

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin
der Philipps-Universität Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. P. Griss)
Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
(Leiter: Prof. D. B. Jones Ph.D.M.I.Biol)

Einfluss fluider Scherspannungen auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten

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



vorgelegt von
Timo Rieger
aus Alsfeld

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 23.6.2005
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. D. B. Jones Ph.D.M.I.Biol

Correferent: PD Dr. R. Stiletto

1	Einleitung	7
1.1	Physiologie des Knochenumbaus	8
1.1.1	Histomorphologie des Knochengewebes.....	8
1.1.2	Regulation der Knochenmasse und „bone remodeling“	11
1.2	Mechanotransduktion	14
1.2.1	Mechanische Belastung des Knochengewebes	15
1.2.1.1	Dehnung und Kompression.....	16
1.2.1.2	Scherspannung	18
1.2.2	Signaltransduktion.....	20
1.2.2.1	Zytoskelett	21
1.2.2.2	Ionenkanäle	24
1.2.2.3	Kalzium und Phospholipase C	25
1.2.3	Zeitliche Abfolge der Signaltransduktion.....	26
1.3	Klinischer Bezug	27
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	29
2	Material und Methoden.....	31
2.1	Material	31
2.1.1	Lösungen und Puffer.....	31
2.1.2	Nährmedien.....	32
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	32
2.1.4	Geräte und verwendete Materialien.....	33
2.2	Zellkultur	34
2.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen	34
2.2.2	Präparation von primären bovinen Osteoblasten	34
2.2.3	Passagieren von Zellen.....	36
2.2.3.1	Primäre bovine Osteoblasten	36
2.2.3.2	Osteosarkomazellen.....	36
2.2.3.3	Kryokonservierung	37
2.3	Versuchsaufbau	38
2.3.1	Die Gradienten- und die Parallelfusskammer	39
2.3.2	Scherspannungsabfall über einer Zelle	44
2.3.3	Berechnung der Scherspannung	45
2.3.4	Flüssigkeitsströmungsprofil.....	46

2.4	Intrazelluläre Kalziummessungen	47
2.4.1	Quanticell-Bildanalyse-System	47
2.4.2	Kalziumbindende Fluoreszenzfarbstoffe.....	48
2.4.2.1	Oregon Green BAPTA 488.....	49
2.4.2.2	Fura-2.....	50
2.4.3	Versuchsvorbereitung und Versuchsdurchführung.....	53
2.4.3.1	Zellpräparation.....	53
2.4.3.2	Zellfärbung.....	53
2.4.3.3	Zusammenbau der Flusskammer und Versuchsbeginn	54
2.4.3.4	Versuchsauswertung.....	55
2.5	Zugkraftmessungen	55
2.5.1	Gelbeschichtung der Deckgläser	55
2.5.1.1	Vorbereitung der Deckgläser.....	55
2.5.1.2	Herstellung des Polyacrylamidgels	56
2.5.1.3	Kollagenbeschichtung	56
2.5.2	Zellaussaat auf die gelbeschichteten Deckgläser.....	57
2.5.3	Zusammenbau der Flusskammer und Versuchsdurchführung.....	57
2.5.4	Bildanalyse und Mikroskopie	58
2.5.5	Charakterisierung des Gels	59
2.5.6	Kalkulation der Zugkraft	59
2.5.7	Versuchsauswertung.....	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Phänotypisierung der Osteoblasten durch Parathormon-Stimulation ..	62
3.2	Scherspannungsgradient der Usami-Flusskammer	63
3.3	Artifizielle Kalziumfluoreszenzmessungen	67
3.3.1	Detachment von Zellen	67
3.3.2	Defokussierung der Zellebene	68
3.3.3	Luftblasen im Perfusionssystem	68
3.4	Kalziummessungen an primären bovinen Osteoblasten	70
3.4.1	Versuchsmedium mit 2% FCS	70
3.4.2	Mangan-Quenching-Experimente	72

3.4.3	Einfachbelastung.....	74
3.4.3.1	5-tägige Zelladhäsion auf Deckglas	76
3.4.3.2	4-tägige Zelladhäsion auf Deckglas	78
3.4.3.3	3-tägige Zelladhäsion auf Deckglas	79
3.4.3.4	2-tägige Zelladhäsion auf Deckglas	80
3.4.3.5	Vergleich der einzelnen Zelladhäsionszeiten und der Scherspannungen	81
3.4.4	Doppelbelastung	82
3.4.5	Oregon Green-Färbung.....	84
3.5	Kalziummessungen an Osteosarkomazellen MG-63	86
3.5.1	Einfachbelastung.....	86
3.5.2	Doppelbelastung	89
3.6	Überprüfung der Zellvitalität nach Kalziummessungen	91
3.7	Zugkraftmessungen	92
3.7.1	Zugkräfte unter Grundfluss	92
3.7.1.1	Primäre bovine Osteoblasten	92
3.7.1.2	Osteosarkomazellen MG-63.....	94
3.7.2	Zugkräfte bei Scherspannungsbelastung mit 65 dyn/cm ²	95
3.7.2.1	Primäre bovine Osteoblasten	95
3.7.2.2	Osteosarkomazellen MG-63.....	98
4	<i>Diskussion</i>	100
4.1	Primärzellen versus Osteosarkomazellen	100
4.2	Intrazelluläre Kalziummessungen.....	102
4.3	Zugkraftmessungen	108
5	<i>Zusammenfassung</i>	112
6	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	114
7	<i>Anhang</i>	130
7.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	130
7.2	Danksagung.....	131
7.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	133

Abkürzungen

AM	Acetoxymethylester
BAPTA	1,2-bis-(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CSF	colony-stimulating-factor
d	Tag
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
HBSS	Hank's balanced Salt solution (Hank's gepufferte Salzlösung)
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
IGF	Insulin-like growth factor
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Nitric oxide (Stickoxyd)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pJ	picoJoule
POb	Primäre bovine Osteoblasten
PTH	Parathormon
RANKL	receptor activator of nuclear factor ligand
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SA-cat	Stretch-activated cation channel
Sulfo-SANPAH	Sulfosuccinimidyl-6-(4-azido-2-phenylamino-)hexanoate
TEMED	N,N,N,N - tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor

1 Einleitung

Der Knochen stellt sich als fester und stabiler Bestandteil des Skelettsystems dar. Er muss in seiner tragenden Rolle teilweise großen Kräften, die an ihm in Form von Dehnung, Kompression, Biegung und Torsion ansetzen, widerstehen. Dabei dient er als Ansatzpunkt für Muskeln, Sehnen und Bänder.

Gleichzeitig ist der Knochen aber auch an der Regulation von metabolischen Prozessen im Körper beteiligt. Hierbei ist vor allem die Aufrechterhaltung des Kalziumspiegels im Blut zu nennen. Des Weiteren erfolgt im Knochenmark die Hämatopoese.

Das zunächst grobe und kompakte Erscheinungsbild lässt bei genauerem Hinsehen also eine molekulare, physiologische und histologische Feinstrukturierung erkennen, die bereits intrauterin beginnend bis ins hohe Alter entscheidende Funktionen im Körper wahrnimmt.

Als Stützorgan des menschlichen Körpers ist das Knochengewebe einem zeitlichen Wandel unterworfen, der zu einer Osteopenie oder im pathologischen Fall zu einer Osteoporose mit konsekutiver Frakturneigung führen kann. Hier setzen zahlreiche Forschungsarbeiten an, um den Einfluss von mechanischer Belastung und hormonellen Faktoren auf das Knochengewebe zu untersuchen, und damit den umschriebenen Erkrankungen des Skelettsystems neue Behandlungsstrategien entgegensetzen zu können (Rodan et Martin, 2000).

1.1 Physiologie des Knochenbaus

1.1.1 Histomorphologie des Knochengewebes

Der Knochen ist mesenchymalen Ursprungs und lässt sich morphologisch beim Erwachsenen in eine Kortikalis, die 70-80% ausmacht, und eine Spongiosa, deren Anteil 20-30% beträgt, unterteilen (Delling, 1992). Histologisch liegen vier Formen von Knochenzellen vor: Vorläuferzellen, die hieraus hervorgehenden Osteoblasten und Osteozyten, und die sich von Monozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen ableitenden Osteoklasten.

Die pluripotenten Vorläuferzellen, Osteoprogenitorzellen, können sich unter dem Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren zu Chondrozyten, Myozyten, Adipozyten oder Osteoblasten differenzieren (Ducy et al., 2000). Die Osteoprogenitorzellen sind während des gesamten Lebens vorhanden und befinden sich endostal, periostal und in den Havers-Kanälen (Junqueira et Caneiro, 1991).

Ist eine Differenzierung zu Osteoblasten, z.B. bei der Frakturkonsolidierung oder Anpassung an mechanische Belastung, nötig, geschieht dies unter der Stimulation neu entdeckter Transkriptionsfaktoren wie Msx2, Dlx5/6, Osterix, Runx2 und fos-Proteinen (Harada et Rodan, 2003). Diese Umwandlung dauert bei jungen Ratten mindestens neun Stunden (Young, 1962).

Die Osteoblasten, die circa 5% der Knochenoberfläche ausmachen (Parfitt, 1983), zeichnen vor allem für die Synthese der organischen Bestandteile der Interzellulärsubstanz verantwortlich. Hierbei den größten Anteil macht das Typ-I-Kollagen (90-95%) aus. Weiterhin werden noch Proteoglykane gebildet. Osteonektin, Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein sind typische Substanzen, die als charakteristische Osteoblastenmarker in Zellkulturen für immunzytochemische Nachweisverfahren dienen (Robey, 1989).

Diese nach extrazellulär abgegebene Grundsubstanz, die noch nicht verkalkt ist, wird als Osteoid bezeichnet. Damit der Knochen seine Festigkeit erhält, ist die Einlagerung von Mineralien in das Osteoid nötig. Dazu geben die Osteoblasten Matrixvesikel zur Bildung der Hartschubstanz in den extrazellulären Raum ab. Mineralische Hauptbestandteile sind anorganisches Phosphat (50%)

und Kalzium (35%). Dieses Kalziumphosphat lagert sich als hexagonales Kristall, als Hydroxylapatit, in die Grundsubstanz ein (Marks et Popoff, 1988). Bis zur vollständigen Mineralisation des neu gebildeten Osteoids vergehen circa zehn Tage (Burr et Martin, 1989). Als klinischer Marker zur Abschätzung der Osteoblastentätigkeit kann die alkalische Phosphatase herangezogen werden, deren Konzentration bei gesteigertem Knochenumbau ansteigt.

Im Rahmen dieser Umbauvorgänge und des Knochenwachstums werden die Osteoblasten in die Knochengrundsubstanz eingeschlossen und wandeln sich dann zu Osteozyten (Abbildung 1-1). Diese machen mit circa 94% den größten Anteil an den Knochenzellen aus.

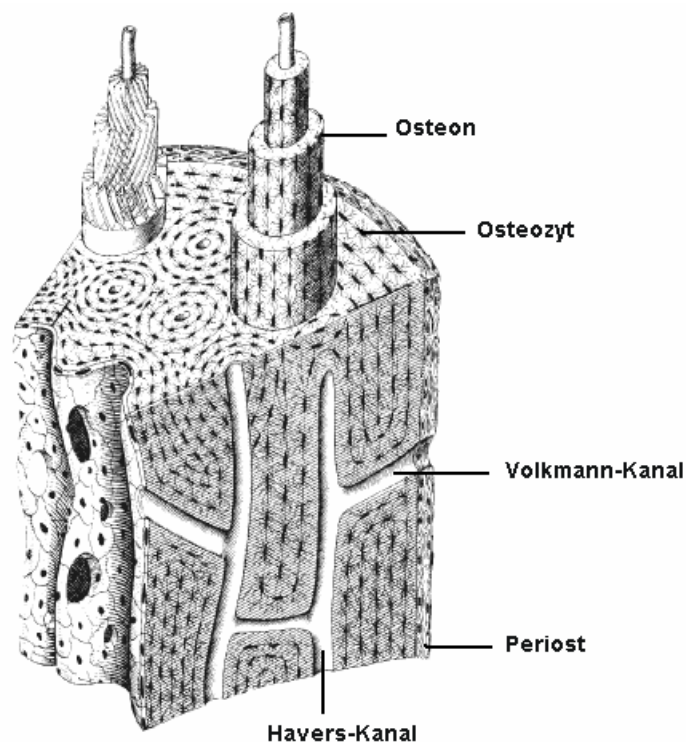


Abbildung 1-1 Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens

(Abbildung aus Junqueira et Caneiro, 1991)

Die Kortikalis ist mit Osteonen durchsetzt. Osteone setzen sich aus dem Havers-Kanal und den zirkulär konzentrisch darum angeordneten Osteozyten zusammen. Die Osteozyten stehen mit ihren filopodienartigen Zellfortsätzen

untereinander über „gap-junctions“ in Verbindung (Doty, 1981). Sie liegen in Knochenhöhlen und werden hier und in den Knochenkanälchen (Canaliculi ossei) mit den Zellfortsätzen stets mit Flüssigkeitsströmen umgeben (Kufahl et Saha, 1990). Diese Flüssigkeitsströme (Abbildung 1-2) konnten bis jetzt noch nicht in-vivo gemessen werden. Man bedient sich derzeit der Hypothese, dass durch Kompression auf der einen Seite und Dehnung auf der anderen Seite diese Flüssigkeitsströme zustande kommen (Turner et Pavalko, 1998). Die Osteozyten dienen dem Erhalt der Knochenstruktur bei eingeschränkter Syntheseaktivität. Die Produktion von Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin ist bei ihnen jedoch im Vergleich zu Osteoblasten erhöht, da diese Substanzen vornehmlich für ihre Adhäsionseigenschaften im lakuno-kanalikulären Netzwerk verantwortlich sind (Aarden et al., 1996).

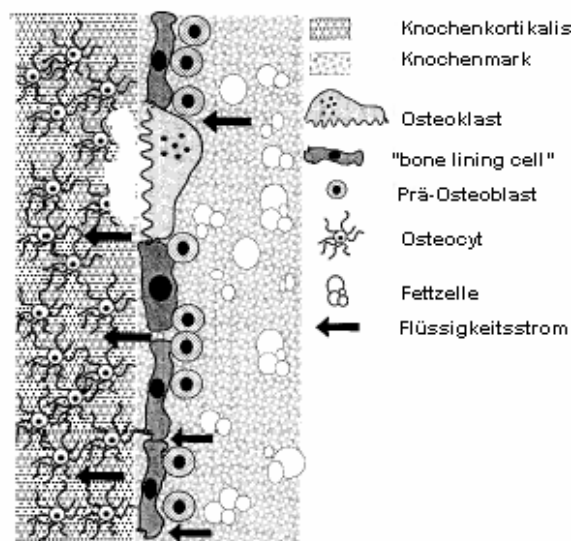


Abbildung 1-2 Schematischer Querschnitt durch die Kortikalis und die Spongiosa

Modell eines radiären Flüssigkeitsstromes in Richtung der Kortikalis
(Abbildung aus McAllister, 2000)

Der Knochenumbau unterliegt einem effizienten Feedbackmechanismus, in dem die Osteoklasten die Aufgaben der Knochenresorption wahrnehmen (Teitelbaum, 2000). Sie machen 1% der Knochenzellen aus und differenzieren

sich anders als die Osteoblasten und Osteozyten aus Vorläuferzellen des Monozyten-/Makrophagensystems unter dem Einfluss von dem Wachstumsfaktor CSF-1 (Lacey et al., 1998) und dem Polypeptid RANKL, das unter anderem wiederum von Osteoblasten gebildet wird (Khosla, 2001). Auf diese Weise schließen sich 10-20 Einzelzellen zu einem aktivierten polynukleären Osteoklasten zusammen, der über die Sekretion von Protonen in die Einbuchtungen der Grundsubstanz (Howship-Lakunen) ein saures Milieu erzeugt. In diesem werden dann die lytischen Hauptenzyme Cathepsin K und die saure tartrat-resistente Phosphatase aktiv, so dass es zur Knochenresorption kommt (Boyle et al., 2003). Diese Stellen sind, da sie einer hohen Flüssigkeitszirkulation ausgesetzt sind, zusammen mit subperiostalen und endostalen Bereichen die Hauptorte des Austausches von mineralisiertem Kalzium (Rowland, 1966).

Ein Inhibitor der Osteoklastogenese ist Osteoprotegerin (OPG), welches ebenfalls von Osteoblasten gebildet wird und über seine Bindung an RANKL dieses inaktiviert. Die Osteoklastenformation in vitro und die Knochenresorption in vivo werden auf diese Weise blockiert (Simonet et al., 1997).

1.1.2 Regulation der Knochenmasse und „bone remodeling“

Die Knochenmasse beim Erwachsenen stellt ein gut ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen Knochenabbau durch Osteoklasten und Knochenanbau durch Osteoblasten dar.

Bereits 1869 postulierte der Berliner Chirurg Julius Wolff, dass der Knochen seine Form durch auf ihn einwirkende mechanische Kräfte erhält. Bei ihm tauchte bereits das trajektorielle Bauprinzip auf. Weiterhin stellte er mathematische Formeln auf, wonach die Knochenform aus den mechanischen Kräften zu berechnen seien, die unter dem Begriff „Das Gesetz der Transformation der Knochen“ bekannt wurden (Wolff, 1892). Ein Grundgedanke, der sich im Aufbau eines Knochens nahezu perfekt darstellt, war, mit einem Minimum an Materialaufwand ein Maximum an Belastbarkeit zu erzielen (Roux, 1895).

In Wolffs Theorien fanden die zahlreichen Umbauvorgänge des Knochens, das so genannte „bone remodeling“, noch keine Beachtung und darüber hinaus sind heute zahlreiche seiner Theorien widerlegt worden (Dibbets, 1992). Wegweisende Arbeiten, die das „bone remodeling“ als gut organisiertes Zusammenspiel und physiologischen Regenerationsprozeß durch Knochenan- und abbau beschrieben, kamen erst wesentlich später (Frost, 1963; LaCroix, 1971).

Der Umbau folgt einem gut definierten zeitlichen Ablauf. Dieser kann in vier Phasen eingeteilt werden (Abbildung 1-3).

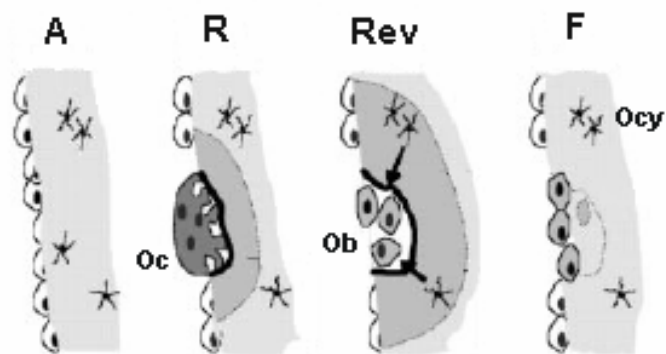


Abbildung 1-3 Phasen des „bone remodeling“

Osteoklasten (Oc), Osteoblasten (Ob) und Osteozyten (Ocy)

Erläuterungen im Text

(Abbildung modifiziert nach Huiskes et al., 2000)

Zuerst erfolgt die Aktivierung von Osteoklastenvorläuferzellen (A, Zeitdauer circa 60 Stunden), woran sich die Phase der Resorption (R, Zeitdauer circa 39 Tage) anschließt. Danach kommt es zu einer Umschaltphase (Rev, Zeitdauer circa 10 Tage). Der Umbau mündet abschließend in die Phase der Knochenformation (F, Zeitdauer circa 94 Tage), die dann in die Ruhephase mit einer durchschnittlichen Zeitdauer von 900 Tagen übergeht (Reeve, 1986).

Diese ARF-Sequenz zeigt, dass die Knochenresorption wesentlich schneller verläuft als die Formation, so dass drei Monate nötig sind, um den in vier bis fünf Wochen resorbierten Knochen zu ersetzen.

Diese Verbindung beider Zellsysteme wird auch als „coupling“ bezeichnet. Unter anderem werden dabei zwei entscheidende Faktoren der Osteoklastogenese, nämlich RANKL und OPG, von Osteoblasten gebildet (Udagawa et al., 2000) und es zeigt sich, dass zahlreiche Stimulatoren wie Parathormon, Prostaglandin E oder TGF- β an beiden Zellsystemen ansetzen. Dieses „coupling“ erklärt auch die Schwierigkeit der Behandlung von Osteopathien, da Medikamente, die die Osteoklasten beeinflussen, gleichsam auch auf die Osteoblasten einwirken.

Diese anabolen und katabolen Vorgänge im Knochengewebe stehen unter dem Einfluss zahlreicher hormoneller Faktoren. Übergeordnete Bedeutung haben hierbei zum einen die kalziotropen Hormone Parathormon, Vitamin D3 und Calcitonin und zum anderen die Sexualhormone (Riggs et al., 2002). Hier ist vor allem das Östrogen zu nennen, dessen Hauptzielzelle im Knochen der Osteozyt zu sein scheint (Braidman et al., 1995).

Als dritter entscheidender Modulator der Knochenmasse sind die körperliche Aktivität eines Individuums und die daraus resultierenden mechanischen Kräfte auf das Skelettsystem zu nennen. Steigt die mechanische Belastung eines Knochens an, so resultiert daraus eine Zunahme an Knochenmasse (Goodship et al., 1979; Kontulainen et al., 2001). Eine Abnahme der Knochenmasse ist im umgekehrten Fall bei reduzierter Belastung, zum Beispiel bei längerer Immobilisation (Krolner et Toft, 1963) oder Schwerelosigkeit bei Weltraumflügen (Vico et al., 2000), zu beobachten.

Hinsichtlich anaboler Wirkungen auf den Knochen durch mechanische Belastung zeigt sich, dass Altern die osteogenetischen Effekte vermindert (Rubin et al., 1992).

Neuere Arbeiten weisen einen inhibierenden Einfluss von Leptin auf die Knochenbildung nach (Ducy et al., 2000), wobei der Wirkort nicht im Knochen selbst, sondern im Zentralnervensystem zu finden ist. Über Hypothalamusbezirke wird das sympathische Nervensystem aktiviert.

Konsekutiv kommt es zur Noradrenalinsekretion im Knochen und über β 2-adrenerge Rezeptoren zu den antiosteogenen Effekten (Takeda et al., 2002). Stimulierende Effekte von dem β -Blocker Propanolol bei der Frakturheilung bei Ratten (Minkowitz et al., 1991) gehen mit diesen Ergebnissen konform.

1.2 Mechanotransduktion

Mechanotransduktion ist die Umwandlung biophysikalischer Kräfte in elektrophysiologische und biochemische Signale, die zu einer Antwort in Zellen führen. Diese können auf diese Weise auf mechanische Umgebungsreize, die auf ein Individuum einwirken, reagieren. Trotz zahlreicher Forschungstätigkeiten auf diesem Gebiet sind die genauen Mechanismen der Anpassung des Knochens der auf ihn einwirkenden mechanischen Belastungen noch nicht ausreichend verstanden und untersucht.

Zum besseren Verständnis bedient man sich Experimenten in-vivo und zunehmend in-vitro. Pionierarbeit in der nun auch quantitativen Beschreibung des Einflusses mechanischer Belastung auf Knochenzellkulturen leistete Glücksmann (Glücksmann, 1939). Die von ihm durchgeführten Dehnungsversuche zur mechanischen Stimulation wurden im Weiteren verfeinert (Bassett et Hermann, 1961). Rodan und Mitarbeiter konnten 1975 zeigen, dass hydrostatischer Druck auf Knochenzellen aus der Tibia von Hühnern zu einer Zunahme zyklischer Nukleotide führt (Rodan et al., 1975).

Um den Knochen und die Zellen durch mechanische Kräfte zu stimulieren, ist eine gewisse Kraftdimension nötig, damit messbare Antworten der Zellen und Knochenanpassungen erzielt werden können. Diesen Schwellenwert bezeichnete Frost als „minimal effective strain“ (Frost, 1983).

Ebenso zeigen sich auch Unterschiede in der Qualität der auf den Knochen einwirkenden Kräfte. In Versuchen mit der Ulna von Vögeln konnte gezeigt werden, dass eine dynamische Ausübung der Kräfte eine erhöhte Knochenmasse im Vergleich zu statischen Kräften bewirkt (Lanyon et Rubin,

1984). Auch spielt die Frequenz der auftretenden Belastungen eine Rolle. Zum Beispiel konnte in der Tibia von Ratten eine vermehrte Osteogenese durch einen höher frequenten Dehnungszyklus bei gleich bleibender Gesamtzahl der Belastung festgestellt werden (Robling et al., 2000).

Welche Zellen dienen dem Knochen nun als Mechanosensor? Duncan postuliert diese Funktion für die Osteozyten, da sie mit 94%, wie bereits unter 1.1.1 beschrieben, den größten Anteil an den Knochenzellen ausmachen (Duncan et Turner, 1995). Über eine parakrine Rückmeldung auf die Osteoblasten, z.B. durch IGF-1 (Lean et al., 1995), sollen diese dann aktiviert werden. Zahlreiche andere parakrine Faktoren sind mittlerweile bekannt: Prostacyclin (Rawlinson et al., 1991), Prostaglandin E2 (Ajubi et al., 1996) und NO (McAllister et al., 2000). Favorisiert werden die Osteozyten ebenfalls von Mullender, der in seinen Vergleichsversuchen beider Zellarten eine bessere Knochenformation bei Stimulation der Osteozyten sah (Mullender et Huiskes, 1997).

Jedoch zeigen andere Autoren ebenfalls eine Mechanosensitivität für Osteoblasten, die nach Dehnungsbelastung mit einer Phospholipase C-Aktivierung reagieren (Jones et al., 1987) oder deren Produktion von cAMP durch Belastung mit Scherspannung gesteigert wird (Reich et al., 1990). Hier scheint ein wohl geordnetes Zusammenspiel der einzelnen Zellarten vorzuliegen.

1.2.1 Mechanische Belastung des Knochengewebes

Im Wesentlichen werden heute zwei verschiedene Belastungsarten des Knochengewebes unterschieden, die auch das Hauptaugenmerk in Experimenten mit Zellkulturen auf sich ziehen. Dies sind zum einen Dehnung/Kompression und zum anderen durch Flüssigkeitsströme in dem lakuno-kanalikulären Netzwerk erzeugte Scherspannung, auf die später noch eingegangen werden sollen. Diese Kräfte wirken in-vivo nicht auf alle Zellen gleich verteilt, so dass eine interzelluläre Kommunikation vorhanden sein muss (Jones et al., 1995).

Strömungspotentiale an den Zelloberflächen, hervorgerufen durch Ionen- und Ladungsänderungen, treten in den Hintergrund, da in neueren Experimenten gezeigt wurde, dass vornehmlich die einwirkenden Scherspannungen und nicht die Potentiale die Zellstimulation hervorrufen (Reich et Frangos, 1993; Bakker et al., 2002). Letztere wiesen durch Zugabe von Dextranen zum Versuchsmedium den Einfluss von Scherspannungen nach. Denn durch die Zugabe veränderte sich die Viskosität des Mediums, aber nicht die Ionenkonzentration.

Ebenso zeigen Versuche mit dem hydrostatischen Druck eine Aktivierung von Zellen, jedoch sind unphysiologisch hohe Druckwerte nötig. Hydrostatischer Druck kommt zudem nicht in mineralisiertem Knochen vor, sondern nur im Knochenmark (Ochoa et al., 1991).

Eine Sonderstellung nimmt die Schwerelosigkeit als mechanischer Stimulus oder besser Anti-Stimulus ein. Hierbei scheint aber auch wieder die Scherspannung eine Rolle zu spielen, denn Zellen können nicht direkt Mikrogravität perzeptieren (Cowin, 1998). Durch Flüssigkeitsumverteilungen in Schwerelosigkeit von Becken und Beinen hin zu Brustkorb und Kopf (Thornton et al., 1992) zeigt sich an der unteren Extremität und am Becken ein Knochenmasseverlust, wo hingegen am Kopf eine Knochendichtezunahme festgestellt werden kann (LeBlanc et al., 1998). Dies könnte in Zusammenhang mit der Flüssigkeitsströmung in dem lakuno-kanalikulären Knochensystem stehen (Burger et Klein-Nulend, 1999).

Um nun die Zellkulturen einer entsprechenden mechanischen Belastung wie Dehnung und Scherspannung aussetzen zu können, war die Entwicklung verschiedenster Apparate für Experimente in-vitro nötig (Brown, 2000).

1.2.1.1 Dehnung und Kompression

In der Biomechanik verwendet man zur Beschreibung von zellulären Veränderungen durch Dehnung die dimensionslose Einheit „strain“ (S). Sie gibt das Verhältnis von Zelllänge unter Dehnung (Δl) minus Ausgangslänge (l) zu

der Ausgangslänge (l) an: $S = (\Delta l - l) / l$. So wäre 1 strain eine Verdopplung der Ausgangslänge. Physiologische Dehnungen liegen zwischen 500 und 3000 μ strain (Jones et Bingmann, 1991).

Wird ein Knochen auf der einen Seite gedehnt, erfährt er auf der anderen Seite eine Kompression. Abbildung 1-4 stellt dies schematisch dar.

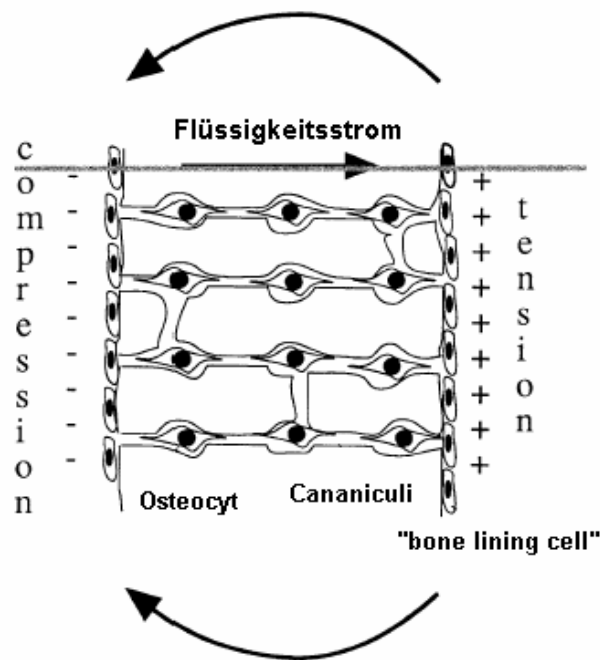


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung von Biegung auf kortikalen Knochen

Gleichzeitig geht man dabei von einem Flüssigkeitsstrom von der komprimierten zur gedehnten Seite in den Canaliculi aus (Abbildung aus Duncan, 1995).

Um Zellkulturen diesen Dehnungen aussetzen zu können, wurden nach entsprechenden mathematischen Vorgaben 4-Punkt-Dehnungsmaschinen entwickelt (Jones et al., 1993).

Der postulierte Flüssigkeitsstrom in den Canaliculi beeinflusst über Scherspannungen gleichsam die Osteozyten. Hierauf wird im folgenden Kapitel eingegangen.

1.2.1.2 Scherspannung

Aus Abbildung 1-4 wird ersichtlich, wie durch mechanische Deformation des Knochens Flüssigkeitsströme entstehen können. Durch diese sind die Osteozyten Scherspannungen ausgesetzt. Hierbei kommt die Zelldeformation durch tangential auf die Zelloberfläche auftretende Kräfte zustande.

Es wurde schon in den 70er Jahren vermutet, dass durch mechanische Belastung ein interstitieller Flüssigkeitsstrom in den Canaliculi vorhanden sei (Piekarski et Munro, 1977). Entscheidende experimentelle Nachweise mit Hilfe von Tracern, die sich unter mechanischer Belastung im lakuno-kanalikulären System bei Versuchen mit explantierten Schafknochen verteilten (Tate et Knothe, 2000), konnten nun erfolgen.

Der nicht mineralisierte Anteil des Knochens mit Lakunen und Canaliculi wird von Wasser und kleinen Molekülen schneller durchwandert als der mineralisierte. Hierbei haben der Havers-Kanal einen Durchmesser von 250 μm und die Canaliculi einen von etwa 1 μm . Im Vergleich betragen die Abstände in der mineralisierten Knochenmatrix mit dem Kollagen und dem Hydroxylapatit um die 0,01 μm . Insgesamt machen Flüssigkeitsbewegungen circa 23% des Gesamtknochenvolumens aus (Owan et al., 1997).

Der Flüssigkeitsstrom sorgt natürlich auch für die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und entsorgt metabolische Abfallprodukte. Jetzt wurde bei den Osteosarkomazellen MC3T3-E1 gezeigt, dass das Vorhandensein bestimmter Nährstoffe auch für die Mechanosensitivität dieser Zellen für Scherspannung verantwortlich ist. Ohne diese zeigten sie eine verminderte intrazelluläre Kalziumantwort und Prostaglandin E2-Produktion (Donahue et al., 2003).

Von einigen Autoren konnte auch gezeigt werden, dass manche Zellen sensitiver für Scherspannungen als für Dehnung zu sein scheinen. MC3T3-E1 reagierten mit einer höheren Bildung von Osteopontin (Owan et al., 1997) und andere Zellen bildeten mehr NO und Prostaglandin E2 bei Vergleichsversuchen (Smalt et al. 1997). Bei diesem Versuch muss jedoch angemerkt werden, dass zur Stimulation der Zellen mit Flüssigkeitsströmungen hohe Scherspannungen von bis zu 148 dyn/cm^2 verwendet wurden.

Die genauen Scherspannungen, die im lakuno-kanalikulären Knochensystem existent sind, konnten noch nicht direkt bestimmt werden. Von theoretisch-mathematischen Berechnungen muss man derzeit von Scherspannungen von 0 bis circa 70 dyn/cm² ausgehen (Weinbaum et al., 1994). Auf die Scherspannung an sich geht das Kapitel 2.3.3 ein.

Um in Experimenten Zellkulturen mit Scherspannungen zu belasten, wird meist eine Parallelfusskammer verwendet, in der ein definierter Flüssigkeitsstrom über die Zellen fließt (Abbildung 1-5).

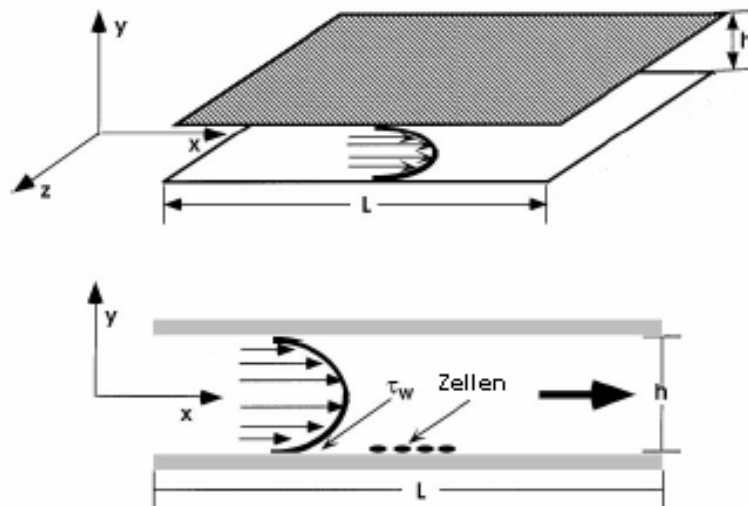


Abbildung 1-5 Flusskammer, in der die Zellen Scherspannungen τ_w ausgesetzt sind
(Abbildung aus Allen et al., 2000)

Aus gegebenen Variablen kann dann die auf die Zellen einwirkende Scherspannung τ_w berechnet werden. Eine genaue Darstellung hinsichtlich der Scherspannungsberechnung erfolgt in Kapitel 2.3.3.

