

Aus dem CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie (CCM)
Direktor: Prof. Dr. med. Gerd-Rüdiger Burmester

Habilitationsschrift

Osteoimmunologische Prozesse in der initialen inflammatorischen Phase der Frakturheilung

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
im Fach Innere Medizin und Rheumatologie
vorgelegt dem Fakultätsrat der
Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Paula Hoff

Eingereicht: Oktober/2015
Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner
2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Steffen Gay

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 3 |
| 1.1 Frakturheilung | 3 |
| 1.2 Interaktion von Immunzellen und Knochenzellen | 6 |
| 1.3 Die initiale inflammatorische Phase der Frakturheilung | 6 |
| 1.4 Frakturheilung bei Patienten mit eingeschränkten Immunfunktionen | 7 |
| 1.5 Fragestellung | 9 |
| 2. Eigene Arbeiten | 10 |
| 2.1 Das frühe humane Frakturhämatom ist charakterisiert durch Inflammation und Hypoxie..... | 10 |
| 2.2 Anpassung und Überleben von humanen Immunzellen unter bioenergetisch widrigen Bedingungen in einem <i>in vitro</i> Frakturhämatom-Modell | 21 |
| 2.3 Immunologisch eingeschränkte Patienten zeigen eine ausgeprägte Inflammation sowie inadäquate Anpassung an Hypoxie im Frakturhämatom | 31 |
| 2.4 Durch präoperative Bestrahlung der Hüftregion zur Prävention von heterotoper Ossifikation vor einer Hüfttotalendoprothese-Operation wird lokal eine Entzündungsreaktion initiiert..... | 40 |
| 2.5 Hypoxie fördert Osteogenese und unterdrückt Adipogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen..... | 51 |
| 3. Diskussion | 64 |
| 4. Zusammenfassung | 72 |
| 5. Literatur | 74 |
| 6. Abkürzungsverzeichnis | 85 |
| 7. Danksagung | 86 |
| 8. Erklärung | 88 |

1. Einleitung

1.1 Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess, der mit einer inflammatorischen Phase beginnt [2]. Eine initiale Inflammation kommt nicht nur bei Frakturheilung vor, allgemein beginnen regenerative Prozesse mit einer Entzündungsreaktion [3]. Während jedoch z. B. bei der Wundheilung der Haut am Ende eine Narbe entsteht, kommt es bei der Frakturheilung zur Bildung von neuem Knochen. Das neu entstandene Gewebe ist also nicht nur bindegewebiger Ersatz, sondern gleicht der ursprünglichen Gewebezusammensetzung.

Nach der Fraktur formt sich im Frakturspalt durch Einblutung von Knochenmark und peripherem Blut aus zerrissenen Blutgefäßen ein Hämatom, das sogenannte Frakturhämatom. Das Frakturhämatom wird als der Ort angesehen, an dem die initiale inflammatorische Phase stattfindet [2]. Hier wird der Heilungsprozess initiiert. Im Anschluss kommt es während der Granulationsphase zur Ausbildung des sogenannten weichen Kallus, der die Frakturenden überbrückt. In der Folge kommt es zur Mineralisierung, und es entsteht Geflechtknochen. Im weiteren Verlauf wird dieser durch Lamellenknochen ersetzt und schließlich wird mit Abschluss der Frakturheilung die normale Knochenstruktur

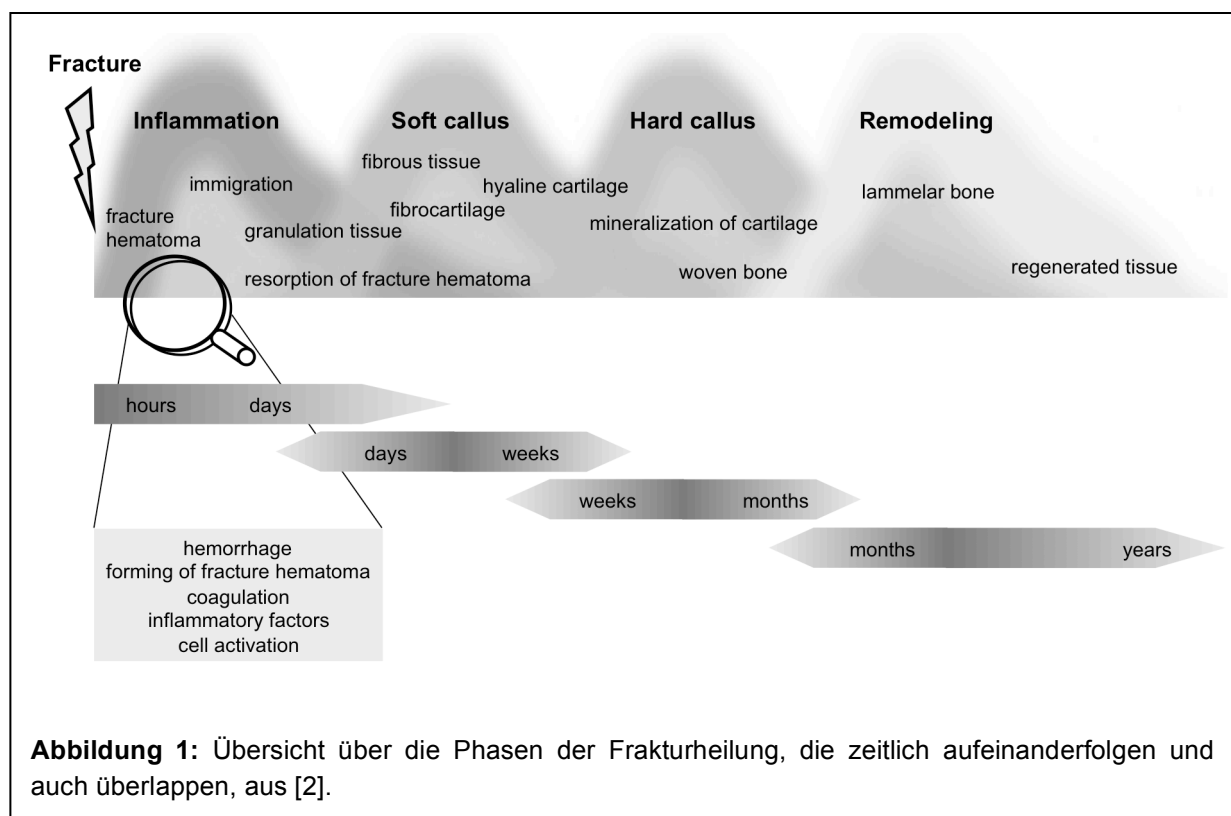


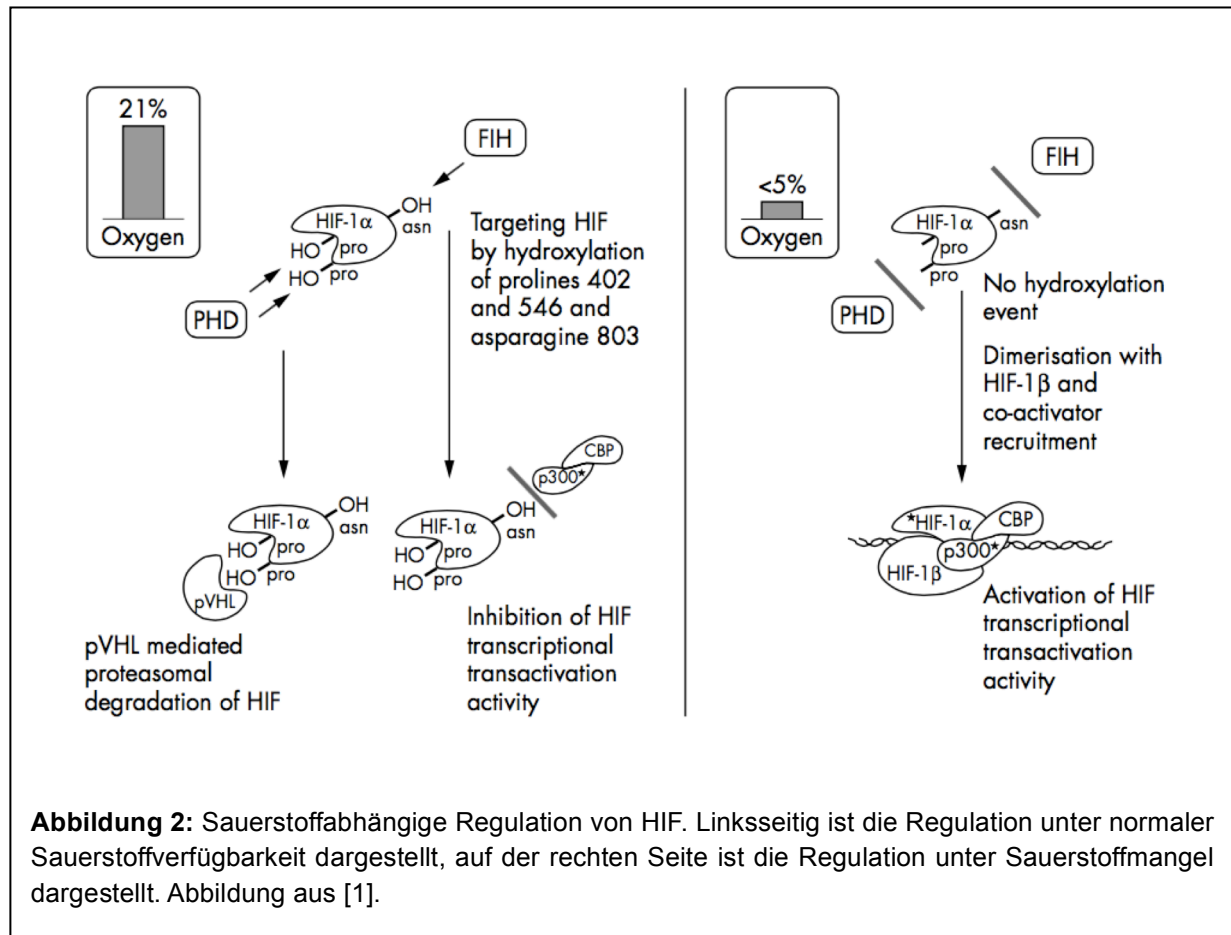
Abbildung 1: Übersicht über die Phasen der Frakturheilung, die zeitlich aufeinanderfolgen und auch überlappen, aus [2].

wiederhergestellt (Remodeling). Eine Übersicht über die Frakturheilung findet sich in Abbildung 1 aus [2].

Aus Tiermodellen ist bekannt, dass eine Entfernung des Frakturhämatoms, des Ortes der initialen inflammatorischen Phase, eine verzögerte oder nicht erfolgreiche Frakturheilung zur Folge hat [4]. Aber auch aus biomechanischer Sicht ist die initiale Phase der Frakturheilung sehr empfindlich. Anfänglich fehlende optimale Fixation geht mit einem schlechten klinischen Ergebnis der Frakturheilung einher [5, 6]. In Zusammenschau ist es sehr wahrscheinlich, dass die klinischen Resultate einer Frakturheilung bereits während der initialen inflammatorischen Phase entscheidend beeinflusst und gelenkt werden können.

