

Aus dem Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik

Direktor: Prof. David B. Jones (PhD M.I. Biol.)

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Philipps



Universität

Marburg

**Zugkraftvergleichsanalyse von primären
Osteoblasten und Osteosarkomzellen in Ruhe
und nach mechanischer Belastung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Tobias Schmenn

aus Gießen

Marburg (Lahn), 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
29.11.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. David B. Jones

1. Korreferent: PD Dr. Thomas M. Frangen

1	Einleitung	1
1.1	Knochenbestandteile	1
1.2	Mechanosensitivität	3
1.2.1	Knochenzellen	3
1.2.2	Osteosarkomzellen	3
1.3	Mechanische Stimulationsarten im Experiment	4
1.4	Anpassungsprozesse des Knochens (Remodeling).....	5
1.4.1	Kopplung zwischen Knochenresorption und –synthese.....	5
1.5	Mechanotransduktion	9
1.6	Mechanorezeption (Mechanosensing).....	10
1.6.1	Integrine, Zytoskelett, ECM, fokale Adhäsionen	11
1.6.2	Ionenkanäle	15
1.6.3	Connexine / Gap Junctions	16
1.6.4	Substratsteifigkeit, Durotaxis.....	16
1.7	Signaltransduktion.....	17
1.7.1	MAPK (ERK)	18
1.7.2	Kalzium	18
1.7.3	NO (Stickstoffmonoxid)	19
1.7.4	G-Proteine	19
1.7.5	WNT/ β -Catenin	20
1.8	Zugkräfte	20
1.9	Zugkraftmessungen.....	21
1.9.1	Das Prinzip der hier verwendeten Art der Zugkraftmessung.....	21
1.9.2	Definition von Strain.....	22
1.10	Klinische Relevanz	22
1.11	Zielsetzung der Arbeit.....	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Zellkultur.....	24
2.1.1	Arbeiten mit Zellkulturen	24
2.1.2	Osteosarkomzellen MG-63	25
2.1.3	Gewinnung primär boviner Osteoblasten	25
2.1.4	Passagieren der Zellen	27
2.1.5	Kryokonservierung	27

2.1.6	Zellzählung und Aussäen der Zellen.....	28
2.1.7	Phänotypisierung der Osteoblasten.....	28
2.1.8	MTT-Zellproliferationsassay.....	30
2.2	Polyacrylamidgele für die Zugkraftmessung.....	31
2.2.1	Herstellung der Aclar-Folien als Gelunterlage.....	31
2.2.2	Gießen der Polyacrylamidgele.....	32
2.2.3	Aktivierung und Kollagenbeschichtung der Polyacrylamidgele ...	35
2.2.4	Sterilisieren der Polyacrylamidgele.....	36
2.2.5	Messung des Elastizitätsmoduls der Polyacrylamidgele.....	36
2.3	Zugkraftexperimente.....	39
2.3.1	Funktionsweise der Dehnungsmaschine.....	39
2.3.2	Kalibrierung der Dehnungsmaschine.....	41
2.3.3	Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie.....	41
2.3.4	Kamera.....	42
2.3.5	Versuchsaufbau.....	43
2.3.6	Durchführung der Dehnungsexperimente.....	45
2.4	Analyse der Zugkräfte (Zugkraftmikroskopie).....	47
2.4.1	Darstellung der Vektorgrafiken.....	48
2.4.2	Festlegen der Zellgrenzen.....	49
2.4.3	Erstellen der Deformationsmatrix.....	49
2.4.4	Ursprungsknoten der Kraftvektoren.....	52
2.4.5	Berechnung der Kraftvektoren für jeden Knotenpunkt.....	53
2.5	Statistik.....	54
2.5.1	Statistische Signifikanz.....	54
2.5.2	T-Test.....	55
2.5.3	Mann-Whitney-U-Test (Wilcoxon-Rangsummen-Test).....	55
2.5.4	Korrelationsanalysen.....	56
2.5.5	Chi-Quadrat-Vierfelder-Test.....	56
2.5.6	z-Transformation (z-Wert).....	57
2.6	Graphische Darstellung.....	57
2.6.1	Boxplots.....	57
3	Ergebnisse.....	58
3.1	Kalibrierung der Dehnungsmaschine.....	58

3.2	Kalibrierung der Kamera.....	59
3.3	Phänotypisierung der primären Osteoblasten.....	59
3.3.1	Nachweis von Osteoblasten-Proteinen.....	59
3.3.2	MTT-Zellproliferationsassay.....	62
3.4	Zugkraftexperimente.....	63
3.4.1	Zugkräfte und Zellgröße vor Dehnung.....	63
3.4.2	Vergleich der verschiedenen Zelltypen.....	66
3.4.3	Kontrollversuche.....	67
3.4.4	Zusammenhang zwischen Zugkraft und Zellgröße.....	68
3.4.5	Zugkräfte nach Dehnung.....	69
3.4.6	Zugkraftveränderungen durch die mechanische Stimulation.....	69
3.4.7	Analyse der Reaktionstypen.....	70
3.4.8	Vergleich der verschiedenen Zelltypen.....	75
3.4.9	Kontrollversuche.....	76
4	Diskussion.....	77
4.1	Ergebnisse.....	77
4.1.1	Absolute Zellkräfte.....	77
4.1.2	Zugkraftunterschiede in beiden Zellpopulationen.....	78
4.1.3	Veränderung der Zugkräfte nach mechanischer Stimulation.....	79
4.1.4	Zusammenhang zwischen Zugkraft und Zellgröße.....	82
4.2	Externe und zellgenerierte Kräfte.....	83
4.2.1	Unterschiedliche mechanische Stimulationsarten.....	84
4.3	Methode.....	85
4.3.1	Technische Hürden.....	85
4.3.2	Mechanosensible Zellen oder mechanosensibles Gewebe.....	85
4.4	Ausblick.....	88
4.4.1	MLCK Inhibitoren und Vinculin.....	88
4.4.2	3D- Modelle und Computersimulationen.....	89
5	Zusammenfassung.....	90
6	Anhang.....	I
6.1	Literaturverzeichnis.....	I
6.2	Tabellarischer Ergebnisteil.....	XXI
6.2.1	MTT-Zellproliferationsassays (POB).....	XXI

6.2.2	MTT-Zellproliferationsassays (MG-63).....	XXIII
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	XXV
6.4	Abkürzungsverzeichnis.....	XXVI
6.5	Tabellenverzeichnis.....	XXVII
6.6	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	XXVIII
6.7	Danksagung.....	XXIX

1 Einleitung

Die Aufgaben des menschlichen Knochens reichen von Schutz (Schädel), Stütz- und Hebefunktion als Teil des Bewegungsapparates, Hämatopoese (Knochenmark) bis zu metabolischen Funktionen als Calcium- und Phosphatspeicher und damit Erfolgsorgan verschiedener Hormone. Knochen ist ein Gewebe mit einem lebhaften Stoffwechsel. Aufgrund der zeitlebens erhaltenen Pluripotenz der mesenchymalen Stammzellen aus denen sich Knochengewebe differenziert, ist eine Anpassung des Knochens an unterschiedliche mechanische und biologische Bedingungen auch im Erwachsenenalter noch möglich. So hängt auch die Zusammensetzung des Knochens bezüglich seiner äußeren Hülle (Kortikalis) und den innen trajektorieell angeordneten Anteilen (Spongiosa) von den jeweiligen statischen und dynamischen Erfordernissen ab. Dabei optimiert der ständige Knochenauf- und -abbau die Beanspruchbarkeit und minimiert gleichzeitig die Knochenmasse in Hinblick auf die Anforderung von Belastung und Gewichtsreduktion zur Beweglichkeit (Minimum-Maximum-Prinzip, Pauwels (1965)).

Grundlage dieser Arbeit und Ausgangspunkt der Forschung im Labor für experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg ist es in vitro mechanische Belastung nachzuahmen um zelluläre Mechanismen der Knochenanpassung über die Interaktion einer Knochenzelle mit der Umgebung aufzudecken.

1.1 Knochenbestandteile

Der Knochen besteht neben den zellulären Bestandteilen (Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, Vorläuferzellen) aus organischer Substanz (Kollagen, Osteocalcin, Proteoglykane, Bone Sialoprotein (BSP) etc.) sowie anorganischer Substanz (Hydroxylapatit, Kalziumphosphat, Kalziumcarbonat). Osteoblasten, als knochenbauende Zellen, entwickeln sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen, die vorwiegend in der inneren Zellschicht des Periosts zu finden sind, was für die Gewinnung von primären Osteoblasten in der Zellkultur von Bedeutung ist (siehe 2.1.3). Osteoblasten synthetisieren

die noch unmineralisierte Knochenmatrix, das Osteoid. Die organischen Verbindungen der Knochenmatrix spielen eine wichtige Aufgabe beim Ablauf der Zellkultur. So ist es möglich mit Hilfe des Nachweises dieser spezifischen Proteine Zellen als Osteoblasten zu identifizieren (siehe 2.1.7). Mit der zunehmenden Matrixproduktion entstehen nach Mineralisierung des Osteoids durch Hydroxylapatit und weiteren Calciumverbindungen Osteozyten. Sie liegen damit in einem Hohlräumssystem zwischen den einzelnen Knochenlamellen. Über zarte Fortsätze und die Ausbildung von Gap junctions (Nexus) bilden sie ein dichtes Netzwerk und stehen miteinander in kommunizierendem Kontakt (Noble (2008)). Eine zweite Erscheinungsform der Osteoblasten sind die sogenannten „Lining cells“, teilweise auch als Hemiosteozyten oder flache mesenchymale Zellen bezeichnet, die nach dem Knochenaufbau an der Knochenoberfläche persistieren (Dierkes (2008))

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die durch Fusion von mononukleären Vorläuferzellen entstehen und zum mononukleären-Phagozytose-System gehören. Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen bauen sie die Interzellulärschicht des Knochengewebes unter Bildung von Resorptionssäumen an Ihrer basalen Seite ab (Bar-Shavit (2007)).

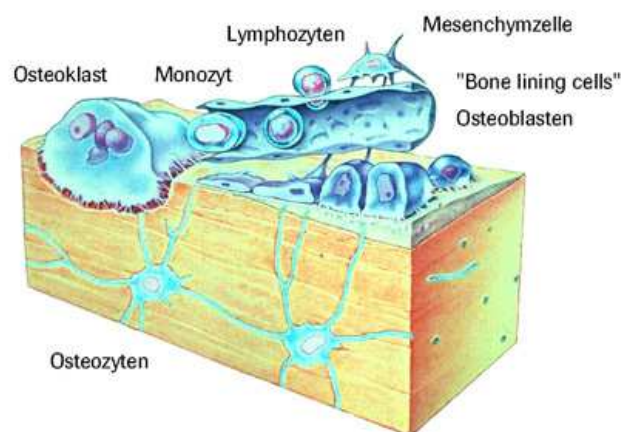


Abbildung 1: Knochenzellen-Schema: Osteoklasten entwickeln sich aus monozytären Vorläuferzellen und resorbieren als mehrkernige Riesenzellen interzelluläre Knochensubstanz, Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen, Osteozyten liegen in einem Lakunensystem der mineralisierten Knochenmatrix und stehen über ihre Zellfortsätze in Verbindung. „Lining cells“ überziehen die Knochenoberfläche in Ruhe (<http://www.roche.com/pages/facetten/11/schemaknochenz.jpg>)

1.2 Mechanosensitivität

1.2.1 Knochenzellen

1942 konnte Glucksmann anhand von Knochengewebekulturen vermutlich erstmals die positiven Auswirkungen von mechanischen Stimuli auf die Osteogenese in vitro zeigen (Glucksmann, A. (1942)). Weitere Untersuchungen z.B. durch Rubin und Lanyon an Ulnae von Vögeln konnten zeigen, dass verstärkte dynamische mechanische Belastung zu gesteigerter Knochenbildung führt (Rubin (1984), Lanyon 1984)). Neben der Änderung der Knochensubstanz (Rubin and Lanyon (1985), Srinivasan et al (2002)) konnten auch Änderung der Proteinexpression nach mechanischer Stimulation nachgewiesen werden (Rawlison et al. (1998), Judex et al. (2005)). Auf der anderen Seite konnten Experimente in Schwerelosigkeit zeigen, dass es dabei, ähnlich wie bei andauernder Immobilität, zu einem Verlust an Knochensubstanz kommt (Le Blanc et al. (1990), Zerwekh et al. (1998), Lang et al. (2004), Morey et al. (1978)). Auch in klinischen Studien konnte ein positiver Effekt von mechanischer Stimulation auf die Knochenzusammensetzung nachgewiesen werden (Rubin et al. (2004), Ward et al. (2004)). Erste therapeutische Anwendung mechanischer Belastung bei Frakturen und verzögerter Knochenheilung erfolgt durch niedrigenergetische, gepulste Ultraschallwellen (EXOGEN®, Firma Smith&Nephew; www.knochenheilung.de).

Während klar ist, dass Knochenzellen, sowohl Osteozyten als auch Osteoblasten, mechanosensitive Eigenschaften aufweisen und dass die Adaptation neben der Knochenmasse auch die Knochenzusammensetzung betrifft, ist weiterhin nicht eindeutig bewiesen, wie der mechanische Stimulus registriert, in ein Signal umgewandelt und letztendlich in der Zelle transportiert wird, um zu einer Zellantwort zu führen. Dies ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.2.2 Osteosarkomzellen

Neben der nachgewiesenen Mechanosensitivität normalen Knochengewebes scheinen auch Tumorzellen auf äußere mechanische Reize zu reagieren. So

konnten in Zellexperimenten eine zu Osteoblasten äquivalente Proliferationsrate der Osteosarkomzelllinie MG-63 um über 20% nach Dehnung gemessen werden (Gratz (2007)). Des weiteren konnten ein zu primären Osteoblasten (POB) identisches Expressionsmuster der Phospholipase C sowie eine nach mechanischer Stimulation gleichartige MAP-Kinasen-Aktivierung, jeweils als wichtiger Bestandteil der Mechanotransduktion (siehe 1.7.1), nachgewiesen werden (Hoberg et al. (2005), Bromme (2000)). Ein ähnliches Verhalten von Osteoblasten und MG-63 Sarkomzellen zeigten auch Experimente in Schwerelosigkeit (Carmeliet et al. (1998)., Hughes-Fulford (2002)). Bezüglich des Ausstoßes von Kalzium als allgemein bekannter wichtiger second messenger der Signaltransduktion und damit auch im Bereich der Mechanosensitivität finden sich unterschiedliche Aussagen. Während nach mechanischer Stimulation durch Scherkräfte eine Kalziumantwort in beiden Zellarten (POB und MG-63) nachzuweisen war (Rieger (2004)), konnten bei Stimulation durch Dehnung lediglich bei Osteoblasten ein Kalziumsignal detektiert werden (Tenbosch (1999)).

1.3 Mechanische Stimulationsarten im Experiment

Aufgrund der unter 1.2 beschriebenen Erkenntnisse bezüglich der vermeintlichen Zusammenhänge zwischen mechanischem Reiz und detektierender Zelle inklusive deren Hintergründe werden in den in vitro-Experimenten verschiedene mechanische Stimulationsarten verwendet. Die Flüssigkeitsströme in den Knochenkanalikuli in Umgebung des Netzwerkes der Osteozyten bilden die Grundlage von Scherkraft-Experimenten (Shear-flow-Experimente). Dabei werden Knochenzellen einem Flüssigkeitsfluss ausgesetzt, der zu einer Zelldeformation durch die tangential auftretenden Kräfte führt.

Die zweite üblicherweise verwendete Stimulationsart ist die Dehnung. Diese ist auf der bei Belastung des Knochens auftretenden äußeren Zugspannung mit Dehnung der dort vorhandenen Knochenzellen begründet. So konnte z. B. gezeigt werden, dass es durch Dehnung zu einer Proliferationssteigerung (Jones et al. (1991)) sowie vermehrter Bildung von spezifischen Proteinen und

von an der Signalweiterleitung beteiligten Molekülen kommt (Chen et al. (2005), Jansen et al. (2004)).

Im Institut für experimentelle Orthopädie und Biomechanik Marburg wird eine dritte Form der mechanischen Stimulation verwendet. Dabei wird mit Hilfe eines eigenständig entwickelten Kraftmikroskops eine gezielte Stimulation einzelner Zellen durch vertikale Kompression ermöglicht (Struckmeier (2001)).

Für die hier vorliegende Arbeit wurden Dehnungsexperimente an Osteoblasten im Vergleich zu einer Osteosarkomzelllinie (MG-63) durchgeführt.

1.4 Anpassungsprozesse des Knochens (Remodeling)

Als Remodellierung des Knochens wird ein zielgerichteter Prozess verstanden, in dessen Verlauf Osteoklasten alte Knochensubstanz abbauen und diese über Osteoblasten durch neue Knochenbildung ersetzt wird. Dies findet während des gesamten Lebens durch die so genannte Basic multicellular Unit (BMU) als Zusammenschluss der verschiedenen Knochenzellarten fortlaufend statt und zeigt, dass sich der Knochen permanent an wechselnde Bedingungen und Belastungssituationen anpasst (Roux (1895)). Im Laufe eines Jahres werden so etwa 3 Prozent der Kortikalis und 25 Prozent der Spongiosa umgebaut, was in etwa aussagt, dass innerhalb von 8 bis 10 Jahren die gesamte Knochenmasse des Menschen ausgetauscht wird. Ein besseres Verständnis über die dabei ablaufenden Prozesse bezüglich mechanischer Belastung, hormoneller Einflüsse (Sexualhormone, Parathormon, Calcitonin, Wachstumshormone) und Zellinteraktion würde zu einer Verbesserung der Behandlungsstrategien umschriebener Knochenerkrankungen (Osteoporose, Osteopetrose, Frakturheilung etc.) führen (Russell et al. (2001)).

1.4.1 Kopplung zwischen Knochenresorption und –synthese

1.4.1.1 Biomechanik

1960 stellte Harold Frost im „Utah Paradigm of Skeletal Physiology“ ein Modell zur Beschreibung des Zusammenhanges zwischen Knochenwachstum und Knochenabbau auf. Diese „Mechanostat“-Theorie basierte auf dem bereits 1892

von Wolff beschriebenen Einfluss von äußeren mechanischen Kräften und damit der jeweiligen Funktion des Knochens auf dessen Form und Festigkeit (Wolff (1982)). Ein sinnvolles Zusammenspiel zwischen Osteoblasten zur Produktion der Knochenmatrix und den zu den Makrophagen zählenden Osteoklasten zur Knochenresorption ermöglicht dabei die gerichtete Umstrukturierung des Knochens an die jeweilige Situation. Frost beschreibt in seinem Modell vier verschiedene Belastungsbereiche (Längenänderung als mechanischer Stimulus) die zu unterschiedlichen Konsequenzen der Knochengewerberemodellierung (engl. bone remodeling) führen (Frost (1987)). Demzufolge führt eine relative Längenänderung des Knochens zwischen 50 – 200 μ Strain und ca. 1500-2500 μ Strain (1000 μ Strain entspricht einer Dehnung von 0,1 Prozent, siehe 1.9.2) zur Balance zwischen Resorption und Formation (physiologischer Bereich). Geringere mechanische Belastung (disuse window) führt zu einem Überwiegen des Knochenabbaus. Dadurch kommt es bei gleich bleibendem mechanischem Reiz und einem Netto-Abbau der Knochensubstanz zu erniedrigter Steifigkeit und damit erhöhter lokaler Belastung, stärkerer Deformation und damit wieder zum Erreichen des physiologischen Bereiches (Knochenabbau = Knochenaufbau). Erhöhte mechanische Beanspruchung führt zu einer positiven Knochenbilanz und erhöhten Knochensteifigkeit. Eine Erhöhung der Belastung über 4000-5000 μ Strain führt laut Frost zu keiner weiteren Erhöhung der Knochensteifigkeit.

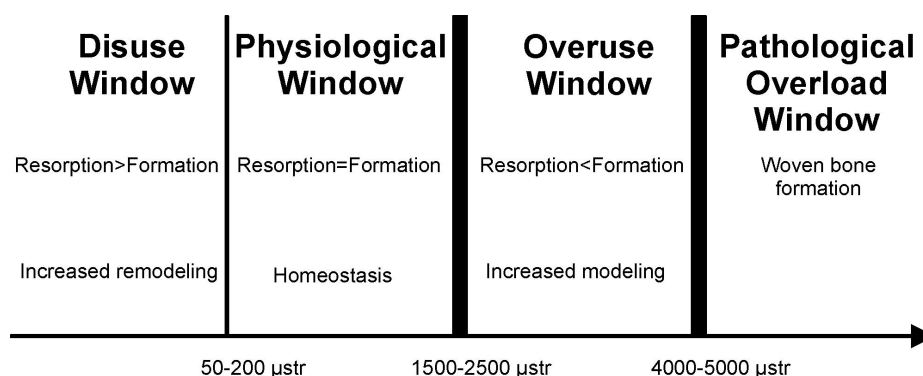


Abbildung 2: Mechanostat-Theorie. Modeling- und Remodelingschwellen des mechanischen Belastungsbereiches nach Harold Frost (aus Duncan and Turner (1995)).

Alleine die Belastungsstärke als Modulator der Knochenbilanz zu sehen ist jedoch nur bedingt gültig. So spielen, an jeder Stelle des Skeletts verschieden, sowohl die Zahl und Frequenz (Robling et al (2000)) als auch die Änderungsgeschwindigkeit und Dauer der Belastungszyklen (Skerry (2006)) und die dazwischen liegenden Pausen (Srinivasan (2002), Gross et al (2004)) eine Rolle in der Komplexität des Remodelings. Als Beispiel konnte gezeigt werden, dass bei Belastung von Ratten durch eine „Ganzkörper-Vibration“ eine höhere Frequenz (90 Hz) zu einer höheren trabekulären Dichte der Knochensubstanz und insgesamt dickeren Trabekeln als bei niedrigeren Frequenzen (45Hz) oder der Kontrollgruppe führt (Judex, S. et al. (2007)).

Neuere Untersuchungen schränken die Mechanostat-Theorie von Frost jedoch in gewisser Weise ein. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine genetische Grundlage der Mechanosensitivität belegen. Verschiedene Mausstämme zeigten sich dabei unterschiedlich sensibel auf eine mechanische Stimulation. Während Kodama et al. eine schwächere Zunahme oder schwächere Stärkung der Knochensubstanz der Tibia nach Sprungbelastung des Mausstammes C3H/He im Vergleich zu anderen Mausstämmen nachweisen konnten, zeigten Robling et al. eine ähnliche Reaktion des gleichen Stammes auf axiale Belastung der Ulna und des Radius (Kodama et al. (2000), Robling et al. (2002)).

1.4.1.2 Osteoklast-Osteoblast-Osteozyt-Kommunikation

Ungeachtet des oben beschriebenen rein mechanischen Stimulus als Ursprung des Bone Remodeling bestimmt das so genannte cell coupling, die Interaktion zwischen Osteoblasten, Osteoklasten sowie Osteozyten, die Umbauprozesse des Knochens und damit die Knochenmasse, -architektur und -qualität. Dabei liegt ein effektiver Feedback-Mechanismus zwischen diesen Zellarten vor, der über direkten Kontakt (Rezeptor/Ligand, gap junctions), parakrin (z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine) oder indirekt über Stoffe der Knochenmatrix zustande kommt. In diesem Mechanismus scheinen sich drei Phasen des Bone Remodelings unterscheiden zu lassen (Matsuo et al (2008)).

Während der so genannten Initiation (Einleitung) kommt es nach der Differenzierung von Osteoklasten aus monozytären Vorläuferzellen zu einem Übergewicht der Osteoklastenaktivität und damit zu einer Knochenresorption. Zu Beginn führt in Gegenwart des M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) zum einen die Bindung des von Osteoblasten synthetisierten Liganden RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) an den Rezeptor RANK der Osteoklasten (Suda et al. (1999)), zum anderen die Apoptose von Osteozyten zur Osteoklastogenese (Clark et al. (2005), Seeman (2009)). Dabei scheinen die Osteozyten als dritte große Zellreihe des Knochens eine besondere Bedeutung bei der Detektion verschiedenster Stimuli, z.B. Mikrofrakturen oder Änderung der mechanischen Belastung, und damit zu Beginn der Regulation des Remodelings zu haben (Tatsumi et al. (2007), Bonewald (2007)). Weitere Stimulationskaskaden der Osteoklasten bestehen RANKL oder M-CSF unabhängig. Beispiele dafür sind TNF- α oder die Interleukine 6,8 und 11 als „RANKL-Ersatz“ sowie die Wachstumsfaktoren VEGF (vascular endothelial growth factor), PlGF (placental growth factor) oder HGF (hepatocyte growth factor) als „M-CSF-Ersatz“ (Knowles et al. (2009)).

Die folgende sich an die Resorption anschließende Phase (Transition) wird durch die Knochenformation der Osteoblasten geprägt. Zunächst kommt es durch die Freisetzung von Calcium aus dem abgebauten Knochen (Ca^{2+} Sensing) zu einer Stimulation der Osteoblasten (Kanatani et al. (1991)) und einer Apoptose der Osteoklasten (Nielsen et al. (2007), Lorget et al. (2000)). Gleichzeitig stimulieren coupling factors, die von den Osteoklasten produziert in der Knochenmatrix zurückgelassen werden, die Differenzierung der Osteoblasten (Martin (2005)). Zu Ihnen zählen unter anderem TGF- β , BMP, IGF-II, Cathepsin K und EphrinB2 (Matsuo et al (2008)). Ein weiterer Faktor in der Differenzierung der Osteoblasten scheint auch der zelluläre Verbund untereinander via Gap junctions zu sein (Jiang et al. (2007)).

Die letzte der drei Phasen des Bone Remodelings (Termination) ist gekennzeichnet durch die Suppression der Differenzierung der Osteoblasten wie auch der Osteoklasten. Sclerostin, sezerniert von in der Knochenmatrix eingebetteten Osteozyten, stoppt dabei die Osteoblasten und damit die

Knochenformation (van Bezooijen et al. (2004)). Wird Sclerostin durch einen Antikörper neutralisiert, steigt die Knochenmasse drastisch an. (Agholme et al. (2010)). Das von Osteoblasten produzierte OPG (Osteoprotegrin) unterdrückt die weitere Osteoklasten-Differenzierung und damit die Knochenresorption durch Bindung an RANKL, was die RANK-Aktivierung supprimiert (Simonet et al. (1997), Murthy et al. (2009)). Neueste Ansätze der Osteoporosetherapie greifen hier mit dem Antikörper Denosumab durch Imitation der OPG-Effekte (IgG2-anti-RANKL-Antikörper) an (Cummings et al. (2009), Romas (2009)).

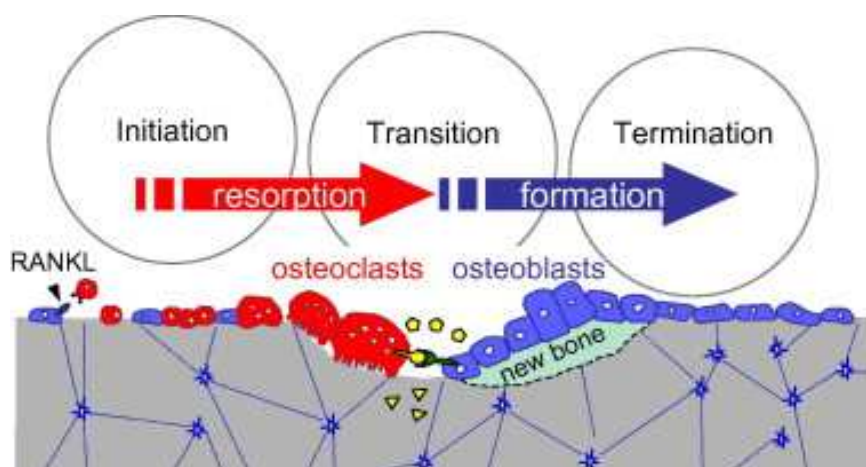


Abbildung 3: 3 Phasen-Modell des Remodelings. Die Einleitung (Initiation) startet mit der Osteoklasten-Differenzierung (rot) durch z.B. RANKL synthetisierenden Osteoblasten (blau). Es folgt die Knochenresorption. Der Übergang (Transition) wird durch so genannte coupling factors (gelb) geprägt – parakrin oder über die Knochenmatrix. Das Ende (Termination) zeigt die aufgefüllte Lacune und abschließende monolayer Schicht von Osteoblasten über dem neu gebildeten Knochen (grau) (aus Matsuo et al (2008))

1.5 Mechanotransduktion

Als Mechanotransduktion versteht man die Umwandlung äußerer Kräfte als mechanisches Signal in eine zelluläre, biochemische Antwort. Diese kann insgesamt in vier verschiedene Schritte unterteilt werden. Nach Aufnahme des mechanischen Reizes als erstem Schritt (Mechanorezeption) erfolgt die biochemische Umwandlung des Signals, die intrazelluläre Signalweiterleitung und letztendlich die biologische Antwort als Expressions-Regulation von Zielgenen (Duncan et al (1995)). Typische Reaktionen stellen die

Differenzierung, die Proteinbiosynthese, die Migration und Orientierung, die Proliferation (Mitose) und die Apoptose dar.

1.6 Mechanorezeption (Mechanosensing)

Die Fähigkeit von Zellen ihre biomechanische Umgebung zu erkennen und darauf auch zu reagieren erfordert, dass Mechanorezeptoren über die Zellmembran und ihre feste Verbindung zum umgebenden Substrat oder durch Erkennen von Konformationsänderungen des sie umgebenden Milieus (z. B. Flüssigkeitsströme) mit der Außenwelt in Kontakt stehen. Die wohl am besten untersuchten Mechanorezeptoren der Osteoblasten sind Integrine und mechanosensitive Ionenkanäle, aber auch Zell-Zell-Adhäsionen (Gap junctions), Bestandteile der Zellmembran und des Zytoskeletts sowie Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) spielen dabei eine Rolle (Ingber (2006)). Insgesamt scheinen aktuell die fokalen Adhäsionen als Zusammenspiel von extrazellulärer Matrix, Integrinen und Zytoskelett die Grundlage des Mechanosensings zu bilden. Dennoch ist es aufgrund der Vielfalt der mechanischen Signale, die einer Zelle präsentiert werden, wahrscheinlich, dass nicht ein einzelner spezieller Rezeptor für die resultierende Reaktion der Zelle auf die veränderten mechanischen Bedingungen verantwortlich ist. Verschiedene Bereiche der Zelle, die an der Mechanorezeption teilnehmen, führen zu verschiedenen Signalkaskaden im Inneren der Zelle, häufig mit beachtlicher Überschneidung. Vermutlich interagieren die einzelnen Rezeptoren, um die chemischen und mechanischen Signale, denen die Zelle ausgesetzt wird, in eine Information zusammenzufassen.

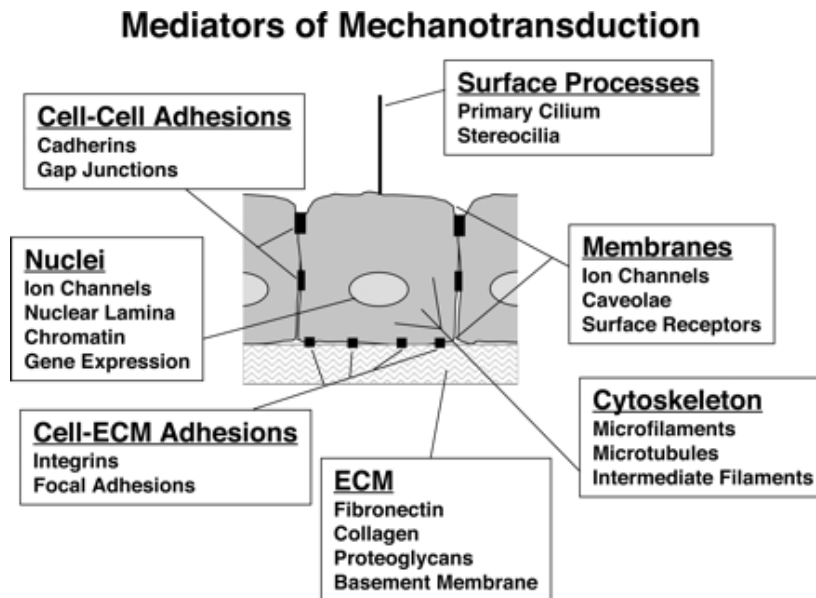


Abbildung 4: Bestandteile der Mechanotransduktion (aus Ingber (2006))

1.6.1 Integrine, Zytoskelett, ECM, fokale Adhäsionen

Offensichtlich sind die Strukturen, die die von außen wirkenden Kräfte ertragen, auch in die Erkennung der Kraft involviert. Jeder Teil eines fokalen Adhäsionskomplexes (Abbildung 5) als Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix (ECM), den Integrienen und dem Zytoskelett ist daher potenzieller Kandidat der Mechanorezeption. Untersuchungen der Zugkräfte, die Zellen auf ihr Substrat ausüben, konnten zeigen, dass die Kraft pro Fläche eines fokalen Adhäsionskomplexes annähernd konstant bei ca. $5,5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ liegt (Balaban et al. (2001)). Die Tatsache dass es unmittelbar nach Applikation eines mechanischen Reizes zu Änderungen der Morphologie einer fokalen Adhäsion kommt sprechen für einen geregelten, mechanosensitiven Mechanismus (Balaban et al. (2001)).