In dieser Arbeit zum Einfluss von Scherspannungen auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten kam eine neu entwickelte Flusskammer von Usami zur Anwendung (Usami et al., 1993). Ihr Vorteil ist, dass in einem Experimentenablauf die gleichen Zellen unterschiedlichen Scherspannungen

ausgesetzt werden können. Dies liegt begründet in der besonderen Flusskammerform, die so einen Scherspannungsgradienten im Verlauf der Kammer erzeugt (siehe auch Kapitel 2.3.1).

1.2.2 Signaltransduktion

Die mechanischen Belastungen auf Zellen werden dann von diesen auf unterschiedlichste Art und Weise wahrgenommen. Auch wenn der eigentliche Mechanosensor noch unbekannt ist, können doch zahlreiche Signaltransduktionskaskaden beobachtet werden, die das intrazelluläre biochemische und biophysiological Korrelat der Mechanostimulation darstellen. Eine Übersicht gibt Abbildung 1-6.

Schematisch ist in der Zellmembran ein Scherspannungsrezeptor dargestellt. Wie nehmen Knochenzellen Scherspannung wahr? Ist es ein Proteinkomplex, der in der Plasmamembran lokalisiert ist, wie es zum Beispiel für Endothelzellen gefordert wird (Baraket et Davies, 1998)? Sind es vielleicht die Integrine selbst, die die Verbindung zur Extrazellulärmatrix herstellen? Besteht eine Verbindung zwischen dem Rezeptor und dem Zytoskelett? Oder sind direkt membranständige Kationenkanäle beteiligt? Welche Rolle spielen die Phospholipase C, G-Proteine, Proteinkinase C oder die NO-Synthase in diesem Prozess?

Dies sind teilweise noch offene Fragen, aber in verschiedenen Experimenten konnten bereits Antworten gefunden werden. Im Folgenden sollen nun die einzelnen Signaltransduktionswege und ihre derzeitige Bedeutung für durch Scherspannung vermittelte Mechanostimulation kurz dargestellt werden.

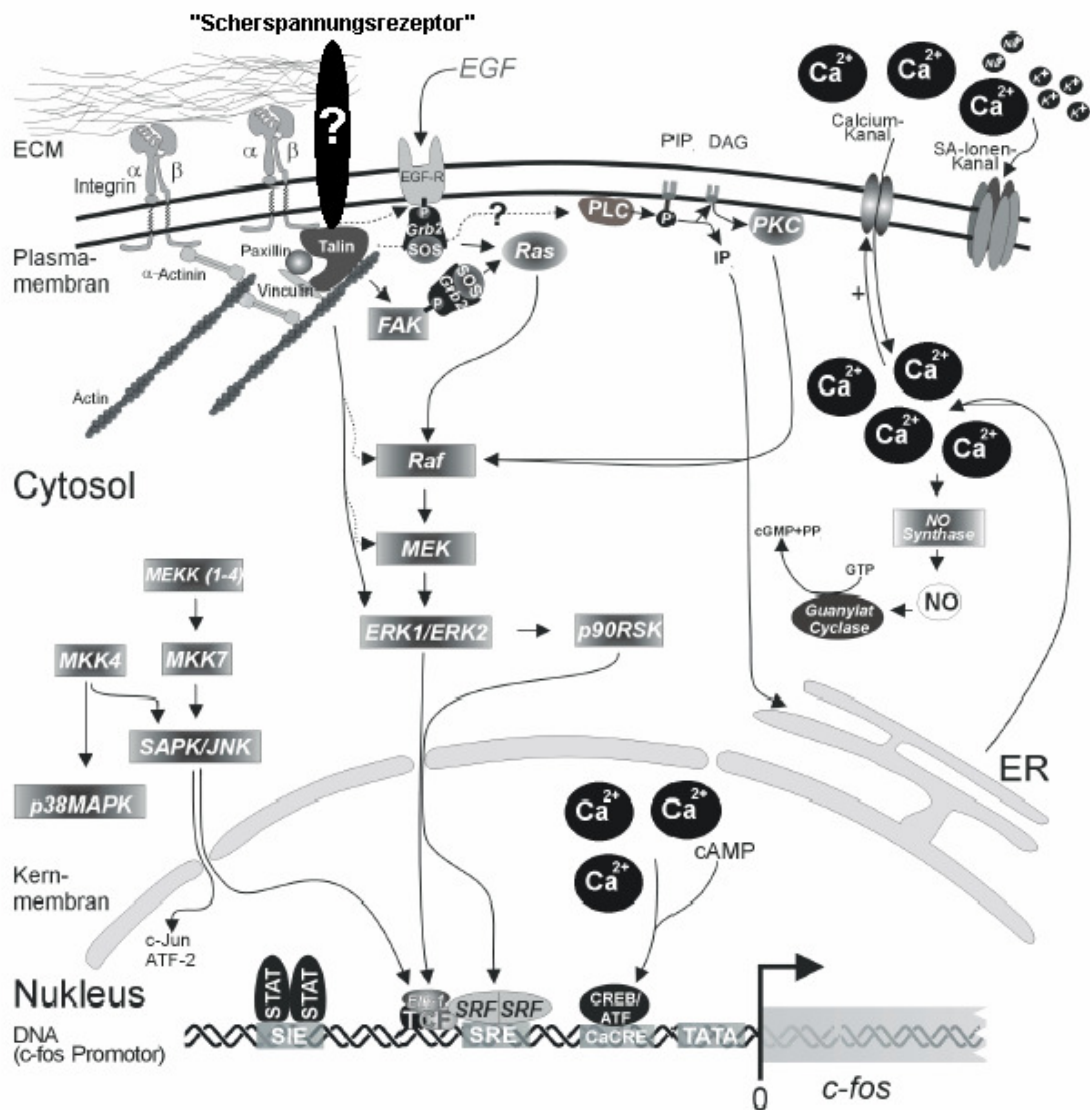


Abbildung 1-6 Übersicht intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden

Erläuterungen im Text
(Abbildung modifiziert nach Tenbosch, 1999)

1.2.2.1 Zytoskelett

Das Zytoskelett gibt die Zellform vor. Hauptbestandteile des Zytoskeletts sind Aktin-Filamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (z.B. Vimentin, Talin, Paxillin, α -Aktinin). Über diese erzeugt die Zelle eine innere Spannung (Harris et al., 1980), die sie an die Extrazellulärmatrix weitergibt. Über diese ist sie mit

Integrinen, die heterodimere Transmembranproteine sind und aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, verbunden. Setzen nun mechanische Belastungen an der Zelle an, so müssen diese erst einmal die inneren Spannungskräfte übersteigen. Durch diese Verbindung von extrazellulär bis hin zum Zellkern, könnte eine gesteigerte Genexpression vermittelt werden (Ingber, 1997).

Pavalko stellt hierzu ein neues Modell vor. Durch die Verbindung über das Zytoskelett zum Zellkern soll die Deformation zu einer Freisetzung von intrazellulären Proteinen, so genannten „Mechanosomen“, führen, die direkt die Geometrie der DNA ändern sollen. So würden diese „Mechanosome“ direkt die Genexpression beeinflussen (Pavalko et al., 2003).

Warum stehen Zellen unter dieser inneren Spannung? Jones stellte Berechnungen an, wonach die Braunsche Molekularbewegung sich über einen Bereich von 250 nm auf der Membran erstreckt. Wird nun eine Knochenzelle mit einem Durchmesser von 40 μm im physiologischen Bereich gedehnt, so kommt es zu einer Längenänderung von 120 nm, was innerhalb der Braunschen Molekularbewegung läge. Dies wäre so für die Zellen nicht wahrnehmbar. Die Aufgabe der inneren Spannung wäre es nun, das „Grundrauschen“ zu reduzieren und den Mechanosensor hervorzuheben (Jones et al., 1995).

Die Quantifizierung der intrazellulären Kräfte wurde Anfang der 80er Jahre vor allem von Harris vorangetrieben. Dieser nutzte elastische Silikonsubstrate in seinen Messungen (Harris et al., 1980). Aufgrund bestehender Nachteile und der begrenzten zeitlichen und räumlichen Auflösung dieser Methode erfolgten entsprechende Weiterentwicklungen. Diese führten zu verbesserten Techniken, um zelluläre Zugkräfte durch Deformationen und Reorganisationen des Zytoskeletts messen zu können. Hervorzuheben ist hier die traction-force-Methode, die durch Dembo und Mitarbeiter stets verfeinert wurde (Dembo et al., 1999). Bei den untersuchten Fibroblasten wurden intrazelluläre Kräfte bei Zellmigration von 2000 nN gemessen.

Hierbei befinden sich Zellen auf einem elastischen Gel, auf das sie die über das Zytoskelett erzeugten Kräfte über die Zelladhäsionspunkte übertragen. In dem Gel sind an der Oberfläche Fluoreszenzpartikel. Ändert sich die Verteilung der Kräfte intrazellulär, ändert sich so über Deformationen auch die Anordnung der Fluoreszenzpartikel. Über das veränderte Fluoreszenzmuster kann mit entsprechender Software auf die wirkenden Kräfte in der Zelle zurück geschlossen werden (siehe auch Kapitel 2.5). So konnte an osteoblastären Zellen gezeigt werden, dass die zelluläre Gesamtkraft bei primären bovinen Osteoblasten bei circa 660 nN pro Zelle und bei den Osteosarkomazellen MG-63 bei circa 50 nN pro Zelle liegt (Curtze et al., 2003).

Die an den Zelladhäsionspunkten lokalisierte Focal-Adhesion-Kinase p125 (FAK) erfährt bei Stimulation eine Translokation vom Zytoplasma zu den Integrinen. Hierüber kommt es zur Autophosphorylierung und Aktivierung der Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK), die ebenfalls zu veränderter Genexpression führt (Guan, 1997).

Das Zytoskelett von Zellen passt sich vorherrschenden Kräfteverhältnissen an. So zeigen in Flussversuchen Endothelzellen eine Ausrichtung der Integrine in Flussrichtung, so dass Zelladhäsion ein dynamischer Prozess als Antwort auf Mechanostimulation zu sein scheint (Davies et al., 1994).

Gleichsam kommt es durch Scherspannungen zu einer Reorganisation des Zytoskeletts in Form der Bildung von starken Aktinbündeln und veränderter Genexpression von c-fos (Chen et al., 2000). C-fos ist eine frühe Genantwort mechanisch stimulierter Zellen, wobei kürzlich einzelne Genloci für separate Belastungsformen identifiziert wurden, hierunter auch ein Genlocus für die durch Scherspannungen induzierte Genexpression (Peake et El Haj, 2003).

Die Bindung von Aktin über α -Aktinin an die β -Untereinheit der Integrine scheint bei der Bildung dieser Aktinbündel eine besondere Rolle zu spielen. Wird die Verbindung durch einen Antagonisten gehemmt, wird die Bildung solcher Aktinbündel durch Flüssigkeitsströme blockiert und gleichzeitig die Expression von c-fos reduziert (Pavalko et al., 1998).

Keine Rolle in der Mechanotransduktion scheint hingegen Vinculin zu spielen. In Versuchen mit bovinen Osteoblasten konnte gezeigt werden, dass unter Dehnungsbelastungen mit 200 μ strain Vinculin sich aus den Fokaladhäsionspunkten umverteilt ins Zytoplasma und die Zelladhäsion sich insgesamt nicht verändert. Auch stellte sich keine veränderte Zellantwort auf Mechanostimulation dar (Meyer et Jones, 1997).

Insgesamt wird von vielen Autoren das Zytoskelett als favorisierter Mechanosensor angesehen.

1.2.2.2 Ionenkanäle

Nachdem zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass Ionenkanäle durch mechanische Belastung aktivierbar sind (Guharay et Sachs, 1984), wurde angenommen, dass sie mögliche Mechanotransduktoren sind.

Die Ionenkanäle können unterteilt werden hinsichtlich ihrer Aktivierungseigenschaften, kinetischer Charakteristika und der Ionenselektivität. In Endothelzellen wurden durch Scherspannungen Kaliumkanäle aktiviert (Olesen, et al., 1988). Auch Jones weist einen Kalziumanstieg über dehnungsaktivierte Kationenkanäle (SA-cat), der durch Kaliumkanäle getriggert ist, nach (Jones et Bingmann, 1991). Diese Kationenkanäle werden bei geringen Kräften aktiviert, sind spannungsabhängig und nicht selektiv für bestimmte Kationen.

Eine entscheidende Position scheinen jedoch die selektiven Kalziumkanäle einzunehmen, da Kalzium nicht nur in der mechanisch stimulierten Zelle ein ubiquitär vorkommender second-messenger ist. Intrazelluläre Kalziumveränderungen kommen bei Zelldifferenzierung, Proliferation, aber auch Apoptose vor (Berridge et al., 1998).

Unterschiedliche osteoblastäre Zellen exprimieren unterschiedliche Kalziumkanäle. Sie können in spannungsabhängige und spannungsunabhängige unterteilt werden. Letztere werden auch als mechanosensitive Kalziumkanäle bezeichnet und kommen z.B. auch in den Osteosarkomazellen MG-63 vor.

Die spannungsabhängigen werden in fünf Untergruppen aufgeteilt, wobei der am weitesten verbreitete und wichtigste der L-Typ ist (Duncan et al., 1998). Dieser ist mit dem Kalziumantagonisten Nifedipin hemmbar und eine Blockade dieses Kalziumkanals bei jungen Hasen im Wachstum zeigte nach zehn Wochen eine verminderte Osteogenese (Duriez et al., 1993). Ob diese Kanäle unabhängig mechanische Belastung perzeptieren können oder ob über Konnektionen zum Zytoskelett deren Aktivierung sekundär erfolgt, bedarf noch weiterer Forschungsarbeit. Eine Forschungsarbeit aus unserem Labor (Struckmeier, 2001) zeigte Werte zur direkten Stimulation und Kalziumaktivierung in POb durch Rasterkraftmikroskopie (englisch: Atomic Force Microscopy [AFM]) von 0,89 pJ auf. Die notwendige Energie zur Aktivierung von Ionenkanälen ist wesentlich geringer und liegt bei 0,00008 pJ (Sukharev et al., 1999) und lässt die Vermutung zu, dass ein potentieller Mechanorezeptor nicht nur aus einem Ionenkanal besteht.

1.2.2.3 Kalzium und Phospholipase C

Phospholipase C (PLC) ist ein plasmamembranständiges Enzym, welches in drei verschiedenen Isoformen vorkommt: PLC- β , PLC- γ und PLC- δ . Das Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat wird durch die PLC in zwei second-messenger hydrolysiert. Dies ist Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 kann über die Bindung an entsprechenden Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum (ER) eine Kalziumfreisetzung aus diesen intrazellulären Kalziumspeichern hervorrufen. DAG aktiviert die Proteinkinase C, die wiederum durch Phosphorylierung andere Proteine aktiviert (Berridge, 1993).

Jones und Scholübbbers zeigten erstmals in ihren uniaxialen Dehnungsversuchen an Knochenzellen, dass die Phospholipase C innerhalb weniger Sekunden aktiviert wird (Jones et Scholübbbers, 1987). Konsekutive intrazelluläre Kalziumanstiege durch IP3 wurden im Weiteren festgestellt (Jones et al., 1991).

Die intrazellulären Kalziumanstiege erreichen Konzentrationen von 200 bis 400 nM, wobei die Konzentration eines Osteoblasten in Ruhe zwischen 50 und 150 nM liegt (Li et al., 1997).

Der intrazelluläre Kalziumanstieg sorgt über eine Triggerung der plasmamembranständigen Kalziumkanäle ebenfalls für einen Kalziumeinstrom von extrazellulär. Nach dem Kalziumanstieg sorgen ATP-abhängige Kalziumpumpen wieder für eine Einstellung der Ruhekonzentration durch Rücktransport des Kalziums in das ER und nach extrazellulär. Da der second-messenger Kalzium weit verbreitet und an zahlreichen Zellaktivitäten beteiligt ist, sind viele Bemühungen unternommen worden, diese Kalziumveränderungen messbar zu machen.

Die ersten reliablen Messungen erfolgten 1967 von Ridgway. Er injizierte das Photoprotein Aequorin in Muskelzellen und konnte so über Fluoreszenzmessungen die Kalziumkonzentrationen messen (Ridgway et Ashley, 1967).

Die Fluoreszenzmessungen nach Einbringen eines intrazellulären Kalziumfarbstoffes sind heute das gängige Verfahren zur Bestimmung intrazellulärer Kalziumdynamiken (siehe auch Kapitel 2.4.2).

1.2.3 Zeitliche Abfolge der Signaltransduktion

Verschiedene Effektorsysteme werden nicht nur unterschiedlich aktiviert durch verschiedene Formen mechanischer Belastung, sondern mitentscheidend ist auch die zeitliche Reihenfolge im Ablauf der Signaltransduktion (Jones et al., 1995; Banes et al., 1995). Erste Ereignisse innerhalb von Sekunden bis zu einer Minute sind die Aktivierung der Phospholipase C. Über IP₃ erfolgt die Freisetzung von Kalzium aus dem ER. Ebenfalls erfolgt die Öffnung von Ionenkanälen der Plasmamembran (Arora et al., 1994). In dieser Phase findet ebenfalls die Kommunikation interzellulär über gap junctions statt. (Donahue, 2000).

Durch Kalzium wird unter anderem die NO-Synthase aktiviert (Bakker et al., 2003). In der gleichen Arbeit wurde die Bildung von Prostaglandin E₂ durch

Scherspannung gezeigt. Dies fällt in die Phase der mittelbaren Effekte bis zwei Minuten. NO aktiviert die Guanylatcyclase, durch die cGMP gebildet wird. In diesem Zeitfenster startet auch die Produktion von cAMP (Reich et al., 1990).

Innerhalb von Minuten erfolgt die Aktivierung der MAPK ERK-1 und ERK-2 und weiterer phosphorylierter Proteine (Jones, 1999).

Späte Effekte (bis zu Stunden) sind die Induktion von Genexpression, z.B. c-fos oder Egr-1 (Ogata, 1997) und die Bildung von Transkriptionsfaktoren, z.B. TGF- β oder IGF-1 (Kawata et Mikuni-Tagagaki, 1998). Hier tritt auch die Reorganisation des Zytoskeletts in Erscheinung.

1.3 Klinischer Bezug

Eine entscheidende Erkrankung des Knochens ist heutzutage die Osteoporose, die für den einzelnen eine ernsthafte Erkrankung darstellen kann, aber auch in unserem heutigen Gesundheitssystem eine bedeutende finanzielle Rolle spielt. Hier sind die medikamentösen Behandlungskosten zu nennen und, wenn es zu Osteoporose bedingten Frakturen kommt, die Kosten einer Operation.

Hinsichtlich der Vermeidung oder zumindest der Verminderung des Knochenmasseverlustes und der daraus resultierenden Frakturanfälligkeit erfolgten in den letzten Jahren einige erfolgsversprechende Therapieansätze.

In der Praxis kommen die Bisphosphonate, die hemmend auf die Knochenresorption wirken, nicht nur bei der Osteoporosebehandlung, sondern auch palliativ bei der Behandlung von Knochenmetastasen zum Einsatz. Sie vermindern den Verlust von Knochenmasse und senken so das Frakturrisiko (Watts, 2003).

Ein Umdenken musste beim Einsatz von Östrogenen erfolgen. Zunächst wurden Erfolge bei der Behandlung der postmenopausalen Osteoporose erzielt. In entsprechenden Studien wurden als Nebeneffekte dieser Therapie jedoch eine erhöhte Inzidenz von Mammakarzinomen und ein gehäuftes Vorkommen

von Herzinfarkten beobachtet, so dass eine Studie im Mai 2002 der Women`s-Health-Initiative sogar abgebrochen werden musste (Solomon et Dluhy, 2003).

Ein neuerer Ansatz stellt die Gabe von Parathormon dar. Parathormon, das für die Bereitstellung von Serumkalzium aus dem Knochen verantwortlich ist und somit eigentlich für Knochenresorption, kann bei intermittierender Gabe zu anabolen Effekten führen (Oxlund et al., 1993).

So konnte die Knochenmasse gesteigert und das Frakturrisiko für postmenopausale Frauen unter der Gabe von Parathormon reduziert werden (Neer et al., 2001).

Weiterhin erfolgt hinsichtlich des Knochenstoffwechsels die Gabe von Vitamin D3, Kalzium oral und Fluoriden. Alle Faktoren zusammen mit mechanischer Belastung und daraus resultierender Stimulation von osteoblastären Zellen regulieren so die Homöostase des Knochens mit. In Versuchen konnte eine wechselseitige Beeinflussung der humoralen Faktoren und der zellulären Antwort auf mechanische Stimulation gezeigt werden (Bakker et al., 2003; Zaman et al., 2000).

So können weiterführende Kenntnisse über Mechanotransduktion in Knochenzellen, und hierunter fallen auch die Einflüsse von Scherspannungen, neue mögliche Therapieansätze nicht nur in der Behandlung der Osteoporose bringen. Versteht man dieses komplexe Zusammenspiel auf zellulärer und molekularer Ebene besser, so könnte dies auch für andere Erkrankungen, die das Skelettsystem betreffen, viel versprechende neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Hierzu zählen unter anderem die rheumatoide Arthritis, ossäre Neoplasma und die Ostitis deformans Paget.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Mechanische Belastung von Knochenzellen spielt eine wichtige Rolle im Erhaltungsprozess der Knochenmasse und -architektur. Um den Einfluss von einer Form der mechanischen Belastung, nämlich Scherspannung, zu untersuchen, wurden primäre bovine Osteoblasten und Osteosarkomazellen MG-63 diesen Scherspannungen ausgesetzt.

Scherspannungen treten im lakuno-kanalikulären Netzwerk auf. Um diese mechanische Stimulation in Experimenten in-vitro durchführen zu können, ist es üblich, die zu untersuchenden Zellen in einer Parallelfusskammer Flüssigkeitsströmen auszusetzen.

In dieser Arbeit kommt eine neue Gradientenflusskammer zum Einsatz, deren Vorteil darin liegt, dass in einem Experimentenverlauf die Zellen unterschiedlichen Kräften (von dem frei wählbaren Maximum bis 0) ausgesetzt sind. So muss, um unterschiedlich hohe Stimuli zu erzeugen, das Experimenten-Setup nicht geändert werden. Gleichzeitig werden Zellen, die am Eingang der Flusskammer lokalisiert sind, weniger stimuliert als am Ende oder in dem zu analysierenden Bereich. So liegt die Vermutung nahe, dass diese Zellen gegebenenfalls weniger Metaboliten sezernieren, die wiederum die nachfolgenden Zellen beeinflussen.

Verschiedene Signaltransduktionswege werden nach mechanischer Stimulation aktiviert. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Scherspannungen kalziumabhängige Signaltransduktionswege in primären bovinen Osteoblasten induzieren. Darüber hinaus fanden bis jetzt noch keine Scherspannungsversuche an den mechanosensitiven Osteosarkomazellen MG-63 statt, die das Verhalten hinsichtlich einer Kalziumantwort auf Scherspannungen untersuchten.

Ebenfalls von Interesse ist die direkte Quantifizierung von intrazellulären Kräften, die die Zelle bei Scherspannungsbelastung generiert. Welche Kräfte treten in der Zelle auf und wie stehen diese in Relation zu einer möglichen Aktivierung kalziuminduzierter Signaltransduktionswege?

Die Versuche sollen auch aufzeigen, ob es Unterschiede in der Zellantwort zwischen der herkömmlichen Parallelfusskammer und der neuen Gradientenflusskammer gibt.

Die Ergebnisse dienen gleichzeitig als Kontrollversuche für zukünftige Experimente zum Einfluss der Schwerelosigkeit auf die Mechanoperzeption bei Parabelflügen und TEXUS-Raketenflügen der European Space Agency (ESA). Die Resultate dieser Flugversuche sind Inhalt einer eigenständigen Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen und Puffer

PBS	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ pH 7,4	136,0 mM 2,6 mM 8,0 mM 1,1 mM
Vitamin C - Phosphat (WAKO Chemical Ind., Japan) Stammlösung		5 mg/ml PBS
HBSS (Hank´s balanced salt solution)	NaCl KCl MgSO ₄ KH ₂ PO ₄ Hepes NaHCO ₃ Glucose CaCl ₂ pH 7,4	132,0 mM 3,0 mM 1,3 mM 1,25 mM 10,0 mM 0,5 mM 11,0 mM 1,8 mM
HBSS (Hank´s balanced salt solution) Kalziumfrei/Manganzusatz	NaCl KCl MgSO ₄ KH ₂ PO ₄ Hepes NaHCO ₃ Glucose MnCl ₂ pH 7,4	132,0 mM 3,0 mM 1,3 mM 1,25 mM 10,0 mM 0,5 mM 11,0 mM 0,1mM
Tyrodellösung	NaCl KCl CaCl ₂ MgCl ₂ NaHCO ₃ NaH ₂ PO ₄ Glucose pH 7,4	136,9 mM 2,68 mM 1,8 mM 1,05 mM 11,9 mM 0,42 mM 5,55 mM

50 mM Hepes (KOH Tabletten Titration auf pH=8,5)	Hepes dd H2O pH 8,5	11,9 g 1l
Earles Puffer (Seromed)	10X Earles 7,5% NaHCO3 ddH2O Streptomycin Penicillin Amphotericin B	50ml 3ml 450ml 375IE/ml 500IE/ml 0,004mg/ml

2.1.2 Nährmedien

Fetales Kälberserum (FCS) Boehringer Mannheim (Chargennr.14713902) Seromed (Chargennr. S0112/511S)	
Ham's F10 (Biochrom KG Berlin)	
High Growth Enhancement Medium (Bio Whittaker)	Modifiziertes DMEM, Fructose statt Glucose
RPMI 1640 (Life technologies)	

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Glasspüllösung	Eisessig 96% Alkohol, vergällt ddH2O	20 ml 200 ml 780 ml
Pluronic F-127	20% in DMSO	Molecular Probes
Fura-2 AM	0,3 mM Stammlösung	Molecular Probes
Oregon Green BAPTA 488-2 AM	0,3 mM Stammlösung	Molecular Probes

Parathormon	0,1% Stammlösung	Firma Sigma
Thapsigargin	0,5 mM Stammlösung	Molecular Probes
Acrylamid	10% Stammlösung	Carl Roth GmbH
BIS-Acrylamid	1% Stammlösung	Sigma
FluoSpheres® (Fluoreszenz-Latexpartikel)	Durchmesser: 0,2 µm Durchmesser: 0,5 µm 10 ml	Molecular Probes
Ammoniumpersulfat (APS)	10% Stammlösung	ServaFeinbiochemica
TEMED		Carl Roth GmbH
Sulfo-SANPAH	1 mM Stammlösung	Pierce Perbio
Typ-I-Kollagen (Calf skin)	0,02% Stammlösung	Sigma Aldrich

2.1.4 Geräte und verwendete Materialien

Begasungsbrutschrank für die Zellkultur	Heraeus Instruments
Autoklav	Guwina Berlin
Sterilisationsofen	Heraeus Instruments
Gewebekulturflaschen 250 ml	Greiner Labortechnik
4fach-Multiwell-Kulturschalen	Nalge Nunc International
Counter Z1	Coulter
Sterilfilter 0,22 µm Porengröße	Schleicher & Schuell
Sterilwerkbank	Gelaire BSB
Zentrifugen	Eppendorf 5415 C
Bildanalyseesystem Quanticell 700	Applied Imaging, UK
Inverses Mikroskop	Nikon Diaphot
Phasenkontrastmikroskop	Olympus CK2(BH2-RFCA)
Objektive für Phasenkontrast- und Fluoreszenzmessungen	Nikon CF Fluor DL 10x, NA 0,5 Nikon CF Fluor DL 20x, NA 0,75 Nikon CF Fluor DL 40x, NA 0,85
Bildanalysekamera	Photonic Science Extended ISIS
Bildanalysekamera	Proxitronic HL4 S NIR 2+
CCD-Kamera	Xillix Microimager MI 1400
Rollerpumpe	Ismatec IPS-12

Tygon®-Silikonschläuche	Colme-Palmer
Deckgläser 60X24X0,1mm	Fa. Marienfeld

Anmerkung: Die zur üblichen Standardausrüstung eines Labors zählenden Materialien und Geräte werden an dieser Stelle nicht weiter separat aufgeführt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen

Das Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank bis zum eigentlichen Experiment mit den Zellen. Die hierzu verwendeten Arbeitstechniken orientierten sich vornehmlich nach Lindl und Bauer (Lindl und Bauer, 1994).

Die Zellkulturen wurden als Monolayer kultiviert. Für die Kultivierung waren verschiedene Standardmedien nötig. Diese wurden mit 10% FCS, je 25000 IE Penicillin und Streptomycin als Antibiotikazusatz, 2 mM L-Glutamin und 10 µg/ml Vitamin C-Phosphat supplementiert.

Das Zellwachstum erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei gesättigtem Wasserdampfdruck, einer Temperatur von 37°C und einem Kohlendioxid-Partialdruck von 5%.

2.2.2 Präparation von primären bovinen Osteoblasten

Für die Experimente mit Primärzellen wurden bovine Osteoblasten verwendet. Diese wurden nach einem von Jones und Mitarbeitern entwickelten so genannten Periostauswachsverfahren (Jones et al., 1991) gewonnen. Hierbei wachsen die Zellen aus Perioststückchen eines Rinderknochens unter Kulturbedingungen aus. Hierzu wurden am ortsansässigen Schlachthof der Stadt Marburg Metacarpi von circa 18 bis 24 Monate alten Rindern erworben.

Die weiteren Präparationsschritte erfolgten unter der Sterilwerkbank. Zunächst wurde der Metacarpus desinfiziert. Dies erfolgte mit vergälltem 70%igem Ethanol. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten wurde mit einem Skalpell das den Knochen umgebende Weichteilgewebe in Form von Haut, Muskeln, Sehnen und Bändern entfernt. Nach Freilegung des Periosts wurde dies im Weiteren ständig mit sterilem PBS gespült, um ein Austrocknen zu verhindern.

Das Periost wurde im Folgenden in circa 5mm breite Streifen geschnitten. Die unterschiedlich langen Perioststreifen oben angegebener Breite wurden dann in Earles-Pufferlösung überführt. Die Perioststreifen wurden dann dreimal für zehn Minuten bei 37°C in einem Schüttler gewaschen. Danach erfolgte nochmals ein 20 Minuten dauernder Waschvorgang in Earles-Pufferlösung mit Zusatz von Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B.

Nun wurden die Perioststreifen in 5 x 5 mm große Quadrate geschnitten und es wurden je zehn Perioststückchen mit ihrer osteogenetischen Seite zum Boden hin in eine Zellkulturschale gelegt. Als Nährmedium diente in der Auswuchsphase HiGEM (High Growth Enhancement Medium), das mit 10% FCS, Penicillin, Streptomycin, Vitamin C und L-Glutamin, die wachstumsbegrenzende Aminosäure, supplementiert wurde.

Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden. Während der weiteren Kultivierung fand der Mediumwechsel einmal wöchentlich statt. Nach circa vier Wochen erreichten die Kulturen Konfluenz und wurden entweder direkt nach dem Passagieren (siehe hierzu Kapitel 2.2.3.1) für Experimente verwendet oder es erfolgte zunächst die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (siehe hierzu Kapitel 2.2.4).

Im Labor erfolgte zuvor routinemäßig für die Kultur der Nachweis charakteristischer, osteoblastärer Marker wie Osteopontin, Osteocalcin, Bone Sialoprotein und Prokollagen Typ I immunzytochemisch. Ebenso wurde eine Charakterisierung durch Parathormonstimulation und bildanalytische Kalziummessung vorgenommen (siehe Kapitel 3.1).

2.2.3 Passagieren von Zellen

2.2.3.1 Primäre bovine Osteoblasten

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen enzymatisch von der Kulturschale abgelöst. Dies geschieht bei der Primärkultur mit dem Enzym Kollagenase. Hierzu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und es erfolgte eine Spülung mit PBS. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 10 ml Ham's F10 mit 0,4%iger Kollagenase-Lösung versetzt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Perioststückchen wurden nun entfernt. Danach wurde eine zweimalige Spülung mit PBS vorgenommen, bevor dann eine 10minütige Inkubation mit 12ml Tyrode-Lösung bei 37°C erfolgte. Diese Suspension mit den Zellen wurde anschließend in 13 ml Ham's F10 aufgenommen. Danach fand eine Zentrifugation mit 1400 rpm für zehn Minuten statt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Ham's F10 unter Vortexen resuspendiert. Im Anschluss daran wurde eine Zellzahlbestimmung mit dem Coulter Counter durchgeführt.

2.2.3.2 Osteosarkomazellen

Für Experimente mit mechanosensitiven Osteosarkomazellen stand die Zelllinie MG-63 zur Verfügung. Diese wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, MD, USA bezogen. Die Osteosarkomazellen wurden in Kultur gehalten und bei Erreichen von Konfluenz war bei diesen ebenfalls ein Passagieren nötig. Hier erfolgte die Verwendung von Trypsin als Enzym. Die Verfahrensweise war ähnlich. Als Nährmedium diente supplementiertes RPMI 1640. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und mit PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen, so dass die Einwirkzeit von Trypsin verkürzt und die Wahrscheinlichkeit von Zellschäden verringert wurde. Dann wurde die Trypsin-Lösung (2 ml) zugegeben und für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 8 ml Ham's F10 aufgenommen und mit 1400 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und verdünnt wieder weiter ausgesät oder für Experimente verwendet oder kryokonserviert.

2.2.3.3 Kryokonservierung

Für die Langzeitlagerung von Zellen ist es nötig, diese zu kryokonservieren. Dabei werden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren.

Hierfür müssen die Zellen von der Oberfläche gelöst werden, was entweder mit Trypsinieren oder Kollagenase geschieht. Nach Zellzählung erfolgte üblicherweise das Fraktionieren der Zellen zu je 10 Millionen pro Kryoröhrchen. Hierbei wurden die Zellen in $900\ \mu\text{l}$ Ham's F10 aufgenommen und mit $900\ \mu\text{l}$ Ham's F10 mit 20% DMSO ergänzt, wodurch eine Endkonzentration von 10% für DMSO entstand.