Durch das Auftreten einer Fraktur kommt es zu einem Gewebeschaden, der mit einem Zerreißen des Gefäßgeflechtes einhergeht. Hierdurch ist die Versorgung mit Sauerstoff sowie Nährstoffen vor Ort nicht mehr gewährleistet. Hinzu kommt, dass Knochenmark an sich bereits ein hypoxisches Gewebe ist [7]. Auf diese bioenergetisch ungünstigen Bedingungen wiesen bereits in der 1970er-Jahren der erniedrigte pH-Wert sowie die erhöhte Laktat-Konzentration im Frakturhämatom hin [8, 9]. Um die komplexen Prozesse der initialen Frakturheilung einleiten zu können, müssen die hierfür zuständigen Zellen in der Lage sein, sich an die bioenergetisch widrigen Bedingungen wie Sauerstoff- und Nährstoffmangel anzupassen [2]. Zumindest vorübergehend müssen diese Zellen nicht nur überleben, sondern auch ihre Funktionen ausführen. In den meisten Zellpopulationen wird zur Anpassung an den vorherrschenden Sauerstoffmangel die α -Untereinheit des Hypoxia Inducible Factor (HIF) stabilisiert. Bei ausreichender Sauerstoffverfügbarkeit wird die α -Untereinheit zwar ständig produziert, aber dann sofort degradiert (Abbildung 2). Die β -Untereinheit wird konstitutiv exprimiert. Nach Stabilisierung der α -Untereinheit wirkt das gesamte Molekül als Transkriptionsfaktor und HIF-regulierte Gene werden induziert. Die meisten bekannten Hypoxie-regulierten Gene sind HIF-reguliert. Zur Anpassung an die vorherrschende Hypoxie zählt HIF zu den wichtigsten Regulatorproteinen [1]. Frakturhämatomzellen sind ebenfalls in der Lage, sich durch HIF an Hypoxie anzupassen, wie wir auf RNA-Ebene bereits gezeigt haben [10]. Laktatdehydrogenase A (LDHA), Interleukin (IL)-6, IL-8, CXC Chemokine Receptor Type 4 (CXCR-4) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), die allesamt HIF-Zielgene sind, zeigten sich im Frakturhämatom erhöht exprimiert. Daraus kann indirekt auf eine HIF-vermittelte Hypoxie-Adaptation geschlossen werden.

Die Expression von LDHA, IL-6, IL-8, CXCR-4 und VEGF weist neben der Anpassung an Hypoxie auch auf die beginnende Entzündungsreaktion sowie die Weichenstellung für Neoangiogenese hin [10]. Darüber hinaus konnte in diesem sehr frühen Stadium im initialen Frakturhämatom unter den genannten bioenergetisch widrigen Bedingungen bereits die



Expression von Markern der Osteogenese, wie Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1, Proteinprodukt Osteopontin), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Runt-related Transcription Factor 2 (RUNX-2), gezeigt werden [10]. Dies galt für Patienten, die bis auf die Fraktur ansonsten gesund waren. In Patienten mit eingeschränkter Immundefizienz, wie z. B. bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder Neoplasien, konnten wir hingegen bereits im initialen Frakturhämatom eine Störung dieser Vorgänge nachweisen [11]. Hier zeigte sich im Vergleich zu den bis auf die Fraktur gesunden Patienten eine ausgeprägt hohe inflammatorische Reaktion, die mit einer Suppression des osteogenen Markers RUNX-2 einhergeht [11]. Darüber hinaus war in diesen Patienten die Adaptation der Frakturhämatomzellen auf die lokale Hypoxie auf Genebene inadäquat niedrig [11].

In einem *in vitro* Frakturhämatom-Modell konnten wir nachweisen, dass die Zellen im initialen Frakturhämatom unter bioenergetisch widrigen Bedingungen, Hypoxie sowie

Nährstoffmangel, in der Lage sind, die initiale inflammatorische Phase ohne ein weiteres exogenes Signal zu initiieren [12].

1.2 Interaktion von Immunzellen und Knochenzellen

Die Interaktionsmechanismen zwischen Osteoblasten, Osteoklasten, deren Vorläuferzellen und Immunzellen sind sehr vielschichtig. Diese Komplexität hat zur Definition dieses Forschungsgebietes als Osteoimmunologie geführt [13-16]. Unterschiedliche Immun- und Knochenzellen exprimieren eine Reihe von gleichen regulatorischen Molekülen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren. Hierdurch wird die enge Verknüpfung des Knochens mit dem Immunsystem betont [14, 16, 17]. Makrophagen und Osteoklasten entwickeln sich aus denselben Vorläuferzellen. Aktivierte T-Zellen sind in der Lage, durch die Expression von Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) die Osteoklastogenese zu fördern [17-20]. Die Sekretion von Interleukin-17 unterstützt ebenfalls die Osteoklastogenese [15, 21-23]. Andererseits kann die Osteoklastogenese auch durch regulatorische T-Zellen supprimiert werden [24-26]. Weiterhin kann die Osteogenese durch die Sekretion von Zytokinen wie Interferon- γ und IL-4 beeinflusst werden [13, 18]. Aber auch Osteoblasten werden durch Zytokine beeinflusst: Interferon- γ hemmt die Kollagensynthese [27], und Interleukin-4 lockt Osteoblasten an [28].

1.3 Die initiale inflammatorische Phase der Frakturheilung

Es war bislang allgemein anerkannt, dass die inflammatorische Phase die Frakturheilung beeinflusst. Allerdings wurde lange von der inflammatorischen Phase als der Phase ausgegangen, in welcher Immunzellen einwandern und den Entzündungs- sowie Abräumungsprozess beginnen. Dabei wurde bislang übersehen, dass bereits initial im primären Frakturhämatom Immunzellen vorhanden sind [2]. Das Frakturhämatom bildet sich nämlich aus als ein Gemisch des einblutenden Knochenmarks sowie nach Gefäßruptur des peripheren Blutes. Welche Rolle diese bereits von Beginn an vorhandenen Immunzellen in der inflammatorischen Phase spielen, war bislang weitgehend unbekannt. Es ist jedoch nachgewiesen worden, dass gerade dieses initiale Frakturhämatom bei der Frakturheilung

eine entscheidende Rolle spielt [29-33]. Es ist daher klar, dass das initiale Frakturhämatom wichtig ist für eine effektive Heilung [4, 34], die genaue regulatorische Rolle bei der Initiierung der Regeneration ist jedoch weitgehend unklar. Bislang war ebenfalls wenig über die immunologische Zusammensetzung in Bezug auf Zellen und humorale Faktoren bekannt.

Die Entfernung von Frakturhämatomen zwischen den Tagen 2 und 4 aber eben auch zwischen den Tagen 1 und 2 führt im Tiermodell zu einer verzögerten Frakturheilung oder einer Pseudarthrose [4, 34]. Wie wichtig das initiale Frakturhämatom ist, wird auch daraus ersichtlich, dass offene Frakturen durch ihre Art selbst, jedoch auch durch die zur Reduzierung des Infektionsrisikos notwendige Säuberung, mit einer Entfernung des Frakturhämatoms einhergehen. Offene Frakturen haben wahrscheinlich auch durch diese notwendige Entfernung des Frakturhämatoms ein schlechteres Ergebnis mit erhöhter Rate von verzögerten Frakturheilungen und Pseudarthrosen.

Interessanterweise ist ein frühes, 2 Tage altes Frakturhämatom offenbar nur in der Lage, erfolgreich eine Knochenneubildung zu initiieren, wenn eine Nachbarschaft mit dem Periosteum besteht. Hingegen kann ein 4 Tage altes Frakturhämatom bereits ektop Knochen produzieren, auch nach Implantation in einen Muskel, und somit ohne Kontakt zum Periosteum [35, 36]. Die gereiften Frakturhämatome beinhalten mesenchymale Stammzellen, die in der Lage sind, in die adipogene oder osteogene Richtung zu differenzieren [37, 38]. Ebenso wichtig ist, dass das humorale Frakturhämatom-Milieu (zellfreier Überstand) osteoinduktiv wirkt [36, 38]. Daher ist anzunehmen, dass in den gereiften Frakturhämatomen bereits sämtliche Weichen zur erfolgreichen Frakturheilung gelegt wurden.

1.4 Frakturheilung bei Patienten mit eingeschränkten Immunfunktionen

Patienten, die unter Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis oder dem Systemischen Lupus erythematodes leiden, zeigen gehäuft verzögerte Frakturheilung oder sogar die Entwicklung von Pseudarthrosen [39-42]. Aber auch Patienten mit anderweitig eingeschränkten Immunfunktionen wie Patienten mit Diabetes mellitus, Patienten unter einer immunsuppressiven Therapie bei malignen Grunderkrankungen oder Alkoholiker leiden gehäuft unter nicht optimaler Frakturheilung [11, 43-45]. Ob und inwieweit sich bis auf die

Fraktur gesunde Patienten von der Patientengruppe mit eingeschränkten Immunfunktionen bereits in der initialen Phase der Frakturheilung unterscheiden, war bislang unklar.

1.5 Fragestellung

Die initiale inflammatorische Phase der Frakturheilung ist weichenstellend für das Ergebnis der Heilung. Allerdings ist bislang wenig über die Zusammensetzung und die Vorgänge im initialen Frakturhämatom bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll das initiale Frakturhämatom näher beleuchtet werden, insbesondere unter Beachtung der bioenergetisch widrigen Bedingungen zum Beginn der Frakturheilung. Weiterhin soll in dieser Arbeit berücksichtigt werden, dass Patienten mit eingeschränkten Immunfunktionen zu einer schlechteren Frakturheilung neigen. Zu dieser Patientengruppe gehören auch Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie wir sie in der Rheumatologie betreuen.

