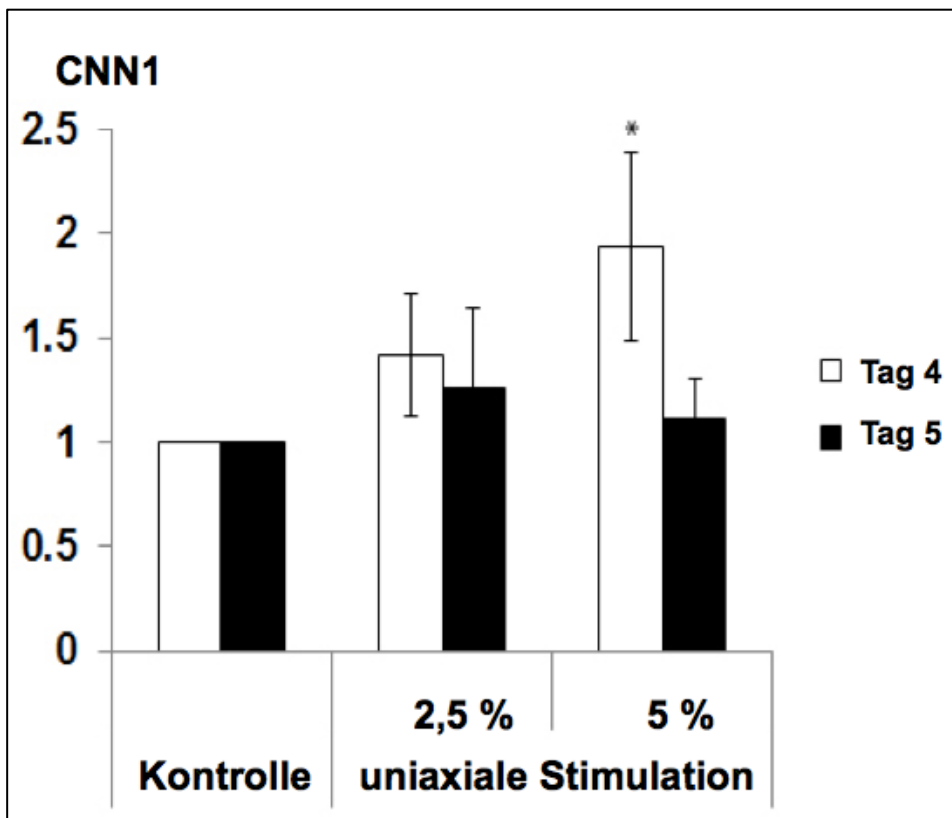


Abbildung 38: Veränderung der relativen mRNA-Expression von CNN1 zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC

4. Diskussion

In der Muskelzell-Nische beeinflussen verschiedene Faktoren Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Stromazelle. Nicht nur Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte, sondern auch biochemische (z.B. Wachstumsfaktoren) und physikalische Signale (z.B. mechanischer Stress, Steifigkeit oder Micropattern) verändern das Verhalten in pro-proliferative oder pro-myogene Richtung (Nava et al., 2012).

Ziel der Arbeit ist es, undifferenzierte Knochenmarksstromazellen durch uniaxialen Stretch in Richtung glattnuskuläre Zellen vom kontraktilen Subtyp zu induzieren. Den Ausgangspunkt für den theoretischen Überbau dieser Arbeit illustriert *Abbildung 39*, die die Schlüsselfaktoren der Myogenese zeigt.

Neben den drei zu untersuchenden Ansätzen, die die unterschiedlichen Foci in TPI der KFO273 bearbeiten (Focus I: Optimalisierung der Differenzierung durch Wachstumsfaktoren, Focus II: Optimalisierung der Differenzierung durch Beschichtungen, Focus III: Optimalisierung der Differenzierung durch biomechanische Stimulation), wurde bei der eingehenden Literaturrecherche rasch klar, dass viele weitere Faktoren im Stretch-Modell zu berücksichtigen sind.

Nach der Diskussion der Hauptergebnisse sollen so weitere wichtige Punkte, wie die Mikrogeometrie (2D vs. 3D), die Plating-Dichte/Zell-Zell-Kontakte, die Substrat-Steifigkeit (inside-out-Stress) und die Zellquelle diskutiert werden. Einige dieser Teilbereiche werden auch in Vorversuchen der Arbeit beleuchtet.

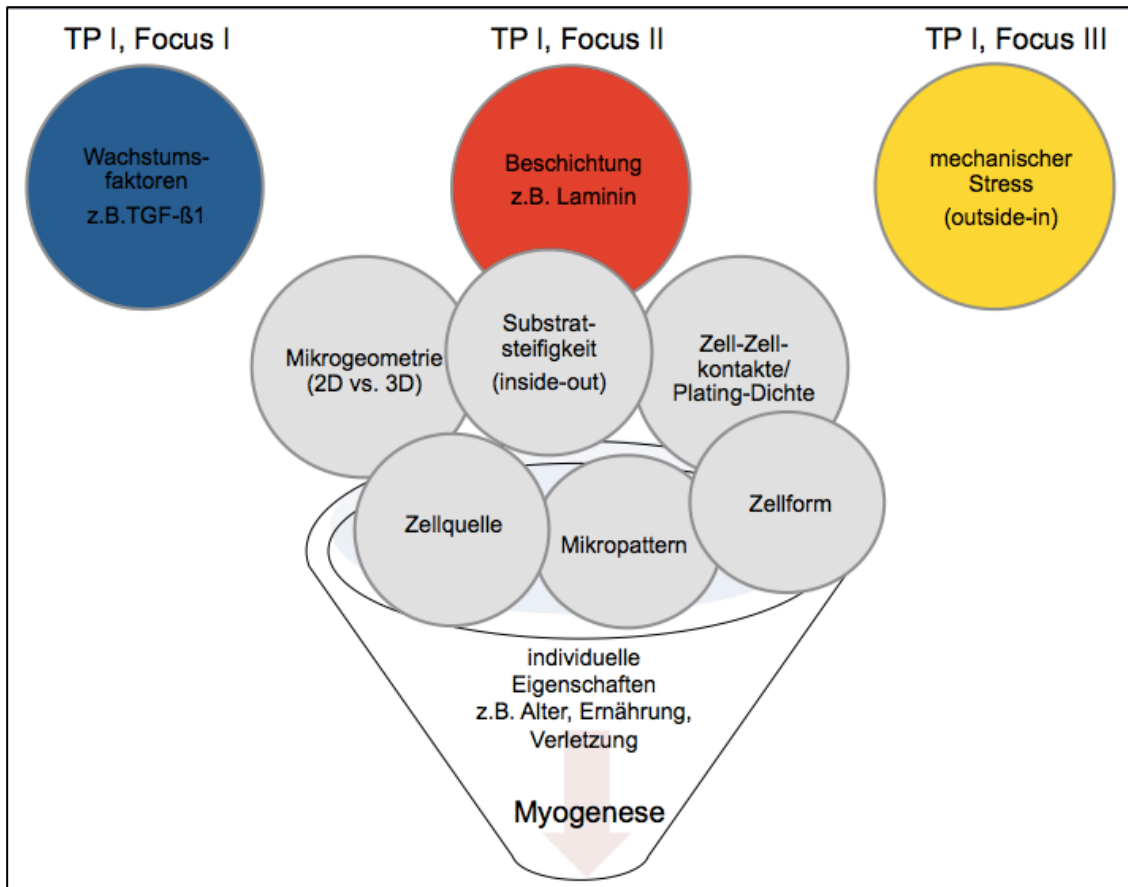


Abbildung 39: Schlüsselfaktoren der Myogenese

Proliferationspotential von hbmMSC auf kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen in statischer und dynamischer Kultur: Humane Knochenmarksstromazellen haben ein sehr großes Proliferationspotential, insbesondere in den ersten Passagen in Kultur (Phinney et al., 1999). Die Proliferationsfähigkeit ist sehr individuell und von verschiedenen Faktoren wie Alter, Geschlecht, dem gewählten Knochen oder dem Zeitpunkt der Isolation abhängig.