Die Kryoröhrchen wurden dann zunächst auf Eis gestellt, im Weiteren erfolgte das langsame Einfrieren in einem -80°C -Gefrierschrank in einem Styroporbehälter mit circa 1°C pro Minute. Nach zehn Stunden wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen dann in den Flüssigstickstoffbehälter überführt.

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen direkt im Wasserbad bei 37°C erwärmt und in $8\ \text{ml}$ Ham's F10 aufgenommen. Eine Zentrifugation schloss sich an und das Zellpellet wurde dann in frischem Medium aufgenommen und in einem Kulturgefäß oder direkt für Experimente ausgesät.

2.3 Versuchsaufbau

Um die Zellen entsprechenden Scherspannungen, die durch Flüssigkeitsströme erzeugt wurden, auszusetzen, ist ein spezieller Versuchsaufbau nötig. Dieser wird im Folgenden beschrieben. Die dabei entscheidenden Komponenten inklusive der bildanalytischen Kalziummessung sind:

- A Vorrichtung zum Erzeugen des Flüssigkeitsstromes
- B Flusskammer
- C Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener Bildanalyse

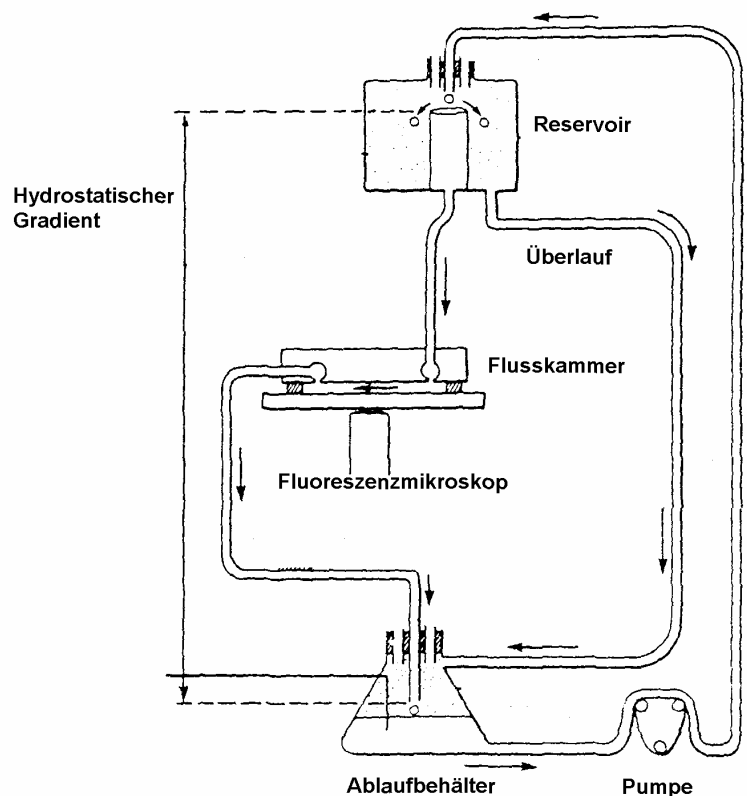


Abbildung 2-1 Versuchsaufbau

Erläuterungen im Text
(Abbildung modifiziert nach Frangos et al., 1985)

Die Abbildung 2-1 gibt in einer modifizierten Darstellung (Frangos et al., 1985) den Versuchsaufbau im Überblick wieder.

Zur Erzeugung des Flüssigkeitsstromes wurde der hydrostatische Gradient zwischen einem oberen Reservoir und dem unteren Ablaufbehälter gewählt. Auf diese Weise wurde ein gleichmäßiger kontinuierlicher Fluss über die in der Flusskammer befindlichen Zellen generiert. Um die Flussgeschwindigkeit zu verändern, wurde der Abstand zwischen den zwei Behältern vergrößert bzw. verkleinert. Um den Flüssigkeitsspiegel im oberen Reservoir und damit den hydrostatischen Gradienten und die resultierende Flussrate konstant zu halten, wurde mit einer Rollerpumpe die Flüssigkeit im Überfluss in das obere Reservoir gegeben. Wie aus der Abbildung 2-1 ersichtlich, fließt überschüssige Flüssigkeit über den Überlauf ab. Die entsprechende Flussrate Q (Volumenmenge pro Zeit), die im Weiteren dann Eingang findet in die Berechnung der erzeugten Scherspannung auf die Zellen, wurde jeweils nach Versuchsende ermittelt. Hierbei wurde mehrfach die Volumenmenge pro Zeiteinheit gemessen und der ermittelte Durchschnitt wurde für die Berechnung der Scherspannung verwendet.

2.3.1 Die Gradienten- und die Parallelflosskammer

Bisher wurden für Flusseexperimente mit Zellen meist parallele Flusskammern verwendet, wie sie in der Abbildung 2-3 links zu sehen sind. Bei diesen ist der Flusskanal rechteckig. Mit der entsprechenden Höhe und Flussrate kann dann die Scherspannung berechnet werden. Diese ist in der gesamten Flusskammer gleich. Das heißt, dass die Zellen am Anfang und am Ende der Flusskammer der gleichen Kraft ausgesetzt sind (Abbildung 2-2).

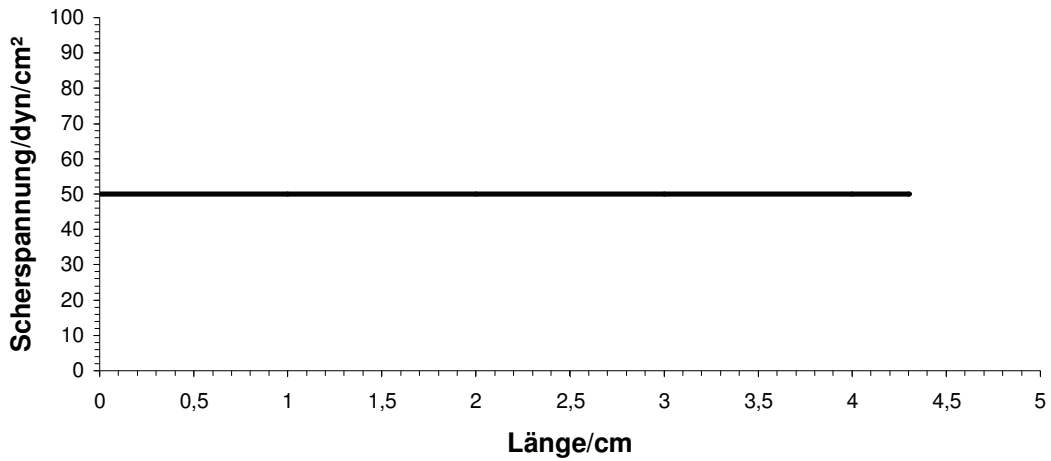


Abbildung 2-2 Scherspannung in einer Parallelfusskammer

An jeder Stelle der Flusskammer wirkt die gleiche Kraft auf die Zellen.
Die Angabe der Scherspannung mit 50 dyn/cm² wurde zu
Illustrationszwecken frei gewählt.

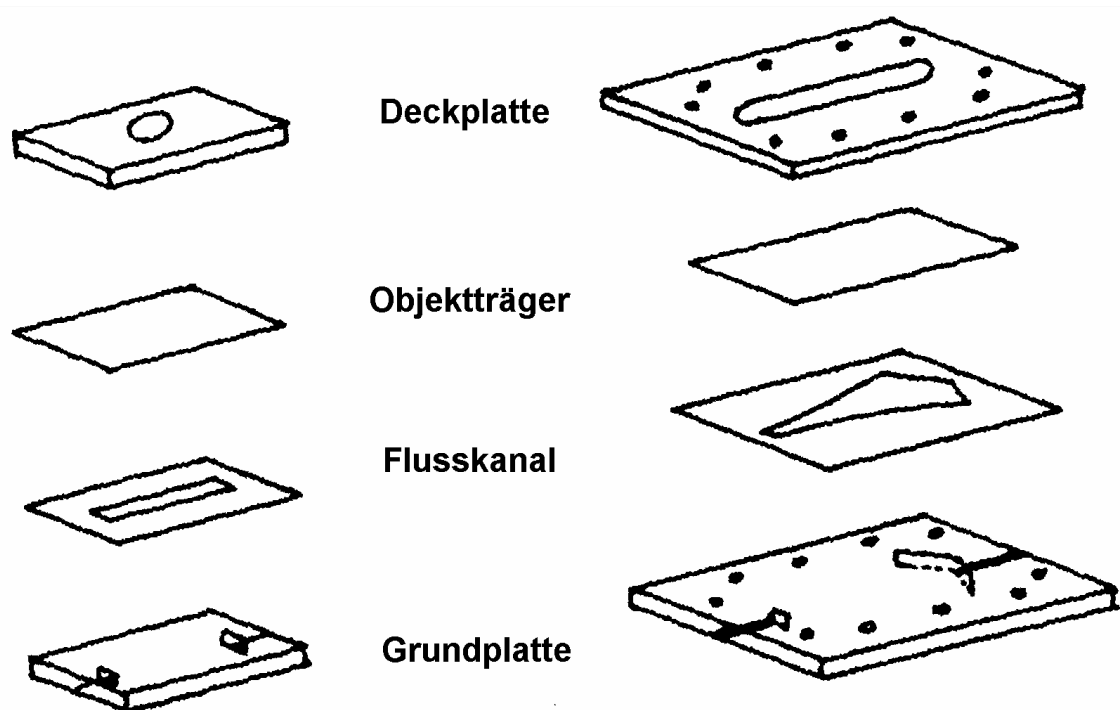


Abbildung 2-3 Vergleich einer herkömmlichen Parallelfusskammer (links) und der Gradientenflusskammer (rechts)

(Abbildung modifiziert nach Usami et al., 1993)

Von Usami und Mitarbeitern wurde eine neuartige Gradientenflusskammer entwickelt, die durch ihre spezielle Form der Flusskanals für einen linearen Anstieg beziehungsweise Abfall der Scherspannung vom Anfang der Flusskammer bis zum Ende sorgt (Abbildung 2-4). Ob ein Anstieg oder ein Abfall der Scherspannung in der Flusskammer vorhanden ist, ist abhängig von der Flussrichtung. Die Flusskammer ist in Abbildung 2-3 rechts und in Abbildung 2-5 nochmals vergrößert separat dargestellt. So können in einem Experiment die Zellen ohne Veränderung der Flussrate unterschiedlichen Scherspannungen ausgesetzt werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Zellen bei linearem Anstieg der Scherspannung in der Flusskammer vor den zu analysierenden Zellen einer geringeren Scherspannung ausgesetzt sind und so geringgradiger stimuliert werden. Dies hat zur Folge, dass die mögliche parakrine Beeinflussung der zu analysierenden Zellen durch z.B. Prostaglandine (Reich et al., 1991), NO (McAllister et al., 2000), Nukleotide (Palmer et al., 1996) oder weiterer anderer Mediatoren reduziert wird und auf diese Weise die mechanische Stimulation im Vordergrund steht.

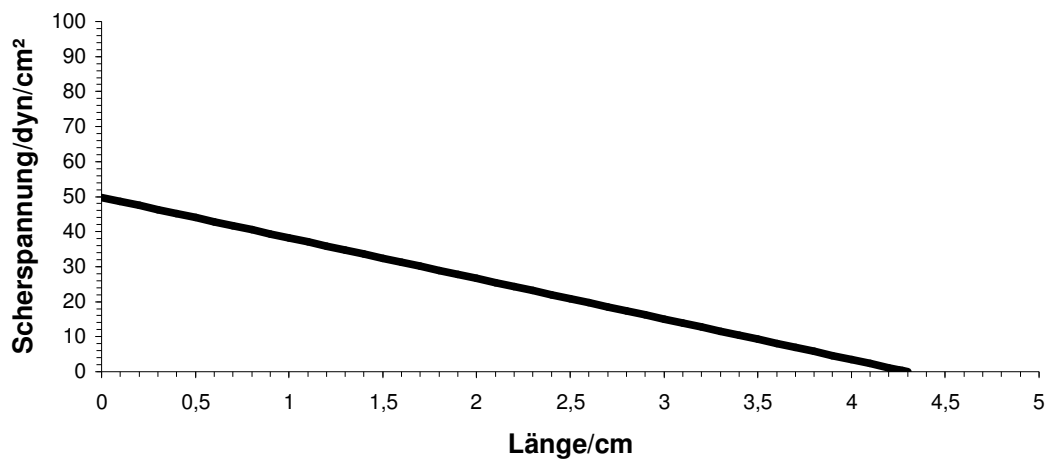


Abbildung 2-4 Linearer Abfall der Scherspannung in der Gradientenflusskammer nach Usami

Die Ausgangsscherspannung mit 50 dyn/cm² wurde zu Illustrationszwecken frei gewählt.

Die Grund- und Deckplatte bestanden aus rostfreiem Stahl. Zwischen Flusskammer und Grundplatte befand sich zusätzlich ein Polycarbonatblock mit den Anschlüssen für die Silikonschläuche (Abbildung 2-5). Der Flusskanal an sich war ebenfalls aus rostfreiem Stahl und hatte eine Länge von 4,3 cm bei einer Eingangsweite von 0,4 cm (Abbildung 2-6). Die Höhe betrug 80 μm .

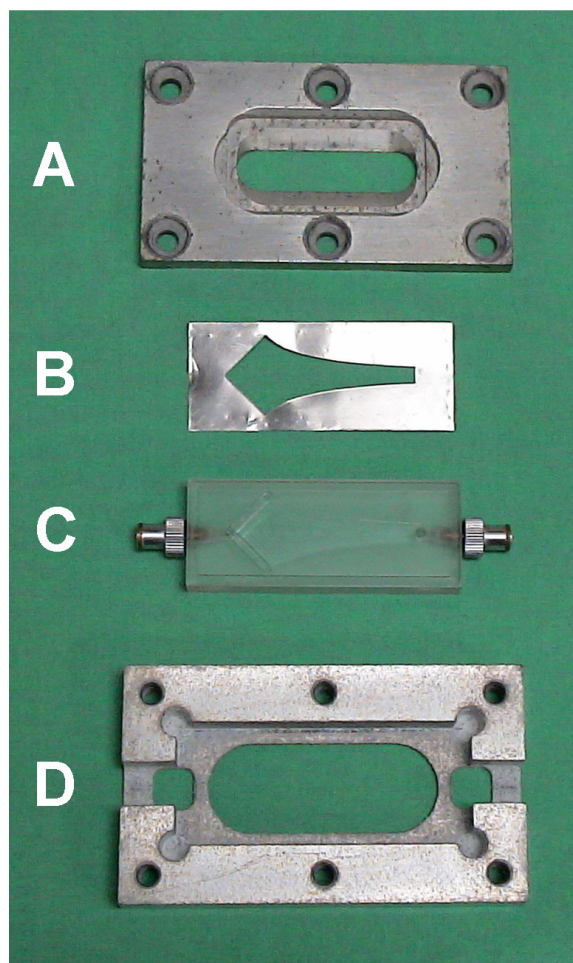


Abbildung 2-5 Verwendete Gradientenflusskammer nach Usami

Deckplatte (A), Flusskanal (B), Polycarbonatblock mit Anschlüssen (C) und Grundplatte (D).
Das Deckgläschen mit den Zellen wird zwischen A und B invertiert eingebaut.

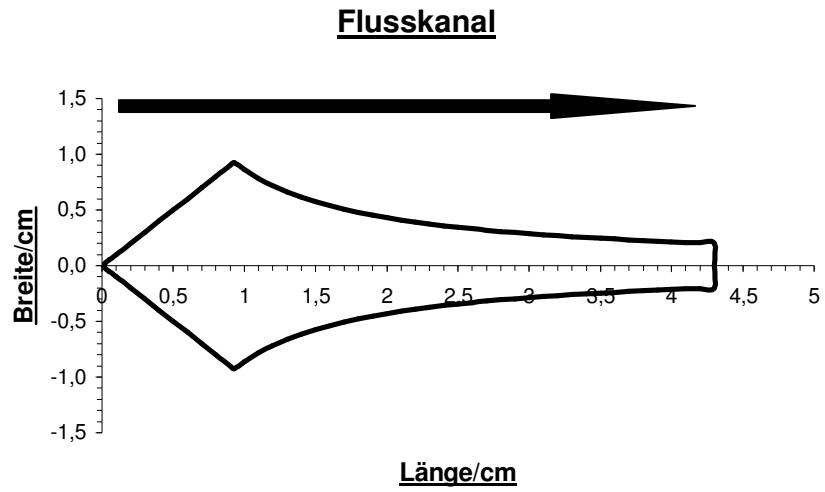


Abbildung 2-6 Flusskanal nach Usami (Fluss in Pfeilrichtung)

2.3.2 Scherspannungsabfall über einer Zelle

Dieser bestehende Gradient führt auch dazu, dass an jeder x-Position der Gradientenflusskammer unterschiedliche Kräfte auf die Zellen wirken. Dies hat zur Folge, dass selbst über einer Zelle unterschiedliche Kräfte vorhanden sind.

Die verwendeten primären Osteoblasten haben in Kultur als Monolayer einen Durchmesser von circa 40 μm . Berechnet man nun den Abfall der Scherspannungswerte über diese 40 μm und setzt diesen in Relation zur Scherspannung an der jeweiligen x-Position (angenommene Mitte des Zelldurchmessers), ergibt sich für jede gewählte Flussrate das Diagramm in der Abbildung 2-7. Aus dieser wird ersichtlich, dass der Abfall der Scherspannung über einer Zelle ab einer x-Position im Flusskanal von circa 0,3 cm kleiner als 1% ist. Die analysierten Zellen lagen meist bei einer x-Position um 2 cm, wobei hier das Verhältnis kleiner als 0,2% ist.

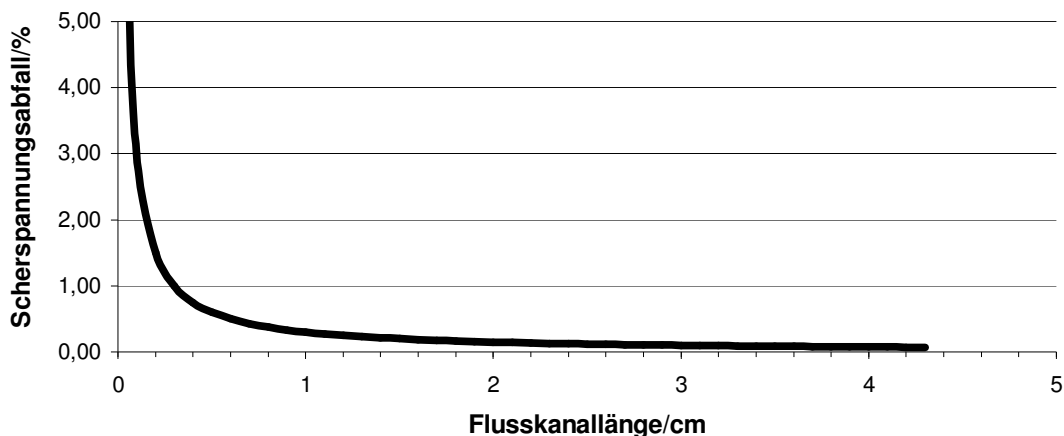


Abbildung 2-7 Scherspannungsabfall über einem Osteoblasten

Da der Durchmesser für die Osteosarkomazellen MG-63 kleiner ist als der von primären Osteoblasten, ist der Scherspannungsabfall über einer Zelle auch entsprechend geringer, so dass auf eine separate Darstellung verzichtet wird.

2.3.3 Berechnung der Scherspannung

Zur Berechnung der Scherspannung in der Gradientenflusskammer dient die folgende Formel. Jedoch sollten zur Vermeidung von Randeffekten vornehmlich Zellen in der Mitte der Flusskammer analysiert werden.

$$\tau_w = \frac{6 \mu Q}{h^2 w} \left(1 - \frac{x}{L} \right)$$

τ_w Scherspannung [dyn/cm²]

μ Viskosität [dyn s/cm²]

Q Flussrate [ml/s]

h Flusskammerhöhe [μ m]

w Eingangsweite [cm]

L Gesamtlänge [cm]

x Position x-Achse [cm]

Feste Größen für die verwendete Gradientenflusskammer sind die Gesamtlänge L mit 4,3 cm, die Eingangsweite w mit 0,4 cm und die Kammerhöhe h mit 80 μ m. Die benutzten Lösungen für die Flüssigkeitsströmung ähneln Wasser, so dass der Viskositätswert für Raumtemperatur aus einschlägigen Tabellen übernommen wurde und 0,009 dyn s/cm² betrug. Zu bestimmen waren so die Flussrate Q in oben angegebener Weise (Kapitel 2.3) und die x-Achsenposition musste zur Berechnung eingegeben werden.

Die Scherspannung wird im Folgenden in der in der Literatur üblichen Einheit [dyn/cm²] angegeben. Diese ist eine aus dem CGS-System (Zentimeter-Gramm-Sekunde-System) abgeleitete Einheit, wobei 1 dyn/cm² 0,1 N/m² oder 0,1 Pascal entspricht. Sie wird verwendet, da es sich hier um sehr kleine Kräfte handelt.

2.3.4 Flüssigkeitsströmungsprofil

Um ein gleichmäßiges Strömungsprofil zu erhalten, ist eine laminäre Strömung nötig. Um das Vorliegen einer laminären Strömung in unserer Flusskammer zu überprüfen, wurde die übliche Berechnung der Reynoldsschen Zahl herangezogen (van Kooten et al., 1992):

$$\text{Re} = \frac{\delta \times Q}{(w_x + h) \times \mu}$$

δ Dichte [g/cm³]

Q Flussrate [ml/s]

h Flusskammerhöhe [μm]

μ Viskosität [dyn s/cm²]

w_x Flusskammerbreite an der jeweiligen x-Position [cm]

Vorgegeben waren die Flusskammerhöhe h mit 80 μm , die Viskosität μ mit 0,009 dyns/cm² und die Dichte δ mit 1g/ml. Variabel hierbei sind die Flussrate Q und die jeweilige Flusskammerbreite w_x .

Für die in den Versuchen verwendeten Flussraten lagen die Werte der Reynoldsschen Zahl jeweils im Bereich unter 500 an den entsprechenden x-Positionen, so dass eine laminäre Strömung in der Flusskammer vorhanden war.

2.4 Intrazelluläre Kalziummessungen

Um nach mechanischer Stimulation der Zellen kalziumdynamische intrazelluläre Veränderungen zu messen, sind zum einen ein Bildanalyse-System und zum anderen entsprechende Kalziumfluoreszenzfarbstoffe notwendig, die nun im Weiteren vorgestellt werden sollen. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer sensitiven CCD-Kamera.

2.4.1 Quanticell-Bildanalyse-System

An das Fluoreszenzmikroskop Nikon Diaphot wurde eine Kamera zur Messung der Fluoreszenzintensitäten angeschlossen. Die Messdaten wurden mit dem auf UNIX basierenden Bildanalyse-System „Quanticell 700m Ver.2.20“ der Firma Applied Imaging, Großbritannien, gespeichert. Über das Softwareprogramm wurden sowohl die Kamera als auch der angeschlossene Monochromator zur Erzeugung der Anregungswellenlängen gesteuert.

Die digitalisierten Bilddaten wurden während der Messung in dem 128 MB-Video-RAM gespeichert und ermöglichen so eine Messung in „real-time“ bei einer Bildwiederholrate von 25 Hertz. Die Digitalisierung sorgt für Aufzeichnung des Bildes in 256 Intensitätsstufen, denen über eine Look-up-Tabelle (LUT-Konverter) eine entsprechende Farbskala zugeordnet wurde (Abbildung 2-8).

Eine Hintergrundsubtraktion wurde vor jedem Experiment durchgeführt.

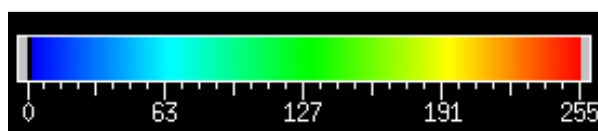


Abbildung 2-8 Farbskala der Intensitätsstufen

2.4.2 Kalziumbindende Fluoreszenzfarbstoffe

Kalzium ist intrazellulär an zahlreichen Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Um die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu messen, stehen heute die Kalzium bindenden Fluoreszenzfarbstoffe zu Verfügung. Diese gehen in ihrer Grundstruktur vom Kalziumchelator EGTA aus.

Entscheidenden Anteil sowohl an der Entwicklung dieser Fluoreszenzfarbstoffe und als auch an der Weiterentwicklung hatten Tsien et al. Anfang der 80er Jahre mit dem Farbstoff Quin-2 (Tsien et al., 1982) und den darauf basierenden Fura-2 und Indo-1 (Grynkiewicz et al., 1985). Jetzt waren kalziumdynamische Messungen möglich, wobei z.B. Fura-2 Kalziumänderungen von 5 ms folgen kann.

Generell können die Farbstoffe verschiedenartig unterteilt werden. Eine gängige Einteilung unterscheidet zwei Gruppen:

Zum einen gibt es Einzel-Wellenlängen-Farbstoffe wie Oregon Green BAPTA 488. Bei diesen erfolgt die Anregung bei einer bestimmten Wellenlänge und bei Kalziumänderungen variiert die Emissionsintensität. Diese sind jedoch anfällig für störende Einflüsse hinsichtlich des Streulichtes, der Autofluoreszenz vor allem von Pyridinnukleotiden (NADH, NADPH), der vorhandenen Farbstoffkonzentration, der Unterschiede im Zelldurchmesser, des Ausbleichens des Farbstoffes und der unterschiedlichen Farbstoffverteilung intrazellulär (Kompartimentalisierung).

Um diese Störfaktoren zu minimieren, wurden deshalb zum zweiten Verhältnisfarbstoffe (Zwei-Wellenlängen-Farbstoffe) entwickelt. Diese zeichnen sich durch spektrale Verschiebung entweder der Anregungswellenlänge (z.B. Fura-2) oder der Emissionswellenlänge (z.B. Indo-1) bei Kalziumveränderungen aus. Diese Störfaktoren können nun durch Quotientenbildung der ermittelten Intensitäten der zwei gewählten Wellenlängen nahezu weitestgehend herausgerechnet werden. Ebenfalls ist es bei den Verhältnisfarbstoffen bei entsprechenden Kalibrierungen möglich, die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu ermitteln.

Eine Methode dies auch für Einzel-Wellenlängen-Farbstoffe in annähernder Weise zu tun, wurde nun auch vorgestellt (Maravall et al., 2000). Für die

durchgeführten Experimente wurden als Einzel-Wellenlängen-Farbstoff Oregon Green BAPTA 488 und als Verhältnisfarbstoff Fura-2 verwendet, die beide im Folgenden nun charakterisiert werden sollen.

2.4.2.1 Oregon Green BAPTA 488

Oregon Green BAPTA 488 ist ein relativ neuer Farbstoff aus der Reihe der Einzel-Wellenlängenfarbstoffe. Das Excitationsmaximum liegt bei 488 nm (Brain et al., 1997), welches auch als Anregungswellenlänge gewählt wurde. Das Emissionsmaximum befindetet sich bei 523 nm (Abbildung 2-9). Ein Emissionsfilter mit 510 nm (Omega Optical, USA) mit einer gewählten Bandbreite von 20 nm wurde verwendet.

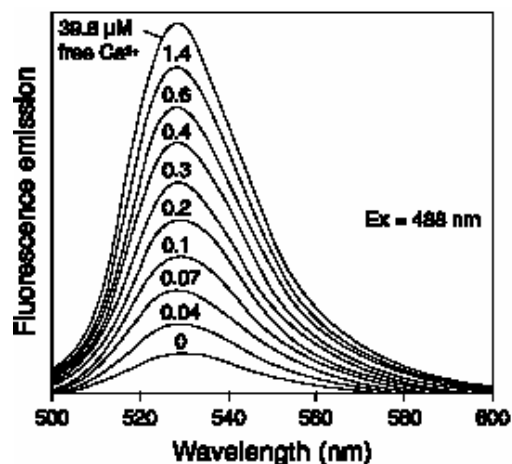


Abbildung 2-9 Emissionsspektrum von Oregon Green BAPTA 488 (Molecular Probes)

Die Abbildung 2-10 zeigt linksseitig das Ausbleichen des Farbstoffes mit einer kontinuierlichen Intensitätsabnahme bei drei verschiedenen Zellen. Zum Effekt des so genannten „photo-bleaching“ kommt noch hinzu, dass der Farbstoff über Anionentransporter in der Zellmembran wieder nach extrazellulär befördert wird. Rechtsseitig sind die gefärbten und markierten Zellen dargestellt.

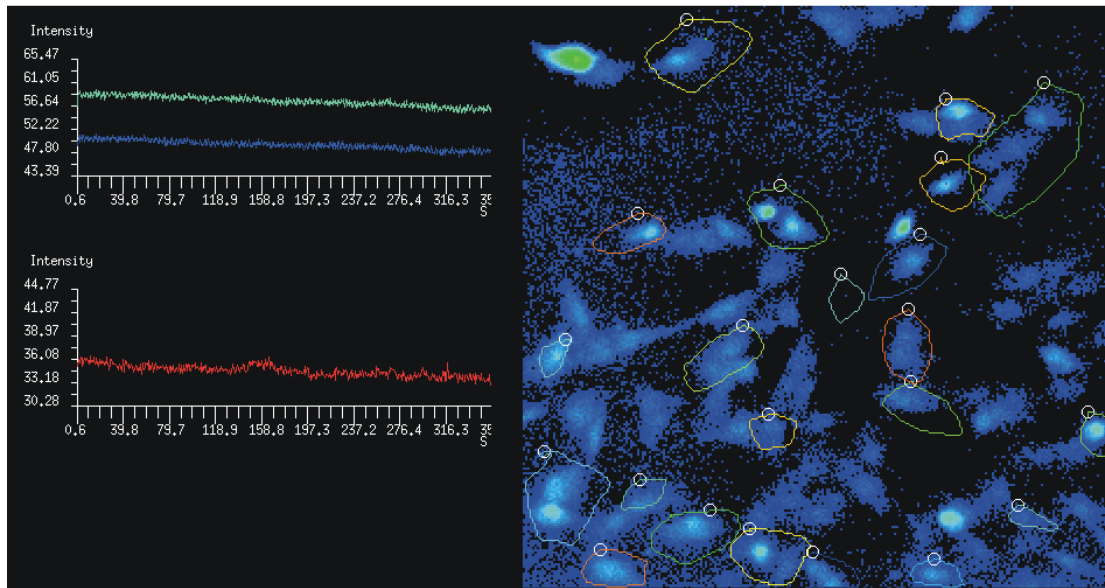


Abbildung 2-10 „Photo-bleaching“ von POB (Oregon Green BAPTA 488-Färbung)

2.4.2.2 Fura-2

Fura-2 ist der am weitesten verbreitete Zwei-Wellenlängen-Farbstoff. Dieser zeigt bei Kalziumänderungen eine Verschiebung der Absorptionseigenschaften. Abbildung 2-11 zeigt das Absorptionsspektrum für Fura-2.

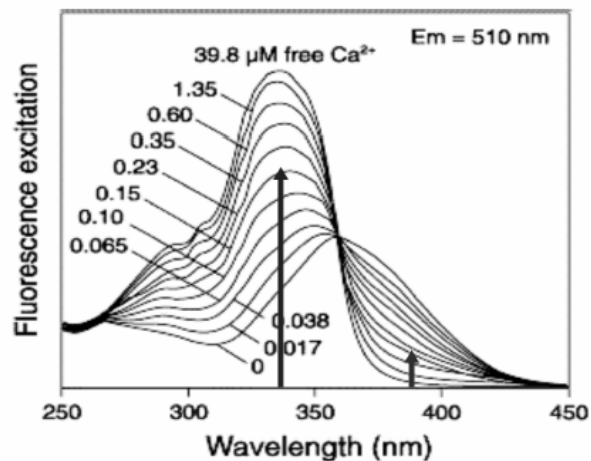


Abbildung 2-11 Absorptionsspektrum von Fura-2 (Molecular Probes)

Das Maximum der Anregungsintensitäten verschiebt sich von 363 nm für kalziumfreien Farbstoff zu 335 nm für kalziumgebundenen Farbstoff (Takahashi et al., 1999). Die Wellenlänge des Emissionsmaximums sowohl für kalziumfreien als auch für kalziumgebundenen Farbstoff liegt bei 500 nm und ist somit unabhängig von der Kalziumkonzentration. So wurde ein Emissionsfilter mit 510 nm (Omega Optical, USA) mit einer Bandbreite von 20 nm verwendet. Als Anregungswellenlängen kamen 340 nm und 380 nm (Pfeilmarkierungen in Abbildung 2-11) zum Einsatz, da bei diesen beiden gewählten Wellenlängen die Quotientenbildung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten die entsprechenden Kalziumänderungen am besten widerspiegelt. Abbildung 2-12 gibt einen typischen Messverlauf für Fura-2 wieder.

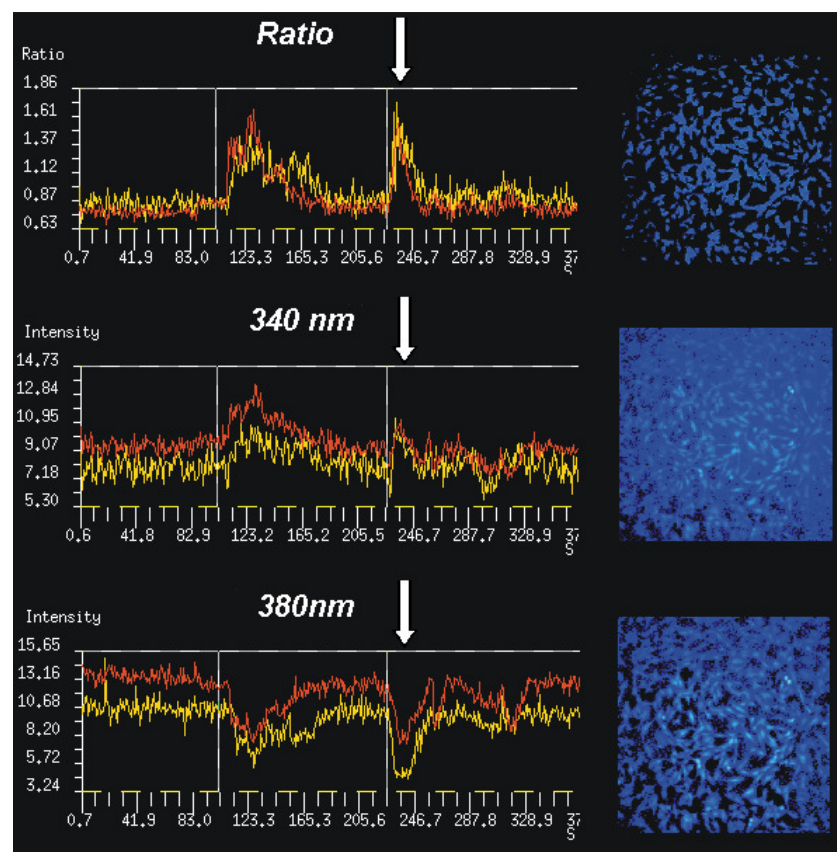


Abbildung 2-12 Darstellung einer typischen Fluoreszenzmessung primärer boviner Osteoblasten mit Fura-2-Färbung (Erläuterungen im Text)

Ein Aufnahmeintervall betrug 420 bis 1400 ms bei einem Divisor von 32 und einem Averaging von ebenfalls 32. Die Expositionszeiten betragen bei 340 nm 20 ms und bei 380 nm 7 ms.