Insgesamt bleibt die Erforschung des initialen Frakturhämatoms ein sehr spannendes Forschungsfeld, deren Erkundung dabei helfen wird, nicht nur die initialen Vorgänge besser zu verstehen, sondern diese möglicherweise auch therapeutisch beeinflussen zu können.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Das frühe humane Frakturhämatom ist charakterisiert durch Inflammation und Hypoxie

Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F (2011) *Human Early Fracture Hematoma Is Characterized by Inflammation and Hypoxia*. Clin Orthop Relat Res 469:3118-26 [46]

Immunologisch korrekt ablaufende Vorgänge spielen bei Regenerationsvorgängen eine große Rolle. Dies ist auch der Fall bei der Frakturheilung. Im Rahmen dieser Untersuchung sollte geklärt werden, inwieweit die initiale Inflammation bereits im frühen Frakturhämatom nachweisbar ist. Hierzu wurde die lokale Genexpression in Zellen des Frakturhämatoms untersucht. Aus dem Expressionsmuster wurden Rückschlüsse in Bezug auf Anpassung an Hypoxie, Migration, Angiogenese und Osteogenese gezogen. Um eine Vorstellung über die zeitlichen Abläufe der Genexpressionen zu bekommen, wurden neben Frakturhämatomen von bis auf die Fraktur gesunden Patienten auch Hämatome untersucht, die nach einer Osteotomie im Rahmen einer totalen Hüftendoprothese entstanden sind. Diese wurden als ein Modell für Frakturhämatome zum Zeitpunkt 0h definiert. Als Modell für eine eingeschränkte immunologische Kompetenz bei einem Frakturhämatom wurden Hämatome nach einer Osteotomie mit vorhergehender Hüftbestrahlung gewählt. Es wurden also die folgenden drei Gruppen untersucht [46]:

1. Frakturhämatome von ansonsten gesunden Patienten
2. Hämatome nach Osteotomie des Femurs (Modell für Zeitpunkt 0h = Hämatom bei Fraktorentstehung von ansonsten gesunden Patienten)
3. Hämatome nach Osteotomie des Femurs mit vorheriger Bestrahlung der Hüftregion (Modell für Zeitpunkt 0h = Hämatom bei Fraktorentstehung von immunologisch eingeschränkten Patienten)

In den Zellen des Frakturhämatoms (6–72 Stunden nach Fraktur) konnten deutlich erhöhte LDHA Genexpressionswerte im Vergleich zum peripheren Blut gefunden werden. Die erhöhte LDHA Genexpression wies auf eine Adaptation an Hypoxie hin. Darüber hinaus konnten höhere Expressionslevel von IL-6, IL-8 und VEGF im Sinne einer Hypoxie-

vermittelten Inflammation und Angiogenese gezeigt werden. CXCR-4 zeigte ebenfalls erhöhte Expressionslevel in den Zellen des Frakturhämatoms. Als Hinweis auf osteogene Differenzierung fanden sich bereits erhöhte Level an SPP1 und RUNX-2 mRNA. Der zeitliche Verlauf der Genexpression wurde durch den Vergleich der Expressionslevel im Osteotomie-Hämatom (Modell Zeitpunkt 0h) mit dem Expressionslevel im Frakturhämatom rekonstruiert. Im Zeitverlauf wurden LDHA, VEGF, IL-8, SPP1 und RUNX-2 induziert. Die Bestrahlung von Hüften vor Entnahme des Osteotomie-Hämatoms führte zu supprimierter Expression von HIF-1A, IL-6, IL-8, CXCR-4 und RUNX-2 mRNA [46].

Insgesamt zeigen die Daten, dass Frakturhämatomzellen in der Lage sind, sich an Hypoxie anzupassen, und dass Entzündungsvorgänge, aber auch Regenerationsvorgänge, bereits im initialen Frakturhämatom auf mRNA Level nachweisbar sind. Insofern kann man auf eine frühe Beteiligung des Immunsystems an den Vorgängen der Frakturheilung schließen. Das initiale Frakturhämatom legt die Weichen für den Beginn der Angiogenese, Chemotaxis und Osteogenese [46].

<http://dx.doi.org/10.1007/s11999-011-1865-3>

2.2 Anpassung und Überleben von humanen Immunzellen unter bioenergetisch widrigen Bedingungen in einem *in vitro* Frakturhämatom-Modell

Hoff P*, Maschmeyer P*, Gaber T, Schutze T, Raue T, Schmidt-Bleek K, Dziurla R, Schellmann S, Lohanatha FL, Rohner E, Ode A, Burmester GR, Duda GN, Perka C, Buttgerit F (2013). *Human immune cells' behavior and survival under bioenergetically restricted conditions in an in vitro fracture hematoma model*. Cell Mol Immunol;10: 151-8. [12]

Da aus der vorherigen Arbeit in *ex vivo* Frakturhämatomen eine Adaptation an bioenergetisch widrige Bedingungen anzunehmen ist, sollten die Immunzellen im Frakturhämatom diesbezüglich näher beleuchtet werden. Darüber hinaus wird zwar allgemein angenommen, dass die frühe inflammatorische Phase der Frakturheilung das Ergebnis des Regenerationsprozesses beeinflusst. Im Detail ist die frühe inflammatorische Phase des Frakturhämatoms jedoch nicht verstanden. Zum besseren Verständnis dieser frühen Phase haben wir in dieser Studie ein *in vitro* Frakturhämatom-Modell etabliert. Hierzu wurden Hämatome, die nach einer Osteotomie im Rahmen einer Hüfttotalendoprothese entstanden, *in vitro* unter bioenergetisch definierten Bedingungen kultiviert. Dabei wurden die Wirkungen von sowohl Hypoxie als auch Nährstoffmangel beleuchtet. Die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen, deren Überleben sowie die Zytokin-Expression wurden in unserem Modell ebenfalls untersucht [12].

Wir konnten nachweisen, dass die kultivierten Immunzellen eine Anpassung an Hypoxie vornahmen. Angiogene Faktoren, Chemokine sowie pro-inflammatorische Moleküle wurden induziert und auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen. Hierzu zählen insbesondere VEGF, Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), IL-8, IL-6 und Interferon- γ . Interessanterweise wurden diese Faktoren nur bei Nährstoffmangel in signifikanten Konzentrationen gefunden. Unter Nährstoffsubstitution ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen und auch die Sauerstoffverfügbarkeit hatte auf diesen Effekt nicht den entscheidenden Einfluss. Hingegen wurde durch die Kombination aus Hypoxie und Nährstoffmangel das selektive Überleben von Lymphozyten begünstigt. Diese Effekte zeigten sich nicht, wenn die Zellen unter bioenergetisch günstigen Bedingungen kultiviert wurden [12]. Interessanterweise entsprach dieses selektive Überleben von Lymphozyten der in *ex vivo* Frakturhämatomen gefundenen Zellzusammensetzung, sodass davon auszugehen ist, dass eine Kombination von Hypoxie und Nährstoffmangel die initialen Bedingungen im Frakturhämatom gut imitiert.

Insgesamt konnten wir in unserem Modell nachweisen, dass die Bioenergetik die initiale inflammatorische Phase der Frakturheilung durch die Lenkung des Überlebens und der Immunzellfunktion entscheidend beeinflusst [12].

<http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2012.56>

2.3 Immunologisch eingeschränkte Patienten zeigen eine ausgeprägte Inflammation sowie inadäquate Anpassung an Hypoxie im Frakturhämatom

Hoff P, Gaber T, Schmidt-Bleek K, Senturk U, Tran CL, Blankenstein K, Lutkecosmann S, Bredahl J, Schuler HJ, Simon P, Wassilew G, Unterhauser F, Burmester GR, Schmidmaier G, Perka C, Duda GN, Buttgereit F (2011) *Immunologically restricted patients exhibit a pronounced inflammation and inadequate response to hypoxia in fracture hematomas*. *Immunol Res* 51:116-22 [11]

In *ex vivo* Frakturhämatomen von bis auf die Fraktur gesunden Patienten konnten wir zuvor eine Adapatation an die im Frakturhämatom vorherrschenden bioenergetisch widrigen Bedingungen zeigen. Darüber hinaus zeigte sich in unserem *in vitro* Frakturhämatom-Modell sogar, dass sowohl Sauerstoffmangel als auch Nährstoffmangel notwendig sind, um die frühe Inflammation zu initiieren und das *in vivo* Frakturhämatom nachzuahmen. Inwieweit auch Zellen in Frakturhämatomen von Patienten mit Einschränkungen der Immunfunktion dazu in der Lage sind, sich an die vorherrschenden bioenergetisch widrigen Bedingungen zu adaptieren, sollte nun geklärt werden.

In Patienten mit Funktionsstörungen des Immunsystems kommt es gehäuft zu ineffektiver oder verzögerter Frakturheilung. Hierzu gehören Patienten mit Autoimmunerkrankungen, immunsuppressiver Therapie, Diabetiker oder auch z. B. Patienten, die unter Neoplasien leiden. Daher wird angenommen, dass ein effektiv funktionierendes Immunsystem wichtig ist für eine zeitgerechte und erfolgreiche Frakturheilung. Über die initiale inflammatorische Phase bei Patienten mit eingeschränkter Immunfunktion ist allerdings bislang wenig bekannt. In dieser Arbeit wurden daher Frakturhämatome von immunologisch eingeschränkten Patienten mit denen von bis auf die Fraktur gesunden Patienten verglichen.

Auf Genebene konnten wir bei immunologisch eingeschränkten Patienten im Vergleich zu bis auf die Fraktur gesunden Patienten eine erniedrigte RUNX-2 Expression nachweisen. Hieraus ergibt sich bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Hinweis auf gestörte osteogene Differenzierung im Frakturhämatom. Es zeigte sich eine ausgeprägte inflammatorische Reaktion mit sehr hoher Expression von IL-8 und CXCR-4 in immunologisch eingeschränkten Patienten. Darüber hinaus konnten wir eine inadäquate Anpassung an Hypoxie auf Genebene nachweisen. HIF-1A mRNA wurde hoch exprimiert, was bereits ungewöhnlich ist, denn die α -Untereinheit von HIF wird auf Proteinebene, nicht auf mRNA

Ebene, reguliert. Trotz der hohen mRNA-Expression von HIF-1A wurde keine adäquate damit einhergehende Expression der Zielgene nachgewiesen. LDHA und Phosphoglyceratkinase (PGK-1) als Zielgene von HIF waren in den immunologisch eingeschränkten Patienten insgesamt erniedrigt.

In Zusammenschau passen sich die Zellen im Frakturhämatom von immunologisch eingeschränkten Patienten zwar ebenfalls an die vorherrschenden bioenergetisch widrigen Bedingungen an. Allerdings verläuft die Adaptation an Hypoxie nicht adäquat und die Initiierung der osteogenen Differenzierung verläuft nicht zeitgerecht. Insgesamt zeigen sich bereits während der frühen inflammatorischen Phase im Frakturhämatom Hinweise auf einen inadäquaten Beginn des Regenerationsprozesses.

<http://dx.doi.org/10.1007/s12026-011-8235-9>

2.4 Durch präoperative Bestrahlung der Hüftregion zur Prävention von heterotoper Ossifikation vor einer Hüfttotalendoprothese-Operation wird lokal eine Entzündungsreaktion initiiert

Hoff P, Rakow A, Gaber T, Hahne M, Sentürk U, Strehl C, Fangradt M, Schmidt-Bleek K, Huscher D, Winkler T, Matziolis D, Matziolis G, Badakhshi H, Burmester GR, Duda GN, Perka C, Buttgerit F (2013). *Preoperative irradiation for the prevention of heterotopic ossification induces local inflammation in humans*. Bone 55:93-101 [47]

In immunologisch eingeschränkten Patienten zeigten sich im Frakturhämatom Defizite in Bezug auf die Initiierung der osteogenen Differenzierung. Zuvor konnten wir bereits zeigen, dass eine Bestrahlung der Hüftregion zur Suppression der Genexpression von osteogenen Markern führt. Daraus ergab sich die Frage, ob eine Bestrahlung der Hüftregion zur Verhinderung einer heterotopen Ossifikation nach Einsatz einer totalen Endoprothese die Vorgänge bei immunologisch eingeschränkten Patienten imitieren könnte, was deren gehäuft schlechtere Frakturheilung mit erklären könnte. Darüber hinaus sollte aus immunologischer Sicht die ausbleibende Knochenneubildung nach Bestrahlung im Operationsgebiet geklärt werden.