1.6.1.1 Integrine

Integrine sind die Zellmembran durchziehende Proteine. Als Bestandteil von fokalen Adhäsionskomplexen gewährleisten sie den Kontakt zwischen Zelle (Zytoskelett) und dem sie umgebenden Milieu (extrazelluläre Matrix). Gleichzeitig fungieren sie sowohl als Regulator der Signaltransduktion im

Inneren der Zelle durch Veränderungen der extrazellulären Matrix (Outside-in-Signaling) als auch als Regulator der Bindungsaffinität durch intrazelluläre Veränderungen (Inside-out-Signaling) (Schwartz, M.A. (2010)). Während die Aktivierung der Integrine vom Inneren der Zelle aus mittlerweile gut verstanden sind (Campbell et al. (2011)), stehen in der Funktion des outside-in-signaling noch viele Fragen aus.

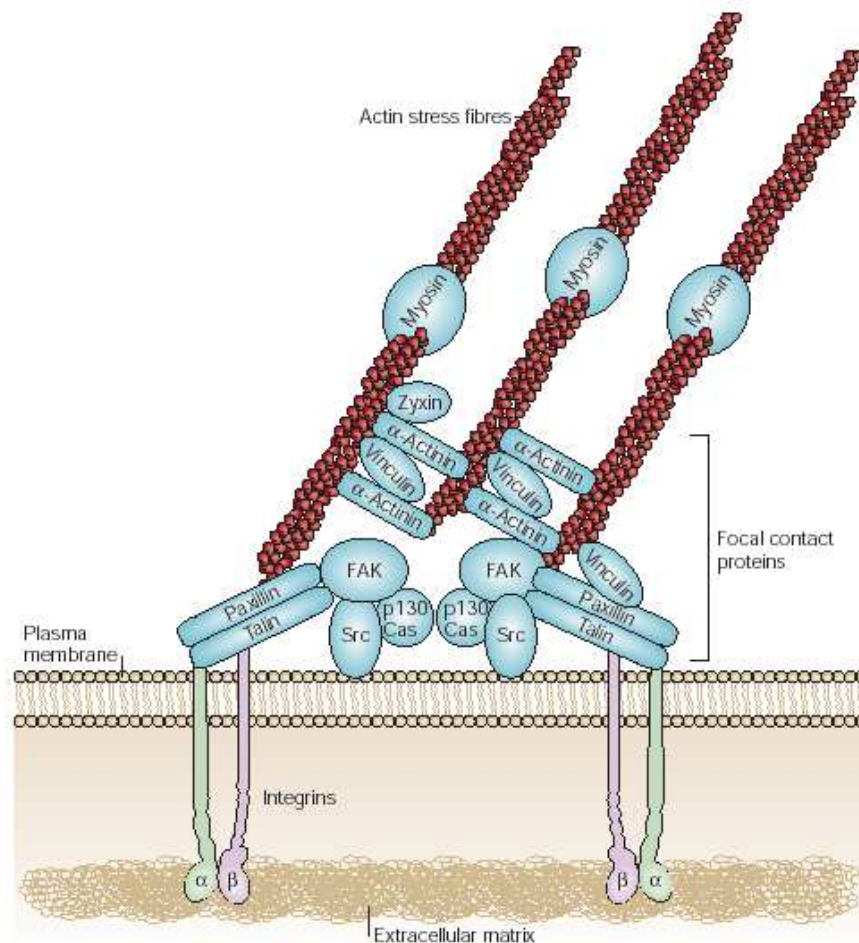


Abbildung 5: Fokaler Kontakt. Verankernde Zellverbindung aus Proteinen, die den Kontakt des Aktin-Zytoskeletts an die Extrazellulärmatrix herstellt (aus Mitra et al (2005))

Integrine selbst sind Dimere bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, wobei in Osteoblasten die β 1-Untereinheit eine führende Rolle einnimmt (Zimmerman et al. (2000)). Zu den gebundenen extrazellulären Molekülen der β 1-Untereinheit zählen u. a. Fibronectin, sowie Kollagen I und III. Auf der intrazellulären Seite ist die β -Untereinheit über Adapterproteine, wie z.B. Talin und Paxillin, Vinculin, α -Actinin und Filamin an Aktinfilamente gekoppelt. Dabei

aktiviert die fokale Adhäsionskinase (FAK) durch Phosphorylierung α -Actinin, das wiederum durch Bindung an Vinculin und die Aktinfilamente eine stabile Verbindung des fokalen Kontaktes herstellt (Mitra et al. (2005)).

Sowohl Scherspannungen über der Zellmembran als auch Deformationen der Membran durch Dehnung oder Druck werden über diese Zell-Matrix-Proteine an das Zytoskelett der Zelle weitergegeben (Katsumi et al. (2004)). Ihre Aufgabe als Mechanorezeptor konnte in vielen verschiedenen Zellarten, wie Muskelzellen (Aikawa et al. (2002)), Endothelzellen (Shyy and Chien 2002), Chondrozyten (Millward-Sadler and Salter (2004)) sowie in Knochenzellen (Salter et al. (1997)) nachgewiesen werden. Gemäß Untersuchungen von Puklin-Faucher und Friedland wird die Konformation von Integrinen durch mechanische Stimulation verändert, was ihre Aufgabe als Mechanosensor deutlich macht (Puklin-Faucher et al. (2009), Friedland et al. (2009)). In dieser Funktion nimmt die mit den Integrinen in engem Kontakt stehende FAK eine zentrale Rolle als Signalmolekül durch ihre Kinase-Aktivität und Tyrosinphosphorylierung ein (Geiger et al. (2011), Schaller (1996), Schlaepfer et al. (1999)) - auch in Osteoblasten nach mechanischer Stimulation (Boutahar et al. (2004)). So konnten Wang, Dembo et al zeigen, dass FAK γ Zellen nicht in der Lage sind nach einer mechanischen Stimulation die fokalen Adhäsionen zu modifizieren (Wang, H. B. et al. (2001)). Insgesamt kommt es durch die FAK zur Aktivierung des MAPK (mitogen-activated protein kinase) -Signalweges, als wichtiger Baustein der Signalkaskade der Mechanotransduktion (Schlaepfer et al. (1998), Boutahar et al. (2004)).

Eine weitere bedeutende Rolle in der Mechanotransduktion wird den in einem fokalen Adhäsionskomplex vorkommenden und mit den Integrinen und der FAK in direkter Verbindung stehenden Bindungsproteinen wie z.B. Talin, Paxillin, Vinculin und Zyxin eingeräumt (Schaller (1996), Subauste et al. (2004), Lele, T. P. et al. (2006)). So konnte nachgewiesen werden, dass das die Differenzierung fokaler Adhäsionen nach einer mechanischen Stimulation mit dem Recruitment von Vinculin einhergeht (Galbraith et al. (2002), Grashoff et al. (2011)). Die vermehrte Exposition von Vinculin in belasteten Adhäsionen könnte durch Freilegung versteckter Domänen in der Helix von Talin hervorgerufen werden.

Del Rio beschreibt eine damit einhergehende Aktivierung von Vinculin unter Dehnung (del Rio et al. (2009)). Ähnliche Konformationsänderungen unter Kraftausübung konnten auch für das Adapter Protein p130cas nachgewiesen werden (Sawada et al. (2006) – siehe Abbildung 5). Die Proteinfaltung als Reaktion auf eine externe Belastung ist zurzeit einer der am wahrscheinlichsten angenommenen Mechanismen zur Transformation einer mechanischen Belastung in ein biochemisches Signal (Johnson et al. (2007)).

1.6.1.2 Zytoskelett und Tensegrity

Mechanische Belastung verändert den Zellumriss, was wiederum Auswirkungen auf die Zytoskelettstruktur, bestehend aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten, hat. Das Zytoskelett ist verantwortlich für die dynamische Stabilisierung und Bewegung der Zelle sowie für ihre äußere Form und den Transport innerhalb der Zelle, z. B. als Reaktion auf einen äußeren Stimulus.

Als „Tensegrity“ bezeichnet man ein von Ingber vorgestelltes Modell, das voraussetzt, dass die Zelle über das Zytoskelett und Zelloberflächenrezeptoren fest mit der extrazellulären Matrix verbunden ist (Ingber (1997)). Nach diesem Modell ist das Zytoskelett nicht einfach für die Stabilisierung der Zelle zuständig, sondern generiert durch das Aktin-Myosin-Zusammenspiel eine Art Vorspannung innerhalb der Zelle. Eine externe Kraft kann durch dieses System nahezu sofort von einer Seite der Zelle auf die andere geleitet werden (Ingber (2003)). Veränderungen der intrazellulären Spannung durch Modifikationen der mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung können zu Veränderungen von Proteinstrukturen und damit zu einer biologischen Reaktion führen (Vogel (2006)). Andererseits führen Veränderungen der intrazellulären Spannung auch zu Umgestaltung der Zellumgebung führen. Die Aufgabe des Zytoskeletts im Ablauf der Mechanotransduktion konnte durch Rosenberg gezeigt werden, indem die durch mechanische Stimulation erwartete Proliferation in osteoblastenähnlichen Zellen nach Blockade der Aktinfilament- und Mikrotubuli-Polymerisation ausblieb (Rosenberg (2003)).

Neben der Reaktion auf extern applizierte Kräfte ist das Zytoskelett in der Lage auch aktiv endogene Kräfte aufzubauen (siehe 1.8).

1.6.1.3 Extrazelluläre Matrix

Zellen reagieren auf eine von außen ausgeübte Kraft mit einem Remodeling der extrazellulären Matrix. So konnte eine vermehrte Expression von Bestandteilen der ECM, allen voran Kollagen, in Fibroblasten nach Dehnungsstimulation nachgewiesen werden (Chiquet et al. (2003), Yang et al. (2004)), die sich entlang der Achse des mechanischen Stimulus ausrichten (Nguyen et al. (2009)). Das Endergebnis zeigt sich dann als Produktion und Anordnung der extrazellulären Matrix, die der applizierten Kraft widerstehen kann (Isenberg et al. (2003), Solan et al. (2009))

1.6.2 Ionenkanäle

Änderungen in der Aktivität von Ionenkanälen stehen in Zusammenhang mit der Aktivierung von Knochenzellen, wie z. B. durch Dehnung in Osteozyten (Mikuni-Takagaki et al. (2002), (Iqbal et al. (2005)) und Sarkomzellen (Duncan et al. 1994)). Als eine Art der Ionenkanäle werden häufig durch Stress aktivierbare und spannungsregulierbare Ca^{2+} -Kanäle beschrieben (Ryder et al. (2001)). Das Resultat der Aktivierung der Ionenkanäle ist eine De- oder Hyperpolarisierung der Zellmembran mit der Möglichkeit weiterer Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden. Neben der direkten mechanischen ist so z.B. auch eine indirekte spannungsabhängige Aktivierung von Ionenkanälen in biomechanischen Experimenten nachgewiesen worden (Li, J. et al. (2002)). Zusammenfassend haben viele Studien mechanosensitive Eigenschaften von im Knochen existierenden Ionenkanälen nachgewiesen, aber eine genaue Identifikation eines bestimmten oder einer bestimmten Gruppe von Ionenkanälen steht weiterhin aus. Dabei scheinen in Osteoblasten die mechanosensitiven Ionenkanäle, anders als in Osteozyten, als primärer Mechanosensor in den Hintergrund zu treten ((Mikuni-Takagaki et al. (2002)).

1.6.3 Connexine / Gap Junctions

Als Connexine werden Transmembranproteine bezeichnet, die durch bestimmte Anordnung Gap Junctions bilden, die den direkten Austausch von kleinen Molekülen zwischen benachbarten Zellen ermöglichen und damit einen direkten Zell-Zell-Kontakt gewährleisten. Es wird angenommen, dass diese direkte interzelluläre Kommunikation eine weitere Möglichkeit zur Mechanorezeption darstellt und es einer Zelle sogar ermöglicht eine Konsequenz aus einer weiter entfernten Änderung des biomechanischen Umfelds zu ziehen (Donahue (2000), Yellowly et al. (2000)). Tatsächlich resultiert eine Unterbrechung dieses zellulären Netzwerkes in einer reduzierten Sensitivität auf verschiedene Stimuli (Saunders et al. (2001), Vander Molen et al. (2000)). Außerdem stellte Alford dar, dass mechanische Stimulation zu einem MAPK-vermittelten Anstieg der Connexin-Expression führt und damit anzunehmen ist, dass die bessere resultierende Kommunikation der Zellen untereinander evtl. eine Art positive Verstärkung ist (Alford et al. (2003)).

1.6.4 Substratsteifigkeit, Durotaxis

Zellen sind in der Lage die Steifigkeit des umgebenden Substrates, der extrazellulären Matrix, zu erkennen und ihre auf das Substrat ausgeübte Kraft entsprechend zu verändern (Lo et al. (2000), Saez et al. (2005), Ingber, D. E. (2006)). Weiterhin besteht eine Neigung der in Richtung des härteren, rigideren Untergrundes zu migrieren (Durotaxis) ((Lo et al. (2000), Saez et al. (2005), Pelham et al. (1997)). In diese Phänomene sind gemäß Untersuchungen von Kobayashi, neben mechanosensitiven Adapterproteinen und Actin-Stress-Fibres in den fokalen Adhäsionen, auch mechanosensitive Kalziumkanäle involviert (Kobayashi et al (2010)). Auch Proliferation und Apoptose von Zellen scheint durch die Substratsteifigkeit beeinflusst zu werden (Wang, et al. (2000)). Interessanterweise differenzieren mesenchymale Stammzellen in verschiedene Zelllinien in Abhängigkeit der Elastizität des Substrats, auf dem sie ausgesät sind (Engler et al. 2006). Insgesamt registrieren Zellen die Compliance des umgebenden Substrats durch die von ihnen aufgewendete Kraft und die

dadurch resultierende Änderung des Substrats. Eine besondere Rolle scheint hierbei die FAK (fokale Adhäsionskinase) einzunehmen, da FAK γ Zellen nicht in der Lage sind zwischen rigidem und flexiblem Substrat zu unterscheiden (Wang, H. B. et al. (2001)).

1.7 Signaltransduktion

Die Belastung von Knochenzellen, sei es durch Dehnung oder Scherfluss, führt zu Veränderungen verschiedenster Zellfunktionen, wie z.B. Proliferationssteigerung (Kaspar et al. (2002)), Änderungen der Genexpression oder Produktion von extrazellulärer Matrix (Harter et al. (1995), Yang et al. (2004), You et al. (2001)). Um dies zu gewährleisten erscheint es offensichtlich, dass verschieden Signalwege und letztendlich Transkriptionsfaktoren durch die angewendete Kraft aktiviert werden. Einen schematischen Überblick der Signalwege zeigt Abbildung 6. Auf einige dieser Signalwege soll im Weiteren kurz eingegangen werden.

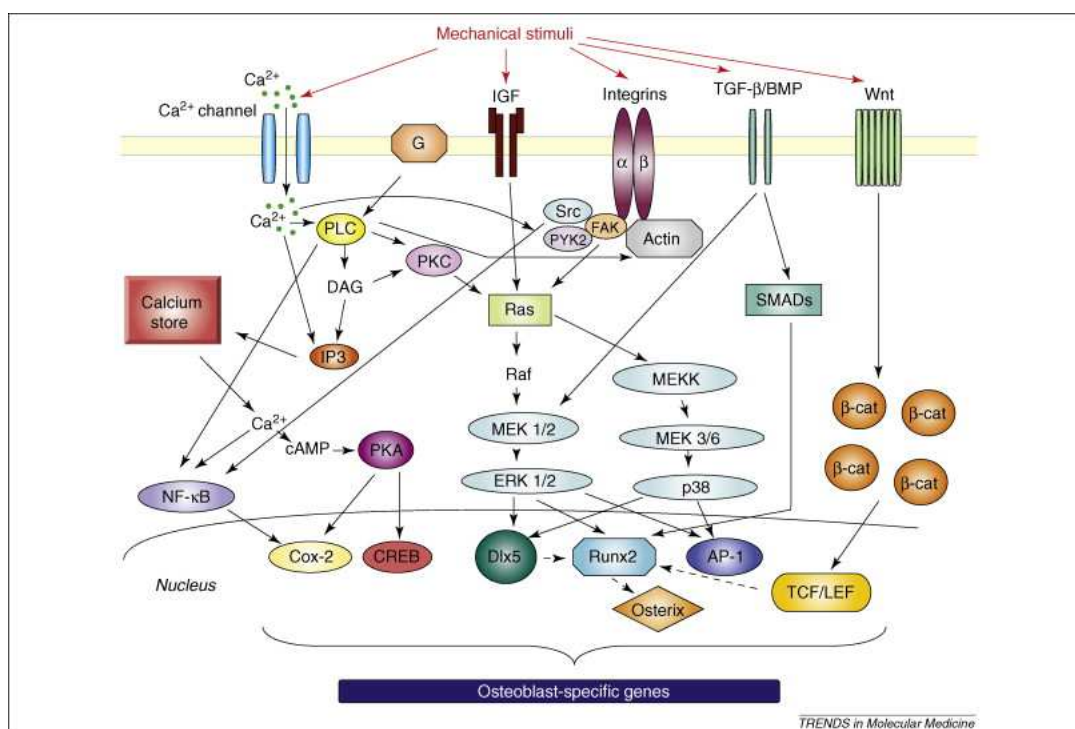


Abbildung 6: Signaltransduktionswege in Osteoblasten nach mechanischer Stimulation. Membrangebundene Rezeptoren wie Integrine, Ionenkanäle, und G-Proteine führen über verschiedene Mechanismen, v.a IP-3 Kaskade und MAPK zur Induktion von Transkriptionsfaktoren (aus Papachroni et al. (2009))

1.7.1 MAPK (ERK)

In vielen Studien konnte die Aktivierung der MAPK (mitogen-activated protein kinasen) in Knochenzellen durch die Ausübung eines mechanischen Stimulus dargestellt werden. (You et al (2001), Yang et al. (2004), Jessop et al. (2002)). Die mechanische Aktivierung von ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase) ist zum einen für die Regulation bestimmter Gene, zum anderen für die Proliferation von Knochenzellen erforderlich (Yang et al. (2004), Boutahar et al. (2004)). Wie und über welche Mechanismen die Aktivierung des ERK-Signalweges erfolgt, ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Involviert scheinen sowohl Integrine, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren als auch membranständige G-Proteine und Ionenkanäle über die aktivierte Proteinkinase C zu sein, die letztendlich zu einer Konformationsänderung des Proteins Ras (Rat sarcoma) und damit zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade führen.

1.7.2 Kalzium

Sowohl Dehnung, Scherfluss als auch Druck als äußere Kraft führen zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Rath et al. (2010), Tenbosch (1999), Adachi et al. (2003), Hung et al. (1995)).

Außerdem konnte dargestellt werden, dass eine Blockade des Kalzium-Signalweges während mechanischer Stimulation nicht zu der zu erwartenden Veränderung der Genexpression führt (Chen et al. (2000), You et al. (2001)). Der schnelle Anstieg von Kalzium als typischer second messenger vieler intrazellulären Signalwege basiert vor allem auf der Aktivierung von PLC (Phospholipase C) durch G-Proteine oder membrangebundenen Kalziumkanäle, was wiederum eine Aktivierung von IP3 (Inositoltriphosphat) und eine Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern zu Folge hat. Über diesen Signalweg kommt es z.B. bei Osteoblasten, die einem Scherfluss ausgesetzt sind, zu einer gesteigerten Expression von c-fos und cox-2 (cyclooxygenase-2)(Chen et al. (2000)) sowie Osteopontin (You et al. (2001)).

Eine weitere interessante Rolle von Kalzium als Signalmolekül wurde von Wiltink et al. beschrieben. Demnach kommt es bei durch Dehnung stimulierten Osteoklasten zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums über dehnungsaktivierbare Kalziumkanäle und kalziumabhängige Kaliumkanäle mit der Folge einer verminderten Aktivität und Ausbreitung der Osteoklasten (Wiltink et al. (1995), Espinosa et al. (2002)).

1.7.3 NO (Stickstoffmonoxid)

NO hat verschiedene Auswirkungen im Knochen (Ralston (1997)) und könnte daher auch eine Rolle in der Mechanotransduktion einnehmen, da die Produktion von Stickoxid in Knochenzellen nach mechanischer Belastung zunimmt (Bakker et al. (2001), Vatsa et al. (2006), Vatsa et al. (2007), Rubin et al. (2003)).

1.7.4 G-Proteine

Guaninnucleotid-bindende Proteine stellen ein Element vieler Signalkaskaden dar. So sind G-Proteine in der durch äußere Kraftanwendung entstehenden Steigerung der intrazellulären Konzentration von cAMP (cyclischem Adenosinmonophosphat) und MAPK (mitogen-activated protein kinase) sowie der dadurch folgenden Regulation der Genexpression involviert.

Die G-Proteine Ras (Rat sarcoma) und Rho (Ras homolog) werden nach mechanischer Belastung von Gefäßendothelzellen aktiviert (Li et al. (1999), Gudi et al. (2003)). Diese belastungsabhängige Aktivierung konnte später auch in Osteoblasten nachgewiesen werden (Kanno et al. (2007)). Weiterhin spielt das G-Protein Rho im Rahmen der Formation von fokalen Adhäsionen und Stress Fibres (kontraktile Aktin-Myosin-Filamente) nach mechanischer Belastung eine Rolle (Chrzanowska-Wodnicka et al. (1996), Chiquet et al. (2003)).

1.7.5 WNT/ β -Catenin

Ein weiterer Signalweg, der in der Mechanotransduktion eine Rolle spielt, ist der Wnt-Signalweg. Nachdem Wnt an den Rezeptor gebunden hat, kommt es intrazellulär zu einer Aktivierung von β -Catenin, das mit TCF (T-cell factor) einen Proteinkomplex bildet und so spezifische Zielgene aktiviert. Erste Erkenntnisse über die Rolle dieses Signalweges im Zusammenhang mit mechanischer Belastung konnte Norvell et al. in Osteoblasten nach Scherfluss-Belastung darstellen (Norvell et al. (2004)). Auch nach Dehnung konnte sowohl in vivo als auch in vitro eine Aktivierung des Wnt/beta-Catenin-Signalweges nachgewiesen werden (Robinson et al. (2006)). Andere Dehnungsexperimente mit Knochenzellen zeigten zunächst einen Anstieg mit anschließendem Abfall von beta-Catenin (Jansen et al. (2010)). Insgesamt konnten in Abhängigkeit des Reifegrades von Osteoblasten unterschiedliche Auswirkungen des Wnt-Signalweges auf die Differenzierung und Matrixproduktion festgestellt werden (Eijken et al. (2008)).

Sclerostin, sezerniert von in der Knochenmatrix eingebetteten Osteozyten, stoppt Osteoblasten und damit die Knochenformation (van Bezooijen et al. (2004)). Sclerostin blockiert gemäß Untersuchungen von Lin et al. selektiv den Wnt/beta-Catenin-Signalweg und unterbindet auf diese Weise die Aktivität der Osteoblasten (Lin et al. (2009)).

1.8 Zugkräfte

Neben den typischen Beispielen der auf Kräfte spezialisierten Zellen zur eigentlichen Mechanik des menschlichen Körpers wie Muskelzellen und Fibroblasten sind wahrscheinlich alle Zellen in der Lage Kräfte auf ihre Umgebung auszuüben. Wie in 1.6.1.2 beschrieben besteht ein Zusammenhang zwischen Zytoskelett und der extrazellulären Matrix (Tensegrity-Modell), wonach Veränderungen der Zellumgebung zu Veränderungen des Zytoskeletts führen und Spannungen des Zytoskeletts auf die extrazelluläre Matrix übertragen werden. Eine Zelle ist demnach in der Lage aktiv Kraft, generiert durch ihr Zytoskelett, auf die sie umgebende Struktur (extrazelluläre Matrix) auszuüben.

1.9 Zugkraftmessungen

Um in Zell-Experimenten die Reaktionen ausgelöst von einem mechanischen Reiz zu untersuchen, kommen, wie bereits in 1.3 beschrieben, verschiedene Stimulationsarten, wie Scherfluss, Dehnung und Kompression zum Einsatz. Die Reaktionen können dabei sehr unterschiedlich ausfallen, wobei die Veränderung der Kraft, die eine Zelle auf ihr umgebendes Milieu ausübt, eine mögliche Reaktion darstellt. Zugkraftmessungen spiegeln dies wieder. Über diese Messungen konnten bereits Untersuchungen zu Migrationsverhalten der Zellen, Einflüsse der extrazellulären Matrix und Auswirkungen elektrischer Spannung erfolgreich durchgeführt werden (Curtze et al. (2004), Gaudet et al. (2003), du Roure et al. (2005)).

Zur Analyse der ausgelösten Kräfte bedarf es eines bestimmten Substrates, das die Haftung der Zellen, bzw. der Matrix gewährleistet, in einem großen Bereich lineare elastische Eigenschaften aufweist, zur Sichtbarkeit der Reaktion bestimmte Marker enthält und zum einen eine für die Zelle angemessene Steifigkeit aufweist, zum anderen aber nicht toxisch auf die Zellen wirkt. Ein solches Substrat konnte durch Pelham und Wang in Form eines Polyacrylamidgels vorgestellt werden (Pelham und Wang (1997), (1998), (1999), Wang und Pelham (1998)).

1.9.1 Das Prinzip der hier verwendeten Art der Zugkraftmessung

Die Grundlage der Experimente bildet das oben genannte Polyacrylamidgel, das erstmalig von Pelham und Wang vorgestellt wurde. Durch Einbringen von fluoreszierenden Partikeln ist es möglich die Auswirkungen der Zellen auf das Gel als Substrat zu beobachten. So kommt es beim Anwachsen der Zellen zur Verformung des elastischen Gels und damit zu einer Verschiebung der eingebrachten Partikel. Löst man die Zelle vom Untergrund ab, kommt es zu einer Relaxation des Gels. Durch Analyse der Distanzänderung der Partikel lassen sich jetzt bei Kenntnis des Elastizitätsmoduls des Gels Zellkräfte berechnen.

1.9.2 Definition von Strain

Als Einheit der Deformation in der Mechanik wurde der Begriff ‚Strain‘ (ϵ) eingeführt, wobei 1 Strain eine Längenänderung von 100 %, entsprechend 1000 μ Strain 0,1% bedeutet. In physiologischen Systemen wird gewöhnlich die Längenänderung in $\mu\epsilon$ angegeben. Eine Änderung von 1 $\mu\epsilon$ repräsentiert hier also eine Änderung der Länge um 0,0001 %.

$$E = \frac{\Delta L}{L} = \frac{l - L}{L}$$

- L: Originallänge des belasteten Materials
l: gedehnte Länge des belasteten Materials

1.10 Klinische Relevanz

Um die verschiedenen pathologischen Verhältnisse des Knochensystems zu verstehen und deren Therapieansätze, incl. mechanischer Stimulation, weiter zu entwickeln ist es unumgänglich die Adaptationsprozesse des Knochens an verschiedene mechanische Beanspruchungen nachzuvollziehen.

Während klar scheint, dass Knochenzellen mechanosensitiv sind und dass die Adaptation neben der Knochenmasse auch die Knochenzusammensetzung betrifft, ist weiterhin nicht eindeutig bewiesen, wie und durch welche Zellen und Rezeptoren der mechanische Stimulus registriert wird, in ein Signal umgewandelt und letztendlich in der Zelle transportiert wird, um zu einer Zellantwort zu führen.

Um die bisherige medikamentöse Therapie der Knochenerkrankungen, allen voran die Osteoporose, durch gezielte Belastung zu unterstützen sind weitergehende Untersuchungen der zellulären und molekularen Reaktionen dringend notwendig.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Knochenzellen, insbesondere Osteoblasten und die aus ihnen hervorgehenden Osteozyten, spielen eine besondere Rolle in der Detektion von mechanischen Reizen und deren Weiterleitung zu einem biologischen Ergebnis.

Die Erkenntnisse der bislang durchgeführten Experimente zur mechanischen Stimulation von Osteoblasten durch Dehnung beruhen auf der Proliferationssteigerung, Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade oder der Reaktion in Form geänderter Genexpression bzw. Proteinbiosynthese. In seiner Arbeit zur Zugkraftanalyse an Osteoblasten nach mechanischer Stimulation konnte Lautenschläger erstmalig eine Veränderung der Zugkräfte in zyklisch stimulierten Zellen feststellen (Lautenschläger (2007)). Diese traten v.a. innerhalb der ersten 5 Sekunden nach Reiz-Applikation durch Dehnung auf. Durch einen verbesserten Versuchsaufbau sowie dem Einsatz einer hochauflösenden Kamera ist eine schnellere Detektion der Reaktionen unmittelbar nach Stimulation möglich. In der hier vorliegenden Arbeit sollen mit Hilfe der Zugkraftmessung die auftretenden Änderungen der Kräfte in primär bovinen Osteoblasten nach Dehnung verifiziert werden und gleichzeitig mit dem Verhalten von Osteosarkomzellen verglichen werden. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse könnten zum einen zum weiteren Verständnis des Knochensystems und der Mechanotransduktion beitragen, zum anderen Unterschiede in pathologischen Zellen in Bezug auf deren Fähigkeit zur Ausübung einer Kraft auf die Umgebung und zur Reaktion auf einen äußeren Reiz darstellen.

2 Material und Methoden

Anmerkung: Die zur Standardausstattung eines Labors zählenden Substanzen, Materialien und Geräte werden in den einzelnen Abschnitten nicht separat aufgeführt. Zur besseren Übersicht sind die verwendeten Materialien am Ende der betreffenden Unterkapitel angegeben.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Arbeiten im Zelllabor bis zum eigentlichen Experiment wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt und orientierten sich weitgehend an Lindl und Bauer (1994) und Spector et al. (1998). Die Experimente dieser Arbeit wurden an primär bovinen Osteoblasten (POB) (Jones und Bingmann, (1991)), sowie der Osteosarkomzelllinie Mg-63 (Billiau et al., (1977)) durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte als Einzelzellschicht (Monolayer) in den speziell dafür vorgesehenen Zellkulturschalen und Zellkulturflaschen. Zur Anzucht der primär bovinen Osteoblasten wurde Ham's F10 und für die Osteosarkomzelllinie RPMI 1640 Medium eingesetzt. Die Zellzüchtung fand im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ statt.

Kulturmedien:

- Für primär bovine Osteoblasten (POB):
 - 500ml Hams F10 (Gibco 31550 (enthält 146mg/l Glutamin), LOT 239597)
 - + 1 ml/l Vitamin C Stammlösung
 - + 50ml FCS (=10% FCS)
 - + 25000U/l Penicillin/Streptomycin (PAA LOT P01008-0589)
- Für Osteosarkomzelllinie (MG-63)
 - 500ml RPMI 1640 Medium (Gibco 11835, LOT 9833)
 - + 1 ml/l Vitamin C Stammlösung
 - + 50ml FCS (=10% FCS)
 - + 25000U/l Penicillin/Streptomycin (PAA LOT P01008-0589)

- Vitamin C Stammlösung:
 - 5 g L Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n-Hydrate (WAKO013-12061)
- Fetales Kälberserum (FCS) der Firma Sigma (LOT 075K3397)

Geräte für die Zellkultur:

- Begasungsbrutschrank für die Zellkultur Heraeus Instruments
- Autoklav Varioklav Dampfsterilisator Typ 250T
- Heißluftsterilisator Heraeus Instruments
- Zellzähler CASY 1 Schärfe System
- Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm Porengröße Schleicher & Schuell
- Sterilwerkbank Gelaire BSB 4
- Zentrifuge Hettich universal
- Phasenkontrastmikroskop Olympus CK2(BH2-RFCA) Olympus mit Objektiven A 10PL, LWD CA 20PL, LWD CD Plan 40PL
- Gewebekulturschalen für die Zellkultur Ø 14 cm Cellstar Greiner Bio-one Kat Nr. 639160
- Gewebekulturflasche 50 ml Cellstar Greiner Bio-one (LOT 0813195)
- RP Test Tubes 50ml, Cellstar Greiner Bio-one Kat Nr. 227261

2.1.2 Osteosarkomzellen MG-63

Für Experimente mit mechanosensitiven Osteosarkomzellen stand die humane Osteosarkomzelllinie MG-63 zur Verfügung. Diese wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, MD, USA bezogen.