Aufgezeichnet wurden das Ratiobild (Fluoreszenzintensität 340 nm/Fluoreszenzintensität 380 nm), Fluoreszenzintensität 340 nm und Fluoreszenzintensität 380 nm. Mit dem unter 2.4.1 beschriebenen Bildanalysesystem können einzelne Zellen markiert und ausgewertet werden. Dies erfolgt in Form einer graphischen Darstellung der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten und dem daraus errechneten Quotienten, der Ratio.

In der oberen Reihe sieht man die Ratio, in der Mitte die Emission bei 340 nm und unten die Emission bei 380 nm. Rechts sind die jeweils dazugehörigen ausgewerteten und bei den entsprechenden Wellenlängen gemessenen Zellen dargestellt. Der weiße Pfeil bei circa 235 s markiert einen intrazellulären Kalziumanstieg. Entsprechend den Absorptionseigenschaften von Fura-2 (Abbildung 2-11) erhöht sich die Fluoreszenzintensität bei 340 nm und sinkt bei 380 nm. Hieraus resultiert konsekutiv ein Anstieg der ermittelten Ratio.

Durch diese Quotientenbildung können die unter 2.4.2 erwähnten Störfaktoren herausgerechnet werden. Ratioanstiege und bei Einzel-Wellenlängen-Farbstoffen der Anstieg der Fluoreszenzintensität können jedoch auch durch Artefakte bedingt sein, so dass tatsächlich gar kein Kalziumanstieg zu verzeichnen ist. Bei den Einzel-Wellenlängen-Farbstoffen besteht keine Möglichkeit dies zu verifizieren. Jedoch kann bei Fura-2 durch Blick auf die Intensitäten bei 340 nm und 380 nm ein artefizieller Ratioanstieg ausgeschlossen werden. Zeigt sich nämlich ein Ratioanstieg, was einem Kalziumanstieg entspräche, und die Fluoreszenzintensitäten verhalten sich nicht wie in oben beschriebener Weise und in Abbildung 2-12 dargestellt, ist von einem Artefakt auszugehen.

Eine Kalibrierung zur Angabe der exakten intrazellulären Kalziumkonzentrationen für die ermittelten Ratiowerte fand nicht statt.

2.4.3 Versuchsvorbereitung und Versuchsdurchführung

2.4.3.1 Zellpräparation

Für die Versuche mussten die Zellen auf spezielle Deckgläser (60x24x 0,1 mm) ausgesetzt werden. Hierzu wurden die Deckgläser vorbehandelt und steril vorgehalten. Sie wurden über Nacht in einer Lösung mit Eisessig und 96%igem vergälltem Alkohol eingelegt. Danach erfolgten ein dreimaliges Aufkochen der Deckgläser in destilliertem Wasser und die Einzelverpackung in Alupapier mit anschließender Autoklavierung. Die sterilen Deckgläser wurden dann in passenden Multiwell-Kulturschalen platziert. Entsprechend der gewünschten Dichte zwischen 20 000 und 60 000 Zellen pro cm² wurden die Zellen dann auf die Deckgläser ausgesetzt.

Die weitere Kultivierung bis zum Tag des Experimentes erfolgte dann mit Ham's F 10 im Brutschrank in wie unter 2.2.1 beschriebener Weise. Es erfolgten regelmäßige Mediumwechsel.

2.4.3.2 Zellfärbung

Die Fluoreszenzfarbstoffe sind negativ geladen und sind in dieser Form nur schwer zellpermeabel. Daher kommen heutzutage die Acetoxymethylesterformen (AM) der Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, die so durch ihre Ladungsneutralität nach Zugabe ins Medium gut in die Zellen aufgenommen werden (Tsien, 1981). Die Esterform wird intrazellulär durch die vorhandenen Esterasen wieder hydrolysiert, wodurch eine Akkumulation des Farbstoffes intrazellulär garantiert wird und der Farbstoff in seine kalziumsensitive Form übergeht. Die optimale intrazelluläre Farbstoffkonzentration liegt zwischen 10 und 50 µM.

So wurde am Experimententag das Kultivierungsmedium entfernt und die Deckgläser vorsichtig einmal mit dem später verwendeten Medium (HBSS mit bzw. ohne FCS) des Flussversuches gewaschen. Die Zellen wurden dann mit diesem Medium und einer Farbstoffkonzentration von 3 µM bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Gleichzeitig erfolgte noch die Zugabe

von Pluronic F-127 in einer Konzentration von 0,1 %. Die Inkubation bei Raumtemperatur reduziert die Kompartimentalisierung (DiVirgilio et al., 1990) und der Zusatz von Pluronic F-127 verhindert eine Präzipitation des Farbstoffes (Poenie et al., 1986).

Nach 30 Minuten Inkubation wurde das Medium mit dem Farbstoff abgesaugt und dreimal mit frischem Medium gespült. Das Deckglas mit den gefärbten Zellen ist nun fertig für den Einbau in die Flusskammer.

2.4.3.3 Zusammenbau der Flusskammer und Versuchsbeginn

Bevor das Deckglas mit den gefärbten Zellen in die Flusskammer (Abbildung 2-3) eingebaut wurde, erfolgte zunächst die Vorbereitung des kompletten Flusssystems (Abbildung 2-1). Dies wurde entlüftet und der Einbau des Deckglases erfolgte ebenfalls „unter Wasser“ in einem mit HBSS gefüllten Behälter, so dass keine Lufteinschlüsse vorhanden waren. Die Flusskammer wurde invertiert auf dem Fluoreszenzmikroskop platziert, so dass die Zellen mit der adhären Seite nach unten zu liegen kamen.

Danach wurde durch den hydrostatischen Gradienten der beiden Flüssigkeitsbehälter zur Grundversorgung der Zellen ein minimaler Grundfluss von 1 bis 3 ml/h generiert. Die daraus resultierende Scherspannung (siehe 2.3.1.3) lag um 1 dyn/cm^2 , was zu keiner wesentlichen Stimulation der Zellen führte (Williams et al., 1994). Der Grundfluss wurde für 30 Minuten aufrechterhalten. Während dieser Zeit erfolgte bereits eine Fluoreszenzmessung hinsichtlich der Kalziumveränderungen ohne Stimulation. Gleichzeitig diente diese Aufnahme als Kontroll- und Vergleichsmessung. Vor dem eigentlichen Versuch wurden dann nochmals Fluoreszenzmessungen ohne Stimulation durchgeführt. Daran schlossen sich nahtlos nach 100 bis 150 aufgenommen Messwerten bei 678 möglichen die Fluoreszenzmessungen unter mechanischer Stimulation der Zellen mit Scherspannung unter Erhöhung der Flussrate des Flusssystems an.

2.4.3.4 Versuchsauswertung

Nach Versuchsende erfolgte mit Hilfe des Bildanalyse systems „Quanticell 700m“ die Auswertung. Als Reaktion einer Zelle auf den mechanischen Stimulus wurde ein Ratioanstieg um 10% über der Ratio ohne Stimulation bei Grundfluss definiert.

Die Auswertung der dichotomen Messgrößen (Kalziumanstieg / kein Kalziumanstieg) erfolgte bei unverbundenen Messungen mit dem χ^2 - Test. Bei verbundenen Messungen wurde der McNemar-Test angewendet.

Die geforderte Signifikanz wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt und der sich daraus ergebende kritische Wert mit 3,84 bei einem Freiheitsgrad.

2.5 Zugkraftmessungen

Für die Zugkraftmessungen von Zellen sind elastische Substratoberflächen mit linearen Eigenschaften nötig, auf die die Zellen ihre Deformationskräfte übertragen können und so messbar gemacht werden. Die Herstellung der Gele erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Pelham und Wang 1997 und 1998. Sichtbar werden die Geldeformationen durch die Aufzeichnung von fluoreszierenden Latexpartikeln im Gel und Videomikroskopie.

2.5.1 Gelbeschichtung der Deckgläser

2.5.1.1 Vorbereitung der Deckgläser

Die Deckgläser (24 x 60 x 0,1 mm) müssen für eine kovalente Bindung des Polyacrylamidgels auf dem Glas vorbehandelt werden. Hierzu werden die gereinigten Deckgläser durch die Flamme eines Bunsenbrenners geführt und danach mit einem Tropfen 0,1 N NaOH versehen. Dieser wird verteilt und es schließt sich die Lufttrocknung an. Die Deckgläser zum Bedecken werden mit 100 % Ethanol gesäubert.

2.5.1.2 Herstellung des Polyacrylamidgels

Die Elastizität des Polyacrylamidgels lässt sich durch das Verhältnis von Acrylamid zu BIS-Acrylamid modifizieren. Die Zielkonzentrationen lagen bei den erstellten Gelen für Acrylamid bei 8 % und für BIS-Acrylamid bei 0,04 %.

Bisendkonzentration/%	10%AcrylamidStammlsg./ml	1%BisStammlsg./ml	dd H2O/ml
0,04	0,8	0,04	0,16

Nun erfolgte die Zugabe der fluoreszierenden Latexpartikel nach Erwärmung im Wasserbad für zwei Minuten im Verhältnis 1:125. Es wurden Latexpartikel mit einem Durchmesser von 0,2 μm (5 μl für 1 ml) und von 0,5 μm (3 μl für 1 ml) zugesetzt. Die gelb-grünen Latexpartikel haben ihr Anregungsmaximum bei 505 nm und das Emissionsmaximum bei 515 nm. Nach guter Durchmischung im Vortexer wurde die Lösung für zehn Minuten entlüftet. Danach wurde die Polymerisation durch die Zugabe von 10 % Ammoniumpersulfat (1:200) und TEMED (1:2000) gestartet. Anschließend wurden je 100 μl des Polymerisates auf ein mit 0,1 N NaOH vorbehandeltes Deckglas pipettiert und mit einem Ethanol vorbehandelten Deckglas bedeckt. Das Polymerisat verteilte sich nun durch die Kapillarkräfte gleichmäßig zwischen den zwei Deckgläsern und es resultierte eine Gelhöhe von circa 70 μm . Das mit NaOH vorbehandelte Deckglas kam oben zu liegen, damit die Latexpartikel an die Geloberfläche sinken konnten und so in der Nähe der Zelladhäsionskontakte lagen. So fand bei 4°C im Kühlschrank die Polymerisation für vier bis zwölf Stunden statt. Danach wurden die Deckgläser getrennt und das Polyacrylamidgel haftete an dem NaOH vorbehandelten Deckglas. Diese wurden nun für 2 x 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken in 50 mM Hepes (pH = 8,5) gewaschen.

2.5.1.3 Kollagenbeschichtung

Um den Zellen eine physiologische Oberfläche auf dem Gel für die Zelladhäsion zu ermöglichen, wurden die Polyarylamidgele mit Typ-I-Kollagen beschichtet. Hierzu wurden nach Abgießen des Hepes die Gele zunächst je mit 500 μl

1 mM Sulfo-SANPAH bedeckt und für zehn Minuten im Abstand von 10 cm einer UV-Lampe (60 Watt) exponiert. Nach Waschen mit 50 mM Hepes wurde dieser Vorgang wiederholt. Das Sulfo-SANPAH wurde auf diese Weise photoaktiviert und bindet an das Polyacrylamid. Nun wurde das beschichtete Gel nochmals für eine Minute mit 50 mM Hepes gewaschen und danach mit 500 µl der Kollagenlösung für zwölf bis 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Gele wurden nun dreimal mit PBS gewaschen und dann mit PBS bedeckt und unter einer Sterilwerkbank in Multi-well-Schalen bei UV-Exposition sterilisiert für zwei Stunden. Sie konnten dann entweder direkt für Experimente verwendet oder bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

2.5.2 Zellaussaat auf die gelbeschichteten Deckgläser

Nach Sterilisation der gelbeschichteten Deckgläser konnten die Zellen nun ausgesät werden. Dies erfolgte mit einer Dichte von circa 5000/cm², so dass einzelne Zellen separat für die Zugkraftmessungen analysiert werden konnten. Zuvor wurden die Gele für 30 Minuten mit Medium bei 37°C inkubiert. Die Zelladhäsion auf dem Gel betrug ein bis zwei Tage.

2.5.3 Zusammenbau der Flusskammer und Versuchsdurchführung

Der Zusammenbau der Flusskammer mit dem gelbeschichteten Deckglas mit den Zellen erfolgte wie unter 2.4.3.3 beschrieben. Zunächst wurden die Zellen mit einem Grundfluss und einer resultierenden Scherspannung von 1 dyn/cm² für 30 Minuten versorgt. Dann erfolgten drei bis vier Fluoreszenzaufnahmen mit entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zur Ermittlung der Zugkraft der Zelle während der Zelladhäsion bei Grundfluss mit einem Aufnahmeintervall von zwei Sekunden. Daran schlossen sich die Erhöhung der Flussrate und die Scherspannungsbelastung mit 65 dyn/cm² an. Nach jeweils 60, 120 und 180 Sekunden wurden wiederum je drei bis vier Aufnahmen aufgezeichnet. Nach 180 Sekunden wurde wieder der Grundfluss eingestellt. Nach fünf Minuten

Grundfluss wurden erneut Fluoreszenzbilder der Latexpartikel und Phasenkontrastbilder der Zellen aufgezeichnet. Diese Belastungszeit der Zellen entsprach der bei den Kalziumexperimenten.

Zum Abschluss des jeweiligen Experimentes wurde die adhärente Zelle vom Gel abgelöst. Dies geschah durch Zugabe von Trypsin zum Perfusionsmedium. So wurde ein Fluoreszenzbild ohne Zelle aufgenommen, das als „Nullbild“ diente. Denn über die Veränderung der Fluoreszenzbilder mit Zelle zu diesem „Nullbild“ konnte man bei bekannten Geleigenschaften (2.5.5) auf die absolute Zugkraft der Zelle schließen. Diese Kräfte der Zelle verschieben so das Gel und somit die darin eingebetteten Latexpartikel.

Damit die Veränderungen dieser im Gel eingebetteten fluoreszierenden Latexpartikel nur einer Zelle zugeordnet werden konnte, wurden Zellen zur Analyse ausgewählt, in deren Umgebung sich im Abstand von einem halben Zelldurchmesser keine andere Zelle befand.

2.5.4 Bildanalyse und Mikroskopie

Die Flusskammer mit den Zellen wurde auf dem inversen Nikon Diaphot Fluoreszenzmikroskop platziert. Sowohl für die Fluoreszenzaufnahmen der im Gel eingebetteten Latexpartikel als auch für die Phasenkontrastaufnahmen der Zellen wurden die 40x Objektive, NA 0,85, verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit der Xillix-CCD-Kamera und wurden mit dem Software-Programm ImageProPlus© aufgezeichnet. Ein Bild bestand aus 1306 x 1032 Pixel, wobei ein Pixel 0,276 µm entsprach.

Bei den Fluoreszenzaufnahmen wurde entsprechend den Fluoreszenzeigenschaften der Latexpartikel ein dichroischer Spiegel mit 505 nm (Omega Optical, DRLPXR) in den Strahlengang eingebaut, ebenso ein Exzitationsfilter mit 450-490 nm und ein Emissionsfilter mit 520-560 nm. Als Anregungslichtquelle diente eine Kombilight-Lampe (Fa. Wolf).

2.5.5 Charakterisierung des Gels

Für die Bestimmung der Elastizität des Polyacrylamidgels wurde eine auf der Hertz-Theorie basierende Messmethode angewendet (Radmacher et al., 1992). Hierzu wurde mit einem Rasterkraftmikroskop, an dessen Spitze des Cantilevers sich eine kleine Kugel mit einem Durchmesser zwischen 2 und 10 μm befand (Struckmeier et al., 2001), Druck auf das Polyacrylamidgel ausgeübt.

Die Impression der Kugel auf das Gel lag zwischen 0,5 und 1,5 μm . Das Young's Modul wurde mit der Gleichung $Y = 3(1 - \nu^2)f / 4d^{3/2}r^{1/2}$ berechnet, wobei f die ausgeübte Kraft auf dem Gel war, d die Impression, r der Radius der Kugel und ν die Poisson-Ratio, welche gleich 0,3 gesetzt wurde (Li et al., 1993). Die Werte lagen um 4400 N/m^2 für die verwendeten Polyacrylamidgelle.

2.5.6 Kalkulation der Zugkraft

Die Berechnung der aufgetretenen Zugkräfte der Zellen erfolgte nach Dembo und Wang, 1999. Diese nutzten die Bayesian-Methode zur Kalkulation von Zugkräften für vorbestimmte Knotenpunkte innerhalb der Zellbegrenzungen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung.

Hierzu wurden in verschiedenen Phasen des Experimentes Fluoreszenzaufnahmen der im Polyacrylamidgel eingebetteten Latexpartikel und Phasenkontrastaufnahmen der Zelle gemacht (Abbildung 2-13).

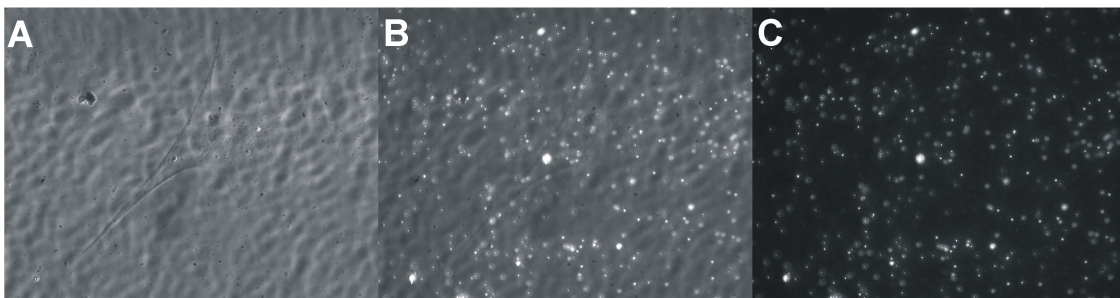


Abbildung 2-13 Verschiedene Aufnahmen für die Zugkraftmessung

Phasenkontrastaufnahme eines POb (A) mit dazugehöriger Fluoreszenzaufnahme der Latexpartikel (C). Bild B zeigt das Fluoreszenzbild mit übergeblendeter Phasenkontrastaufnahme.

Die auf dem Gel adhären Zellen übten Adhäsions- und Deformationskräfte aus, die sie auf das Gel übertrugen. Hierdurch wurden kleine Bewegungen der Latexpartikel verursacht.

Das veränderte Fluoreszenzmuster der Latexpartikel, die Koordinaten der Zellbegrenzungen und die bekannten Geleigenschaften (Kapitel 2.5.5) flossen in die Berechnung der Zugkräfte ein. Diese erfolgten mit dem LIBTRC-Softwareprogramm von Professor Dembo (Boston, MA) auf Linux-Basis (Red Hat Linux 7.2).

Die von den Zellen ausgeübten Zugkräfte auf das Gel wurden als Vektorenmatrix dargestellt (Abbildung 2-14).

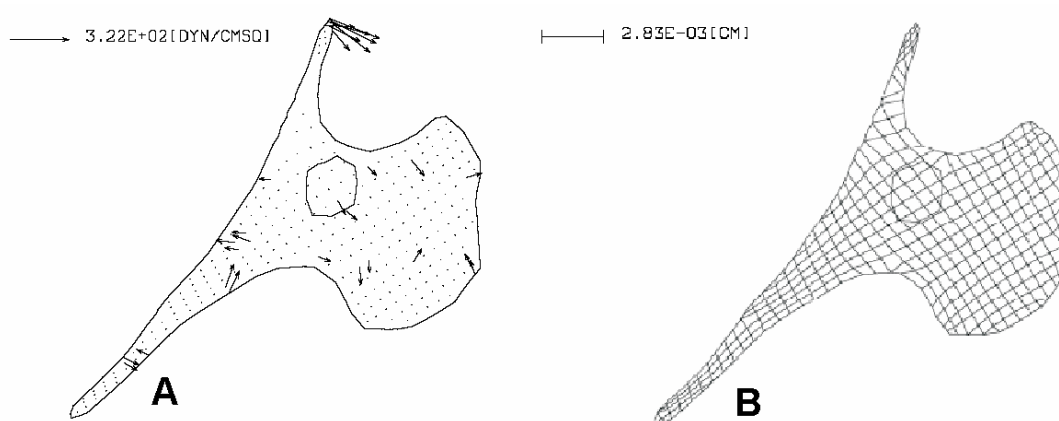


Abbildung 2-14 Vektorenmatrix der berechneten Zugkräfte der Zelle

Die berechneten Zugkräfte des POB aus Abbildung 2-13 sind nun als Vektorenmatrix dargestellt (A). Das Softwareprogramm benötigt zur Berechnung den Zellumriss und ermittelt durch ein Gitternetz über der Zelle mit entsprechenden Knotenpunkten (B) die Verschiebung der Fluoreszenzpartikel in Bezug auf diese Knotenpunkte.

2.5.7 Versuchsauswertung

Wie schon unter 2.5.3 beschrieben wurden so je drei bis vier Aufnahmen bei Grundfluss, nach 60, 120 und 180 Sekunden Belastung mit Scherspannung und nach erneuter Rückkehr zum Grundfluss gemacht. Für die ermittelten Werte wurde der Mittelwert mit der Standardabweichung berechnet.

Zur statistischen Analyse, ob sich bei Belastung mit Scherspannung die Zugkräfte der Zelle signifikant zum Grundfluss änderten, wurde der t-Test für unverbundene Stichproben eingesetzt. Für den zweiseitigen Test wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ gewählt. Der kritische T-Wert lag je nach Anzahl der Messwerte (Freiheitsgrad f zwischen 4 und 6) bei 2,447 bis 2,776.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung der Osteoblasten durch Parathormon-Stimulation

Durch die periostale Auswaschmethode (siehe Kapitel 2.2.2) zur Gewinnung primärer boviner Osteoblasten entstand eine Mischkultur mesenchymaler Zellen. Zum Nachweis der Gewinnung von Osteoblasten erfolgte die Phänotypisierung routinemäßig jeder Charge in unserem Labor. Zum einen erfolgte der immunzytochemische Nachweis spezifischer osteoblastärer Proteine und zum anderen erfolgte die Stimulation der Zellkultur durch Parathormon (Fragment 1-34).

Die Osteoblasten besitzen PTH-Rezeptoren, die über die Phospholipase C die second-messenger Diacylglycerin und Inositoltrisphosphat bilden (Civitelli et al., 1988). Durch IP₃ kommt es zur Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern.

Für die Experimente wurden die POb in einer Dichte von circa 20 000 Zellen/cm² auf einem Deckgläschen in Vollmedium ausgesät. Bei Erreichen von Subkonfluenz nach zwei bis drei Tagen erfolgte die Farbstoffbeladung der Zellen mit Fura-2 AM wie unter 2.5.2 beschrieben. Die Zellen wurden nun in eine nach oben offene Zellkammer mit HBSS als Medium eingebaut. Als Kontrollzellen dienten Hautfibroblasten. Zunächst wurde die Grundratio aufgenommen und daran direkt anschließend erfolgte die Zugabe von PTH (1-34, 50 ng/ml). Wie in Abbildung 3-1 dargestellt, zeigten zahlreiche Zellen einen Kalziumanstieg, so dass die Osteoblasten phänotypisiert werden konnten.

Ausgewertet wurden in einem Experiment zwischen 60 und 100 Zellen, wobei der Anteil der Zellen, die auf die PTH-Stimulation mit einem Kalziumanstieg reagierten, zwischen 92% und 98% lag.

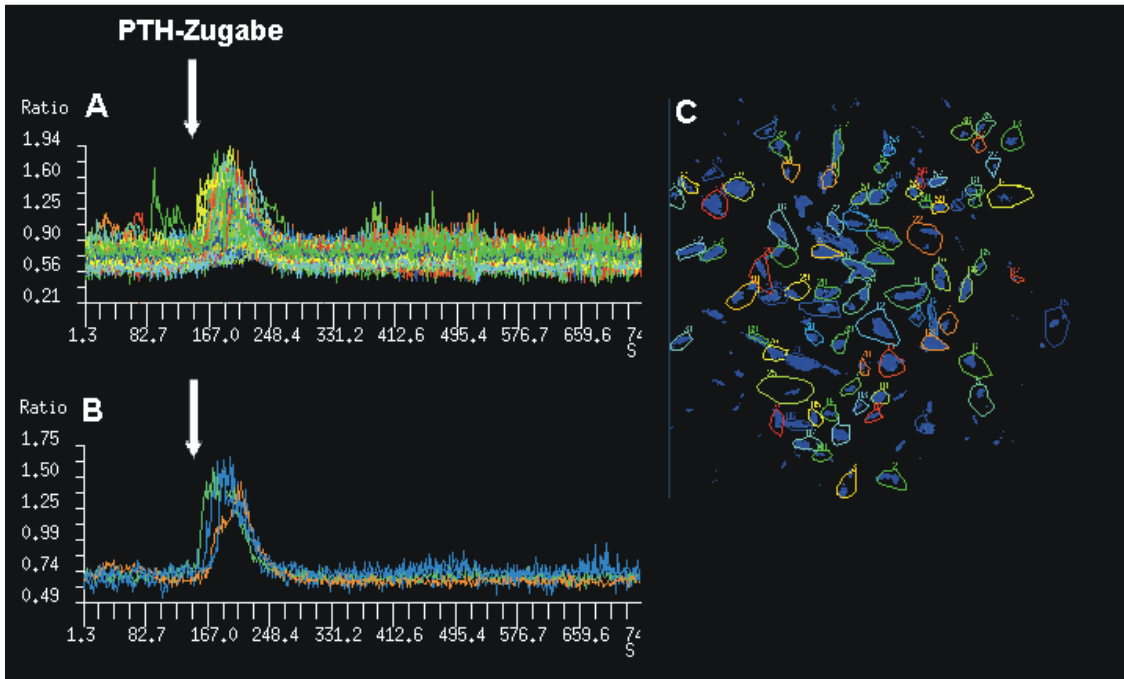


Abbildung 3-1 PTH-Stimulation einer Knochenzellkultur

Nach PTH-Zugabe zeigt sich ein intrazellulärer Kalziumanstieg bei zahlreichen Zellen (A), die mit Fura-2 AM gefärbt wurden (C, mit Markierung).

Bild B stellt die Kalziumdynamik für drei einzelne Zellen dar. Die Skalierung der y-Achse wurde zur besseren Darstellung dem größten Ratiowert angepasst.

3.2 Scherspannungsgradient der Usami-Flusskammer

Die neu entwickelte Gradientenflusskammer von Usami bietet zahlreiche Vorteile, die schon unter 2.3.1 dargestellt wurden. Zur Überprüfung der vorhandenen Gradienteneigenschaften der Flusskammer wurden die Zellen an unterschiedlichen x-Positionen des Flusskanals der gleichen Flussrate ausgesetzt. Hierbei wurden auch Scherspannungen oberhalb des angenommenen physiologischen Bereiches von 70 dyn/cm² generiert.

Die Zellen wurden in üblicher Weise mit Fura-2 AM beladen und invertiert in die Flusskammer eingebaut. Nach dem Grundfluss von 30 Minuten erfolgten

zunächst die Aufnahmen bei der x-Position mit der kleineren Scherspannung am Anfang der Flusskammer. Danach wurden die Messungen bei der x-Position mit der größeren Scherspannung am Ende der Flusskammer durchgeführt, bei jeweils gleicher Flussrate.

Zur Anwendung kam der Chi-Quadrat-Test für unverbundene Stichproben bei dichotomem Merkmal (Kalziumanstieg / kein Kalziumanstieg). Die kritische Grenze liegt bei 3,84 bei einer Signifikanz von $\alpha = 0,05$. Der Testwert χ^2 befindet sich unter den Tabellen. Die Flussrate ist in den Tabellen oben links angegeben, die x-Position jeweils in den Zeilen.

Zeigen sich hierbei unterschiedliche Verhältnisse in der Stimulation der Zellen hinsichtlich einer Kalziumantwort? Beinhaltet die spezielle Flusskanalform der Usami-Kammer also einen Scherspannungsgradienten?

Flussrate: 560 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=1,3 cm)	18	62	80
Zellen (Flusskanalende; x=3,1 cm)	30	40	70
Summe	48	102	150

Testwert χ^2 :

7,11

Flussrate: 170 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=0,9 cm)	0	65	65
Zellen (Flusskanalende; x=3,3cm)	9	76	85
Summe	9	141	150

Testwert χ^2 :

7,32

Flussrate: 250 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=0,9 cm)	6	59	65
Zellen (Flusskanalende; x=3,3cm)	15	70	85
Summe	21	129	150

Testwert χ^2 :

2,17

Flussrate: 230 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=1,6 cm)	6	59	65
Zellen (Flusskanalende; x=3,5 cm)	30	35	65
Summe	36	94	130

Testwert χ^2 :

22,13

Flussrate: 67 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=1,3 cm)	0	82	82
Zellen (Flusskanalende; x=2,5 cm)	1	88	89
Summe	1	170	171

Testwert χ^2 :

0,93

Flussrate: 120 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=1,3 cm)	0	82	82
Zellen (Flusskanalende; x=2,5 cm)	2	87	89
Summe	2	169	171

Testwert χ^2 :

1,86

Flussrate: 178 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=1,3 cm)	1	81	82
Zellen (Flusskanalende; x=2,5 cm)	7	82	89
Summe	8	163	171

Testwert χ^2 :

4,23

Flussrate: 260 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=1,3 cm)	6	76	82
Zellen (Flusskanalende; x=2,5 cm)	16	73	89
Summe	22	149	171

Testwert χ^2 :

4,33

Flussrate: 120 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=1,3 cm)	4	56	60
Zellen (Flusskanalende; x=2,6 cm)	11	47	58
Summe	15	103	118

Testwert χ^2 :

4,02

Flussrate: 178 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=0,6 cm)	1	48	49
Zellen (Flusskanalende; x=2,9 cm)	7	42	49
Summe	8	90	98

Testwert χ^2 :

4,90

Flussrate: 260 ml/h	Kalziumanstieg	Kalziumanstieg	Gesamt
	ja	nein	
Zellen (Flusskanalanfang; x=0,6 cm)	2	47	49
Zellen (Flusskanalende; x=2,9 cm)	11	38	49
Summe	13	85	98

Testwert χ^2 :

7,18

Bei den elf Versuchen zeigen neun eine signifikante Zunahme der Zellen mit Kalziumanstieg an der x-Position mit der größeren Scherspannung bei gleicher Flussrate. So ist von einer unterschiedlichen Scherspannung an den überprüften Stellen auszugehen. Dies ist durch die spezielle Flusskammerform bedingt, da die übrigen Parameter und vor allem die Flussrate konstant gehalten wurden. Die Beschreibung der Gradienteneigenschaft kann durch die durchgeführten Experimente nur qualitativ und nicht quantitativ erfolgen.

3.3 Artificielle Kalziumfluoreszenzmessungen

Im Rahmen der Versuche und im speziellen bei der Versuchsauswertung können artifizielle Fluoreszenzmessungen auftreten. Diese können einen intrazellulären Kalziumanstieg vortäuschen oder es tritt ein plötzlicher Abbruch des Fluoreszenzsignals auf. Hierdurch sind die gemessenen Fluoreszenzwerte stets kritisch zu hinterfragen und bei der Interpretation zu berücksichtigen. Es konnten drei mögliche Ursachen festgestellt werden.

3.3.1 Detachment von Zellen

Während des Experimentes können sich nicht ausreichend adhärenente Zellen vom Deckglas ablösen (Detachment). Dabei bricht das Fluoreszenzsignal abrupt ab. Dies trat nur sehr vereinzelt auf.

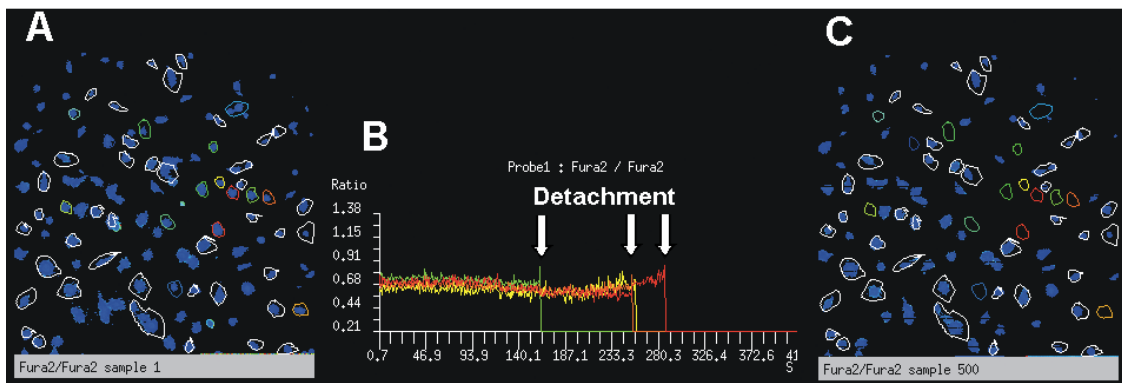


Abbildung 3-2 Detachment von Zellen vom Deckglas

Zellen am Versuchsbeginn (A) und Versuchsende (C). Farblich sind die Zellen markiert, die sich vom Deckglas abgelöst haben. Das Fluoreszenzsignal bricht plötzlich ab (B).

3.3.2 Defokussierung der Zellebene

Im Laufe des Versuches konnte es zu einem Defokussieren der Zellebene kommen. Am ehesten durch geringe Bewegungen des Objektivs. Dies hat zur Folge, dass sich die Fluoreszenzintensitäten, die bei den Anregungswellenlängen von 340 nm und 380 nm gemessen wurden, verringerten. Da sich beide Intensitäten nicht proportional änderten, veränderte sich der Quotient (Intensität 340 nm / Intensität 380 nm) zugunsten der Intensität von 340 nm. Dies zeigte im errechneten Quotienten, dem Ratiowert, dann einen fiktiven Kalziumanstieg an. Zur Überprüfung eines tatsächlichen Kalziumanstieges wurden dann neben der Ratio die Intensitäten der einzelnen Wellenlängen betrachtet. Zeigten beide einen Abfall bei gleichzeitigem Anstieg der Ratio war von einem Artefakt auszugehen (siehe hierzu auch 2.4.2.2).

3.3.3 Luftblasen im Perfusionssystem

Wie unter 2.5.3 bereits beschrieben wurde das Schlauchsystem entlüftet und der Zusammenbau der Flusskammer erfolgte „unter Wasser“ in einer mit HBSS gefüllten Petrischale. So befanden sich nahezu in allen Experimenten keine Lufteinschlüsse mehr im System.