Zur Prävention einer heterotopen Ossifikation nach dem operativen Einsatz einer Hüfttotalendoprothese werden standardmäßig eine Bestrahlung der Hüftregion mit 7 Gray (GY) oder die postoperative Behandlung mit NSAR eingesetzt. Da anzunehmen ist, dass inflammatorische Prozesse die Entwicklung einer heterotopen Ossifikation triggern sowie im allgemeinen Regenerationsprozesse wie auch die Neubildung von Knochen mit einer Entzündungsreaktion beginnen, sind wir davon ausgegangen, dass die präoperative Bestrahlung zur Einschränkung der lokalen Immunantwort führt. Um dies zu untersuchen, wurden Zellpopulationen und Zytokine in Hämatomen untersucht, die im Rahmen der Osteotomie bei Patienten entstanden, die eine Hüfttotalendoprothese erhielten. Dabei wurden Hämatome untersucht und verglichen von Patienten, die präoperativ bestrahlt wurden, mit denen von Patienten, die postoperativ NSAR erhalten sollten und somit keine Bestrahlung erhielten.

Die präoperative Bestrahlung führte zu einem Anstieg der Häufigkeit von T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen, Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und CD25+CD127-regulatorischen T-Zellen im Osteotomie-Hämatom. Hingegen zeigte sich der Anteil von

naiven CD45RA exprimierenden zytotoxischen T-Zellen nach der Bestrahlung erniedrigt. Pro-inflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-6 und Interferon- γ , und auch Chemokine, wie z. B. MCP-1 und das Protein Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES), fanden sich in den Hämatomen der bestrahlten Gruppe in signifikant höherer Konzentration als in denen der unbestrahlten Gruppe. Hingegen zeigte sich die Konzentration des Angiogenesefaktors VEGF in der bestrahlten Gruppe signifikant erniedrigt.

Präoperative Bestrahlung führt zu signifikanten Veränderungen der lokalen Zellzusammensetzung sowie der lokalen Zytokinsekretion. Durch Bestrahlung wird ein eher pro-inflammatorisches Milieu generiert. Insgesamt scheint die Bestrahlung der Hüftregion nicht nur wegen der gestörten Angiogenese zur Verhinderung der heterotopen Ossifikation beizutragen. Möglicherweise entsteht eine Wirkung auch insbesondere durch die zu frühe und zu starke Inflammation, die einen geordneten Knochenaufbau verhindert, wie es in diesem Fall zur Verhinderung der heterotopen Ossifikation gewünscht ist.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.03.020>

2.5 Hypoxie fördert Osteogenese und unterdrückt Adipogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen

Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, Tran CL, Schonbeck K, Hoff P, Ode A, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. (2012) *Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner*. PLoS One 7:e46483 [48]

Im Rahmen der Frakturheilung ist eine Anpassung an lokale Hypoxie unumgänglich. Hierbei spielt als Schlüsselfaktor HIF-1 eine wichtige Rolle. In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass sich die initial im Frakturhämatom vorhandenen Zellen an Hypoxie anpassen. Es ist bekannt, dass mesenchymale Stammzellen zur Frakturheilung vonnöten sind und in das Frakturhämatom einwandern. Daher haben wir im Rahmen dieser Arbeit den Einfluss von Hypoxie und der Expression von HIF-1 α auf die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht.

Mesenchymale Stammzellen wurden aus dem Knochenmark gewonnen. Sie wurden unter Normoxie bzw. Hypoxie in Kultur genommen und anschließend auf die Expression Hypoxie-induzierter Gene untersucht. Darüber hinaus wurden durch Zusätze zum Kulturmedium Adipogenese bzw. Osteogenese induziert. Im Anschluss wurde überprüft, ob eine Differenzierung in Richtung Adipogenese oder Osteogenese stattfand. Mittels eines Knock-Down-Systems sollte die Rolle von HIF-1 α geklärt werden.

Durch Hypoxie konnten HIF-1 α sowie Zielgene von HIF-1 in mesenchymalen Stammzellen induziert werden. Darüber hinaus führte eine Kultivierung unter Hypoxie zu einer supprimierten Adipogenese und zu einer verstärkten Osteogenese. Dieses Phänomen wurde auf Genebene, aber auch auf Proteinebene gezeigt. Der Knock-Down von HIF-1 α verstärkte Adipogenese sowohl unter Normoxie als auch Hypoxie und suppressierte die Hypoxie-vermittelte Osteogenese.

In Zusammenschau konnten wir zeigen, dass Hypoxie die Osteogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen fördert und die Adipogenese supprimiert. Das heißt, dass die initialen bioenergetischen Bedingungen nicht nur an der Induktion der Inflammation beteiligt sind, sondern durch die Beeinflussung der für die Frakturheilung unerlässlichen mesenchymalen Stammzellen entscheidend zur Osteogenese beitragen. Insgesamt sehen

wir die in der frühen Phase der Frakturheilung herrschende Hypoxie als einen der wichtigen Faktoren zur Initiierung einer effektiven Frakturheilung.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046483>

3. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Erkenntnisse zu immunologischen Vorgängen während der initialen Phase der Frakturheilung gewonnen. Dabei wurde insbesondere der Einfluss der bioenergetischen Bedingungen, wie Hypoxie und Nährstoffmangel, berücksichtigt. Sämtliche hier dargestellten wissenschaftlichen Untersuchungen fanden im humanen System statt. Dadurch konnten auch wertvolle Ergebnisse zu Störungen der initialen Phase der Frakturheilung gewonnen werden. Insbesondere konnten Patienten mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für verzögerte oder nicht gelungene Frakturheilung untersucht werden. Eine Simulation der gestörten immunologischen Funktion fand mittels Verarbeitung von Material aus der bestrahlten Hüftregion statt. Darüber hinaus wurde ein *in vitro* Frakturhämatom-Modell etabliert, das die initialen Vorgänge im Frakturhämatom nachstellt und auch aktuell weiterhin erfolgreich für Forschungszwecke eingesetzt wird. Aber auch die für die Frakturheilung wichtigen mesenchymalen Stammzellen wurden unter Bedingungen wie im Frakturhämatom vorherrschend beleuchtet.

Die initiale Phase der Frakturheilung ist durch eine Entzündungsreaktion gekennzeichnet [29, 30, 32]. Allgemein wird angenommen, dass in dieser Phase bioenergetisch widrige Bedingungen herrschen. Darauf gibt es bereits seit den 70er-Jahren des 20. Jahrhunderts Hinweise in Form von erniedrigtem pH sowie erhöhten Laktatwerten [2, 49]. Bereits damals wurden diese Erkenntnisse als ein Hinweis auf Sauerstoffmangel gewertet [8, 9]. Insgesamt ist es auch logisch, bioenergetisch widrige Bedingungen anzunehmen, denn aufgrund der Fraktur ist die Gefäßstruktur zerstört und damit die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen eingeschränkt. Darüber hinaus ist eine Entzündungsreaktion ein bioenergetisch hoch aktiver Prozess, der mit Einschränkung der Sauerstoffverfügbarkeit einhergeht [1, 50, 51]. Durch Vergleich der Genexpression in Zellen des frühen Frakturhämatoms mit der Genexpression in einem Modell für Zeitpunkt 0h (Osteotomie-Hämatom) konnte nachgewiesen werden, dass Zielgene des Schlüsselregulators der Hypoxieanpassung (HIF-1) hoch exprimiert wurden. Die Hypoxie-regulierten Gene LDHA, IL-8 und VEGF fanden sich im frühen Frakturhämatom (<72 Stunden post Fraktur) erhöht. Dies zeigt nicht nur die Anpassung an die vorhandene Hypoxie, sondern bereits den Beginn der Inflammation sowie Angiogenese [52-54]. Darüber hinaus fand sich CXCR-4 erhöht. Die Hypoxie-induzierte Hochregulation von CXCR-4 könnte zu der Immigration von Granulozyten und Makrophagen beitragen, die bekanntermaßen innerhalb von 48 Stunden stattfindet [55-57]. Aber auch das

osteogene Potenzial der initialen Frakturhämatome war bereits früh an der Expression von SPP1 sowie RUNX-2 erkennbar [10]. SPP1 als Osteogenesemarker gehört zu den HIF-regulierten Genen [58, 59]. RUNX-2 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Osteoblastendifferenzierung steuert, und der auf einem deutlich erhöhten Expressionsniveau nachgewiesen werden konnte [59-61].

Als ein Modell für Patienten mit eingeschränkter immunologischer Leistung im initialen Frakturhämatom wurden Osteotomie-Hämatome untersucht, die von zuvor in der Hüftregion bestrahlten (7 Gy) Patienten stammten [10]. Diese Patienten erhielten die Bestrahlung zur Prophylaxe einer heterotopen Ossifikation vor Einsatz einer Hüfttotalendoprothese. Die Osteotomie-Hämatome von bestrahlten Patienten wurden mit den Osteotomie-Hämatomen von Patienten ohne Bestrahlung verglichen. Das *ex vivo* Frakturhämatom enthält insbesondere Leukozyten, sodass davon auszugehen ist, dass diese besonders durch die Bestrahlung beeinflusst werden, da es sich um metabolisch hoch aktive Populationen handelt. Auf Genebene fanden sich Marker der Inflammation (IL-6, IL-8) deutlich erniedrigt. Scheinbar widerspricht die niedrige mRNA Expression von IL-6 und IL-8 den später auf Proteinebene gewonnenen Daten, wo sich erhöhte Konzentrationen pro-inflammatorischer Marker wie eben auch IL-6 und IL-8 zeigen [47]. In Zusammenschau ist zu vermuten, dass die Zellen im bestrahlten Osteotomie-Hämatom initial aktiviert werden und überschießend Zytokine und weitere Faktoren produzieren. Allerdings gehen sie dann im Anschluss in Apoptose und stellen zuvor die mRNA Produktion ein, daher können wir auf mRNA Ebene nur noch wenig IL-6 und IL-8 nachweisen. Außerdem sind die sezernierten Proteine stabiler und somit länger nachweisbar als die mRNA. Zusätzlich werden die hohen Zytokinmengen wahrscheinlich nur von Subpopulationen gebildet, die möglicherweise selektiv länger überleben und auch dann länger mRNA dieser Faktoren bilden. Da die mRNA Analysen jedoch im Gesamtzellgemisch stattfanden, gingen die Signale von prozentual weniger Zellen insgesamt unter.