2.1.3 Gewinnung primär boviner Osteoblasten

Die Osteoblasten wurden aus dem Periost boviner Knochen nach dem Auswachsverfahren (Jones und Bingmann (1991)) gewonnen. Hierzu wurden die Metacarpalen eines frisch geschlachteten Jungbullen von einem ortsansässigen Schlachthof verwendet. Nach Desinfektion mit Alkohol wurden

die Knochen unter sterilen Bedingungen von den Weichteilen befreit und gründlich mit PBS (phosphate buffered saline) gespült. Anschließend wurden 5mm dicke Perioststreifen vom Knochen abpräpariert und für 3 x 10 Minuten in Earles Lösung bei 37°C gewaschen. Nach erneuter 20 minütiger Behandlung mit Earles Lösung mit Antibiotikazusatz erfolgte die weitere Unterteilung der Perioststreifen in 5mm x 5mm große Stücke. Jeweils 8 - 10 dieser Stücke wurden in vorbereiteten Zellkulturschalen gleichmäßig ausgesetzt und in mit Antibiotika versetztem BGjb Medium bei 37°C inkubiert. Ein erster Mediumwechsel erfolgte nach 24h und anschließend einmal pro Woche. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens (4 – 5 Wochen) wurden die Zellen direkt für Experimente verwendet oder in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Medien:

- PBS Lösung Gibco REF14190-094 Lot 404522
- Earles Lösung
 - 100 ml Earles 10x (Biochrom KG, No.L 1925, Lot 1109G)
 - + 894 ml ddH₂O
 - + 6 ml 7,5% NaHCO₃ Lösung aus NaHCO₃ (Merck 6329 Lot 241K17 943529)
- Earles Lösung + Antibiotikum (Pro 1 l Earles-Lösung):
 - + 500000 IE Penicillin/Streptomycin (PAA: P11-010)
 - + 4 mg/l Amphotericin B (PAA: P11-001; 250µg/ml)
- BGjb Medium (US Biological, Kat. Nr.:31091, LOT L6012788)
 - 900 ml dd H₂O
 - + 21.3g BGjb Medium
 - + 1.2g/l NaHCO₃
 - + 10% FCS 75K (100ml)
 - + 1 ml/l Vitamin C Stammlösung
 - + 25000IU Penicillin/Streptomycin
 - dann den pH auf 7.2 titrieren und steril filtrieren

2.1.4 Passagieren der Zellen

Bei Erreichen eines dicht bewachsenen Zellrasens konnten die Zellen passagiert werden. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Mittels einer Trypsin/EDTA Lösung erfolgte dann bei 1-3 minütiger Inkubation im Brutschrank die Ablösung der Zellen vom Untergrund. Die Enzymreaktion wurde anschließend mit der dreifachen Menge Medium gestoppt und in einem Greiner-Röhrchen bei 1000 Umdrehungen/min für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des überstehenden Mediums konnte das gewonnene Zellpellet mit einer entsprechenden Menge frischem Medium resuspendiert und in der Verdünnung 1:5 in neue sterile Kulturflaschen überführt, kryokonserviert oder direkt für Experimente benutzt werden.

Material:

- Trypsin / EDTA 10x
 - 100 ml Stammlösung (Sigma X0930 Lot S04147X0930)
 - 900 ml PBS Lösung

2.1.5 Kryokonservierung

Für einen längeren Konservierungszeitraum wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C tiefgekühlt. Nach Ablösen der Zellen, Zellzählung und Einstellung der Zellzahl auf zwei Millionen Zellen pro Milliliter wurde die Zellsuspension hierfür in auf Eis gelagerte Kryoröhrchen überführt und 1:1 mit Einfriermedium versetzt. Die langsame Abkühlung der Zellen zur Vermeidung von Kälteschäden erfolgte in einem geschlossenen Styroporgefäß im Tiefkühlschrank bei -80 °C für 12 Stunden. Anschließend konnten die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert werden.

Um die kryokonservierten Zellen wieder für ein Experiment benutzen zu können, wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in 10 ml vorgewärmtes Ham's F10 überführt und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert.

Das gewonnene Zellpellet wurde in frischem Medium gelöst und in Kulturflaschen ausgesät. Ein erster Mediumwechsel fand nach 24h statt.

Medium:

- Einfriermedium
 - Hams F10 Gibco
 - 10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) (Roth A994.1)

2.1.6 Zellzählung und Aussäen der Zellen

Für eine gleichmäßige Dichte der Zellen pro Fläche bei den einzelnen Experimenten wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension mit Hilfe des Zellzählers CASY bestimmt. 50µl der Zellsuspension wurden in 10ml isotonischer Salzlösung (Casyton) resuspendiert und die Zellkonzentration pro ml bestimmt.

Um eine semi-konfluente Zellkultur zu erreichen wurden die Zellen mit einer Dichte von 3500/cm² ausgesät und, um ein Anwachsen der Zellen auf dem Untergrund zu gewährleisten, für 48 - 72h (Osteoblasten), bzw. 24 – 48h (Osteosarkomzellen) im Brutschrank inkubiert.

2.1.7 Phänotypisierung der Osteoblasten

Um die bei der periostalen Auswachsmethode gewonnenen Zellen tatsächlich als Osteoblasten zu identifizieren, wurde bei jeder gewonnenen Zell-Charge eine Phänotypisierung anhand spezifischer Knochenzellproteine (Osteocalcin, Kollagen I, Knochen-Sialoprotein (BSP)) durchgeführt (Robey (1989)). Die einzelnen synthetisierten Eiweiße wurden immunzytochemisch mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen (labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LSAB)).

Dazu wurden die Zellen auf Deckgläsern für zwei Tage bis zur Konfluenz in Vollmedium kultiviert und anschließend nach dreimaligem Spülen mit PBS durch ein Methanol/Aceton-Gemisch (1:1) bei -20°C fixiert. Nach erneutem

Waschen mit PBS erfolgte die Behandlung mit 0,3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für 10 min bei Raumtemperatur (Blockade der endogenen Peroxidasen) und drei weitere PBS-Spülungen. Daraufhin wurden die Zellen nacheinander mit dem spezifischen Antikörper (Anti-Osteocalcin, Anti-Kollagen I, Anti-Knochen-Sialoprotein(BSP)), einem Biotin-konjugierten Antikörper und zuletzt mit Peroxidase-konjugiertem Streptavidin für jeweils 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend an den jeweiligen Arbeitsschritt erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang mit PBS. Als nächstes wurde die Färbelösung für 10 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit zugegeben. Nach Abstoppen der Reaktion durch 10 minütiges Spülen mit H₂O wurden die Proben luftgetrocknet und mit Glyceringelatine konserviert. Die Beurteilung der Reaktion erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

Die Positivkontrolle wurde mit einem Vimentin-Antikörper (Vimentin kommt in allen mesenchymalen Zellen vor), die Negativkontrolle mit Mausserum anstelle des ersten Antikörpers durchgeführt.

Material:

- Antikörper in Verdünnung
 - anti-Vimentin (mouse) Boehringer Mannheim; Clone V9 #814318 1:4
 - anti-Osteocalcin (mouse) Larry Fisher (NIH) 1:50
 - anti-Kollagen I (rabbit) Chemicon AB765 1:30
 - anti-BSP (rabbit) Larry Fisher LF6 1:100
- Biotin-konjugierte AK
 - anti-Mouse Boehringer #1089285 1:50
 - anti-Rabbit Boehringer #1214659 1:50
- Peroxidase-konjugiertes Streptavidin
 - Streptavidin Boehringer #1089153 1:30
- Färbelösung

2.1.8 MTT-Zellproliferationsassay

Um das Proliferationsverhalten von Osteoblasten und Osteosarkomzellen in Bezug auf ihre mechanische Sensitivität zu untersuchen wurde der MTT-Proliferationsassay nach Mosmann herangezogen. Die Zellen wurden mit und ohne mechanische Stimulation untersucht.

In diesem quantitativen, spektroskopischen Assay (Mosmann (1983)) wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase in das wasserunlösliche dunkelblaue Formazan gespalten. Dieser Vorgang findet nur in lebenden Zellen statt (Slater et al. (1963)). Die auf diese Weise entstandenen Formazankristalle können durch organische Lösungsmittel oder Isopropanol gelöst und anschließend die optische Dichte des umgesetzten Farbstoffes, die mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen korreliert, bestimmt werden.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20000 Zellen/cm² in 9-Loch Dehnungsplatten ausgesät und an den folgenden beiden Tagen mit einer Frequenz von 1Hz dreißigmal mit 4000 μ Strain gedehnt. Nach der mechanischen Stimulation erfolgte jeweils ein Mediumwechsel. Nach Entfernen des Mediums am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit 100 μ l MTT-Lösung (Lösung 2) bei 37°C für 4h. Anschließend wurde die MTT-Lösung durch das Lösungsmittel (Lösung3) ausgetauscht und erneut für 5 - 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur photometrischen Messung der Extinktion bei 580nm wurden die Proben dann in Mikrotiterplatten überführt. Die Extinktion korreliert dabei proportional mit der Aktivitäts- und damit der Proliferationssteigerung der jeweiligen Zellen.

Die Kontrollplatten wurden in der gleichen Art und Weise behandelt, jedoch nicht gedehnt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (Wilcoxon (1945), Mann, Whitney (1947)).

Material:

- MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid), Sigma
- Lösung 1: MTT-Stammlösung
5 mg MTT/ml PBS
- Lösung 2: MTT-Lösung
1:10 Verdünnung aus MTT-Stammlösung in Ham's F10 ohne Zusätze
- Lösung 3: Lösungsmittel
20 % Sodium dodecylsulfat, 50 % Dimethylformamid in ddH₂O
oder Isopropanol
- Vier-Punkt-Dehnungsmaschine (Jones et al. (1993), Bromme (2000))
- Polycarbonatplatten (Dicke 2,8 mm) mit aufgeklebter Silikonbegrenzung
(Löcher: 9 x 0,7mm)

2.2 Polyacrylamidgele für die Zugkraftmessung

2.2.1 Herstellung der Aclar-Folien als Gelunterlage

Zur Durchführung von Experimenten wurde als Grundlage Aclar-Folie in der Dicke von 198µm benutzt. Diese Folie aus Polychlorotrifluoroethylene (PCTFE), einem Teflon ähnlichen, biochemisch inerten und gegenüber Chemikalien widerstandsfähigem Material, verhält sich bei Dehnung bis über 1% (10000 µstr) homogen-elastisch, bei über 4% (40000µstr) reißt sie. Darüber hinaus ist Aclar transparent, zeigt keine Autofluoreszenz und erlaubt damit verlustfreie fluoreszenzmikroskopische Beurteilungen der Zellen während des Versuches.

Zur Vorbereitung der Zell-Versuche wurde die Folie entsprechend der Klemmhalterungsgröße der Dehnungsmaschine auf eine Abmessung von 20 x 110mm zugeschnitten, aus einer Silikonmatte ein runder Zellkammerring mit einem Durchmesser von 18mm, ausgestanzt und dieser Ring mittels Silikonkleber auf die in Streifen geschnittene Aclar-Folie geklebt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Rückstände des Klebers innerhalb der Zellkammer zurückblieben, um die spätere Deckung der Gele mit runden Deckgläsern nicht zu behindern. Die Kammer hatte bei einer Höhe von 2mm ein

Fassungsvermögen für das Zellmedium von 0,5ml. Nach Trocknung bei Zimmertemperatur für 24h wurde die Aclar-Folie mit aufgeklebter Zellkammer zum Herauslösen der Essigsäurereste des Klebers in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 70%igen Alkohol sterilisiert.

Material:

- ACLAR 33C, Honeywell, England
- Silikonmatten, med. Qualitätsgrad, 55 Shora A
- Silikonstanze Boehm, Frankreich, PL320CM
- Silikonkleber Marina klar, Belgien, Art-Nr. A -1072
- Ethanol (70%)
- destilliertes Wasser

2.2.2 Gießen der Polyacrylamidgele

Die Vorbereitung der Aclarfolien als Substratunterlage, sowie die Herstellung der Polyacrylamidgele erfolgten weitestgehend nach der für Glas bekannten Methode nach Wang und Pelham (Wang und Pelham (1998), Pelham und Wang (1999)).

2.2.2.1 Vorbereitung der Aclarfolie als Substratunterlage

Um ein Haften der Gele an den Aclarfolien zu gewährleisten mussten diese entsprechend vorbehandelt werden. Zunächst wurde die Oberfläche mit einem Tropfen 0,1-molaren NaOH-Lösung gereinigt und anschließend luftgetrocknet. Danach schloss sich die Behandlung mit 3-Aminopropyltriethoxysilane an. Nach einer Einwirkzeit von 3-5 min folgte ein 3 x 5minütiges Waschen mit destilliertem Wasser und die Inkubation der Zellkammern mit Glutaraldehyde 0,5% in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Dabei dienten die beiden letztgenannten Chemikalien der Verbindung zwischen Aclar-Folie und dem später darauf gegossenen Gel. Als letztes wurden die Reste des Glutaraldehyds durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten mit destilliertem Wasser entfernt.

2.2.2.2 Herstellung der Polyacrylamidgele

Die Elastizität bzw. Steifigkeit von Polyacrylamidgelen lässt sich durch Veränderung der Konzentration von BIS-Acrylamid variieren. Die Beschaffenheit des Substrates beeinflusst dabei Zelleigenschaften, wie Wachstum, Adhäsion oder Bewegung (Wang et al. (2000), Pelham und Wang (1998), Lo et al. (2000)). Für bovine Osteoblasten und Osteosarkomzellen hat sich in vorangegangenen Experimenten eine Konzentration von 0,04% (Osteosarkomzellen) - 0,06% (Osteoblasten) BIS-Acrylamid im Gel bewährt (Curtze (2004)). Aufgrund besserer Qualität der Gele auf Aclarfolie bei höheren Konzentrationen und des besseren Vergleichs zwischen Osteoblasten und Sarkomzellen wurden in den hier durchgeführten Versuchen alle Gele mit einem BIS-Acrylamid-Anteil von 0,06% gegossen.

Zur Produktion der Gele wurde, basierend auf einer 10%igen Acrylamid-Stammlösung (pH 8,5) und einer 1%igen BIS-Acrylamid-Stammlösung (pH8,5), eine 8%ige Acrylamidlösung mit einem BIS-Acrylamid-Anteil von 0,06% hergestellt und dieser die für die Zugkraftmikroskopie notwendigen Fluoreszenzpartikel zugefügt. Dabei betrug die Menge der fluoreszierenden Latexpartikel pro ml Acrylamid-Mischlösung 12µl der 0,2µm und 4µl der 0,5µm im Durchmesser messenden Partikel. Nach gründlichem Durchmischen im Vortexer wurde zur Entfernung der Luftblasen das Gemisch für 10 Minuten in einem Unterdruckgefäß mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, um ein blasenfreies Gel zu gewährleisten. Der Start der Polymerisation erfolgte anschließend mit 5µl 10%iger APS-Lösung und 1,2µl TEMED als Katalysator der APS-Radikalbildung. Im Anschluss musste sofort mit dem eigentlichen Gießen der Gele begonnen werden. Dazu wurden 14µl der vorbereiteten Lösung in die Zellkammer der präparierten Aclar-Folien pipettiert und umgehend mit einem mit Regenabweiser vorbehandelten runden Deckglas (Ø 16mm) abgedeckt. Durch die gleichmäßige Ausbreitung des Gels unter dem Deckglas konnte bei konstanter Gelmenge eine immer gleiche Gelhöhe von 70µm erreicht werden.

$$h = \frac{V}{A} = \frac{V}{\pi \cdot r^2} = \frac{14\text{mm}^3}{\pi \cdot (8\text{mm})^2} \approx 70\mu\text{m}$$

h = Gelhöhe (mm)
V = Gelvolumen (mm³)
A = Gelfläche (mm²)
r = Radius des Gelzylinders

Die Erfolgsquote der Gelherstellung konnte im Verlauf der Versuche durch Nutzen von kleineren Deckgläsern (Ø 14mm) verbessert werden. Grund dafür waren die nicht immer zu vermeidenden Restbestände des Silikonklebers innerhalb der Zellkammer, die ein planes Aufliegen der Deckgläser auf dem Gel verhinderten.

Um mit Hilfe der Schwerkraft an der Oberfläche des Gels eine für die Versuche ausreichende Anzahl der physikalisch dichteren Fluoreszenzpartikel zu erreichen, wurden die Aclar-Folien zum Aushärten der Gele um 180° gedreht und mit dem Deckglas nach unten für 6 -12h im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Nach Abschluss der Polymerisation wurden die Deckgläser entfernt und die Gele in den Zellkammern für 2 x 15 Minuten in 50mM HEPES-Pufferlösung pH 8,5 bei Raumtemperatur gewaschen.

Material:

- Präparierte Aclar-Folie mit Zellkammer
- 3-Aminopropyltriethoxysilane 98%; H₂N(CH₂)₃Si(OCH₃)₃; Sigma - Aldrich; A3648 034K0610
- PBS Lösung Gibco REF14190-094 Lot 404522
- Glutaraldehyde 0,5% in PBS aus Glutaraldehyd sol. 25%; C₅H₈O₂ Serva 23115
- Acrylamide; C₃H₅NO; Roth, Art.Nr. 3037.1
- BIS-Acrylamide: N,N'-Methylene-bis-Acrylamide 98%; C₇H₁₀N₂O₂; 2% sol in water. Serva 29197 Lot P060010
- Fluoreszenzpartikel: Fluospheres carboxylate-modified microspheres; Molecular Probes (Leiden, Netherlands)

Tabelle 1: Fluoreszenzpartikel

Durchmesser	Katalognummer	Exzitation	Emission	Farbe
0,2 µm	F-8811	505	515	Gelb-grün
0,5 µm	F-8813	505	515	Gelb-grün
0,2 µm	F-8810	580	605	rot
0,5 µm	F-8812	580	605	rot

- Ammonium Persulfat (APS); H₈N₂O₈S₂; Fluka 09913 Lot 453008/1 12903451
 - 10% w/v 0.1 g in 1 ml ddH₂O
- TEMED p.a. 99% C₆H₁₆N₂; Carl Roth GmbH Art 23673, Charge 46628335
- Rain X, Regenabweiser
- Deckgläser; Menzel-Gläser; (rund) Ø 16 mm, LOT 4711186
- Deckgläser; Menzel-Gläser; (rund) Ø 14 mm, LOT 4710887
- 50 mM HEPES, pH 8,5
 - 11,9 g N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]); Sigma H-3375 LOT 118H5413
 - 1 l ddH₂O
 - mit Kaliumhydroxid Pellets wird der pH auf 8.5 titriert.

2.2.3 Aktivierung und Kollagenbeschichtung der Polyacrylamidgele

Da die Polyacrylamidgele eine sehr glatte Oberfläche aufweisen und Zellen damit wenig Möglichkeit zum Haften bieten, wurden die Gele nach erfolgreicher Polymerisation mit Kollagen Typ-I beschichtet, um die natürliche Umgebung nachzuahmen.

Dazu erfolgte eine Beschichtung der Gele mit frisch angesetzter Sulfo-SANPAH-Lösung und die Photoaktivierung unter einer 60W UV-Lampe. Bei leichtem Nachdunkeln der Gele wurde der Aktivierungsvorgang unterbrochen und nach anschließendem Beseitigen der Sulfo-SANPAH-Lösung wiederholt. Dabei bindet Sulfo-SANPAH an die Polyacrylamidoberfläche. Nach zweimaliger Photoaktivierung wurden die Gelsubstrate mit HEPES gespült und daraufhin mit

0,1%iger Kollagen I - Lösung überschichtet. Während einer Inkubationszeit von 6h bindet sich das Kollagen an eine weitere Bindungsstelle des Sulfo-SANPAH. Eine bessere Ausbeute von verwertbaren Zellen konnte durch mehrmaliges Bedecken mit Kollagen und anschließendem Lufttrocknen erreicht werden. Als letztes wurden die Substrate 3x für 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Material:

- Sulfo-SANPAH: Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-phenylamino)hexanoate, Pierce Perbio BL, Art. 22589, Lot HC103730
 - 1 mM in 50 mM HEPES, pH 8,5
- Kollagen: Kollagen Solution Type 1 (Calf Skin); 0.1%ige Kollagenlösung in 0.1 N acetic acid; Sigma-Aldrich Nr. C-8919, LOT 047K2344

2.2.4 Sterilisieren der Polyacrylamidgele

Um die Gele unter möglichst keimfreien Bedingungen für die Zellkultur einzusetzen wurden die Substrate mit einer dünnen Schicht PBS inkubiert und für 2h unter UV-Licht sterilisiert. Im Weiteren konnten die fertig vorbereiteten Gele in Experimenten eingesetzt oder in sterilem PBS im Kühlschrank (4°C) für 1 - 2 Wochen zwischengelagert werden.

Material:

- UV-Temperatur-Werkbank Edmund Bühler TH 25

2.2.5 Messung des Elastizitätsmoduls der Polyacrylamidgele

Um eine statistisch richtige Kraftberechnung aus der Verschiebung der Fluoreszenzpartikel an der Oberfläche des Gels während der Zugkraftanalyse zu gewährleisten war die Kenntnis des so genannten Elastizitätsmoduls (Young's modulus) der Gele notwendig. Die elastischen Eigenschaften der Polyacrylamidgele wurden von Pelham und Wang genauer charakterisiert

(Wang und Pelham (1998); Pelham und Wang (1998)). Dabei zeigte sich eine Vollelastizität der Gele über einen weiten Bereich und das Zurückkehren in die ursprüngliche Form nach Dehnung um bis zu 30%. In besonderem Maße abhängig zeigt sich das Elastizitätsmodul von der Konzentration der BIS-Acrylamidkonzentration (Abbildung 7).

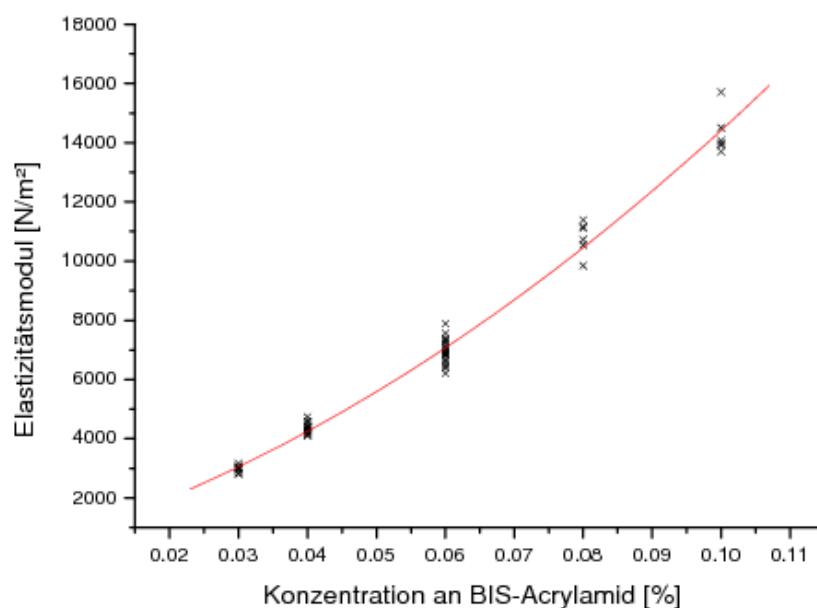


Abbildung 7: Elastizitätsmodul. Es wurde das Elastizitätsmodul von Polyacrylamidsubstraten, die sich nur in der Konzentration von BIS-Acrylamid unterschieden, mit dem Rasterkraftmikroskop gemessen. Die Regressionskurve zweiter Ordnung wurde mit der „Fit Polynominal“ Funktion des Programms Microcal Origin erstellt (Curtze (2004))

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgelen wurde zur Messung der elastischen Eigenschaften die Rasterkraftmikroskopmethode angewandt. Ursächlich dafür war, dass mit dieser Methode deutlich geringere Standardabweichungen erzielt werden konnten als mit der Münz- oder Mikrobalkenmethode (Dembo und Wang (1999), Lo et al. (2000), Curtze (2004)).

Die Kraft des Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope (AFM)) wird von einer kleinen, an einem Cantilever (engl. Ausleger) befestigten Kugel aus Silika-Glas mit einem Durchmesser von 10µm auf die Unterlage übertragen. Der Cantilever weist dabei eine bestimmte, geringe Federkonstante auf, die es möglich macht eine sehr kleine Auslenkung zu detektieren, indem man die

Reflektion eines auf den Cantilever gerichteten Laserstrahls mit Hilfe eines positionsempfindlichen Detektors (PSD) misst.

Im hier verwendeten Messmodus senkt ein Piezostellelement kontinuierlich die Cantileverspitze auf die Unterlage ab. In Abhängigkeit von der Steifigkeit der Probe kommt es dabei zu einem unterschiedlich starken Verbiegen des Cantilevers und einer entsprechenden Auslenkung des Laserstrahls, was zu was zu einer Änderung der Position der Reflektion auf dem PSD führt. Bei bekannter Federkonstante des Cantilevers und bekanntem Vorschub der Aufhängung des Cantilevers durch das Piezostellelement (Symbol Z in Abbildung 8) lässt sich diese Positionsänderung in die vorliegende Kraft und Auslenkungsstrecke der Cantileverspitze umrechnen. Subtrahiert man nun diese Strecke vom Vorschub durch das Piezostellelement erhält man die Eindringtiefe in die Unterlage.

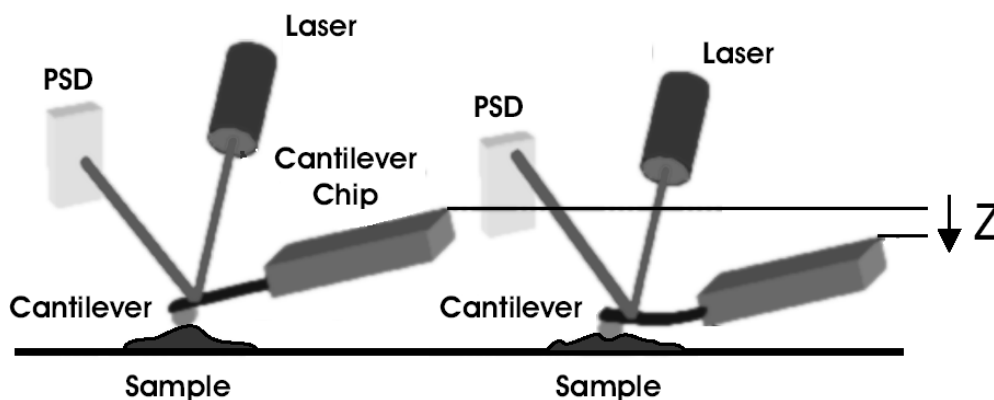


Abbildung 8: Prinzip eines Rasterkraftmikroskops. Bei Auslenkung des Cantilevers verändert sich der Reflexionswinkel des Lasers was zu einer Änderung der Position der Reflektion auf dem PSD führt (nach Struckmeier (2001)).

Um rechnerisch mit den in der Kraftmikroskopie ermittelten Werten das Elastizitätsmodul bestimmen zu können, benötigt man außerdem die Poissonzahl, die als Verhältnis aus der relativen Dicken- zur relativen Längenänderung eines Materials bei Einwirkung einer äußeren Kraft definiert ist:

$$\mu = -\frac{\Delta d / d}{\Delta l / l}$$

μ = Poissonzahl

d = Dicke (mm)

l = Länge (mm)

Dabei besitzen die verwendeten Polyacrylamidgele eine Poissonzahl von 0,3 (Li et al. (1993)), so dass nach folgender Formel das Elastizitätsmodul berechnet werden kann:

$$E = \frac{3(1 - \mu^2)F}{4\sqrt{d^3 r}}$$

E = Elastizitätsmodul (N/mm²)

μ = Poissonzahl (dimensionslos)

F = ausgeübte Kraft (N) auf die Unterlage

d = Eindringtiefe in das Gel (mm)

r = Radius der Stahlkugel (mm)

Eine genaue Beschreibung der Rasterkraftmikroskopie und der verwendeten Methode kann der Arbeit von Struckmeier (2001) entnommen werden.

2.3 Zugkraftexperimente

2.3.1 Funktionsweise der Dehnungsmaschine

Für die Experimente zur Zugkraftanalyse von Osteoblasten und Osteosarkomzellen vor und nach einer mechanischen Stimulation wurde eine von Jones et al. (1993) konstruierte Dehnungsmaschine verwendet (Abbildung 10). Dabei handelt es sich um zwei die Aclar-Klemmhalterung (Abbildung 9) tragende Schlitten, die durch zwei gegenläufige Gewinde zu einer gleichmäßigen Ausdehnung der Folie und damit des darauf gegossenen Gels und der wiederum darauf ausgesäten Zellen führt. Nach der Dehnung folgt durch die Umkehrung der Drehrichtung der Gewinde die Rückkehr der gedehnten Folie in ihren Ausgangszustand. Die Aclarfolie und das Polyacrylamidgel verhalten sich dabei wie in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.5 beschrieben vollelastisch. Über einen elektronisch gesteuerten Motor mit Kontrolleinheit ist es möglich sowohl die Frequenz als auch die Abstandsänderung der Schlitten während einer Dehnung zu beeinflussen. In

dieser Weise können mit der beschriebenen Apparatur Dehnungszyklen bis 20000 μ Strain und 10 Hz gefahren werden.

Um während der Versuche gleiche Vorspannungen der Aclarfolien zu gewährleisten, sind zum einen die Klemmhalterungen federnd gelagert, zum anderen führen zusätzlich zwei Teflonerhöhungen auf den tragenden Schlitten zu gleicher Vorspannung.

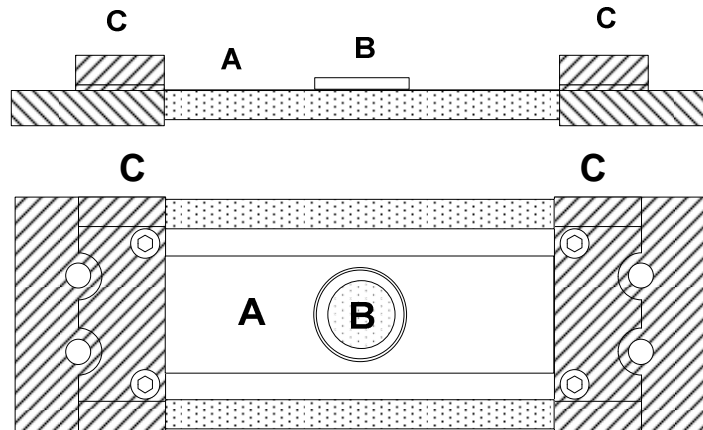


Abbildung 9: Aclar-Klemmhalterung/Folienträger. A Aclarfolie, B Zellkammerring aus Silikon mit Polyacrylamidgel, C Aclar-Klemmhalterung/Folienträger

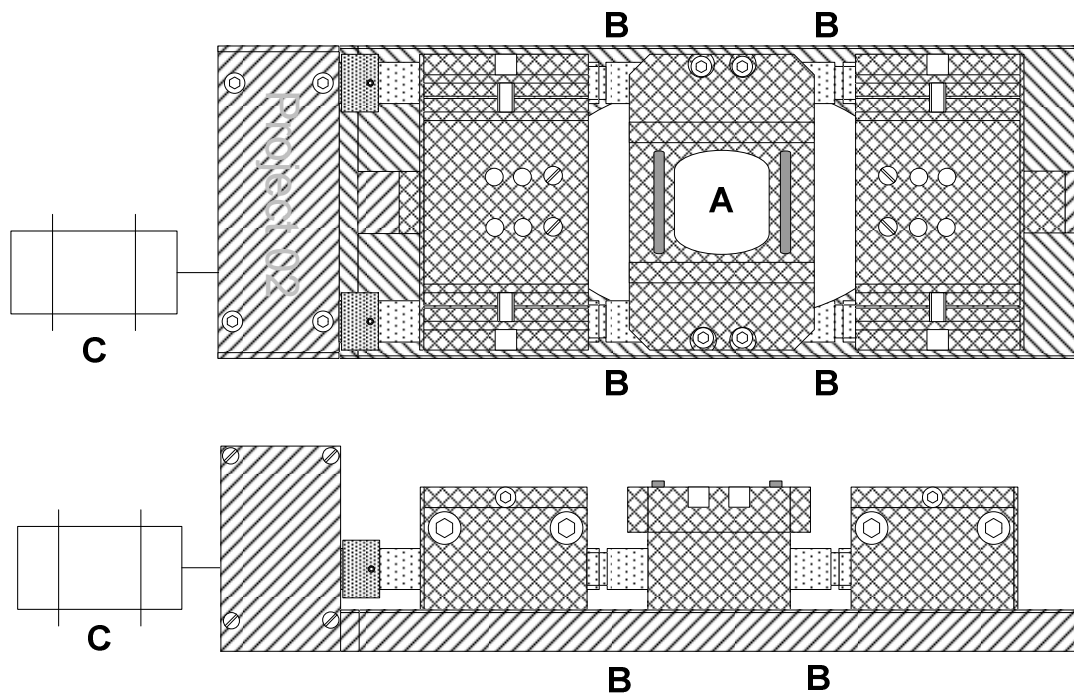


Abbildung 10: Dehnungsmaschine. A Aclar-Klemmhalterungsträger, B Gewindestäbe, C Elektromotor

2.3.2 Kalibrierung der Dehnungsmaschine

Eine der Voraussetzungen, um Aussagen über Reaktionen der Zellen nach mechanischer Stimulation treffen zu können, ist die immer gleiche Stimulationsgröße in den einzelnen Versuchen, d.h. die Genauigkeit der Dehnungsmaschine bei repetitiven Dehnungen. Dazu wurde die Maschine mit eingespannter Aclarfolie und Polyacrylamidgel auf einem inversen Mikroskop befestigt und mit einem 20x Objektiv mikroskopiert. Eine CCD-Kamera übertrug die Bilder in ein Bildverarbeitungsprogramm, welches zur Berechnung der Abstände der Fluoreszenzpartikel im Gel vor und nach der Dehnung herangezogen wurde. Die Dehnungsmaschine zeigte sich auf weniger als einen Pixel exakt (Lautenschläger (2007)).