Luftblasen im Flusskanal stören das Experiment erheblich, da es zu einer maximal mechanischen Deformation der Zellen mit Zellschädigung und Ablösung der Zellen kommt (Abbildung 3-3).

Der Ratioanstieg, der durch Luftblasen hervorgerufen wurde, ergab maximale Werte bis über 4,0. Diese konnten durch physiologische Stimulation nicht erreicht werden. Des Weiteren zeigten alle Zellen einen zeitgleichen Ratioanstieg, was ebenfalls charakteristisch für eine artifizielle Stimulation durch Luftblasen war, gefolgt von einem Detachment.

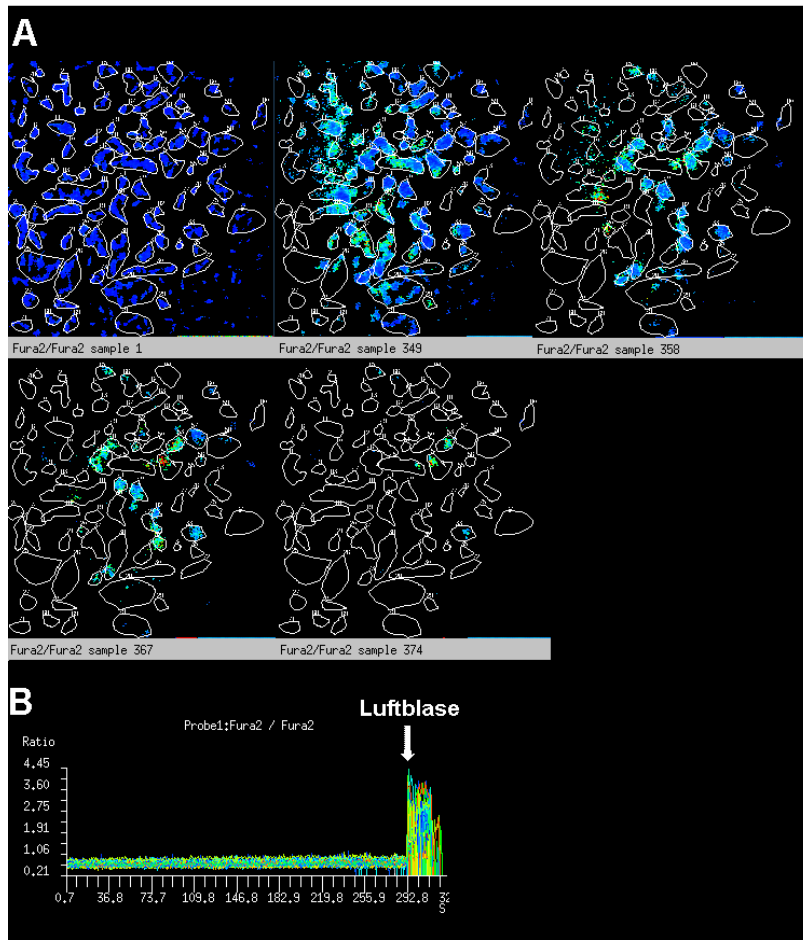


Abbildung 3-3 Mechanische Zellschädigung durch Luftblasen im Perfusionssystem

Sequenzaufnahmen (A): Versuchsbeginn (1), Zellschädigung durch Luftblase und Kalziumanstieg (Bild 349), Detachment (Bilder 358, 367, 374). Es wurden Ratiowerte bis über 4,0 gemessen (B).

3.4 Kalziummessungen an primären bovinen Osteoblasten

Nach Beladen der Osteoblasten mit dem Fluoreszenzfarbstoff erfolgte der Zusammenbau der Flusskammer wie unter 2.5.3 beschrieben. Das Medium, das während des Versuches benutzt wurde, war nach Durchführung der Vorversuche HBSS. Es erfolgte die Umstellung auf ein FCS-freies Medium mit Wegfall der Hormone und Zytokine im FCS, so dass die mechanisch induzierte Zellantwort im Vordergrund stand.

3.4.1 Versuchsmedium mit 2% FCS

Bei den Experimenten mit 2%igem FCS-Anteil im Versuchsmedium zeigten sich ausgeprägte intrazelluläre Kalziumoszillationen zahlreicher Zellen bei dem Grundfluss mit einer resultierenden Scherspannung von 1 bis 3 dyn/cm². Diese Oszillationen waren ebenfalls zu beobachten, wenn die Zellen nicht in eine Flusskammer, sondern in eine nach oben offene Kammer ohne Fluss eingebaut wurden (Abbildung 3-4).

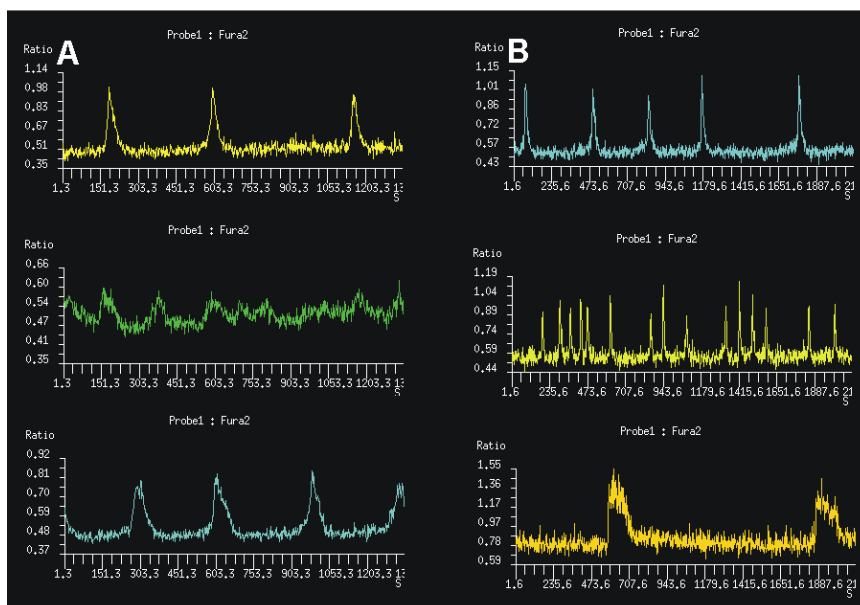


Abbildung 3-4 Kalziumoszillationen von POB in Medium mit 2% FCS

Diese Oszillationen waren sowohl bei POB in einer Standardzellkammer ohne Fluss (A) als auch in der Flusskammer mit einem Grundfluss mit 1 bis 3 dyn/cm² zu beobachten (B).

Die Kalziumoszillationen der einzelnen Zellen sind sowohl von der Frequenz als auch vom Verlauf und Form der Oszillation für jede Zelle separat betrachtet sehr ähnlich. Man kann von einem der Zelle eigenen Oszillationsmuster sprechen, das von Prentki als „calcium-fingerprint“ bei Untersuchungen an Pankreas-beta-Zellen bezeichnet wurde (Prentki et al., 1988).

Diese Kalziumoszillationen zeigten sich nicht bei Verwendung eines Mediums ohne FCS. Während des Grundflusses vor mechanischer Belastung durch Scherspannung zeigten die Zellen ein konstantes Kalziumniveau intrazellulär. Während des Grundflusses zeigten im gesamten Aufnahmeintervall von bis zu 1000 s nur maximal 5% der Zellen einen Kalziumanstieg. Die Stimulationszeit lag hingegen um 200 s.

Durch die zahlreichen Oszillationen bei Verwendung von FCS-haltigem Medium ist die Auswertung hinsichtlich der reinen mechanischen Stimulation durch Scherspannung mit intrazellulärem Kalziumanstieg für die einzelne Zelle erschwert. Trotzdem zeigt sich bei der Analyse über das gesamte aufgenommene Fluoreszenzbild der Zellen nach Beginn der Exposition gegenüber Scherspannung ein intrazellulärer Kalziumanstieg (Abbildung 3-5).

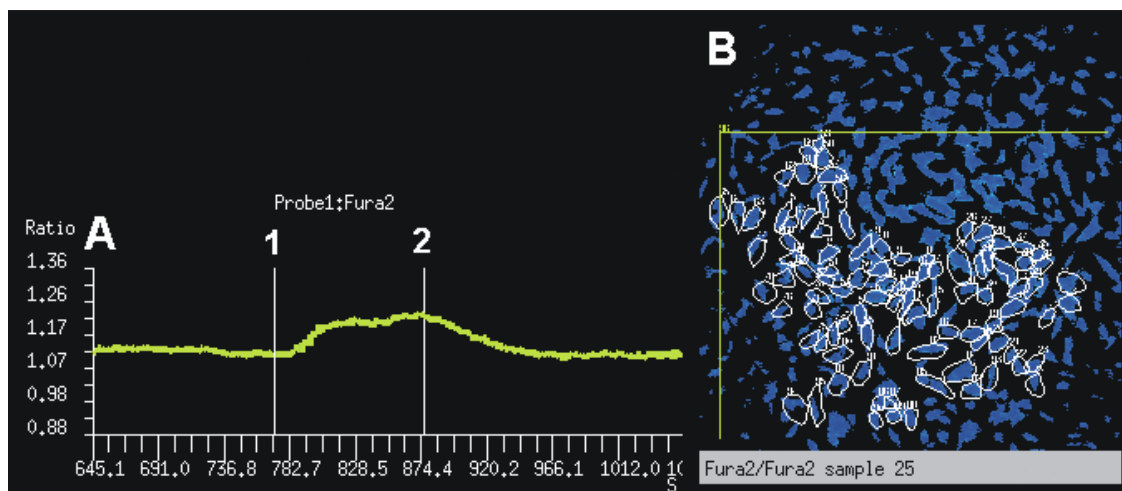


Abbildung 3-5 Stimulation von POB mit 25 dyn/cm² (Medium mit 2% FCS)

Die Analyse erfolgt nicht für eine Zelle, sondern über einen Zellbereich (B). Nach dem Grundfluss mit 1 dyn/cm² erfolgt die Belastung bei 770s mit 25 dyn/cm² bis 875s (A). Ab circa 790s, also 20s nach Stimulationsbeginn, zeigt sich ein Anstieg der Kalziumkonzentration mit einer Plateauphase bis zur Rückkehr zum Grundfluss (2). Danach zeigt sich ein Kalziumrückgang wieder hin zum Ausgangsniveau.

Abbildung 3-6 gibt den Verlauf der Kalziumdynamik nochmals in Sequenzbildern wieder.

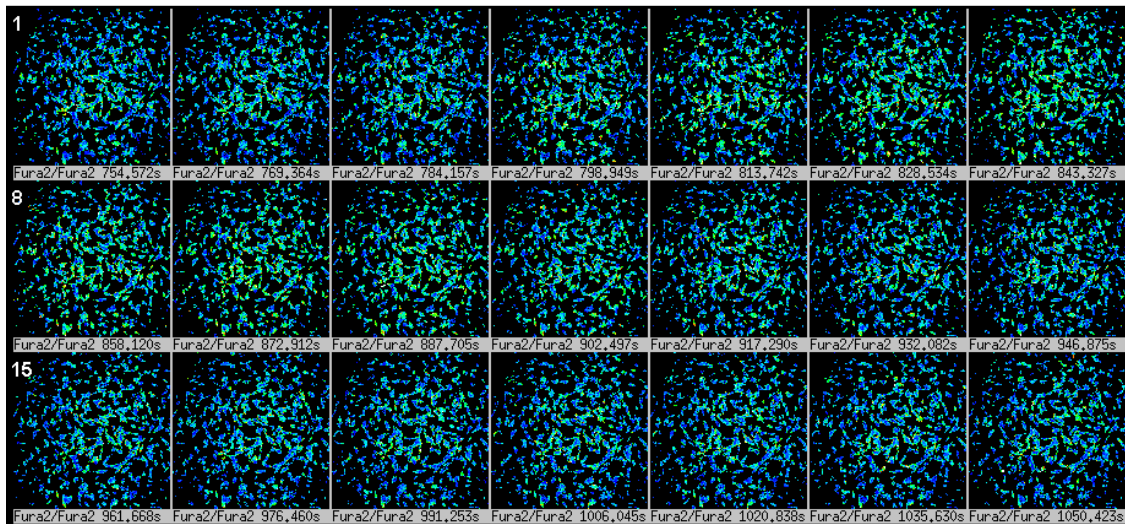


Abbildung 3-6 Sequenzbilder (Ratiobild) der Stimulation von POB mit 25 dyn/cm²

Belastungsbeginn bei Bild 2 (770s), Anstieg der Fluoreszenzintensität ab Bild 4 (799s), Maximum bei Bild 9 (873s) und Abfall ab Bild 11 (902s).
(Bildnummern von oben links fortlaufend horizontal nach unten rechts)

3.4.2 Mangan-Quenching-Experimente

Zur weiteren Differenzierung, ob das freie intrazelluläre Kalzium bei diesen Oszillationen aus dem endoplasmatischen Retikulum oder durch plasmamembranständige Kalziumkanäle aus dem Extrazellulärraum stammt, erfolgten Experimente mit kalziumfreiem Medium.

HBSS wurde ohne CaCl₂ angesetzt und stattdessen erfolgte die Zugabe von Manganchlorid in einer Konzentration von 0,1 mM. Ebenfalls war noch 2% FCS in diesem Versuchsmedium. Der Grundfluss erzeugte eine Scherspannung von 1 dyn/cm².

Mangan passiert über die gleichen Kationenkanäle wie Kalzium die Plasmamembran. Befindet sich nun Mangan intrazellulär in mit Fura-2 gefärbten Zellen, bindet Mangan an den Farbstoff mit hoher Affinität und sorgt

über eine Konformationsänderung für eine Reduktion der Fluoreszenzintensität (englisch: Quenching).

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich trotz des Fehlens von extrazellulärem Kalzium eine fortbestehende intrazelluläre Kalziumoszillation bei den Osteoblasten (Abbildung 3-7, A). So kommen diese Oszillationen durch Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern zu Stande. Gleichzeitig zeigte sich ein Quenching der Fluoreszenzintensität durch den Einstrom von Mangan von extrazellulär in die Zellen (Abbildung 3-7, B).

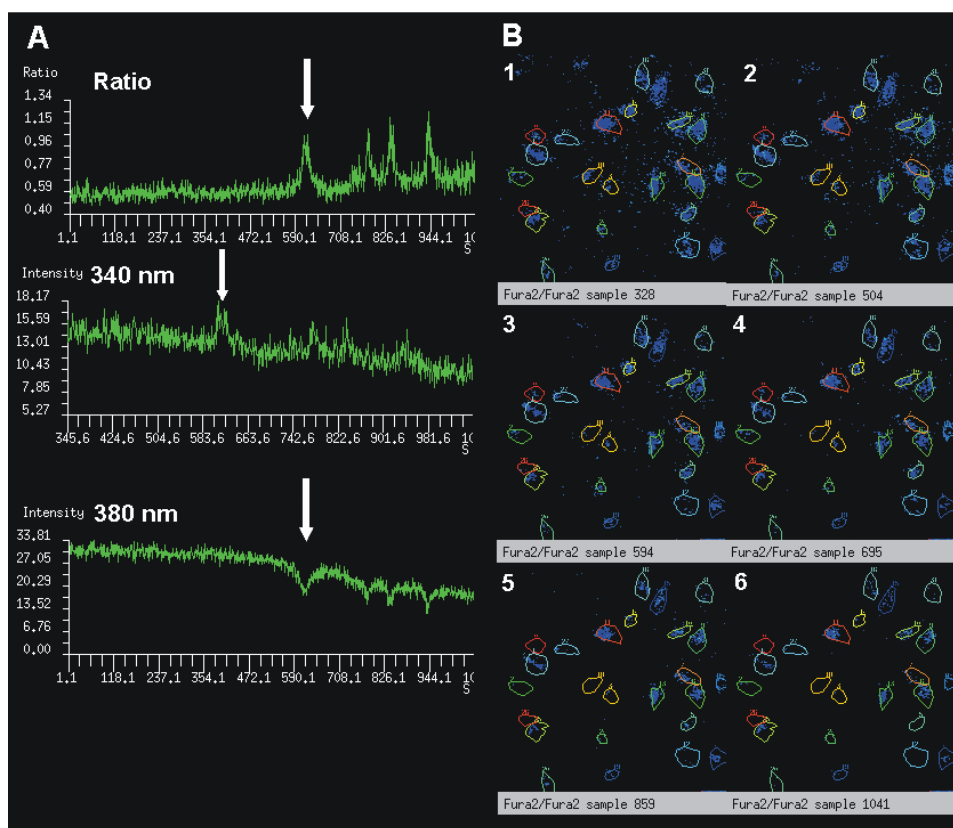


Abbildung 3-7 Mangan-Quenching bei kalziumfreiem Versuchsmedium mit 2% FCS

Trotz des Fehlens von extrazellulärem Kalzium zeigten sich Oszillationen (Pfeile, A). Der Graph von der Anregung bei 340 nm beginnt erst bei 345s und steht daher nach links versetzt. Die Fluoreszenz der Zellen nimmt durch den Manganestrom kontinuierlich ab (Bilder 1-6, B) und auf Bild 6 ist nahezu keine Fluoreszenz mehr zu erkennen. Die Fluoreszenzintensitäten nehmen durch das Mangan-Quenching sowohl bei 340 nm als auch bei 380 nm ab. Der Anstieg der Ratio ab circa 700s ist durch die Verschiebung des Quotienten zugunsten von 340 nm zu erklären und ist keine reale Kalziumerhöhung (siehe auch Kapitel 2.4.2.2).

Für die weiteren Versuche erfolgte so die Verwendung von FCS-freiem Medium.

3.4.3 Einfachbelastung

Zur Überprüfung, ob nach mechanischer Belastung von POb kalziumabhängige Signaltransduktionskaskaden initiiert werden, erfolgte nach dem Einbau des Deckgläschens mit den gefärbten Zellen (siehe hierzu auch Kapitel 2.5) zunächst ein Grundfluss. Dieser stellt die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sicher und betrug im Mittel 30 Minuten, so dass sich die Zellen an das neue Milieu gewöhnen konnten (Abbildung 3-8).

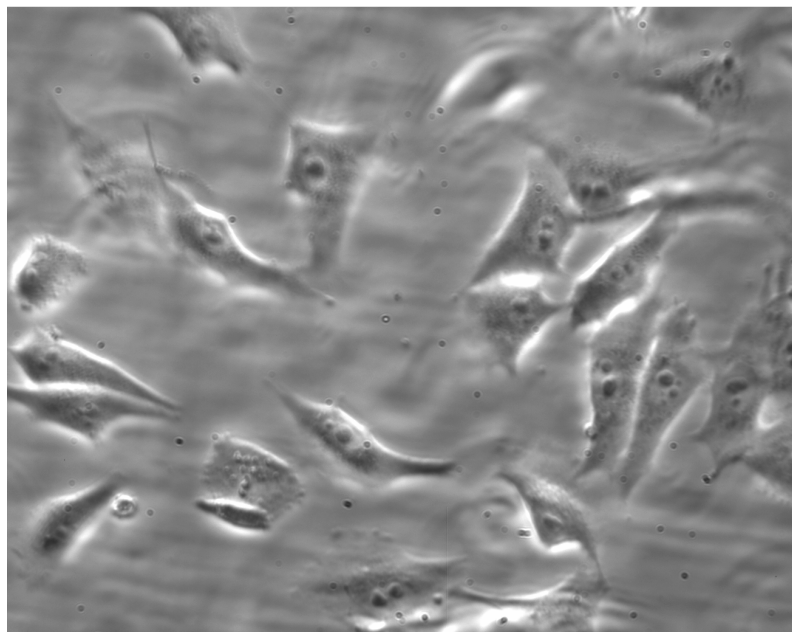


Abbildung 3-8 POb (Grundfluss 1 dyn/cm²)

(Phasenkontrastaufnahme, 20x Objektiv)

Danach erfolgte das eigentliche Experiment, indem zunächst bei weiter bestehendem Grundfluss und einer resultierenden Scherspannung von circa 1 dyn/cm² die Fluoreszenzaufnahmen mit dem Bildanalysesystem aufgezeichnet

wurden. Dann erfolgte die mechanische Belastung der Zellen durch Erhöhen der Flussrate für einen definierten Zeitraum (100 Bilder bei einer Aufnahmeintervalleinstellung von 1400 ms). Hieran schloss sich die Rückkehr wieder zum Grundfluss an (Abbildung 3-9). Als Kontrolle dienten die Kalziumfluoreszenzmessungen vor Flusserhöhung.

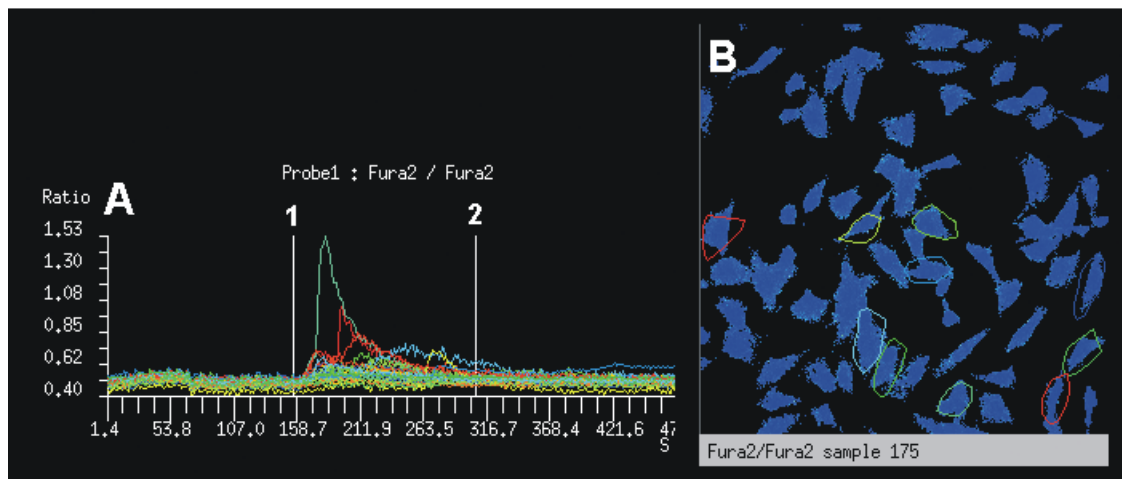


Abbildung 3-9 Intrazellulärer Kalziumanstieg bei Stimulation mit 45 dyn/cm²

Die Zellen, die mit einem Kalziumanstieg reagieren, sind markiert (B). Die einzelnen Ratioverläufe zeigen einen Anstieg (A) nach Flusserhöhung (1) und damit Scherspannungsbelastung der Zellen. Marker 2 gibt die Rückkehr zum Grundfluss an.

So kam zur Versuchsauswertung der McNemar-Test für verbundene Stichproben zur Anwendung. Die Werte der einzelnen Experimente mit gleicher Belastung wurden addiert und einer gemeinsamen Auswertung zugeführt. Zum Vergleich der stimulierten Zellen zwischen den einzelnen Scherspannungen wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet.

Pro Scherspannungswert wurden drei bis zehn Experimente durchgeführt, wobei je zwischen 28 und 89 Einzelzellen analysiert wurden, um einen potenziellen Kalziumanstieg zu messen. Als Kalziumanstieg wurde ein

Ratioanstieg um 10% über der durchschnittlichen Ratio bei Grundfluss definiert (Abbildung 3-10).

Zur Verifizierung, ob die Dauer des Zellwachstums auf dem Deckgläschen die Mechanosensitivität gegenüber Scherspannungen beeinflusst, erfolgten Messungen am zweiten, dritten, vierten und fünften Tag nach Aussaat.

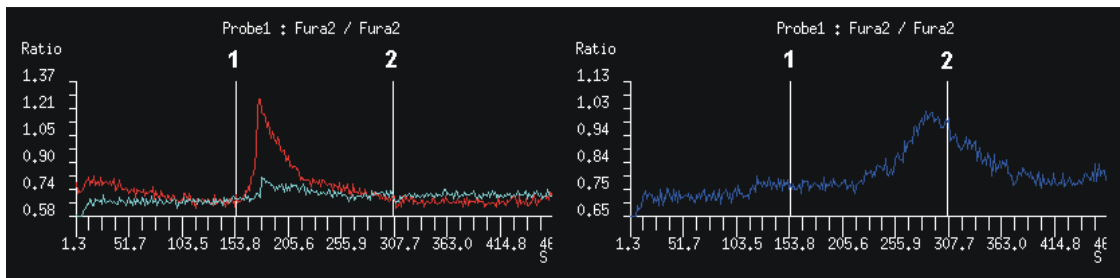


Abbildung 3-10 Unterschiedlicher Kalziumanstieg bei drei einzelnen POB

Nach Flusserhöhung (1) mit einer resultierenden Scherspannung von 65 dyn/cm² stellen sich differierende Verläufe des intrazellulären Kalziumanstiegs dar.

3.4.3.1 5-tägige Zelladhäsion auf Deckglas

Die nachfolgenden Übersichtstabellen geben die Zellen mit Ratioanstieg bei mechanischer Belastung mit 25, 45 und 65 dyn/cm² mit dazugehörigen Kontrollzellen mit Ratioanstieg wieder. Unter den jeweiligen Tabellen befindet sich der Testwert χ^2 . Signifikanz ($p=0,05$) liegt bei einem Wert von 3,84 vor.

Für alle drei Scherspannungswerte zeigen sich signifikante Anstiege in der Zahl der Zellen mit Kalziumanstieg bezogen auf die Kontrollzellen mit Grundfluss bei circa 1 dyn/cm². Sofortige Kalziumanstiege innerhalb von ms nach Stimulationsbeginn konnten nicht gemessen werden.

<u>Scherspannung</u> <u>(dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg</u> <u>(Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen</u> <u>(Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	10	227	4,4
25	37	227	16,3

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	10
c	ja	nein	37

Testwert χ^2 : 15,51

<u>Scherspannung</u> <u>(dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg</u> <u>(Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen</u> <u>(Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	9	231	3,9
45	61	231	26,4

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	9
c	ja	nein	61

Testwert χ^2 : 38,63

<u>Scherspannung</u> <u>(dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg</u> <u>(Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen</u> <u>(Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	4	143	2,8
65	36	143	25,2

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	4
c	ja	nein	36

Testwert χ^2 : 25,60

Bei 25 dyn/cm² reagieren 16,3%, bei 45 dyn/cm² 26,4% und bei 65 dyn/cm² 25,2% der Zellen. Beim Vergleich untereinander zeigt sich eine signifikante Zunahme der Zellen mit Kalziumanstieg bei einem Scherspannungszuwachs

von 25 auf 45 dyn/cm² (p=0,01). Von 45 auf 65 dyn/cm² zeigt sich keine signifikante Zunahme.

3.4.3.2 4-tägige Zelladhäsion auf Deckglas

Hierbei erfolgten die mechanischen Belastungen mit 25, 65 und im hyperphysiologischen Bereich mit 95 dyn/cm².

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	9	249	3,6
25	15	249	6,0

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	9
c	ja	nein	15

Testwert x²: 1,50

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	18	551	3,3
65	84	551	15,2

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	18
c	ja	nein	84

Testwert x²: 42,71

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	7	171	4,1
95	34	171	19,9

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	6
c	ja	nein	34

Testwert x²: 19,60

Bei 25 dyn/cm² zeigt sich kein signifikanter Anstieg ($\chi^2=1,5$) im Vergleich zum Grundfluss, wobei 6,0% der Zellen einen Ratioanstieg zeigen.

Bei 65 und 95 dyn/cm² stellt sich ein signifikanter Anstieg zum Grundfluss dar, jedoch ohne signifikante Zunahme von 65 auf 95 dyn/cm² ($\chi^2=2,05$). 15,2% der Zellen bei 65 dyn/cm² und 19,9% bei 95 dyn/cm² zeigen einen Ratioanstieg bei Belastung.

3.4.3.3 3-tägige Zelladhäsion auf Deckglas

Bei allen mechanischen Belastungen mit 25, 45, 65 und 95 dyn/cm² zeigen sich signifikante Veränderungen zum Grundfluss.

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	27	770	3,5
25	49	770	6,4

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	27
c	ja	nein	49

Testwert χ^2 : 6,37

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	25	739	3,4
45	89	739	12,0

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	25
c	ja	nein	89

Testwert χ^2 : 35,93

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	25	619	4,0
65	98	619	15,8

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	25
c	ja	nein	98

Testwert χ^2 : 43,33

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	13	328	4,0
95	59	328	18,0

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	13
c	ja	nein	59

Testwert χ^2 : 29,39

Von 25 auf 45 dyn/cm² ist ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ($p=0,001$; $\chi^2=14,64$), ebenso von 45 auf 65 dyn/cm² ($p=0,05$; $\chi^2=4,07$). Von 65 auf 95 dyn/cm² beträgt der Testwert χ^2 0,72 ohne Signifikanz.

3.4.3.4 2-tägige Zelladhäsion auf Deckglas

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	11	298	3,7
25	19	298	6,4

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	11
c	ja	nein	19

Testwert χ^2 : 2,13

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	15	412	3,6
45	70	412	17,0

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	15
c	ja	nein	70

Testwert χ^2 : 35,59

<u>Scherspannung (dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg (Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen (Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	16	471	3,4
65	84	471	17,8

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	16
c	ja	nein	84

Testwert χ^2 : 46,24

Für 25 dyn/cm² ergibt sich keine Signifikanz im Gegensatz zu 45 und 65 dyn/cm², die eine signifikante Zunahme der stimulierten Zellen mit Kalziumanstieg zum Grundfluss mit 1 dyn/cm² zeigen.

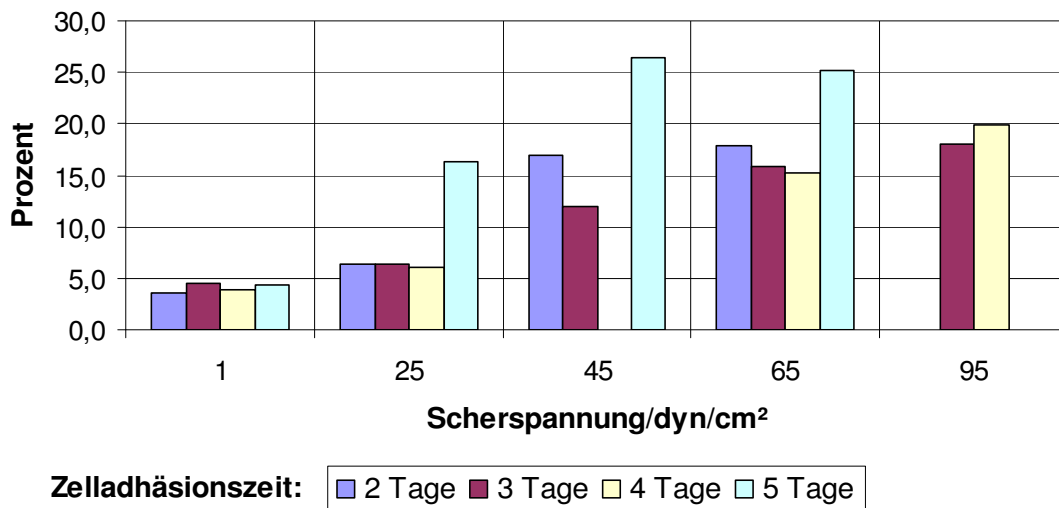
Auch stellt sich eine signifikante Zunahme von 25 auf 45 dyn/cm² ein ($\chi^2=17,77$; $p=0,001$), dagegen von 45 auf 65 dyn/cm² ohne Signifikanz.

3.4.3.5 Vergleich der einzelnen Zelladhäsionszeiten und der Scherspannungen

Vergleicht man die Anteile der Zellen mit Kalziumanstieg nach Stimulation bei einer bestimmten Scherspannung in Abhängigkeit von den Zelladhäsionszeiten, so zeigt sich folgendes: Fünf Tage nach Zellaussaat auf die Deckgläser zeigten

sich bei 25 , 45 und 65 dyn/cm² signifikante Zunahmen der stimulierten Zellzahlen im Vergleich zu den Tagen 2 bis 4.

Eine Ausnahme ist Tag 2 bei 65 dyn/cm², da hier χ^2 3,76 beträgt und somit nicht signifikant ist. Die Tage 2 bis 4 untereinander im Vergleich weisen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der stimulierten Zellen bei den einzelnen Scherspannungen auf. Ausnahme ist der Vergleich Tag 2 mit Tag 3 bei 45 dyn/cm², da hier χ^2 5,44 ist. So zeigt sich bei Tag 2 ein erhöhter Anteil der stimulierten Zellen.



3.4.4 Doppelbelastung

Eine weitere Frage war: Zeigen die POb ein unterschiedliches Stimulationsverhalten bei Doppelbelastung der Zellen mit je zwei Phasen der Exposition gegenüber Scherspannungen? Hierzu erfolgte die Aufzeichnung bei Grundfluss, daran schloss sich die erste Belastungsphase mit 45 dyn/cm² an mit Rückkehr zum Grundfluss. Hierauf folgte dann noch einmal eine zweite Belastungsphase mit ebenfalls 45 dyn/cm² (Abbildung 3-11). Hierzu wurden Zellen drei Tage nach Aussaat auf das Deckglas verwendet.

Die Anzahl der Zellen mit Kalziumanstieg bei Stimulation wurde jeweils in Relation zur Zellanzahl mit Kalziumanstieg bei Grundfluss hinsichtlich der Signifikanzberechnung gesetzt.

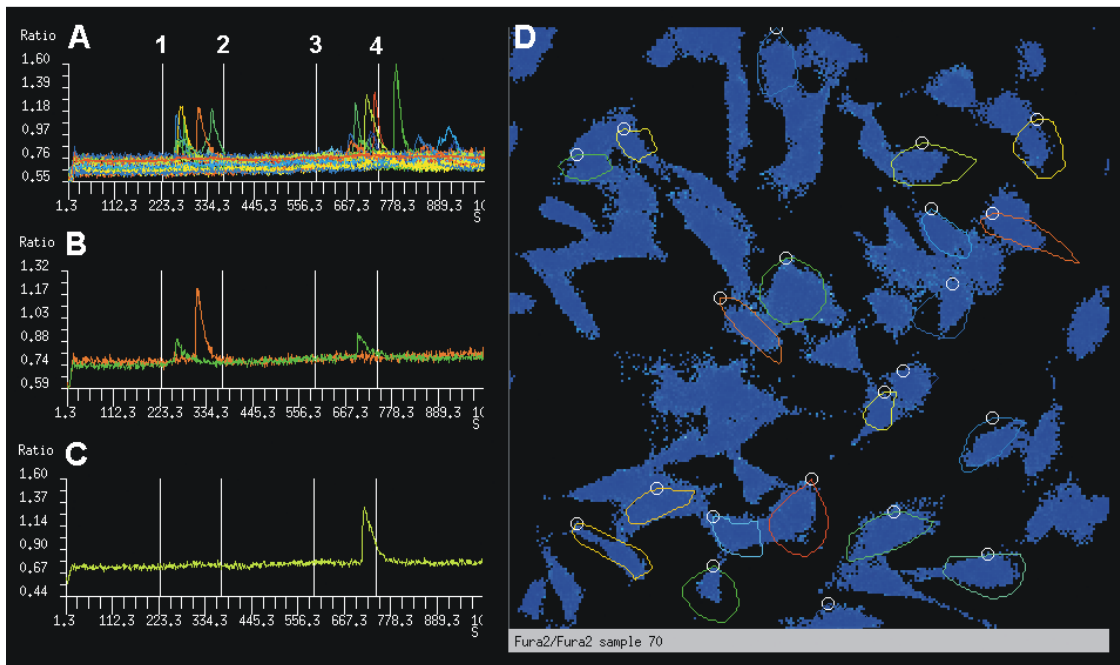


Abbildung 3-11 Doppelbelastung von POB mit 45 dyn/cm²

Nach Grundfluss erfolgte die Belastung mit 45 dyn/cm² (1) und die Rückkehr zum Grundfluss (2). Eine zweite gleiche Belastungsphase schloss sich an (3,4). Bild D zeigt die ausgewerteten Zellen.