Studien zur Untersuchung der frühen inflammatorischen Phase der Frakturheilung waren bislang selten. Die vorhandenen Studien konzentrierten sich eher auf die Einwanderung von Immunzellen in bereits existierende Frakturhämatome [55, 56, 62, 63]. Das initiale Frakturhämatom entwickelt sich jedoch unmittelbar nach einem Trauma und enthält bereits zahlreiche Immunzellpopulationen aus dem Knochenmark sowie aus dem zerstörten Gefäßsystem [57, 64]. Um die Rolle dieser Immunzellen besonders in Augenschein zu nehmen, entwickelten wir ein *in vitro* Frakturhämatom-Modell [12]. Dazu wurden Osteotomie-Hämatome als Modell für ein Frakturhämatom zum Zeitpunkt 0 Stunden benutzt und für 6

bzw. 24 Stunden unter hypoxischen versus normoxischen Bedingungen *in vitro* ohne weitere Zufuhr von Nährstoffen kultiviert. HIF-1-regulierte Gene, wie PGK-1 und VEGF, fanden sich in den unter Hypoxie kultivierten Zellen erhöht. Pro-inflammatorische Faktoren, wie Interferon- γ , IL-6 und IL-8, fanden sich auf Genebene unter Hypoxie ebenfalls signifikant erhöht. Dies war unter Normoxie nicht der Fall, sodass die Hypoxie hier als ein wichtiger Trigger der Inflammation angesehen wird [12]. Auf Genebene korrespondierten die Ergebnisse mit den von uns gewonnenen Ergebnissen aus *ex vivo* Frakturhämatomen [10]. Auch die mRNA von angiogenen Faktoren, wie VEGF, zeigte sich signifikant erhöht, erneut passend zu unseren *ex vivo* Ergebnissen [10]. Der frühe Beginn der Angiogenese kann nicht nur in Form von erhöhtem VEGF gefunden werden. Auch IL-8 wirkt sich proangiogen aus [65-67]. IL-8 ist allerdings auch ein wichtiges Chemokin, das die Einwanderung weiterer Immunzellen steuert, wie z. B. Granulozyten [65-67]. Die Ergebnisse auf Genebene konnten jedoch auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die Konzentration von VEGF, Interferon- γ , IL-6 und IL-8 zeigten sich nach einer 24-stündigen Inkubation deutlich erhöht. Interessanterweise zeigte sich die Konzentration dieser Faktoren im Frakturhämatom-Modell nicht erhöht, wenn ausreichend Nährstoffe zugeführt wurden. Daher ist dieser Vorgang auch abhängig von der Nährstoffzufuhr. Insgesamt konnten wir also nicht nur die Hypoxie, sondern insbesondere deren Kombination mit Nährstoffmangel identifizieren als entscheidende Faktoren zur Initiierung der frühen Inflammation ohne weitere Triggerfaktoren [12]. MCP-1 wurde ebenfalls unter Hypoxie in erhöhter Konzentration gefunden und könnte zusammen mit IL-8 für die notwendige Anlockung von phagozytierenden Zellen verantwortlich sein [68, 69]. Auf Proteinebene konnte jedoch kein Unterschied zwischen hypoxischen und normoxischen Bedingungen in Bezug auf die Initiierung der inflammatorischen Faktoren unter Nährstoffmangel gefunden werden. Daher gehen wir davon aus, dass die Bedingungen unter Hypoxie und Nährstoffmangel in Zusammenschau mit den eindeutig unter Hypoxie erhöhten mRNA Werten für die inflammatorischen und proangiogenen Faktoren ein selektives Überleben der Zellen fördern, die diese Faktoren produzieren.

In unserer Untersuchung haben wir uns daher auch insbesondere der Analyse der Immunzellen und deren Zusammensetzung im *in vitro* Frakturhämatom-Modells gewidmet [12]. Die Zellzahl blieb über die ersten 6 Stunden konstant, war jedoch nach 24 Stunden bereits halbiert. Unter Hypoxie und Nährstoffmangel kam es selektiv zu einem deutlich besseren Überleben der Lymphozyten, während Granulozyten untergingen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen aus Frakturhämatomen im Schaf gut überein [64]. Im humanen System konnten wir diesen Effekt in noch nicht publizierten Daten ebenfalls beobachten. Darüber hinaus ist bekannt, dass CD4 positive T-Zellen, die zu den

Lymphozyten gehören, auch unter Sauerstoffmangel überleben und ihre Effektorfunktion aufrecht erhalten, passend zu der gefundenen Sekretion der genannten Zytokine/Chemokine [51, 70].

In unserem Frakturhämatom-Modell konnten wir bestätigen, dass Sauerstoff- und Nährstoffmangel die frühe inflammatorische Phase initiieren. Aber auch Angiogenese und die Anlockung weiterer Immunzellen werden bereits innerhalb von 24 Stunden nach Fraktur induziert [12].

Patienten mit Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen wie auch Alkoholiker weisen eine eingeschränkte Immunabwehr auf [71-76]. Es ist bekannt, dass Frakturen in immunsupprimierten Patienten verzögert heilen oder sogar in Pseudarthrosen resultieren [39-41]. Um zu untersuchen, ob sich Unterschiede zwischen bis auf die Fraktur gesunden Patienten und Patienten mit eingeschränkter Immunantwort im initialen Frakturhämatom zeigen, wurden diese beiden Gruppen verglichen [11].

Interessanterweise zeigte sich der Transkriptionsfaktor RUNX-2, der die Osteoblastendifferenzierung induziert, in immunologisch eingeschränkten Patienten auf Genebene deutlich supprimiert. Hingegen zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf die Expression von SPP1. Daraus lässt sich folgern, dass nicht alle Wege zur Osteogenese generell in dieser Patientengruppe eingeschränkt sind, sondern selektiv bestimmte Pathways betroffen sind. Die bereits zuvor aus unseren Ergebnissen bekannte Expression der HIF-1-regulierten Gene IL-8, CXCR-4 sowie VEGF konnte auch in der Patientengruppe mit eingeschränkter Immunfunktion detektiert werden [10, 12]. Interessanterweise konnten IL-8, CXCR-4 und VEGF in der immunologisch eingeschränkten Gruppe im Vergleich zu Normal Spendern auf einem deutlich erhöhten Expressionsniveau gefunden werden [11]. Bereits hier zeigte sich der Verdacht auf eine Deregulation des zeitlichen Ablaufs im Frakturhämatom von immunologisch eingeschränkten Patienten.

In den immunologisch eingeschränkten Patienten konnte jedoch auch eine höhere Expression der HIF-1 α mRNA nachgewiesen werden. Dies war überraschend, denn der Faktor HIF-1 α wird auf Proteinebene, nicht auf mRNA Ebene reguliert [1, 50]. Dieser Umstand weist auf eine sehr hohe metabolische Aktivität hin, wie auch bereits zuvor die deutliche Erhöhung der inflammatorischen und angiogenen Marker sowie Marker für Einwanderung (IL-8, CXCR-4, VEGF). Eine gestörte Begrenzung der Immunantwort kann vermutet werden, diese kommt oft bei immunologischen Störungen vor [77, 78]. Insgesamt liegt also am ehesten eine gestörte inflammatorische Reaktion in immunologisch

eingeschränkten Patienten vor, was zumindest zum Teil die erhöhte Wahrscheinlichkeit einer verzögerten oder nicht erfolgreichen Frakturheilung erklärt [39, 41-45]. Darüber hinaus zeigten sich typische HIF-1 Zielgene, die die Anpassung an Hypoxie vermitteln, wie LDH-1 und PGK-1, erniedrigt im Vergleich zu Normal Spendern. Daher ist insgesamt nicht nur eine gestörte initiale Inflammation wahrscheinlich, sondern auch von einer Unfähigkeit einer adäquaten Anpassung an Hypoxie [11].

Um die interessanten Ergebnisse, die sich aus der Untersuchung der immunologisch eingeschränkten Patienten ergaben, weiter zu untersuchen, widmeten wir uns der Untersuchung der heterotopen Ossifikation [47]. Heterotopie Ossifikation tritt häufig im Operationsgebiet auf in Patienten nach einer Hüftgelenktotalendoprothese, wenn sich diese keiner Prophylaxe unterziehen. Dabei kommt es zu Knochenneubildung in Weichteilen. Ohne Prophylaxe tritt heterotopie Ossifikation in 25–60 % der Patienten auf [79-81]. Es gibt jedoch auch Literaturstellen, die die Inzidenz von heterotoper Ossifikation ohne Prophylaxe auf bis zu 90 % angeben [82]. Standardisiert wird daher die Hüftregion bei einer geplanten Hüftgelenktotalendoprothese bestrahlt oder aber die Patienten werden postoperativ prophylaktisch mit NSAR behandelt. In Patienten, die präoperativ bestrahlt wurden, konnte im Vergleich zu präoperativ unbestrahlten Patienten in den Osteotomie-Hämatomen eine deutlich erhöhte Konzentration pro-inflammatorischer Faktoren wie IL-6, IL-8 und Interferon- γ gefunden werden. Interessanterweise zeigten sich in den Zellen der Osteotomie-Hämatome aus bestrahlten Patienten auch eine Reihe von Chemokinen erhöht, wie MCP-1, Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1) α , MIP-1 β , Eotaxin, Basic Fibroblast Growth Factor (FGF basic) und RANTES (Protein-Ebene). Dies passt zu unseren Voruntersuchungen, wo in unserem *in vitro* Frakturhämatom-Modell die Proteinkonzentration von MCP-1 erhöht war [12]. Insgesamt bestätigt sich die Hypothese, dass bei Patienten mit Einschränkung der Immunfunktion eine Störung der initialen Inflammation mit überschießender Produktion von pro-inflammatorischen Faktoren und Chemokinen besteht [12, 47]. Die genannten Chemokine werden von Monozyten/Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen, aber auch NKT-Zellen produziert [68, 83]. Hierzu passen auch die Erkenntnisse auf zellulärer Ebene, wo wir in Osteotomie-Hämatomen von präoperativ in der Hüftregion bestrahlten Patienten eine erhöhte Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen nachweisen konnten. Interessanterweise konnten wir aber nicht nur eine Erhöhung aller untersuchten Zytokine und Chemokine nachweisen, vielmehr handelt es sich um einen selektiven Prozess. In der Gruppe der bestrahlten Patienten zeigten sich IL-2, IL-7, IL-15 und VEGF in signifikant erniedrigter Konzentration. IL-2 und IL-15 sind überlebens- und proliferationsinduzierende Faktoren in T-Zellen und in NKT-Zellen [84, 85]. Die geringe Konzentration von IL-2 und IL-15 ging jedoch

nicht einher mit einer Reduktion von T- und NKT-Zellen. Vielmehr waren T-Zellen und NKT-Zellen in erhöhter Anzahl zu finden, daher gehen wir davon aus, dass es hier zu einem selektiven Verbrauch der Zytokine kommt. IL-7 ist wichtig für die Knochenmarkshomöostase [86]. Durch die Bestrahlung könnte die Sekretion von IL-7 hier eingeschränkt sein. Ebenso ist die Induktion des proangiogenen VEGF reduziert. Dieses Protein spielt jedoch eine wichtige Rolle beim Knochenaufbau durch Angiogeneseinduktion [65, 87, 88]. Bei der Bestrahlung der Hüftregion könnte dieser Effekt entscheidend zur Verhinderung der heterotopen Ossifikation beitragen. Es wurden jedoch auch zahlreiche Effekte auf Immunzellpopulationen gefunden. Naive B-Zellen fanden sich nach Bestrahlung erniedrigt, sodass wir von einer Aktivierung von B-Zellen durch die Bestrahlung ausgehen [89, 90]. Dies könnte auf eine Rolle von B-Zellen während der Osteogenese hinweisen, z. B. durch bestimmte, von diesen Zellen produzierte Zytokine [91]. Nach Bestrahlung zeigten sich auch CD3+CD8+ zytotoxische T-Zellen und CD3+CD56+ NKT-Zellen signifikant erhöht. Beide Zellpopulationen sind in antivirale und antitumorale Immunantworten involviert [92, 93]. Möglicherweise sind ähnliche Mechanismen zur Prävention von heterotoper Ossifikation günstig. Darüber hinaus sind die genannten Populationen dazu in der Lage, Interferon- γ in hoher Konzentration zu produzieren [92, 93], und scheinen daher in Zusammenschau mit den Zytokindaten verantwortlich zu sein für die erhöhte Interferon- γ Konzentration nach Bestrahlung. Aus der Wundheilung ist bekannt, dass die Depletion von zytotoxischen T-Zellen mit einer verbesserten Regenerationskapazität assoziiert ist [3, 85, 94, 95]. Daher könnte auch die erhöhte Anzahl von CD8+ zytotoxischen T-Zellen in diesem Fall mit einer Verhinderung von Knochenneubildung und somit mit Verhinderung der heterotopen Ossifikation assoziiert sein (hier ein gewünschter Effekt).