In der vorgestellten Versuchsreihe lässt sich sowohl das große Proliferationspotential, als auch die extremen individuellen Schwankungen von Patient zu Patient bzw. Passage zu Passage nachvollziehen. Während einige Passagen nur 1-2 Tage bis zur angestrebten Konfluenz von 80 % wachsen, dauert es bei anderen Passagen oft doppelt so lang. So ist die Streubreite der Zellzahlen auf dem kompaktierten Kollagen-I-Hydrogel nach 4 bzw. 5 Tagen sehr groß.

Ein Grund hierfür kann der extrem hohe Kollagengehalt des Gels sein. Übliche Kollagenbeschichtungskonzentrationen liegen zwischen 0,1 μ l/ml - 3 mg/ml, in

Gelen zwischen 3,5-4 mg/ml (Tondon and Kaunas, 2014). Natürlicherweise findet sich in der extrazellulären Matrix ein Kollagen I-Gehalt von 30-40 mg/ml (Miller and Rhodes, 1982). Das heißt, dass der Kollagengehalt des Hydrogels doppelt so hoch wie *in vivo* ist.

Kollagen I unterstützt den synthetischen Phänotyp glatter Muskulatur (Hedin et al., 1988), hemmt die Proliferation von MSC, bedeutet Fibrose und führt damit zur Dysregulation der Stammzelle (De Lisio et al., 2014), (Antoon et al., 2012). Da die Ergebnisse der Zellzahlen, weder in statisch noch dynamisch statistisch signifikant sind, lassen sich keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen uniaxialer Stimulation und Proliferationsfähigkeit ziehen.

In der statischen Kultur zeigt sich jedoch, dass die Proliferationsfähigkeit von hbmMSC auf den kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen, insbesondere im Vergleich zur Zellkultur auf Plastik, herabgesetzt ist. Diese Ergebnisse passen sehr gut in den Kontext der Literatur: MSC auf weichen Substraten proliferieren weniger (McDaniel et al., 2007), (Park et al., 2011), uniaxialer Stretch stimuliert die Proliferation von MSC nur passager, bis zur Neuausrichtung der Zellen perpendicular zur Stressrichtung (Kurpinski et al., 2006a/b).

Veränderung der Formfaktoren von hbmMSC auf kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen in statischer und dynamischer Kultur: Bereits in der statischen Kultur zeigt sich nach Tag 4 bzw. 5 ein deutliches Abkugeln der Zellen, was sich in einer größeren Circularity und Roundness widerspiegelt. Logischerweise verhält sich die Aspect Ratio dementsprechend invers. Dieser Abkuglungseffekt wird durch die mechanische Stimulation nochmals verstärkt. In anderen Stretch-Experimenten wurde hingegen beschrieben, dass sich die Zellen durch die Stimulation strecken, also, entsprechend der Formfaktoren die Circularity, Roundness und Solidity kleiner und Aspect ratio größer wird. Da sich der Abkuglungseffekt aber bereits deutlich in der statischen Kultur zeigt, lässt sich dieser nicht allein durch die biomechanische Stimulation erklären, sondern ist sicherlich auch eine Substratfunktion. Bezieht man sich auf die Ergebnisse der Nano-Steifigkeitsmessung des AFM, nimmt die MSC eine Oberfläche mit einer Steifigkeit von 10,2 kPa wahr. Die Steifigkeit des

kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels bewegt sich im optimalen Bereich von Muskulatur (Engler et al., 2004), (Discher et al., 2005). Wie vorbeschrieben, breiten sich MSC auf vergleichsweise weichen Untergründen nicht so stark aus (Quinlan et al., 2011). Hinzukommt der Zeitpunkt der Auswertung der MSC-Morphologie: Dynamische Untersuchungen der Wirkung von Stretch auf Einzelzellniveau wie z.B. durch Greiner et al. konnten zeigen, dass die perpendiculare Neuausrichtung von MSC innerhalb der ersten zwei Stunden nach Applikation von Stress stattfindet (Greiner et al., 2013). Im hier gezeigten Versuch wird jedoch nur für eine Stunde stimuliert, so dass sich bei der Zellmorphologie die Frage stellt, welcher Stimulus für die MSC zum Zeitpunkt der Auswertung führend ist outside-in oder inside-out Stress. Klar ist, dass die Zellform aus der Summation aller wirkenden Kräfte resultiert (Sun et al., 2012). Eine denkbare Hypothese wäre, dass sich die Zelle wie folgt verhält: In der statischen Kultur ist das Substrat ausschlaggebend für die Zellform. Zum Zeitpunkt der Streckung wird die Zelle ebenfalls gestreckt, der outside-in-Stress ist führend für die Zellmorphologie. Nach Beendigung des Stresses geht die Zelle wieder in ihre Ausgangsform zurück, das Substrat bestimmt wieder die Zellform. In der beschriebenen Versuchreihe kann die MSC-Morphologie unter Stretch nicht monitoriert werden. Es ist also offen, welche Zellform die MSC zum Zeitpunkt der Streckung aufweisen.

Veränderung der glattemuskulären Marker von hbmMSC auf kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen in statischer und dynamischer Kultur: Für alle drei untersuchten Marker ACTA 2, Transgelin und Calponin 1 lässt sich eine Zunahme der Expression durch die biomechanische Stimulation nachweisen. Mit Ausnahme von CNN 1, ist diese an Tag 5 und bei 5 % Substratelongation am größten. Da sich statische und dynamische Kultur weder im verwendeten Medium noch im besiedelten Substrat unterscheiden, sondern allein die mechanische Stimulation den Unterschied macht, lässt sich schlussfolgern, dass sich bereits durch die Stimulation von 1/24 bzw. 2/48 Stunden ein frühmyogenes Markerprofil induzieren lässt. Auch scheint die Induktion des Markerprofils vom Grad der Streckung, hier in %-Substratelongation, abhängig.

Das veränderte Makerprofil lässt sich bereits unmittelbar nach der applizierten mechanischen Stimulation detektieren.

Viele andere Versuchsprotokolle beschreiben hintereinander geschaltete Phasen mit dem Ziel der Proliferation oder Differenzierung (Gong and Niklason, 2008), (Tian et al., 2010). Um eine Zellvermehrung und Zellspezialisierung zu erzielen, werden so z.B. spezifische Zusätze in ein Differenzierungsmedium gegeben oder auf Phasen von biomechanischer Stimulation, folgen Phasen ohne Stimulation. Die hier gezeigten Ergebnisse legen dieses sequentielle Vorgehen nahe, da ein gleichzeitiges Mehr an Zellzahl und Spezialisierung nicht möglich zu sein scheint.

weitere zu diskutierende Einflussfaktoren

Plating-Dichte: Als Plating-Dichte für ein optimales Wachstum wurde bei MSC 200 Zellen/cm² beschrieben (Neuhuber et al., 2008). In den Vorversuchen wurde die Zellzahl variiert bis a) ausreichend Material für die PCR zur Verfügung stand und b) die angestrebte Konfluenz von 80 % auch an Tag 4 und 5 nicht überschritten wird, damit die Auswertung mittels IF möglich ist. Grundsätzliches Ziel ist es, die Plating-Dichte möglichst niedrig zu halten, da es Hinweise gibt, dass direkter Zell-Zell-Kontakt das adipogene und osteogene Differenzierungspotential steigert (Gao et al., 2010), (Tang et al., 2010). Andere Arbeiten konnten zeigen, dass zwar das Wachstum bei höherer Zelldichte eingeschränkt ist, aber die Multipotenz der Zellen nicht verloren geht (Neuhuber et al., 2008). Mit der hier gewählten Platingdichte von initial 5000 Zellen/cm², wurde so bewusst ein Mittelweg gewählt. Auch nach 4 bzw. 5 Tagen auf den kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen, bestehen nur sehr wenig direkte Zell-Zell-Kontakte, so dass Wachstum und Multipotenz nicht kompromittiert werden. Alle Stimulationsversuche werden mit der gleichen Plating-Dichte durchgeführt, so dass eine Aussage zur Plating-Dichte im Bezug auf Proliferation und Differenzierung von hbmMSC in statischer oder dynamischer Kultur nicht gemacht werden können.