Gesamtübersicht der Zellen mit Kalziumanstieg nach Stimulation (A).

In Graph B zeigt sich die Ratio für zwei einzelne Zellen, wobei eine Zelle in beiden Stimulationsintervallen einen Kalziumanstieg aufweist (grün).

Ratioanstieg im zweiten Belastungsintervall (C).

Die Analyse erfolgte ebenfalls als summierte Auswertung der einzelnen Experimente. In beiden Belastungsphasen mit 45 dyn/cm² zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellen mit intrazellulärer Kalziumerhöhung zum Grundfluss ($p=0,001$). Eine zweifache Stimulation einer Zelle zeigte sich nur vereinzelt, wobei in beiden Belastungsphasen meist jeweils unterschiedliche Zellen einen Kalziumanstieg aufwiesen.

Zwischen den beiden Belastungsphasen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der stimulierten Zellen nachweisen (Testwert $\chi^2=0,04$).

Scherspannung (dyn/cm²)	Ratioanstieg (Anzahl)	Analysierte Zellen (Summe)	Prozent
1	18	615	2,9
1. Belastungsphase: 45	62	615	10,1
2. Belastungsphase: 45	64	615	10,4

McNemar-Test	Kalziumanstieg		Gesamt
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	18
1. Belastungsphase	ja	nein	62
2. Belastungsphase	ja	nein	64

Testwert χ^2	
1. Belastungsphase	24,20
Testwert χ^2	
2. Belastungsphase	25,80

3.4.5 Oregon Green-Färbung

Hierbei wurden die POB mit dem Einzel-Wellenlängen-Farbstoff Oregon Green BAPTA 488 AM gefärbt (siehe 2.4.2.1). Nach 3-tägiger Zelladhäsion auf dem Deckglas erfolgte die Scherspannungsbelastung mit 65 dyn/cm². Hierbei zeigte sich im Verlauf der Fluoreszenzmessung ein photo-bleaching (Abbildung 3-12, A) mit kontinuierlicher Abnahme der Fluoreszenzintensität. Nach Scherspannungsbelastung zeigte sich bei einem Anteil von 16,9% der Zellen ein intrazellulärer Kalziumanstieg.

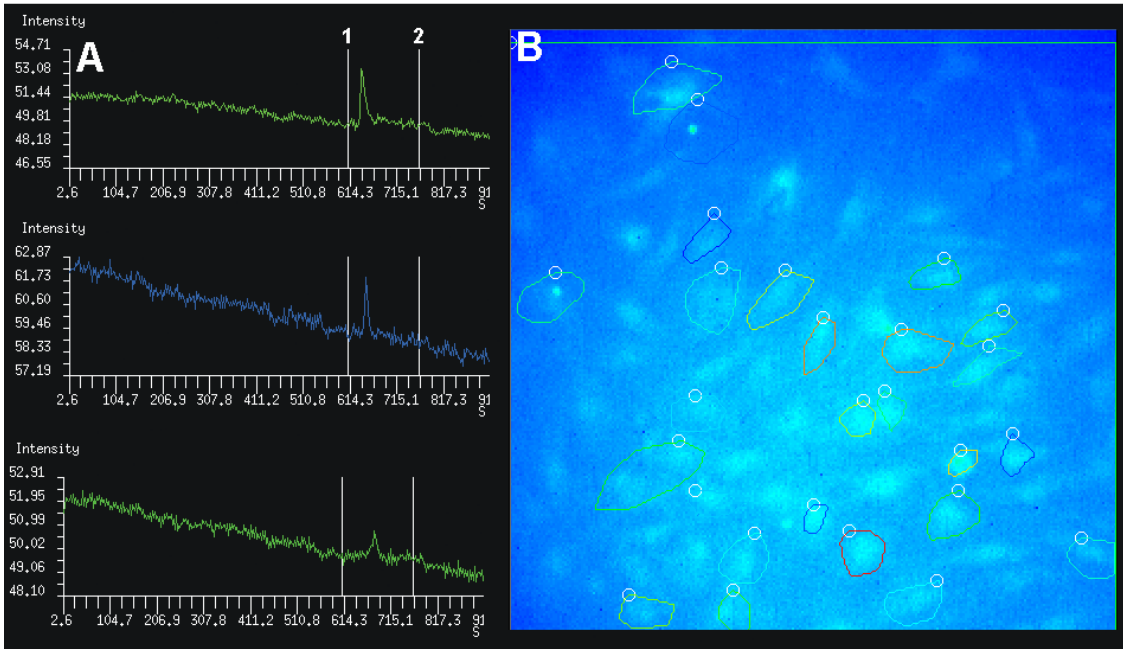


Abbildung 3-12 POB mit Oregon Green-Färbung und Stimulation mit 65 dyn/cm²

Nach Grundfluss erfolgt die Erhöhung auf 65 dyn/cm² (A, 1). Links sind die Fluoreszenzkurven von 3 einzelnen Zellen mit Kalziumanstieg dargestellt. Rückkehr zum Grundfluss (A, 2). Gefärbte Zellen (B).

Zur Auswertung wurden die Daten der drei Experimente zusammengefasst und es kam der McNemar-Test zur Anwendung. Es zeigt sich zum Grundfluss ein signifikanter Anstieg der Zellen mit intrazellulärem Kalziumanstieg nach Scherspannungsbelastung mit einem Testwert χ^2 von 14,4.

<u>Scherspannung</u> <u>(dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg</u> <u>(Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen</u> <u>(Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	8	189	4,2
65	32	189	16,9

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	8
c	ja	nein	32

Testwert χ^2 :

14,40

3.5 Kalziummessungen an Osteosarkomazellen MG-63

Humane Osteosarkomazellen MG-63 wurden ebenfalls Belastungen mit Scherspannungen ausgesetzt mit der Frage, ob bei dieser Knochentumorzelllinie intrazelluläre Signaltransduktionswege auf diese Weise aktiviert werden. Nach Umstellung des Wachstumsmediums RPMI 1640 erfolgten die Versuche mit HBSS wie unter 2.5 beschrieben.

3.5.1 Einfachbelastung

Die Zellen wurden nach 3-tägiger Zelladhäsion auf dem Deckglas verwendet und Belastungen von 25 und 45 dyn/cm² ausgesetzt. Nach Einbau in die Flusskammer erfolgte zunächst wieder ein Grundfluss für 30 Minuten mit einer resultierenden Scherspannung von circa 1 dyn/cm² (Abbildung 3-13). Hieran schloss sich die Belastungsphase an mit Rückkehr zum Grundfluss. Das Bildaufnahmeintervall betrug 1400 ms.

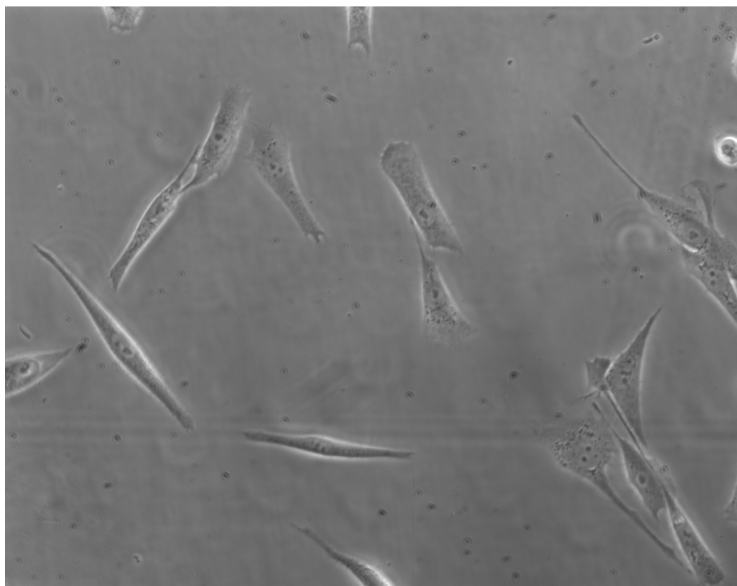


Abbildung 3-13 MG-63 (Grundfluss 1 dyn/cm²)
(Phasenkontrastaufnahme, 20x Objektiv)

Bei den Fluoreszenzaufnahmen und Darstellung der Ratio bei 1 dyn/cm² zeigen sich im Grundfluss innerhalb der 30 Minuten bei den MG-63 im Verlauf teilweise stärkere Schwankungen in der freien intrazellulären Kalziumkonzentration (Abbildung 3-14) als bei den POb.

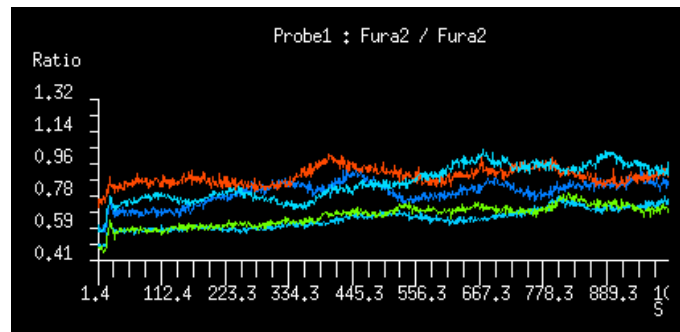


Abbildung 3-14 Verlauf der Kalziumkonzentrationen bei Grundfluss mit 1 dyn/cm²

Hier zeigen sich bei den MG-63 Schwankungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Trotz den bereits vorher bestehenden intrazellulären Kalziumschwankungen zeigte sich bei den Osteosarkomazellen nach Belastung eine signifikante Zunahme der Anzahl der Zellen mit Kalziumanstieg im Vergleich zum Grundfluss, wobei aufgrund der höheren Anzahl der Zellen mit Kalziumanstieg im Grundfluss der Testwert χ^2 kleiner ausfiel als bei den POb. Dieser betrug für 25 dyn/cm² 3,92 und für 45 dyn/cm² 4,27.

<u>Scherspannung</u> <u>(dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg</u> <u>(Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen</u> <u>(Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	18	246	7,3
25	32	246	13,0

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	18
c	ja	nein	32

Testwert χ^2 : 3,92

<u>Scherspannung</u> <u>(dyn/cm²)</u>	<u>Ratioanstieg</u> <u>(Anzahl)</u>	<u>Analysierte Zellen</u> <u>(Summe)</u>	<u>Prozent</u>
1	22	267	8,2
45	38	267	14,2

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	22
c	ja	nein	38

Testwert χ^2 :

4,27

Zur Verdeutlichung des Anstieges der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Belastung erfolgte ebenfalls eine Auswertung und Darstellung der Ratio über das gesamte aufgezeichnete Bild, das alle Zellen beinhaltet (Abbildung 3-15, B). Hier zeigte sich nach Belastungsbeginn eine Zunahme des Ratio und somit der Kalziumkonzentration.

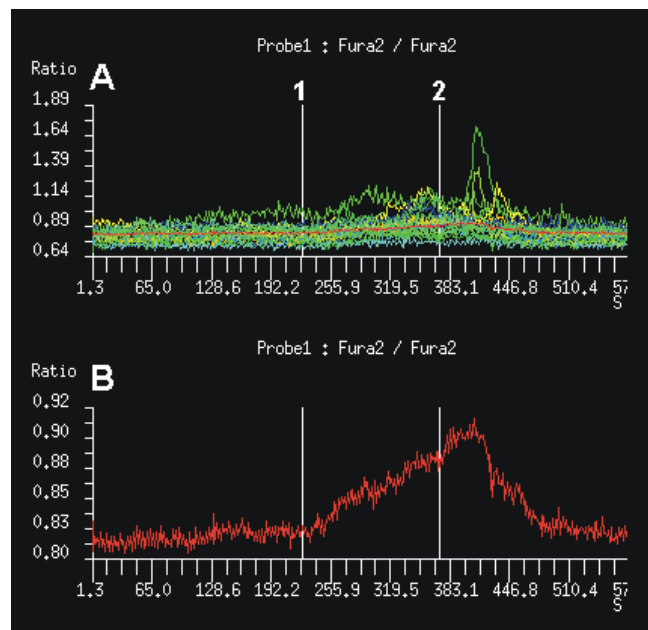


Abbildung 3-15 Belastung von MG-63 mit 45 dyn/cm²

In A sind die Kalziumverläufe der Einzelzellen dargestellt. Hier zeigt sich nach Erhöhung auf 45 dyn/cm² (1) eine Zunahme der Zellen mit Kalziumanstieg. Rückkehr zum Grundfluss (2).

In B ist der Kalziumverlauf für alle Zellen auf dem aufgezeichneten Bild dargestellt. Hier zeigt sich ein Anstieg der Kalziumkonzentration nach Belastungsbeginn, der bis über das Belastungsende (2) hinweg andauert, und dann wieder nahezu das Ausgangsniveau erreicht.

3.5.2 Doppelbelastung

Auch die Osteosarkomazellen MG-63 wurden einer Doppelbelastung mit Scherspannungen ausgesetzt. Die Scherspannung betrug in beiden Belastungsphasen 45 dyn/cm². Die Zellen wurden nach drei Tagen auf dem Deckglas für die Experimente verwendet. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellenanzahl mit Kalziumanstieg sowohl während der ersten Belastungsphase ($\chi^2=6,53$, $p=0,05$) als auch während der zweiten Belastungsphase ($\chi^2=4,26$, $p=0,05$) jeweils in Relation zum Grundfluss. Es erfolgte neben der Analyse der Einzelzelle ebenfalls wieder eine Auswertung hinsichtlich des Kalziumverlaufes über den gesamten Zellbereich, der aufgezeichnet wurde (Abbildung 3-16, B).

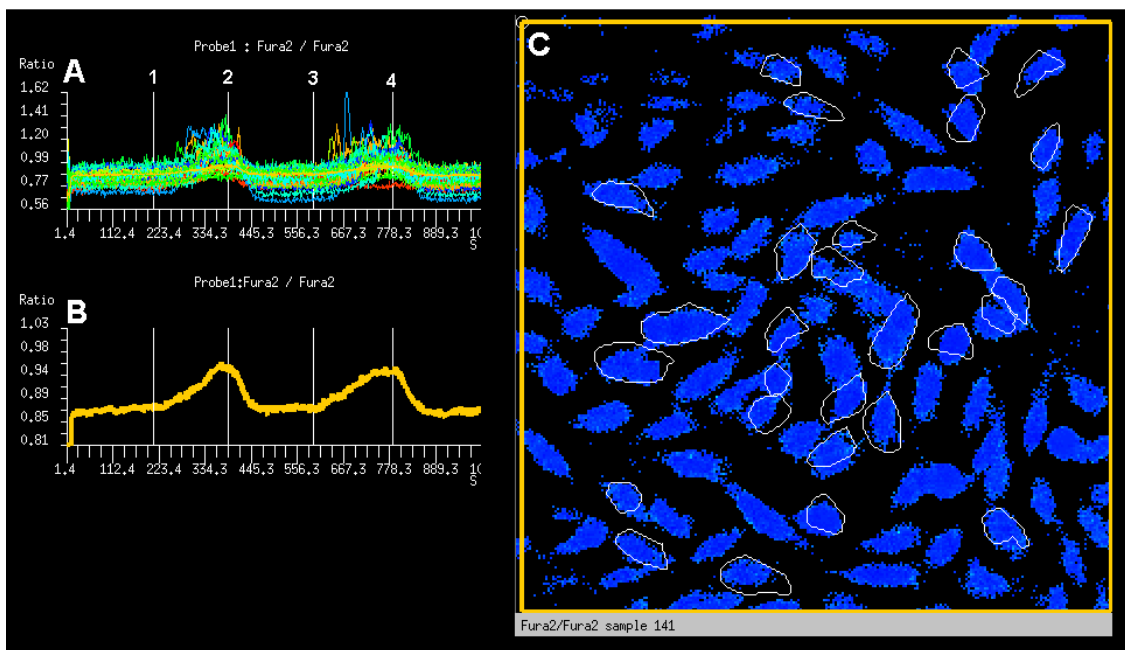


Abbildung 3-16 Doppelbelastung von MG-63 mit 45 dyn/cm²

Nach Grundfluss und Scherspannungsbelastung (1) zeigt sich eine Zunahme der Zellen mit Kalziumanstieg (A). Nach Rückkehr zum Grundfluss (2) und erneuter Belastung (3) stellt sich ebenfalls eine Zunahme dar. Rückkehr zum Grundfluss (4).

Bild B zeigt den Ratioverlauf für den gesamten Zellbereich (C), wobei sich hier nach Belastungsbeginn jeweils ein Anstieg der Kalziumkonzentration zeigt, der über das Belastungsende hinweg andauert.

(Belastungsdauer 140 s, Aufnahmeintervall 1400 ms)

<u>Scherspannung</u> (dyn/cm ²)	<u>Ratioanstieg</u> (Anzahl)	<u>Analysierte Zellen</u> (Summe)	<u>Prozent</u>
1	29	345	8,4
1. Belastungsphase: 45	52	345	15,1
2. Belastungsphase: 45	47	345	13,6

<u>McNemar-Test</u>	<u>Kalziumanstieg</u>		<u>Gesamt</u>
	Belastung	Grundfluss	
b	nein	ja	29
1. Belastungsphase	ja	nein	52
2. Belastungsphase	ja	nein	47

Testwert χ^2	
1. Belastungsphase	6,53
Testwert χ^2	
2. Belastungsphase	4,26

Es zeigen manche Zellen einen intrazellulären Kalziumverlauf, der dem Verlauf des Graphen über den gesamten Zellbereich gleicht. Ebenso zeigen mehrere Zellen einen Kalziumanstieg in beiden Belastungsphasen mit 45 dyn/cm² (Abbildung 3-17, C und D).

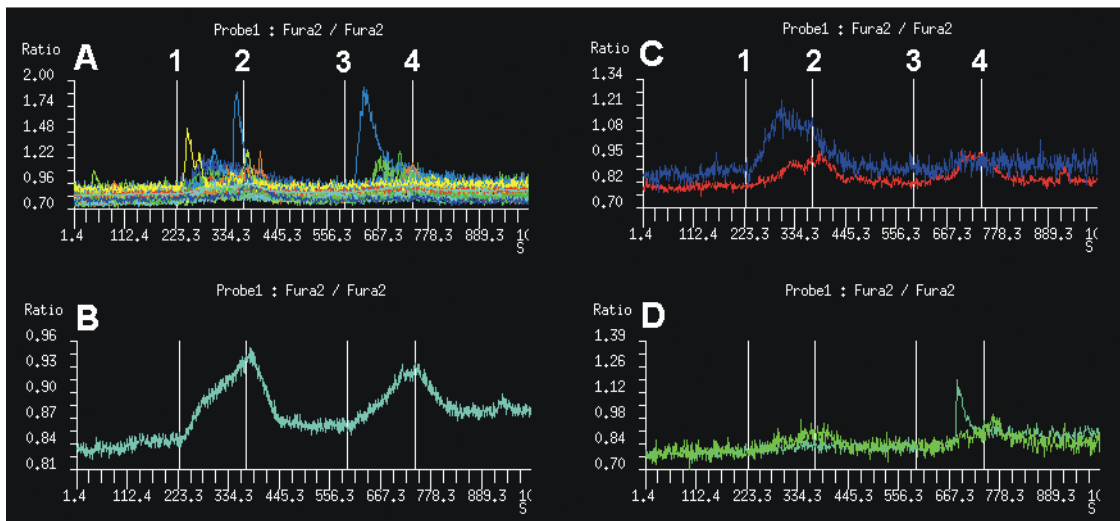


Abbildung 3-17 Doppelbelastung von MG-63 mit 45 dyn/cm²

Bild A zeigt die Zellen mit Kalziumanstieg während der Belastungsphasen. Bild B gibt den Kalziumverlauf über den gesamten Zellbereich wieder. Kalziumverlauf je zweier Einzelzellen (C,D). Doppelter Kalziumanstieg bei rotem Graph in C und grünem Graph in D, die dem Kalziumverlauf des Gesamtzellbereiches ähneln (B).

Hinsichtlich der Zellenanzahl mit Kalziumanstieg weisen beide Belastungsphasen im Vergleich keinen signifikanten Unterschied auf ($\chi^2=0,29$).

3.6 Überprüfung der Zellvitalität nach Kalziummessungen

Nach Durchführung der Experimente erfolgte als Positivkontrolle und zur Evaluierung der Vitalität der mit Scherspannung belasteten Zellen die Zugabe von Thapsigargin in das Perfusionsmedium mit einer Konzentration von 5 μM (0,5 mM Stammlösung, Molecular Probes). Thapsigargin ist ein selektiver Inhibitor der endoplasmatischen Kalzium-ATPase, die freies intrazelluläres Kalzium in das endoplasmatische Retikulum transportiert (Arora et al., 1994). Wird die Kalzium-ATPase durch Aufnahme des Thapsigargin in die Zellen nun geblockt, steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration an (Abbildung 3-18).

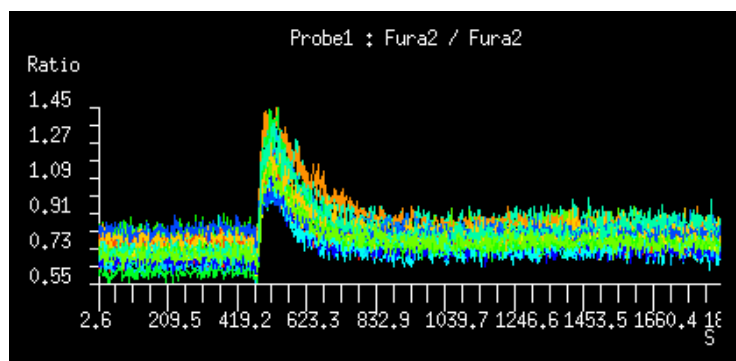


Abbildung 3-18 Thapsigargin induzierter Kalziumanstieg bei POB

Nach Zugabe von 5 μM Thapsigargin in das Perfusionsmedium zeigt sich nach Ankunft des Thapsigargin im beobachteten Zellbereich bei den Zellen ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

Die Zellen zeigten einen Kalziumanstieg mit Rückkehr zum Ausgangsratio als Vitalitätskriterium nach dem Experiment und als Nachweis der intakten Fluoreszenzeigenschaften des verwendeten Farbstoffes.

3.7 Zugkraftmessungen

3.7.1 Zugkräfte unter Grundfluss

Hierzu erfolgten der Versuchsbeginn und die Durchführung wie unter 2.5.3 beschrieben. Nach einem Grundfluss über 30 Minuten mit einer resultierenden Scherspannung von 1 dyn/cm^2 wurden pro Zelle drei bis vier Fluoreszenzaufnahmen und Phasenkontrastbilder gemacht. Bei bekannten Geleigenschaften (Kapitel 2.5.5) konnte so das Softwareprogramm die Zugkräfte, die die einzelnen Zellen bei der Zelladhäsion unter Grundfluss aufbrachten, errechnen. Aus den erhaltenen Zugkräften wurde der Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt.

3.7.1.1 Primäre bovine Osteoblasten

POb wiesen Zugkräfte im Mittel zwischen 60,4 nN und 464,8 nN auf. Abbildung 3-19 stellt die Ergebnisse als Histogramm mit den jeweiligen Standardabweichungen dar.

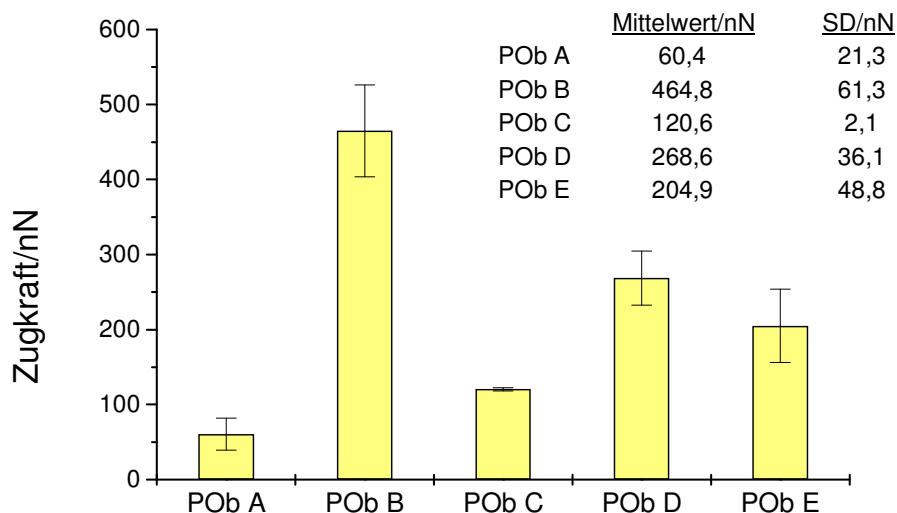


Abbildung 3-19 Zugkräfte von POb unter Grundfluss (1 dyn/cm^2)

Die in Abbildung 3-19 angegebenen Mittelwerte der Zugkräfte, geben die absolute Kraft an, die der POb auf das Gel über seine Zelladhäsionspunkte ausgeübt hat, ohne Berücksichtigung der genauen Zellgröße. Um die Schubspannung, also die Kraft pro Fläche, zu ermitteln, muss man die absolute Zugkraft durch die Zellfläche teilen. Annäherungsweise erhält man bei einer Zugkraft von circa 200 nN und einer Zellfläche von circa 8000 μm^2 so 25 N/m^2 , was 250 dyn/cm^2 entspricht. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht:

	Zugkraft/nN	SD/nN	Zellfläche/ μm^2	Schubspannung/dyn/cm ²
POb A	60,4	21,4	6500	92,9
POb B	464,9	61,3	8500	546,9
POb C	120,6	2,1	7800	154,7
POb D	268,7	36,1	9400	285,8
POb E	205,0	48,8	9200	222,8

Abbildung 3-20 stellt die Vektorenmatrix und das korrespondierende Phasenkontrastbild eines POb dar.

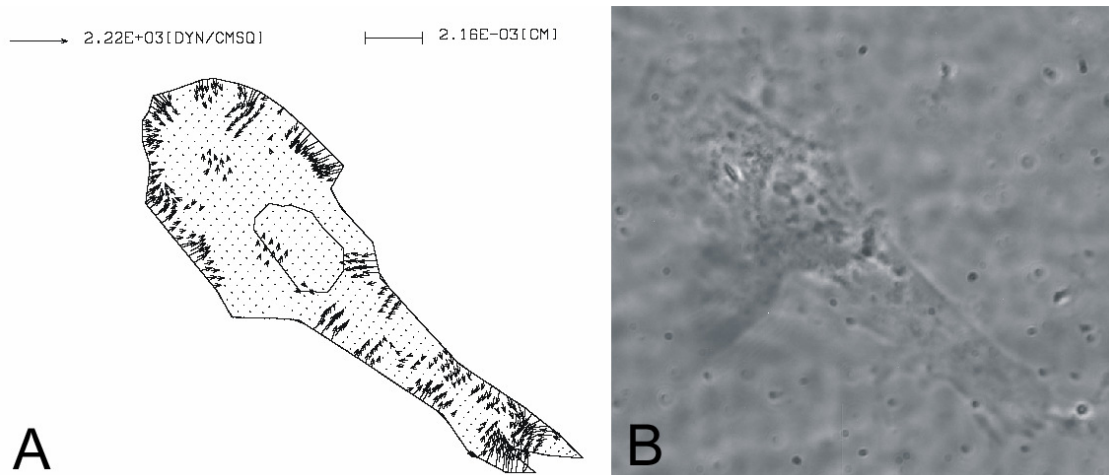


Abbildung 3-20 Vektorenmatrix eines POb

Die einzelnen Vektoren sind in Bild A bei einem POb dargestellt. Die Skalierungen der Vektoren und der Zellgröße befinden sich oben im Bild. Bild B zeigt das Phasenkontrastbild der Zelle.

3.7.1.2 Osteosarkomazellen MG-63

Die Osteosarkomazellen MG-63 zeigten bei Grundfluss mit 1 dyn/cm^2 geringere Zugkräfte zwischen $3,4 \text{ nN}$ und $222,4 \text{ nN}$ (Abbildung 3-21). Jedoch lagen bei den Tumorzellen auch geringere Zellgrößen vor.

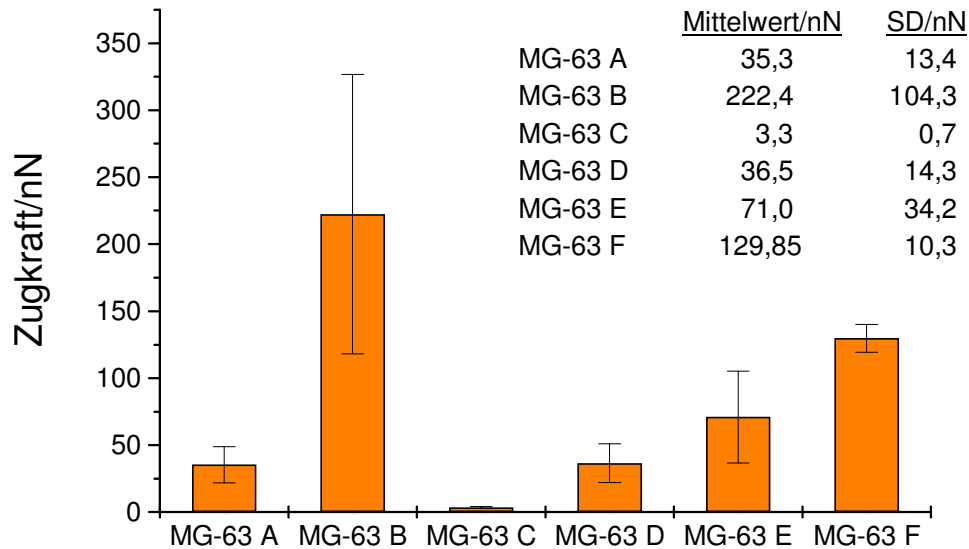


Abbildung 3-21 Zugkräfte der Osteosarkomazellen MG-63 bei 1 dyn/cm^2

Ebenso zeigt die folgende Tabelle die sich ergebenden Schubspannungen. Die Zellflächen betragen circa 30% derer bei den POb. Die Schubspannungen, die die Zellen auf das Gel ausüben, liegen alle über der Scherspannungsbelastung des Grundflusses mit 1 dyn/cm^2 auf die Zellen. Sie liegen sogar jenseits der 100 dyn/cm^2 -Grenze bis auf die Zelle MG-63 C.

	Zugkraft/nN	SD/nN	Zellfläche/ μm^2	Schubspannung/ dyn/cm^2
MG-63 A	35,3	13,4	3200	110,3
MG-63 B	222,4	104,4	3800	585,4
MG-63 C	3,4	0,8	2200	15,3
MG-63 D	36,5	14,3	1600	228,1
MG-63 E	71,0	34,3	1700	417,6
MG-63 F	129,9	10,4	2100	618,3

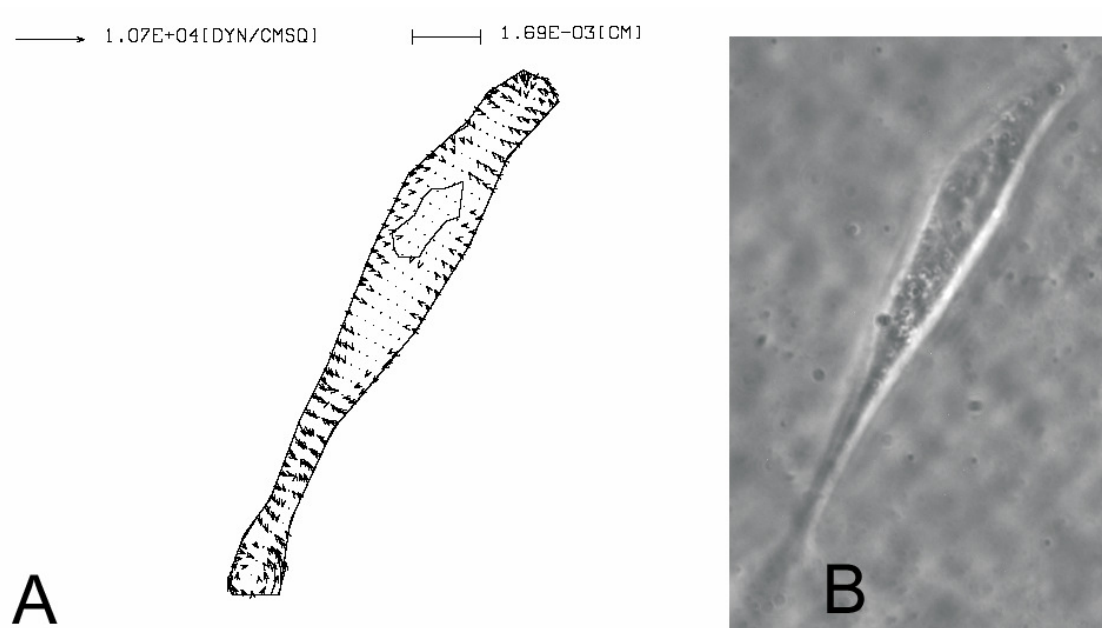


Abbildung 3-22 Vektorenmatrix einer Osteosarkomazelle MG-63

3.7.2 Zugkräfte bei Scherspannungsbelastung mit 65 dyn/cm^2

Nach Messung der Zugkräfte unter Grundfluss schloss sich eine Flusserhöhung mit einer Scherspannungsbelastung von 65 dyn/cm^2 an. Diese wurde für insgesamt 180 Sekunden aufrechterhalten. Nach 60, 120 und 180 Sekunden wurde jeweils die Fluoreszenzaufnahmen aufgezeichnet. Danach erfolgte die Rückkehr zum Grundfluss und nach weiteren fünf Minuten wurden nochmals Aufnahmen zur Zugkraftmessung gemacht. Die Messwerte jeder Phase wurden hinsichtlich einer signifikanten Änderung zum Grundfluss vor Scherspannungsbelastung einer Überprüfung durch den t-Test für unverbundene Stichproben ($\alpha=0,05$) unterzogen.