Ebenso konnten CD25+CD127- regulatorische T-Zellen in signifikant erhöhter Häufigkeit nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Zur Beschränkung der Immunantwort geht normalerweise die eingeleitete Inflammation auch mit einer Erhöhung der Zahl regulatorischer T-Zellen einher [96, 97]. Daher passt dieser Fund erneut zu der dargestellten starken Inflammationsreaktion.

Insgesamt konnten wir nachweisen, dass lokale Bestrahlung als Modell für gestörte Immunfunktion mit einer starken, aber gestörten Inflammation einhergeht [12, 47]. In diesem Fall ist dies ein gewünschter Effekt zur Verhinderung der heterotopen Ossifikation. In immunologisch eingeschränkten Patienten stellt dies bereits ein initiales Problem dar, das mit einer gestörten Frakturheilung assoziiert ist.

Es ist bekannt, dass mesenchymale Stammzellen zur Frakturheilung beitragen und bereits nach 24 Stunden in das Frakturhämatom angelockt werden [98-101]. Durch *in vitro* Kultur von *ex vivo* Frakturhämatome lassen sich mesenchymale Stammzellen mit chondrogenen und osteogenen Eigenschaften gewinnen [37, 38]. Inwieweit sich die zuvor nachgewiesenen bioenergetisch widrigen Bedingungen wie Hypoxie auf mesenchymale Stammzellen auswirken, war bislang unbekannt. Wir konnten nachweisen, dass unter Hypoxie die Adipogenese supprimiert wird, während sich Hypoxie fördernd auf die Osteogenese auswirkt. Mesenchymale Stammzellen stabilisieren unter Hypoxie den Faktor HIF-1 α und sind daher in der Lage, sich an Hypoxie anzupassen [1, 102-105]. HIF-1 regulierte Gene konnten nach Inkubation unter Hypoxie in mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden. Hierzu zählen Glucose Transporter 1 (GLUT-1), LDHA und PGK-1 [106]. Passend hierzu wurde bereits demonstriert, dass Hypoxie zu verstärkter Proliferation von mesenchymalen Stammzellen führt [107, 108]. Der Effekt der Hypoxie auf verstärkte Osteogenese und erniedrigte Adipogenese konnte auf zellulärer Ebene mittels Färbungen dargestellt werden. Hierzu passend zeigte sich jedoch auch, dass unter Hypoxie der für Adipogenese wichtige Transkriptionsfaktor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) auf mRNA Ebene supprimiert war. Hingegen zeigte sich die Expression der mRNA des osteogenen Markers RUNX-2 unter Hypoxie signifikant erhöht. Unter Hypoxie und Einfluss von osteogenem Medium wird auch die mRNA Expression von VEGFA deutlich erhöht nachgewiesen.

Auch mittels chemisch induzierter Hypoxie konnten mesenchymale Stammzellen in Richtung Osteogenese getriggert werden. Daher könnte dieser Weg ebenfalls ein therapeutisches Potenzial für zukünftige Behandlung bei Risikopatienten für Frakturheilungsstörungen bieten.

Insgesamt gehen wir davon aus, dass das initiale Frakturhämatom zur Anlockung von mesenchymalen Stammzellen beiträgt und dass diese vor Ort durch das Frakturhämatom-Milieu in die osteogene Differenzierungsrichtung getrieben werden. Dieser Vorgang wird darüber hinaus durch die vorhandene Hypoxie unterstützt. Insgesamt wird das Milieu des initialen Frakturhämatoms mit den vor Ort vorhandenen bioenergetischen Bedingungen auch für die korrekte Triggerung der mesenchymalen Stammzellen zur adäquaten Frakturheilung benötigt. Eine schematische Zusammenfassung wird in Abbildung 3 dargestellt.

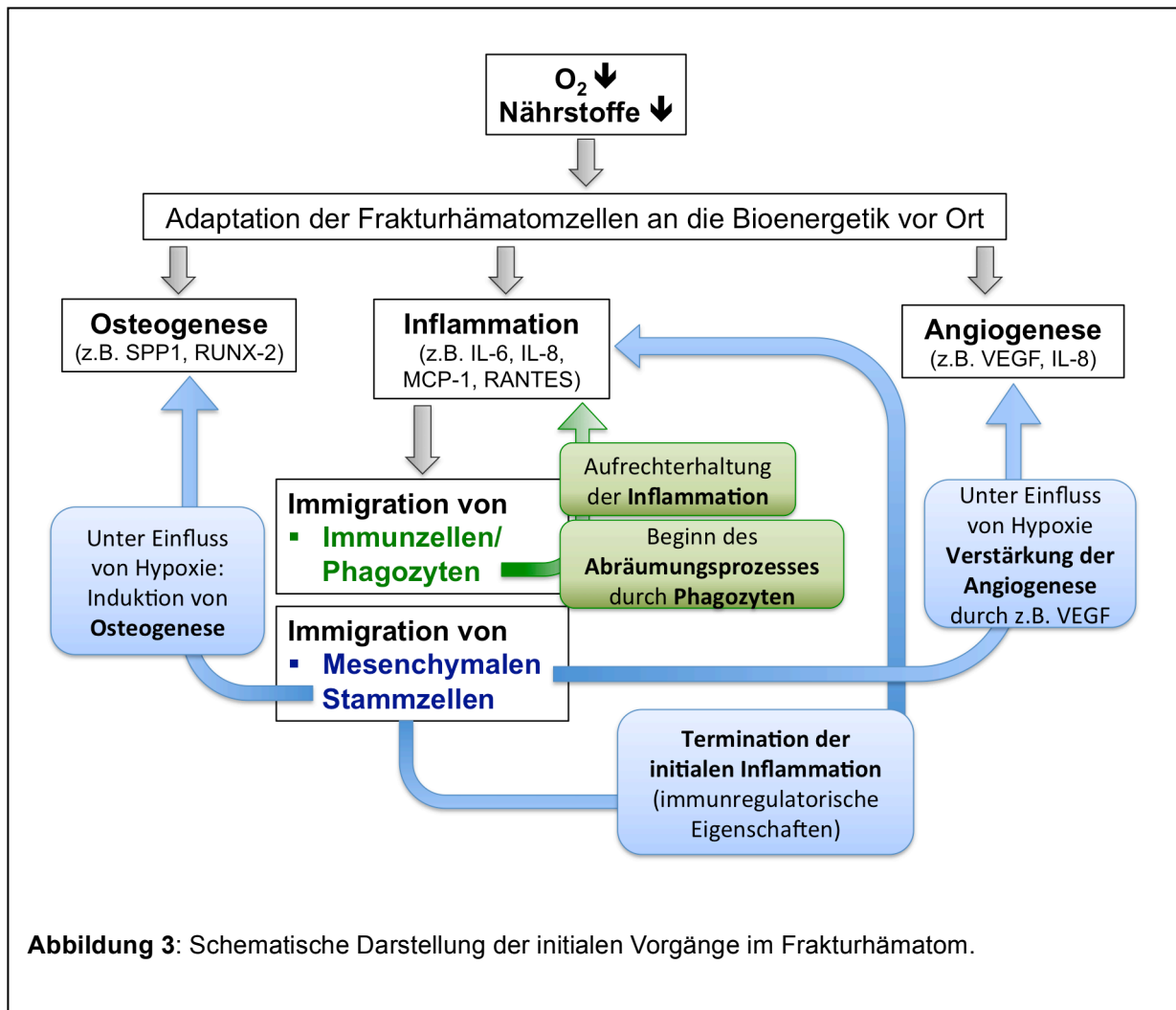


Abbildung 3: Schematische Darstellung der initialen Vorgänge im Frakturhämatom.

4. Zusammenfassung

Das Immunsystem und die Regulation des Knochens sind eng miteinander verknüpft. In den letzten Jahren wurde dieser Umstand immer besser verstanden, und das Forschungsfeld der Osteoimmunologie wurde etabliert [14-16]. In dieser Arbeit wurde insbesondere die frühe inflammatorische Phase der Frakturheilung untersucht. Diese findet örtlich im Frakturhämatom statt [2]. Das Frakturhämatom formt sich innerhalb des Frakturspalts direkt nach dem Trauma und enthält bereits zahlreiche Immunzellpopulationen aus dem Knochenmark und durch Einblutung aus dem zerrissenen Gefäßsystem auch aus dem peripheren Blut [3, 109]. Diese bereits initial vorhandenen Immunzellen wurden bislang wenig untersucht. Wir konnten zeigen, dass bereits das initiale Frakturhämatom eine hohe inflammatorische Aktivität aufweist. Zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine finden sich hier deutlich erhöht. Darüber hinaus ist bereits in dieser Phase ein angiogenes Potenzial nachweisbar, das sich u. a. an der Expression von IL-8 und VEGF zeigt. Aber auch osteogene Marker wie SPP1 und RUNX-2 werden bereits initial exprimiert. Wir konnten darüber hinaus in einem *in vitro* Frakturhämatom-Modell zeigen, dass eine hohe entzündliche Aktivität besteht und dass angiogene und osteogene Faktoren induziert werden. Diese Vorgänge sind abhängig von den bioenergetisch widrigen Bedingungen im initialen Frakturhämatom. Die beeinflussenden bioenergetischen Bedingungen sind der lokale Sauerstoff- und Nährstoffmangel. Darunter wird die Inflammation im Frakturhämatom auch ohne weitere exogene Faktoren induziert. Interessanterweise ist die initiale inflammatorische Phase des Frakturhämatoms bei Patienten mit Neigung zu verzögerter Frakturheilung deutlich gestört. Dabei handelt es sich um Patienten mit Autoimmunerkrankungen oder anderweitig gestörter Immunfunktion. Hier konnte in *ex vivo* Frakturhämatomen nicht nur eine überschießende Inflammation gezeigt werden, sondern auch eine inadäquate Antwort auf die lokale Hypoxie. Diese spannenden Ergebnisse konnten wir wiederum in Osteotomie-Hämatomen bestätigen, die aus Patienten gewonnen wurden, die vor einem geplanten Einsatz einer totalen Hüftgelenksendoprothese in der Hüftregion bestrahlt wurden. In diesem Fall geht dieser Effekt mit der gewünschten Verhinderung der heterotopen Ossifikation einher. Das bedeutet, dass in diesem Fall eine Knochenneubildung verhindert wird. Bei den immunologisch eingeschränkten Patienten können daher die gefundene gestörte Inflammation und inadäquate Antwort auf Hypoxie ebenfalls mit der gehäuft auftretenden Frakturheilungsstörung assoziiert werden.