Darüber hinaus wurde bestimmt, welche Abstandsdifferenz der Schlitten während einer Dehnung zu einer mechanischen Stimulation der Geloberfläche in Form von einer gewissen Belastung in Strain (siehe Abschnitt 1.9.2) führt. Wie oben beschrieben wurde dazu ein auf Aclarfolie gegossenes Gel in die Dehnungsmaschine eingespannt, über eine CCD-Kamera Fluoreszenzbilder aufgenommen und bei verschiedenen großen Retraktionen der Dehnungsmaschine die Auswirkungen auf das Gel in Form von Abstandsveränderungen zweier vorher bestimmter Fluoreszenzpartikel gemessen.

2.3.3 Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie

Zur Beobachtung der Zellen und der in den Acrylamidgelen enthaltenen Fluoreszenzmarker als Grundlage der Zugkraftmikroskopie wurde ein inverses Nikon TE 2000-U Mikroskop verwendet. Für Phasenkontrastaufnahmen der beobachteten Zellen zur Festlegung des Zellumrisses während der Analyse der Zugkräfte diente die eingebaute Lichtquelle des Mikroskops. Bei den Fluoreszenzaufnahmen der Gele wurde zur notwendigen Anregung der Partikel eine Xenon-Lichtquelle von Wolf mit einem Quarz-Lichtleiter eingesetzt.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird das Anregungslicht über einen dichroitischen Spiegel durch das Objektiv zur Zelle bzw. im vorliegenden Fall zum fluoreszierenden Gel reflektiert. Die Farbstoffmoleküle werden dadurch

angeregt, und es kommt zur Emission von Fluoreszenzlicht mit anderer, längerer Wellenlänge als der des Anregungslichtes. Dieses kann den dichroischen Spiegel durchdringen und wird durch einen Emissionsfilter auf ein engeres Wellenlängenband reduziert (Störsignale werden eliminiert). Das Emissionslicht wird an eine Kamera weitergeleitet, die ein Bild des fluoreszierenden Gels zur Weiterverarbeitung an einen Computer übermittelt.

In dieser Arbeit wurden je nach Art/Farbe der Fluoreszenzpartikel (siehe Abschnitt 2.2.2.2) Filter eingesetzt, die eine Anregung von 505nm (grüne Marker), bzw. 580nm (rote Marker) und eine Emissionswellenlänge von 515nm, bzw. 605nm gewährleisten.

Sowohl für die Phasenkontrast- als auch die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein 40x Nikon Plan Fluor ELWD Objektiv (ELWD = Extra-Long Working Distance) verwendet.

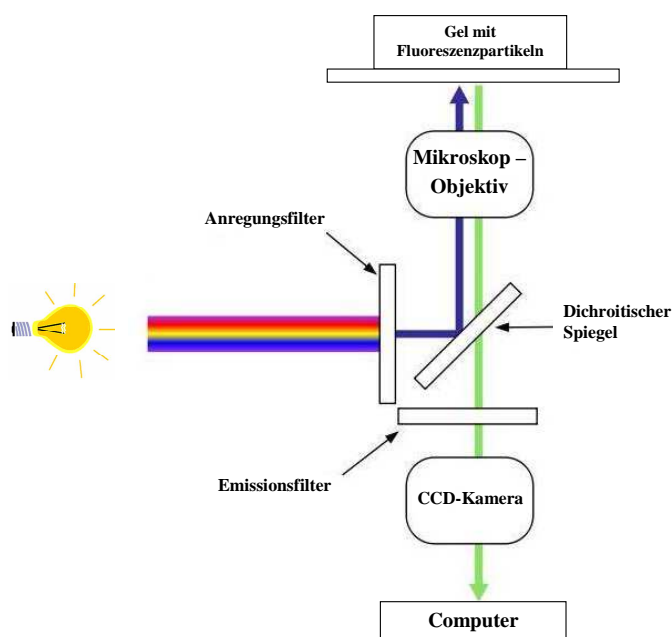


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopie. Die Abbildung zeigt den Strahlengang eines inversen Fluoreszenzmikroskops wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben.

2.3.4 Kamera

Während der Versuche wurde eine CCD-Kamera (Cool View Em1000, Photonic Science, 12 Bit CCD (1000 x 1000 Pixel)) eingesetzt. Diese beinhaltet einen lichtempfindlichen CCD-Sensor, der ein zur eingestrahltene Lichtmenge

proportionales elektrisches Signal ausgibt. Dieses Signal wird dann verstärkt und durch geeignete elektronische Schaltungen in ein digitales Videosignal umgesetzt.

Die Bilder wurden per Framegrabber-Karte auf einen Computer übertragen und im TIFF-Format auf der Festplatte gespeichert.

2.3.4.1 Kalibrierung der Kamera

Bei der Analyse der Zugkräfte einzelner Zellen werden sowohl Verschiebungen der Fluoreszenzpartikel als auch die Größe einer Zelle bestimmt. Um die tatsächliche im Versuchsaufbau abgebildete Pixelgröße der hier verwendeten Kamera zu ermitteln, wurde diese mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer und dem Programm Image-Pro Plus bestimmt.

2.3.5 Versuchsaufbau

2.3.5.1 Technische Aspekte des Versuchsaufbaus

Um die Zugkräfte von Zellen vor und nach Dehnung bestimmen zu können musste der Versuchsaufbau gewisse Bedingungen erfüllen. So durfte der beobachtete Bereich, d.h. die Zellen mit dem darunter liegendem Gel, während der Dehnungsapplikation keiner lateralen und vertikalen Bewegung (Fokusebene) unterliegen. Erste Voraussetzung hierfür waren die homogenen Materialeigenschaften der Aclarfolie und die exakt arbeitende Mechanik des Gerätes (siehe Abschnitt 2.3.2). Des Weiteren musste die Dehnungsmaschine so auf dem Mikroskoptisch befestigt werden, dass es während eines Dehnungszyklus nicht zu einer Verschiebung zwischen Tisch und Maschine kommt. Aufgrund des fest mit dem Mikroskop verbundenen Mikroskoptisches war es aber notwendig eine für den Versuch geeignete Zelle über das Verschieben der Dehnungsmaschine mit eingespannter Aclarfolie aufzusuchen. Daher musste die Befestigung gewährleisten, dass es bei Fixierung der Maschine nicht zu einer Verschiebung des Versuchsaufbaus in laterale Richtung kommt und damit die Zelle aus dem Blickfeld verschwinden würde.

Für die Versuche wurde eigens ein Aluminium-U-Profil mit der Möglichkeit die Maschine an mehreren Stellen zu befestigen angefertigt. In den ersten Experimenten traten jedoch sowohl bei der Fixierung, als auch während des Stimulationszyklus Verschiebungen auf, die keiner Systematik folgten. Dabei genügte bereits ein Versatz von wenigen μm in x-y-Richtung, um die Auswertung eines Versuches unmöglich zu machen. Die Ausbeute an verwertbaren Versuchen lag mit diesem Aufbau bei unter 20%.

Anstelle der Verwendung des U-Profiles wurden in weiteren Experimenten drei großen Schraubzwingen zur Fixierung an verschiedenen Punkten der Dehnungsapparatur eingesetzt. Dadurch ließ sich die Erfolgsquote an adäquat auswertbaren Versuchen auf nahezu 100% steigern.

2.3.5.2 Versuchsaufbau

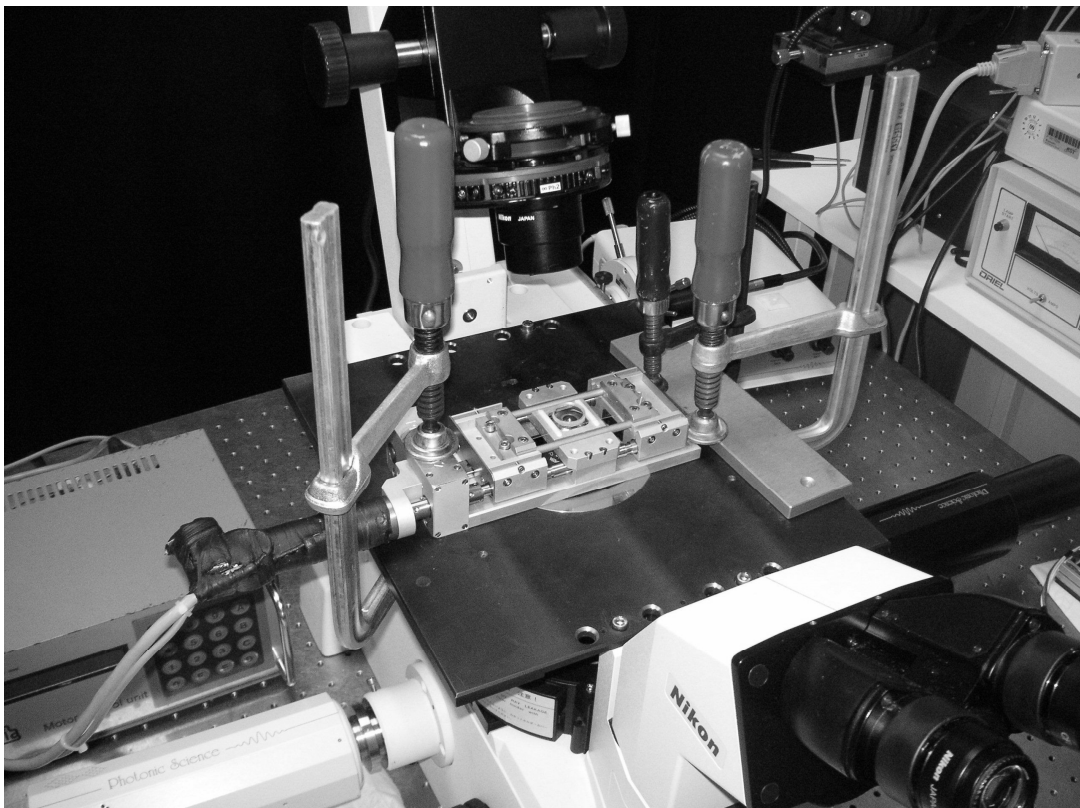


Abbildung 12: vollständiger Versuchsaufbau. Mikroskop mit durch Schraubzwingen auf dem Mikroskoptisch fixierter Dehnungsmaschine und eingespannter Aclarfolie mit Zellkammer

Material:

- Nikon Eclipse TE 2000-U
- Nikon Plan Fluor ELWD 40x/0.60 Ph2 DM
- Cool View Em1000, Photonic Science, 12 Bit CCD (1000 x 1000 Pixel)
- Richard Wolf Comilight 5133 PDD (Xenon)
- Dehnungsmaschine
- Schraubzwingen

2.3.6 Durchführung der Dehnungsexperimente**2.3.6.1 Präparation der Aclarfolie für die Dehnungsversuche**

Um die vorbereiteten Aclarfolien mit den darauf gegossenen Gelen für ein Experiment zu nutzen wurden diese in Klemmhalterungen eingespannt (siehe Abbildung 9). Dazu wurden die Halterungen zunächst mit 70%igem Alkohol desinfiziert und anschließend unter der UV-Bank getrocknet und sterilisiert. Nach Einbau der Folien unter der Sterilwerkbank wurden die Gele zur Rekonstitution zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min bei 37°C mit den jeweiligen Medien für Osteoblasten und Osteosarkomzellen im Brutschrank inkubiert, bevor Zellen, wie in Abschnitt 2.1.6 beschrieben, auf die Substrate ausgesät werden konnten.

2.3.6.2 Versuchsablauf

Nach Inkubation der ausgesäten Zellen (3500/cm²) für 48 - 72h (Osteoblasten), bzw. 24 - 48h (Osteosarkomzellen) im Brutschrank, konnten die Zugkraftexperimente nach Erreichen eines semikonfluenten Zellrasens gestartet werden. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium durch HEPES gepuffertes Medium zur pH-Stabilisierung ersetzt. Als Medium-Grundlage hierfür diente, wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben, Ham's F10 für primär bovine Osteoblasten POB und RPMI 1640 Medium für die Osteosarkomzelllinie (MG-63).

Danach wurden die in die Klemmhalterungen eingespannten Aclarfolien in die Dehnungsmaschine eingesetzt und auf dem Mikroskop positioniert. Durch Verschiebung in der x-y-Achse konnte eine einzelne, für den Versuch geeignete Zelle in das Blickfeld der Kamera eingestellt werden.

Um die Zugkräfte durch Auswertung der Bilder zuverlässig bestimmen zu können, musste die betreffende Zelle sorgfältig ausgesucht werden. Neben der Morphologie wurde darauf geachtet, dass sich im direkten Umfeld der Zelle keine weiteren Zellen befanden. Diese würden über die von ihnen ausgehenden Kräfte die Auswertung der beobachteten Zelle beeinflussen und zu Störungen in der Kraftberechnung führen. Optimalerweise wurden Zellen aufgesucht, die 1 - 2 Kontakte zu anderen Zellen ausgebildet hatten, um zu vermeiden nur isolierte Zellen zu betrachten. Dabei mussten die Zellkörper mindestens einen Abstand von einem Zelldurchmesser (ca. 50 - 100 μm) aufweisen.

Nach Einstellung eines geeigneten Sichtfeldes am Präparat wurde die Dehnungsmaschine über drei Schraubzwingen vorsichtig unter optischer Kontrolle der Zelllage am Mikroskop fixiert. Um mit dem eigentlichen Experiment beginnen zu können schloss sich jetzt eine Wartezeit von 20 Minuten an.

Zunächst wurde ein Phasenkontrastbild der beobachteten Zelle angefertigt. Nach Fokussieren auf die an der obersten Ebene des Gels gelegenen Partikel konnten dann die Fluoreszenzbilder aufgenommen werden. Bei Aufnahme der Fluoreszenzbilder war es wichtig immer die gleiche Ebene der Marker im Gel einzustellen, um später Vergleiche zwischen den Kräften der einzelnen Experimente ziehen zu können. Aufgrund der durch die Kräfte wenig verschobenen tiefen Partikel würde eine zu tiefe Fokusebene beispielsweise zu einer zu gering bestimmten Kraft führen.

Im Versuchsablauf wurden zunächst 12 Fluoreszenzbilder im Abstand von 10 Sekunden aufgenommen. Diese Bilder lieferten bei der Auswertung zum einen die Vergleichswerte der beiden Zellpopulationen in Ruhe, zum anderen dienten sie als Bezugsgröße für den Vergleich mit den Zellkräften nach Stimulation.

Im Anschluss an diese Beobachtungszeit von 2 Minuten wurde der Dehnungsreiz appliziert. Dabei wurde die Folie und damit auch Gel und Zellen mit 6000 μ Strain (entspricht einer Dehnung von 0,6 %) und einer Frequenz von 10 Hz für 2 Sekunden mechanisch stimuliert. Dabei wurden die Parameter gezielt so gewählt, da zum einen hohe Frequenzen eine wichtige Rolle in der Knochensynthese einnehmen, zum anderen frühere Arbeiten gezeigt hatten, dass es bei Stimulationen von 4000 - 6000 μ Strain zur Ausschüttung von Calcium als wichtigem second messenger der Mechanotransduktion kommt (Tenbosch (1999)).

Nach der Dehnung diente bei minimal möglicher Belichtungszeit eine Bildaufnahmesequenz von 50 Fluoreszenzbildern in 35 Sekunden zur Beurteilung der Veränderungen der Zugkräfte unmittelbar nach Stimulation.

Zur Beurteilung des Zugkräfteinflusses in den folgenden 5 Minuten wurden ohne erneute Änderung der Fokusebene ein zweites Phasenkontrastbild und weitere 30 Fluoreszenzbildsequenzen aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Trypsin vom Gel abgelöst und eine Bildsequenz der Fluoreszenzpartikel im relaxierten Gel ohne Verschiebung der Fokusebene aufgenommen. Dieses Bild diente als Referenzbild, als „Nullbild“, zur Berechnung der Zugkräfte. Die Fokusebene der Bilder vor und nach Lösen der Zelle musste dabei genau übereinstimmen, um eine Auswertung zu ermöglichen. Falls dies durch Veränderung der Fokusebene, beispielsweise durch den mechanischen Stimulus, nicht mit einem Referenzbild für alle gemachten Fluoreszenzbildern mit Zelle möglich war, wurden weitere Nullbilder in der entsprechenden Fokusebene aufgenommen.

2.4 Analyse der Zugkräfte (Zugkraftmikroskopie)

Der vorherige Abschnitt zum Versuchsablauf befasste sich damit, wie die Daten in Form von Fluoreszenzbildern des Gels mit und ohne Zelle für die Zugkraftanalyse erhoben wurden. Im Folgenden soll der Ablauf der Auswertung beschrieben werden.

Gemäß den Ausführungen in Abschnitt 1.9.1 bildet die Grundlage der Zugkraftmikroskopie das hier verwendete Polyacrylamidgel mit den darin

enthaltenen fluoreszierenden Partikeln. Mit Hilfe eines Computerprogramms können diese Verschiebungen berechnet werden. Dabei vergleicht das Programm bestimmte Bereiche der Fluoreszenzaufnahme mit Zelle mit den entsprechenden Sektoren des Referenzbildes ohne Zelle und erstellt daraus eine Deformationsmatrix (siehe Abschnitt 2.4.3), die der Deformation des Gels durch die Zugkräfte der Zelle entspricht. Die Software berechnet schließlich das dieser Matrix zugrunde liegende Kraftvektorfeld.

Die Erstellung der Deformationsmatrix und die Berechnung der Kraftvektoren wurden mit Hilfe des Libtrc-Software-Pakets durchgeführt. Dieses wurde dem Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik freundlicherweise von Professor M. Dembo (Department of Biomedical Engineering, Boston University) zur Verfügung gestellt.

2.4.1 Darstellung der Vektorgrafiken

Die in dieser Arbeit dargestellten Vektorgrafiken zeigen im Allgemeinen nur ein Teilausschnitt des aufgenommenen Bildes. Das Libtrc-Programm zur Auswertung der Zugkräfte der Osteoblasten und Osteosarkomzellen bildet in den Grafiken stattdessen eine Bildregion ab, die der Ausdehnung der Zelle plus 30% in x-y-Richtung entspricht. Die absolute Größe der Zelle und die Länge der dargestellten Vektoren (Deformationsmatrix) sind durch eine Maßstabangabe in Form einer Referenzlänge angegeben. Die Eichmarken der Kraftvektoren in den Kraftvektor-Bildern werden in dyn/cm^2 oder N/m^2 ($10\text{dyn/cm}^2 = 1\text{N/m}^2$) angegeben. Dabei wird die Angabe einer Spannung gewählt, da die Kräfte nicht an diskreten Punkten, sondern pro Flächeneinheit wirken. Andererseits wäre es nötig unendlich viele Punkte mit den entsprechenden Kräften zu definieren und zu berechnen, da sich die Kräfte von Punkt zu Punkt unterscheiden.

Bei den Vektoren der Deformationsmatrix werden nur solche durch einen Pfeil dargestellt, die mindestens einem Pixel der Kamera entsprechen. Die Deformationen, die weniger als ein Bildelement betragen, werden nicht dargestellt, aber dennoch in die Berechnung einbezogen.

2.4.2 Festlegen der Zellgrenzen

Mit den aufgenommenen Phasenkontrastbildern der Zelle (siehe Abschnitt 2.3.6.2) kann im Auswertungsverlauf die Projektion der Zelle auf die Fluoreszenzbilder nachvollzogen werden. Da durch das verwendete Programm die Berechnung der Zellkräfte in Bezug auf die Grundfläche der Zelle durchgeführt wird, ist es notwendig die Zellgröße zu bestimmen. Da es möglich ist, dass die von der Zelle generierte Kraft abhängig von der Zellgröße ist, erscheint die Angabe als mechanische Spannung sinnvoll.

Die Zellgrenzen wurden unter Verwendung des Bildanalyseprogramms Image-Pro Plus (Media cybernetics) nachgezeichnet und in Libtrc exportiert. Die Fläche der Zelle sollte dabei relativ exakt eingegrenzt werden, um eine genaue Kraftberechnung zu ermöglichen, da auch Deformationen des Acrylamidgels außerhalb des Zellumrisses der Zellkraft zugeschrieben werden. Würde der Zellumriss zu klein bestimmt, wäre die resultierende Kraft pro Fläche zu groß, da die gesamten Verschiebungen der Fluoreszenzmarker im Gel einer zu kleinen Fläche (Zellumriss) zugeordnet würden. Anders herum werden die Kräfte bei einem zu großen Zellumriss zu niedrig berechnet.

Da es durch den Dehnungsstimulus immer wieder zu minimalen Verschiebungen des Blickfeldes in x-y-Richtung kam, wurden zwei Phasenkontrastaufnahmen, jeweils vor und nach Stimulation, zur Zeichnung der Zellumrisse verwendet.

2.4.3 Erstellen der Deformationsmatrix

Der Grundgedanke der hier verwendeten Methode zur Zugkraftmessung ist das Vergleichen von Fluoreszenzbildern des Gels mit Zelle mit einem Bild nach Ablösen der Zelle. Die durch die Zelle hervorgerufene Substratdeformierung wird mit Hilfe eines optischen Fluss-Ansatzes zur Analyse bewegter Bilder quantifiziert. Dazu bringt man Intensitätsmuster der im Gel enthaltenen fluoreszierenden Partikel mit den zu vergleichenden Bildern zur Deckung.

Im Verlauf der computerbasierten Analyse soll nun zunächst jeweils ein Fluoreszenzmarker des zellfreien Gels auf dem Bild des durch die Zelle

deformierten Substrates gesucht werden. Dieser einzelne Marker kann aber allein aufgrund seiner Helligkeit nicht eindeutig identifiziert werden, so dass Intensitätsmuster der Umgebung der gesuchten Koordinate erfasst (Korrelationsfenster) und verglichen werden. Dabei sollte die Größe dieses Korrelationsfensters so gewählt werden, dass es ein möglichst einmaliges Intensitätsmuster im Sinne eines Fingerabdruckes darstellt. Dazu werden zunächst die Helligkeiten der beiden Bilder angepasst. Das hat den Vorteil, dass unterschiedliche Intensitäten, wie sie z.B. durch Ausbleichen der Fluoreszenzpartikel entstehen, als Fehlerquelle eliminiert werden. Die Übereinstimmung oder Ähnlichkeit der Korrelationsfenster wird mit Hilfe des Kreuzkorrelationskoeffizienten R bestimmt. Dieser kann Werte von -1 bis $+1$ annehmen. Im Falle einer totalen Übereinstimmung der Intensitätsmuster ist $R=+1$. Korrelieren die Intensitätsmuster gar nicht, ist $R=0$ und im Falle der genau entgegengesetzten Intensität (Negativbild) gilt $R=-1$.

Als nächstes wird der maximale Suchabstand festgelegt, um den die Korrelationsbox im Bild in alle Richtungen verschoben werden soll (Suchbox, siehe Abbildung 13).

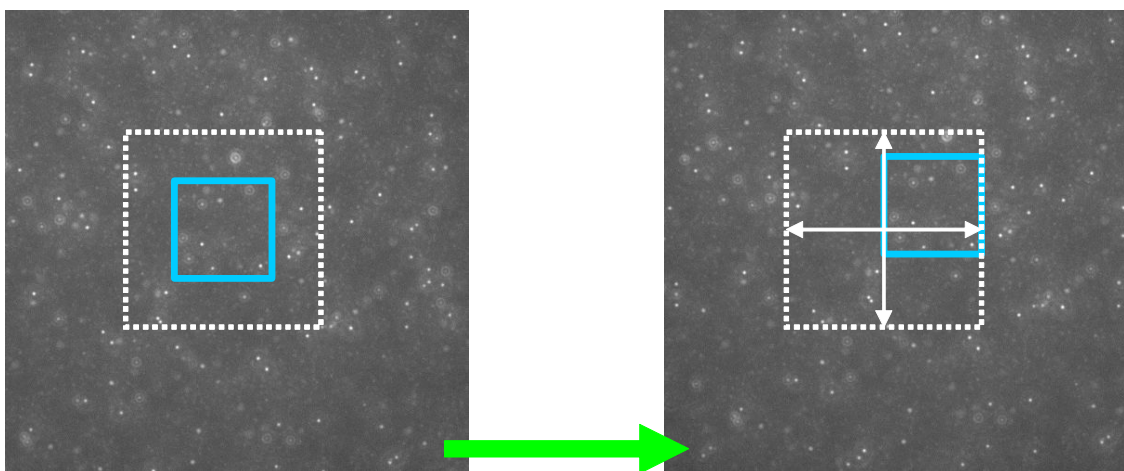


Abbildung 13: Korrelations-Box und Such-Box. Die Größe des Korrelationsfensters (blau) im Fluoreszenzbild ohne Substratdeformation (links) wird festgelegt und die entsprechende Verteilung der Fluoreszenzpartikel innerhalb des Suchabstandes (Such-Box, weiß) im zu vergleichenden Bild mit Substratdeformation (rechts) gesucht und mit Hilfe des Kreuzkorrelationskoeffizienten berechnet.

In dieser Umgebung wird für den zu suchenden Punkt des unverformten Substrates ein korrespondierender Punkt auf dem verformten Substrat gesucht. Für die größte Übereinstimmung weist R ein Maximum auf. Anschließend wird die Suchbox um das Zentrum des Punktes gelegt, für den R das Maximum aufweist und R für alle Positionen des Korrelationsfensters berechnet. Gehört das maximale R wieder zum gleichen Punkt, wird die Suche abgebrochen und eine Übereinstimmung angenommen. Ansonsten wird die Berechnung wiederholt.

Für die Exaktheit dieser Methode gibt Marganski et al. (2003) eine theoretische Genauigkeit von 0,1 Pixel an (20,5 nm). In der Praxis ist die Wahl der richtigen Fokusebene oder eine Verschiebung der Fokusebene während des Experiments die häufigsten Fehlerquellen. Diese wurden in den hier beschriebenen Experimenten durch Beibehalten einer einzigen Fokusebene und die Anfertigung mehrerer Referenzbilder, im Falle einer Verschiebung der Ebene durch den mechanischen Stimulus, minimiert. Zu weiteren Fehlerquellen kann ein zu klein gewähltes Korrelationsfenster, d.h. ein nicht mehr einzigartiger Ausschnitt im Fluoreszenzbild, führen. Wird das Korrelationsfenster als zu groß bestimmt, kann es sein, dass die Zelle die Fluoreszenzmarker innerhalb der Box in unterschiedlicher Weise verschiebt und der Bildausschnitt daher nicht wieder zu erkennen ist. Bei zu geringer Partikeldichte an der Oberfläche, Autofluoreszenz der Zelle oder im Medium treibender Zellreste sowie sehr großen Verformungen des Gels kann es ebenfalls zu falschen Annahmen der Deformationsvektoren kommen. Außerdem können Marker, die nicht in beiden Bildern zu finden sind oder aufgrund schlechter Ausleuchtung nicht auf beiden Bildern gleich hell erscheinen, zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Daher werden Punkte, an denen das Signal das Hintergrundrauschen nicht um einen festgelegten Wert überschreitet, nicht in die Berechnung einbezogen. Ebenso ausgeschlossen werden Fluoreszenzpartikel, deren maximaler Kreuzkorrelationskoeffizient R einen bestimmten Schwellenwert nicht erreicht. Zur Fehlervermeidung werden außerdem Punkte, deren Verschiebungsrichtung und Größe sich deutlich von der näheren Umgebung unterscheidet oder als unphysiologisch hoch erscheinen, als suspekt markiert und neu berechnet,

indem das Korrelationsfenster automatisch vergrößert wird. Dabei dient der am nächsten nicht suspekten Punkt als Zentrum der Suchbox. Artefakte durch Wackeln am Mikroskopoptisch oder Verschiebungen der Apparatur in x-y-Richtung werden durch das Programm erkannt und ausgeglichen.

Nach Abschluss der Berechnungen für die Verschiebung jedes Markers werden diese als 2000 bis 25000 Deformationsvektoren pro Zelle und deren näherer Umgebung von ca. 30% des Zelldurchmessers in jede Richtung bestimmt.

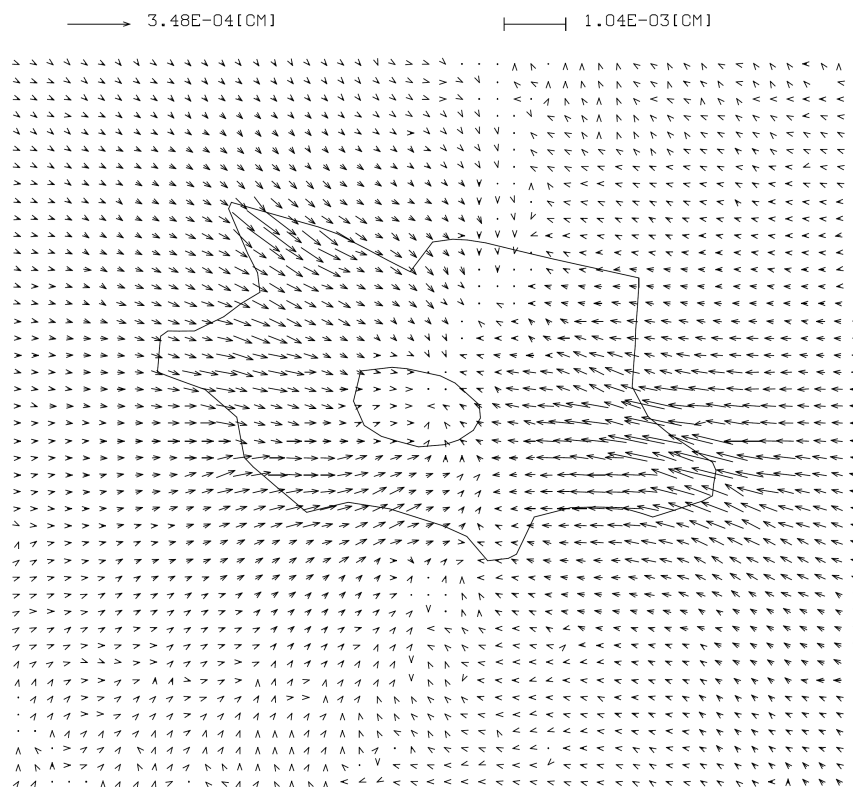


Abbildung 14: Deformationsmatrix. Typische Deformationsmatrix eines Gels mit BIS-Acrylkonzentration von 0,06% hervorgerufen durch einen primär bovinen Osteoblasten. Die Pfeile stellen die Verschiebung der Fluoreszenzpartikel des Gels dar.

Die hier verwendete Methode wird von Autoren des Programms (Marganski et al. (2003)) im Detail erläutert.

2.4.4 Ursprungsknoten der Kraftvektoren

Zur weiteren Analyse wird im Folgenden die ermittelte Zellfläche in 100 bis 2000 Unterregionen eingeteilt. Dies geschieht durch Anpassung eines der

Zellgeometrie entsprechenden Netzes. Dabei wird ein die Zellfläche um ca. 30% überragendes Rechteck gezeichnet und anschließend in vier gleich große Teile geteilt. Die neu entstandenen Vierecke werden wieder geviertelt. Dieser Zyklus wiederholt sich einige Male, während Rechtecke, die außerhalb der Zellgrenzen liegen, gelöscht werden. Rechtecke, die die Zellfläche schneiden, werden so verformt, dass sie von beiden Seiten der Zellgrenze angenähert werden. Im letzten Schritt werden gegebenenfalls die Ränder der Rechtecke an die Zellgrenzen angepasst. Die auf diese Weise entstandenen Schnittpunkte der Vierecke, die Knotenpunkte des Netzes, werden in der weiteren Berechnung als potentieller Ursprung der Kraftvektoren betrachtet.

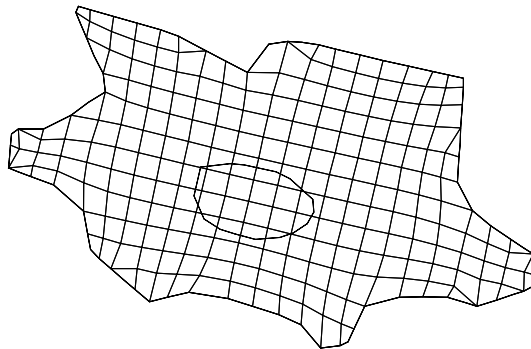


Abbildung 15: Ursprungsknoten der Kraftvektoren. Nach Unterteilung der Zellfläche in kleine Rechtecke spiegelt jede Schnittstelle einen Knotenpunkt als Ursprung der zu berechnenden Kraftvektoren dar.

2.4.5 Berechnung der Kraftvektoren für jeden Knotenpunkt

Die in Abschnitt 2.4.3 beschriebene Deformationsmatrix stellt den Datensatz für die sich anschließende Berechnung der Kraftvektor-Karte dar. Aus den Daten der Deformationsmatrix berechnet die Software das die Deformationsmatrix am wahrscheinlichsten verursachende Kraftfeld.

Der komplizierte Algorithmus zur Zugkraftberechnung auf elastischen Substraten sowie die physikalischen Grundlagen können in verschiedenen Publikationen nachvollzogen werden (Lautenschläger (2007), Dembo et al. (1999), Landau et al. (1986)).

Aus den so gewonnenen Daten der Kraftvektoren wird danach zunächst das Kraftvektorfeld ermittelt, was die Deformationsmatrix am besten beschreibt. Anschließend werden die resultierenden Vektoren noch mal auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Nach der „Bootstrap-Methode“ (Efron und Tibishirani (1986)) wird dem wahrscheinlichst zutreffenden Bild ein zusätzliches Grundrauschen zugefügt und anschließend neu berechnet. Dieser Vorgang wird einige Male wiederholt um die Signifikanz des endgültigen Kraftvektorfeldes zu erhöhen (Dembo et al. (1996)).

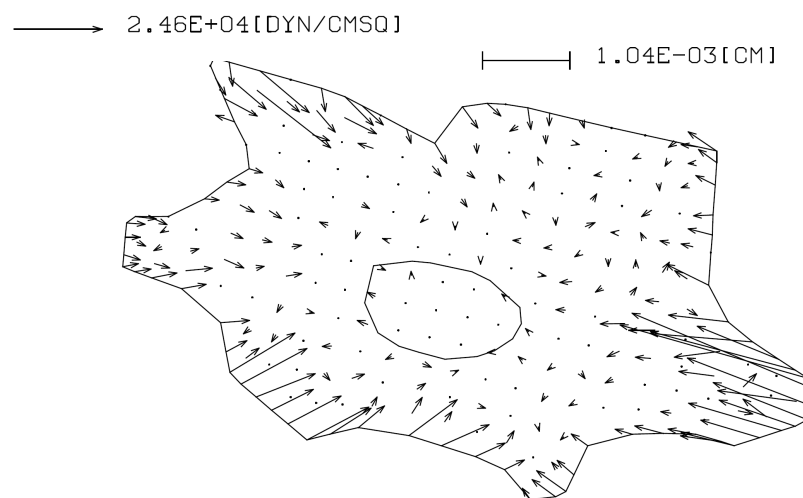


Abbildung 16: Kraftvektorfeld. Typische Darstellung eines Kraftvektorfeldes wie es aus der Deformationsmatrix (Abbildung 14) errechnet wird. Es werden nur signifikante Vektoren dargestellt.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung sowie die graphischen Darstellungen der in den Experimenten erhobenen Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2003 und SPSS für Windows 14.0 erstellt.

2.5.1 Statistische Signifikanz

Als signifikant gilt, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass ein Unterschied oder Zusammenhang zwischen zwei Variablen oder Messgrößen nur durch Zufall zustande gekommen ist, gering ist. Zur Überprüfung von Signifikanz werden

statistische Tests angewandt, die gewisse Voraussetzungen an das Datenmaterial aufweisen (siehe Abschnitt 2.5.2 und 2.5.3) und eine Abschätzung der Irrtumswahrscheinlichkeit erlauben. Signifikanz liegt vor, wenn die im Test ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner oder gleich dem vorher festgelegten Signifikanzniveau α ist. Je geringer dabei die vorher festgelegte maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau α), desto höher die Informationsqualität. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit P von $\leq 0,05$ (5%), spricht man von einem signifikanten Ergebnis. Als hochsignifikant werden Ergebnisse bezeichnet, bei denen die Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 0,01$ (1%) beträgt (Bortz (2005), S.113-114).

2.5.2 T-Test

Ein t-Test wird bei normalverteilten Daten zur Prüfung eines signifikanten Unterschieds der arithmetischen Mittel zweier Stichproben verwendet. Man unterscheidet dabei den gepaarten t-Test, bei zwei von einander abhängigen Stichproben, vom ungepaarten t-Test, bei zwei von einander unabhängigen Stichproben. Liegt keine Normalverteilung vor, kann als Ersatz für den t-Test ein nichtparametrischer Test, wie z.B. der Wilcoxon-Rangnummern-Test angewendet werden.

2.5.3 Mann-Whitney-U-Test (Wilcoxon-Rangsummen-Test)

Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreier statistischer Test zur Überprüfung eines signifikanten Unterschieds zweier Verteilungen (Wilcoxon (1945), Mann, Whitney (1947)). Der Vergleich beruht dabei auf einer Rangierung der Werte und nicht auf den Messdaten selber. Während beim t-Test die Differenz der Stichprobenmittelwerte der ursprünglichen Daten betrachtet wird, ist es beim Wilcoxon-Rangsummen-Test die Differenz der Mittelwerte der Ränge.

2.5.4 Korrelationsanalysen

Als Korrelationskoeffizienten bezeichnet man ein Maß für einen Zusammenhang zwischen zwei Variablen. Dieser kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale überhaupt nicht voneinander ab.

2.5.4.1 Korrelationskoeffizient nach Pearson

Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient liefert korrekte Ergebnisse bezüglich eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen. Für niedrigere Skalierungen oder nicht normalverteilte Variablen existieren andere Korrelationskonzepte (z. B. Rangkorrelationskoeffizienten).

2.5.4.2 Kendalls tau-Korrelation

Der Rangkorrelationskoeffizient ist ein parameterfreies Maß für die Korrelationen. Das bedeutet er misst, ohne irgendwelche Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Variablen zu machen, wie gut der Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschrieben werden kann. Anders als der Kreuzkorrelationskoeffizient nach Pearson, benötigt er weder die Annahme, dass eine lineare Beziehung zwischen den Variablen vorliegt, noch ist es Voraussetzung, dass die Variablen auf einer Intervallskala gemessen werden, sondern lediglich ordinalskaliert vorliegen. Der Rangkorrelationskoeffizient nimmt genau dann den Wert 1 an, wenn die Werte von X und Y die gleiche Reihenfolge zwischen den Beobachtungseinheiten definieren. Der Rangkorrelationskoeffizient ist dabei robust gegenüber Ausreißern.

2.5.5 Chi-Quadrat-Vierfelder-Test

Der Vierfeldertest dient dazu, die relative Häufigkeit eines Merkmals in zwei unabhängigen Gruppen zu vergleichen und zugleich die Frage nach der Signifikanz des Testes zu beantworten.

2.5.6 z-Transformation (z-Wert)

Um die Abweichung von Daten vom Mittelwert besser vergleichen zu können, müssen sie zuvor an die Abweichungen bzw. Unterschiede aller Daten im jeweiligen Kollektiv angepasst werden. Dies geschieht, indem die Abweichung durch die Standardabweichung im jeweiligen Kollektiv dividiert wird. Ein solcher Wert wird als z-Wert bezeichnet. (Bortz (2005), S.45).

2.6 Graphische Darstellung

2.6.1 Boxplots

Neben x-y-Diagrammen zum zeitlichen Verlauf der Zellkräfte wurden zur Darstellung der Ergebnisse Säulendiagramme und Boxplots verwendet.

Ein Boxplot reduziert die Daten auf fünf Kennzahlen (Minimum, unteres Quartil, Median, oberes Quartil, Maximum) und stellt sie graphisch dar. Die Box reicht vom unteren bis oberen Quartil und stellt somit die zentralen 50% dar. Der Median wird als Strichmarkierung innerhalb der Box angegeben und lässt eine Aussage über die Symmetrie der Verteilung zu. Die Linien außerhalb der Box geben Maximum und Minimum innerhalb von 1,5 Boxlängen wieder.

3 Ergebnisse

3.1 Kalibrierung der Dehnungsmaschine

Um die Experimente mit einer vorgegebenen Belastung durchzuführen musste bestimmt werden, welcher Abstand der Schlitten während einer Dehnung zu einer mechanischen Stimulation der Geloberfläche, und damit der Zelle, in Höhe von $6000\mu\text{str}$ führt. Dafür wurden, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, die Auswirkungen verschieden großer Retraktionen der Dehnungsmaschine auf die oberste Ebene des Gels gemessen. Dabei zeigte sich bei einer Verschiebung der Schlitten um ca. $750\mu\text{m}$ eine Dehnung des Gels um $0,6\%$ ($6000\mu\text{str}$).

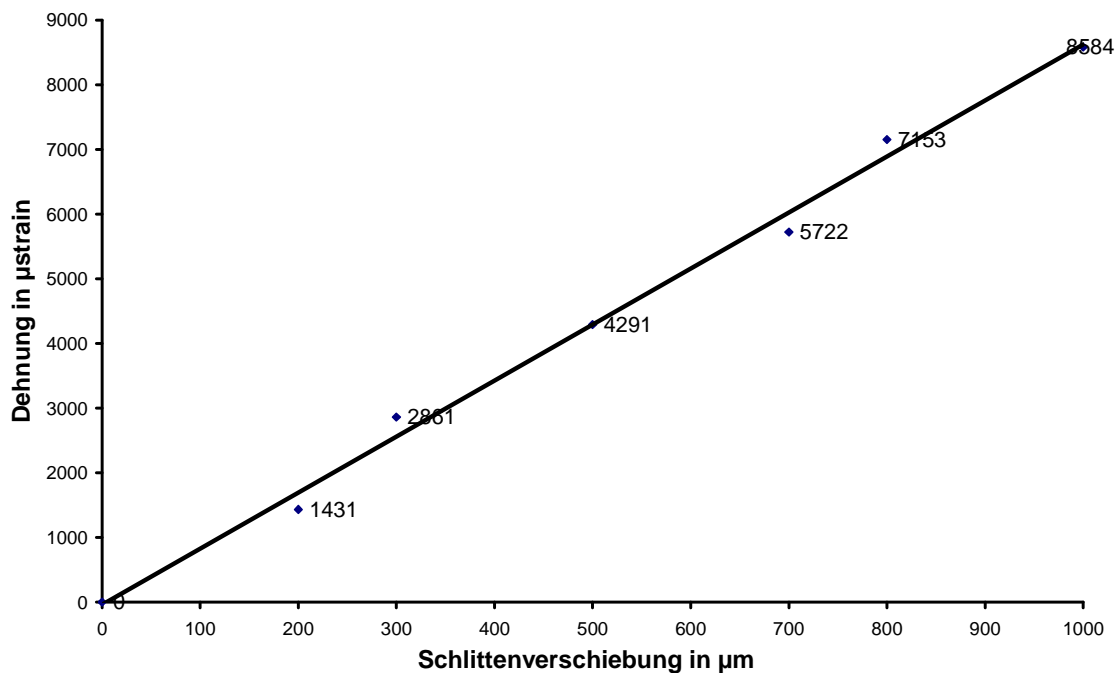


Abbildung 17: Kalibrierung der Dehnungsmaschine. Verschiebung der Dehnungsmaschinenschlitten in μm im Vergleich zur Dehnung der Geloberfläche in μStrain . Bei einer Verschiebung von ca. $750\mu\text{m}$ zeigt sich eine Dehnung von $6000\mu\text{Strain}$.

3.2 Kalibrierung der Kamera

Da bei der Zugkraftanalyse die absolute Verschiebung der Fluoreszenzpartikel und die Größe der Zelle eine entscheidende Rolle spielen, war es wichtig die Größe eines Pixels im hier verwendeten Mikroskop-Kamera-System zu kennen. Mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (Kantenlänge 0,05 mm) und dem Programm Image-Pro Plus wurde daher die Pixelgröße der Kamera auf 205 nm bestimmt. Eine Fläche von 5 x 5 Pixeln enthält somit einen quadratischen Bildausschnitt mit einer Kantenlänge von ca. 1 µm.

3.3 Phänotypisierung der primären Osteoblasten

3.3.1 Nachweis von Osteoblasten-Proteinen

Im Laufe der Entwicklung aus mesenchymalen pluripotenten Stammzellen synthetisieren Osteoblasten als Knochenmatrix produzierende Zellen eine Reihe von Proteinen, deren Expression hier zur Charakterisierung des Phänotyps der Osteoblasten herangezogen wurde (Eckert (2005)). Diese Syntheseprodukte, wie Kollagen Typ I, Osteocalcin, Osteopontin, BSP (Bone Sialoprotein) und andere Proteine, dienen daneben außerdem als Biomarker der Ursachenforschung von Osteopathien sowie der Beurteilung der Knochenumbau- und -geschwindigkeit (Bieglmayer et al. (2006)). Dabei ist Osteocalcin das einzige der oben genannten Proteine, welches speziell von Knochenzellen synthetisiert wird.

Zur Phänotypisierung boviner Osteoblasten wurden immunzytochemische Färbungen verschiedener Proteine (Osteocalcin, BSP und Kollagen Typ-I) durchgeführt. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.1.7 beschrieben, auf Deckgläsern für zwei Tage bis zur Konfluenz in Vollmedium kultiviert, anschließend fixiert und mit den genannten Antikörpern gefärbt.

3.3.1.1 Kontrollfärbungen - Positiv – Negativ

Als methodische Kontrolle wurde eine anti-Vimentin-Färbung (Vimentin kommt in allen mesenchymalen Zellen vor) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit Mausserum anstelle des ersten Antikörpers.

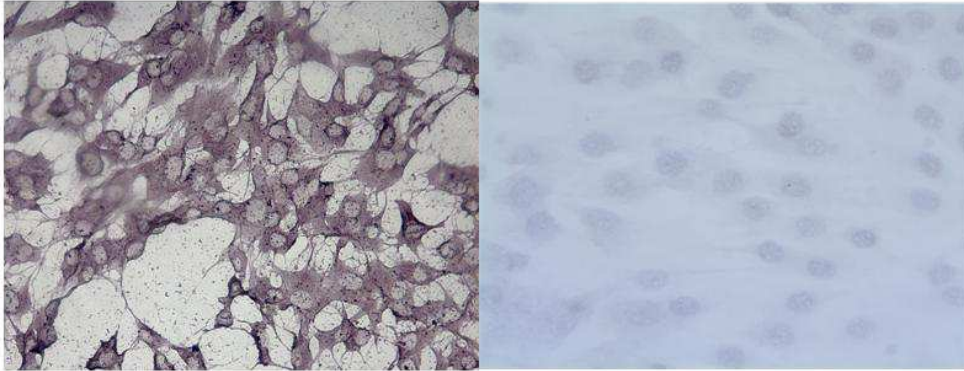


Abbildung 18: Kontrollfärbungen - Positiv - Negativ. Links: Positivkontrolle mit Vimentin; Rechts: Negativkontrolle mit Mausserum

3.3.1.2 Osteocalcin (OC)

Das aus 49 Aminosäuren bestehende Osteocalcin wird in der frühen und späten Differenzierung den Osteoblasten synthetisiert und ist ein nicht-kollagenes Peptidhormon, welches 2 % des totalen Knochenproteins ausmacht. Es besitzt eine hohe Affinität zum Hydroxylapatit und Calcium. Osteocalcin ist ein Marker der Knochenneubildung mit guter diagnostischer Spezifität.

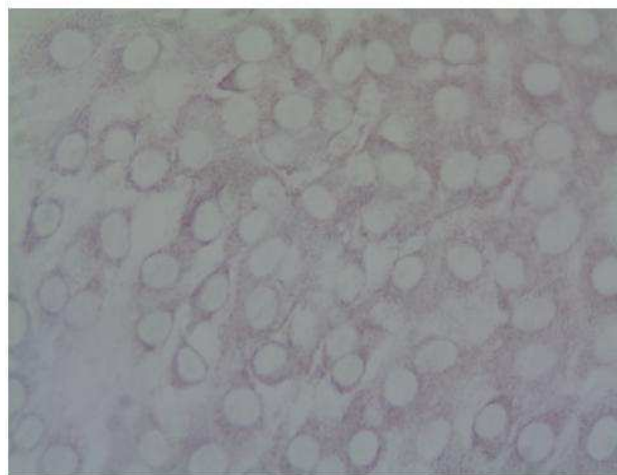


Abbildung 19: Osteocalcinnachweis. Osteocalcinnachweis in primären Osteoblasten. Chloronaphthol-Färbung

3.3.1.3 Kollagen Typ-I

Kollagen ist ein nur bei Menschen und Tieren vorkommendes Strukturprotein des Bindegewebes (genauer: der extrazellulären Matrix). Kollagen Typ I, ein fibrilläres Kollagen, kommt in vielen Geweben vor, am häufigsten in Haut und Knochen, aber auch in Sehnen oder der Hornhaut des Auges. Differenzierte Osteoblasten produzieren fast ausschließlich diesen Kollagentyp. Es nimmt mit einem Anteil von 90% den größten Teil des organischen Materials der Knochenmatrix ein.

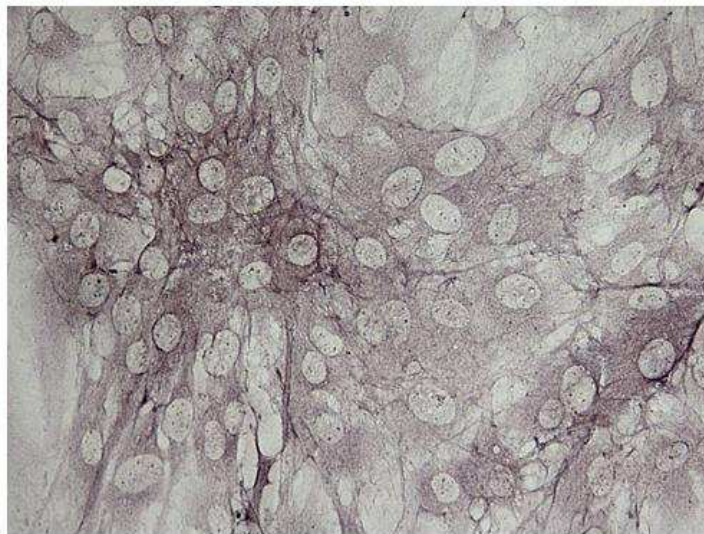


Abbildung 20: Kollagen-Typ 1-Nachweis. Kollagen-Typ 1-Nachweis in primären Osteoblasten. Chloronaphthol-Färbung

3.3.1.4 Knochen - Sialoprotein (BSP)

„Bone Sialoprotein“ (früher als BSP II bezeichnet), ist ein Glykoprotein, das in mineralisierendem Bindegewebe, wie Knochen, Dentin oder kalzifizierendem Knorpel, gefunden wird. BSP macht 8% der nicht kollagenen Proteine des Knochens aus und wird zeitgleich mit Osteocalcin gebildet. Ihm wird eine ähnliche Funktion wie Osteopontin (früher als BSP I) und damit der Hydroxylapatitbildung zugeschrieben.

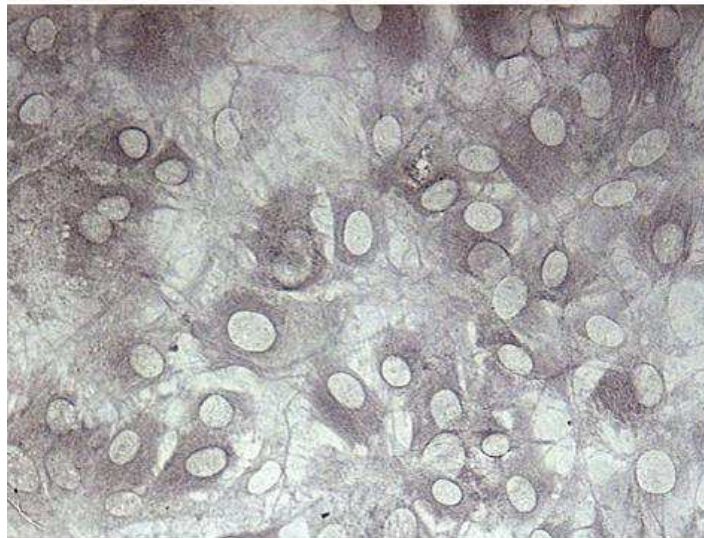


Abbildung 21: BSP (Bone Sialoprotein)-Nachweis. BSP (Bone Sialoprotein) Nachweis in primären Osteoblasten. Chloronaphthol-Färbung.

3.3.2 MTT-Zellproliferationsassay

Um aussagekräftige Experimente bezüglich der Reaktion von Zellen auf einen mechanischen Stimulus zu realisieren wurden MTT-Zellproliferationsassays nach Mosmann, wie in Abschnitt 2.1.8 beschrieben, durchgeführt. Dies diente dem Nachweis der Proliferationssteigerung von Osteoblasten und Osteosarkomzellen nach mechanischer Stimulation und damit der mechanischen Sensitivität der entsprechenden Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (Wilcoxon (1945), Mann, Whitney (1947)).

Im Folgenden ist beispielhaft das Ergebnis eines MTT-Tests aufgeführt, welches Veränderungen der Extinktion und damit der Zellproliferationsraten der in den Experimenten verwendeten primär bovinen Osteoblasten darstellt. Alle Ergebnisse werden im tabellarischen Ergebnisteil (Kapitel 6.2) aufgeführt.

Tabelle 2: MTT-Zellproliferationsassay

Extinktionen	Dehnung (2x)	Kontrolle	Rang gedehnt	Rang ungedehnt
Zellart: POB	1,697	1,226	16	6
	1,534	0,889	15	1
	1,407	1,074	11	3
	1,454	1,201	13	5
	1,429	1,275	12	9
	1,497	1,018	14	2
	1,401	1,259	10	8
	1,239	1,183	7	4
	Mittelwert	1,45725	1,140625	
Standardabweichung	13,04%	13,50%		
Differenz (Extinktionen):	27,76%			
Signifikanz	Signifikant	($\alpha=0,05$)		

Testgröße T=UX	62
UY	2
unterer kritischer Wert	13
oberer kritischer Wert	51

Sowohl bei den primär bovinen Osteoblasten als auch den humanen MG-63 Osteosarkomzellen zeigten die MTT-Tests durchweg signifikante Aktivitätssteigerungen ($\alpha=0,05$) und damit Proliferationssteigerungen nach zwei Dehnungszyklen (30x, 1Hz, 4000 μ Strain). Die Aktivitätssteigerungen gegenüber der beobachteten Kontrollgruppe ohne mechanischen Stimulus betrugen in fünf MTT-Tests (je n=8) für die primär bovinen Osteoblasten 18,59%, 24,49%, 30,92%, 27,76% (s.o.) und 30,55%. Drei MTT-Tests (je n=8) zur Überprüfung der Osteosarkomzellen ergaben Aktivitätssteigerungen von 20,07%, 9,11% und 18,56%.

3.4 Zugkraftexperimente

3.4.1 Zugkräfte und Zellgröße vor Dehnung

In den Versuchsreihen wurden Experimente mit insgesamt 23 primären bovinen Osteoblasten (Abbildung 22) und 18 humanen Osteosarkomzellen MG-63 (Abbildung 23) auf Substraten mit einer BIS-Acrylkonzentration von 0,06% und einem Elastizitätsmodul von 7000N/m² durchgeführt. Während des Versuchsablaufes wurden zunächst 12 Fluoreszenzbilder im Abstand von 10 Sekunden aufgenommen. Dieser Beobachtungszeitraum von 2 Minuten diente zum einen als Vergleichswert der beiden Zellpopulationen in Ruhe, zum

anderen als Bezugsgröße für den Vergleich mit den Zellkräften nach Stimulation.

Die Zugkräfte der Zellen innerhalb der Zellpopulationen schwankten im Vergleich sehr stark. Die Zugkräfte einzelner Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Beobachtungszeitraumes vor Dehnung unterschieden sich aber relativ gering. Darauf soll in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen werden.

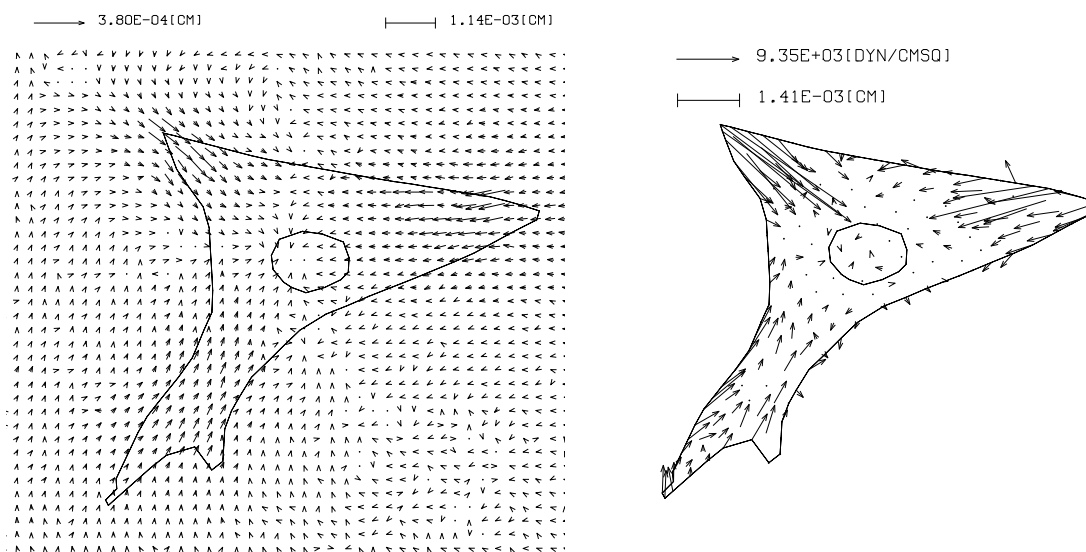


Abbildung 22: Deformationsmatrix und Kraftvektorfeld POB. Links: die typische Deformationsmatrix eines primär bovinen Osteoblasten. Rechts: das dazugehörige Kraftvektorfeld

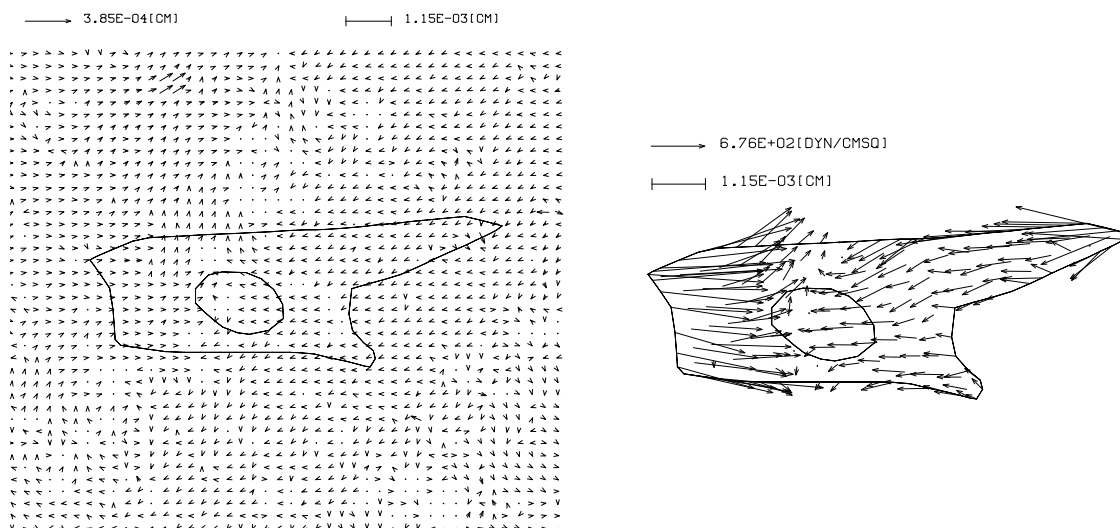


Abbildung 23: Deformationsmatrix und Kraftvektorfeld MG-63. Links: die typische Deformationsmatrix einer humanen Osteosarkomzelle MG-63. Rechts: das dazugehörige Kraftvektorfeld

3.4.1.1 Zugkräfte und Zellgröße der primär bovinen Osteoblasten

Wie bereits oben beschrieben schwankten die Zugkräfte innerhalb einer Zellpopulation im Vergleich der einzelnen Zellen sehr stark. Die durchschnittlichen mechanischen Spannungen der Osteoblasten vor Dehnung lagen zwischen 387dyn/cm^2 und 7723dyn/cm^2 , bei einem Mittelwert von 2561dyn/cm^2 (95% Konfidenzintervall zwischen 1878dyn/cm^2 und 3243dyn/cm^2).

Die Zellgröße, ermittelt durch Einzeichnen der Zellgrenzen mit Hilfe des Phasenkontrastbildes, lagen zwischen $2,2 \times 10^{-5}\text{cm}^2$ und $5,1 \times 10^{-5}\text{cm}^2$, bei einem Mittelwert von $3,2 \times 10^{-5}\text{cm}^2$ (95% Konfidenzintervall zwischen $2,9 \times 10^{-5}\text{cm}^2$ und $3,6 \times 10^{-5}\text{cm}^2$). Dabei gilt $1 \times 10^{-5}\text{cm}^2 = 1000\mu\text{m}^2$.

Um eine Aussage über die absoluten Kräfte der Zellen zu tätigen und diese im Anschluss auch zwischen den einzelnen Zellpopulationen zu vergleichen wurde die relative Zugkraft pro Fläche mit der Zellgröße multipliziert. Dabei gilt $1\text{dyn} = 10000\text{nN}$. Es fanden sich Zellkräfte zwischen 144nN und 2058nN , bei einem Mittelwert von 783nN (95% Konfidenzintervall zwischen 595nN und 970nN).

3.4.1.2 Zugkräfte und Zellgröße der Osteosarkomzellen MG-63

Die durchschnittlichen mechanischen Spannungen der Osteosarkomzellen vor Dehnung lagen zwischen 225dyn/cm^2 und 1848dyn/cm^2 , bei einem Mittelwert von 893dyn/cm^2 (95% Konfidenzintervall zwischen 627dyn/cm^2 und 1158dyn/cm^2).

Die Zellgrößen lagen zwischen $0,9 \times 10^{-5}\text{cm}^2$ und $2,23 \times 10^{-5}\text{cm}^2$, bei einem Mittelwert von $1,6 \times 10^{-5}\text{cm}^2$ (95% Konfidenzintervall zwischen $1,4 \times 10^{-5}\text{cm}^2$ und $1,8 \times 10^{-5}\text{cm}^2$).

Bei den absoluten Zellkräften fanden sich Zellkräfte zwischen 39nN und 400nN , bei einem Mittelwert von 144nN (95% Konfidenzintervall zwischen 91nN und 197nN).

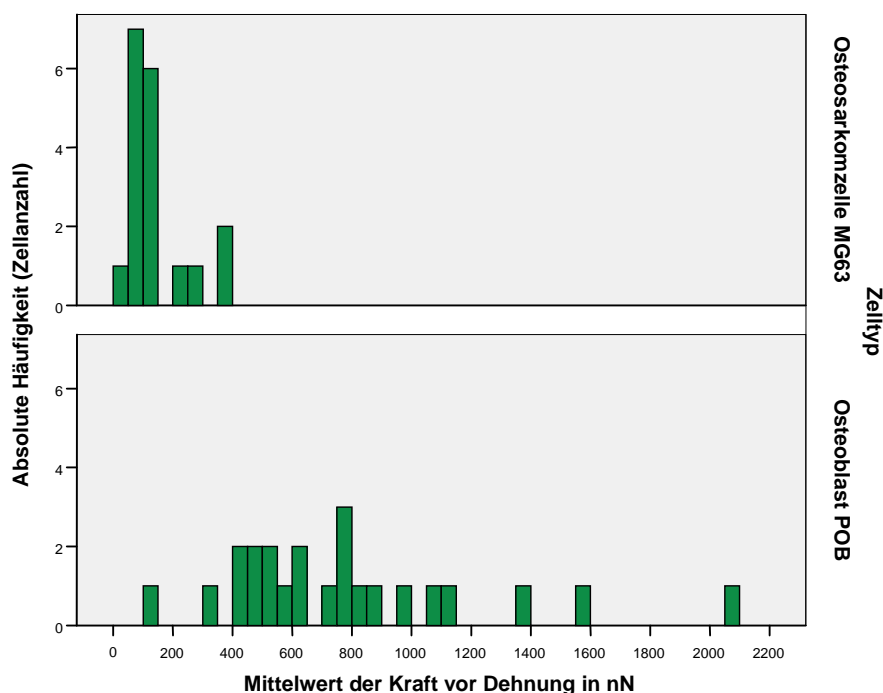


Abbildung 24: Zugkräfte der POB und MG-63. Verteilung der durchschnittlichen Zugkraft in nN der beiden Zellpopulationen vor Stimulation. Oben: Osteosarkomzellen. Unten: Osteoblasten

3.4.2 Vergleich der verschiedenen Zelltypen

Die in den Experimenten eingesetzten Zellpopulationen wurden auf Unterschiede hinsichtlich Zugkraft und Zellgröße getestet. Unter Annahme nicht normalverteilter Daten wurde hier ein nonparametrisches Testverfahren (Mann-Whitney-U-Test) eingesetzt.

3.4.2.1 Vergleich der Zugkräfte

In Bezug auf die von den Zellen auf das Substrat ausgeübten Zugkräfte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen primären Osteoblasten und den Osteosarkomzellen MG-63 festgestellt werden. Der Vergleich der durchschnittlichen Zellkräfte in nN vor mechanischer Stimulation zeigt im Mann-Whitney-U-Verfahren ($p \leq 0,001$) höchstsignifikante Unterschiede. Diese lassen sich bei Betrachtung der durchschnittlichen Zugkräfte pro Zellfläche (dyn/cm^2) bestätigen (Mann-Whitney-U-Test: $p \leq 0,001$). Um den Vergleich optisch

nachvollziehen zu können, sind die Zugkräfte der beiden Populationen in Abbildung 25 neben dem Vergleich der Zellgröße noch mal graphisch als Boxplot dargestellt.

3.4.2.2 Vergleich der Zellgröße

Auch im Hinblick auf die Zellgröße konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beobachteten Zellarten gefunden werden. Der Vergleich der Zellgröße in cm^2 zeigt höchstsignifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Verfahren ($p \leq 0,001$)).

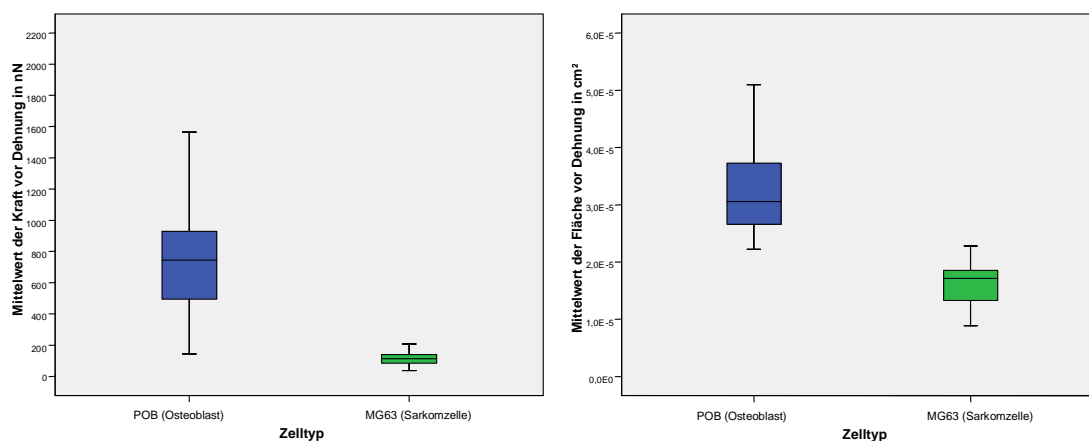


Abbildung 25: Vergleich von Zellgröße und Zugkraft. Links: Vergleich der durchschnittlichen Zugkräfte in nN der beiden Zellgruppen vor mechanischer Stimulation. Rechts: Vergleich der Zellgröße in cm^2 der beiden Zellgruppen vor mechanischer Stimulation. blau: Osteoblasten (POB, $n=23$), grün: Sarkomzellen (MG-63, $n=18$)

3.4.3 Kontrollversuche

Während der Versuche hat sich gezeigt, dass das Programm Libtrc auch versucht Verschiebungen und damit Kraftvektoren im Substrat zu finden, wenn eigentlich keine Verschiebung der Fluoreszenzpartikel durch Zugkräfte der Zelle stattfindet. Diese fehlerhaften Vektoren sind jedoch im Verhältnis zu den hervorgerufenen Verschiebungen durch Osteoblasten vernachlässigbar klein und zeigen bei deren Kraftberechnungen keinen Einfluss. Vergleicht man aber die Deformationsmatrix eines Osteoblasten (siehe Abbildung 22) mit der Deformationsmatrix einer Osteosarkomzelle (siehe Abbildung 23), so fällt auf,

dass es optisch zu keiner gerichteten Deformation in der durch Sarkomzellen hervorgerufenen Matrix kommt. Es wäre also möglich, dass die berechneten, relativ geringen Kräfte der Sarkomzellen lediglich Artefakte darstellen. Zum Ausschluss dieser Annahme wurden Kontrollexperimente mit dem gleichen Versuchsablauf ohne Zelle auf dem Substrat durchgeführt. Dabei waren in keinem Fall signifikanten Deformations- und in einigen Fällen lediglich keiner Ordnung folgende Kraftvektoren zu erkennen, die am ehesten mangelhafter Bildqualität entsprachen. Die vom Programm errechneten Zugkräfte dieser Kontrollen lagen einerseits um ca. eine Zehnerpotenz unter denen der Sarkomzellen, andererseits zeigten sich deutlich größere Schwankungen, die mit den Ergebnissen aller anderen Versuche nicht vereinbar waren. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass auch die gemessene Deformierung der Substrate in den Experimenten mit den Sarkomzellen durch die Zugkräfte der Zellen hervorgerufen worden sind.

3.4.4 Zusammenhang zwischen Zugkraft und Zellgröße

In bisherigen Arbeiten wurde häufig auf die Annahme verwiesen, dass größere Zellen auch eine größere Zugkraft erbringen können (Lautenschläger (2007), Curtze (2004), Rieger (2004)). Dies sollte über eine Korrelation der Zugkraft mit der Zellgröße in den beiden Zellpopulationen untersucht werden. Dabei lautete die angenommene Hypothese, dass Zugkraft und Zellfläche linear miteinander korrelieren.

In der Gruppe der Osteoblasten konnte beim Vergleich zwischen Kraft und Fläche kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden. Es zeigte sich ein Rang-Korrelationskoeffizient (Kendalls-Tau) von $r=0,02$ bei $p=0,90$.

Auch in der Gruppe der Osteosarkomzellen zeigte sich beim Vergleich zwischen Kraft und Fläche kein signifikanter Zusammenhang. Der Rang-Korrelationskoeffizient (Kendalls-Tau) lag bei $r=0,11$ ($p=0,52$).

3.4.5 Zugkräfte nach Dehnung

Während des Versuchsablaufes wurden, wie in Abschnitt 2.3.6.2 beschrieben, nach der mechanischen Stimulation in Form der Dehnung zunächst bei minimal möglicher Belichtungszeit 50 Fluoreszenzbilder innerhalb von 35 Sekunden aufgenommen. Dies diente der Beobachtung von Veränderungen der Zugkräfte in den ersten Sekunden nach Stimulation, die sich in vorherigen Experimenten angedeutet hatten (Lautenschläger (2007)). Im Anschluss folgten weitere 30 Fluoreszenzaufnahmen innerhalb von 5 Minuten.

3.4.5.1 Osteoblasten

Die durchschnittlichen absoluten Zugkräfte der Osteoblasten nach Dehnung lagen zwischen 125nN und 1762nN, bei einem Mittelwert von 753nN (95% Konfidenzintervall zwischen 577nN und 928nN).

3.4.5.2 Osteosarkomzellen

Die durchschnittlichen absoluten Zugkräfte der Osteoblasten nach Dehnung lagen zwischen 39nN und 381nN, bei einem Mittelwert von 140nN (95% Konfidenzintervall zwischen 88nN und 19nN).

3.4.6 Zugkraftveränderungen durch die mechanische Stimulation

Zur Untersuchung der Auswirkung der mechanischen Stimulation auf die Zugkräfte wurde unter der Annahme nicht normalverteilter Daten ein nonparametrisches Testverfahren eingesetzt. Beim Vergleich der durchschnittlichen Zellkräfte (in nN) in beiden Zellpopulationen vor Dehnung im Vergleich zu nach Dehnung zeigte sich kein signifikanter Unterschied (POB: Wilcoxon: $p=0,078$; MG-63: Wilcoxon: $p=0,777$).

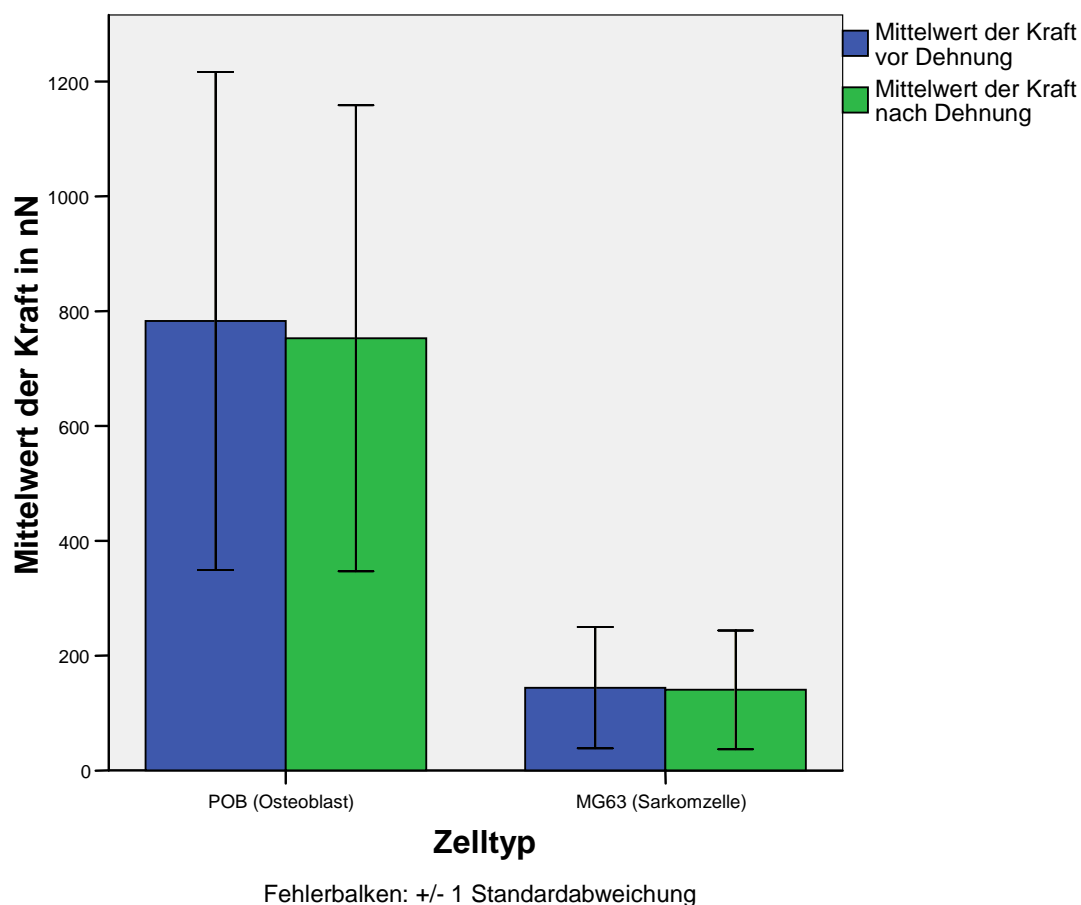


Abbildung 26: Zugkraftveränderungen durch mechanische Stimulation. Links: Zugkraftveränderung der Osteoblasten (n=23) durch Dehnung. Rechts: Zugkraftveränderung der Osteosarkomzellen (n=18) durch Dehnung. Es zeigt sich bei beiden Zellpopulationen kein signifikanter Unterschied.

3.4.7 Analyse der Reaktionstypen

Sowohl bei der Zugkraft-Analyse der Osteoblasten, als auch der Sarkomzellen zeigte sich, dass die getesteten Zellen nicht einheitlich auf die Dehnung reagierten. Aufgrund dieser bereits von Rieger (2004), Mennenga-Klopp (2005) und Lautenschläger (2007) beschriebenen unterschiedlichen Reaktionen der Zellen auf mechanische Stimulation war es notwendig, die einzelnen Graphen der Zugkräfte über die Zeit optisch auszuwerten und gleiche Reaktionstypen in Gruppen zusammenzufassen.

3.4.7.1 Primär bovine Osteoblasten

Die optische Graphen-Auswertung der Zugkräfte über die Zeit zeigte bei den 23 primär bovinen Osteoblasten vier unterschiedliche Reaktionsarten auf die mechanische Stimulation. Die erste Gruppe (n=8) reagierte mit einer sprunghaften sofortigen Abnahme ihrer zellulären Zugkräfte innerhalb der Zeit bis zum ersten Bild (ca. 1 Sekunde). Die durchschnittliche Kraftabnahme lag dabei zwischen 6,89% und 19,3%, bei einem Mittelwert von 13,48% (95% Konfidenzintervall zwischen 10,0% und 16,95%). Die zweite Gruppe (n=7) zeigte keine eindeutige Reaktion auf die Dehnung. Die zwei anderen Gruppen wiesen eine langsame, kontinuierliche Zunahme (n=4), bzw. Abnahme (n=3) der Zugkräfte über die Zeit auf. Der Verlauf einer Zelle folgte keiner eindeutigen Systematik und ließ sich keiner dieser Gruppen zuordnen. Insgesamt kam es bei 16 Zellen zu Veränderungen der Zugkräfte.

Abbildung 27 zeigt den typischen Verlauf von vier Zellen der unterschiedlichen Reaktionsarten der primär bovinen Osteoblasten auf den Dehnungsreiz.

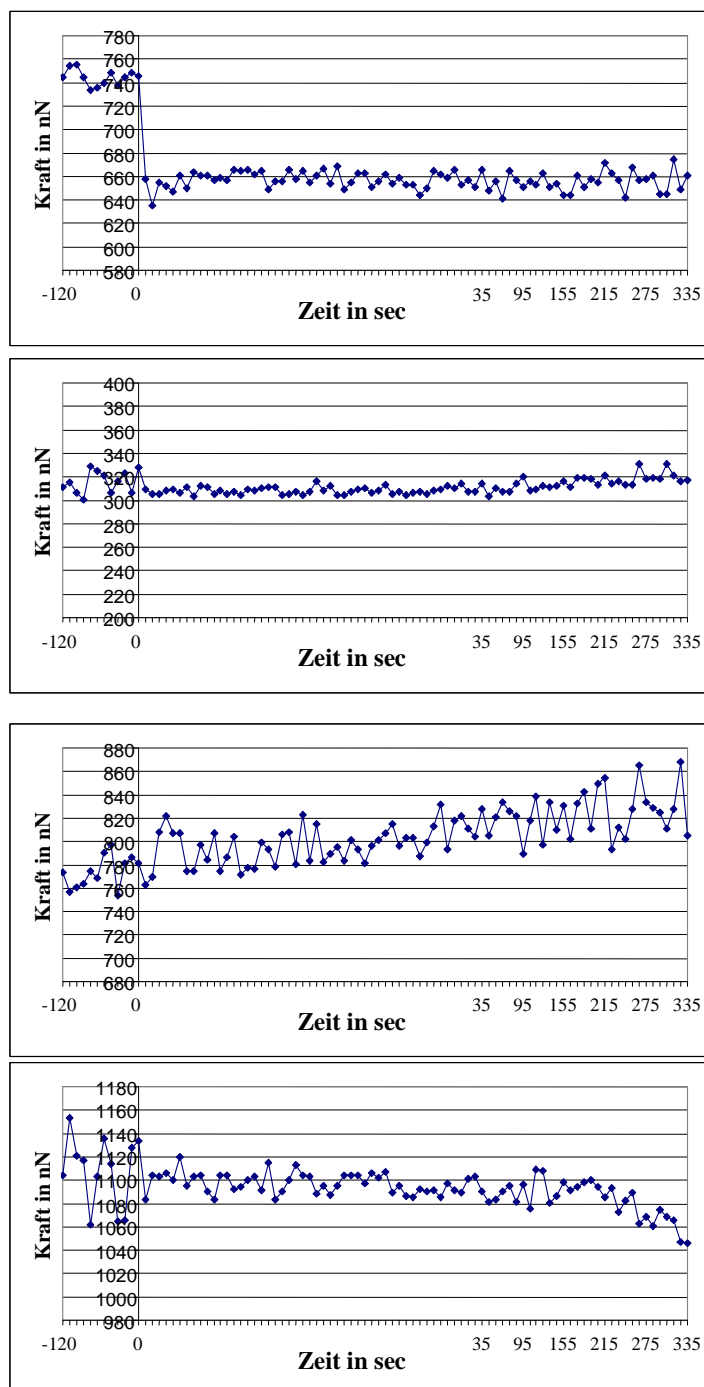


Abbildung 27: Verlauf der Zugkräfte der POB nach Gruppen. Die mechanische Stimulation erfolgte bei 0 Sekunden. Oben: typischer Verlauf der Gruppe mit Kraftabnahme unmittelbar nach Stimulation durch Dehnung (n=8). 2. Graph: Verlauf ohne Reaktion auf die Dehnung (n=7). 3. Graph: Verlauf mit langsamer Zunahme der Zugkräfte (n=4). 4. Graph: Verlauf mit langsamer Abnahme der Zugkräfte (n=3). Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungsbereiche der x-Achse. Die Bilder vor Dehnung haben einen Abstand von je 10 Sekunden. Die ersten 50 Bilder nach Dehnung wurden innerhalb von 35 Sekunden aufgenommen. Der Abstand der folgenden 30 Bilder betrug wieder 10 Sekunden.

3.4.7.2 Humane Osteosarkomzellen MG-63

Bei Auswertung der Graphen bezüglich der Zugkräfte über die Zeit stellten sich bei den 18 humanen Osteosarkomzellen 3 unterschiedliche Reaktionsarten auf die mechanische Stimulation dar. Die überwiegende Mehrzahl der Zellen (n=13) zeigte keine eindeutige Reaktion auf den mechanischen Reiz und änderte ihre Zugkräfte im Vergleich zum Beobachtungszeitraum vor der Dehnung nicht (Gruppe 1). Die zweite Gruppe (n=3) reagierte mit einer Abnahme der Zugkräfte nach der Stimulation, wobei 1 Zelle eine langsame Abnahme aufwies, während die beiden anderen Zellen neben einer langsamen Abnahme über die Zeit auch einen sprunghaften Abfall nach der Dehnung (-19,5%, -12,9%) zeigten. Die letzte Gruppe (n=2) wies eine langsame, kontinuierliche Zunahme der Zugkräfte über die Zeit auf. Insgesamt kam es bei 5 Zellen zu Veränderungen der Zugkräfte. Abbildung 28 zeigt den Verlauf von drei Zellen der unterschiedlichen Reaktionsarten der humanen Osteosarkomzellen auf den Dehnungsreiz.

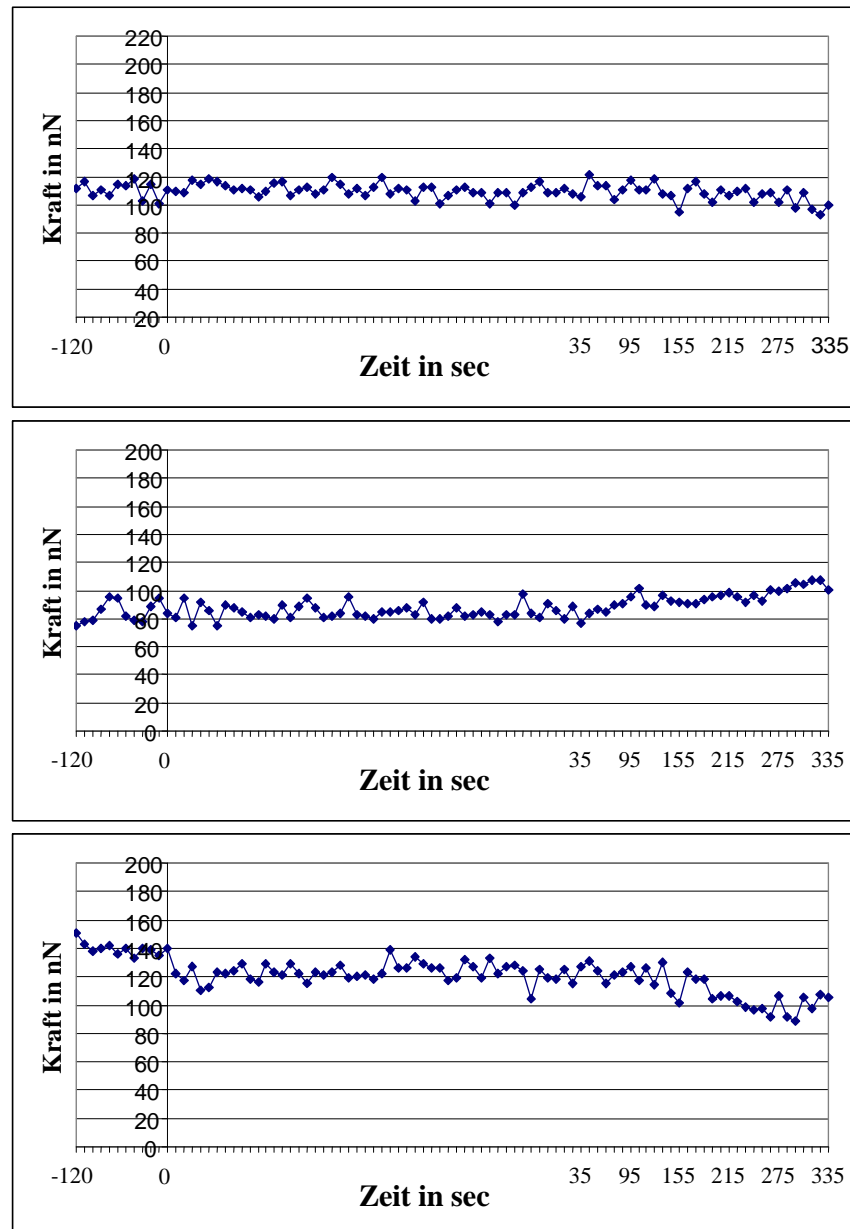


Abbildung 28: Verlauf der Zugkräfte der MG-63 nach Gruppen. Die mechanische Stimulation erfolgte bei $t = 0$ s. Oben: typischer Verlauf ohne Reaktion auf die Dehnung ($n=13$). 2. Graph: Verlauf mit langsamer Zunahme der Zugkräfte ($n=2$). 3. Graph: Verlauf der Gruppe mit Zugkraftabnahme nach Dehnung ($n=3$); zu sehen ist eine Zelle, die neben der langsamen Abnahme auch eine sprunghafte Abnahme direkt nach Stimulation zeigte. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungsbereiche der x-Achse. Die Bilder vor Dehnung haben einen Abstand von je 10 Sekunden. Die ersten 50 Bilder nach Dehnung wurden innerhalb von 35 Sekunden aufgenommen. Der Abstand der folgenden 30 Bilder betrug wieder 10 Sekunden.

3.4.8 Vergleich der verschiedenen Zelltypen

Vergleicht man die durchschnittlichen Zugkräfte beider Zelltypen nach Dehnung mit den durchschnittlichen Zugkräften im Beobachtungszeitraum vor Dehnung, so lässt sich, wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben, keine signifikante Änderung nachweisen. Bei der Analyse der verschiedenen Reaktionstypen fällt jedoch auf, dass im Vergleich mit den Osteosarkomzellen ein größerer Anteil der Osteoblasten mit einer Veränderung ihrer Zugkräfte auf die Dehnung und damit auf einen mechanischen Reiz reagiert. Aufgrund dessen wurde zum statistischen Vergleich ein Chi-Quadrat-Vierfelder-Test durchgeführt, um die Anzahl der Responder und damit die relative Häufigkeit der direkten Reaktion auf die mechanische Stimulation in beiden Zellpopulationen zu vergleichen. Als Responder gelten solche Zellen, die direkt nach der Dehnung eine Veränderung hinsichtlich der ausgeübten Kraft auf das Substrat zeigen, die außerhalb der normalen Streuung vor der Dehnung liegt. Hierzu wurde die Differenz der Zugkräfte zwischen letztem Zeitpunkt vor und ersten Zeitpunkt nach der Dehnung berechnet und durch die Standardabweichung aller Messwerte vor Dehnung ($n=12$) geteilt (Z-Transformation). Die so berechneten z-Werte lagen außerhalb der normalen Streuung, wenn sie $> 1,96$ waren. Bei den Osteoblasten zeigten hinsichtlich der absoluten Kraft (in nN) 9 Zellen dieses Verhalten, 14 Zellen blieben direkt nach Dehnung ohne Kraftveränderung. Bei den Sarkomzellen wiesen lediglich 3 Zellen eine solche Kraftänderung auf, die Zugkräfte von 15 Zellen blieben zu diesem Zeitpunkt unverändert. Es ist zu vermuten, dass der Anteil der Responder bei den Sarkomzellen deutlich niedriger liegt, als bei den Osteoblasten, da bei gleicher Verteilung bei den Sarkomzellen 7 Responder und 11 Non-Responder zu erwarten wären. Statt der 7 wurden aber nur 3 gefunden, was bei der relativ kleinen Stichprobe aber gerade so noch nicht für einen signifikanten Unterschied im Chi-Quadrat-Vierfelder-Test ausreicht ($p=0,051$).

Bestimmt man mit Hilfe dieses Vierfeldertests den Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen in Hinblick auf alle Zellen, bei denen es zu Veränderungen der Zugkräfte gekommen war findet man einen hochsignifikanten Unterschied ($p<0,01$) zwischen Osteoblasten und Osteosarkomzellen.

3.4.9 Kontrollversuche

Die direkt nach Dehnung zu beobachteten Zugkraftverluste könnten auch durch Veränderungen am Substrat, beispielsweise durch Ablösen des Polyacrylamidgels von der vorgespannten Aclarfolie, zustande kommen. Aufgrund dessen wurden die in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Kontrollversuche ohne Zelle auf ein solches Verhalten geprüft. Dabei zeigte sich keine Zugkraftabnahme zwischen dem letzten Zeitpunkt vor Dehnung im Vergleich zum ersten Zeitpunkt danach. Eine wie oben beschriebene Veränderung im Versuchsaufbau ist damit auszuschließen.

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe der Zugkraftmessung die auftretenden Änderungen der Kräfte in primär bovinen Osteoblasten nach Dehnung analysiert werden und gleichzeitig mit dem Verhalten von Osteosarkomzellen verglichen werden. Dabei ist es gelungen, zum einen Zugkräfte von Osteoblasten und einer Osteosarkomzelllinie im Vergleich darzustellen, zum anderen Zugkraftexperimente mit der Beobachtung unter mechanischer Belastung zu koppeln. Neben der bereits vorliegenden Methoden für die Zellkultur und der Zugkraftmessungen konnte ein neues, verbessertes Kamerasystem in den Versuchsaufbau eingebunden werden.

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Absolute Zellkräfte

Die durchschnittlichen Zugkräfte vor mechanischer Stimulation der primär bovinen Osteoblasten in den hier vorliegenden Experimenten lagen bei 783nN. Zugkräfte von 660nN konnten an POB in vorherigen Arbeiten im Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik durch Curtze (2004) nachgewiesen werden. Bei den Sarkomzellen MG-63 lagen die Zugkräfte vor mechanischer Stimulation bei 144nN. Curtze konnte Zugkräfte von 47nN (Curtze (2004)) nachweisen.

Messungen der durch eine Zelle auf ihre Unterlage ausgeübten absoluten Kraft sind erheblich von der zur Kraftermittlung angewandten Methode und deren Durchführung abhängig. Auch die Art der verwendeten Zellen, die in anderen Arbeitsgruppen nur in den seltensten Fällen primär bovinen Osteoblasten entsprechen, lassen einen möglichen Vergleich nicht zu. In der Literatur finden sich dementsprechend unterschiedliche Angaben der ermittelten Zugkräfte (Rieger et al. (2005), Simon et al. (2003)). Eine Aussage zu den unterschiedlichen Kräften der verschiedenen hier eingesetzten Zellpopulationen ist jedoch möglich und wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

4.1.2 Zugkraftunterschiede in beiden Zellpopulationen

Beim Vergleich der Zugkräfte der beiden eingesetzten Zellpopulationen in Ruhe, also ohne jegliche Art der mechanischen Stimulation, zeigte sich ein höchstsignifikanter Unterschied zwischen primär bovinen Osteoblasten und Osteosarkomzellen. So lagen die durchschnittlichen Zugkräfte der Osteoblasten bei 783nN, die der Sarkomzellen bei 144nN. Ähnliche Unterschiede konnten bereits durch Curtze und Rieger gezeigt werden (Curtze (2004), Rieger (2005)). Ein solches Ergebnis lässt die Frage nach dem Zusammenhang der Zugkräfte und einer möglichen Zellverschleppung in Form der Tumormetastasierung aufkommen. So konnten Versuche belegen, dass eine verminderte Adhäsionskraft mit einer erhöhten Motilität von Zellen einhergeht (Munevar et al. (2001), Gaudet et al. (2003)).

Um letztendlich einen Einfluss der verminderten Zugkräfte von Tumorzellen im Vergleich zu normalen Knochenzellen auf die Metastasierung zu klären sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei sind verschiedene Faktoren der Mechanotransduktion zu diskutieren. Verlieren Tumorzellen z.B. gewisse Fähigkeiten der Mechanotransduktion wie z.B. die Herstellung wichtiger, für die Erkennung unterschiedlicher mechanischer Gegebenheiten notwendiger Proteine? Subauste konnte diesbezüglich nachweisen, dass Zellen, die in der Lage sind entweder gar kein Vinculin (Vinculin-Null-Zellen (vin -/-)) oder nur eine Mutation von Vinculin zu bilden, zum einen eine verlängerte Überlebenszeit, zum anderen eine erhöhte Motilität aufweisen (Subauste et al. (2004)). Weiterhin konnten Versuche im Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik zeigen, dass die Anzahl der fokalen Adhäsionen und die Konzentration von Vinculin in diesen fokalen Adhäsionen in primär bovinen Osteoblasten im Vergleich zu MG-63-Sarkomzellen höher sind. (Tan et al (2010)). In Kenntnis der Tatsache, dass Vinculin eines der wichtigen Proteine in sich ausbildenden fokalen Adhäsionen ist, würde ein solches Phänomen eine verminderte Adhäsion und geringere Zugkräfte der Zelle zur Folge haben. Weiterhin konnte der in der Literatur aktuell häufig diskutierte Zusammenhang zwischen Erkennung der Umgebung und der Mechanotransduktion als Unterschied in normalen und genetisch veränderten Zellen in Bezug auf deren

Wachstumsverhalten nachgewiesen werden (Wang et al. (2000)). Ein weiteres Phänomen von Tumorzellen zeigte eine Reihe von Experimenten mit Brustkrebszellen. Paszek fand heraus, dass ein Tumor im Vergleich zum gesunden Gewebe eine erhöhte Zytoskelett-Steifigkeit aufweist und diese Steifigkeit mit einer erhöhten Rho und ERK Aktivität einhergeht (Paszek et al. (2005)). In Abhängigkeit der Steifigkeit des umgebenden Substrates konnte eine Veränderung der Proliferation, der Ausbildung fokaler Adhäsionen und Zugkräfte sowie Beeinträchtigung der Gewebeorganisation und Zellpolarität dargestellt werden. Eine härtere extrazelluläre Matrix als umgebendes Substrat führt demzufolge zu einem härteren, solideren Tumor. Mit dieser Tatsache einhergehend scheint für die Onkogenese die Steifigkeit des Zytoskeletts und die Kräfte der Zelle in Bezug auf ihre Umgebung (Zugkräfte) eine wichtige Rolle zu spielen.

4.1.3 Veränderung der Zugkräfte nach mechanischer Stimulation

In verschiedenen Versuchen konnten Reaktionen der Zugkräfte einer Zelle auf einen mechanischen Stimulus nachgewiesen werden (Rieger (2005), Klopp (2005)). Eine immer gleichgerichtete Reaktion auf eine externe Kraft, sei es durch Dehnung, Scherfluss oder Druck (Rasterkraftmikroskop) konnte nicht nachgewiesen werden. In Kenntnis des aktuellen Stands der Forschung scheint dies jedoch nicht unerwartet (siehe 4.2). Auch in den hier vorliegenden Ergebnissen war trotz der Standardisierung des Versuchsaufbaues mit homogenen Zellen keine Zugkraftveränderung nachweisbar, die als eindeutige Reaktion, z.B. sprunghafte Zu- oder Abnahme der generierten Kräfte, zu werten wäre. Wie in 3.4.7 beschrieben lassen sich jedoch sowohl für die primär bovinen Osteoblasten, als auch für die Osteosarkomzellen MG-63 bestimmte Verhaltensmuster erkennen, die eine Einordnung der Reaktionstypen in Gruppen möglich machen. So kam es bei 8 der untersuchten POB zu einer sprunghaften Abnahme der Zellkräfte nach mechanischer Stimulation, bei 4 Zellen zu einer langsamen kontinuierlichen Zunahme und bei 3 Zellen zu einer kontinuierlichen Abnahme der beobachteten Zugkräfte. Keine Reaktion auf den mechanischen Reiz durch Dehnung zeigten 7 Osteoblasten. In der

Gruppe der Osteosarkomzellen MG-63 reagierte die überwiegende Mehrzahl der Zellen nicht auf den Dehnungsreiz (13/18). Daneben reagierten 3 Sarkomzellen mit einer Kraftabnahme und 2 Zellen mit einer langsamen kontinuierlichen Zunahme der Zugkräfte.

Insgesamt gab es also verschiedene Reaktionstypen in beiden untersuchten Zellpopulationen. Auffällig ist aber, dass die Sarkomzellen im Vergleich zu den Osteoblasten häufig keine Reaktion auf den externen Reiz zeigen.

4.1.3.1 Verschiede Reaktionstypen

Die Komplexität der Mechanotransduktion lässt sich daran erkennen, dass trotz intensiver Forschung der letzten Jahrzehnte ein klares Ergebnis in Bezug auf einen Mechanosensor und die daran gekoppelte biochemische Reaktion weiterhin aussteht. Ein komplexes Zusammenspiel der externen auf die Zelle ausgeübten Kräfte und der internen, vom Zytoskelett hervorgerufenen Kräfte im Sinne mehrerer Feedbackschleifen scheint sehr wahrscheinlich. Folglich ist die Reaktion einer Zelle immer auch von deren aktuellem Zustand abhängig. Auf diese Tatsache, insbesondere auch auf den Zusammenhang zwischen Zytoskelett, fokalen Adhäsionen und den unterschiedlichen Reaktionstypen, soll gesondert in Kapitel 4.2 eingegangen werden.

Tenbosch konnte in Versuchen mit primär bovinen Osteoblasten nachweisen, dass ein Calciumsignal in durch Dehnung stimulierten Zellen räumlich unabhängig voneinander ca. 120 – 160 s nach Abschluss des mechanischen Reizes durch Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher auftritt (Tenbosch (1999)). Eine sofortige Reaktion der Zellen wie in einigen wenigen Osteosarkomzellen und 8 von 23 Osteoblasten muss also calciumunabhängig verlaufen. Die langsame kontinuierliche Zu- oder Abnahme der Zugkräfte jedoch könnte unter anderem über eine Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels und damit Aktivierung für die Mechanotransduktion notwendiger Signalkaskaden hervorgerufen werden. Einen zeitlich versetzter Zusammenhang zwischen intrazellulärem Calciumsignal und anschließender Veränderung der Zugkräfte konnte in Fisch-Keratozyten nachgewiesen werden (Doyle et al. (2004)). Hier könnten Calciumfarbstoff-gekoppelte Zugkraft-

experimente weiter Aufschluss über einen Zusammenhang geben. Den möglichen apparativen Aufbau konnten Doyle et al. bereits zeigen (Doyle et al. (2002)). Eine Erklärung für die unmittelbare Abnahme der Zellkräfte nach mechanischer Stimulation wäre ein Abreißen der fokalen Adhäsionen durch die ausgeübte Kraft. So konnte z.B. bereits ein Kraft- und ATP-abhängiges Abreißen der fokalen Adhäsionen nachgewiesen werden (Kong et al. (2010), Crowley et al. (1995)). In den Zellexperimenten wäre also eigentlich eine kurzfristige Zunahme, gefolgt von einer Abnahme der Zugkräfte zu erwarten gewesen. In diesem Versuchsaufbau konnte das erste Bild ca. 1 s nach Abschluss des Stimulus aufgenommen werden. Eventuell wäre hier zu diskutieren, ob der oben beschriebene Ablauf aufgrund der Geschwindigkeit nicht zu erkennen ist.

Die vorgefundenen Zugkraftänderungen könnten auch Konsequenz oder Ursache einer durch den mechanischen Stimulus verursachten Motilität der Zellen sein. Motile Zellen könnten, entsprechend dem Modell der Durotaxis, an Orte höherer Steifigkeit, hervorgerufen durch Dehnung und Kompression der Geloberfläche während der mechanischen Belastung, wandern. Damit käme es zu Zugkraftveränderungen beim Ausbilden von Zellfortsätzen. Auf der anderen Seite könnte die vermehrte externe Belastung zu einem Verbleib der Zelle an diesem Ort und Veränderung des Zytoskeletts und damit auch der Zugkräfte führen, um dieser Kraft zu widerstehen.

Die Tatsache, dass neben der verminderten Zugkräfte in Ruhe die Sarkomzelllinie auch überdurchschnittlich häufig keine Reaktion auf den mechanischen Stimulus Dehnung zeigt, weist auch hier auf einen Unterschied im Erkennen und Verarbeiten der mechanischen Reize hin. Tenbosch beschrieb zwar eine mit den Osteoblasten vergleichbar starke Zunahme der Proliferation von MG-63 auf einen Dehnungsreiz, in den Experimenten mit FURA-2 beladenen Zellen konnte jedoch keine Calciumänderung entsprechend der Gruppe der Osteoblasten detektiert werden (Tenbosch (1999)). Ein möglicher Einfluss des intrazellulären Calciumsignals auf die Reaktion in Sarkomzellen könnte auch hier durch Calciumfarbstoff-gekoppelte Zugkraftexperimente überprüft werden.

Auch die verminderte Anzahl der fokalen Adhäsionen und die Konzentration von Vinculin in diesen fokalen Adhäsionen (Tan et al. (2010)) könnte eine Ursache für die in den Experimenten dargestellte geringere Reaktion der Osteosarkomzellen im Vergleich zu Osteoblasten sein.

4.1.4 Zusammenhang zwischen Zugkraft und Zellgröße

Bisherige Arbeiten im Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik gingen davon aus, dass es einen positiven Zusammenhang zwischen Zellgröße und Zugkraft gibt, also große Zellen eine große Zugkraft, kleine Zellen eine kleine Zugkraft aufweisen (Lautenschläger (2007), Rieger (2005), Curtze (2004)). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen konnte durch Korrelation von Zellgröße und Zugkraft weder in der Gruppe der Osteoblasten noch in der Gruppe der Sarkomzellen ein solcher Zusammenhang festgestellt werden (Kapitel 3.4.4.). Eine ähnliche Feststellung machten Ragopalan et al. durch Untersuchungen an Fibroblasten (Ragopalan et al. (2004)). Unterschiedliche Zugkräfte waren unabhängig von der Ausbreitungsfläche der Zellen aber abhängig von der extrazellulären Matrix. Eine positive Korrelation besteht zwischen der Höhe der Zugkräfte und den in dieser Region vorkommenden fokalen Adhäsionen (Dequchi et al. (2011)). Erste Untersuchungen bezüglich der durch das Zytoskelett vorgegebenen Zellform und der registrierten Zugkraft und Reaktion lassen auch hier Zusammenhänge vermuten (Lemmon et al. (2011)). Insgesamt muss also die Struktur der fokalen Adhäsionen und des Zytoskeletts und damit die Zugkräfte unabhängig von der Zellgröße generiert werden.

Nach aktuellem Stand der Forschung besteht diesbezüglich eine enge Korrelation zwischen externen Kräften (mechanische Stimulation, Substratsteifigkeit, extrazelluläre Matrix) und internen Kräften (Zytoskelett, fokale Adhäsionen) im Sinne einer ständigen Feedbackschleife. Das soll, auch in Hinblick auf die verschiedenen Reaktionstypen, im Folgenden näher diskutiert werden.

4.2 Externe und zellgenerierte Kräfte

Ein Zusammenhang zwischen der von außen applizierten Kraft und der zellulär generierten Kraft wird von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Die Mechanotransduktion und damit die zu erwartende Reaktion durch eine externe mechanische Belastung bleibt durch Blockade der Zytoskelettkontraktilität aus (Zhao et al. (2007), Torsoni et al. (2005), Rosenberg, N. (2003)). Weiterhin führt eine externe mechanische Stimulation innerhalb von 10 - 20 min zur Änderung der Anordnung von Aktinfilamenten (Zhao et al. (2007)).

Die unterschiedlichen Reaktionen der Zellen auf einen mechanischen Reiz in den hier vorliegenden Experimenten könnten auf dieses Zusammenspiel zurückzuführen sein. Während der Applikation von lang andauernder äußerer mechanischer Belastung einzelner fokaler Adhäsionen und gleichzeitiger Messung der Zugkräfte waren verschiedene Änderungen messbar (Sniadecki et al. (2007)). Nach anfänglicher Relaxation folgte eine erneute Zunahme der Zugkräfte, die auch über die Zeitspanne der mechanischen Belastung hinaus bestand. Auch hier konnte in einigen Zellen ein plötzlicher Verlust an Zugkraft und an anderen Zellen ein langsamer Verlust der Zugkraft nachgewiesen werden. Diese genannten und die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente lassen vermuten, dass die Mechanotransduktion nicht als simples Aktion-Reaktion-Modell dargestellt werden kann. Vielmehr besteht ein komplexes Zusammenspiel als dynamische Feedback-Schleife aus externer Belastung, Signaltransduktion, interner Zytoskelettspannung, erneuter Signaltransduktion, neuer Beurteilung der externen Kräfte, Signaltransduktion, usw. Letztendlich resultiert ein neuer Zustand, der als Reaktion zu sehen ist. Dies würde einem ständigen Vergleich von Ist- und Sollwert der Zugkräfte und einer entsprechenden Anpassung entsprechen. Eine Reaktion ist demnach vor allem abhängig vom momentanen Ist-Zustand der Zelle. Obwohl versucht wird durch standardisierte Verfahren in den Zellexperimenten, durch die immer gleiche Kultivierungsmethode und Versuchsdurchführung sowie den gleichen Versuchsaufbau, einen annähernd gleichen Ist-Zustand zu gewährleisten, können durch kleine Einflüsse im Ablauf der Methodik Unterschiede nicht komplett vermieden werden. So ist es z.B. auch schwierig vorauszusagen ob

die von außen aufgewendete Kraft über Integrine und das Zytoskelett während eines Belastungsexperimentes wirklich auf jede Zelle gleich übertragen wird oder der ankommende Reiz ggf. jedes Mal unterschiedlich ausfällt. Aufgrund dieser Überlegungen scheint klar, dass es nicht den einen Mechanosensor für die Erkennung eines äußeren Reizes oder der Umgebung zu geben scheint, sondern ein komplexes Zusammenspiel einzelner Kompartimente vorliegt, was zu unterschiedlichen Reaktionen führt.

4.2.1 Unterschiedliche mechanische Stimulationsarten

Untersuchungen zur Detektion eines Mechanosensors, sei es durch Scherfluss, Dehnung oder Druck, üben auf unterschiedliche Art und Weise einen externen mechanischen Stimulus auf die Zelle aus. Während Scherfluss im Verhältnis zum Untergrund an der apikalen Seite der Zelle angreift, wirkt die Stimulation durch Dehnung eher basal. Die mit dem AFM (Rasterkraftmikroskop) erzeugte Druckbelastung sogar nur punktuell. Dennoch führen unterschiedliche Arten von In-vitro-Kraftstimulationen zu gleichen Änderungen der Genexpression (Rubin et al. (2006)). Unterschiedliche Stimulationsarten rufen also über die gleichen Signaltransduktionswege ein gleiches molekulares Ergebnis hervor, wie beispielsweise die Konformationsänderung eines Proteins. Die entscheidende Frage dabei ist, wie die Zelle in der Lage ist die Unmengen von mechanischer Information zu filtern, zu ordnen und zu einer bestimmten Reaktion zusammenzufassen. Aussagen über Mechanismen der Mechano-transduktion sind aufgrund dieser Experimente zwar möglich, aber auf der Suche nach einem spezifischen Mechanosensor wahrscheinlich nur schwer vergleichbar.

4.3 Methode

4.3.1 Technische Hürden

In dieser Arbeit sollten, aufbauend auf vorherigen Experimenten im Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, zum einen Osteoblasten mit Osteosarkomzellen hinsichtlich ihrer Zugkräfte verglichen werden, zum anderen mit Hilfe einer neuen hochauflösenden Kamera mechanisch belastete Zellen und deren Reaktionsverhalten beobachtet werden. Wie in 2.3.5.1 beschrieben kam es zunächst aufgrund des neuen Versuchsaufbaus zu Schwierigkeiten bei der adäquaten Positionierung und Fixierung der Dehnungsmaschine auf dem Mikroskoptisch. Mit Hilfe von Schraubzwingen konnte nach einiger Übung die Erfolgsquote an auswertbaren Versuchen auf annähernd 100 % gesteigert werden. Dennoch ist für weiterführende Experimente ein besserer Versuchsaufbau möglich. Durch kleinste Verschiebungen der Zellkammer bei der Befestigung mit den Schraubzwingen waren Zellen, die sich, aufgrund ihrer Umgebung mit genügend Abstand zum Rand des Sichtfeldes und Kontakt zu anderen Zellen über Zellausläufer, optimal für die Versuche eignen, bereits aus dem Sichtfeld verschwunden. Damit waren sie nicht verwertbar und die Einstellungen mussten von vorne beginnen. Eine Variante, bei der Mikroskop und Dehnungsmaschine unabhängig voneinander aufgebaut werden können wäre hier denkbar. So könnte zunächst eine feste Verankerung der Dehnungsmaschine auf dem Tisch vorgenommen und anschließend das Mikroskop, optimalerweise auf einer vom zuvor genannten Tisch unabhängigen Vorrichtung, eingeschoben werden. Verschiebungen durch die Dehnungsstimulation würden so, durch die räumlich getrennte Ausrichtung des Mikroskops, kompensiert.

4.3.2 Mechanosensible Zellen oder mechanosensibles Gewebe

Ein immer wieder aufkommendes Thema im Zuge der Mechanotransduktion und des Remodelings des Knochens ist die Rolle der einzelnen Zellen im Knochenverbund. Sind die Osteoblasten oder die Osteozyten die führenden mechanosensitiven Zellen? Sind ggf. Aussagen über das komplexe Gebiet der

Mechanotransduktion in Hinblick auf Umbauvorgänge im Knochen an isolierten Zellen, wie in Zellexperimenten verwendet, sowieso nur Annäherungen und müsste man letztendlich nicht ein Modell entwickeln indem die Zellen im Verbund und dreidimensional in Hinblick auf ihre Reaktionen geprüft werden?

Der größte Anteil des Zellsystems Knochen wird durch Osteozyten gebildet. Osteozyten stehen wie unter 1.1 beschrieben über ihre Zellfortsätze miteinander in Kontakt. Diese liegen in Kanalikuli von einem Flüssigkeitssaum umgeben, der durch mechanische Kräfte in Bewegung versetzt wird. Daher erscheinen sie als bestgeeignet sowohl Stärke als auch Richtung einer mechanischen Stimulation, die auf den gesamten Knochen wirkt, in Form einer Art „Informationsnetzwerk“ zu registrieren. Auch Behauptungen, dass Osteozyten in ihren Lakunen einer Belastung von bis zu 30000 μ Strain ausgesetzt werden, obwohl der sie umgebende Knochen lediglich mit 3000 μ Strain belastet wird und sie damit als Verstärker aufzutreten scheinen, sprechen für eine führende Rolle der Osteozyten im Zusammenspiel des „Mechanosensings“ (Nicoletta et al. (2006), (2008)). Untersuchungen an Knochen von Mausmodellen, bei denen durch Diphtherietoxin 70 - 80% der Osteozyten entfernt wurden, wodurch es zum einen zu einer fragilen und porösen Knochenformation kam, zum anderen der erwartete Verlust an Knochensubstanz unter fehlender Belastung ausblieb (Tatsumi, S. et al. (2007)), unterstützen zudem diese These.

Grundlage der Überlegung, ob nur Beobachtungen am Knochenverbund letztendlich zu weiterführenden Erkenntnissen führen, ist, dass der Umbauvorgang im Knochen einen dynamischen Prozess darstellt und sich als Wechselspiel von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten im Bereich einer BMU (bone multicellular unit) versteht. Die komplexe Kommunikation zwischen den beteiligten Zellen kann über extrazelluläre Moleküle, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine, aber auch direkt über intrazelluläre Signalkaskaden mit der Expression spezifischer Proteine stattfinden. Dennoch können natürlich Grundlagen der Signalkaskaden in Zellexperimenten dargestellt werden. So konnte Hung beispielsweise nachweisen, dass es bei mit Scherfluss belasteten Knochenzellen zu einer intrazellulären Calciumreaktion kommt. Dabei ist

unerheblich, ob diese isoliert oder als Zellverbund vorliegen (Hung et al (1995)). Demgegenüber weisen Zellen in subkonfluenten Zellkulturen nach mechanischer Belastung in 1% bis 15% der Fälle ein intrazelluläres Calciumsignal auf, während in konfluenten Kulturen bei bis zu 55% der Zellen ein solches Signal messbar ist (Tenbosch (1999)). Als weiteres Beispiel der Notwendigkeit des Knochenverbundes konnte nachgewiesen werden, dass auch Stromazellen des Knochenmarks Veränderungen in Zahl und Genexpression nach mechanischer Stimulation zeigen (Li et al. (2004)). In der Kenntnis, dass diese Stromazellen RANKL mechanosensitiv exprimieren (Rubin et al. (2002)) und dieser Ligand die Osteoklastogenese beeinflusst (1.4.1.2), könnte man suggerieren, dass mechanosensitive Stromazellen die Anzahl der Osteoklasten im belasteten Knochen und damit das Remodeling beeinflussen. Auch andere Zellen im Knochen, wie beispielsweise Endothelzellen, könnten Einfluss nehmen auf die Reaktion des Knochens auf einen mechanischen Stimulus. So kommt es beispielsweise durch Scherfluss, der durch die erhöhte Herzfrequenz bei Belastung ausgelöst wird, zu einer Ausschüttung von NO (Davis et al. (2001)) als wichtigem Botenstoff für die Mechanotransduktion in Gefäßzellen. Gleichzeitig reduziert NO die Knochenresorption durch Hemmung der Osteoklastenproduktion und -aktivität (Fan et al. (2004)). Auch Stromazellen sind in der Lage, als Reaktion auf mechanische Stimulation, mit der Bildung von NO zu reagieren (Rubin et al. (2003)). Vermutlich bilden andere Zellsysteme des Knochens wie Stromazellen oder Gefäßzellen weitere Angriffspunkte der mechanischen Stimulation von Knochen.

Insgesamt erscheint es schwierig einen einzelnen Teil aus dem gesamten für die Knochenumbauvorgänge verantwortlichen mechanosensitiven Konstrukt hervorzuheben oder durch Verständnis eines einzelnen Abschnittes Umbauvorgänge auf einen bestimmten Reiz vorherzusagen. So sind In-vitro-Experimente lediglich theoretische Modelle. Zellen, die als Monolayer in der Zellkultur für diese Experimente bereitgestellt werden, sind wahrscheinlich nicht in der Lage, Kräfte auf die gleiche Art zu detektieren und darauf zu reagieren wie Zellen, die im Zellverbund im Organ und damit in ihrer gesamten Umgebung vorliegen. Auch die Beobachtungszeiträume im Experiment sind,

verglichen mit den Zeiten innerhalb derer ein Knochen in vivo reagiert, wahrscheinlich zu kurz gewählt. Daher können In-vitro-Experimente die zeitlichen und räumlichen Zusammenhänge, die eine Knochenzelle im lebenden Verbund erfährt, nicht oder allenfalls marginal widerspiegeln.

4.4 Ausblick

Durch verschiedene Untersuchungen konnten unterschiedliche Reaktionen der Zelle auf verschiedene Arten der Kraft und unterschiedliches Kraftausmaß dargestellt werden. Wie diese Unterschiede jedoch erkannt werden, ist noch nicht hinreichend erklärt. Es ist gewiss vorstellbar, dass unterschiedliche räumliche und zeitliche Belastung, z.B. an verschiedenen fokalen Adhäsionen, auch zu unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Reaktionen führt. Andersartige Mechanosensoren (z.B. Zytoskelett, Ionenkanäle, fokale Adhäsionen) weisen wahrscheinlich auch unterschiedliche Grenzwerte auf, die überschritten werden müssen damit es überhaupt zu einer Reaktion kommt. Weiterhin können bestimmte Orte des Mechanosensings gewisse Kräfte besser wahrnehmen als andere.

Viele Fragen zur Erklärung des Mechanosensings entstehen aufgrund des Wissens, dass Zellen oder Gewebe insgesamt in der Lage sind, Kräfte aufzunehmen, aber auch zu generieren und dass es zwischen Aufnahme eines äußeren Reizes, Signaltransduktion und Generieren interner Kräfte (z.B. Zugkräfte) vielzählige Regelkreise (Feedback) gibt. Um weiterführende Erkenntnisse der genauen Reaktionen von Knochen auf einen mechanischen Stimulus zu erlangen und um diese ggf. auch in die Therapie von Erkrankungen des Knochensystems umzusetzen, sind nach aktuellem Stand weitere Forschungsarbeiten nötig.

4.4.1 MLCK Inhibitoren und Vinculin

Als führend in Bezug auf die Erkennung von äußeren Reizen werden nach aktuellem Stand der Forschung fokale Adhäsionen und das Zytoskelett mit den in dieser Arbeit besprochenen Feedbackmechanismen gesehen. Ausgehend

von den hier dargelegten Zugkraftexperimenten müssen sich weiterführende Versuche genauer mit diesem Thema auseinandersetzen. So sollten sich beispielsweise Versuche anschließen, bei denen eben diese Feedbackschleife an verschiedenen Punkten unterbrochen wird. Erste Versuche mit durch Scherfluss stimulierten Osteoblasten und Inhibitoren der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) werden im Institut für experimentelle Orthopädie und Biomechanik bereits durchgeführt. Ebenfalls in die Konformation des Zytoskeletts eingreifend, konnte Curtze bereits in Versuchen mit Cytochalazin D einen deutlichen Rückgang der Zugkräfte in Osteoblasten durch Depolymerisation der Aktinfilamente zeigen (Curtze (2004)).

Auf der anderen Seite sind Zugkraftexperimente mit gleichzeitiger Darstellung von nachgewiesenen wichtigen Proteinen der fokalen Adhäsionen sinnvoll. In Scherflussexperimenten konnten bereits an GFP transfizierten Zellen die Rolle von Vinculin und fokalen Adhäsionen in mechanisch belasteten Osteoblasten und Sarkomzellen dargestellt werden (Tan et al. (2010)). Ähnliche Versuche sollten auch mit Dehnungsstimulationen, ggf. zunächst ohne die Kombination mit Zugkraftmessungen, an beiden Zellpopulationen durchgeführt werden und dann mit den Ergebnissen der Scherflussexperimente verglichen werden.

4.4.2 3D- Modelle und Computersimulationen

Die Überlegung, dass Versuche zur Untersuchung mechanosensitiver Eigenschaften von Knochen auf der Grundlage eines möglichst physiologischen Milieus stattfinden sollten, hat zur Entwicklung neuer Versuchsaufbauten geführt. So konnte z.B. dargestellt werden, dass mechanisch belastete Zellen in zweidimensionalen Kulturen im Vergleich zu dreidimensionalen Kulturen eine unterschiedlich ausgeprägte Expression von Proteinen zeigen (Barron et al. (2010)). Außerdem machen sich aufgrund der sich oft als schwierig gestaltenden Zellexperimente verschiedene Arbeitsgruppen Computersimulationen und mathematische Modelle zunutze (Dunlop et al. (2009), Weinkamer (2005)).

5 Zusammenfassung

Umbauvorgänge des Knochens (Remodeling) finden während des gesamten Lebens statt. Viele der dafür notwendigen Schritte basieren auf der Fähigkeit mechanische Reize als solche zu registrieren und darauf zu reagieren. Trotz intensiver Forschungen im Bereich der Reizaufnahme (Mechanosensing), Weiterleitung und Reaktion ist der genaue Mechanismus der Mechano-transduktion in weiten Bereichen ungeklärt.

Absicht der Arbeit war es, mit Hilfe der Zugkraftmikroskopie das Verhalten von Knochenzellen in Ruhe und nach mechanischem Reiz durch Dehnung zu beobachten. Die vorliegenden Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Mechanismen der Mechanotransduktion besser zu verstehen und gleichzeitig einen Vergleich zwischen Osteoblasten und Osteosarkomzellen darstellen.

Zur Berechnung der Zugkräfte wurden die Zellen auf kollagenisierten und verformbaren Polyacrylamidgelen ausgesät. Durch die in den Gelen vorhandenen Fluoreszenzpartikel konnten die durch die Zelle hervorgerufene Deformation der Gele bestimmt und die Zugkräfte berechnet werden. Nach Beobachtung der Zelllinien in Ruhe wurde ein Dehnungsreiz mit 6000 μ Strain (entspricht einer Dehnung von 0,6%) und einer Frequenz von 10Hz für 2 Sekunden appliziert und anschließend der zeitliche Verlauf der Zugkräfte beobachtet.

Bei der Beobachtung der Zellen in Ruhe konnte im Vergleich der Osteoblasten mit den Osteosarkomzellen ein signifikanter Unterschied in den Zugkräften nachgewiesen werden. So generierten die beobachteten Sarkomzellen deutlich geringere Zugkräfte. Nach mechanischer Stimulation durch Dehnung zeigte sich keine eindeutige Reaktion der Zugkräfte in beiden Zellpopulationen. In der Gruppe der Osteoblasten (n=23) konnten vier verschiedene Reaktionstypen nachgewiesen werden. Neben einem plötzlichen Kraftverlust bei 8 Zellen kam es bei weiteren 3 Zellen zu einer langsamen Kraftabnahme, bei 4 Zellen zu einer langsamen Kraftzunahme und bei 7 Zellen zu keiner Reaktion. In der Gruppe der Osteosarkomzellen MG-63 (n = 18) zeigte sich in der Mehrheit der Fälle keine Reaktion (n=13), bei 3 Zellen eine langsame Kraftabnahme, bei 2 Zellen eine langsame Kraftzunahme. Sowohl Osteoblasten als auch

Osteosarkomzellen reagieren also nicht uniform auf einen äußeren mechanischen Reiz. Als Ursache dessen und der Kraft- und Reaktionsunterschiede zwischen den Zellpopulationen könnten fokale Adhäsionen und deren Zusammensetzung eine führende Rolle spielen. Ein Feedbacksystem zwischen externer und intern generierter Kraft im Zuge der Mechanotransduktion scheint sehr wahrscheinlich.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt einen eindeutigen Unterschied zwischen den Zugkräften von Osteoblasten und Osteosarkomzellen auf. Gleichzeitig konnten verschiedene Reaktionstypen von Zellen in einer weltweit nur selten durchgeführten Kombination aus mechanischer Belastung und Zugkraftmikroskopie in den aktuellen Stand der Forschung eingeordnet werden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Agholme, F., X. Li, et al. (2010) "Sclerostin antibody treatment enhances metaphyseal bone healing in rats." J Bone Miner Res 25(11): 2412-8.

Aikawa, R., T. Nagai, et al. (2002). "Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation." Hypertension 39(2): 233-8.

Alford, A. I., C. R. Jacobs, et al. (2003). "Oscillating fluid flow regulates gap junction communication in osteocytic MLO-Y4 cells by an ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanism small star, filled." Bone 33(1): 64-70.

B. Efron and R. Tibshirani (1986). "Bootstrap Methods for Standard Errors, Confidence Intervals, and Other Measures of Statistical Accuracy". *Statistical Science*, Vol 1, Number 1, 54-75.

Bakker, A. D., K. Soejima, et al. (2001). "The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent." J Biomech 34(5): 671-7.

Balaban, N. Q., U. S. Schwarz, et al. (2001). "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates." *Nat Cell Biol* 3(5): 466-72.

Barron, M. J., C. J. Tsai, et al. (2010). "Mechanical stimulation mediates gene expression in MC3T3 osteoblastic cells differently in 2D and 3D environments." J Biomech Eng 132(4): 041005.

Bar-Shavit, Z. (2007). "The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell." J Cell Biochem 102(5): 1130-9.

Bieglmayer, C., Clodi, M., Kudlacek, S. (2006). „Biomarker in der Osteologie: Aktueller Stand“. *Journal für Mineralstoffwechsel* 2006; 13 (3): 82-87.

Billiau, A., V. G. Eddy, et al. (1977). "Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63." *Antimicrob Agents Chemother* 12(1): 11-15.

Bonewald, L. F. (2007). "Osteocytes as dynamic multifunctional cells." *Ann N Y Acad Sci* 1116: 281-90.

Bortz, J. (2005). *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 6. Auflage 2005, Springer-Verlag.

Boutahar, N., A. Guignandon, et al. (2004). "Mechanical strain on osteoblasts activates autophosphorylation of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 tyrosine sites involved in ERK activation." *J Biol Chem* 279(29): 30588-99.

Bromme, B. (2000). *Charakterisierung der mechanosensitiven Signaltransduktion in Osteoblasten anhand der Extrazellulär Regulierten Kinase/ERK*. MD thesis, Philipps-University Marburg.

C. Dierkes (2008), „*Laser- Mikrodisektion und molekulare Analyse von endostalen „Lining Cells“ aus mineralisiertem humanem Knochen*“, MD thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen

Campbell, I. D. and M. J. Humphries (2011) "Integrin structure, activation, and interactions." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(3).

Carmeliet, G., G. Nys, et al. (1998). "Gene expression related to the differentiation of osteoblastic cells is altered by microgravity." *Bone* 22(5 Suppl): 139S-143S.

Chen, N. X., K. D. Ryder, et al. (2000). "Ca²⁺ regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts." *Am J Physiol Cell Physiol* 278(5): C989-97.

Chen, X., C. M. Macica, et al. (2005). "Stretch-induced PTH-related protein gene expression in osteoblasts." J Bone Miner Res 20(8): 1454-61.

Chiquet, M., A. S. Renedo, et al. (2003). "How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production?" Matrix Biol 22(1): 73-80.

Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." J Cell Biol 133(6): 1403-15.

Clark, W. D., E. L. Smith, et al. (2005). "Osteocyte apoptosis and osteoclast presence in chicken radii 0-4 days following osteotomy." Calcif Tissue Int 77(5): 327-36.

Crowley, E. and A. F. Horwitz (1995). "Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions." J Cell Biol 131(2): 525-37.

Cummings, S. R., J. San Martin, et al. (2009). "Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis." N Engl J Med 361(8): 756-65.

Curtze, S. (2004). *Zugkraftmikroskopie an Osteoblasten*. MD thesis, Philipps-University Marburg.

Curtze, S., M. Dembo, et al. (2004). "Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells." J Cell Sci 117(Pt 13): 2721-9.

Davis, M. E., H. Cai, et al. (2001). "Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways." Circ Res 89(11): 1073-80.

Deguchi, S., T. S. Matsui, et al. (2011). "The position and size of individual focal adhesions are determined by intracellular stress-dependent positive regulation." Cytoskeleton (Hoboken) 68(11): 639-51.

del Rio, A., R. Perez-Jimenez, et al. (2009). "Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding." Science 323(5914): 638-41.

Dembo, M. and Y. L. Wang (1999). "Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts." Biophys J 76(4): 2307-16.

Dembo, M., T. Oliver, et al. (1996). "Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method." Biophys J 70(4): 2008-22.

Donahue, H. J. (2000). "Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation." Bone 26(5): 417-22.

Doyle, A. D. and J. Lee (2002). "Simultaneous, real-time imaging of intracellular calcium and cellular traction force production." Biotechniques 33(2): 358-64.

Doyle, A., W. Marganski, et al. (2004). "Calcium transients induce spatially coordinated increases in traction force during the movement of fish keratocytes." J Cell Sci 117(Pt 11): 2203-14.

du Roure, O., A. Saez, et al. (2005). "Force mapping in epithelial cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A 102(7): 2390-5.

Duncan, R. L. and C. H. Turner (1995). "Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain." Calcif Tissue Int 57(5): 344-58.

Duncan, R. L. and K. A. Hruska (1994). "Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells." Am J Physiol 267(6 Pt 2): F909-16.

Dunlop, J. W., M. A. Hartmann, et al. (2009). "New suggestions for the mechanical control of bone remodeling." Calcif Tissue Int 85(1): 45-54.

Eckert, S. (2005). *Einfluß fetaler Kälberseren als Medienzusatz auf Differenzierung und Proliferation von primären Osteoblasten*. MD thesis, Philipps-University Marburg.

Eijken, M., I. M. Meijer, et al. (2008). "Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner." J Cell Biochem 104(2): 568-79.

Engler, A. J., S. Sen, et al. (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell 126(4): 677-89.

Espinosa, L., L. Paret, et al. (2002). "Osteoclast spreading kinetics are correlated with an oscillatory activation of a calcium-dependent potassium current." J Cell Sci 115(Pt 19): 3837-48.

Fan, X., E. Roy, et al. (2004). "Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells." Endocrinology 145(2): 751-9.

Friedland, J. C., M. H. Lee, et al. (2009). "Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function." Science 323(5914): 642-4.

Frost, H. M. (1987). "Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal." Anat Rec 219(1): 1-9.

Galbraith, C. G., K. M. Yamada, et al. (2002). "The relationship between force and focal complex development." J Cell Biol 159(4): 695-705.