3.7.2.1 Primäre bovine Osteoblasten

In den durchgeführten Experimenten zeigten sich unterschiedliche Verlaufsformen der zellulären Zugkräfte. Sowohl Anstiege als auch Abfälle der

Zugkräfte im Vergleich zum Grundfluss wurden gemessen. Jedoch wurden signifikante Änderungen nur jeweils einmal während der Belastungsphase bei den POb A, POb C und POb D gemessen (Abbildung 3-23, Pfeilmarkierungen). Zweimal war ein signifikanter Abfall bei 180 s (POb A) bzw. 120 s (POb D) zu verzeichnen und einmal bei POb C ein signifikanter Anstieg bei 180s. POb B zeigte keine signifikanten Veränderungen.

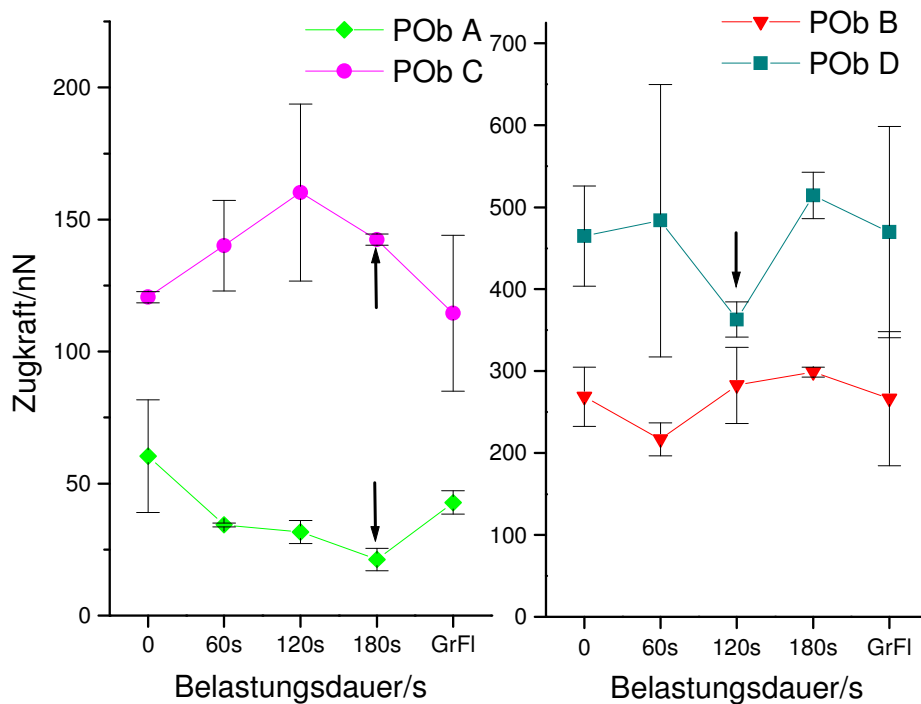


Abbildung 3-23 Zugkräfte unter Scherspannungsbelastung mit 65 dyn/cm²

Dargestellt sind die zellulären Zugkräfte vor Belastungsbeginn (0), nach 60s, 120s und 180s Belastung und wieder eingestelltem Grundfluss mit 1 dyn/cm² (GrFI) nach Belastungsende. Zu den Mittelwerten sind die Standardabweichungen dargestellt. Die Pfeile markieren signifikante Änderungen zum Grundfluss vor Belastungsbeginn.

Bei der visuellen Analyse der einzelnen Vektorenbilder zeigte sich kein charakteristisches Muster für das Auftreten der Spannungsvektoren parallel beziehungsweise orthogonal zur Flussrichtung des Perfusionsmediums (Abbildung 3-24).

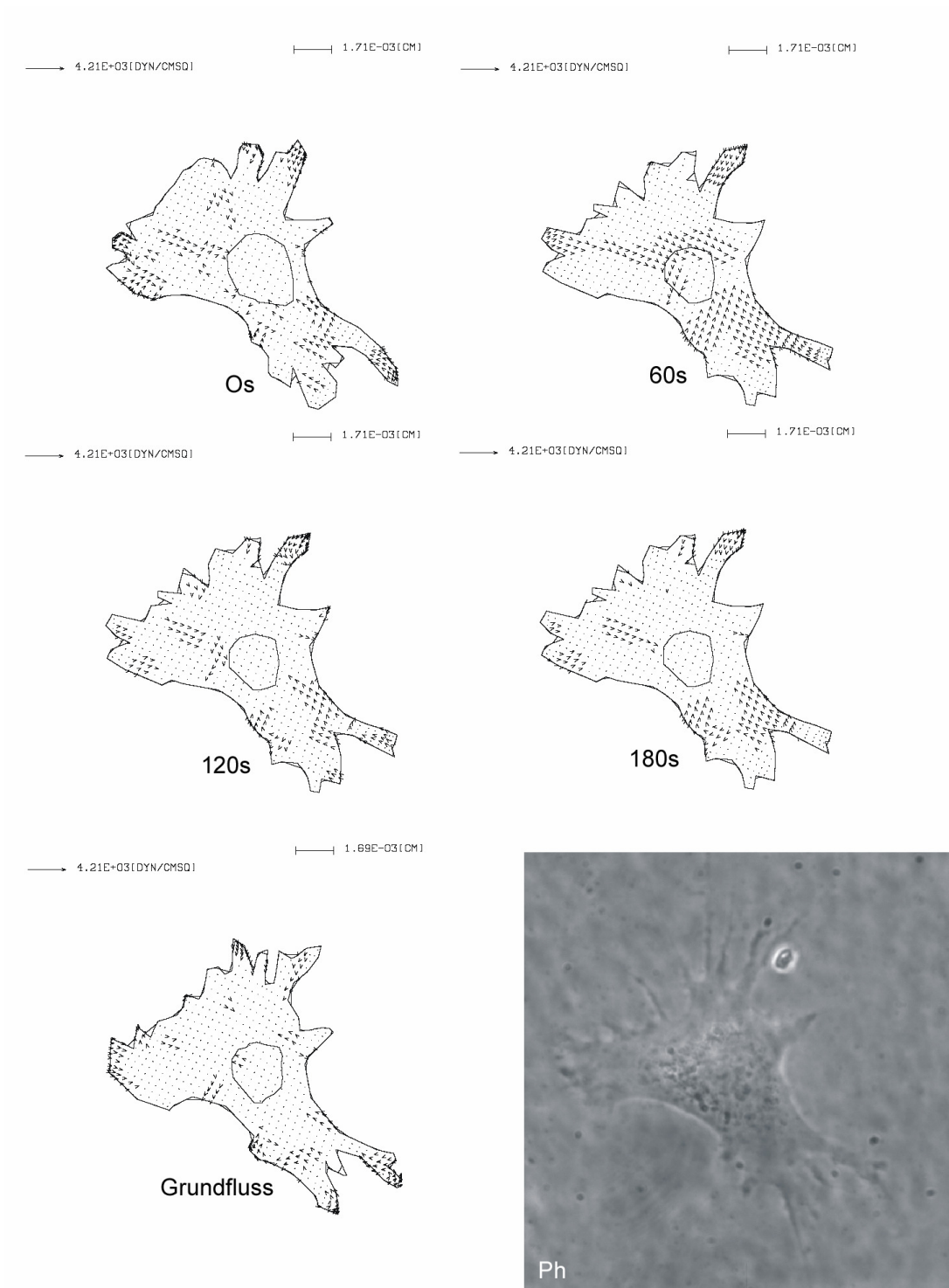


Abbildung 3-24 Vektorenmatrix eines POB unter Scherspannungsbelastung

Die fünf Vektorenmatrices zeigen einen POB in den verschiedenen Phasen des Experimentes mit den gemessenen Kraftvektoren. Die Flussrichtung war von rechts nach links. Phasenkontrastaufnahme Ph.

3.7.2.2 Osteosarkomazellen MG-63

Auch bei den Osteosarkomazellen zeigten sich heterogene Verläufe der zellulären Zugkräfte. Bei den Zellen MG-63 B bis D wurden keine signifikanten Veränderungen der Zugkräfte gemessen (Abbildung 3-25).

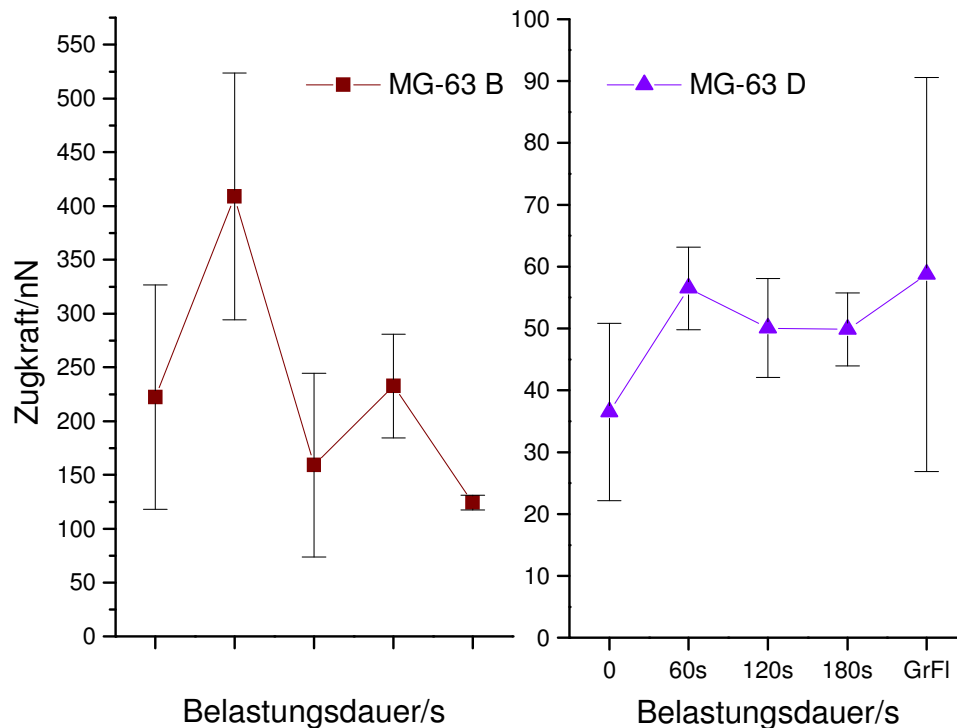


Abbildung 3-25 Zugkräfte unter Scherspannungsbelastung mit 65 dyn/cm²

Bei MG-63 A war ein signifikanter Anstieg bei der Messung bei 180s zu verzeichnen, wobei sich beim Grundfluss nach Belastungsende wieder keine Differenz zeigte. Die Zellen MG-63 E und F wiesen einen ähnlichen Verlauf der Zugkräfte auf (Abbildung 3-26). Bei MG-63 E war bei 180s ein signifikanter Abfall vorhanden, der ebenfalls noch beim Grundfluss nach Belastungsende existent war. Bei MG-63 F stellte sich bei 120s ein signifikanter Abfall dar, der ebenso noch beim anschließenden Grundfluss messbar war.

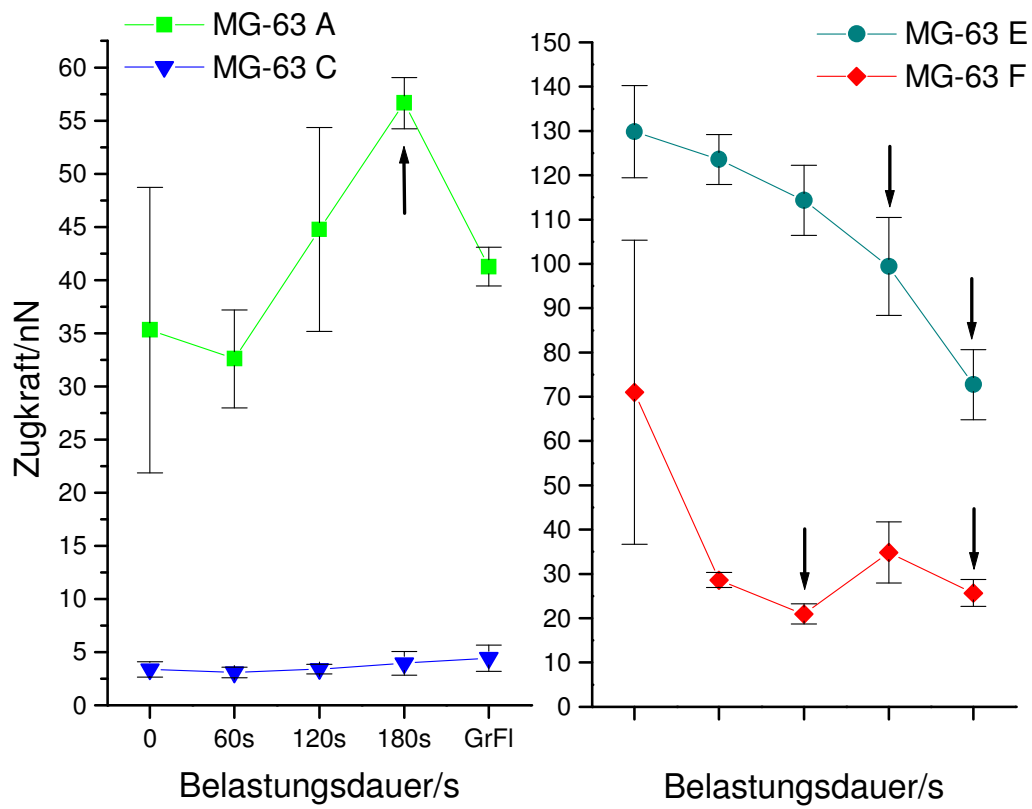


Abbildung 3-26 Zugkräfte unter Scherspannungsbelastung mit 65 dyn/cm²
 Die Pfeile markieren wiederum signifikante Veränderungen zum Grundfluss vor Belastungsbeginn.

4 Diskussion

Die anabolen Effekte mechanischer Belastung auf Knochen sind weithin gut untersucht, aber wie der Knochen und damit seine kleinste biologische Untereinheit, die osteoblastäre Zelle, die auf ihn einwirkenden Kräfte perzeptiert und so die Anpassungs- und Umbauvorgänge zustande bringt, ist letztlich noch unklar. Man bedient sich zur Erforschung der Mechanoperzeption und Mechanotransduktion in-vitro-Experimenten mit Knochenzell-Modellsystemen. Hierüber sollen Rückschlüsse auf die Bedingungen in-vivo möglich werden und so zukünftige Therapieansätze zur Behandlung von Erkrankungen des Skelettsystems, vor allem der Knochenkrankheit Nummer eins, der Osteoporose, vorangetrieben werden.

4.1 Primärzellen versus Osteosarkomazellen

In unserer Arbeitsgruppe wurden hierzu primäre bovine Osteoblasten verwendet, die auch in dieser Dissertation als Primärzellkultur zum Einsatz kamen. Primärkulturen haben den Vorteil, dass sie hinreichend gut charakterisiert und die intrazellulären Signaltransduktionswege und ihr Verhalten auf hormonellen Einfluss und mechanische Stimulation teilweise erforscht sind.

Jedoch weisen Primärkulturen auch Nachteile auf, denn die Gewinnung von Primärzellen ist aufwendig und teuer. Ebenso zeigt sich eine Inhomogenität der herangezüchteten Kultur in jeder Präparation, so dass immer von einer mesenchymalen Mischkultur auszugehen ist. Zur Kontrolle des vorwiegend osteoblastären Phänotyps erfolgte unter anderem die Charakterisierung durch PTH-Stimulation der Zellen (Kapitel 3.1). Zwischen 92 und 98% lag der Anteil der Primärzellen mit zu forderndem Kalziumanstieg nach PTH-Stimulation (Abou-Samra et al., 1992), so dass es sich um das Vorliegen einer osteoblastären Kultur handelte.

Ein weiterer Nachteil ist die Abhängigkeit bezüglich der Differenzierung der Primärzellen von dem verwendeten fetalen Kälberserum (FCS), so dass hier ebenfalls Unterschiede in den einzelnen Präparationen möglich sind. Dadurch wird eine ständige Charakterisierung der Primärkultur notwendig.

Um die oben beschriebenen Nachteile der Primärkultur zu umgehen, wäre ein neues Zellmodellsystem für die in-vitro-Experimente nötig. Dies könnte mit der Verwendung von Zellen aus Knochentumoren, den Osteosarkomazellen, gelingen. Sie besitzen osteoblastäre Eigenschaften, sind einfacher und kostengünstiger zu kultivieren und weisen einen stabileren Phänotyp auf. Jedoch ist ein Phänotyp-Drift mit konsekutiver Heteroplodie möglich.

Grundvoraussetzung für die Einführung von Osteosarkomazellen in die Mechanotransduktionsforschung ist die Beantwortung der Frage: Sind die gewählten Osteosarkomazellen überhaupt mechanosensitiv?

Bislang liegen nur vereinzelt Ergebnisse bei Flussexperimenten mit Osteosarkomazellen vor. So konnte die Aktivierung von TNF-abhängigen Proteinen durch Flüssigkeitsströme erzeugte Scherspannungen in UMR-106-Zellen der Ratte gezeigt werden (Kurokouchi et al., 2000). Osteosarkomazellen MC3T3-E1 der Maus reagierten mit einem Anstieg von Prostaglandin E und intrazellulärem Kalzium nach Stimulation mit oszillierender Flüssigkeitsströmung (Donahue et al., 2003).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Scherspannungen auf primäre bovine Osteoblasten (POb) und deren kalziumabhängige Signaltransduktion untersucht werden. Als Osteosarkomazellen wurden den POb humane MG-63-Zellen gegenübergestellt: Wie reagieren POb und diese Tumorzelllinie auf mechanische Belastung mit Scherspannungen?

In unserer Arbeitsgruppe erfolgten mit den MG-63-Zellen parallel Experimente mit Dehnungsbelastung. Hier konnte bei diesen Osteosarkomazellen eine zu den POb äquivalente Steigerung der Mitoserate um 20% nach Dehnung gemessen werden. Ebenso zeigten sich ein identisches Expressionsmuster der Phospholipase (Hohberg, 2003) und eine gleichartige MAP-Kinase-Aktivierung von MG-63-Zellen und POb nach mechanischer Stimulation durch Dehnung (Bromme, 2001).

Abweichend hiervon konnten bei intrazellulären Kalziummessungen nach Dehnungsbelastung keine signifikante Kalziumantwort gemessen werden (Tenbosch, 1999).

4.2 Intrazelluläre Kalziummessungen

In dieser Forschungsarbeit kam eine von Usami neu entwickelte Gradientenflusskammer zum Einsatz (Usami et al., 1992). Der Vorteil dieser im Vergleich zu den herkömmlichen Parallelfusskammern liegt darin, dass vom Anfang bis zum Ende des Flusskanals ein linear ansteigender Scherspannungsgradient aufgebaut wird. So können in einem Flusseperiment Zellen unterschiedlichen Scherspannungen, vom frei wählbaren Maximum bis 0, ausgesetzt werden, ohne dass das Experimenten-Setup verändert werden muss.

Bei einer Flusskanallänge von 4,3 cm konnten wir aufgrund der optischen Eigenschaften des Mikroskops nur einen kleinen Bereich von circa 250 μm bei den Kalziumexperimenten beobachten und auswerten. Interessant wäre die gleichzeitige Aufzeichnung aller Zellen von der maximalen Belastung bis 0 dyn/cm^2 . Dies ist für Fluoreszenzmessungen in Echtzeit jedoch schwer zu realisieren. Möglich wären jedoch die gleichzeitige Belastung der Zellen in der Gradientenflusskammer, der Ausbau des Objektträgers und die Anwendung immunzytochemischer Verfahren.

Der Vorteil der Gradientenflusskammer in dieser Arbeit lag darin, dass die Zellen im Flusskanal vor den auszuwertenden Zellen einer geringeren Scherspannung ausgesetzt waren, so weniger stimuliert wurden und auf diesem Wege eine mögliche parakrine Beeinflussung reduziert wurde.

Zur Überprüfung der Gradienteneigenschaften der Flusskammer erfolgten bei gleicher Flussrate Auswertungen der Anzahl der Zellen mit Kalziumantwort am Anfang des Flusskanals (geringere Scherspannung) und am Ende des Flusskanals (höhere Scherspannung). Bei neun von elf Versuchen zeigten sich

signifikante Zunahmen der Zellen mit Kalziumantwort ($p=0,05$), so dass von einem Scherspannungsgradienten auszugehen ist. Die Beschreibung der Gradienteneigenschaften erfolgte durch diese Experimente qualitativ und nicht quantitativ.

Die Heterogenität der durch Scherspannung erzeugten Zellantwort ist auch dadurch bedingt, dass die theoretisch kalkulierte Scherspannung an einer Position x nicht der tatsächlich vorhandenen Scherspannung an der Zellmembran entspricht (Hyman, 1972). Beeinflusst vom Fluss über und um die Zellen herum und von transmembranösen Proteinen, die die Zelloberfläche individuell gestalten, ergibt sich bereits auf diese Weise ein potentieller interzellulärer Scherspannungsgradient (Satcher et al., 1992). So ist die kalkulierte auftreffende Scherspannung weder an jeder Stelle der Zelloberfläche einer Zelle noch an benachbarten Zellen exakt gleich.

Zwei weitere Faktoren für heterogene Kalziumantworten sind zu berücksichtigen: Zum einen das Vorliegen unterschiedlicher Phasen des Zellzyklus (Bizzarri et al. 1994), wobei die meisten Zellen sich in der G₀-Phase befinden, und für Primärkulturen, trotz präexperimenteller Charakterisierung, das Vorhandensein einer Mischkultur (Wong, 1990). So können unterschiedliche Anzahlen von Rezeptoren und eine differierende Expression von Mediatoren der Signaltransduktionskette interindividuell vorliegen, die bereits so für jede Zelle eine unterschiedliche Ausgangsposition für die Mechanotransduktion schafft.

Diese zellulären Unterschiede und die Heterogenität im Stimulus mögen einzelne heterogene Messungen erklären, aber dennoch lassen sich signifikante scherspannungsabhängige Änderungen nachweisen.

Sowohl für die Messungen der Kalziumfluoreszenz als auch der Zugkraftmessungen wurde serumfreies Medium verwendet (HBSS). So wirkte auf die Zellen nur die reine mechanische Stimulation ein, ohne Beeinflussung von Wachstumsfaktoren und Hormonen. In Vorversuchen zeigte sich bei Verwendung von Perfusionsmedium mit 2% FCS ein der Zelle eigenes

Kalziumoszillationsmuster (Kapitel 3.4.1) sowohl ohne Fluss als auch unter Grundfluss mit 1 dyn/cm^2 .

Dies bezeichnete Prentki als „Kalzium-Fingerabdruck“ der Zelle (Prentki et al., 1998). Die Amplitude und die Frequenz intrazellulärer Kalziumveränderungen steuert so die unterschiedlichsten zellulären Vorgänge wie Kontraktion, Fertilisation, Proliferation und Metabolismus, aber auch die Apoptose (Berridge et al., 1998).

Bei sich anschließender Scherspannungsbelastung mit 25 dyn/cm^2 war ein signifikanter Anstieg der Kalziumfluoreszenz zu verzeichnen. Im Weiteren erfolgten die Experimente jedoch ohne FCS-Zusatz zur Fokussierung auf die mechanische Stimulation.

Allen et al. fanden in ihren Flussexperimenten an Osteoblasten der Ratte durch die Zugabe von 2% FCS zum Perfusionsmedium einen Anstieg der Intensität der Kalziumfluoreszenz. Die Zugabe von 10% FCS zeigte jedoch eine Abnahme und verminderte Sensitivität der Zellen (Allen et al., 2000). Andere wiederum messen der Höhe des intrazellulären Kalziumanstieges eine untergeordnete Rolle bei, da für sie die Alles-oder-nichts-Theorie gilt. Hierbei ist eher entscheidend, wie viele Zellen reagieren und nicht wie stark die einzelne Zelle reagiert (Jacobs et al., 1998).

Kalzium dient als universeller Transmitter in der intrazellulären Signaltransduktion. Nach uniaxialer Dehnung von Osteoblasten konnte eine Aktivierung der Phospholipase C innerhalb von 80 ms nachgewiesen werden (Jones et al., 1987). Auch konnte durch oszillierende Flüssigkeitströmung in Osteoblasten der Ratte ein sofortiger intrazellulärer Kalziumanstieg nach Flussbeginn beobachtet werden, wobei zahlreiche Zellen einen simultanen Anstieg aufwiesen (Donahue et al., 2001). Anzumerken ist bei diesem Experiment, dass dem Perfusionsmedium 2% FCS zugegeben wurde.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit POb und Osteosarkomazellen MG-63 wurde eine laminäre gleichförmige Flüssigkeitsströmung und Medium ohne FCS verwendet. Kalziumanstiege innerhalb weniger Millisekunden nach Erhöhung der Scherspannung konnten nur sehr vereinzelt gemessen werden. Führend war ein Beginn der

Kalziumanstiege nach circa 20 Sekunden, wobei sich diese dann über den weiteren Belastungszeitraum erstreckten und über diesen teilweise hinausgingen (Abbildung 3-15).

Um eine Aussage hinsichtlich der Bedeutung der Zelladhärenz und der Stimulation der Zellen durch Scherspannung zu treffen, wurden die Flusseexperimente bei den POb nach unterschiedlich langen Zelladhäsionszeiten zwischen zwei und fünf Tagen durchgeführt. Die Zellen wurden in der Gradientenflusskammer nach Usami mit Scherspannungen von 25, 45, 65 und partiell im angenommenen hyperphysiologischen Bereich mit 95 dyn/cm² belastet. Im Grundfluss mit circa 1 dyn/cm² zeigte sich ein Anteil von maximal 4,4% der Zellen mit Kalziumanstieg. Signifikante Zunahmen der Zellen mit Kalziumantwort nach Belastung mit 25 dyn/cm² waren bei den Tagen 3 und 5 zu verzeichnen (3 d: 6,4%, p=0,05; 5 d: 16,3%, p=0,001), wobei sich für die Tage 2 und 4 keine Signifikanz ergab. Für die Experimente mit einer Scherspannungsbelastung mit 45 dyn/cm² waren bei allen gemessenen Zelladhäsionszeiten (Tag 4 nicht mit 45 dyn/cm² belastet) signifikante Zunahmen vorhanden (2d: 17,0%, p=0,001; 3d: 12,0%, p=0,001; 5d: 26,4%, p=0,001). Ebenso zeigte sich bei 65 dyn/cm² ein signifikanter Anstieg an allen Tagen (2d: 17,8%, p=0,001; 3d: 15,8%, p=0,001, 4d: 15,2%, p=0,001, 5d: 25,2%, p=0,001). Nach theoretischen Berechnungen liegt die maximale Scherspannung in-vivo im Knochen bei 70 dyn/cm² (Weinbaum et al., 1994). Als Belastungsexperimente im hyperphysiologischen Bereich erfolgten Experimente mit 95 dyn/cm² an den Tagen 3 und 4 (3d: 18,0%, p=0,001; 4d: 19,9%, p=0,001).

Zusammenfassend lässt sich für POb sagen, dass sich bis auf die Tage 2 und 4 mit 25 dyn/cm² nach Belastung der Zellen mit Scherspannung eine signifikante Zunahme der Anzahl der Zellen mit intrazellulärem Kalziumanstieg zeigte. Scherspannung scheint ein adäquater Stimulus für die POb zu sein, um die kalziumabhängige Signaltransduktion in Gang zu setzen. So scheint ab einem bestimmten Wert die Höhe der Scherspannung zu keiner weiteren Zunahme der Zellen mit Kalziumanstieg zu führen, so dass von einem Schwellenwert und einer Alles-oder-Nichts-Antwort auszugehen ist. Die Frage jedoch, wie die

Zellen die Scherspannung perzeptieren und die Signalkaskade in Gang setzen, ist noch offen und bedarf weiterer Forschungsarbeit.

Im Vergleich der einzelnen Zelladhäsionszeiten untereinander zeigte sich fünf Tage nach Aussaat der Zellen eine signifikante Zunahme der stimulierten Zellen im Vergleich zu den Tagen 2 bis 4, bis auf Tag 2 mit 65 dyn/cm² (keine Signifikanz). Die Tage 2 bis 4 zeigen untereinander keine wesentliche Divergenz auf bis auf Tag 2 mit 45 dyn/cm² (erhöhter Anteil der stimulierten Zellen, p=0,01). Die auffällige Erhöhung der Zellenanzahl mit Kalziumanstieg nach fünf Tagen Zellaussaat kann mit der zunehmenden Konfluenz und Ausbildung von gap junctions zusammenhängen (Duncan et Turner, 1995).

In ähnlichen Versuchen mit Osteoblasten von Ratten wurden von anderen Autoren bei Belastungen mit um die 70 dyn/cm² Ansprechraten von 73% bis über 88% festgestellt (Hung et al., 1995). In den hier vorliegenden Versuchen mit den POb wurden Ansprechraten von maximal knapp über 25% gefunden, was durch die Verwendung der neu entwickelten Gradientenflusskammer bedingt sein kann.

Weitere wichtige Einflussgrößen sind zunächst die verwendeten Zellen und das Perfusionsmedium. Hier spielt vor allem eine Rolle, ob das Medium Serum enthält oder nicht. Wie bereits unter 3.4.1 beschrieben zeigte sich trotz der zahlreichen Oszillationen der einzelnen Zellen ein Kalziumanstieg nach Flusserhöhung bei Auswertung über alle Zellen. Die Betrachtung der Einzelzelle und Analyse wird jedoch durch die Oszillationen erschwert, so dass in dieser Arbeit serumfreies HBSS verwendet wurde. Gleichsam steht so die mechanisch induzierte Antwort im Vordergrund. Ein weiterer entscheidender Faktor ist die Art der Flüssigkeitsströmung: kontinuierlich laminär, pulsatil oder oszillierend (Jacobs et al., 1998). So sind einzelne Ergebnisse letztlich untereinander nur schwer vergleichbar.

So konnte bei zweimaliger Belastung mit Scherspannung mit 45 dyn/cm² bei den POb mit einem dazwischen befindlichen Grundfluss mit 1 dyn/cm² von circa 220 s kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Zellen (n=615) mit Kalziumanstieg festgestellt werden (1.Belastungsphase: 10,1%, 2.Belastungsphase 10,4%, $\chi^2=0,04$). Inwieweit refraktäre Zeiträume nach

einmaliger Stimulation für eine Einzelzelle bestehen, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Bei Osteoblasten von Ratten gibt Donahue eine notwendige Pause zwischen zwei Belastungsphasen von 600 s an, um die gleiche Anzahl von Zellen zu erhalten, die eine Kalziumantwort aufweisen. Das Experimenten-Setup beinhaltet jedoch oszillierenden Fluss und Perfusionsmedium mit 2% FCS (Donahue et al., 2003), wobei hier über 95% der Zellen mit einer Kalziumantwort reagiert haben.

Wie verhalten sich nun die Osteosarkomazellen MG-63 hinsichtlich der Mechanosensitivität für Scherspannung? Auffällig waren stärkere Schwankungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration während des Grundflusses mit 1 dyn/cm² (siehe hierzu auch Kapitel 3.5.1), so dass zwischen 7,3% und 8,2% der Zellen einen Kalziumanstieg aufwiesen. Nach Belastungsbeginn mit 25 dyn/cm² bzw. 45 dyn/cm² zeigte sich bei 13,0% bzw. 14,2% der MG-63 ein intrazellulärer Kalziumanstieg. Dies entsprach einem Signifikanzniveau von $p=0,05$, so dass nach Belastung mit Scherspannung auch bei den Osteosarkomazellen intrazelluläre kalziumabhängige Signaltransduktionswege induziert wurden, wenn auch in geringerem Umfang als bei den POB. Wie bei den POB konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Zellen mit Kalziumantwort bei Doppelbelastung mit 45 dyn/cm² in den beiden Belastungsphasen gefunden werden (1.Belastungsphase: 15,1%, 2.Belastungsphase: 13,6%, $\chi^2=0,29$).

Diese Arbeit beschreibt somit erstmals die Mechanosensitivität der Osteosarkomazellen MG-63 hinsichtlich Scherspannung bezogen auf die Initiation intrazellulärer kalziumabhängiger Signaltransduktionswege. So wäre diese Tumorzelllinie als mechanosensitives Zellmodelsystem als Ersatz für Experimente mit Primärzellen mit ihren Nachteilen (siehe Kapitel 4.1) denkbar.

4.3 Zugkraftmessungen

Mikrotubuli, Aktinfilamente und Intermediärfilamente bilden ein die Zelle umspannendes Netzwerk aus, das die Zellform kennzeichnet. Das Zytoskelett besteht so aus statischen und dynamischen Komponenten, die dafür verantwortlich sind, dass diese intrazellulären Kräfte der Zelle ein Spannungsprofil geben. Dieses bezeichnet Ingber als „tensegrity-model“, ohne das eine Mechanoperzeption und Aktivierung von second-messenger-Systemen in der Folge nicht möglich sei (Ingber, 1997).

Über Integrine werden die Kräfte an die Extrazellulärmatrix weitergegeben und so durch die traction-force-Methode messbar (Dembo et Wang, 1999). Ein intaktes Aktin-Netzwerk ist in MC3T3-E1-Osteoblasten notwendig für die durch Scherspannung induzierte Aktivierung von Genen für die Expression von c-fos und Cyclooxygenase-2 (Pavalko et al., 1998), wobei Kalzium als Modulator eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Chen et al., 2000).

Welche Zugkräfte bauen POb und MG-63 nun unter Scherspannung auf und wie verhalten sich diese unter Belastung? Erstmals konnten Zugkraftwerte unter Flussbedingungen gemessen werden.

Zunächst erfolgten Messungen beider Zellarten unter Grundfluss mit 1 dyn/cm^2 . Bei einer mittleren Zellfläche von circa $8000 \mu\text{m}^2$ für POb und $2500 \mu\text{m}^2$ für MG-63 entsprach dieser einer auftreffenden Kraft pro Zelle von $0,8 \text{ nN}$ bzw. $0,25 \text{ nN}$. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick für die anderen Scherspannungswerte.

Bei den POb zeigten sich hierbei Zugkräfte zwischen $60,4 \text{ nN}$ und $464,9 \text{ nN}$ (SD in %: 1,8 bis 35,4; $n=5$). Unter stationären Bedingungen wurden in unserem Labor Werte um 660 nN gemessen (Curtze et al., 2003). Berücksichtigt man die Zellfläche und setzt diese absoluten Kräfte in Relation zur Zellfläche, ergaben sich Schubspannungen zwischen $92,9 \text{ dyn/cm}^2$ und $546,9 \text{ dyn/cm}^2$ (Mittelwert: $260,6 \text{ dyn/cm}^2$). Eine andere Technik zur Bestimmung von Zelladhäsionskräften wendete Simon bei humanen Osteoblasten unter Kulturbedingungen ohne Fluss an. Er benutzte die

Rasterkraftmikroskopie und erhielt Schubspannungen zwischen 3000 und 20000 dyn/cm² (Simon et al., 2003).