Die ausgesprochene Wichtigkeit der initial bioenergetisch widrigen Bedingungen konnten wir auch in mesenchymalen Stammzellen nachweisen. Mesenchymale Stammzellen tragen zu

einer effektiven Frakturheilung bei. Unter Hypoxie werden diese in die osteogene Richtung differenziert, während die Adipogenese supprimiert wird. Hiermit einhergehend zeigen sich angiogene Marker erhöht, sodass die in das Frakturhämatom einwandernden mesenchymalen Stammzellen auch zum angiogenen Potenzial beitragen. Eine effektive Neoangiogenese ist essenziell für eine erfolgreiche Frakturheilung.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit wichtige initiale Vorgänge im Frakturhämatom dargestellt werden. Hierzu zählen nicht nur die Einleitung des inflammatorischen Prozesses, die Initiierung der Angiogenese und der Migration von weiteren Zellpopulationen; sondern insbesondere auch die initialen bioenergetischen Bedingungen konnten als wichtige Faktoren für die Initiierung einer Frakturheilung identifiziert werden. Durch Modulation der initialen inflammatorischen Phase lassen sich möglicherweise zukünftig die Ergebnisse einer Frakturheilung in Risikopatienten beeinflussen. Dadurch sollten wir in der Lage sein, bessere Therapiemöglichkeiten insbesondere für Patienten mit erhöhtem Risiko für eine Frakturheilungsstörung zu entwickeln.

5. Literatur

1. Gaber T, Dziurla R, Tripmacher R, Burmester GR, Buttgerit F (2005) Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis* 64:971-980
2. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN (2010) The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. *Tissue Eng Part B Rev*
3. Park JE, Barbul A (2004) Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 187:11S-16S
4. Park SH, Silva M, Bahk WJ, McKellop H, Lieberman JR (2002) Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. *J Orthop Res* 20:1197-1204
5. Epari DR, Kassi JP, Schell H, Duda GN (2007) Timely fracture-healing requires optimization of axial fixation stability. *J Bone Joint Surg Am* 89:1575-1585
6. Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, Bragulla H, Haas NP, Duda GN (2006) Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 38:547-554
7. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, Zaher W, Mortensen LJ, Alt C, Turcotte R, Yusuf R, Cote D, Vinogradov SA, Scadden DT, Lin CP (2014) Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*
8. Brighton CT, Krebs AG (1972) Oxygen tension of healing fractures in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 54:323-332
9. Brighton CT, Krebs AG (1972) Oxygen tension of nonunion of fractured femurs in the rabbit. *Surg Gynecol Obstet* 135:379-385
10. Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F (2011) Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res* 469:3118-3126

11. Hoff P, Gaber T, Schmidt-Bleek K, Senturk U, Tran CL, Blankenstein K, Lutkecosmann S, Bredahl J, Schuler HJ, Simon P, Wassilew G, Unterhauser F, Burmester GR, Schmidmaier G, Perka C, Duda GN, Buttgerit F (2011) Immunologically restricted patients exhibit a pronounced inflammation and inadequate response to hypoxia in fracture hematomas. *Immunol Res* 51:116-122
12. Hoff P, Maschmeyer P, Gaber T, Schutze T, Raue T, Schmidt-Bleek K, Dziurla R, Schellmann S, Lohanatha FL, Rohner E, Ode A, Burmester GR, Duda GN, Perka C, Buttgerit F (2013) Human immune cells' behavior and survival under bioenergetically restricted conditions in an in vitro fracture hematoma model. *Cell Mol Immunol* 10:151-158
13. Arron JR, Choi Y (2000) Bone versus immune system. *Nature* 408:535-536
14. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y (2006) Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 24:33-63
15. Takayanagi H (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7:292-304
16. Takayanagi H (2015) Osteoimmunology in 2014: Two-faced immunology-from osteogenesis to bone resorption. *Nat Rev Rheumatol* 11:74-76
17. Takayanagi H (2005) Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 83:170-179
18. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T (2000) T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 408:600-605
19. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D (2004) The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:457-475
20. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H (2014) Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep* 12:115-120

-
21. Lee Y (2013) The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. *BMB Rep* 46:479-483
 22. Komatsu N, Takayanagi H (2012) Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints. *Adv Immunol* 115:45-71
 23. Braun T, Schett G (2012) Pathways for bone loss in inflammatory disease. *Curr Osteoporos Rep* 10:101-108
 24. Zaiss MM, Axmann R, Zwerina J, Polzer K, Guckel E, Skapenko A, Schulze-Koops H, Horwood N, Cope A, Schett G (2007) Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum* 56:4104-4112
 25. Al-Sebaei MO, Daukss DM, Belkina AC, Kakar S, Wigner NA, Cusher D, Graves D, Einhorn T, Morgan E, Gerstenfeld LC (2014) Role of Fas and Treg cells in fracture healing as characterized in the fas-deficient (lpr) mouse model of lupus. *J Bone Miner Res* 29:1478-1491
 26. Cooles FA, Isaacs JD, Anderson AE (2013) Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep* 15:352
 27. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E (1988) Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology* 123:1442-1448
 28. Lind M, Deleuran B, Yssel H, Fink-Eriksen E, Thestrup-Pedersen K (1995) IL-4 and IL-13, but not IL-10, are chemotactic factors for human osteoblasts. *Cytokine* 7:78-82
 29. Phillips AM (2005) Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36 Suppl 3:S5-7
 30. Remedios A (1999) Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29:1029-1044, v
 31. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008) Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*
 32. Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2015) Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 11:45-54

-
33. Neunaber C, Yesilkaya P, Putz C, Krettek C, Hildebrand F (2013) Differentiation of osteoprogenitor cells is affected by trauma-haemorrhage. *Injury* 44:1279-1284
 34. Grundnes O, Reikeras O (1993) The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 64:340-342
 35. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K (1990) The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br* 72:822-829
 36. Tachibana T, Matsubara T, Mizuno K, Hirohata K (1991) Enhancement of new bone formation by hematoma at fracture site. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 65:349-358
 37. Oe K, Miwa M, Sakai Y, Lee SY, Kuroda R, Kurosaka M (2007) An in vitro study demonstrating that haematomas found at the site of human fractures contain progenitor cells with multilineage capacity. *J Bone Joint Surg Br* 89:133-138
 38. Tsunoda M, Mizuno K, Matsubara T (1993) The osteogenic potential of fracture hematoma and its mechanism on bone formation--through fracture hematoma culture and transplantation of freeze-dried hematoma. *Kobe J Med Sci* 39:35-50
 39. Bogoch ER, Moran EL (1999) Bone abnormalities in the surgical treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res*:8-21
 40. Busti AJ, Hooper JS, Amaya CJ, Kazi S (2005) Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. *Pharmacotherapy* 25:1566-1591
 41. Dominiak B, Oxberry W, Chen P (2005) Study on a nonhealing fracture from a patient with systemic lupus erythematosus and its pathogenetic mechanisms. *Ultrastruct Pathol* 29:107-120
 42. Stromqvist B (1984) Hip fracture in rheumatoid arthritis. *Acta Orthop Scand* 55:624-628
 43. Follak N, Kloting I, Merk H (2005) Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* 21:288-296

-
44. Kidder LS, Chen X, Schmidt AH, Lew WD (2009) Osteogenic protein-1 overcomes inhibition of fracture healing in the diabetic rat: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 467:3249-3256
 45. Tyndall WA, Beam HA, Zarro C, O'Connor JP, Lin SS (2003) Decreased platelet derived growth factor expression during fracture healing in diabetic animals. *Clin Orthop Relat Res*:319-330
 46. Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F (2011) Human Early Fracture Hematoma Is Characterized by Inflammation and Hypoxia. *Clin Orthop Relat Res*
 47. Hoff P, Rakow A, Gaber T, Hahne M, Senturk U, Strehl C, Fangradt M, Schmidt-Bleek K, Huscher D, Winkler T, Matziolis D, Matziolis G, Badakhshi H, Burmester GR, Duda GN, Perka C, Buttgerit F (2013) Preoperative irradiation for the prevention of heterotopic ossification induces local inflammation in humans. *Bone* 55:93-101
 48. Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, Tran CL, Schonbeck K, Hoff P, Ode A, Perka C, Duda GN, Buttgerit F (2012) Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS One* 7:e46483
 49. Wray JB (1970) The biochemical characteristics of the fracture hematoma in man. *Surg Gynecol Obstet* 130:847-852
 50. Gaber T, Haupl T, Sandig G, Tykwinska K, Fangradt M, Tschirschmann M, Hahne M, Dziurla R, Erekul K, Lautenbach M, Kolar P, Burmester GR, Buttgerit F (2009) Adaptation of human CD4+ T cells to pathophysiological hypoxia: a transcriptome analysis. *J Rheumatol* 36:2655-2669
 51. Gaber T, Strehl C, Sawitzki B, Hoff P, Buttgerit F (2015) Cellular energy metabolism in T-lymphocytes. *Int Rev Immunol* 34:34-49
 52. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP (2000) Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res*:224-237
 53. Schmidt-Bleek K, Kwee BJ, Mooney DJ, Duda GN (2015) Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev* 21:354-364

-
54. Schmidt-Bleek K, Schell H, Lienau J, Schulz N, Hoff P, Pfaff M, Schmidt G, Martin C, Perka C, Buttgereit F, Volk HD, Duda G (2014) Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med* 8:120-130
 55. Cornell CN, Lane JM (1992) Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*:297-311
 56. Hauser CJ, Zhou X, Joshi P, Cuchens MA, Kregor P, Devidas M, Kennedy RJ, Poole GV, Hughes JL (1997) The immune microenvironment of human fracture/soft-tissue hematomas and its relationship to systemic immunity. *J Trauma* 42:895-903; discussion 903-894
 57. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgereit F, Duda GN (2010) The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev* 16:427-434
 58. Bosco MC, Delfino S, Ferlito F, Puppo M, Gregorio A, Gambini C, Gattorno M, Martini A, Varesio L (2009) The hypoxic synovial environment regulates expression of vascular endothelial growth factor and osteopontin in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 36:1318-1329
 59. Nakashima K, de Crombrughe B (2003) Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet* 19:458-466
 60. Komori T (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339:189-195
 61. Komori T (2011) Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem* 112:750-755
 62. Teti A (2011) Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep* 9:264-273
 63. Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh DR (1994) Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand* 65:462-466