Gaudet, C., W. A. Marganski, et al. (2003). "Influence of type I collagen surface density on fibroblast spreading, motility, and contractility." *Biophys J* 85(5): 3329-35.

Geiger, B. and K. M. Yamada (2011). "Molecular architecture and function of matrix adhesions." Cold Spring Harb Perspect Biol 3(5).

Glucksmann, A. (1942). "The role of mechanical stresses in bone formation in vitro." J Anat 76(Pt 3): 231-9.

Grashoff, C., B. D. Hoffman, et al. (2011). "Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics." Nature 466(7303): 263-6.

Gratz, H. (2007). *Untersuchungen zur Bedeutung der Phospholipase C bei der Mechanotransduktion in Osteosarkomzellen mittels induzierbarer Antisense-Suppression*. MD thesis, Philipps-University Marburg.

Gross, T. S., S. L. Poliachik, et al. (2004). "Why rest stimulates bone formation: a hypothesis based on complex adaptive phenomenon." Exerc Sport Sci Rev 32(1): 9-13.

Gudi, S., I. Huvar, et al. (2003). "Rapid activation of Ras by fluid flow is mediated by Galpha(q) and Gbetagamma subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(6): 994-1000.

Harter, L. V., K. A. Hruska, et al. (1995). "Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation." Endocrinology 136(2): 528-35.

Hoberg, M., H. H. Gratz, et al. (2005). "Mechanosensitivity of human osteosarcoma cells and phospholipase C beta2 expression." *Biochem Biophys Res Commun* 333(1): 142-9.

Hughes-Fulford, M. (2002). "The role of signaling pathways in osteoblast gravity perception." J Gravit Physiol 9(1): P257-60.

Hung, C. T., S. R. Pollack, et al. (1995). "Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow." Clin Orthop Relat Res(313): 256-69.

Ignatius, A., H. Blessing, et al. (2004). "[Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices]." Orthopade 33(12): 1386-93.

Ingber, D. E. (1997). "Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction."

Ingber, D. E. (2003). "Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally." Proc Natl Acad Sci U S A 100(4): 1472-4.

Ingber, D. E. (2006). "Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again." Faseb J 20(7): 811-27.

Iqbal, J. and M. Zaidi (2005). "Molecular regulation of mechanotransduction." Biochem Biophys Res Commun 328(3): 751-5.

Isenberg, B. C. and R. T. Tranquillo (2003). "Long-term cyclic distention enhances the mechanical properties of collagen-based media-equivalents." Ann Biomed Eng 31(8): 937-49.

Jansen, J. H., F. A. Weyts, et al. (2004). "Stretch-induced phosphorylation of ERK1/2 depends on differentiation stage of osteoblasts." J Cell Biochem 93(3): 542-51.

Jansen, J. H., M. Eijken, et al. (2010). "Stretch-induced inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in mineralizing osteoblasts." J Orthop Res 28(3): 390-6.

Jessop, H. L., S. C. Rawlinson, et al. (2002). "Mechanical strain and fluid movement both activate extracellular regulated kinase (ERK) in osteoblast-like cells but via different signaling pathways." Bone 31(1): 186-94.

Jiang, J. X., A. J. Siller-Jackson, et al. (2007). "Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress." Front Biosci 12: 1450-62.

Johnson, C. P., H. Y. Tang, et al. (2007). "Forced unfolding of proteins within cells." Science 317(5838): 663-6.

Jones, D. B., H. Nolte, et al. (1991). "Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells." Biomaterials 12(2): 101-10.

Jones, D.B., Bingmann, D. (1991). "How do Osteoblasts respond to mechanical stimulation?" *Cells and methods I*, 329-340

Jones, D.B., Leivseth, G., Sawada, Y., van der Sloten, J. and Bigmann, D. (1993). "*Application of homogeneous, defined strains to cell cultures.*" Society for Experimental Biology, Cambridge University Press, pp. 197-219

Judex, S., N. Zhong, et al. (2005). "Mechanical modulation of molecular signals which regulate anabolic and catabolic activity in bone tissue." J Cell Biochem 94(5): 982-94.

Judex, S., X. Lei, et al. (2007). "Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude." J Biomech 40(6): 1333-9.

Kanatani, M., T. Sugimoto, et al. (1991). "Effect of elevated extracellular calcium on the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells:its direct and indirect effects via monocytes." Biochem Biophys Res Commun 181(3): 1425-30.

Kanno, T., T. Takahashi, et al. (2007). "Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts." J Cell Biochem 101(5): 1266-77

Kaspar, D., W. Seidl, et al. (2002). "Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain." J Biomech 35(7): 873-80.

Katsumi, A., A. W. Orr, et al. (2004). "Integrins in mechanotransduction." J Biol Chem 279(13): 12001-4.

Knowles, H. J. and N. A. Athanasou (2009), "Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation." Histol Histopathol 24(3): 337-46

Kobayashi, T. and M. Sokabe (2010). "Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions." Curr Opin Cell Biol 22(5): 669-76.

Kodama, Y., Y. Umemura, et al. (2000). "Exercise and mechanical loading increase periosteal bone formation and whole bone strength in C57BL/6J mice but not in C3H/HeJ mice." Calcif Tissue Int 66(4): 298-306.

Kong, D., B. Ji, et al (2010). "Stabilizing to disruptive transition of focal adhesion response to mechanical forces." J Biomech 43(13): 2524-9.

L.D. Landau and E.M. Lifshitz. *Theory of Elasticity*, volume 7. Pergamon Press, third (revised) edition, Oxford, UK, 1986

Lang, T., A. LeBlanc, et al. (2004). "Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight." J Bone Miner Res 19(6): 1006-12.

Lanyon, L. E. and C. T. Rubin (1984). "Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling." J Biomech 17(12): 897-905.

Lautenschläger, T. (2007). *Zugkraftanalyse an Osteoblasten nach mechanischer Stimulation*. MD thesis, Philipps-University Marburg.

Leblanc, A. D., V. S. Schneider, et al. (1990). "Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest." J Bone Miner Res 5(8): 843-50.

Lele, T. P., J. Pendse, et al. (2006). "Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells." J Cell Physiol 207(1): 187-94.

Lemmon, C. A. and L. H. Romer (2011). "A predictive model of cell traction forces based on cell geometry." Biophys J 99(9): L78-80.

Li, J., R. L. Duncan, et al. (2002). "L-type calcium channels mediate mechanically induced bone formation in vivo." J Bone Miner Res 17(10): 1795-800.

Li, S., B. P. Chen, et al. (1999). "Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress." J Clin Invest 103(8): 1141-50.

Li, Y. J., N. N. Batra, et al. (2004). "Oscillatory fluid flow affects human marrow stromal cell proliferation and differentiation." J Orthop Res 22(6): 1283-9.

Li, Y., Hu, Z. and Li, C. (1993). "New Method for Measuring Poisson's Ratio in Polymer Gels." Journal Of Applied Polymer Science 50(6):1107-1111

Lin, C., X. Jiang, et al. (2009). "Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling." J Bone Miner Res 24(10): 1651-61.

Lindl, T., Bauer J. (1994). *Zell- und Gewebekultur*. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart-Jena-New York

Lo, C. M., H. B. Wang, et al. (2000). "Cell movement is guided by the rigidity of the substrate." Biophys J 79(1): 144-52.

Lorget, F., S. Kamel, et al. (2000). "High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis." Biochem Biophys Res Commun 268(3): 899-903.

- Mann, H., Whitney, D. (1947): "On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other." *Annals of mathematical Statistics* 18: 50-60.
- Marganski, W. A., M. Dembo, et al. (2003). "Measurements of cell-generated deformations on flexible substrata using correlation-based optical flow." *Methods Enzymol* 361: 197-211.
- Martin, T. J. and N. A. Sims (2005). "Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption." Trends Mol Med 11(2): 76-81.
- Matsuo, K. and N. Irie (2008). "Osteoclast-osteoblast communication." Arch Biochem Biophys 473(2): 201-9.
- Mennenga-Klopp, E. (2005). *Kombinierte Rasterkraft-, Zugkraft- und Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mechanotransduktion in Knochenzellen*. PhD thesis, Philipps-University Marburg.
- Mikuni-Takagaki, Y., K. Naruse, et al. (2002). "The role of calcium channels in osteocyte function." J Musculoskelet Neuronal Interact 2(3): 252-5.
- Millward-Sadler, S. J. and D. M. Salter (2004). "Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction." Ann Biomed Eng 32(3): 435-46.
- Mitra, S. K., D. A. Hanson, et al. (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nat Rev Mol Cell Biol 6(1): 56-68.
- Morey, E. R. and D. J. Baylink (1978). "Inhibition of bone formation during space flight." Science 201(4361): 1138-41.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.

Munevar, S., Y. Wang, et al. (2001). "Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts." Biophys J 80(4): 1744-57.

Murthy, R. K., P. K. Morrow, et al. (2009). "Bone biology and the role of the RANK ligand pathway." Oncology (Williston Park) 23(14 Suppl 5): 9-15.

Nguyen, T. D., R. Liang, et al. (2009). "Effects of cell seeding and cyclic stretch on the fiber remodeling in an extracellular matrix-derived bioscaffold." Tissue Eng Part A 15(4): 957-63.

Nicolella, D. P., D. E. Moravits, et al. (2006). "Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone." J Biomech 39(9): 1735-43.

Nicolella, D. P., J. Q. Feng, et al. (2008). "Effects of nanomechanical bone tissue properties on bone tissue strain: implications for osteocyte mechanotransduction." J Musculoskelet Neuronal Interact 8(4): 330-1.

Nielsen, R. H., M. A. Karsdal, et al. (2007). "Dissolution of the inorganic phase of bone leading to release of calcium regulates osteoclast survival." Biochem Biophys Res Commun 360(4): 834-9.

Noble, B. S. (2008). "The osteocyte lineage." Arch Biochem Biophys 473(2): 106-11.

Norvell, S. M., M. Alvarez, et al. (2004). "Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts." Calcif Tissue Int 75(5): 396-404.

Papachroni, K. K., D. N. Karatzas, et al. (2009). "Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease." Trends Mol Med 15(5): 208-16.

Paszek, M. J., N. Zahir, et al. (2005). "Tensional homeostasis and the malignant phenotype." Cancer Cell 8(3): 241-54.

Pauwels, F. (1965): *Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates*. Berlin: Springer-Verlag

Pelham, R. J., Jr. and Y. L. Wang (1998). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate." *Biol Bull* 194(3): 348-9; discussion 349-50.

Pelham, R. J., Jr. and Y. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13661-5.

Pelham, R. J., Jr. and Y. Wang (1999). "High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate." *Mol Biol Cell* 10(4): 935-45.

Puklin-Faucher, E. and M. P. Sheetz (2009). "The mechanical integrin cycle." *J Cell Sci* 122(Pt 2): 179-86.

Rajagopalan, P., W. A. Marganski, et al. (2004). "Direct comparison of the spread area, contractility, and migration of balb/c 3T3 fibroblasts adhered to fibronectin- and RGD-modified substrata." *Biophys J* 87(4): 2818-27.

Rath, A. L., L. F. Bonewald, et al. (2010). "Correlation of cell strain in single osteocytes with intracellular calcium, but not intracellular nitric oxide, in response to fluid flow." *J Biomech* 43(8): 1560-4.

Rawlinson, S. C., G. Zaman, et al. (1998). "Heme oxygenase isozymes in bone: induction of HO-1 mRNA following physiological levels of mechanical loading in vivo." *Bone* 23(5): 433-6.

Rieger, T. (2005). *Einfluss fluider Scherspannung auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten*. MD thesis, Philipps-University Marburg.

Robey, G.P. (1989). "The biochemistry of bone." *Endocrinol Metab Clin North Am* 18(4): 858-902.

Robinson, J. A., M. Chatterjee-Kishore, et al. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone." J Biol Chem 281(42): 31720-8.

Robling, A. G. and C. H. Turner (2002). "Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice." Bone 31(5): 562-9.

Robling, A. G., D. B. Burr, et al. (2000). "Partitioning a daily mechanical stimulus into discrete loading bouts improves the osteogenic response to loading." J Bone Miner Res 15(8): 1596-602.

Romas, E. (2009). "Clinical applications of RANK-ligand inhibition." Intern Med J 39(2): 110-6.

Rosenberg, N. (2003). "The role of the cytoskeleton in mechanotransduction in human osteoblast-like cells." Hum Exp Toxicol 22(5): 271-4.

Rössler, H., Rüter W. (2005). *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 19. Auflage 2005, Elsevier, ISBN 3-437-42591-9

Roux, W. (1895): *Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen*. Leipzig: Engelmann-Verlag

Rubin, C. T. and L. E. Lanyon (1984). "Regulation of bone formation by applied dynamic loads." J Bone Joint Surg Am 66(3): 397-402.

Rubin, C. T. and L. E. Lanyon (1985). "Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude." Calcif Tissue Int 37(4): 411-7.

Rubin, C., R. Recker, et al. (2004). "Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety." J Bone Miner Res 19(3): 343-51.

Rubin, J., C. Rubin, et al. (2006). "Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone." Gene 367: 1-16.

Rubin, J., T. C. Murphy, et al. (2002). "Activation of extracellular signal-regulated kinase is involved in mechanical strain inhibition of RANKL expression in bone stromal cells." J Bone Miner Res 17(8): 1452-60.

Rubin, J., T. C. Murphy, et al. (2003). "Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2 MAPK." J Biol Chem 278(36): 34018-25.

Russell, G., G. Mueller, et al. (2001). "Clinical disorders of bone resorption." Novartis Found Symp 232: 251-67; discussion 267-71.

Ryder, K. D. and R. L. Duncan (2001). "Parathyroid hormone enhances fluid shear-induced $[Ca^{2+}]_i$ signaling in osteoblastic cells through activation of mechanosensitive and voltage-sensitive Ca^{2+} channels." J Bone Miner Res 16(2): 240-8.

Saez, A., A. Buguin, et al. (2005). "Is the mechanical activity of epithelial cells controlled by deformations or forces?" Biophys J 89(6): L52-4.

Saez, A., M. Ghibaudo, et al. (2007). "Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates." Proc Natl Acad Sci U S A 104(20): 8281-6.

Salter, D. M., J. E. Robb, et al. (1997). "Electrophysiological responses of human bone cells to mechanical stimulation: evidence for specific integrin function in mechanotransduction." J Bone Miner Res 12(7): 1133-41.

Saunders, M. M., J. You, et al. (2001). "Gap junctions and fluid flow response in MC3T3-E1 cells." Am J Physiol Cell Physiol 281(6): C1917-25.

Sawada, Y., M. Tamada, et al. (2006). "Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas." Cell 127(5): 1015-26.

Schaller, M. D. (1996). "The focal adhesion kinase." J Endocrinol 150(1): 1-7.

Schlaepfer, D. D., C. R. Hauck, et al. (1999). "Signaling through focal adhesion kinase." Prog Biophys Mol Biol 71(3-4): 435-78.

Schlaepfer, D. D., K. C. Jones, et al. (1998). "Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events." Mol Cell Biol 18(5): 2571-85.

Schwartz, M. A. (2010) "Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction." Cold Spring Harb Perspect Biol 2(12): a005066.

Seeman, E. (2009). "Bone modeling and remodeling." Crit Rev Eukaryot Gene Expr 19(3): 219-33.

Shyy, J. Y. and S. Chien (2002). "Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress." Circ Res 91(9): 769

Simon, A., T. Cohen-Bouhacina, et al. (2003). "Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy." Cytometry A 54(1): 36-47.

Simonet, W. S., D. L. Lacey, et al. (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." Cell 89(2): 309-19.

Skerry, T. M. (2006). "One mechanostat or many? Modifications of the site-specific response of bone to mechanical loading by nature and nurture." J Musculoskelet Neuronal Interact 6(2): 122-7.

Slater, T. F., B. Sawyer, et al. (1963). "Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts." Biochim Biophys Acta 77: 383-93.

Sniadecki, N. J., A. Anguelouch, et al. (2007). "Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells." Proc Natl Acad Sci U S A 104(37): 14553-8.

Solan, A., S. L. Dahl, et al. (2009). "Effects of mechanical stretch on collagen and cross-linking in engineered blood vessels." Cell Transplant 18(8): 915-21.

Spector, D., Goldman, R. and Leinwand, L. (1998). *Cells: a laboratory manual, volume v.1. Culture and biochemical analysis of cells*. Cold Spring Harbor Laboratory

Srinivasan, S., D. A. Weimer, et al. (2002). "Low-magnitude mechanical loading becomes osteogenic when rest is inserted between each load cycle." J Bone Miner Res 17(9): 1613-20.

Struckmeier, J. (2001). *Spektroskopische Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktion in mechanisch stimulierten Osteoblasten*. PhD thesis, Philipps-University Marburg

Subauste, M. C., O. Pertz, et al. (2004). "Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility." J Cell Biol 165(3): 371-81.

Suda, T., N. Takahashi, et al. (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." Endocr Rev 20(3): 345-57.

Tan, L., T. Meyer, et al. (2010). "Rapid vinculin exchange dynamics at focal adhesions in primary osteoblasts following shear flow stimulation." J Musculoskelet Neuronal Interact 10(1): 92-9.

Tatsumi, S., K. Ishii, et al. (2007). "Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction." Cell Metab 5(6): 464-75.

- Tenbosch, J. (1999). *Untersuchungen zum Einfluß mechanischer Deformationen auf Osteoblasten*. PhD thesis, Philipps-University Marburg.
- Torsoni, A. S., T. M. Marin, et al. (2005). "RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol 289(4): H1488-96.
- van Bezooijen, R. L., B. A. Roelen, et al. (2004). "Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist." J Exp Med 199(6): 805-14.
- Vander Molen, M. A., H. J. Donahue, et al. (2000). "Osteoblastic networks with deficient coupling: differential effects of magnetic and electric field exposure." Bone 27(2): 227-31.
- Vatsa, A., D. Mizuno, et al. (2006). "Bio imaging of intracellular NO production in single bone cells after mechanical stimulation." J Bone Miner Res 21(11): 1722-8.
- Vatsa, A., T. H. Smit, et al. (2007). "Extracellular NO signalling from a mechanically stimulated osteocyte." J Biomech 40 Suppl 1: S89-95.
- Vogel, V. (2006). "Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals." Annu Rev Biophys Biomol Struct 35: 459-88
- Wang, H. B., M. Dembo, et al. (2000). "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells." Am J Physiol Cell Physiol 279(5): C1345-50.
- Wang, H. B., M. Dembo, et al. (2001). "Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration." Proc Natl Acad Sci U S A 98(20): 11295-300.

Wang, Y. L. and R. J. Pelham, Jr. (1998). "Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells." *Methods Enzymol* 298: 489-96.

Ward, K., C. Alsop, et al. (2004). "Low magnitude mechanical loading is osteogenic in children with disabling conditions." *J Bone Miner Res* 19(3): 360-9.

Weinkamer, R. (2005). „Der Umbauprozess im trabekulären Knochen“. Tätigkeitsbericht 2005, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung Potsdam, http://www.mpikg-golm.mpg.de/pdf/Jahrbuch1/Weinkamer_2005_gen.PDF

Wilcoxon, F. (1945) "Individual Comparisons by Ranking Methods." *Biometrics Bulletin* 1: 80–83.

Wiltink, A., P. J. Nijweide, et al. (1995). "Cell membrane stretch in osteoclasts triggers a self-reinforcing Ca²⁺ entry pathway." *Pflügers Arch* 429(5): 663-71.

Wolff, J. (1982). „ Das Gesetz der Transformation des Knochens“, Hirschwald, Berlin

Yang, C. M., C. S. Chien, et al. (2004). "Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells." *J Biol Chem* 279(21): 22158-65.

Yellowley, C. E., Z. Li, et al. (2000). "Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells." *J Bone Miner Res* 15(2): 209-17.

You, J., G. C. Reilly, et al. (2001). "Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts." *J Biol Chem* 276(16): 13365-71.

Zerwekh, J. E., L. A. Ruml, et al. (1998). "The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects." J Bone Miner Res 13(10): 1594-601.

Zhao, X. H., C. Laschinger, et al. (2007). "Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway." J Cell Sci 120(Pt 10): 1801-9.

Zimmerman, D., F. Jin, et al. (2000). "Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts." Dev Biol 220(1): 2-15.

6.2 Tabellarischer Ergebnisteil

6.2.1 MTT-Zellproliferationsassays (POB)

Zellart:	075k				
Datum:	08.06.2007	von 11/7/06			
Dehnung:	2x				
	gedehnt	ungedehnt		Rang gedehnt	Rang ungede
	1,412	1,226		14	9
	1,744	0,889		16	1
	1,206	1,074		7	3
	1,428	1,201		15	6
	1,257	1,275		10	12
	1,195	1,018		5	2
	1,217	1,259		8	11
	1,362	1,183		13	4
Mittelwert:	1,352625	1,140625	Summe:	88	48
Varianz:	0,03376455	0,01822713			
Standardabweichung:	18,38%	13,50%			
Differenz (Extinktionen):	18,59%				
U-Test von Whitney					
Testgröße T=UX	52				
UY	12				
unterer kritischer Wert	13				
oberer kritischer Wert	51				
	signifikant			(alpha = 5%)	

Zellart:	075k				
Datum:	08.06.2007	von 11/7/06			
Dehnung:	2x				
	gedehnt	ungedehnt		Rang gedehnt	Rang ungede
	1,508	1,226		15	6
	1,462	0,889		14	1
	1,392	1,074		11	3
	1,635	1,201		16	5
	1,250	1,275		7	9
	1,406	1,018		12	2
	1,431	1,259		13	8
	1,276	1,183		10	4
Mittelwert:	1,42	1,140625	Summe:	98	38
Varianz:	0,01521	0,01822713			
Standardabweichung:	12,33%	13,50%			
Differenz (Extinktionen):	24,49%				
U-Test von Whitney					
Testgröße T=UX	62				
UY	2				
unterer kritischer Wert	13				
oberer kritischer Wert	51				
	signifikant			(alpha = 5%)	

Zellart:	POB 075k				
Datum:	08.06.2007	von 11/7/06			
Dehnung:	2x				
	gedehnt	ungedehnt		Rang gedehnt	Rang ungede
	1,303	1,226		11	6
	1,471	0,889		13	1
	1,750	1,074		16	3
	1,589	1,201		14	5
	1,451	1,275		11	9
	1,589	1,018		14	2
	1,567	1,259		13	8
	1,226	1,183		6	4
	1,276				
Mittelwert:	1,49325	1,140625	Summe:	98	38
Varianz:	0,02851336	0,01822713			
Standardabweichung:	16,89%	13,50%			
Differenz (Extinktionen):	30,92%				
U-Test von Whitney					
Testgröße T=UX	62				
UY	2				
unterer kritischer Wert	13				
oberer kritischer Wert	51				
	signifikant			(alpha = 5%)	

Zellart:	POB 075k				
Datum:	08.06.2007	von 11/7/06			
Dehnung:	2x				
	gedehnt	ungedehnt		Rang gedehnt	Rang ungede
	1,697	1,226		16	6
	1,534	0,889		15	1
	1,407	1,074		11	3
	1,454	1,201		13	5
	1,429	1,275		12	9
	1,497	1,018		14	2
	1,401	1,259		10	8
	1,239	1,183		7	4
Mittelwert:	1,45725	1,140625	Summe:	98	38
Varianz:	0,01701164	0,01822713			
Standardabweichung:	13,04%	13,50%			
Differenz (Extinktionen):	27,76%				
U-Test von Whitney					
Testgröße T=UX	62				
UY	2				
unterer kritischer Wert	13				
oberer kritischer Wert	51				
	signifikant			(alpha = 5%)	

Zellart:	POB 075k				
Datum:	08.06.2007	von 11/7/06			
Dehnung:	2x				
	gedehnt	ungedehnt		Rang gedehnt	Rang ungede
	1,429	1,226		11	7
	1,475	0,889		12	1
	1,227	1,074		8	3
	1,482	1,201		13	5
	1,756	1,275		16	10
	1,698	1,018		15	2
	1,624	1,259		14	9
	1,222	1,183		6	4
Mittelwert:	1,489125	1,140625	Summe:	95	41
Varianz:	0,03956755	0,01822713			
Standardabweichung:	19,89%	13,50%			
Differenz (Extinktionen):	30,55%				
U-Test von Whitney					
Testgröße T=UX	59				
UY	5				
unterer kritischer Wert	13				
oberer kritischer Wert	51				
	signifikant			(alpha = 5%)	

6.2.2 MTT-Zellproliferationsassays (MG-63)

Zellart:	MG63				
Datum:	25.09.2003				
Dehnung:	2x				
	gedehnt	ungedehnt		Rang gedehnt	Rang ungede
	0,568	0,417		13	1
	0,542	0,490		10	5
	0,598	0,440		16	2
	0,579	0,496		14	6
	0,530	0,456		9	4
	0,594	0,514		15	8
	0,544	0,452		11	3
	0,567	0,501		12	7
Mittelwert:	0,56525	0,47075	Summe:	100	36
Varianz:	0,00061907	0,00117107			
Standardabweichung:	2,49%	3,42%			
Differenz (Extinktionen):	20,07%				
U-Test von Whitney					
Testgröße T=UX	64				
UY	0				
unterer kritischer Wert	13				
oberer kritischer Wert	51				
	signifikant			(alpha = 5%)	

Zellart:	MG63				
Datum:	25.09.2003				
Dehnung:	2x				
	gedehnt	ungedehnt		Rang gedehnt	Rang ungede
	0,488	0,417		6	1
	0,524	0,490		12	7
	0,538	0,440		15	2
	0,446	0,496		3	8
	0,543	0,456		16	5
	0,530	0,514		13	11
	0,535	0,452		14	4
	0,505	0,501		10	9
Mittelwert:	0,513625	0,47075	Summe:	89	47
Varianz:	0,00108484	0,00117107			
Standardabweichung:	3,29%	3,42%			
Differenz (Extinktionen):	9,11%				
U-Test von Whitney					
Testgröße T=UX	53				
UY	11				
unterer kritischer Wert	13				
oberer kritischer Wert	51				
	signifikant			(alpha = 5%)	

Zellart:	MG63				
Datum:	25.09.2003				
Dehnung:	2x				
	gedehnt	ungedehnt		Rang gedehnt	Rang ungede
	0,510	0,417		8	1
	0,527	0,490		10	5
	0,547	0,440		12	2
	0,533	0,496		11	6
	0,564	0,456		13	4
	0,585	0,514		14	9
	0,587	0,452		15	3
	0,612	0,501		16	7
Mittelwert:	0,558125	0,47075	Summe:	99	37
Varianz:	0,00121898	0,00117107			
Standardabweichung:	3,49%	3,42%			
Differenz (Extinktionen):	18,56%				
U-Test von Whitney					
Testgröße T=UX	63				
UY	1				
unterer kritischer Wert	13				
oberer kritischer Wert	51				
	signifikant			(alpha = 5%)	

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Knochenzellen-Schema.....	2
Abbildung 2: Mechanostat-Theorie.....	6
Abbildung 3: 3 Phasen-Modell des Remodelings.....	9
Abbildung 4: Bestandteile der Mechanotransduktion.....	11
Abbildung 5: Fokaler Kontakt.....	12
Abbildung 6: Signaltransduktionswege in Osteoblasten nach mechanischer Stimulation.	17
Abbildung 7: Elastizitätsmodul.....	37
Abbildung 8: Prinzip eines Rasterkraftmikroskops.....	38
Abbildung 9: Aclar-Klemmhalterung/Folienträger.....	40
Abbildung 10: Dehnungsmaschine.....	40
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopie.....	42
Abbildung 12: vollständiger Versuchsaufbau.....	44
Abbildung 13: Korrelations-Box und Such-Box.....	50
Abbildung 14: Deformationsmatrix.....	52
Abbildung 15: Ursprungsknoten der Kraftvektoren.....	53
Abbildung 16: Kraftvektorfeld.....	54
Abbildung 17: Kalibrierung der Dehnungsmaschine.....	58
Abbildung 18: Kontrollfärbungen - Positiv - Negativ.....	60
Abbildung 19: Osteocalcinnachweis.....	60
Abbildung 20: Kollagen-Typ 1-Nachweis.....	61
Abbildung 21: BSP (Bone Sialoprotein)-Nachweis.....	62
Abbildung 22: Deformationsmatrix und Kraftvektorfeld POB.....	64
Abbildung 23: Deformationsmatrix und Kraftvektorfeld MG-63.....	64
Abbildung 24: Zugkräfte der POB und MG-63.....	66
Abbildung 25: Vergleich von Zellgröße und Zugkraft.....	67
Abbildung 26: Zugkraftveränderungen durch mechanische Stimulation.....	70
Abbildung 27: Verlauf der Zugkräfte der POB nach Gruppen.....	72
Abbildung 28: Verlauf der Zugkräfte der MG-63 nach Gruppen.....	74

6.4 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic force microscopy
BMP	bone morphogenetic protein
BMU	Bone multicellular unit
BSP	Bone Sialo Protein
CCD	charged-coupled Device
c-fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogen homolog
cox-2	cyclooxygenase-2
ECM	Extrazelluläre Matrix
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAK	focal adhesion kinase
G-Protein	Guaninnucleotid bindendes Protein
h	Stunden
HGF	hepatocyte growth factor
Hz	Hertz (Frequenz)
IGF	insulin-like growth factor
IP3	Inositoltriphosphat
M	molare Masse
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
nN	Nanonewton
NO	Nitric oxid / Stickstoffmonoxid
OPG	osteoprotegrin
PIGF	placental growth factor
PLC	Phospholipase C
POB	primär bovine Osteoblasten
PTH	Parathormon
RANKL	receptor Activator of NF- κ B Ligand
Ras	Rat sarcoma

Rho	Ras homolog
rpm	rounds per minute
s	Sekunden
str	Strain (relative Längenänderung)
TCF	T-cell factor
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor nekrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wnt	Zusammensetzung aus „wingless“ und Integration-1

6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fluoreszenzpartikel.....	35
Tabelle 2: MTT-Zellproliferationsassay	63

6.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine Akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Aumüller, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Baum, PD Dr. Becker, Prof. Dr. Behr, Prof. Dr. Bertalanffy, Prof. Dr. Bien, Dr. Boudriot, Prof. Dr. Cetin, Prof. Dr. Christiansen, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic, Dr. Fuchs, Prof. Dr. Fruhstorfer, Prof. Dr. Gemsa, PD Dr. Gerdes, Prof. Dr. Görg, Prof. Dr. Gotzen, Prof. Dr. Griss, Prof. Dr. Grzeschik, Prof. Dr. Gudermann, Prof. Dr. Happle, Prof. Dr. Dr. Hartmann, Prof. Dr. Hasilik, Prof. Dr. Heeg, Prof. Dr. Hofmann, Dr. Jackowski-Dohrmann, Prof. Dr. Jones, Prof. Dr. Joseph, Prof. Dr. Jungclas, Prof. Dr. Kern, Dr. Kill, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Klose, Prof. Dr. Krause, Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Koolmann, Prof. Dr. Kuhn, Prof. Dr. Lang, Prof. Dr. Lennartz, Prof. Dr. Lenz, Prof. Dr. Lorenz, Prof. Dr. Maisch, Prof. Dr. Maier, Prof. Dr. Mennel, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Moosdorf, Prof. Dr. Dr. Mueller, Prof. Dr. Mutters, Prof. Dr. Neubauer, Prof. Dr. Niessing, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Radsak, Prof. Dr. Remschmidt, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Richter, Prof. Dr. Roehm, Prof. Dr. Rothmund, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmidt, Dr. Schmidt, PD Dr. Schnabel, Dr. Schrader, Prof. Dr. Schüffel, Prof. Dr. Schulz, Prof. Dr. Schwarz, Prof. Dr. Seitz, Prof. Dr. Seyberth, Prof. Dr. Slenczka, Prof. Dr. Sommer, Prof. Dr. Steiniger, PD Dr. Stiletto, Prof. Dr. Sturm, Prof. Dr. Vogelmeier, Prof. Dr. Vohland, Prof. Dr. Voigt, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Weiler, Prof. Dr. Werner, Prof. Dr. von Wichert, Prof. Dr. Wulf.

In Frauenfeld, Schweiz	(Innere PJ):	PD Dr. med. B. Frauchiger
In Bruneck, Italien	(Orthopädie/Traumatologie PJ):	Prim. Dr. Pizzinini

6.7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. David B. Jones für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Aufsicht durchführen zu dürfen.

Weng Tan für seine Einführung in die Zellkultur und seine unerschütterliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente

Marita Kratz für ihre wertvollen Typs während der Laborarbeit und Erstellung der Arbeit

Marian Steinert für die Hilfe bei Layout und verschiedensten Korrekturen

Dr. Bringfried Müller, Geschäftsführung Medi-Learn Marburg, für seine Einführung in die Statistik

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinen Freunden Caro und Claas für die Unterstützung während der Erstellung der Arbeit.

Vor allem möchte ich aber meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danken für die ständige maximale Unterstützung und die Möglichkeit des Studiums