Es wird nun ersichtlich, warum es zu keinem wesentlichen Detachment der Zellen gekommen ist: Die erzeugten Scherspannungen im physiologischen Bereich (bis 70 dyn/cm²) liegen unterhalb der Zelladhäsionskräfte ab circa 90 dyn/cm².

<u>Scherspannung</u> <u>(dyn/cm²)</u>	<u>Scherspannung</u> <u>(N/m²)</u>	<u>Zellfläche</u> <u>(µm²)</u>	<u>Kraft/POb</u> <u>(nN)</u>
1	0,1	8000	0,8
25	2,5	8000	20,0
45	4,5	8000	36,0
65	6,5	8000	52,0
95	9,5	8000	76,0

<u>Scherspannung</u> <u>(dyn/cm²)</u>	<u>Scherspannung</u> <u>(N/m²)</u>	<u>Zellfläche</u> <u>(µm²)</u>	<u>Kraft/MG-63</u> <u>(nN)</u>
1	0,1	2500	0,25
25	2,5	2500	6,25
45	4,5	2500	11,25
65	6,5	2500	16,25
95	9,5	2500	23,75

Die Osteosarkomazellen MG-63 wiesen geringere absolute Zugkraftwerte auf. Diese lagen zwischen 3,4 nN und 222,4 nN (SD in %: 8,0 bis 48,3; n=6). Aufgrund der kleineren Zellfläche ergaben sich jedoch höhere Werte für die Schubspannungen, wenn man die Zellgröße mit einbezieht. Diese befanden sich dann zwischen 15,3 dyn/cm² und 618,3 dyn/cm² (Mittelwert: 329,2).

Die Zellen wurden anschließend mit 65 dyn/cm² belastet und die Zugkräfte nach 60 s, 120 s und 180 s und wieder eingestelltem Grundfluss gemessen.

Bei den POB (n=4) zeigten sich nach 60 s keinerlei signifikante Veränderungen in der Zugkraft, nach 120 s bei POB D eine signifikante Abnahme (p=0,05) und nach 180 s bei POB C eine Zunahme und bei POB A eine Abnahme der Zugkraft. Somit traten Änderungen erst nach dem ersten Intervall von 60s auf.

Ähnliches konnte bei den Osteosarkomazellen MG-63 gemessen werden. Bei diesen waren nach 60 s Belastung mit 65 dyn/cm^2 ebenfalls keine Änderungen zu verzeichnen ($n=6$). Erst nach 120 s konnte bei MG-63 F eine signifikante Abnahme der Zugkraft ($p=0,05$) gemessen werden, bei MG-63 E nach 180 s und bei beiden eine Abnahme bei wieder eingestelltem Grundfluss von 1 dyn/cm^2 nach Belastungsende. Bei MG-63 A zeigte sich nach 180 s eine Zunahme der Zugkraft.

Intrazelluläre Kalziumanstiege nach Belastungsbeginn waren meist nicht innerhalb weniger Millisekunden, aber schon innerhalb der ersten 60 Sekunden vorhanden und somit vor Veränderung der Zugkräfte. Dies würde konform mit den Ergebnissen von Chen gehen, in dessen Arbeit mit Osteoblasten unter Fluss die Reorganisation von Aktinbündeln durch Blockierung von Kalziumkanälen inhibiert wurde (Chen et al., 2000).

Mit fluider Scherspannung können osteoblastäre Zellen stimuliert und intrazelluläre Kalziumantworten hervorgerufen werden, wenn auch maximal bei 26,4 %. Die hierzu notwendigen Kräfte pro Zelle lagen für POb bei maximal 52 nN und für MG-63 bei 16 nN (Scherspannung von 65 dyn/cm^2 bezogen auf Zellfläche). In unserem Labor wurden POb direkt mechanisch durch Kompression der Zellmembran mit der Rasterkraftmikroskopie stimuliert. Hierbei wurden unter 110 nN keinerlei Kalziumantworten ausgelöst und die durchschnittlich nötige Kraft zum Auslösen eines intrazellulären Kalziumanstiegs lag bei 300 nN (Struckmeier, 2001).

110 nN entsprechen für POb einer notwendigen fluiden Scherspannung von circa 140 dyn/cm^2 , was weit außerhalb des physiologischen Bereiches läge. So sind die Knochenzellen sensitiver für durch Flüssigkeitsströme erzeugte Scherspannungen. Wo aber der Mechanosensor genau lokalisiert ist, ist noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Der Mittelwert der gemessenen Zugkräfte für POb bei Grundfluss mit 1 dyn/cm^2 lag bei circa 224 nN. Bei 1 dyn/cm^2 Scherspannung wirkt somit circa 0,8 nN auf die Zelle, also 0,4% der Adhäsionskraft.

Erfolgt nun die Belastung mit 9% der Adhäsionskraft (Scherspannung 25 dyn/cm²; circa 20 nN pro Zelle) zeigen 7,8% der Zellen einen Kalziumanstieg. Bei 16% der Adhäsionskraft (Scherspannung 45 dyn/cm²; circa 36 nN pro Zelle) sind es 16% der Zellen. Bei weiterer Steigerung auf 23% der Zugkraft (Scherspannung 65 dyn/cm²; circa 52 nN pro Zelle) ist kein wesentlicher Anstieg der Zellzahl (17%) mit Kalziumantwort zu verzeichnen, so dass ab einem bestimmtem Wert die sensiblen Zellen stimuliert werden. Eine weitere Erhöhung der Kraft führt nicht zu einer Zunahme der Zellen mit Kalziumantwort.

Für zukünftige Experimente wäre eine gleichzeitige Messung der intrazellulären Kalziumveränderungen über Fluoreszenzfarbstoffe und der Zugkräfte der Zelle von Vorteil, um eine exakte zeitliche Korrelation herstellen zu können. Die technischen Voraussetzungen waren bis jetzt nicht gegeben.

5 Zusammenfassung

Der Knochen zeigt sich anpassungsfähig und nimmt die auf das Skelettsystem wirkenden Kräfte auf. Die Knochenzellen im lakuno-kanalikulären Netzwerk sind dabei Flüssigkeitsströmen und daraus resultierenden Scherspannungen, die auf die Knochenzellen auftreffen, ausgesetzt.

Mit der Frage der Mechanosensitivität und Aktivierung intrazellulärer kalziumabhängiger Signaltransduktionswege wurden primäre bovine Osteoblasten in einer von Usami entwickelten Gradientenflusskammer Scherspannungen von 25, 45, 65 und 95 dyn/cm² und Osteosarkomazellen MG-63 25 und 45 dyn/cm² ausgesetzt. Im Weiteren erfolgten Messungen der Zugkräfte der Zellen unter Anwendung der traction-force-Methode nach Dembo und Wang unter Grundfluss und Belastung mit 65 dyn/cm².

Die POB wurden nach unterschiedlich langen Zelladhäsionszeiten zwischen zwei und fünf Tagen auf dem Deckglas verwendet. Bei fast allen Belastungsexperimenten zeigten die POB eine signifikante Zunahme (Ausnahme bei 25 dyn/cm² und zwei- und viertägiger Zelladhäsionszeit) der Anzahl von Zellen mit intrazellulärem Kalziumanstieg (6,0% bis 26,4%) im Vergleich zum Grundfluss mit 1 dyn/cm², was auf eine Mechanosensitivität gegenüber Scherspannungen schließen lässt. Auch zeigten sich gleiche Anteile von Zellen mit Kalziumantwort bei Doppelbelastung mit 45 dyn/cm². Maximale Zellansprechraten von 26,4% konnten bei fünftägiger Zelladhäsionszeit erreicht werden, wobei hierbei die zunehmende Konfluenz der Zellen mit Ausbildung von gap-junctions eine Rolle spielen dürfte. Keine signifikante Steigerung der Zellenanzahl mit Kalziumerhöhung ergab sich bei einer horizontalen Auswertung aller POB bei Zunahme der Scherspannung von 45 auf 65 dyn/cm², so dass von einem Schwellenwert auszugehen ist, von dem an Zellen, die sich in einer mechanosensiblen Phase befinden, reagieren.

Die Osteosarkomazellen MG-63 wiesen ebenfalls eine Aktivierung intrazellulärer kalziumabhängiger Signaltransduktionswege bei Belastung mit Scherspannung auf, wobei sich bei 25 dyn/cm² ein Anteil von 13,0% und bei 45

dyn/cm² von 14,2% zeigte. Grenzwertige Signifikanzen ($\chi^2=3,92$ bzw. $\chi^2=4,27$; kritischer Wert $\chi^2=3,84$) ergaben sich durch den erhöhten Anteil von Zellen mit Kalziumerhöhung während des Grundflusses als Kontrollwert. Bei Doppelbelastung mit 45 dyn/cm² ergaben sich ebenfalls gleiche Anteile von Zellen mit Kalziumantwort in beiden Belastungsphasen.

Während des Grundflusses mit 1 dyn/cm² konnten bei POb mit der traction-force-Methode Zugkräfte zwischen 60,4 nN und 464,9 nN gemessen werden, was bezogen auf die Zellfläche Schubspannungswerten zwischen 92,9 dyn/cm² und 546,9 dyn/cm² entsprach. Für MG-63 fanden sich Zugkräfte zwischen 3,4 nN und 222,4 nN (Schubspannung zwischen 15,3 und 618,3 dyn/cm²). Signifikante Änderungen der zellulären Zugkräfte zeigten sich nach 60 Sekunden bei Scherspannungsbelastung mit 65 dyn/cm² bei beiden Zelltypen nicht. Veränderungen fanden sich partiell erstmals bei Messungen nach 120 Sekunden, so dass intrazelluläre Kalziummobilisationen den Veränderungen der Zugkräfte unter Scherspannungsbelastung vorausgehen.

Zur genaueren räumlichen und zeitlichen Zuordnung der zellulären Reaktionen wäre eine gleichzeitige Messung beider Parameter notwendig. Dies wird durch technische Modifikationen in Zukunft möglich werden und so den Inhalt weiterer Forschungen darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Aarden, E. M., P. J. Nijweide, A. Vanderplas, M. J. Alblas, E. J. Mackie, M. A. Horton, and M. H. Helfrich. Adhesive properties of isolated chick osteocytes in-vitro. *Bone* 18:305-313: 305-313, 1996.
2. Abou-Samra, A. B., H. Juppner, T. Force, M. W. Freeman, X. F. Kong, E. Schipani, P. Urena, J. Richards, J. V. Bonventre, J. T. Potts, Jr., and . Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 89: 2732-2736, 1992.
3. Ajubi, N. E., J. Klein-Nulend, P. J. Nijweide, T. Vrijheid-Lammers, M. J. Alblas, and E. H. Burger. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes--a cytoskeleton-dependent process. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 225: 62-68, 1996.
4. Allen, F. D., C. T. Hung, S. R. Pollack, and C. T. Brighton. Serum modulates the intracellular calcium response of primary cultured bone cells to shear flow. *J.Biomech.* 33: 1585-1591, 2000.
5. Arora, P. D., K. J. Bibby, and C. A. McCulloch. Slow oscillations of free intracellular calcium ion concentration in human fibroblasts responding to mechanical stretch. *J.Cell Physiol.* 161: 187-200, 1994.
6. Bakker, A. D., M. Joldersma, J. Klein-Nulend, and E. H. Burger. Interactive effects of PTH and mechanical stress on nitric oxide and PGE2 production by primary mouse osteoblastic cells. *Am.J.Physiol/Endocrinol.Metab* 285: E608-E613, 2003.

7. Banes, A. J., M. Tsuzaki, J. Yamamoto, T. Fischer, B. Brigman, T. Brown, and L. Miller. Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem.Cell Biol.* 73: 349-365, 1995.
8. Barakat, A. I. and P. F. Davies. Mechanisms of shear stress transmission and transduction in endothelial cells. *Chest* 114: 58S-63S, 1998.
9. BASSETT, C. A. and I. HERRMANN. Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature* 190:460-1.: 460-461, 1961.
10. Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325, 1993.
11. Berridge, M. J., M. D. Bootman, and P. Lipp. Calcium--a life and death signal [news]. *Nature* 395: 645-648, 1998.
12. Bizzarri, C. and R. Civitelli. Activation of the Ca²⁺ message system by parathyroid hormone is dependent on the cell cycle. *Endocrinology* 134: 133-140, 1994.
13. Boyle, W. J., W. S. Simonet, and D. L. Lacey. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342, 2003.
14. Braidman, I. P., L. K. Davenport, D. H. Carter, P. L. Selby, E. B. Mawer, and A. J. Freemont. Preliminary in situ identification of estrogen target cells in bone. *J.Bone Miner.Res.* 10: 74-80, 1995.
15. Brain, K. L. and M. R. Bennett. Calcium in sympathetic varicosities of mouse vas deferens during facilitation, augmentation and autoinhibition. *J.Physiol* 502: 521-536, 1997.

16. Bromme, B. Charakterisierung der mechanosensitiven Signaltransduktion in Osteoblasten anhand der Extrazellulär Regulierten Kinase / ERK. 2001. Philipps-Universität Marburg. Dissertation
17. Brown, T. D. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J.Biomech.* 33: 3-14, 2000.
18. Burger, E. H. and J. Klein-Nulend. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J.* 13 Suppl:S101-12.: S101-S112, 1999.
19. Burr, D. B. and R. B. Martin. Errors in bone remodeling: toward a unified theory of metabolic bone disease. *Am.J.Anat.* 186: 186-216, 1989.
20. Chen, N. X., K. D. Ryder, F. M. Pavalko, C. H. Turner, D. B. Burr, J. Qiu, and R. L. Duncan. Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 278: C989-C997, 2000.
21. Civitelli, R., I. R. Reid, S. Westbrook, L. V. Avioli, and K. A. Hruska. PTH elevates inositol polyphosphates and diacylglycerol in a rat osteoblast-like cell line. *Am.J.Physiol* 255: E660-E667, 1988.
22. Cowin, S. C. On mechanosensation in bone under microgravity. *Bone* 22: 119S-125S, 1998.
23. Curtze, S., M. Dembo, M. Miron, and D. B. Jones. Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells. *J.Cell Sci* 117: 2721-2729, 2004.
24. Davies, P. F., A. Robotewskyj, and M. L. Griem. Quantitative studies of endothelial cell adhesion. Directional remodeling of focal adhesion sites in response to flow forces. *J.Clin.Invest* 93: 2031-2038, 1994.
25. Dembo, M. and Y. L. Wang. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys.J.* 76: 2307-2316, 1999.

26. Di, V. F., T. H. Steinberg, and S. C. Silverstein. Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium* 11: 57-62, 1990.
27. Donahue, H. J. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* 26: 417-422, 2000.
28. Donahue, S. W., C. R. Jacobs, and H. J. Donahue. Flow-induced calcium oscillations in rat osteoblasts are age, loading frequency, and shear stress dependent. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281: C1635-C1641, 2001.
29. Donahue, S. W., H. J. Donahue, and C. R. Jacobs. Osteoblastic cells have refractory periods for fluid-flow-induced intracellular calcium oscillations for short bouts of flow and display multiple low-magnitude oscillations during long-term flow. *J.Biomech.* 36: 35-43, 2003.
30. Donahue, T. L., T. R. Haut, C. E. Yellowley, H. J. Donahue, and C. R. Jacobs. Mechanosensitivity of bone cells to oscillating fluid flow induced shear stress may be modulated by chemotransport. *J.Biomech.* 36: 1363-1371, 2003.
31. Doty, S. B. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif.Tissue Int.* 33: 509-512, 1981.
32. Ducy, P., T. Schinke, and G. Karsenty. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289: 1501-1504, 2000.
33. Ducy, P., M. Amling, S. Takeda, M. Priemel, A. F. Schilling, F. T. Beil, J. Shen, C. Vinson, J. M. Rueger, and G. Karsenty. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100: 197-207, 2000.
34. Duncan, R. L. and C. H. Turner. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif.Tissue Int.* 57: 344-358, 1995.

35. Duncan, R. L., K. A. Akanbi, and M. C. Farach-Carson. Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin.Nephrol.* 18: 178-190, 1998.
36. Duriez, J., B. Flautre, M. C. Blary, and P. Hardouin. Effects of the calcium channel blocker nifedipine on epiphyseal growth plate and bone turnover: a study in rabbit. *Calcif.Tissue Int.* 52: 120-124, 1993.
37. FRANGOS, J. A., S. G. Eskin, L. V. McIntyre, and C. L. Ives. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227.:1477.-1479. : 1985.
38. Frost, H. M. Dynamics of bone remodelling. In Thomas, S., ed. Bone biodynamics. 1963, 313-333.
39. Frost, H. M. A determinant of bone architecture. The minimum effective strain. *Clin.Orthop.* 286-292, 1983.
40. Glücksmann, A. The role of tension and pressure in chondrogenesis. Studies on bone mechanics in vitro. *Anatomical Record* 73. 1939, 39-56.
41. Goodship, A. E., L. E. Lanyon, and H. McFie. Functional adaptation of bone to increased stress. An experimental study. *J.Bone Joint Surg.Am.* 61: 539-546, 1979.
42. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* 260: 3440-3450, 1985.
43. Guan, J. L. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29: 1085-1096, 1997.
44. Guharay, F. and F. Sachs. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J.Physiol* 352:685-701.: 685-701, 1984.

45. Harada, S. and G. A. Rodan. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-355, 2003.
46. Harris, A. K., P. Wild, and D. Stopak. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* 208: 177-179, 1980.
47. Huiskes, R., R. Ruimerman, G. H. van Lenthe, and J. D. Janssen. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 405: 704-706, 2000.
48. Hung, C. T., S. R. Pollack, T. M. Reilly, and C. T. Brighton. Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow. *Clin.Orthop.* 256-269, 1995.
49. Hyman, W. A. Shear flow over a protrusion from a plane wall. *J.Biomech.* 5: 45-48, 1972.
50. Ingber, D. E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu.Rev.Physiol.* 59:575-99: 575-599, 1997.
51. Jacobs, C. R., C. E. Yellowley, B. R. Davis, Z. Zhou, J. M. Cimbala, and H. J. Donahue. Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells. *J.Biomech.* 31: 969-976, 1998.
52. Jones, D. B. and J. G. Scholuebbbers. Evidence that phospholipase C mediates the mechanical stress effect in bone. *Calcif.Tiss.Int.* 41:supp p4: supp, 1987.
53. Jones, D. B., H. Nolte, J.-G. Scholubbers, E. Turner, and D. Veltel. Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* 12:101-110: 101-110, 1991.
54. Jones, D. B. and D. BINGAMNN. How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? *Cells and.Methods* 1:329-340: 329-340, 1991.

55. Jones, D. B., G. Leivseth, and J. Tenbosch. Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem.Cell Biol.* 73: 525-534, 1995.
56. Junqueira, L. C. and J. Carneiro. Histologie. Springer-Verlag. 1991.
57. Kawata, A. and Y. Mikuni-Takagaki. Mechanotransduction in stretched osteocytes--temporal expression of immediate early and other genes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 246: 404-408, 1998.
58. Khosla, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5055, 2001.
59. Kontulainen, S., P. Kannus, H. Haapasalo, H. Sievanen, M. Pasanen, A. Heinonen, P. Oja, and I. Vuori. Good maintenance of exercise-induced bone gain with decreased training of female tennis and squash players: a prospective 5-year follow-up study of young and old starters and controls. *J.Bone Miner.Res.* 16: 195-201, 2001.
60. Krolner, B. and Toft, B. Vertebral bone loss: an unheeded side effect of therapeutic bed rest. *Clin.Sci (Colch.)* (64), 537-540. 1963.
Ref Type: Abstract
61. Kufahl, R. H. and S. Saha. A theoretical model for stress-generated fluid flow in the canaliculi- lacunae network in bone tissue. *J.Biomech.* 23: 171-180, 1990.
62. Kurokouchi, K., C. R. Jacobs, and H. J. Donahue. Oscillating Fluid Flow Inhibits TNF-a-Induced NF-kappaB Activation via an IkappaB Kinase Pathway in Osteoblast-Like UMR106 Cells. *J.Biol.Chem.* .: 2000.
63. Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W. J. Boyle. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93: 165-176, 1998.

64. LaCroix, P. The internal remodelling of bones. In Bourne, G. H., ed. The biochemistry and physiology of bone. New York, Academic Press. 1971, 119-144.
65. Lanyon, L. E. and C. T. Rubin. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J.Biomech.* 17: 897-905, 1984.
66. LeBlanc, A., L. Shackelford, and V. Schneider. Future human bone research in space. *Bone* 22: 113S-116S, 1998.
67. Li, C., Z. Hu, and Y. Li. Poisson's ratio in polymer gels near the phase-transition point. *PHYSICAL.REVIEW.E.STATISTICAL.PHYSICS., PLASMAS., FLUIDS, AND RELATED.INTERDISCIPLINARY.TOPICS.* 48: 603-606, 1993.
68. Li, W., R. L. Duncan, N. J. Karin, and M. C. Farach-Carson. 1,25 (OH)₂D₃ enhances PTH-induced Ca²⁺ transients in preosteoblasts by activating L-type Ca²⁺ channels. *Am.J.Physiol* 273: E599-E605, 1997.
69. Lindl, T. and J. Bauer. Zell- und Gewebekultur. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart - Jena - New York. 1994.
70. Maravall, M., Z. F. Mainen, B. L. Sabatini, and K. Svoboda. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys.J.* 78: 2655-2667, 2000.
71. Marks, S. C., Jr. and S. N. Popoff. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am.J.Anat.* 183: 1-44, 1988.
72. McAllister, T. N., T. Du, and J. A. FRANGOS. Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 270: 643-648, 2000.

73. Meyer, U., T. Meyer, and D. B. Jones. No mechanical role for vinculin in strain transduction in primary bovine osteoblasts. *Biochemistry And.Cell Biology.-Biochimie Et.Biologie.Cellulaire.* 75:81-87: 81-87, 1997.
74. Minkowitz, B., A. L. Boskey, J. M. Lane, H. S. Pearlman, and V. J. Vigorita. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. *J.Orthop.Res.* 9: 869-875, 1991.
75. Minta, A., J. P. Kao, and R. Y. Tsien. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J.Biol.Chem.* 264: 8171-8178, 1989.
76. Mullender, M. G. and R. Huiskes. Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone? *Bone* 20: 527-532, 1997.
77. Neer, R. M., C. D. Arnaud, J. R. Zanchetta, R. Prince, G. A. Gaich, J. Y. Reginster, A. B. Hodsmann, E. F. Eriksen, S. Ish-Shalom, H. K. Genant, O. Wang, and B. H. Mitlak. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N.Engl.J.Med.* 344: 1434-1441, 2001.
78. Ochoa, J. A., A. P. Sanders, D. A. Heck, and B. M. Hillberry. Stiffening of the femoral head due to inter-trabecular fluid and intraosseous pressure. *J.Biomech.Eng* 113: 259-262, 1991.
79. Ogata, T. Fluid flow induces enhancement of the Egr-1 mRNA level in osteoblast-like cells: involvement of tyrosine kinase and serum. *J.Cell Physiol* 170: 27-34, 1997.
80. Olesen, S. P., D. E. Clapham, and P. F. Davies. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* 331: 168-170, 1988.

81. Owan, I., D. B. Burr, C. H. Turner, J. Qiu, Y. Tu, J. E. Onyia, and R. L. Duncan. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am.J.Physiol.* 273: C810-C815, 1997.
82. Oxlund, H., C. Ejersted, T. T. Andreassen, O. Topping, and M. H. Nilsson. Parathyroid hormone (1-34) and (1-84) stimulate cortical bone formation both from periosteum and endosteum. *Calcif.Tissue Int.* 53: 394-399, 1993.
83. Palmer, R. K., D. I. Yule, D. S. Shewach, J. A. Williams, and S. K. Fisher. Paracrine mediation of calcium signaling in human SK-N-MCIXC neuroepithelioma cells. *Am.J.Physiol.* 271: C43-C53, 1996.
84. Parfitt, A. M. The physiological and clinical significance of bone histomorphometric data. In Becker, ed. Bone histomorphometry. CRC Press, Boca Raton. 1983, 143-223.
85. Pavalko, F. M., N. X. Chen, C. H. Turner, D. B. Burr, S. Atkinson, Y. F. Hsieh, J. Qiu, and R. L. Duncan. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am.J.Physiol.* 275: C1591-C1601, 1998.
86. Pavalko, F. M., S. M. Norvell, D. B. Burr, C. H. Turner, R. L. Duncan, and J. P. Bidwell. A model for mechanotransduction in bone cells: the load-bearing mechanosomes. *J.Cell Biochem.* 88: 104-112, 2003.
87. Peake, M. A. and A. J. El Haj. Preliminary characterisation of mechanoresponsive regions of the c-fos promoter in bone cells. *FEBS Lett.* 537: 117-120, 2003.
88. Pelham, R. J., Jr. and Y. Wang. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 94: 13661-13665, 1997.

89. Piekarski, K. and M. Munro. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature* 269: 80-82, 1977.
90. Poenie, M., J. Alderton, R. Steinhardt, and R. Tsien. Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase. *Science* 233: 886-889, 1986.
91. Prentki, M., M. C. Glennon, A. P. Thomas, R. L. Morris, F. M. Matschinsky, and B. E. Corkey. Cell-specific patterns of oscillating free Ca²⁺ in carbamylcholine-stimulated insulinoma cells. *J.Biol.Chem.* 263: 11044-11047, 1988.
92. Radmacher, M., R. W. Tillamnn, M. Fritz, and H. E. Gaub. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science* 257: 1900-1905, 1992.
93. Rawlinson, S. C., A. J. El Haj, S. L. Minter, I. A. Tavares, A. Bennett, and L. E. Lanyon. Loading-related increases in prostaglandin production in cores of adult canine cancellous bone in vitro: a role for prostacyclin in adaptive bone remodeling? *J.Bone Miner.Res.* 6: 1345-1351, 1991.
94. Reeve, J. A stochastic analysis of iliac trabecular bone dynamics. *Clin.Orthop.* 264-278, 1986.
95. Reich, K. M., C. V. Gay, and J. A. FRANGOS. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J.Cell Physiol* 143: 100-104, 1990.
96. Reich, K. M. and J. A. FRANGOS. Effect of flow on prostaglandin E2 and inositol trisphosphate levels in osteoblasts. *Am.J.Physiol.* 261: C428-C432, 1991.
97. Reich, K. M. and J. A. FRANGOS. Protein kinase C mediates flow-induced prostaglandin E2 production in osteoblasts. *Calcif.Tissue Int.* 52: 62-66, 1993.

98. Ridgway, E. B. and C. C. Ashley. Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 29: 229-234, 1967.
99. Riggs, B. L., S. Khosla, and L. J. Melton, III. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr.Rev.* 23: 279-302, 2002.
100. Robey, P. G. The biochemistry of bone. Metabolic bone disease. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 1989, 859-884.
101. Robling, A. G., D. B. Burr, and C. H. Turner. Partitioning a daily mechanical stimulus into discrete loading bouts improves the osteogenic response to loading. *J.Bone Miner.Res.* 15: 1596-1602, 2000.
102. Rodan, G. A., L. A. Bourret, A. Harvey, and T. Mensi. Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodeling. *Science* 189: 467-469, 1975.
103. Rodan, G. A. and T. J. Martin. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289: 1508-1514, 2000.
104. Roux, W. Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungmechanik der Organismen. Engelmann, Leipzig. 1895.
105. Rowland, R. E. Exchangeable bone calcium. *Clin.Orthop.* 49:233-48.: 233-248, 1966.
106. Satcher, R. L., Jr., S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone, Jr., and C. F. Dewey, Jr. The distribution of fluid forces on model arterial endothelium using computational fluid dynamics. *J.Biomech.Eng* 114: 309-316, 1992.
107. Simon, A., T. Cohen-Bouhacina, M. C. Porte, J. P. Aime, J. Amedee, R. Bareille, and C. Baquey. Characterization of dynamic cellular adhesion of osteoblasts using atomic force microscopy. *Cytometry* 54A: 36-47, 2003.

108. Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, W. J. Boyle, and . Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-319, 1997.
109. Smalt, R., F. T. Mitchell, R. L. Howard, and T. J. Chambers. Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am.J.Physiol.* 273: E751-E758, 1997.
110. Solomon, C. G. and R. G. Dluhy. Rethinking postmenopausal hormone therapy. *N.Engl.J.Med.* 348: 579-580, 2003.
111. Struckmeier, J. Spektroskopische Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktion in mechanisch stimulierten Osteoblasten. 2001. Philipps-Universität Marburg. Dissertation
112. Struckmeier, J., E. Klopp, M. Born, M. Hofmann, D. J. D. Rink, and H. Butt. Real-time atomic force fluorescence microscopy on living cells. *Proceedings-SPIE the International Society for optical engineering* 4434: 142-149, 2001.
113. Sukharev, S. I., W. J. Sigurdson, C. Kung, and F. Sachs. Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL. *J.Gen.Physiol* 113: 525-540, 1999.
114. Sun, X. P., N. Callamaras, J. S. Marchant, and I. Parker. A continuum of InsP3-mediated elementary Ca²⁺ signalling events in *Xenopus* oocytes. *J.Physiol* 509: 67-80, 1998.
115. Takahashi, A., P. Camacho, J. D. Lechleiter, and B. Herman. Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev.* 79: 1089-1125, 1999.

116. Takeda, S., F. Elefteriou, R. Levasseur, X. Liu, L. Zhao, K. L. Parker, D. Armstrong, P. Ducy, and G. Karsenty. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111: 305-317, 2002.
117. Tate, M. L. and U. Knothe. An ex vivo model to study transport processes and fluid flow in loaded bone. *J.Biomech.* 33: 247-254, 2000.
118. Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508, 2000.
119. Tenbosch, J. Untersuchungen zum Einfluß mechanischer Deformation auf Osteoblasten. 1999. Philipps-Universität Marburg, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik. Dissertation
120. Thornton, W. E., V. Hedge, E. Coleman, J. J. Uri, and T. P. Moore. Changes in leg volume during microgravity simulation. *Aviat.Space Environ.Med.* 63: 789-794, 1992.
121. Tsien, R. Y. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290: 527-528, 1981.
122. Tsien, R. Y., T. Pozzan, and T. J. Rink. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J.Cell Biol.* 94: 325-334, 1982.
123. Tsien, R. Y. Fluorescent probes of cell signaling. *Annu.Rev.Neurosci.* 12:227-53.: 227-253, 1989.
124. Turner, C. H. and F. M. Pavalko. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation [In Process Citation]. *J.Orthop.Sci.* 3: 346-355, 1998.

125. Udagawa, N., N. Takahashi, H. Yasuda, A. Mizuno, K. Itoh, Y. Ueno, T. Shinki, M. T. Gillespie, T. J. Martin, K. Higashio, and T. Suda. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141: 3478-3484, 2000.
126. Usami, S., H. H. Chen, Y. Zhao, S. Chien, and R. Skalak. Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Ann.Biomed.Eng.* 21: 77-83, 1993.
127. van, K. T., J. M. Schakenraad, van der Mei HC, and H. J. Busscher. Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces. *J.Biomed.Mater.Res.* 26: 725-738, 1992.
128. Vico, L., P. Collet, A. Guignandon, M. H. Lafage-Proust, T. Thomas, M. Rehaillia, and C. Alexandre. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *Lancet* 355: 1607-1611, 2000.
129. Wang, Y. L. and R. J. Pelham, Jr. Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods Enzymol.* 298:489-96.: 489-496, 1998.
130. Watts, N. B. Bisphosphonate treatment of osteoporosis. *Clin.Geriatr.Med.* 19: 395-414, 2003.
131. Williams, J. L., J. P. Iannotti, A. Ham, J. Bleuit, and J. H. Chen. Effects of fluid shear stress on bone cells. *Biorheology.* 31: 163-170, 1994.
132. Wolff, J. Das Gesetz der Transformation der Knochen. *Hirschwald, Berlin* 1892.
133. Wong, G. Isolation and Behavior of Isolated Bone-Forming Cells. The Osteoblast and the Osteocyte. Telford Press 494. 1990.

134. YOUNG, R. W. Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats. *J.Cell Biol.* 14:357-70.: 357-370, 1962.
135. Zaman, G., M. Z. Cheng, H. L. Jessop, R. White, and L. E. Lanyon. Mechanical strain activates estrogen response elements in bone cells. *Bone* 27: 233-239, 2000.

7 Anhang

7.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Daut, Berger, Ganz, Gemsa, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Gröne, Happle, Hasilik, Hofmann, Jones, Joseph, Katschinski, Kern, Kleine, Klenk, Klose, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lennartz, Maisch, Mennel, Moosdorf, Oertel, Renz, Richter, Remschmidt, Rothmund, Schäfer, Schachtschabel, Schmidt, Schneider, Seyberth, Slenczka, Sturm, Thomas, Voigt, Weihe, Werner, von Wichert.

7.2 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. D. B. Jones Ph.D.M.I.Biol für die Überlassung des Themas der Dissertation und für die zahlreichen Gespräche zur Klärung aufgetretener Probleme während der Experimente.

Darüber hinaus wird mir der Forschungsaufenthalt in Bordeaux mit den Experimenten in Schwerelosigkeit bei der 26. Parabelflugkampagne der ESA stets in Erinnerung bleiben. Für die Ermöglichung der Teilnahme durch Prof. D. B. Jones möchte ich mich nochmals im Besonderen bedanken.

Für seine stete Präsenz im Labor und seine unermüdliche Unterstützung nicht nur meiner Dissertation geht ein herzliches Dankeschön an Dr. rer.phil. J. Tenbosch.

Hervorzuheben ist das gute Arbeitsklima in der Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik. Großen Anteil daran hatten die anderen Doktoranden, aber vor allem die beiden medizinisch-technischen Assistenten Marita Kratz und Weng Tan, denen mein Dank dafür und für die Unterstützung bei den Arbeiten mit der Zellkultur gewidmet ist. Vor allem danke ich Weng Tan für die tatkräftige Unterstützung der Zugkraftmessungen an Osteoblasten.

Für die Mithilfe bei der Auswertung und Interpretation der Zugkraftmessungen bedanke ich mich bei Sami Curtze.

Aus dem Team soll auch nicht Torsten Pohl vergessen werden, der durch seine feinmechanischen Arbeiten erst so manches Experiment möglich gemacht hat.

Abschließend bedanke ich mich nicht nur für die finanzielle Unterstützung während der Jahre des Studiums bei meinen Eltern. Ohne ihre uneingeschränkte Unterstützung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Gleichzeitig sind hier ebenfalls meine Tanten Ingrid und Gerlinde Rieger zu nennen.



Arbeitsgruppe Prof. D. B. Jones (Foto Airbus: ESA)

7.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Einfluss fluider Scherspannungen auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten

im Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter Leitung von Prof. David B. Jones Ph.D.M.I.Biol mit Unterstützung durch Diplombiologe Jochen Tenbosch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 25.1.2005