Mikrogeometrie: Das kompaktierte Kollagen-I-Hydrogel ist eine 2D-Membran. Allein durch die Veränderung der Mikrogeometrie reagieren MSC unterschiedlich auf applizierten Stress. Während sich MSC auf 2D-Membranen, wie oben bereits beschrieben, perpendicular zur Stressrichtung ausrichten (Kurpinski et al., 2010), (Jang et al., 2011), geschieht dies in 3D-Matrices nicht (Zheng et al., 2012). Ein vergleichbares 3D-Modell mit eingebetteten MSC in einem kompaktierten Kollagen-I-Hydrogel, das ebenfalls stretchbar ist, ist derzeit nicht verfügbar. Über den Einfluss der Mikrogeometrie im Bezug auf Proliferation und Differenzierung von hbmMSC in statischer oder dynamischer Kultur kann somit keine Aussage gemacht werden.

Wachstumsfaktoren: Ein häufig zur myogenen Differenzierung genutzter Wachstumsfaktor ist TGF- β 1 (Galmiche et al., 1993), (Kinner et al., 2002), (Narita et al., 2008), (Kurpinski et al., 2010). Neben der myogenen Differenzierung, spielt er allerdings auch in der Chondrogenese eine wichtige Rolle (Gao et al., 2010). Park et al. zeigte, dass die Wirkung des TGF- β 1 von der gewählten Substratsteifigkeit abhängig ist (Park et al., 2011).

TGF- β 1 ist ein natürlicher Bestandteil des Extrazellarraums (Sun et al., 2012) und ein Bestandteil von FCS (Oida and Weiner, 2010), (Gong and Niklason, 2008). Bei einem Medium mit 10 % FCS lässt sich approximieren, dass es 1000-2000 pg/ml TGF- β 1 enthält. Außerdem sind neben TGF- β 1 in FCS bis zu 1000 weitere Inhaltsstoffe wie z.B. das antiinflammatorische Dexamethason nachgewiesen.

Mit der Verwendung von FCS im Kulturmedium finden sich eine ganze Reihe an Faktoren in nicht-bestimmter Menge, die sich auf die myogene Differenzierung von MSC auswirken können. Nicht zuletzt deshalb, sondern auch weil FCS als Mediumbestandteil bei humaner Applikation nicht zugelassen ist, hat unsere (Felka et al., 2009), wie auch anderen Arbeitsgruppen (Castrén et al., 2015) versucht, FCS-freie Ansätze zu entwickeln.

Andere Arbeiten in TP 1 Focus I können zeigen, dass die Hinzugabe von Plättchenlysat im Kulturmedium, wie auch hier verwendet, die Proliferation von hbmMSC, sowie deren Expression von CD 146 steigert (Brun et al., 2016). CD

146 wird als Marker eines osteogenen Subsets von bmMSC diskutiert (Aicher et al., 2011), so dass die Verwendung von dem hier verwendeten Plättchenlysat eventuell auch inverse Effekte für auf die myogene Differenzierung von hbmMSC haben kann. Des Weiteren wird für die Kombination von Wachstumsfaktoren und mechanischer Stimulation ein synergistischer Effekt beschrieben (Stegemann and Nerem, 2003), (Riha et al., 2007), insbesondere für TGF- β 1 (Narita et al., 2008), (Kurpinski et al., 2009), (Wang et al., 2010b), (Khani et al., 2015). Letztlich lässt sich festhalten, dass im vorliegenden Stretchmodell Wachstumsfaktoren zwar nicht direkt supplementiert werden aber durch die Wahl des Mediums sich durchaus Einflussfaktoren auf die MSC-Differenzierung identifizieren lassen.

Substratsteifigkeit (inside-out): Park et al. können zeigen, dass hbmMSC auf festeren Substraten eine höhere Expression der glattmuskulären Marker ACTA II und CNN1 haben.

Die vorliegende Arbeit unterstützt frühere Daten, die zeigen, dass MSC bereits feine Unterschiede in der Steifigkeit ihres Substrats wahrnehmen können (Engler et al., 2004), die sich auch morphologisch zeigen (Engler et al., 2006). Je fester der Untergrund ist, desto mehr breiten sich die Zellen aus (Rowlands et al., 2008). Aber auch die Proliferationsrate von MSC ist höher, je größer die Steifigkeit des Substrates ist (McDaniel et al., 2007), (Park et al., 2011).

Wie die AFM-Messungen zeigen, bietet das kompaktierte Kollagen-I-Hydrogel einen optimierten Steifigkeitsbereich für die Myogenese. In wieweit sich die Steifigkeit allerdings durch die mechanische Stimulation verändert, wird in der vorliegenden Versuchsreihe nicht untersucht. Nur die Untersuchung der Dehnungssteifigkeit mit dem Bose ElectroForce 5210 zeigen eine veränderte Steifigkeit des unbesiedelten Substrats vor und nach der Stimulation. Inwieweit die hbmMSC das Substrat während der Besiedelungs- oder Stimulationsphase modifizieren ist ebenfalls nicht untersucht. Dass dies aber wahrscheinlich passiert, legen Veröffentlichungen nahe, die zeigen, dass Zellen ihre Matrix selbst modifizieren (Lozito et al., 2009), dass biomechanische Stimulation die Kollagen-I-Synthese anregt (Park et al., 2004, Nieponice et al., 2007, Zhang et

al., 2008) und die Ultrastruktur von Kollagen verändern kann (Vader et al., 2009). Auch stellt sich die Frage wie die unterschiedlichen Young's-Moduli in AFM- und Dehnungssteifigkeitsmessung zu bewerten sind.

Die Charakterisierung des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels zeigt, dass es sich bei dem gewählten Substrat nicht um ein homogenes Gel handelt, sondern es von Kollagenfasern durchzogen wird. An Stellen wo sich Kollagenfasern finden, wird das Gel härter sein, als an Stellen, wo sich keine Fasern finden. In wieweit diese Lokalisationen bei der AFM-Messung erfasst sind ist unklar. Die Dehnungssteifigkeitsmessungen untersuchen hingegen das ganze Gel und nicht den Teil, die die Zellen als Substratsteifigkeit im „Nanobereich“ wahrnehmen. Die Versuche dokumentieren, dass die Proliferationsfähigkeit durch die gewählte Substratsteifigkeit herabgesetzt, die früh-intermediären Marker allerdings in der statischen wie dynamischen Kultur hochreguliert werden. Somit unterstützt das kompaktierte Kollagen-I-Hydrogel den gewünschten Differenzierungseffekt und wirkt additiv zum applizierten uniaxialen Stress.

Matrix: MSC werden in ihrem Verhalten maßgeblich durch ihre Matrix beeinflusst (Salasnyk et al., 2004), (Hashimoto et al., 2006) und verändern diese selbst (Lozito et al., 2009).

Grundidee des Kollagen-I-Hydrogels ist eine Kontrollmatrix zu haben, da sich das verwendete Gel durch seine hohe Kollagen-Konzentration nicht positiv auf die myogene Differenzierung auswirkt, sondern vielmehr die osteogene Differenzierung von MSC unterstützt (Mizuno et al., 2000), (Huang et al., 2009). In den REM-Aufnahmen lässt sich zeigen, dass es sich beim verwendeten kompaktierten Kollagen-I-Hydrogel um ein Substrat mit sehr feinen Fibrillen handelt. Damit sollte, im Kontext der Literatur, die Proliferation deaktiviert (Elliott et al., 2003) und die Differenzierung vorangetrieben werden. Die Zellzahlen und PCR-Ergebnisse legen diesen Effekt des gewählten Substrats nahe.

Weiterführende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass ACTA 11, TAGLN und CCN1 auf den kompaktierten Hydrogelen signifikant höher exprimiert werden als auf Plastik. Interessanter Weise erreichte die

Expressionshöhe die, der zum Vergleich herangezogenen glatten Muskelzellen aus Detrusorbiopsien. Verglichen mit anderen, auch in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Substraten, insbesondere beschichteten Silikonmembranen (z.B. mit Laminin 511, Fibronectin oder Kollagen I), zeigt sich, dass das gewählte Kollagen-I-Hydrogel im Vergleich zu den anderen Matrices recht hohe Zellzahlen generiert (Daten bisher nicht veröffentlicht), sich also der hohe Kollagengehalt nicht unbedingt negativ auf die Proliferationsrate auswirkt.

Zellquelle: In der Versuchsreihe findet keine Aufreinigung oder Cell-Sorting, sondern eine Zellselektion durch das Adhärenzverhalten von MSC an Plastik statt. Somit sind besonders in der Primärkultur viele andere Zelltypen vorhanden, z.B. der hämatopoetischen Reihe, die das Wachstumsverhalten im Sinne einer Cokultur beeinflussen können (Lozito et al., 2009), (Tian et al., 2010).

Betrachtet man des Weiteren das gewählte Patientenkollektiv wird schnell klar, dass die verwendeten bmMSC von durchweg älteren Patienten stammen. Außerdem ist bisher nicht beschrieben, wie sich die Multipotenz und Proliferation der MSC bei Patienten mit vorbeschriebener Arthrose verändert. Hinzu kommt, dass das bereits oben beschriebene, osteogene Potential von bmMSC eine etwaige Selektion dieses Subsets durch das relativ steife Plastik der Zellkulturflaschen erfahren könnte. Allerdings können Arbeiten in Teilprojekt I, Focus I zeigen, dass sich das hier gewählte bmMSC-Kollektiv durch die Induktion in entsprechendem Medium (mit Zusatz von TGF- β 1, Zitronensäure und PDGF-AB) myogen differenzieren lässt (Brun et al., 2015).

Mit dem verwendeten kompaktierten Kollagen-I-Hydrogel wird also apriori ein pro-proliferatives, pro-fibrotisches und pro-synthetisches Substrat gewählt. Durch die optimalisierte Nano-Steifigkeit von 10,2 kPa werden diese Effekte auf bmMSC allerdings niveliert.

Zur Interpretation der Ergebnisse könnte man im verwendeten Stretch-Modell zur folgender Hypothese kommen: Die MSC nimmt die Kollagen-reiche

Umgebung als Wunde wahr. Die zu erwartende Reaktion Proliferation wird durch die Wahrnehmung des relativ weichen Substrats und dem applizierten Stretch in Richtung Differenzierung „umzuprogrammiert“. Durch die Applikation von kurzzeitigem, cyclischem, uniaxialem Stress kann, additiv zu dem bereits erfolgten Signaling durch das promyogene Substrat, signifikant die Genexpression der myogenen Marker ACTA II, TAGLN und CNN1 gesteigert werden, so dass ein intermediäres, myogenes Markerprofil generiert wird.

In der Literatur wird das Induzieren eines intermediär myogenen Markerprofils durch Applikation von uniaxialer mechanischer Stimulation bereits beschrieben (Park et al., 2004), (Ghazanfari et al., 2009), (Kurpinski et al., 2006b), (Kurpinski et al., 2009). Diese Ergebnisse 1:1 nachzuvollziehen, ist aufgrund der unterschiedlichen Einflussfaktoren nicht trivial, steht z.B. nicht der gleiche Bioreaktor oder die gleiche Zellquelle zur Verfügung. Die beschriebenen Ergebnisse zu erzielen wurde erst möglich, nachdem das Substrat angepasst und von den üblichen, beschichteten, sehr steifen Silikonmembranen Abstand genommen wurde. Mit den kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen lassen sich gleichzeitig Stress- und Steifigkeits-induzierte Effekte nutz- und untersuchbar machen. Mit dem integralen Ansatz von optimiertem inside-out und outside-in Stress gelingt der Nachweis eines intermediär myogenen Markerprofils bereits nach einer Stunde uniaxialer Stimulation. Damit ist dieses Protokoll im Literaturvergleich hoch effektiv (Park et al., 2004), (Ghazanfari et al., 2009). Durch das Hinzunehmen der verschiedenen Formfaktoren und damit ein mathematisches Sichtbarmachen von morphologischen Veränderungen wird ein weiterer Baustein in das multifaktorielle Gefüge von Einflüssen in der Muskelzellnische mit einbezogen. Somit könnte man in Zukunft durch Steuerung der MSC-Morphologie über outside-in und inside-out Stress gezielt die myogene Differenzierung von MSC vorantreiben, im Sinne eines „form follows function“.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Versuchsreihe wird der Einfluss von biomechanischer Stimulation auf humane Knochenmarksstromazellen (hbmMSC) in der glattmuskulären Differenzierung untersucht. hbmMSC von Patienten, die sich einer Hüft-Gelenksimplantation unterziehen (n=8) werden in einem Medium aus DMEM, gepooltem Plasma und Plättchenlysate expandiert und in den Passagen 2-5 mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² auf kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen mit einer Konzentration von 80 mg/ml ausgesät. Das Hydrogel wird hierbei nach einer für die myogene Differenzierung optimalisierten Steifigkeit ausgewählt. Nach einer Adhärenzzeit von 4 Tagen wird die Membranen an einem bzw. zwei konsekutiven Tagen für jeweils eine Stunde mit 2,5% bzw. 5% Substratelongation mit dem ElectroForce 5210 uniaxial gestreckt. Wie auf den unstimulierten Kontrollen werden die Zellen bezüglich Zellzahl und Morphologie (Formfaktoren) mittels Image J quantifiziert. Außerdem werden Marker der glattmuskulären Differenzierung (ACTA-2, TGLN, CNN-1) per PCR und Immunfluoreszenz untersucht.

In der PCR zeigt sich unter 5%-Stretch ein signifikanter Anstieg der frühen glattmuskulären Marker α -Actin und Transgelin ($p < 0.05$) an Tag 5 sowie ein transients Anstieg des intermediären Markers Calponin I an Tag 4.

Somit gelingt durch die Kombination von optimiertem outside-in (Steifigkeits-induziert) und inside-out (biomechanisch-induziert) Stress die Induktion eines glatt-muskulären intermediären Markerprofils.

Diese Ergebnisse sind besonders bemerkenswert, da mit dem kompaktierten Kollagen-I-Hydrogel ein pro-osteogenes, pro-fibrotisches und pro-synthetisches Substrat gewählt wurde. So unterstreicht die Versuchsreihe den elementaren Einfluss von mechanischem Stress und dokumentiert, dass bio-mechanische Stimulation das Verhalten von MSC „umprogrammieren“ kann. Somit könnte man in Zukunft durch Steuerung der MSC-Morphologie und den gezeigten Ansatz aus Kombination von outside-in und inside-out Stress, gezielt die myogene Differenzierung von MSC promoten, ohne andere Kofaktoren wie z.B. die Beschichtung oder Wachstumsfaktoren berücksichtigen zu müssen.

6. Literaturverzeichnis

Aicher, W.K., Bühring, H.-J., Hart, M., Rolauffs, B., Badke, A., and Klein, G. (2011). Regeneration of cartilage and bone by defined subsets of mesenchymal stromal cells - Potential and pitfalls. *Adv Drug Deliv Rev.* 63(4-5): 342 – 351.

Alexakis, C., Partridge, T., and Bou-Gharios, G. (2007). Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: a self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am J Physiol Cell Physiol.*;293(2): C661 – C669.

Antoon, R., Yeger, H., Loai, Y., Islam, S., and Farhat, W.A. (2012). Impact of bladder-derived acellular matrix, growth factors, and extracellular matrix constituents on the survival and multipotency of marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.*;100(1): 72 – 83.

Assinder, S.J., Stanton, J.-A.L., and Prasad, P.D. (2009). Transgelin: An actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol.*;41(3): 482 – 486.

Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *Stem Cells.*;25(6): 1384 – 1392.

Beamish, J.A., He, P., Kottke-Marchant, K., and Marchant, R.E. (2010). Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.*;16(5): 467 – 491.

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 4(2).

Bergmann, W. (2013). *Werkstofftechnik 1: Struktureller Aufbau von Werkstoffen - Metallische Werkstoffe - Polymerwerkstoffe - Nichtmetallisch - anorganische Werkstoffe, 7., neu-bearbeitete Auflage, Seite 95-97, Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, München.*

Brun, J., Lutz, K.A., Neumayer, K.M.H., Klein, G., Seeger, T., Uynuk-Ool, T., Wörgötter, K., Schmid, S., Kraushaar, U., Guenther, E., et al. (2015). Smooth Muscle-Like Cells Generated from Human Mesenchymal Stromal Cells Display Marker Gene Expression and Electrophysiological Competence Comparable to Bladder Smooth Muscle Cells. *PLoS One.*;10(12):e0145153

Brun, J., Abruzzese, T., Rolauffs, B., Aicher, W.K., and Hart, M.L. (2016). Choice of xenogenic-free expansion media significantly influences the myogenic differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.*;18(3): 344 – 359.

Bühring, H.-J., Treml, S., Cerabona, F., De Zwart, P., Kanz, L., and Sobiesiak, M. (2009). Phenotypic Characterization of Distinct Human Bone Marrow-Derived MSC Subsets. *Ann N Y Acad Sci.*;1176: 124 – 134.

Büttner, R., and Thomas, C. (2003). *Allgemeine Pathologie / Spezielle Pathologie / Histopathologie. Set / Allgemeine Pathologie*, 3. erweiterte Auflage, Seiten 164-167, Schattauer Verlag, Stuttgart.

Cao, C., Dong, Y., and Dong, Y. (2005). Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 19(8), 642 – 647.

Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*;9(5): 641 – 650.

Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.*;213(2): 341 – 347.

Cappella, B., and Dietler, G. (1999). Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports* 34, 1 – 104.

Castrén, E., Sillat T., Oja, S., Noro, A., Laitinen, A., Konttinen, Y. T., Lehenkari, P., Hukkanen, M., Korhonen, M (2015). Osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in two-dimensional and three-dimensional cultures without animal serum. *Stem Cell Res Ther.*;6:167.

Chamley-Campbell, J., Campbell, G.R., and Ross, R. (1979). The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59, 1 – 61.

De Lisio, M., Jensen, T., Sukiennik, R.A., Huntsman, H.D., and Boppart, M.D. (2014). Substrate and strain alter the muscle-derived mesenchymal stem cell secretome to promote myogenesis. *Stem Cell Res Ther.*;5(3): 74.

Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino, M., Takeda, S., Ide, C., and Nabeshima, Y. (2005). Bone Marrow Stromal Cells Generate Muscle Cells and Repair Muscle Degeneration. *Science.*;309(5732): 314 – 317.

Discher, D.E., Janmey, P., and Wang, Y. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science.*;310(5751): 1139 – 1143.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*;8(4): 315 – 317.

Elliott, J.T., Tona, A., Woodward, J.T., Jones, P.L., and Plant, A.L. (2003). Thin films of collagen affect smooth muscle cell morphology. *Langmuir* 19(5): 1506 – 1514.

Elsdale, T., and Bard, J. (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol.*;54(3): 626 – 637.

Engler, A.J., Griffin, M.A., Sen, S., Bönnemann, C.G., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2004). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol.*;166(6): 877 – 887.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell.*;126(4): 677 – 689.

Felka, T., Schäfer, R., Schewe, B., Benz, K., and Aicher, W.K. (2009). Hypoxia reduces the inhibitory effect of IL-1 β on chondrogenic differentiation of FCS-free expanded MSC. *Osteoarthritis Cartilage.*;17(10): 1368 – 1376.

Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.*;6(2): 230 – 247.

Friedl, G., Schmidt, H., Rehak, I., Kostner, G., Schauenstein, K., and Windhager, R. (2007). Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.*;15(11): 1293 – 1300.

Galmiche, M.C., Koteliansky, V.E., Briere, J., Herve, P., and Charbord, P. (1993). Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 82, 66 – 76.

Gao, L., McBeath, R., and Chen, C.S. (2010). Stem Cell Shape Regulates a Chondrogenic Versus Myogenic Fate Through Rac1 and N-Cadherin. *Stem Cells.*; 28(3): 564 – 572.

Ge, W., Ren, C., Duan, X., Geng, D., Zhang, C., Liu, X., Chen, H., Wan, M., and Geng, R. (2014). Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neural Stem Cells Using Cerebrospinal Fluid. *Cell Biochem Biophys.* 71(1): 449 – 55

Ghazanfari, S., Tafazzoli-Shadpour, M., and Shokrgozar, M.A. (2009). Effects of cyclic stretch on proliferation of mesenchymal stem cells and their differentiation to smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 23;388(3): 601 – 605.

Gillies, A.R., and Lieber, R.L. (2011). Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. *Muscle Nerve.*;44(3): 318 – 331.

Gong, Z., and Niklason, L.E. (2008). Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASEB J*;22(6): 1635 – 1648.

Greiner, A.M., Chen, H., Spatz, J.P., and Kemkemer, R. (2013). Cyclic Tensile Strain Controls Cell Shape and Directs Actin Stress Fiber Formation and Focal Adhesion Alignment in Spreading Cells. *PLoS One*.;8(10): e77328.

Haghighipour, N., Heidarian, S., Shokrgozar, M.A., and Amirizadeh, N. (2012). Differential effects of cyclic uniaxial stretch on human mesenchymal stem cell into skeletal muscle cell. *Cell Biol Int*.;36(7): 669 – 675.

Hamilton, D.W., Maul, T.M., and Vorp, D.A. (2004). Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: implications for vascular tissue-engineering applications. *Tissue Eng*.;10(3-4): 361 – 369.

Hartig, S.M. (2013). Basic Image Analysis and Manipulation in ImageJ, *Curr Protoc Mol Biol*. 2013; Chapter 14: Unit 14.15.

Hashimoto, J., Kariya, Y., and Miyazaki, K. (2006). Regulation of Proliferation and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Laminin-5 (Laminin-332). *Stem Cells* 24, 2346 – 2354.

Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., and Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*.;9: 12.

Hauschka, S.D., and Konigsberg, I.R. (1966). The influence of collagen on the development of muscle clones. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;55(1):119 – 126

Hedin, U., Bottger, B.A., Forsberg, E., Johansson, S., and Thyberg, J. (1988). Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol*. ;107(1): 307–319.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnology (NY)*.;10(4): 413–417.

Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M., and Gabbiani, G. (2012). Recent Developments in Myofibroblast Biology. *Am J Pathol*.;180(4): 1340–1355.

Holzappel, B., and Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit* 37, 120 – 126.

Hornberger, T.A. (2005). Intracellular Signaling Specificity in Response to Uniaxial vs. Multiaxial Stretch: Implications for Mechanotransduction. *Am J Physiol Cell Physiol*.;288(1):C185 – C194.

Huang, N.F., and Li, S. (2008). Mesenchymal stem cells for vascular regeneration. *Regen Med*.;3(6): 877 – 892. Huang, C.-H., Chen, M.-H., Young,

T.-H., Jeng, J.-H., and Chen, Y.-J. (2009). 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.

Huard, J., Cao, B., and Qu-Petersen, Z. (2003). Muscle-derived stem cells: Potential for muscle regeneration. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 69, 230–237.

Ichii, T., Koyama, H., Tanaka, S., Kim, S., Shioi, A., Okuno, Y., Raines, E.W., Iwao, H., Otani, S., and Nishizawa, Y. (2001). Fibrillar Collagen Specifically Regulates Human Vascular Smooth Muscle Cell Genes Involved in Cellular Responses and the Pericellular Matrix Environment. *Circ Res.*;88(5): 460 – 467.

Jang, J.-Y., Lee, S.W., Park, S.H., Shin, J.W., Mun, C., Kim, S.-H., Kim, D.H., Shin, J.-W., Jang, J.-Y., Lee, S.W., et al. (2011). Combined Effects of Surface Morphology and Mechanical Straining Magnitudes on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Using Biochemical Reagents. *J Biomed Biotechnol.*;2011:860652.

Jones, P.L., Crack, J., and Rabinovitch, M. (1997). Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the $\alpha\beta3$ integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol.* 139(1): 279 – 293.

Kadler, K., Holmes, D., Trotter, J., and Chapman, J. (1996). Collagen fibril formation. *Biochem J.*; 316(Pt 1): 1 – 11.

Keating, A. (2006). Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.*;13(6): 419–425.

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells.* ;24(5):1294 – 1301.

Khani, M.-M., Tafazzoli-Shadpour, M., Goli-Malekabadi, Z., and Haghhighipour, N. (2015). Mechanical characterization of human mesenchymal stem cells subjected to cyclic uniaxial strain and TGF- β 1. *J Mech Behav Biomed Mater.*;43:18 – 25.

Kim, W., Barron, D.A., San Martin, R., Chan, K.S., Tran, L.L., Yang, F., Ressler, S.J., and Rowley, D.R. (2014). RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;111(46):16389 – 16394.

Kinner, B., Zaleskas, J.M., and Spector, M. (2002). Regulation of Smooth Muscle Actin Expression and Contraction in Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Exp Cell Res.*;278(1):72 – 83.

Kurpinski, K., Park, J., Thakar, R.G., and Li, S. (2006a). Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. *Mol Cell Biomech.*;3(1):21 – 34.

Kurpinski, K., Chu, J., Hashi, C., and Li, S. (2006b). Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;103(44):16095 – 16100.

Kurpinski, K., Chu, J., Wang, D., and Li, S. (2009). Proteomic profiling of mesenchymal stem cell responses to mechanical strain and TGF- β 1. *Cell Mol Bioeng.*;2(4): 606 – 614.

Kurpinski, K., Lam, H., Chu, J., Wang, A., Kim, A., Tsay, E., Agrawal, S., Schaffer, D.V., and Li, S. (2010). Transforming Growth Factor- β and Notch Signaling Mediate Stem Cell Differentiation into Smooth Muscle Cells. *Stem Cells.*;28(4): 734 – 742.

Lee, I.-C., Wang, J.-H., Lee, Y.-T., and Young, T.-H. (2007). The differentiation of mesenchymal stem cells by mechanical stress or/and co-culture system. *Biochem Biophys Res Commun.*;352(1): 147 – 152.

Li, B., Li, F., Puskar, K.M., and Wang, J.H.-C. (2009). Spatial patterning of cell proliferation and differentiation depends on mechanical stress magnitude. *J Biomech.*;42(11): 1622–1627.

Liu, Y., Deng, B., Zhao, Y., Xie, S., and Nie, R. (2013). Differentiated markers in undifferentiated cells: Expression of smooth muscle contractile proteins in multipotent bone marrow mesenchymal stem cells. *Dev Growth Differ.*;55(5): 591 – 605.

Lozito, T.P., Taboas, J.M., Kuo, C.K., and Tuan, R.S. (2009). Mesenchymal stem cell modification of endothelial matrix regulates their vascular differentiation. *J Cell Biochem.*;107(4): 706 – 713.

Lu, L.-L., Liu, Y.-J., Yang, S.-G., Zhao, Q.-J., Wang, X., Gong, W., Han, Z.-B., Xu, Z.-S., Lu, Y.-X., Liu, D., et al. (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica.*;91(8): 1017 – 1026.

Maul, T.M., Chew, D.W., Nieponice, A., and Vorp, D.A. (2011). Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation. *Biomech Model Mechanobiol.*;10(6): 939 – 953.

McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell.*;6(4): 483 – 495.

McDaniel, D.P., Shaw, G.A., Elliott, J.T., Bhadriraju, K., Meuse, C., Chung, K.-H., and Plant, A.L. (2007). The Stiffness of Collagen Fibrils Influences Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *Biophys J.*;92(5): 1759 – 1769.

Miller, E.J., and Rhodes, R.K. (1982). Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol.*;82 Pt A: 33 – 64.

Mizuno, M., Fujisawa, R., and Kuboki, Y. (2000). Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- $\alpha 2\beta 1$ integrin interaction. *J Cell Physiol.*;184(2): 207 – 213.

Muraglia, A., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.*;113 (Pt 7): 1161 – 1166.

Narita, Y., Yamawaki, A., Kagami, H., Ueda, M., and Ueda, Y. (2008). Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. *Cell Tissue Res.*;333(3): 449 – 459.

Nava, M.M., Raimondi, M.T., and Pietrabissa, R. (2012). Controlling Self-Renewal and Differentiation of Stem Cells via Mechanical Cues. *J Biomed Biotechnol.*;2012: 797410, 1 – 12.

Neuhuber, B., Swanger, S.A., Howard, L., Mackay, A., and Fischer, I. (2008). Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol.*;36(9): 1176 – 1185.

Nieponice, A., Maul, T.M., Cumer, J.M., Soletti, L., and Vorp, D.A. (2007). Mechanical stimulation induces morphological and phenotypic changes in bone marrow-derived progenitor cells within a three-dimensional fibrin matrix. *J Biomed Mater Res A.*;81(3): 523 – 530.

Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., Jorgensen, C., and Cousin, B. (2008). Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal–stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res.*;314(7): 1575 – 1584.

O’Cearbhaill, E.D., Murphy, M., Barry, F., McHugh, P.E., and Barron, V. (2010). Behavior of human mesenchymal stem cells in fibrin-based vascular tissue engineering constructs. *Ann Biomed Eng.*;38(3): 649 – 657.

Oida, T., and Weiner, H.L. (2010). Depletion of TGF- β from fetal bovine serum. *J Immunol Methods.*;362(1-2):195 – 198.

Owens, G. (1995). Regulation of Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Physiol Rev.*;75(3): 487 – 517.

Owens, G.K., Kumar, M.S., and Wamhoff, B.R. (2004). Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev.*; 84(3): 767 – 801.

Park, J.S., Chu, J.S., Cheng, C., Chen, F., Chen, D., and Li, S. (2004). Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng.*;88(3): 359 – 368.

Park, J.S., Chu, J.S., Tsou, A.D., Diop, R., Tang, Z., Wang, A., and Li, S. (2011). The Effect of Matrix Stiffness on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Response to TGF- β Biomaterials.;32(16): 3921 – 3930.

Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., Ma, K., and Zhou, C. (2008). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.*;17(4): 761 – 774.

Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., and Prockop, D.J. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem.*;75(3): 424 – 436.

Pilz, G.A., Ulrich, C., Ruh, M., Abele, H., Schäfer, R., Kluba, T., Bühring, H.-J., Rolauffs, B., and Aicher, W.K. (2010). Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev.*;20(4): 635 – 646.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.*;284(5411): 143 – 147.

Quinlan, A.M.T., Sierad, L.N., Capulli, A.K., Firstenberg, L.E., and Billiar, K.L. (2011). Combining dynamic stretch and tunable stiffness to probe cell mechanobiology in vitro. *PLoS One.* 2011;6(8): e23272

Rensen, S.S.M., Doevendans, P., and Van Eys, G. (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J.*;15(3): 100 – 108.

Riehl, B.D., Park, J.-H., Kwon, I.K., and Lim, J.Y. (2012). Mechanical Stretching for Tissue Engineering: Two-Dimensional and Three-Dimensional Constructs. *Tissue Eng Part B Rev.*;18(4): 288 – 300.

Riha, G.M., Wang, X., Wang, H., Chai, H., Mu, H., Lin, P.H., Lumsden, A.B., Yao, Q., and Chen, C. (2007). Cyclic strain induces vascular smooth muscle cell differentiation from murine embryonic mesenchymal progenitor cells. *Surgery.*;141(3): 394 – 402.

Roeder, B.A., Kokini, K., Sturgis, J.E., Robinson, J.P., and Voytik-Harbin, S.L. (2002). Tensile Mechanical Properties of Three-Dimensional Type I Collagen Extracellular Matrices With Varied Microstructure. *J Biomech Eng.*;124(2): 214 – 222.

Rowlands, A.S., George, P.A., and Cooper-White, J.J. (2008). Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *Am J Physiol Cell Physiol.*;295(4): C1037 – C1044.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.*;230(4732): 1350 – 1354.

Salasznyk, R.M., Williams, W.A., Boskey, A., Batorsky, A., and Plopper, G.E. (2004). Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol.*; 2004(1): 24 – 34.

Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.-G., and Prockop, D.J. (2002). Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *Stem Cells.*;20(6): 530 – 541.

Sivasubramaniyan, K., Lehnen, D., Ghazanfari, R., Sobiesiak, M., Harichandan, A., Mortha, E., Petkova, N., Grimm, S., Cerabona, F., de Zwart, P., et al. (2012). Phenotypic and functional heterogeneity of human bone marrow- and amnion-derived MSC subsets: Prospective isolation of MSC subsets. *Ann NY Acad Sci.*;1266: 94 – 106.

Stegemann, J.P., and Nerem, R.M. (2003). Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture. *Exp Cell Res.*;283(2): 146 – 155.

Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., and Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev.*;129(3): 163 – 173.

Sun, Y., Chen, C.S., and Fu, J. (2012). Forcing Stem Cells to Behave: A Biophysical Perspective of the Cellular Microenvironment. *Annu Rev Biophys.*;41: 519 – 542.

Tamama, K., Sen, C.K., and Wells, A. (2008). Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into the Smooth Muscle Lineage by Blocking ERK/MAPK Signaling Pathway. *Stem Cells Dev.*;17(5): 897 – 908.

Tang, J., Peng, R., and Ding, J. (2010). The regulation of stem cell differentiation by cell-cell contact on micropatterned material surfaces. *Biomaterials.*;31(9): 2470 – 2476.

Tang, Z., Wang, A., Wang, D., and Li, S. (2013). Smooth Muscle Cells: To Be or Not To Be?: Response to Nguyen et al. *Circ Res.*;112(1): 23 – 26.

Thorpe, S.D., Buckley, C.T., Steward, A.J., and Kelly, D.J. (2012). European Society of Biomechanics S.M. Perren Award 2012: The external mechanical environment can override the influence of local substrate in determining stem cell fate. *J Biomech.*;45(15): 2483 – 2492.

Tian, H., Bharadwaj, S., Liu, Y., Ma, H., Ma, P.X., Atala, A., and Zhang, Y. (2010). Myogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on a 3D Nanofibrous Scaffold for Bladder Tissue Engineering. *Biomaterials.*;31(5): 870 – 877.

Tondon, A., and Kaunas, R. (2014). The Direction of Stretch-Induced Cell and Stress Fiber Orientation Depends on Collagen Matrix Stress. *PLoS One.*;9(2): e89592.

Torensma, R., Prins, H.-J., Schrama, E., Verwiel, E.T.P., Martens, A.C.M., Roelofs, H., and Jansen, B.J.H. (2013). The Impact of Cell Source, Culture Methodology, Culture Location, and Individual Donors on Gene Expression Profiles of Bone Marrow-Derived and Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells Dev.*;22(7): 1086 – 1096.

Ulrich, C., Rolauffs, B., Abele, H., Bonin, M., Nieselt, K., Hart, M.L., and Aicher, W.K. (2013). Low Osteogenic Differentiation Potential of Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells Correlates with Low Expression of the Transcription Factors Runx2 and Twist2. *Stem Cells Dev.*;22(21): 2859 – 2872.

Vader, D., Kabla, A., Weitz, D., and Mahadevan, L. (2009). Strain-Induced Alignment in Collagen Gels. *PLoS One.*;4(6): e5902.

Wang, J.H., and Thampatty, B.P. (2008). Mechanobiology of adult and stem cells. Chapter 7. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008;271: 301 – 346.

Wang, C., Yin, S., Cen, L., Liu, Q., Liu, W., Cao, Y., and Cui, L. (2010a). Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein-4. *Tissue Eng Part A.*;16(4): 1201 – 1213.

Wang, C., Cen, L., Yin, S., Liu, Q., Liu, W., Cao, Y., and Cui, L. (2010b). A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials.*;31(4): 621 – 630.

Winder, S.J., and Walsh, M.P. (1993). Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. *Cell Signal.*;5(6): 677 – 686.

Yang, Y., Relan, N.K., Przywara, D.A., and Schuger, L. (1999). Embryonic mesenchymal cells share the potential for smooth muscle differentiation: myogenesis is controlled by the cell's shape. *Development.*;126(13): 3027 – 3033.

Zhang, L., Kahn, C.J., Chen, H.-Q., Tran, N., and Wang, X. (2008). Effect of uniaxial stretching on rat bone mesenchymal stem cell: orientation and expressions of collagen types I and III and tenascin-C. *Cell Biol Int.*;32(3): 344 – 352.

Zheng, W., Xie, Y., Zhang, W., Wang, D., Ma, W., Wang, Z., and Jiang, X. (2012). Fluid flow stress induced contraction and re-spread of mesenchymal stem cells: a microfluidic study. *Integr Biol (Camb).*;4(9): 1102 – 1111.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Projektposter des Teilprojekt I der KFO 273 | 11 |
| Abbildung 2: Die mesenchymale Stammzelle und ihre Abkömmlinge | 12 |
| Abbildung 3: „The Mesengenic Process“ vermittelt ein komplexeres Bild der MSC-Differenzierung | 14 |
| Abbildung 4: Fließende Übergänge zwischen dem synthetischen und dem kontraktilen Phänotyp..... | 16 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen synthetischem (links) und kontraktilem (rechts) Phänotyp der glatten Muskelzelle | 17 |
| Abbildung 6: Glattmuskuläre Marker und ihre zeitliche Abfolge in der glattmuskulären Differenzierung | 19 |
| Abbildung 7: Protagonisten der Mechanotransduktion | 21 |
| Abbildung 8: Schematische Darstellung der Wirkung von uniaxialem Stress | 22 |
| Abbildung 9: Neuausrichtung von Zellen durch mechanischen Stress | 23 |
| Abbildung 10: MSC auf Kollagen-I-Gelen unterschiedlicher Steifigkeit nach 24h Adhärenz..... | 27 |
| Abbildung 11: Das ElectroForce® 5210 BioDynamic® Test-Instrument von BOSE® mit 4 eingespannten Kammern..... | 34 |
| Abbildung 12: Bildschirmansicht während der laufenden Stimulation in WinTest..... | 34 |
| Abbildung 13: Frontal- und Seitenaufnahme eines 1 x 1 cm großen Quadrats des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels mit 80 mg/ml..... | 36 |
| Abbildung 14: Funktionsprinzip des Atomic Force Mikroskop (AFM)..... | 38 |
| Abbildung 15: Schematische Darstellung einer AFM-Messung | 39 |
| Abbildung 16: Beispiel einer Kraft-Abstands-Kurve des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels..... | 40 |
| Abbildung 17: Ansicht des Zeiss Observer Z1 | 45 |
| Abbildung 18: Beispiel einer Live-Dead-Bildakquise für Tag 4 | 46 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 19: Verhältnis der Formfaktoren untereinander in einer schematischen Darstellung I | 51 |
| Abbildung 20: Verhältnis der Formfaktoren untereinander in einer schematischen Darstellung II | 52 |
| Abbildung 21: Beispiele von Zellen unterschiedlicher Roundness-Werte (hbmMSC, nach 24 h Adhaerenz, ohne mechanische Stimulation auf einem Kollagen-I-Hydrogel mit 80 mg/ml) | 52 |
| Abbildung 22: Beispiel eines bearbeiteten Calcein-Kanal-Mosaix-Bildes vor Analyse der Formfaktoren | 53 |
| Abbildung 23: Beispiel eines in Excel überführten Read-outs des Shape-Descriptor Plugins | 54 |
| Abbildung 24: Versuchsablauf pro Patient | 60 |
| Abbildung 25: Stimulationskammer mit Kontrollmedium und eingespanntem kompaktiertem Kollagen-I-Hydrogel | 63 |
| Abbildung 26: Coomassie-Färbung zur Bestimmung der optimalen Zellzahl | 66 |
| Abbildung 27: Veränderung des Young's Modulus (in MPa) in den ersten 100 bzw. letzten 100 Zyklen bei einer 1-stündigen Stimulation mit 5 %-Substratelongation im Bose ElectroForce 5210 | 67 |
| Abbildung 28: Vergleich der unterschiedlichen Young's Moduli bei Kollagen-I-Hydrogelen mit 80, 160- und 240 mg/ml | 68 |
| Abbildung 29: REM-Aufnahmen des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels mit 80 mg/ml | 69 |
| Abbildung 30: Beispiel einer IF-Färbung (ACTA II) von unstimulierten (links) bzw. stimulierten (rechts, nach 5% Substratelongation für 1 Stunde) hbmMSC auf kompaktierten Kollagen-I-Hydrogelen | 70 |
| Abbildung 31: Vergleich der absoluten Zellzahlen zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC | 72 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 32: Veränderung der Circularity zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC | 73 |
| Abbildung 33: Veränderung der Roundness zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC | 74 |
| Abbildung 34: Veränderung der Aspect Ratio zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC | 75 |
| Abbildung 35: Veränderung der Solidity zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC | 76 |
| Abbildung 36: Veränderung der relativen mRNA-Expression von ACTA II zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC | 77 |
| Abbildung 37: Veränderung der relativen mRNA-Expression von TAGLN zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC | 78 |
| Abbildung 38: Veränderung der relativen mRNA-Expression von CNN1 zwischen Tag 4 und 5, den Kontrollen bzw. den mit 2,5 und 5 %-Substratelongation stimulierten hbmMSC | 79 |
| Abbildung 39: Schlüsselfaktoren der Myogenese | 81 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| Tabelle 2: Literaturübersicht zur uniaxialen Stimulation von hbmMSC | 25 |
| Tabelle 3: Chemikalien..... | 30 |
| Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien | 31 |
| Tabelle 5: Geräte | 32 |
| Tabelle 6: Verwendete Software | 32 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung des GMP+-Mediums | 42 |
| Tabelle 8: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz | 48 |
| Tabelle 9: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz..... | 49 |
| Tabelle 10: mathematische Definition der Formfaktoren | 50 |
| Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primer und Sonden..... | 58 |
| Tabelle 12: Zusammensetzung des MSC-Kontrollmediums | 59 |
| Tabelle 13: Patientencharakteristika | 71 |

7. Erklärung zum Eigenanteil

Während meiner Promotion findet eine enge Kooperation mit der Teilprojekt I (Focus I), vertreten durch Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Aicher, Professor für Molekulare Medizin, Universitätsklinik für Urologie, Forschungslabore TTR, Tübingen, sowie Teilprojekt I (Focus II), vertreten durch Professor Dr. rer. nat. Gerd Klein, Sektion Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, Abteilung Innere Medizin II, Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Tübingen statt. So verwenden wir z.B. innerhalb der klinischen Forschergruppe das gleiche Zellkulturmedium und identische Passagierungs-, Einfrier- oder Immunfluoreszenzprotokolle.

Die humanen mesenchymalen Knochenmarkstromazellen werden in Passage I durch das Teilprojekt I/ Focus I bereitgestellt.

Die weiteren Versuchsschritte werden im Labor der berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen, Siegfried Weller Institut für unfallmedizinische Forschung der Universität Tübingen, Arbeitsgruppe PD Dr. Bernd Rolauffs, am Standort des Zentrums für medizinische Forschung, Waldhörlestr. 22, 72072 Tübingen - Derendingen, durchgeführt.

Die dargestellte Versuchsreihe sowie die Vorversuche werden von mir selbst konzipiert und praktisch durchgeführt.

Einzelne Teilschritte der Versuchsreihe (z.B. Membranbesiedlung, biomechanische Stimulation, Bildakquise mit dem konfokalen Mikroskop, Umschreiben der Ribonucleinsäure ect.) oder vorbereitende Tätigkeiten (z.B. Zellen passagieren, Autoklavieren der Stimulationskammer ect.) werden nach meinen Vorgaben von Dr. Tatiana Uynuk-Ool oder Dr. Miriam Rothdiener, beides wissenschaftliche Mitarbeiterinnen der o.g. AG Rolauffs und Mitbetreuerinnen meiner Arbeit durchgeführt.

Die Etablierung und praktische Durchführung der Polymerasekettenreaktion wird ausschließlich von Dr. Tatiana Uynuk-Ool nach meinen Vorgaben durchgeführt.

Die Analyse der Formfaktoren wird durch mich initiiert und im Projekt mit den vorhandenen Tools (Shape_descriptor Plug-in von ImageJ) etabliert. Phong Nguyen, Bachelor-Student der Medizintechnik der Eberhard-Karls Universität Tübingen und Universität Stuttgart hat alle beschriebenen Formfaktoren nach meiner Anleitung an den von mir aufgenommenen Bildern, im Rahmen seiner Bachelor-Arbeit untersucht.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt in enger Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater PD Dr. Bernd Rolauffs.

Bei den Messungen mit dem Atomic Force Mikroskop werde ich maßgeblich durch Tanja Seeger, M. Sc., Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Klein, Sektion Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, Abteilung Innere Medizin II, Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen unterstützt.

Die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskops des kompaktierten Kollagen-I-Hydrogels erfolgt, nach meiner entsprechenden Vorbereitung im o.g. Labor, durch Prof. Bodo Kurz, Anatomisches Institut, Universität Kiel.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 22. Mai 2016

Miriam Lena Hegemann

Danksagung

Mein erster Dank gilt PD Dr. Rolauffs für die Initiierung und Betreuung meiner Promotion. Besonders bemerkenswert fand ich es, dass er nicht vor der Aufgabe zurückgeschreckt ist, eine bereits klinisch tätige Ärztin in seine Arbeitsgruppe zu integrieren. Mit dem Spagat zwischen Klinik und Labor hat er mir die Möglichkeit gegeben, in einem spannenden und anspruchsvollen Feld zu promovieren. Sein gesamtes Team hat mich vom ersten Tag an freundlich aufgenommen und mich geduldig in die mir völlig neue Materie eingearbeitet. Hier sind vor allem Dr. Tanja Uyunk-Ool und Dr. Miriam Rothdiener zu nennen, die mit mir am engsten zusammengearbeitet haben. Aber auch bei allen anderen Mitarbeitern des KFO 273 TP I möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Es war aufregend, in die Welt der Molekularbiologie einzutauchen. Neben den „großen“ Köpfen Prof. Dr. Aicher, PD Dr. Hart und Prof. Dr. Klein, die für mich Inspiration waren, haben besonders Mitarbeiter wie Tanja Seeger und Tanja Abruzzese mein Laborleben in vielen Belangen einfacher gemacht. Bei Tanja Seeger möchte ich mich ganz speziell für Ihre Unterstützung bei den AFM-Messungen bedanken.

Mein Dank geht auch an meinen damaligen Chefarzt der Urologischen Klinik der Kreiskliniken Reutlingen, Dr. Schwaibold, der mir durch die Teilzeittätigkeit das Arbeiten im Projekt erst möglich gemacht hat.

Schlussendlich möchte ich mich natürlich auch bei meinen Eltern bedanken, die mich zu einem neugierigen und selbstkritischen Menschen erzogen haben und mich immer unterstützt und ermutigt haben, meinen eigenen Weg zu gehen. Nicht zuletzt deshalb widme ich meinen Eltern diese Arbeit.

Großer Dank gebührt zum Schluss meinem Mann und besten Freund Olaf, ohne dessen Unterstützung ich mich wahrscheinlich nie an das Projekt Promotion gewagt hätte. Ohne sein Motivationstalent in Phasen der Frustration im Labor oder seinen Langmut im technischen Support beim Schreiben dieser Arbeit wäre sie wohl nie in dieser Form fertig geworden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Miriam Lena Hegemann, geb. Fahlbusch
Geburtsdatum und -ort 12.05.1983 in Mettingen

Schulbildung

1993 – 2002 Städtisches Gymnasium Ochtrup (Abitur-Note: 1,8)

Hochschulbildung

2002 – 2007 Studium der Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen
17. September 2004 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,33)
08/2007 – 10/2008 Fortführung des Studiums an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
08/2007 – 07/2008 Praktisches Jahr am Klinikum Konstanz, Wahlfach Urologie
20. November 2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)

Berufserfahrung

12/2008 – 12/2010 Assistenzärztin in der Urologischen Klinik, CA Prof. Dr. Truß, Klinikum Dortmund, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Münster
01/2011 – 02/2015 Assistenzärztin bzw. Fachärztin in der Urologischen Klinik, CA Dr. Schwaibold, Kreiskliniken Reutlingen, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
November 2014 Facharztprüfung Urologie
03/2015 – heute Fachärztin in der Universitätsklinik für Urologie, CA Prof. Dr. Stenzl, Universitätsklinikum Tübingen
Weiterbildung medikamentöse Tumorthherapie
Juni 2015 europäische Facharztprüfung (FEBU)
seit November 2015 ärztliche Leitung der urologischen Studienzentrale der Universitätsklinik für Urologie, Universitätsklinikum Tübingen

Promotion

seit 10/2012 Effekte biomechanischer Kräfte auf die Morphologie und glatt-muskuläre Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen des Knochenmarks