-
64. Schmidt-Bleek K, Schell H, Kolar P, Pfaff M, Perka C, Buttgerit F, Duda G, Lienau J (2009) Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep. *J Orthop Res* 27:1147-1151
 65. Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL (2009) Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res* 24:1347-1353
 66. Martin D, Galisteo R, Gutkind JS (2009) CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *J Biol Chem* 284:6038-6042
 67. Rosenkilde MM, Schwartz TW (2004) The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS* 112:481-495
 68. Yadav A, Saini V, Arora S (2010) MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 411:1570-1579
 69. Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L, Blokhuis T (2011) Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol* 89:669-673
 70. Tripmacher R, Gaber T, Dziurla R, Haupl T, Erekul K, Grutzkau A, Tschirschmann M, Scheffold A, Radbruch A, Burmester GR, Buttgerit F (2008) Human CD4(+) T cells maintain specific functions even under conditions of extremely restricted ATP production. *Eur J Immunol* 38:1631-1642
 71. Chidrawar SM, Khan N, Chan YL, Nayak L, Moss PA (2006) Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing* 3:10
 72. Ishikawa M, Nishioka M, Hanaki N, Miyauchi T, Kashiwagi Y, Kawasaki Y, Miki H, Kagawa H, Ioki H, Nakamura Y (2006) Postoperative host responses in elderly patients after gastrointestinal surgery. *Hepatogastroenterology* 53:730-735
 73. Kang SC, Matsutani T, Choudhry MA, Schwacha MG, Rue LW, Bland KI, Chaudry IH (2004) Are the immune responses different in middle-aged and young mice following bone fracture, tissue trauma and hemorrhage? *Cytokine* 26:223-230
 74. Smith RM (2007) Immunity, trauma and the elderly. *Injury* 38:1401-1404

-
75. Woodland DL, Blackman MA (2006) Immunity and age: living in the past? *Trends Immunol* 27:303-307
 76. Hadjiargyrou M, O'Keefe RJ (2014) The convergence of fracture repair and stem cells: interplay of genes, aging, environmental factors and disease. *J Bone Miner Res* 29:2307-2322
 77. Arason GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR (2010) Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol* 71:317-328
 78. Yu D, Vinuesa CG (2010) Multiple checkpoints keep follicular helper T cells under control to prevent autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 7:198-203
 79. Fransen M, Neal B (2004) Non-steroidal anti-inflammatory drugs for preventing heterotopic bone formation after hip arthroplasty. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001160
 80. Kienapfel H, Koller M, Wust A, Sprey C, Merte H, Engenhardt-Cabillic R, Griss P (1999) Prevention of heterotopic bone formation after total hip arthroplasty: a prospective randomised study comparing postoperative radiation therapy with indomethacin medication. *Arch Orthop Trauma Surg* 119:296-302
 81. Ranganathan K, Loder S, Agarwal S, Wong VC, Forsberg J, Davis TA, Wang S, James AW, Levi B (2015) Heterotopic Ossification: Basic-Science Principles and Clinical Correlates. *J Bone Joint Surg Am* 97:1101-1111
 82. Rosendahl S, Christoffersen JK, Norgaard M (1977) Para-articular ossification following hip replacement. 70 arthroplasties ad modum Moore using McFarland's approach. *Acta Orthop Scand* 48:400-404
 83. Maurer M, von Stebut E (2004) Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1882-1886
 84. Hill N, Sarvetnick N (2002) Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 14:791-797
 85. Wu Z, Xu Y (2010) IL-15R alpha-IgG1-Fc enhances IL-2 and IL-15 anti-tumor action through NK and CD8+ T cells proliferation and activation. *J Mol Cell Biol* 2:217-222

-
86. Boyman O, Letourneau S, Krieg C, Sprent J (2009) Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells. *Eur J Immunol* 39:2088-2094
 87. Allori AC, Sillon AM, Warren SM (2008) Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev* 14:259-273
 88. Moens S, Goveia J, Stapor PC, Cantelmo AR, Carmeliet P (2014) The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 25:473-482
 89. Agematsu K (2000) Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol* 15:573-576
 90. Kim KM, Reth M (1995) Signaling difference between class IgM and IgD antigen receptors. *Ann N Y Acad Sci* 766:81-88
 91. Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Neves P, Shen P, Stervbo U, Boudinot P, Anderton SM, Fillatreau S (2010) Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunol Rev* 233:146-161
 92. Ishikawa H, Tanaka K, Kutsukake E, Fukui T, Sasaki H, Hata A, Noda S, Matsumoto T (2010) IFN-gamma production downstream of NKT cell activation in mice infected with influenza virus enhances the cytolytic activities of both NK cells and viral antigen-specific CD8+ T cells. *Virology* 407:325-332
 93. Moreno M, Molling JW, von Mensdorff-Pouilly S, Verheijen RH, Hooijberg E, Kramer D, Reurs AW, van den Eertwegh AJ, von Blomberg BM, Scheper RJ, Bontkes HJ (2008) IFN-gamma-producing human invariant NKT cells promote tumor-associated antigen-specific cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 181:2446-2454
 94. Barbul A, Breslin RJ, Woodyard JP, Wasserkrug HL, Efron G (1989) The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg* 209:479-483
 95. Schaffer M, Barbul A (1998) Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br J Surg* 85:444-460

-
96. Bour-Jordan H, Bluestone JA (2009) Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev* 229:41-66
 97. Kolar P, Knieke K, Hegel JK, Quandt D, Burmester GR, Hoff H, Brunner-Weinzierl MC (2009) CTLA-4 (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells in mice. *Arthritis Rheum* 60:123-132
 98. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36:1392-1404
 99. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88:873-884
 100. Watson L, Elliman SJ, Coleman CM (2014) From isolation to implantation: a concise review of mesenchymal stem cell therapy in bone fracture repair. *Stem Cell Res Ther* 5:51
 101. Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S (2013) Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop* 37:2491-2498
 102. Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148:399-408
 103. Semenza GL (2011) Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76:347-353
 104. Yang C, Jiang L, Zhang H, Shimoda LA, DeBerardinis RJ, Semenza GL (2014) Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. *Methods Enzymol* 542:425-455
 105. Semenza GL (2013) HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest* 123:3664-3671
 106. Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R (2010) Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal* 8:18

107. Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, Hung SC (2011) Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 117:459-469
108. Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, Guan J, Ganju RK, Sen CK (2011) Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition. *J Cell Biochem* 112:804-817
109. Canturk NZ, Esen N, Vural B, Canturk Z, Kirkali G, Oktay G, Solakoglu S (2001) The relationship between neutrophils and incisional wound healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:108-116

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| CXCR-4 | CXC Chemokine Receptor Type 4 |
| FGF basic | Basic Fibroblast Growth Factor |
| GLUT-1 | Glucose Transporter 1 |
| GY | Gray |
| HIF | Hypoxia Inducible Factor |
| IL | Interleukin |
| LDHA | Laktatdehydrogenase A |
| MCP-1 | Monocyte Chemotactic Protein 1 |
| MIP-1 | Macrophage Inflammatory Protein |
| NKT-Zellen | Natürliche Killer-T-Zellen |
| PGK-1 | Phosphoglyceratkinase |
| PPARG | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma |
| RANTES | Regulated on Activation, normal T cell expressed and secreted |
| SPP1 | Secreted Phosphoprotein 1 (Proteinprodukt Osteopontin) |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| RANKL | Receptor Activator of NF- κ B Ligand |
| RUNX-2 | Runt-related Transcription Factor 2 |

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Buttgereit für seine stetige Unterstützung in den vielen Jahren unserer Zusammenarbeit. Ich bedanke mich für seine Förderung, seine zahlreichen guten Ratschläge, sein Vertrauen und die vielen konstruktiven Diskussionen. Ich freue mich sehr über die vielen Möglichkeiten und wissenschaftlichen Projekte, die sich für mich als Teil seiner Arbeitsgruppe ergeben haben.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester, der sämtliche wissenschaftliche Projekte mit großem Interesse gefördert hat.

Darüber hinaus haben mich Herr Prof. Dr. Frank Buttgereit und Herr Prof. Dr. Gerd-Rüdiger Burmester in Bezug auf meine klinische Ausbildung unterstützt. Dafür möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken, denn meine vielseitige klinische Ausbildung und mein wissenschaftlicher Werdegang haben sich im Laufe der vielen Jahre an dieser Klinik sehr gut ergänzt.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Buttgereit möchte ich ebenfalls sehr herzlich danken. Ich habe hier eine enorme Unterstützung erfahren, insbesondere war mir durch die hervorragende und harmonische Zusammenarbeit auch die Fortsetzung meiner Forschungsprojekte während der klinischen Ausbildungszeit und auch während der Elternzeit möglich. Besonders erwähnen möchte ich hier, dass viele Mitglieder der Arbeitsgruppe zu Freunden geworden sind. Ich danke Herrn Dr. Timo Gaber, Frau Manuela Jakstadt und ihren goldenen Händen, Frau Dr. Cindy Strehl und Frau Annemarie Lang. Ich bedanke mich auch bei den zum Teil von mir betreuten Diplomanden und Doktoranden, die fleißig an unseren Forschungsprojekten gearbeitet haben, sowie bei den ehemaligen Mitarbeitern: Frau Dr. Monique Fangradt, Herrn Dr. Patrick Maschmayer, Herrn Dr. Martin Hahne und Frau Sarah Fügener.

Ich möchte mich ebenfalls ganz herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Rheumatologie bedanken, die mich insbesondere in Bezug auf Patientenmaterial für Forschungszwecke jederzeit unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Carsten Perka sowie seinem Team möchte ich mich für die Unterstützung in den letzten Jahren bedanken, die Arbeit wäre ohne die zahlreichen Proben aus der Orthopädie nicht möglich gewesen. Auch den ehemaligen Mitarbeitern, Herrn Prof. Dr. Georg

Matziolis sowie Herrn Dr. Eric Röhner, möchte ich danken. Erfreulicherweise konnten wir unsere Zusammenarbeit auch nach ihrem Wechsel nach Jena erfolgreich fortsetzen.

Bei Frau Dr. Katharina Schmidt-Bleek und Herrn Prof. Dr. Georg Duda möchte ich mich für die langjährige gute Zusammenarbeit bedanken.

Ich möchte meiner Mutter ganz herzlich danken für ihre große Unterstützung während meines beruflichen Werdegangs. Zur Unterstützung einer weiblichen Karriere gibt es kaum etwas Schöneres als eine liebevolle Oma. Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Holger für seine fortwährende Unterstützung, sein Verständnis und seine Geduld in Bezug auf Wissenschaft und das sämtliche restliche Leben und unseren wunderbaren Töchtern Helena Clara und Lucie Charlotte.

8. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift abgegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift