

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Interleukin-1 β -Kurzzeitstimulation humaner
mesenchymaler Stammzellen in Ko-Kulturen mit Osteosarkomzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jan Oliver Voß

aus Berlin

Datum der Promotion: 01.03.2019

INHALTSVERZEICHNIS

Kurzfassung	6
Abstract	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	10
1.1 Knochen	10
1.1.1 Knochenaufbau	10
1.1.2 Knochenbildung	12
1.1.3 Knochenabbau	13
1.1.4 Formen des Knochengewebes	13
1.1.5 Extrazellulärmatrix	14
1.1.6 Knochenbildung (Ossifikation)	15
1.2 Frakturheilung und Regeneration	15
1.2.1 Direkte und indirekte Knochenheilung	15
1.2.2 Einfluss unterschiedlicher Kompartimente	16
1.2.3 Einfluss proinflammatorischer Zytokine	17
1.2.4 Therapieoptionen beeinträchtigter Knochenstrukturen	19
1.3 Stammzellen	20
1.3.1 Mesenchymale Stammzellen	21
1.4 Ziel der Arbeit	25
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Übersicht des Versuchsaufbaus	27
2.2 Zellreihen	27
2.2.1 Humane mesenchymale Stromazellen aus Knochenmarksgewebe	27
2.2.2 Humane Osteosarkom-Zelllinie MG-63	28
2.3 Zellbiologische Methodik	28
2.3.1 Allgemeine Prinzipien	28
2.3.2 Zellgewinnung humaner mesenchymaler Stromazellen	28
2.3.3 Zellernte und Zellaufteilung	29
2.3.4 Kryokonservierung und Zellauftau	30
2.3.5 Osteogene Differenzierung	30
2.3.6 IL-1 β -Stimulation humaner mesenchymaler Stromazellen	31
2.4 Zellkultur	31

2.5 Molekularanalyse	32
2.5.1 RNA-Extraktion	32
2.5.2 Reverse Transkription	33
2.5.3 Quantitative Real-Time-PCR	33
2.5.4 DNA-Quantifizierung	34
2.6 Aktivitätsanalyse der alkalischen Phosphatase	35
2.7 Determinierung von Kalzifikationen	35
2.7.1 Einlagerung radioaktiven Kalziums	35
2.7.2 Alizarin-Red-S	36
2.8 Statistik	37
2.9 Laborartikel	38
2.9.1 Puffer und Lösungen	38
2.9.2 Gene	38
2.9.3 Peptide	38
2.9.4 Sonstige Reagenzien und Chemikalien	38
2.9.5 Sonstige Materialien	39
2.9.6 Geräte	39
2.9.7 Verwendete Software	40
3 ERGEBNISSE	41
3.1 Proliferationsverhalten nach IL-1 β -Stimulation	41
3.2 IL-1 β -Stimulation moduliert die ALP-Aktivität in hMSCs	42
3.3 Verminderte ⁴⁵Ca-Einlagerung nach IL-1 β -Stimulation	43
3.4 Alizarin-Red-S-Bestimmung	43
3.4.1 ARS-Quantifizierung	43
3.4.2 ARS-Färbung von Zellkulturen	44
3.5 mRNA-Expression nach IL-1 β -Stimulation	45
3.5.1 Einfluss der IL-1 β -Stimulation auf die mRNA-Expression humaner MSCs	46
3.5.2 Runx2/Sox9-Quotient humaner MSCs	49
3.5.3 mRNA-Expression ko-kultivierter MG-63-GFP-Zellen	50
3.5.4 Runx2/Sox9-Quotient ko-kultivierter MG-63-GFP-Zellen	54
4 DISKUSSION	55
4.1 Einfluss der Kurzzeitstimulation von hMSCs auf mRNA-Ebene	57
4.1.1 Veränderte Runx2/Sox9-Expression von hMSCs nach IL-1 β -Stimulation	58
4.1.2 Einfluss der IL-1 β -Stimulation von hMSCs auf Gene der Osteoblastendifferenzierung	59

4.2 Einfluss der IL-1 β -Stimulation von hMSCs auf Proteinebene	61
4.2.1 Auswirkung der IL-1 β -Stimulation auf den Gesamt-DNA-Gehalt.....	61
4.2.2 Erhöhte ALP-Aktivität bei beeinträchtigter Kalziumeinlagerung	62
4.3 Auswirkung stimulierter hMSCs auf ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen	63
4.3.1 Stimulierte hMSCs evozieren Genveränderung in MG-63-GFP-Zellen	63
4.3.2 Osteogene Differenzierung MG-63-GFPs unter dem Einfluss stimulierter hMSCs	64
4.3.3 Kalzifikation von MG-63-GFP-Zellen durch Zellkommunikation?.....	66
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	68
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	78
LEBENS LAUF	79
PUBLIKATIONS LISTE	80
DANKSAGUNG.....	82

Kurzfassung

Einleitung: Ausgedehnte Knochendefekte mit eingeschränkter Wundheilung, die durch Frakturen oder infekt- sowie tumorassoziierten Resektionen verursacht werden, stellen im klinischen Alltag eine therapeutische Herausforderung dar, wenn konventionelle Behandlungsmaßnahmen an ihre Grenzen stoßen. Neue Behandlungsansätze haben das Ziel, die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen (hMSCs) als fundamentalen Bestandteil der Knochenheilung zu unterstützen bzw. diese gezielt zu stimulieren. Neben der Stammzellendifferenzierung rückt die Beeinflussung umliegender Zellen durch parakrine Sekretion vermehrt in den Fokus. Interleukin-1 β (IL-1 β) wird als ein proinflammatorisches Zytokin in der Frühphase der Frakturheilung vermehrt exprimiert und mit der osteogenen Differenzierung von Stammzellen in Verbindung gebracht. Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der IL-1 β -Stimulation auf die Differenzierung humaner MSCs zu untersuchen sowie die Auswirkung dieser Differenzierung auf ko-kultivierte Osteosarkomzellen zu analysieren.

Methodik: hMSCs von drei Spendern wurden in unabhängigen Experimenten für zwei Stunden mit 10 ng/ml IL-1 β inkubiert und anschließend mit Osteosarkomzellen der MG-63-GFP-Zelllinie in einem Transwellverfahren ko-kultiviert. Die Kultivierung erfolgte für 28 Tage in Kontroll- oder Differenzierungsmedium. Zur Untersuchung genetischer und funktioneller Auswirkungen wurden im Verlauf mRNA-Expression, DNA-Gehalt, Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) sowie die Kalziumaufnahme der Extrazellulärmatrix bestimmt.

Ergebnisse: Durch die Stimulation humaner MSCs und Kultivierung in Differenzierungsmedium konnten deutliche Anzeichen einer osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Die einsetzende Differenzierung der humanen MSCs führte zudem zu einer Beeinträchtigung, das Differenzierungsverhalten ko-kultivierter MG-63-GFP-Zellen zu beeinflussen. Durch die Kultivierung stimulierter hMSCs in Kontrollmedium resultierte hingegen ein eher regulierender Einfluss auf ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen, welche in der Folge eine Hochregulation osteogen-spezifischer Gene sowie eine erhöhte ALP-Aktivität ihrerseits zeigten.

Schlussfolgerung: Eine zweistündige IL-1 β -Stimulation humaner MSCs führt in Abhängigkeit vom Kulturmedium zu einer veränderten Zelldifferenzierung sowie zu einer Beeinflussung des Differenzierungsverhaltens ko-kultivierter MG-63-GFP-Zellen. Diese Erkenntnis bietet neue Möglichkeiten im Rahmen zukünftiger klinischer intraoperativer Zelltherapiekonzepte.

Schlagwörter: Knochenheilung, osteogene Differenzierung mesenchymale Stammzellen, Interleukin-1 β , MG-63-GFP

Abstract

Introduction: Impaired bone healing in bones with critical size defects due to open bone fracture as well as infect- or tumor-associated surgery, are challenging the current therapeutic regimes. New treatment approaches target to accelerate bone healing by enhanced osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells (hMSCs). Besides the aim to direct the stem cell differentiation, the interference of the surrounding cell environment by paracrine signalling is currently gaining interest. Interleukin-1 β (IL-1) – a proinflammatory cytokine, which is highly expressed in the early fracture-healing phase – has been attributed to exert significant impact on the differentiation behaviour of hMSCs. Here, we investigated the effect of a 2-hour stimulation with Interleukin-1 β . We aimed to analyse the differentiation and paracrine activity of bone marrow derived hMSCs in co-culture with MG-63- cells *in vitro*.

Methods: HMSCs from three donors were incubated for 2 hours with 10ng/ml IL-1 β *in vitro* and subsequently co-cultured with osteosarcoma cells (MG-63-GFP cell line) in a transwell system during independent experiments. Cells were either cultured in control medium or differentiation medium for 28 days. Genetic and functional effects were investigated by analysing mRNA gene expression, DNA content, alkaline phosphatase enzyme activity (ALP), Alizarin Red S staining and quantification and the Calcium-45 incorporation of the extracellular matrix.

Results: Stimulated hMSCs cultured in control medium exhibited a more regulatory effect on co-cultured MG-63-GFP cells leading to an up-regulation in osteogenic genes in combination with increased ALP activity. While stimulated hMSCs cultured under differentiation conditions exhibit signs of osteogenic differentiation, stimulation also caused an impaired stimulatory effect on the co-cultured MG-63-GFP cells.

Conclusion: This data has demonstrated that a short, clinically relevant, 2-hour stimulation of hMSCs has the potential to modify their long-term behaviour and offers a novel approach for clinical cell therapy protocols. In addition, we were able to show, that advancing the osteogenic differentiation of hMSCs is affiliated with a loss in regulatory function when co-cultured with MG-63-GFP cells. These results reveal the potential value of stimulated hMSCs in an intraoperative setting.

Keywords: bone healing, osteogenic differentiation, mesenchymal stem cell, Interleukin-1 β , MG-63-GFP

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALP	alkalische Phosphatase
ANOVA	engl.: <i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
BMAC	engl.: <i>bone marrow aspirate concentrate</i> , konzentriertes Knochenmarkaspirat
BM-MSC	engl.: <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i> , knochenmarkspezifische mesenchymale Stromazelle
BMP	engl.: <i>bone morphogenetic protein</i> , knochenmorphogenetisches Protein
CD	engl.: <i>Cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppen
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS
Ci	Curie (Einheit)
Col1	engl.: <i>type 1 collagen</i> , Kollagen Typ 1
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DM	engl.: <i>differentiation medium</i> , Differenzierungsmedium
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	engl.: <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
ECACC	engl.: <i>European Collection of Cell Cultures</i>
EDTA	engl.: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	engl.: <i>fluorescence-activated cell sorting</i> , fluoreszenz-markierte Durchflusszytometrie
FBS	engl.: <i>fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FGF	engl.: <i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
g	mittlere Erdbeschleunigung
GCSF	engl.: <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GM	engl.: <i>growth medium</i> , Wachstumsmedium
°C	Grad Celsius
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
IGF	engl.: <i>Insulin-like growth factor</i> ; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
ML	engl.: <i>monolayer</i> , Ein-Zellschicht
MM	engl.: <i>micromass</i> , Mikromasse
MMLV	Moloney-Mausleukämievirus
mRNA	engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MSC	engl.: <i>mesenchymal stem cell</i> , mesenchymale Stammzelle bzw. mesenchymale Stromazelle
n	Anzahl
OC	Osteocalcin
pNP	para-Nitrophenol
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT-PCR	engl.: <i>real time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
Runx2	engl.: <i>runt-related transcription factor 2</i>
SCF	engl.: <i>stem cell factor</i> , Stammzellfaktor
SEM	engl.: <i>standard error of the mean</i> , Mittelwert des Standardfehlers
Sox9	engl.: <i>Sry-related transcription factor 9</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
α -MEM	engl.: <i>alpha Minimum Essential Medium</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Knochen

Als besondere Form des Bindegewebes hat der Knochen neben seiner Funktion als Schutz-, Stütz- und Halteapparat metabolische und blutbildende Eigenschaften. Der hormongesteuerte Auf- und Abbau der Knochensubstanz unterliegt einem physiologischen Gleichgewicht, über das die Konzentration an Kalzium- und Phosphationen im Blut reguliert wird (1). Im Knochenmark, welches sich in der Markhöhle des Knochens befindet, lässt sich ein heterogenes Zellmuster nachweisen. Einige dieser Zellen sind als sog. undifferenzierte Vorläufer- oder auch Stammzellen sowohl für die Blutbildung (Hämatopoese) als auch für die Bildung von mesenchymalen Gewebearten (Mesengenese) verantwortlich.

1.1.1 Knochenaufbau

Das menschliche Skelett besteht aus verschiedenen Knochen, die unterschiedliche Größe und Formen aufweisen (2). Knochenform und -aufbau werden dabei maßgeblich durch die Funktion des Knochens und seiner Lage im Organismus bedingt. Makroskopisch kann eine spongiöse Bauform (*Substantia spongiosa* – Spongiosa) von einer diese ummantelnden kompakten Bauform (*Substantia compacta* – Kompakta) abgegrenzt werden. Während der spongiöse Knochen den inneren Anteil des Knochens bildet und aus einem schwammähnlichen Netzwerk von Knochenbälkchen – den sog. Knochentrabekeln – gebildet wird, weist der äußere, kompakte Knochen ein dichtes System aus longitudinal angeordneten Osteonen auf (1).

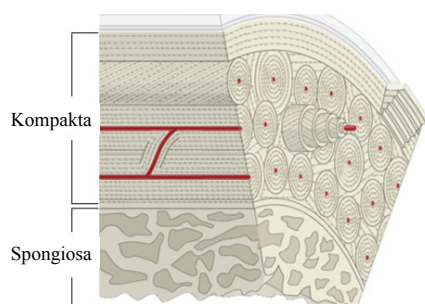


Abb. 1: Schematische Darstellung der Kompakta und Spongiosa (aus dem Englischen übersetzt; (3)).

Die schwammähnliche Struktur der Spongiosa verringert das Gesamtgewicht und schafft eine um ein Vielfaches größere Knochenoberfläche, die aufgrund einer starken Vaskularisation einen bedeutenden Anteil bei Resorptionsvorgängen darstellt (2). Die Ausrichtung und Architektur des Systems aus Knochentrabekeln der Spongiosa wird durch die Kraftvektoren von Druck- und Zugspannung beeinflusst und dabei maßgeblich durch die Beanspruchung bedingt (2). Julius Wolff sprach in seinem „Gesetz der Transformation der Knochen“ von 1892 in diesem

Zusammenhang von einer funktionellen Anpassung der Knochenstruktur auf einwirkende Kräfte (4).

Von außen ist der Knochen mit Ausnahme der Gelenkflächen von einer Knochenhaut – dem Periost – umgeben. Das Periost dient neben der Fixierung von Sehnen und Bändern der nervalen und vaskulären Versorgung des Knochens und ist im Rahmen von Wachstum, Regeneration und Umbauvorgängen für die Vitalität des Knochens essentiell (2).

Die äußere Schicht der Knochenhaut – *Stratum fibrosum* – wird von einer inneren, dem Knochen direkt anliegende Schicht – *Stratum osteogenicum* – abgegrenzt (vgl. Abb. 2). Das Stratum fibrosum, das aus geflechtartig angeordneten elastischen und straffen Bindegewebsfasern gebildet wird, vermittelt über sogenannte Sharpey-Fasern den Knochenkontakt und dient somit vor allem der Kraftübertragung (1).

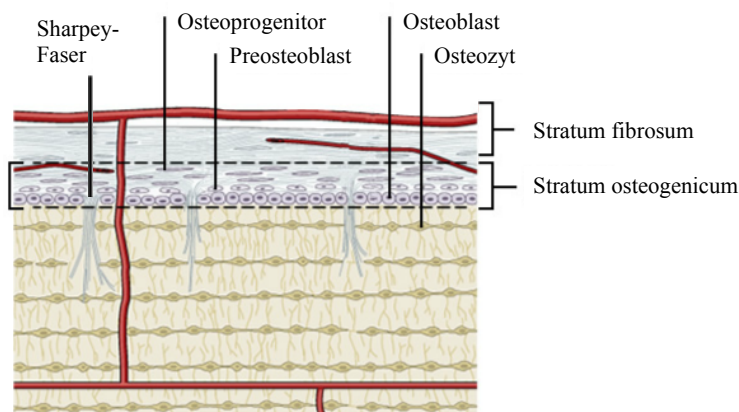


Abb. 2: Schematischer Aufbau der äußeren Knochenschicht (modifiziert und aus dem Englischen übersetzt; (3)).

Das Stratum osteogenicum hingegen besteht aus lockerem Bindegewebe, das ein dichtes Netz an Kapillaren und Nervenfasern beherbergt. Im Gegensatz zum Stratum fibrosum ist das Stratum osteogenicum arm an Kollagenfasern jedoch reich an mesenchymalen Osteoprogenitorzellen, die über ein sogenanntes osteogenes Differenzierungspotential die Fähigkeit aufweisen, sich in Osteoblasten weiter zu entwickeln (1).

Von innen ist die Knochenoberfläche mit Endost ausgekleidet, das sich bis in die Haverskanäle ausdehnt. Ähnlich dem Periost liegen dem Endost Osteoprogenitorzellen an. Diese Zellen vermitteln das osteogene Potential, welches im Rahmen von Auf- und Umbauvorgängen eine wichtige Rolle spielt. Osteoprogenitorzellen differenzieren sich als Vorläuferzellen mesenchymalen Ursprungs im Verlauf zu Osteoblasten, die die knochenspezifische, noch unmineralisierte organische Matrix – das sog. Osteoid – produzieren und eine fundamentale Rolle im Knochenumbau einnehmen (1).

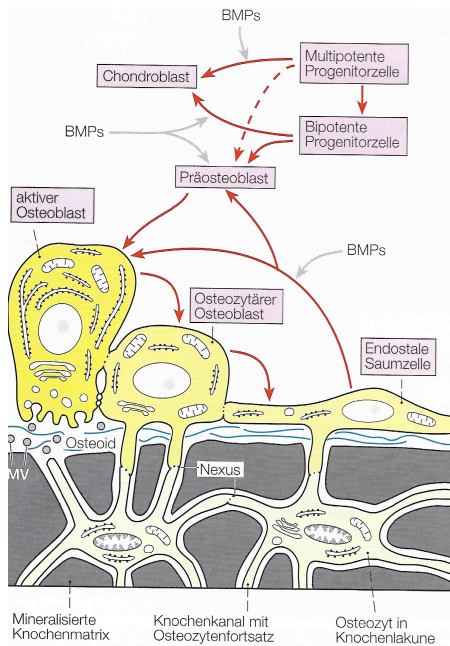


Abb. 3: Schematische Darstellung der osteoblastären Zellreihe (MV = Matrixvesikel, BMP = *bone morphogenic protein*) (2).

1.1.2 Knochenbildung

Im Rahmen der Osteoidproduktion mauern sich die Osteoblasten durch die Produktion der Extrazellulärmatrix immer weiter ein und werden dadurch voneinander getrennt. Sobald der Osteoblast vollständig von der Knochengrundsubstanz eingebettet ist wird er als Osteozyt bezeichnet. Die einzelnen Knochenlamellen sind dabei schichtartig um die Knochenzelle angeordnet und formen ein System aus verschiedenen Hohlräumen. Dieses System setzt sich aus Knochenhöhlen – den sog. Lakunen –, in denen der Osteozyt verweilt, und kleinen Kanälchen – den sog. *Canaliculi* –, in denen die Zellfortsätze der Osteozyten hineinragen, zusammen. Über diese Kanälchen bleiben die Osteozyten untereinander in Kontakt (2).

Osteozyten weisen im Vergleich zu Osteoblasten eine verminderte Stoffwechselaktivität auf (5) und haben die Eigenschaft zur Zellteilung verloren. Sie dienen hauptsächlich der Synthese von kollagenen Fasern, der Mineralisation sowie der Regulation der Osteoklastenaktivität.

Zur Anpassung an die ständig wechselnden Anforderungen und Belastungen an das Skelettsystem werden durch ein komplexes Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten permanente Umbauprozesse durchgeführt, die das physiologische Gleichgewicht des Knochenumsatzes aufrechterhalten (2). Etwa 20 % der spongiösen Knochenstruktur unterliegen einem kontinuierlichem *Remodelling*-Prozess (6). Diese Eigenschaft ist im Vergleich zu bradytrophem Geweben – wie z.B. dem Knorpel – einzigartig.

1.1.3 Knochenabbau

Osteoklasten sind 30–100 µm große mehrkernige Zellen, die durch die Fusion mehrerer mononukleärer Vorläuferzellen hämatopoetischen Ursprungs entstehen und somit dem mononukleär-phagozytären System angehören (2). Ihre Hauptaufgabe gilt der Resorption mineralisierter Knochenmatrix. Aktive Osteoklasten lagern sich hierfür der Knochenmatrix an und bilden eine Reaktionszone (sog. Versiegelungszone) (7). In diese Resorptionszone werden durch H⁺-ATPasen Protonen gepumpt, die in der Folge mit Hilfe proteolytischer Enzyme die Knochenmatrix zerstören. Dadurch entstehen im Bereich des kompakten Knochengewebes Erosionstunnel – sog. Bohrkanäle –, während im Bereich des spongiösen Knochens Erosionslakunen – sog. Howship-Lakunen – gebildet werden. Abgebaute Knochen wird im Rahmen von Umbauvorgängen durch Osteoblasten erst langsam wieder aufgebaut (2).

1.1.4 Formen des Knochengewebes

Histologisch können zwei Arten von Knochengewebe unterschieden werden: der Geflecht- und der Lamellenknochen. Die geometrische Anordnung der Kollagenbündel im Geflechtknochen ist ungeordnet und folgt keiner einheitlichen Verlaufsrichtung, während der Lamellenknochen eine regelmäßige und geordnete Ausrichtung der Kollagenbündel aufweist.

Im Rahmen der Knochenentwicklung und in den meisten Fällen der Frakturheilung entsteht primär der unreife Geflechtknochen. Erst durch den zeitlich verzögert einsetzenden Umbau des Knochens wird der biomechanisch hochwertige Lamellenknochen gebildet (2).

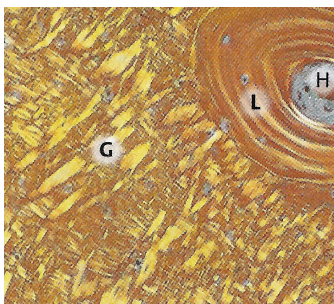


Abb. 4: Polimerisationsoptische Darstellung der Geflecht- (G) und Lamellenanordnung (L) um einen Havers-Kanal im Bereich des kompakten Unterkieferknochens im Schwein (7).

Ausdifferenzierter Knochen zeigt die typische lamelläre Struktur mit unterschiedlicher, geometrischer Ausrichtung des Lamellensystems von spongiösem zu kompaktem Knochen. Die Lamellen des kompakten Knochens sind aus mineralisierten Kollagenfibrillen aufgebaut, die zwischen unterschiedlichen Lamellen die Verlaufsrichtung ändern, jedoch innerhalb der einzelnen Lamelle einen gleichausgerichteten Verlauf aufweisen (2).

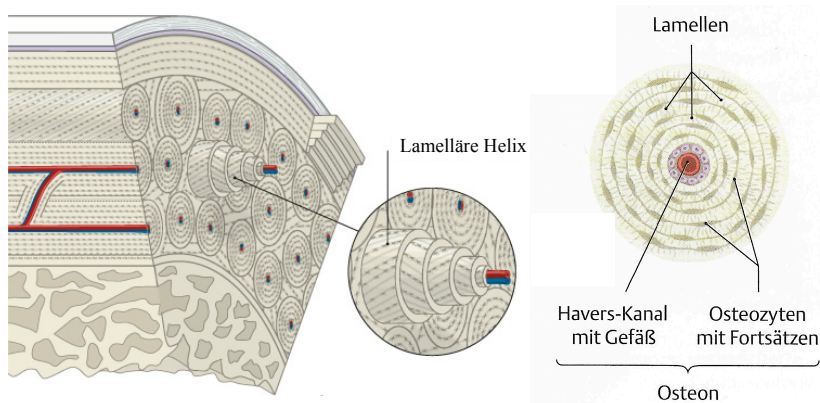


Abb. 5 und 6: Links: Schematische Darstellung der Helixstruktur des Osteons (aus dem Englischen übersetzt; (3)) und rechts: Aufbau eines Osteons (8).

Osteone gelten als Grundeinheit des kompakten Knochens und setzen sich aus einem zentral gelegenen Havers-Kanal sowie einem System aus bis zu 30 konzentrischen Lamellen und den darin eingebetteten Osteozyten zusammen. Diese Lamellen liegen konzentrisch angeordnet um einen Havers-Kanal, in dem kleine Blutgefäße mit fenestriertem Endothel und zumeist marklose Nervenfasern verlaufen. Über ein System von transversal verlaufenden Volkmann-Kanälen stehen wiederum die Havers-Kanäle in Kontakt (2).

1.1.5 Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix des Knochens setzt sich aus ca. 65 % anorganischen und 35 % organischen Bestandteilen zusammen, die in ihrer Kombination dem Knochen seine harte und gleichzeitig flexible Eigenschaft verleihen (1). Den Hauptbestandteil der anorganischen Matrix bildet mit mehr als 90 % das Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), das ca. 45 % des Feuchtgewichtes des Knochengewebes ausmacht und in einem hexagonalen angeordneten Kristallsystem vorliegt (7). Im Knochen lagert sich das Hydroxylapatit aufgrund seiner Affinität zu den Kollagenmolekülen als nadelförmige kristalline Struktur den Kollagenfibrillen longitudinal an (Biominalisation) und verleiht dem Knochen dadurch seine Festigkeit.

Mehr als 90 % der organischen Komponenten bestehen aus Kollagenfibrillen vom Typ 1, die sich zu Kollagenfasern zusammenschließen und für die ausgeprägte Elastizität und hohe Zugfestigkeit verantwortlich sind (2). Weitere Bestandteile der organischen Komponente bilden Matrixproteine (u.a. Kollagen Typ 5, Osteocalcin und Metalloproteinasen), Proteoglykane (u.a. Decorin, Biglycan und Osteoadherin) sowie verschiedenen Glykoproteine (u.a. Osteonectin, Osteopontin, *Bone*-Sialoprotein, und Fibronectin) (7).

1.1.6 Knochenbildung (Ossifikation)

Generell werden zwei unterschiedliche Formen der Knochengewebsbildung unterschieden: die desmale (membranäre oder *intramembranous bone formation*) und die chondrale (kartilaginäre oder *endochrondrale bone formation*) Ossifikation. In beiden Fällen bilden mesenchymale Zellen die Grundlage für die folgenden Prozesse.

Während der desmalen Knochenbildung wandeln sich mesenchymale Progenitorzellen direkt in Osteoblasten um und formen so eine primäre Spongiosa aus unreifem Geflechtknochen, welcher mit der Zeit in Lamellenknochen umgewandelt wird. Diese Art der Knochenbildung wird durch das Stratum osteogenicum des Periosts gesteuert (9).

Im Rahmen der chondralen Ossifikation wird über die Rekrutierung, Proliferation und letztendlich Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen ein Knorpelgerüst gebildet, welches im Verlauf mineralisiert und in Knochengewebe umgewandelt wird (9, 10). Darüber hinaus können zwei Arten der chondralen Ossifikation voneinander differenziert werden: die enchondrale Ossifikation und die perichondrale Ossifikation. Über die enchondrale Ossifikation erfährt der Knochen v.a. ein Längenwachstum während die perichondrale Ossifikation für das Dickenwachstum verantwortlich ist (2).

1.2 Frakturheilung und Regeneration

Ist die einwirkende Kraftentwicklung auf den Organismus zu groß, frakturiert der Knochen und es kommt zur Verletzung des periostalen Gewebes sowie des umgebenden Weichgewebes und der Blutgefäße. Die physiologischen Mechanismen, die zur Knochenheilung führen, spiegeln ein sehr komplexes System aus einzelnen, sich überschneidend ablaufenden Komponenten wider. Im Rahmen der Frakturheilung werden in modifizierter Art und Weise Vorgänge der embryonalen Knochenentwicklung durchlaufen (11). Ziel des Heilungsprozesses ist die vollständige Wiederherstellung – sog. *restitutio ad integrum* – der ursprünglichen Form und Funktion (12). Im Gegensatz zur Heilung anderer Gewebearten erfolgt bei der Knochenheilung keine Bildung von Narbengewebe, sondern die vollständige Regeneration des Knochengewebes (13).

1.2.1 Direkte und indirekte Knochenheilung

Es werden grundsätzlich zwei Formen der Knochenheilung unterschieden: die direkte (primäre) Knochenheilung und die indirekte (sekundäre) Knochenheilung.

Während die direkte Knochenheilung im Rahmen anatomisch gut adaptierter Knochenfixation v.a. im kortikalen Anteil auftritt und ohne Kallusbildung abläuft, zeichnet sich die indirekte Knochenheilung dadurch aus, dass zukünftiger Knochen über die Umwandlung eines

knorpeligen Kallusgerüsts gebildet wird und sich erst im Verlauf zu Knochengewebe umwandelt (14).

Im Gegensatz zur direkten Knochenheilung, die eine totale Ruhigstellung (absolute Stabilität) und vollständige Adaptation der Bruchfragmente (korrekte Reposition) der Fraktur durch z.B. die Anwendung von Osteosynthesematerialien erfordert (13, 15), bewirkt eine relative Stabilität mit auftretenden Mikrobewegung im Rahmen der indirekten Frakturheilung die Formation eines knorpeligen Kallusgerüsts (16). Eine Beeinträchtigung der Immobilisation verhindert die Entstehung eines knorpeligen Grundgerüsts bzw. die Überbrücken des Frakturspalt mit Knochengewebe. Eine ausbleibende Vereinigung der Frakturfragmente (sog. Pseudarthrose) ist die Folge (13). Theoretisch kann die direkte Frakturheilung in Abhängigkeit von der Größe des Frakturspalt noch weiter in eine Kontaktheilung (Frakturrenden stehen im unmittelbaren Kontakt zueinander) und eine Spaltheilung (Abstand der Frakturrenden zueinander $> 0,1$ mm) unterteilt werden, was jedoch im klinischen Alltag keine Relevanz aufweist (2, 9).

Während im Rahmen der Kontaktheilung neugebildete Osteone den Frakturspalt direkt durchwachsen und somit der Lamellenknochen wiederhergestellt wird (einphasiger Vorgang), kommt es bei der Spaltheilung erst zur einer Überbrückung des Frakturspalt mit Knochengewebe (Ausfüllung des Trennungsspalt) und im Verlauf zu einer „osteogenen Verzapfung“ (sekundärer Osteonumbau). Der so gebildete Knochen wird im Verlauf durch Remodelling der Osteonarchitektur zu Lamellenknochen umgewandelt (zweiphasiges Geschehen) (14, 17). Da im Rahmen einer Frakturversorgung aufgrund des variablen Frakturmusters keine einheitliche Adaptation gewährleistet werden kann ist es naheliegend, dass Kontaktheilung wie auch Spaltheilung in enger Beziehung zueinander stattfinden (14).

1.2.2 Einfluss unterschiedlicher Kompartimente

In Abhängigkeit von Zeitpunkt und Ort tragen Zellen und Signalstoffe der verschiedenen Kompartimente (Knochenmark, Periosteum, Kortikalis, umgebendes Weichgewebe sowie das Frakturhämatom) auf unterschiedliche Weise zur Neubildung von Knochengewebe bei. Die Herkunft der an der Regeneration beteiligten Zellen kann weiter differenziert werden i) Stratum osteogenicum des Periosts, ii) Osteoprogenitorzellen der Havers'schen Kanäle des kortikalen Knochens, iii) Zellen des Endosts, iv) undifferenzierte mesenchymale Zellen des Knochenmarks sowie v) undifferenzierte Zellen des umliegenden Weichgewebes (9).

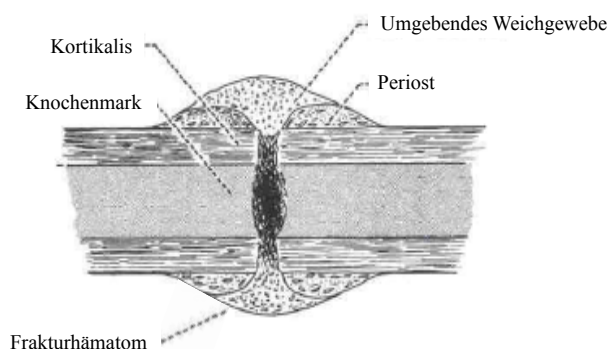


Abb. 7: Schematische Darstellung der wesentlichen, an der Frakturheilung beteiligten, Kompartimente (modifiziert und aus dem Englischen übersetzt; (15)).

Bei der Frakturierung von Knochengewebe kommt es zu einer Beeinträchtigung von Periost, umliegendem Weichgewebe sowie zu einer Ruptur von Blutgefäßen. Durch die Einblutung in das Weichgewebe werden neben Erythrozyten, Immunzellen und mesenchymale Stammzellen eingeschwemmt (1. Hämatombildung). Die im Folgenden einsetzende Koagulation führt zur Aktivierung der Immunzellen. Proinflammatorische Stimuli, welche die Gerinnungskaskade initiieren, sind ebenfalls für die Aktivierung phagozytischer Effektorzellen verantwortlich (18). Durch die Unterbrechung der Blutversorgung kommt es konsekutiv zu einer Ischämie des betroffenen Gewebes. Diese hypoxische Umgebung initiiert eine akute, aseptische Immunantwort, wodurch weitere Zellen des Immunsystems rekrutiert werden. Proinflammatorische Mediatoren bewirken eine Vasodilatation mit anschließender Plasmaexsudation und Ödembildung. Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen üben über die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen einen chemotaktischen wie auch proliferativen Effekt auf weitere Zellen aus (2. Immunreaktion) und sind dadurch maßgeblich an der Einleitung der Frakturheilung beteiligt (19). In der Folge wird die Kollagensynthese wie auch die Angiogenese (3.) initiiert und es kommt zur die Bildung des weichen und harten Kallus (4.), der im Verlauf durch Knochengewebe ersetzt wird (5.).

1.2.3 Einfluss proinflammatorischer Zytokine

Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), die durch Makrophagen, Immunzellen und Zellen mesenchymalen Ursprungs am Ort der Fraktur sekretiert werden, spielen in der initialen Phase der Knochenheilung eine entscheidende Rolle (20). Neben einem chemotaktischen Einfluss auf inflammatorische Zellen besteht ein stimulierender Effekt zur Produktion der Extrazellulärmatrix, zur Angiogenese, sowie zur Rekrutierung fibroblastischer Zellen am Ort der Verletzung (10). TNF- α und IL-1 unterliegen während des gesamten Heilungsprozesses einem bimodalen Verteilungsmuster. Innerhalb der

ersten 24 Stunden konnten Höchstwerte nachgewiesen werden, welche im Verlauf einer Woche wieder abfallen. Während der Knochenumbauphase kann wiederum eine erneute vermehrte Expression nachgewiesen werden, die für die Umwandlung des Knorpelgerüsts verantwortlich zu sein scheint (12, 21-24). In Abwesenheit von TNF- α scheint die desmale wie auch enchondrale Ossifikation durch eine verzögerte Umwandlung von Knorpel- in Knochengewebe beeinträchtigt zu sein (21, 22, 25).

1.2.3.1 Interleukin-1

Interleukin-1 gehört zur Interleukinfamilie, die den Zytokinen zugeordnet werden und eine Polypeptidstruktur aufweisen. Neben den beiden Hauptagonisten Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) gehört der Interleukin-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) der Interleukin-1-Familie an (26). Trotz der engen Beziehung zueinander liegt die Codierung von IL-1 α und IL-1 β auf unterschiedlichen Genen (27). In den meisten Zellen überwiegt die Synthese des IL-1 β im Vergleich zum IL-1 α . Während zudem das IL-1 β in bedeutendem Umfang sekretiert wird, verbleibt das IL-1 α in aktiver Form membrangebunden (26). Aufgrund des insgesamt ähnlichen strukturellen Aufbaus konkurrieren die drei Unterformen um die IL-1-Rezeptoren: IL-1RI, IL-1RII und *TL/ST2/Fit-1*, die in unterschiedlicher Quantität auf nahezu allen Zellen zu finden sind. Unterschiedliche Wege der Signaltransduktion wurden beschrieben, welche schon innerhalb der ersten Minuten nach Stimulation kultivierter Zellen auftreten (28).

Die Wirkung des IL-1 α und IL-1 β ist allgemein ähnlich, jedoch weisen beide Zytokine mitunter divergierende Effekte auf unterschiedliche Zelltypen auf. Während besonders IL-1 α durch den hypoxischen Zellschaden ausgeschüttet wird und über die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beiträgt, wird dem IL-1 β die Rekrutierung von Makrophagen zugesprochen (29).

IL-1 wird neben Chondrozyten, Synoviazellen, Zellen der glatten Muskulatur, Keratinozyten und Epithelzellen im Speziellen von Monozyten, Gewebemakrophagen, T-Helferzellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen, Fibroblasten, Dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen ausgeschüttet und hat dabei einen erheblichen Anteil als proinflammatorisches Zytokin in der Immunabwehr des Körpers gegenüber Infektionen (26, 30). Zusätzlich wird in manchen Zellen (Hypothalamus, Haut und Schleimhaut) auch in Abwesenheit einer Inflammation eine konstitutive IL-1-Genexpression beschrieben, was auf eine mögliche Rolle des IL-1 in der Homöostase und/oder Zelldifferenzierung hinweist (28).

IL-1 wurde als erstes immunologisch assoziiertes Zytokin im Zusammenhang mit der Regulation des Knochenbaus beschrieben und nimmt eine wichtige Rolle in der Frakturheilung über die

Modulation in der Entzündungsreaktion, Matrixsynthese sowie im Aufbau, Abbau und Remodelling der Knochenstruktur ein (26, 31). Darüber hinaus wurde die Expression von IL-1-Rezeptoren auf humanen Osteoblasten wie auch die IL-1-Sekretion durch diese Zellen beschrieben (26).

1.2.4 Therapieoptionen beeinträchtigter Knochenstrukturen

Ausgedehnte Verletzungsmuster können zu großen knöchernen Substanzdefekten führen (z.B. offene Frakturen). Ausgedehnte knöcherne Substanzdefekte, welche die Möglichkeit der körpereigenen Knochenheilung überschreiten werden als *critical size defects* bezeichnet (32) und weisen eine beeinträchtigte bzw. unvollständige Heilung auf.

Der Anteil prolongierter und/ oder ausbleibender Frakturheilung bezogen auf alle Frakturen beträgt nach aktuellen Schätzungen zwischen 5 – 10 Prozent (33) und ist maßgeblich von Frakturlokalisation und –ausmaß (34, 35) sowie von patientenspezifischen Risikofaktoren abhängig (35, 36). Die Behandlung ausgedehnter Knochendefekte stellt insgesamt eine große Belastung für den Patienten sowie für das Gesundheitssystem dar (37).

Im Rahmen unterschiedlicher Therapieoptionen wird versucht, den knöchernen Substanzverlust durch die Transplantation von Geweben zu rekonstruieren bzw. zu überbrücken. Eine Therapieoption ausgedehnter knöcherner Substanzdefekte basiert auf der Defektrekonstruktion durch die Transplantation eigenen Knochens. Heutzutage werden avaskuläre und vaskuläre Knochentransplantate zur Rekonstruktion von Knochendefekten verwendet (38). Aufgrund hoher Operationskosten, Gefahr der Morbidität an der Knochenentnahmestelle, chronischen Schmerzen, Narbenbildung und erhöhtem Infektions- und Frakturrisiko, Gefahr der Graftresorption sowie die eingeschränkte Verfügbarkeit in osteoporotischen oder atrophischen Knochenstrukturen ist die Autotransplantation nicht immer sinnvoll bzw. möglich (39-42). Neben der Transplantation von körpereigenem Knochen – sog. *Autografts* –, finden Fremdknochen oder -knochenbestandteile – sog. *Allografts* (genetisch verschiedene Individuen derselben Spezies), *Xenografts* (Individuen fremder Spezies) und Knochenersatzmaterialien Verwendung (43). Eine weitere Therapieform beruht auf dem Längenwachstum von Knochen unter Distraction, welches bereits 1989 durch Ilizarov beschrieben wurde (44). Im Verlauf wurde dieses Prinzip auch zur Therapie knöcherner Substanzdefekte angewendet (45). Bis heute wird jedoch die Autotransplantation als sogenannter Goldstandard in der Therapie von Knochendefekten angesehen (42, 46). Vorteile dieser Therapieform sind das Ausbleiben einer Immunreaktion des Körpers aufgrund der vorliegenden Histokompatibilität (47) sowie der Besitz von Eigenschaften, die zur Osteoinduktion (Proteine), Osteokonduktion (Knochengerüst) und

Osteogenese (Zellpool) führen (48). Während osteoinduktive Stoffe die Bildung von Knochengewebe anregen, bieten osteokonduktive Materialien eine Art Matrix für die Knochenneubildung (43). Im Vergleich dazu bergen körperfremde Stoffe prinzipiell das Risiko einer Immun- und Abstoßungsreaktionen aufgrund der Diskrepanz hinsichtlich der Histokompatibilität und weisen im Vergleich zu Autografts ein geringeres osteoinduktives Potential auf (49). Immer häufiger kommen synthetische Knochenersatzmaterialien zur Anwendung, welche häufig nur einen Teil der gewünschten Eigenschaften autogener Transplantate aufweisen und primär zur Therapie kleiner Knochendefekte eingesetzt werden (33). In den letzten Jahren ist vermehrt die Verwendung von Stammzellen zur Herstellung biologischer Gewebe diskutiert worden, um die Biokompatibilität gerade auch von künstlichen Knochenersatzmaterialien positiv beeinflussen zu können (46).

1.3 Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, welche die Fähigkeit aufweisen, sich im Laufe des gesamten Lebens selbst zu erneuern und in unterschiedlichste Zellarten zu differenzieren. Verschiedene Formen von Stammzellen mit unterschiedlicher Potenz zur Differenzierung (Toti-, Pluri- und Multipotenz) können grundsätzlich voneinander abgegrenzt werden (50). Bulgin et al. beschreiben drei wesentliche Eigenschaften, welche diese Zellen charakterisieren (51):

- bei der Zellteilung entsteht eine Tochterzelle, die als Stammzelle weiterbesteht, während sich die andere Tochterzelle in ihrer Differenzierung festlegt (asymmetrische Zellteilung)
- Differenzierung in unterschiedlichen Zelltypen des Organismus
- eine Stammzelle bildet im Rahmen der Differenzierung ein komplettes Gewebe, sobald diese in den Körper implantiert wird

Die ontogenetisch früheste Form der Stammzellen sind die Blastomeren, die aus Teilungen der Zygote in viele Tochterzellen hervorgehen. Als totipotente Zellen weisen Blastomeren bis zum 8-Zell-Stadium der Morula die Fähigkeit auf, einen vollständigen bzw. eigenständigen Organismus zu bilden (50). Im Verlauf differenzieren sich diese Zellen weiter und verlieren ihre Totipotenz. Es entstehen embryonale Stammzellen, die als Zellen der inneren Zellschicht (Embryoblast) der Blastozyste eine Pluripotenz aufweisen und nur noch in der Lage sind, sich zu den unterschiedlichen Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren (Pluripotenz), jedoch keinen ganzen Organismus mehr zu bilden. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, die nur zum Zeitpunkt des Embryonalstadiums existieren, werden adulte Stammzellen aus Geweben endodermalen, mesodermalen oder ektodermalen Ursprunges isoliert und weisen eine Multipotenz auf (50, 52).

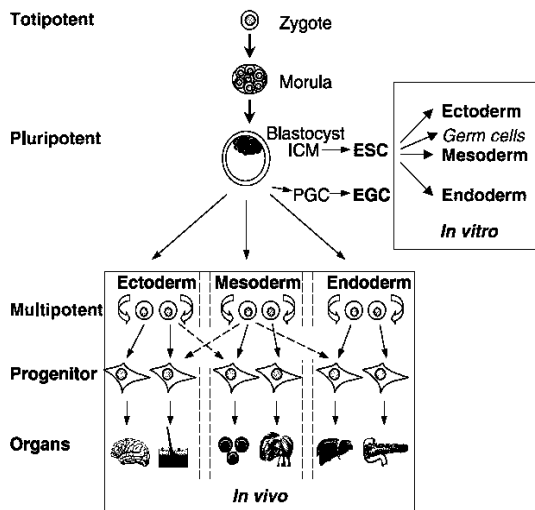


Abb. 8: Schematische Übersicht über die Potenz unterschiedlicher Stammzelltypen (modifizierte Darstellung; (50)).

Stammzellen können aus vielen verschiedenen Geweben wie der inneren Zellschicht der Blastozyste, Gewebe der Nabelschnur, Knochenmark, Muskelgewebe, Haut, Fettgewebe, der Zahnpulpa u.a. erfolgreich isoliert werden (51).

1.3.1 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) stellen eine Form adulter Stammzellen dar. Erste Nachweise über diese Zellform gelangen Friedenstein und Kollegen, die durch die Transplantation von Knochenmarkgewebe die Entstehung neuen Knochens nachweisen konnten (53). Im Jahr 1999 beschrieb die Gruppe um Pittenger et al., dass sich Zellen aus Knochenmarkspunktionen an den Plastikoberflächen von Zellkulturbehältnissen anhafteten und durch spezielle Kultivierungsverfahren in verschiedene mesenchymale Zelllinien differenzieren ließen (54). Dieser Zelltyp wurde im weiteren Verlauf als mesenchymale Stammzelle bezeichnet (55). Die Zahl dieser plastikadhärenten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl des Punktats bezifferte Pittenger auf durchschnittlich zwischen 0,001-0,01 Prozent. Nimmt man eine altersabhängige Aufteilung in Lebensabschnitte vor, so kann eine 10-fache Abnahme der Zellzahl von Jugendlichen im Vergleich zu Neugeborenen sowie eine weitere 10-fache Abnahme von Senioren im Vergleich zu Jugendlichen nachgewiesen werden (56).

Neben dem Knochenmark können MSCs aus Fett- und Muskelgewebe, Gewebe der Nabelschnur, Periosteum und mineralisiertem Knochen, Synovialgewebe und vielen weiteren Geweben isoliert werden (57, 58). Die isolierten Zellen der verschiedenen Gewebe unterscheiden sich dabei nicht nur in ihrem Muster der Oberflächenantigenpräsentation sondern zudem in ihrer Gesamtzellzahl, ihren Verhaltenseigenschaften sowie in ihrem

Differenzierungspotential (59). Zudem hat neben dem Gewebe das Alter des Spenders Einfluss auf die Gesamtzellzahl (60, 61). Im Knochenmark vermutet man Stammzellen v.a. im Bereich des Endosts, perivaskulär sowie stromal (62). Aufgrund der engen Beziehung zu Blutgefäßen wurden in der Vergangenheit Vergleiche zu Zellen gezogen, die in enger Beziehung zu Endothelzellen von Kapillaren stehen – sog. Perizyten. Neben der Fähigkeit sich *in vitro* in verschiedene Gewebe zu differenzieren, weisen Perizyten ein ähnliches Muster an Oberflächenmolekülen auf, so dass einige Autoren Perizyten als eine Art primitive Vorläuferzellen einer mesenchymalen Stammzellen beschreiben (63).

Andere Autoren gehen davon aus, dass Perizyten als mesenchymale perivaskuläre Stammzellen vorliegen oder eine bestimmte Subpopulation mesenchymaler Stammzellen darstellen (64, 65).

Ein Goldstandard zur genauen Identifizierung einer mesenchymalen Stammzelle existiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht, sodass eine genauere Eingrenzung über eine funktionelle Charakterisierung erfolgt (52). Bei der Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen gibt es mitunter divergierende Ansichten. Bisher war der Nachweis bestimmter Kombinationen von Oberflächenmarkern zur Identifikation mesenchymaler Stammzellen entscheidend (54). Obwohl diese Kombinationen an Oberflächenmarkern eine Ein- bzw. Abgrenzung gegenüber anderen Zellen wie z.B. der hämatopoetischen Zelllinie ermöglicht, sind sie dennoch nicht in der Lage eine einzelne MSC-Population klar abzugrenzen und zu definieren (66, 67).

Horwitz et al. raten aus diesem Grund dazu, plastikadhärente Zellen, welche aus unterstützendem Bindegewebe isoliert wurden, unter Vermeidung einer Aussage über das biologische oder therapeutische Potential als mesenchymale Stromazellen zu bezeichnen, was jedoch in der Literatur noch keine einstimmige Berücksichtigung gefunden hat (68). Der Buchstabe „S“ des Akronymes „MSC“ kann für Stromazelle als auch für Stammzelle stehen und sollte entsprechend erklärt werden.

Der Terminus „humane Knochenmark-spezifische mesenchymale Stromazelle (hMSC)“ für Knochenmark-spezifische stammzellartige, mesenchymale Zellen ist in diesem Zusammenhang die wohl zutreffendste Bezeichnung und findet in dieser Arbeit Verwendung.

Um einheitliche Grundvoraussetzungen zu schaffen, definierten Dominici et al. folgende drei Eigenschaften, welche zur Abgrenzung von mesenchymalen Stromazellen vorliegen sollten (69):

- Anhaftung am Plastikboden in Zellkulturen
- Exprimierung der Oberflächenmoleküle CD 105, CD 73 und CD 90 ohne das gleichzeitige Vorliegen der Oberflächenmoleküle CD 34, CD 45, CD 14, CD 11b, CD 79- α oder CD 19 und HLA-DR Moleküle

- Kapazität/Potential/Fähigkeit zur Differenzierung in Richtung der Osteoblasten-, Chondrozyten- und Adipozytenzelllinie durch die Kultivierung in unterschiedlichen Kulturmedien

Die Existenz einer mesenchymalen Stammzelle als „Ursprungszelle“ oder einer heterogenen Zusammensetzung von Zellen unterschiedlichen Reifegrads (Progenitorzellen sowie entdifferenzierte Zellen) im Knochenmark, welche nach entsprechendem Stimulus in die Differenzierung einer bestimmten Zelllinie eintreten, wird derzeit kontrovers diskutiert (52, 54). Während der Embryogenese differenzieren sich multipotente Progenitorzellen des Mesoderms in die mesoderm-typischen Zelllinien. Basierend auf dieser Vorstellung geht man zum gegenwärtigen Zeitpunkt davon aus, dass ähnliche Differenzierungsvorgänge in adulten Stammzellen im Knochenmark ablaufen würden (55). Zytokine, Wachstumsfaktoren, interzelluläre Interaktionen (direkt über Zell-Zell-Kontakte oder indirekt über parakrine Stimulation), Zell-Matrixkontakte sowie physikalische Einflüsse (u.a. Oberflächenstruktur und Beschaffenheit des Kulturbodens) spielen in der Stammzellendifferenzierung eine entscheidende Rolle (70).

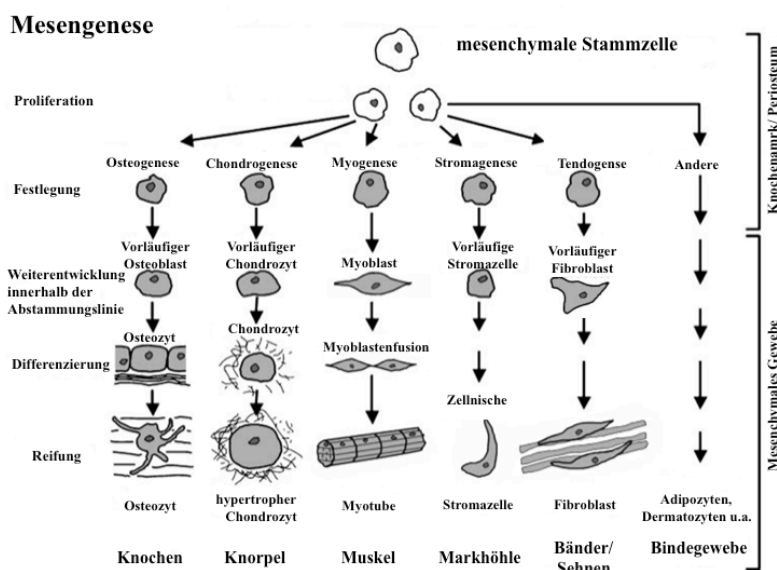


Abb. 9: Aktuelle Vorstellung über die Abläufe der mesenchymalen Stammzellendifferenzierung im Rahmen der Mesengnese (modifiziert und aus dem Englischen übersetzt; (71)).

Die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in die abgebildeten Gewebeformen wurde *in vitro* von mehreren Autoren beschrieben (Fett, Knorpel, Knochen (53, 54), Muskel (72), Stromazellen (73), Sehnen (74) sowie in andere Zellen (59)).

Adulte MSCs verweilen in einer speziellen Mikroumgebung, die auch als Stammzellnische bezeichnet wird (75). Hämatopoetische Stammzellen, Blutzellen, Immunzellen, Osteoblasten,

Osteoklasten, Fibroblasten und die jeweiligen Vorläuferzellen kommunizieren und interagieren hier untereinander und können auf lokale sowie systemische Reize reagieren. In dieser Stammzellnische befinden sich MSCs überwiegend in einem „Ruhemodus“.

MSCs sekretieren in Abhängigkeit ihres Aktivitätszustandes und den Einflüssen des umliegenden Milieus eine Bandbreite an Zytokinen und Wachstumsfaktoren (sog. Sekretom), die sowohl über autokrine als auch parakrine Wirkung wiederum die lokale zelluläre Umgebung beeinflussen und dadurch eine Mikroumgebung schaffen, welche die Modulation des beeinträchtigten Gewebes unterstützt (76, 77). MSCs nehmen dadurch Einfluss auf die Differenzierung umliegender Zellen, die Angiogenese, Regeneration und Umbau von Geweben, sowie auf die lokale Immunantwort (70, 78, 79).

Ob der Effekt des Sekretoms humaner MSCs auf das umliegende Zellmilieu nicht viel entscheidender ist, als die eigentliche Differenzierung der Stammzelle selbst ist bislang ungeklärt (56).

1.3.1.1 Effekt des IL-1 auf mesenchymale Stammzellen

In Studien konnte gezeigt werden, dass eine IL-1 β - und TNF- α -Stimulation osteogen-kultivierter Stammzellen sowohl zu einer gesteigerten Mineralisation als auch zu einer erhöhten Expression osteoblasten-assoziiierter Gene führte (80, 81). Darüber hinaus gelang in diesen Zellen in Abhängigkeit der IL-1 β - und TNF- α -Zytokindosis über die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B eine Inhibition der Chondrogenese (82). Murakami et al. konnten *in vitro* an murinen Chondrozyten nachweisen, dass eine Stimulation mit sowohl IL-1 β als auch mit TNF- α die Sox9-Genexpression inhibiert und infolgedessen auch das mRNA-Level des Kollagen 2a1 gesenkt wurde. Die Beteiligung des Sox9-Gens wird als wesentlicher Bestandteil in der Chondrogenese sowie in der Ausprägung des chondrogenen Phänotyps angesehen (83).

Unklar ist in diesem Zusammenhang, welche Signalwege in der Vermittlung der Interleukinstimulation dominieren. Ferreira et al. beschrieben ebenfalls eine vermehrte Mineralisation IL-1 β -stimulierter hMSCs, machten jedoch nicht den NF- κ B sondern MAPK- und PI3K-Signalwege für diesen Effekt verantwortlich (84). Eine gesteigerte osteoblastische Differenzierung und Mineralisation humaner MSCs durch ähnliche Stimulation führen Sonomoto et al. auf den Wnt5a Signalweg zurück (81).

Sonomoto und Kollegen beschrieben eine osteogene Differenzierung mit vermehrter Runx2-Expression sowie gesteigerter Mineralisation in humanen mesenchymalen Stammzellen im Anschluss an eine zehntägige Stimulation mit unterschiedlicher IL-1-Konzentration (81). Ähnliche Ergebnisse konnten zudem schon nach einer dreitägigen IL-1 β -Stimulation bestätigt

werden. Neben einer vermehrten Kalziumeinlagerung wurde zudem eine erhöhte BMP-2-mRNA-Expression nachgewiesen. Die gleiche Stimulation führte jedoch unter chondrogenen Kulturbedingungen zu einer Differenzierung humaner MSCs in Richtung eines chondrogenen Phänotyps (22).

Die Arbeitsgruppe um Mumme et al. untersuchte den Effekt des Interleukin-1 β im Rahmen der enchondralen Knochenbildung *in vivo*. *In vitro* generierte hypertrophe Knorpelstrukturen wiesen nach subkutaner Implantation in Mäusen einen Remodellingprozess auf, welcher in einer knochenähnlichen Struktur mündete. Die Autoren der Studien schlussfolgerten daraus, dass die Stimulation humaner mesenchymaler Stammzellen mit IL-1 β wichtige Stufen der enchondralen bzw. perichondralen Knochenentstehung modulieren würde (22). Die Modulation der Knochenentstehung bzw. die Einflussnahme auf die chondrale Knochenbildung sind vielversprechende Ansätze in der regenerativen Therapie knöcherner Substanzdefekte.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Therapie ausgedehnter knöcherner Substanzdefekte, welche die körpereigenen Heilungskapazitäten übersteigen, basiert zum gegenwärtigen Zeitpunkt auf der Defektrekonstruktion durch die Transplantation eigenen Knochens.

Pro Jahr werden in Europa in etwa eine Millionen chirurgische Knochenrekonstruktionen im Zusammenhang mit einer beeinträchtigten bzw. unzulänglichen Frakturheilung durchgeführt – mit steigender Tendenz (33). Die Belastungen für den Patienten sowie für das Gesundheitssystem sind dabei immens (37). Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt stellt die autologe Knochentransplantation den Goldstandard in der Therapie kritischer knöcherner Defekte dar. Durch die limitierte Verfügbarkeit von autologem Knochen sowie durch die Gefahr von Hebedefektmorbiditäten ist die Entwicklung alternativer Behandlungsmöglichkeiten und -strategien erforderlich um zukünftig eine zeitgerechte Therapie der Patienten weiterhin zu gewährleisten. Alloplastische Materialien finden dabei immer häufiger bei der Behandlung kleinerer Defekte Anwendung, weisen jedoch unterschiedliche Vor- und Nachteile auf (49).

Die Verwendung multipotenter autologer Stamm- bzw. Stromazellen zur Behandlung ossärer Defektsituationen stellt aktuell einen vielversprechenden Ansatz im Bereich der regenerativen, translationalen Medizin dar und soll in den folgenden *in vitro* Versuchen untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zwei Aspekte der Stimulation von humanen Stromazellen genauer zu untersuchen: zum einen den direkten Effekt auf die Differenzierung der Stromazelle selbst und zum anderen den Effekt der Stromazellendifferenzierung auf umliegende/ko-kultivierte Zellen. Daraus ergeben sich die beiden zentralen Fragen dieser Arbeit:

1. Welchen Effekt hat die IL-1 β -Stimulation bzw. die Kultivierung in den unterschiedlichen Kulturmedien auf das Differenzierungsverhalten humaner MSCs *in vitro*?
2. Welchen Effekt hat die IL-1 β -Stimulation humaner MSCs bzw. die Kultivierung in den unterschiedlichen Kulturmedien auf das Differenzierungsverhalten ko-kultivierter unreifer osteoblasten-ähnlicher Zellen (Osteosarkomzellen der MG-63-GFP-Zelllinie)?

Die Arbeit basiert auf der Hypothese, dass über eine Kurzzeitstimulation von zwei Stunden mit dem proinflammatorischen Zytokin Interleukin-1 β sowohl eine osteogene Differenzierung humaner MSCs *in vitro* induziert wird, als auch über eine parakrine Stimulation Einfluss auf ko-kultivierte Osteosarkomzellen genommen werden kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Übersicht des Versuchsaufbaus

Humane MSCs unterschiedlicher Knochenmarksspender wurden in drei Versuchsreihen auf vier Gruppen verteilt und die Unterschiede im Differenzierungsverhalten in Bezug auf eine zweistündige IL-1 β -Stimulation (+/-) untersucht. In Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit erfolgte die Kultivierung der Zellen mit Zellen einer Osteosarkomzelllinie (MG-63-GFP) in zwei unterschiedlichen Kulturmedien (Kontrollmedium - CM oder Differenzierungsmedium - DM). Jede Gruppe wies dabei Triplikate (technische Wiederholungen) auf.

Tab. 1: Versuchsgruppen

	Medium	
\pm IL-1-Stimulus	<u>unstimulierte MSCs in CM</u> MG-63-GFP	<u>unstimulierte MSCs in DM</u> MG-63-GFP
	<u>stimulierte MSCs in CM</u> MG-63-GFP	<u>stimulierte MSCs in DM</u> MG-63-GFP

2.2 Zellreihen

2.2.1 Humane mesenchymale Stromazellen aus Knochenmarksgewebe

Die verwendeten Stammzellen entstammen der Gewebekbank des Research Institutes der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen in Davos. In dieser Datenbank werden Informationen zu Ort, Zeitpunkt und Art des operativen Eingriffes, Patientenalter und -geschlecht, Ursprungsort des Gewebes sowie Gesamtzellzahl gespeichert. Humane MSCs wurden aus dem Knochenmark während totaler Hüftendoprothesen-, Wirbelkörperersatz- oder Spondylodeseoperationen gewonnen. Humanes Material wurde freundlicherweise durch PD Dr. Benneker (Universitätsklinik für Orthopädische Chirurgie und Traumatologie, Inselspital Bern, Schweiz; Ethikantragsnummer: KEK Bern 126/03) bereitgestellt.

Tab. 2: Informationen über die teilnehmenden Knochenmarksspender

Donor-Nr.	Geschlecht	Geburtsjahr	Ort der Zellgewinnung
# 50	weiblich	1972	<i>Os Ileum</i>
# 75	weiblich	1987	<i>Corpus vertebrae</i> Th7 und Th9
# 77	männlich	1963	<i>Corpus vertebrae</i> Th12 und L2

Humane MSCs von insgesamt drei Knochenmarksspendern (Altersdurchschnitt: $38,33 \pm 12,58$ Jahre) wurden in Ko-Kulturen mit Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie (vgl. 2.2.2) untersucht. Die

Isolierung humaner MSCs erfolgte entweder aus dem Beckenknochen (n=1) oder aus Wirbelkörpern (n=2) der Spender (vgl. Tab. 2).

2.2.2 Humane Osteosarkom-Zelllinie MG-63

Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie MG-63 haben ihren Ursprung in einem Osteosarkom (distale Diaphyse des linken Femurknochens) eines 14-jährigen Jungen (85) und wurden über die ECACC (*The European Collection of Cell Cultures*) bezogen. MG-63-Zellen repräsentieren eine Zellart, die einen unreifen Osteoblastenphänotypen widerspiegeln und aufgrund ihres Zellliniencharakters eine höhere phänotypische Stabilität im Vergleich zu natürlichen Prä-Osteoblasten aufweisen (86).

Die Zellen der MG-63-Zelllinie wurden in DMEM (angereichert mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin – vgl. 2.9.1 Puffer und Lösungen) kultiviert. In Abhängigkeit vom Zellwachstum, der damit verbundenen Proliferationsrate und der für das jeweilige Experiment benötigten Gesamtzellzahl wurden die Zellen aus der Kultur entfernt und in die Versuchsreihen eingegliedert. Mit Hilfe eines retroviralen Vektors wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) übertragen und somit eine permanente GFP-Expression in Zellen der MG-63-Zelllinie hervorgerufen (MG-63-GFP) (87).

2.3 Zellbiologische Methodik

2.3.1 Allgemeine Prinzipien

Arbeiten mit Zellkulturen unterlagen stets sterilen Bedingungen. Oberflächen und Materialien, die mit Zellen in Kontakt kamen, wurden zuvor gereinigt und desinfiziert. Die verwendeten Sterilbänke waren in einen regelmäßigen Reinigungszyklus (Desinfektion, UV-Licht-Bestrahlung) eingebunden. Inkubierte Zellen unterlagen konstanten Bedingungen (37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂-Konzentration). Die Bestimmungen zur Einhaltung der biologischen Schutzstufe „2“ wurden während der Gesamtdauer der Experimente stets eingehalten.

2.3.2 Zellgewinnung humaner mesenchymaler Stromazellen

Für die Gewinnung von mesenchymalen Stromazellen ist die mononukleäre Zellfraktion des Knochenmarks von Bedeutung. In dieser Fraktion sind Zellen der hämatopoetischen Zelllinie – wie Lymphozyten, Monozyten, hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen – sowie mesenchymale Stromazellen vertreten. Die mononukleären Zellen wurden durch einen Dichtegradient von anderen Knochenmarksbestandteilen - wie den Erythrozyten oder Lipiden - isoliert (54).

Die Lösung der Knochenmarkspunktion wurde unverdünnt in einem Verhältnis von 1:3 mit PBS gemischt und durch einen 70 µm Filter in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Der Filter wurde erneut mit einer weiteren Volumeneinheit PBS gespült und die Lösung aufgefangen. Das gelöste Knochenmarksgewebe wurde in ein neues Falconröhrchen übertragen, welches 2,6 ml Ficoll pro ml ungelöstem Knochenmark enthielt. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation mit 800 g bei Raumtemperatur. Mononukleäre Zellen, die sich durch die Zentrifugation zwischen Plasma und roten Blutzellen in der sogenannten Interphase angesammelt hatten wurden in ein neues 50 ml Falconröhrchen übertragen. Pro ml gewonnener Interphase wurden zudem 5 ml αMEM mit 10 % FCS hinzugegeben. Zellen wurden in diesem Medium resuspendiert und im Anschluss mit 400 g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in αMEM gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin erneut in Medium aufgenommen und mit Hilfe eines automatischen Handzählgerätes (Scepter 2.0) gezählt. Isolierte mononukleäre Zellen wurden bei einer Dichte von 50.000 Zellen/cm² in αMEM mit 10 % MSC getestetem Serum, 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und 5 ng/ml *basic Fibroblast Growth Factor-2* (bFGF-2) in 300 cm² Kulturflaschen aufgenommen (im Folgenden als Zellpassage Nummer 0 bezeichnet) (85, 88). Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 4 Tagen, alle weiteren dreimal wöchentlich. Sobald eine Konfluenz der Zellen von 80 % vorlag, wurden die Zellen geerntet und auf -196 °C tiefgefroren (vgl. 2.3.3 und 2.3.4) oder in ein Experiment eingegliedert und als Zellpassage Nummer „1“ bezeichnet.

2.3.3 Zellernte und Zellaufteilung

Zur Gewährleistung einer adäquaten Raum-Zell-Verteilung und zur Vermeidung spontan auftretender Differenzierungsvorgänge während der Zellproliferation wurden die Zellen bei 70-80 % Konfluenz geerntet und in die erforderlichen Zellkulturflaschen transferiert. Hierzu wurde eine 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung in PBS hergestellt. Das Kulturmedium der zu erntenden Zellkultur wurde abgesaugt und die Zellen zweimalig mit PBS-Lösung gewaschen. In PBS verdünnte 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung wurde auf 37 °C vorgewärmt und 0,03 ml/cm² in die Zellkulturflasche gegeben. In Abhängigkeit der jeweiligen Zelllinie wurden die Zellen für 3-10 min bei 37 °C inkubiert. Die Beurteilung einer erfolgreichen Zelllösung erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25 Mikroskop). Zur Inaktivierung der Trypsinlösung wurde 10 % FCS-haltiges Wachstumsmedium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falconröhrchen transferiert und bei 300 g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gesamtzellzahl berechnet. Das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und die Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 auf eine

Neubauerzählkammer aufgetragen. Zur Bestimmung der Zellviabilität von Zellen in Zellkulturen wurde die Trypanblau-Färbung durchgeführt.

Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Differenzierung zwischen lebenden und avitalen Zellen. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wurde die gezählte Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor, dem Volumen, in welchem sich die Zellsuspension befand, sowie dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert (Gesamtzahl = $n \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen} \times 10^4$). Im Anschluss an die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in die jeweilige Versuchsreihe eingegliedert und in entsprechendes Medium überführt. Die Passagenummer wurde dabei um eine Einheit erhöht.

2.3.4 Kryokonservierung und Zellauftau

Um Zellen auf Dauer zu konservieren wurde ein sog. Einfriermedium verwendet, welches 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS enthielt. Nach Überführung der Zellen in Einfriermedium ($1-2 \times 10^6$ / ml), wurde 1 ml Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert und in einen Gefrierbehälter überführt. Für die erfolgreiche Kryokonservierung und Zellviabilität wurden die Zellen mit einer Einfrierate von 1 °C/min auf -80 °C abgekühlt und im Anschluss in flüssigen Stickstoff überführt.

Um ein rasches Auftauen zu gewährleisten wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad transferiert. Anschließend erfolgte die äußere Reinigung der Kryoröhrchen mittels Ethanol und die Überführung unter die Sterilbank. Das Gefriermedium samt der darin befindlichen Zellen wurden in ein 50 ml Falconröhrchen übertragen, welches 10 ml vorgewärmtes Wachstumsmedium beinhaltete. Es folgte die Zentrifugation bei 300 g für 8 min. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Wachstumsmedium resuspendiert, die Zellen gezählt und in Abhängigkeit der Zelllinie mit einer Dichte von 3000 – 9000 Zellen/cm² in die Zellkultur überführt.

2.3.5 Osteogene Differenzierung

Zur Initiierung einer osteogenen Differenzierung humaner MSCs wurde ein sog. Differenzierungsmedium (DM) verwendet, welches auf vorangegangene Differenzierungsversuche der Gruppe um Pittenger und Jaiswal beruht (54, 89). Dieses DM basiert auf der Grundlage des DMEM, welches mit folgenden zusätzlichen Faktoren angereichert wird: 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 5 mM β -Glycerolphosphat, 10 nM Dexamethason sowie 50 μ g/ml Ascorbinsäure. Die Zellen der Kontrollgruppe wurden hingegen in einem normalen Wachstumsmedium (GM) kultiviert, welches ebenfalls auf der Grundlage des DMEM basiert und 10 % FCS sowie 1 % Pen/Strep beinhaltet.

2.3.6 IL-1 β -Stimulation humaner mesenchymaler Stromazellen

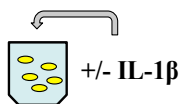
Zuvor kultivierte hMSCs wurden am Tag der Stimulation geerntet, in 50 ml Falconröhrchen überführt und in die verschiedenen Gruppen aufgeteilt. Zu stimulierende Zellen wurden in Wachstumsmedium aufgenommen und mit 10 ng/ml IL-1 β versetzt. Die Zellen der Negativkontrolle erhielten keine Stimulation. Die Zellen der verschiedenen Gruppen wurden bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Falconröhrchen mit GM aufgefüllt, bei 300 g für 8 min zentrifugiert und letztlich mit dem Endvolumen an GM oder DM aufgefüllt und in die 24-Lochplatten analog dem Versuchsprotokoll überführt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Ko-Kulturen humaner MSCs

Zellen der humanen MSC- und MG-63-Zelllinien wurden in verschiedenen Versuchsreihen ko-kultiviert. Hochverdichtete Zellpellets (100.000 Zellen in 5 μ l GM/ Vertiefung einer 24-Zellkulturtestplatte) a) humaner MSCs und b) Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie wurden in Ko-Kultur-Versuchen verwendet. Im Anschluss wurden 500 μ l GM vorsichtig in die Vertiefung pipettiert. Um eine parakrine Stimulation verschiedener Zellreihen miteinander vergleichen zu können wurde eine räumliche Trennung der Zelllinien durch Membraneinsätze mit am Boden befindlicher 0,4 μ m Polyethylenterephthalat (PET)-Membran verwendet – sog. Transwellverfahren. Auf dieser Membran wurde ebenfalls eine hochverdichtete Zellpelletkultur der humanen MSCs in zuvor beschriebener Art und Weise installiert und mit 250 μ l GM aufgefüllt. Die Membran verhindert Zell-Zell-Kontakte, erlaubt jedoch die Diffusion von Kleinstpartikeln. Humane MSCs wurden entweder mittels IL-1 β -Stimulation vorbehandelt oder gehörten der Negativkontrollgruppe an. Neben den genannten Faktoren wurde zudem die Auswirkung des Differenzierungsmediums im Vergleich zum Kontrollmedium untersucht.

1. Kurzzeitstimulation humaner MSCs für 2 Stunden



- hMSCs
- MG63-GFP Osteosarkomzelle (unreifer Osteoblastenphänotyp)
- Kontrollmedium (unspezifisches Nährmedium)
- Differenzierungsmedium (Vit. C, β -Glycerolphosphat, Dexamethason)

2. Ko-Kultur humaner MSCs und Osteosarkomzellen für 28 Tage

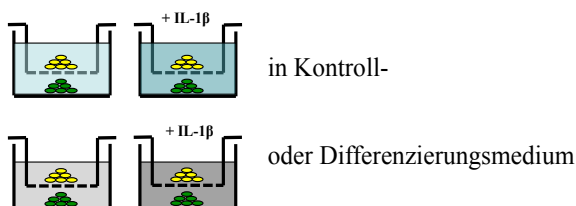


Abb. 10: Schematischer Versuchsaufbau der Ko-Kultur humaner MSCs und MG-63-GFP-Zelllinie.

2.5 Molekularanalyse

2.5.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe von TRI-Reagenz und RNeasy Mini-Kit entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Während des Extraktionsprozesses wurden ausschließlich RNase freie Materialien verwendet sowie alle verwendeten Arbeitsflächen mit RNaseZap-Lösung behandelt.

Zu Beginn der RNA-Extraktion wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen in 300 ml TRI-Reagenz-Lösung aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße transferiert. Zur Sicherstellung einer vollständigen Zerstörung der Zellmembran wurden die Proben über Nacht bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen der Zelllösung wurde diese in 1,5ml Eppendorfgefäße mit 5 µl Polyacryl Carrier überführt und beide Komponenten vermischt. Dieser Carrier erleichtert durch Acrylpolymer die Isolation auch kleiner RNA-Mengen. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Folgenden wurden 0,1 ml 1-Bromo-3-Chlor-Propan (BCP) pro ml TRI-Reagenz zugegeben, für 15 Sekunden geschüttelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation mit 12.000 g für 15 Minuten bei 4 °C gelang eine Separation der Bestandteile des Homogenisats in drei verschiedene Phasen: eine wässrige Phase mit RNA-Bestandteilen, eine sog. Interphase mit DNA-Bestandteilen sowie die organische Phase, in welcher Proteinbestandteile vorlagen.

Durch vorsichtiges Abpipettieren von ca. 130 µl der wässrigen Phase jeder Probe konnte die RNA von den übrigen Phasen getrennt werden. Das abgenommene Volumen wurde in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und jeweils die gleiche Menge an Ethanol (75 %) hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung auf eine RNA-bindende Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Es folgten entsprechend der Herstellerangaben weitere Waschschrte der Säule mit RW1-Puffer (700 µl) und RPE-Puffer (500 µl), die der Aufreinigung der RNA dienen.

Im Anschluss an die Waschschrte wurde die Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführt und durch 1-minütige Zentrifugation bei 12.000 g von überschüssigem Puffer getrennt. Die Säule wurde daraufhin in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert und 30 µl RNA-freies Wasser direkt auf die Säulenmembran appliziert. Durch eine erneute Zentrifugation konnte die RNA aus der Säule gelöst werden. Die Reinheit und Menge der extrahierten RNA wurden im Anschluss mit einem NanoDrop-Spektrometer ermittelt. Die Menge an RNA konnte bei der Wellenlänge von 260 nm detektiert werden. Die Reinheit an isolierter RNA in den Proben wurden über das Verhältnis 260/280 und 260/230 bestimmt. Die Messungen basieren dabei auf dem Lambert-

Beerschen Gesetz. Die Proben wurden im Anschluss bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.2 Reverse Transkription

Zur Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR erfolgte die Umschreibung der mRNA in cDNA im Rahmen der reversen Transkription (MultiScribe reverse Transkriptase).

Von der isolierten RNA wurden 0.5-1.0 µg in 20 µl Reaktionslösung für jede Reaktion verwendet. Zu Beginn wurden folgende nicht-enzymatische Bestandteile in RNase-freie Eppendorfgläser überführt: 2,0 µl 10x TaqMan RT Puffer, 4,4 µl 25mM Magnesiumchlorid, 4,0 µl Desoxynukleosidtriphosphat-Lösung (jeweils 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie 1,0 µl Random Hexonukleotid-Lösung (50 µM). Die Lösung wurde geschüttelt und im Anschluss 0,4 µl RNase-Inhibitor (20U/µl), 0,5 µl Multiscribe reverse Transkriptase (50U/µl) sowie die entsprechende RNA-Menge hinzugefügt. Fehlendes Volumen wurde durch RNase-freies Wasser ergänzt (Gesamtvolumen von 20 µl). Die folgenden Reaktionen fanden in einem GeneAMP 5700 Sequence Detection System statt: Primer-Inkubation bei 25 °C für 10 Minuten, reverse Transkription bei 48 °C für 30 Minuten sowie Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 95 °C für 5 Minuten. Am Ende des Reaktionsprozesses wurden zur Stabilisation des pH-Wertes der cDNA 80 µl Tris-EDTA-Puffer zu jeder Probe hinzugegeben und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.3 Quantitative Real-Time-PCR

Die Analyse der Genexpression in den Proben erfolgte anhand des Real-Time-PCR-Verfahrens.

Zur Bestimmung der folgenden Gene wurden die entsprechenden Primer verwendet (vgl. 2.9.2): Alkalische Phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC), Runx2, Kollagen 1 (COL1) und Sox9. RPLP0 diente in der anschließenden Kalkulation als sog. Referenzgen (*engl.: housekeeping gene*).

Jede Probe wurde in zweifacher Ausführung verwendet. 20 µl Reaktionslösung beinhalteten: 10 µl TaqMan Universalmix, 0,4 µl beider Primer (Endkonzentration 900 nM), 0,4 µl TaqMan-Sonde 6.8 µl RNase freies Wasser sowie 2 µl der cDNA-Vorlage. Die Negativkontrolle beinhaltete keine cDNA-Vorlage. Die Reaktionslösung wurde in eine 96-Well-Mikrotiterplatte transferiert und mit einer klebenden Folie versiegelt. Im Anschluss fanden folgende Reaktionsschritte im QuantStudio-6-Flex statt: 10-minütige Inkubation bei 95 °C zur Aktivierung der Polymerase, 40 PCR-Zyklen bei 95 °C für 15 Sekunden sowie bei 60 °C für eine Minute. Um etwaige nichtspezifische Amplifikationen nachweisen zu können wurde während weiterer 20 Minuten bei 60 – 90 °C eine Dissoziationskurve erstellt. Die folgende Analyse

basiert auf der Festlegung von Schwellenwerten der jeweiligen Gene. Die Ermittlung des *cycle threshold* (Ct-Wert) ist dabei entscheidend. Dieser Wert bezieht sich auf den Teil der Kurve, der ein exponentielles Wachstums aufweist und einen Fluoreszenzanstieg verzeichnet, der über den des Hintergrundwertes ansteigt. Je größer der DNA-Anteil einer Probe vor den Replikationszyklen ist, desto mehr Kopien entstehen anschließend und desto schneller sind Fluoreszenzsignale zu detektieren. Zum Vergleich verschiedener PCR-Ergebnisse eines Versuches wurde der durchschnittliche Grenzwert ermittelt und an die einzelnen Ergebnisse angepasst. Von den Ct-Werten der einzelnen Gene wurden jeweils die zugehörigen Ct-Werte des Referenzgens subtrahiert um den ΔCt -Wert zu erhalten. Anschließend wurde eine Probe vom Versuchstag 0 als interne Kalibrierung verwendet um den $\Delta\Delta Ct$ -Wert zu errechnen:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{Referenzgen}})_{\text{Zeitpunkt } x} - (Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{Referenzgen}})_{\text{Zeitpunkt } 0}$$

Die Menge des Genes – in Bezug auf das Referenzgen im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0 – wird über die Bestimmung des *fold change* der Genexpression und damit über die Berechnung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ jeder Probe erreicht (90).

2.5.4 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung der Proben erfolgte über die Verwendung des Hoechst *assays* (91). Das vorliegende Zellmedium wurde entfernt, Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in einer 0,5 mg Proteinase K/ml PBS-Lösung aufgenommen, die 3,36 g/l Dinatrium-EDTA (pH-Wert = 6,5) aufwies. Um einer Verdunstung vorzubeugen wurden die Zellkulturplatten mit Parafilmfolie sowie Aluminiumfolie umwickelt und nachfolgend für 16 Stunden bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zelllösung in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Die DNA-Quantifizierung der erforderlichen Proben eines Experimentes wurde stets zur gleichen Zeit durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe mit DNA-Konzentrationen von 50 µg/ml bis 0,78 µg/ml wurde in zweifacher Ausführung in einer 2 M NaCl-PBS-Lösung erstellt (DPBS). 40 µl jeder Probe wurden in zweifacher Ausführung in Vertiefungen einer 96-Titrierplatte überführt, 160 µl der Essay-Lösung (0,1 µg/ml Hoechst 33258 in DPBS) jeder Vertiefung hinzugegeben, die Titrierplatte mit Aluminiumfolie umwickelt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenzwerte erfolgte bei 360 nm Anregung und 465 nm Emission. Die Werte konnten durch Subtraktion der Kontrollproben von den eigentlichen Proben errechnet werden. Die Mengen an DNA wurde dann über eine lineare Standardkurve in Bezug auf die Kälber-DNA (µg/ml) bestimmt.

2.6 Aktivitätsanalyse der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (ALP) gilt als wichtiger Marker im Rahmen der osteogenen Differenzierung. Die Methode, die zur quantitativen kolorimetrischen Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase verwendet wurde, beruht auf der Eigenschaft des Enzymes, in alkalischer Umgebung Phosphorsäureester zu hydrolysieren. Die Menge an vorhandener ALP wird über eine Enzymreaktion mit dem Substrat para-Nitrophenylphosphat (pNPP) ermittelt. Die ALP katalysiert den Abbau von pNPP zu gelbem p-Nitrophenol, das bei $\lambda=405$ nm detektiert werden kann. Die gemessene Farbintensität ist dabei proportional zur ALP-Aktivität.

Zur Vorbereitung wurde das Zellmedium entfernt und die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Proben einem Lysis-Puffer (0,1% Triton X) ausgesetzt, für eine Stunde auf einer rotierenden Unterlage bei 4 °C inkubiert und dann in Eppendorfgefäße überführt. Bis zur weiteren Analyse erfolgte die Lagerung der Zellen bei -20 °C.

Zur Durchführung der Analyse wurden die Zellen aufgetaut und bei 4 °C für 30 Minuten gelagert. Während dieser Zeit wurde eine 1M Diethanolaminpufferlösung in 0,5 mM $MgCl_2$ -Lösung (pH-Wert = 9,8) und eine 1,5 M alkalische Pufferlösung (2-Amino-2-methylpropanol, pH-Wert = 10,3) bereitgestellt. Die Substratlösung enthielt 25 mg pNPP pro ml Diethanolaminpufferlösung. Zur Vorbereitung der Standardlösung wurden 10 mM p-Nitrophenol mittels Lysispuffer (0,1% Triton-X in 10 mM Trizma-Base) auf eine Endkonzentration von 1 μ M verdünnt. Zur Herstellung der folgenden Standardreihe wurden 0, 10, 20–70 μ l p-Nitrophenol mit dem jeweiligen Volumen des Lysispuffers verdünnt, um ein Endvolumen von 100 μ l zu erhalten. Zu jeder Stufe der Verdünnungsreihe wurden 250 μ l alkalischer Pufferlösung, 100 μ l Milli-Q-Wasser sowie 50 μ l Substratlösung zugegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transferierung von jeweils 500 μ l 0,1 M NaOH, 200 μ l alkalischer Pufferlösung, 50 μ l Substratlösung sowie 100 μ l der jeweiligen Probe in 1,5 ml Eppendorfgefäße. Die Lösung wurde vermischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu unterbrechen wurden 500 μ l 0,1 M NaOH-Lösung hinzugegeben. Die Messung der Proben sowie des Standards erfolgte in Duplikaten in einem *Victor 3 microplate reader* bei 405 nm (vgl. 2.9.6).

2.7 Determinierung von Kalzifikationen

2.7.1 Einlagerung radioaktiven Kalziums

Zur Determinierung von Kalzifikationen wird über die Bestimmung von aufgenommenen radioaktiven ^{45}Ca die Einlagerung von Kalzium in das Matrixgewebe ermittelt. Hierzu wurde das

vorliegende Zellmedium entfernt, die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und jeder Probe 300 µl Medium mit $^{45}\text{CaCl}_2$ (1.25 µCi/ml) hinzugefügt. Die Zellkulturplatte wurde mit Aluminiumfolie umwickelt und unter Zellkulturbedingungen (vgl. 2.3.1) für 16 Stunden inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten in einem speziellen Radioaktivitätslabor mit eigener Sterilbank. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen und jeder Probe 500 µl Ameisensäure (70 %) zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 65 °C für 60 Minuten. Das Gesamtvolumen der Ameisensäure jeder Probe wurde in ein Szintillationsgefäß überführt und 3,5 ml einer Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Die Messung erfolgte in einem Wallac 1414 WinSpectral Liquide Scintillation Counter. Die Menge des aufgenommenen, radioaktiven Kalziums stellte sich in Zählrate pro Minute (cpm/min) dar.

2.7.2 Alizarin-Red-S

Vergleichbar mit der Detektierung von radioaktivem Kalzium lässt sich anhand der Färbung mit dem Alizarin-Red-S-Farbstoff in die Matrix eingelagertes Kalzium nachweisen. Im Vergleich zur Radioaktivitätsmessung, die eine Momentaufnahme über die Kalziumaufnahme zu einem bestimmten Zeitpunkt darstellt, lässt sich mit Hilfe der Quantifizierung gebundener ARS-Partikel eine kumulative Einlagerung des Kalziums bestimmen. Dabei kommt es während des Chelationsprozesses zur Bildung eines Alizarin-Red-S Kalzium-Komplexes. Die Menge an gebundenem Alizarin-Red-S kann anschließend kolorimetrisch bestimmt werden und fungiert dementsprechend als Indikator für die gebildeten Formationen mineralisierter Matrix im Rahmen des Differenzierungsprozesses.

2.7.2.1 Färbung

Alizarin-Red-S fungiert als ein Chelatbildner und wird in der Histologie als Anfärbemittel u.a. zur Untersuchung von Kalzium-Ablagerungen in kalzifizierter Extrazellulärmatrix verwendet. Zur Detektierung der qualitativen Mineralisation wurde eine Färbung mit 40 mM Alizarin-Red-S (pH-Wert = 4,1-4,3) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen zweimal in PBS-Lösung gewaschen und für 15 Minuten in einer Paraformaldehydlösung (4 %) fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für jeweils fünf Minuten in demineralisiertem Wasser gewaschen. Es folgte die Färbung mit 250 µl/cm² 40 mM Alizarin-Red-S-Lösung. Die Proben wurden mit Aluminiumfolie umhüllt und für eine Stunde auf einer rotierenden Unterlage bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgten insgesamt fünf Waschschrte mit demineralisiertem Wasser und die anschließende Lagerung bei 4 °C.

2.7.2.2 Quantifikation

Nach erfolgreicher Färbung wurde die Menge an gebundenem Farbstoff quantifiziert. Die Alizarin-Färbelösung lag standardisiert in einer Konzentration von 0,47 μM bis 30 μM vor. Verdünnungsreihen wurden – ausgehend von einer 40 μM Lösung – für die folgende Quantifizierung verwendet. Die Alizarin-Red-S-Lösung wurde anhand einer Standardlösung (10 % Ammoniumhydroxid und 10 % Essigsäure) in einem Verhältnis von 1 : 4 verdünnt. Die Zellen wurden hierfür 30 Minuten bei Raumtemperatur in Essigsäure (10%) inkubiert. Daraufhin löste sich der Zellrasen von der Unterlage und konnte in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß übertragen werden. Die Proben wurden mit Parafilm abgedichtet und bei 85 °C für 10 Minuten inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen für 5 Minuten auf Eis gelagert, dann bei 20.000 g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Neutralisation der Essigsäure wurden 120 μl der Standardlösung zum Überstand gegeben um einen pH-Wert von 4,1-4,5 zu erhalten. Als Kontrolle dienten 150 μl der Standardlösung. Sowohl die Kontrolle als auch die Proben wurden als Duplikate in eine transparente 96-Mikrotitrierplatte transferiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=405$ nm erfasst (*Wallac Victor 1420 Multilabel Counter*). Die Konzentration an gebundenem Alizarin-Red-S in den Proben wurde unter Verwendung der Standardkurve ermittelt und ins Verhältnis zur DNA gesetzt.

2.8 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe von Graphpad Prism 5. Die Prüfung der Normalverteilung der Ergebnisse wurde anhand des *D'Agostino & Pearson omnibus normality tests* durchgeführt. In Abhängigkeit des Testergebnisses wurden der t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test verwendet um die Ergebnisse hinsichtlich einer statistischer Signifikanz zu untersuchen. Bei mehr als zwei Gruppen wurde die Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Ein p-Wert von $p \leq 0,05$ wurde bei einem Konfidenzintervall von 95% als statistisch signifikant definiert und bis auf die 3. Stelle nach dem Komma gerundet.

2.9 Laborartikel

2.9.1 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Tabletten			Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) 1g/l Pulver	3,7 g NaHCO ₃ /l		Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA
<i>α-Minimum Essential Medium</i> (MEM) Pulver	+ 2.2 g NaHCO ₃ /l		Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Wachstumsmedium	DMEM 1g Glucose + 10 % fetales Kälberserum (FCS) SeraPlus + 1 % Pen Strep (10.000 Units/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin)		PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Differenzierungsmedium	Wachstumsmedium + 5 mM β-Glycerolphosphat + 10 nM Dexamethason + 50 µg/ml Ascorbinsäure		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lysis-Puffer	99 % destilliertes Wasser + 1 % von 10 % Triton X-100 + 0,1576 g 10 mM Trizma-Base/100 ml		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	4 % 0,1 M PBS, pH 7,2 – 7,4 0,1 % Diethylpyrocarbonat in MilliQ-Wasser (Dampfsterilisation bei 121 °C für 20 Minuten)		Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA Fluka, Buchs, Schweiz

2.9.2 Gene

Gen	Forward 5'–3'	Reverse 3'–5'	Sonde	Assay on demand	Herkunft
RPLP0	5'-TGG GCA AGA ACA CCA TGA TG-3'	5'-CGG ATA TGA GGC AGC AGT TTC-3'	5'-AGG GCA CCT GGA AAA CAA CCC AGC-3'		Microsynth, Balgach, Schweiz
Runx2	5'-AGC AAG GTT CAA CGA TCT GAG AT-3'	5'-TTT GTG AAG ACG GTT ATG GTC AA-3'	5'-TGA AAC TCT TGC CTC GTC CAC TCC G-3'		Microsynth, Balgach, Schweiz
Sox9				Hs00165814_m1	Applied Biosystem, Forster City, USA
OC	5'-AAG AGA CCC AGG CGC TAC CT-3'	5'-AAC TCG TCA CAG TCC GGA TTG-3'	5'- ATG GCT GGG AGC CCC AGT CCC-3'		Microsynth, Balgach, Schweiz
ALPL				Hs00758162_m1	Applied Biosystem, Forster City, USA
Col1	5'-CCC TGG AAA GAA TGG AGA TGA T-3'	5'-ACT GAA ACC TCT GTG TCC CTT CA-3'	5'-CGG GCA ATC CTC GAG CAC CCT-3'		Microsynth, Balgach, Schweiz

2.9.3 Peptide

SeraPlus <i>Special Processed fetal bovine serum</i> (FBS) Hitze inaktiviertes FBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA
---	---

2.9.4 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

TRI REAGENT RNA/ DNA/ <i>protein isolation reagent</i> Pen Strep (10.000 Units/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin)	Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA
IL1-β <i>human recombinant</i> 10 µg	PromoKine/ PromoCell GmbH, Heidelberg

β-Glycero-2-phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Recombinant Human Stem Cell Factor (SCF)	PromoKine/ PromoCell GmbH, Heidelberg
Trypsin-EDTA 0.5 % (5g/l Trypsin, 2g/l EDTA, 8 g/l NaCl)	Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Polyacryl Carrier	Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA
Proteinkinase K	Roche Applied Science, Penzberg
Diethanolamine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-EDTA Pufferlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TaqMan Genexpression Universal Master Mix	Applied Biosystem, Forster City, USA
TaqMan <i>reverse Transcription reagents</i>	Perkin Elmer, Waltham, USA
Hoechst 33258	Polyscience Inc., Warrington, USA
Alizarin-Red-S	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1-Bromo-3-chlorpropan (BCP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KKeine Indexeinträge gefunden. alzium-45 (⁴⁵ Ca)	Perkin Elmer, Waltham, USA
Radionukleotid (CaCl ₂ in Lösung)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alkalische Pufferlösung 1,5 M	Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA
<i>High Salt Precipitation Solution</i>	Fitzgerald Industries, Acton, USA
<i>Basic FGF, human recombinant</i>	Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Kälber Thymus DNA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Amino-2methylpropanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol, Isopropanol, Methanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Ameisensäure (70 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Deoxy NTPs <i>mixture</i>	Applied Biosystems
Magnesiumchlorid-Lösung	Applied Biosystems
MultiScribe Reverse Transkriptase 50 U/μl	Applied Biosystems
PCR-Puffer II 10x	Applied Biosystems
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Formaldehydlösung(Formalin)	Formafix AG, Hittnau, Schweiz
Histopaque 1077	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Optiphase HiSafe 3 Szintillationslösung	Perkin Elmer, Waltham, USA
4-Nitrophenol Lösung 10 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
p-Nitrophenol Standardlösung 10mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase Inhibitor20 U/μl	Applied Biosystem, Forster City, USA
Trypan Blue Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase Zap	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MilliQ – demineralisiertes Wasser	Millipore Corporation, Billerica, USA
Alizarin-Red-S	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.9.5 Sonstige Materialien

<i>"Mr. Frosty" Cryo Freezing Container</i>	Nalagene Labware, USA
Gewebekultur-Lochplatten (6, 24 und 96)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen „ <i>Falcon tubes</i> “ 15 und 50 ml	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Gewebekulturflaschen T300	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Einfrierröhrchen „ <i>Cryo tubes</i> “	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipets " <i>Costar Stripette</i> "	Corning Incorporated, New York, USA
Cell Culture Inserts (24-Well, 0.4 μm pore size)	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Companion-Platte (24-Well)	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen	Neptune Scientific, Rador, USA
Reaktionsgefäße " <i>safe lock tubes</i> "	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauerzählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen,
Thermanox Plastic Coverslips (13 mm Ø)	NUNC Brand Products, Rochester, USA

2.9.6 Geräte

QuantStudio™ 6 and 7 Flex Real-Time PCR System	Life Technologies, Carlsbad, USA
Axiovert 25 Mikroskope	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiovert 200 M	
Rotanta 46 RSC Robotic	Hettich AG, Bäch, Schweiz

Vortex-Genie 2 Shaker, 120 VAC
GeneAmp 5700 *Sequence Detection System*
Eppendorf Zentrifuge 5415D und 5417R
NanoDrop 1000 spectrophotometer
Wallac 1414 *WinSpectral Liquide Scintillation Counter*
Victor 3 1420 *Multilabel Plate Counter*
Inkubatoren
Wasserbad Typ 1004

Scepter 2.0
Olympus CK40 Fluoreszenzmikroskope
Hettich Rotanta/RP, Typ 4300
Pipetman Pipetten
Multipipette plus
Sterilbank
Stickstofftank ARPEGE 110
Waage XS603SDR (für Chemikalien)

Scientific Industries, New York, USA
Applied Biosystem, Forster City, USA
Eppendorf AG, Hamburg
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Perkin Elmer, Waltham, USA

Heraeus, Hanau
GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH,
Burgwedel
Merck Millipore, Darmstadt
Olympus, Shinjuku, Japan
Hettich AG, Bäch, Schweiz
Gilson, Middleton, USA
Eppendorf, Hamburg
Kendro Laboratory Products, Heraeus, Hanau
VWR International, Rador, USA
Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz

2.9.7 Verwendete Software

Graphpad Prism 5
DP Controller
QuantStudio™ 6 and 7 Flex Real-Time PCR System v 1.0
Word, Excel 2007
ND-1000 V3.8.1
WorkOut2.5 Data Analysis

Graphpad Software Inc., USA
Olympus, Shinjuku, Japan
Life Technologies, Carlsbad, USA
Microsoft, Redmond, USA
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Perkin Elmer, Waltham, USA

3 ERGEBNISSE

3.1 Proliferationsverhalten nach IL-1 β -Stimulation

IL-1 β -stimulierte hMSCs, welche mit MG-63-GFP-Zellen ko-kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu unstimulierten hMSCs während des gesamten Versuchsverlaufes ein ähnliches Proliferationsverhalten. Die IL-1 β -Stimulation hatte demnach keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten humaner MSCs unabhängig davon, welches Kulturmedium verwendet wurde.

Ein klarer Unterschied im Proliferationsverhalten humaner MSCs konnte hingegen in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium nachgewiesen werden.

So führte eine Kultivierung humaner MSCs im Differenzierungsmedium zu einem kontinuierlichen Anstieg des totalen DNA-Gehaltes über die Zeit, während eine Kultivierung im Kontrollmedium keine Veränderung an den unterschiedlichen Tagen zeigte. Der totale DNA-Gehalt war zudem zu jedem Zeitpunkt signifikant höher in Zellen, die im Differenzierungsmedium kultiviert wurden (DM und DM +IL-1 β) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$; CM und CM +IL-1 β) (vgl. Abb. 11a).

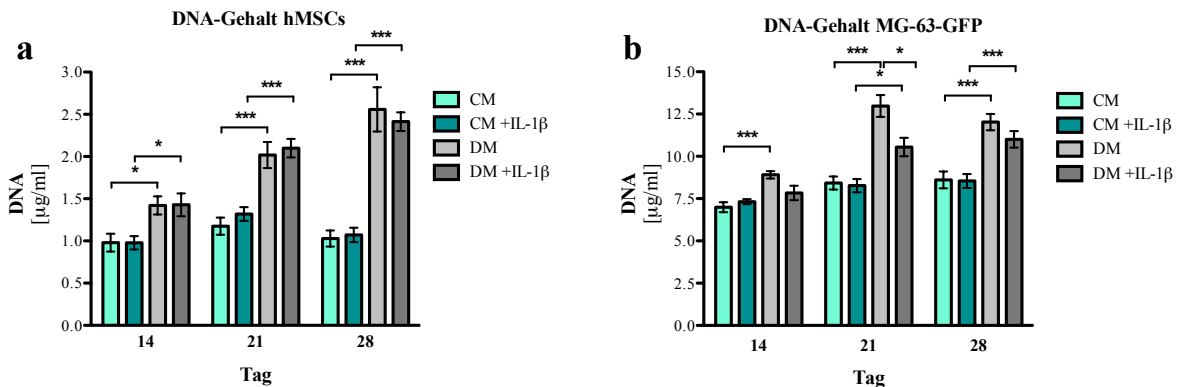


Abb. 11: Absoluter DNA-Gehalt ($\mu\text{g/ml}$; Mittelwert \pm SEM) an den Tagen 14, 21 und 28. **a)** humane MSC-Zellkulturen und **b)** MG-63-GFP-Zellkulturen; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Analog zu den Ergebnissen der hMSCs konnte in Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie ein signifikant höherer Gehalt an totaler DNA während des gesamten Verlaufes nachgewiesen werden, wenn Zellen im Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. Zellen, welche mit unstimulierten hMSCs ko-kultiviert wurden zeigten an Tag 21 signifikant höhere Werte im Vergleich zu Zellen, welche mit stimulierten hMSCs ko-kultiviert wurden ($p \leq 0,05$) (vgl. Abb. 11b).

3.2 IL-1 β -Stimulation moduliert die ALP-Aktivität in hMSCs

Stimulierte hMSCs, die im Differenzierungsmedium kultiviert wurden, zeigten am 14. und 21. Tag die höchste Enzymaktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe (DM) sowie zu den Gruppen des Kontrollmediums (vgl. Abb. 12a). Während an Tag 14 noch die unstimulierten hMSCs im Kontrollmedium eine geringfügig höhere Enzymaktivität im Vergleich zu stimulierten Zellen (CM +IL-1 β) aufwiesen, konnte an Tag 21 eine umgekehrte Relation nachgewiesen werden.

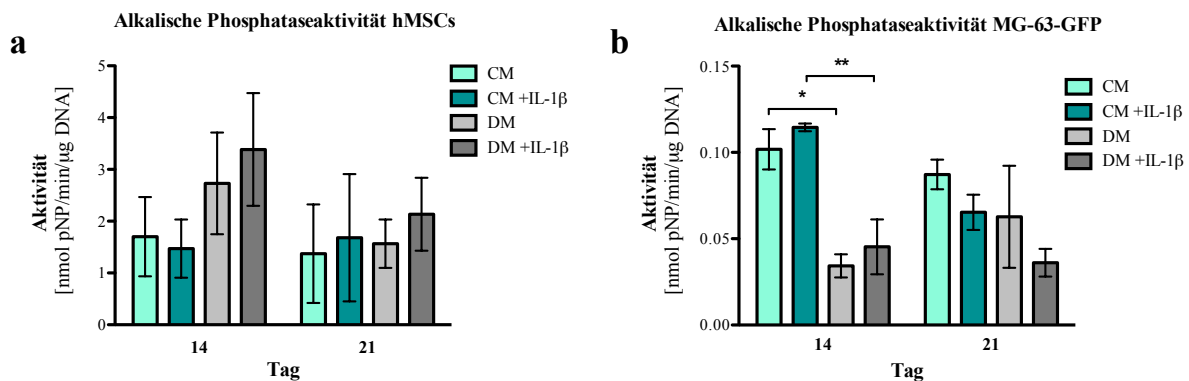


Abb. 12: Alkalische Phosphataseaktivität bezogen auf den absoluten DNA-Gehalt (nmol pNP/min/ μ g DNA; Mittelwert \pm SEM) an den Tagen 14 und 21. **a)** humane MSC-Zellkulturen und **b)** MG-63-GFP-Zellkulturen; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Die Kultivierung von MG-63-GFP-Zellen im Kontrollmedium (CM und CM +IL-1 β) führte zu einer erhöhten ALP-Aktivität im Vergleich zum Differenzierungsmedium (DM und DM +IL-1 β). Hier konnte ein signifikanter Unterschied an Tag 14 nachgewiesen werden ($p < 0,05$ / $p < 0,01$; vgl. Abb. 12b). Eine Ko-Kultivierung von MG-63-GFP-Zellen mit stimulierten hMSCs (CM +IL-1 β und DM +IL-1 β) führte in beiden Kulturmedien an Tag 14 zu einer erhöhten ALP-Aktivität im Vergleich zu Zellen, die mit unstimulierten hMSCs in Kultur vorlagen. An Tag 21 war dieser Effekt umgekehrt und MG-63-Zellen in Kultur mit stimulierten hMSCs wiesen eine deutlich reduzierte Enzymaktivität im Vergleich zu den Kontrollgruppen (CM und DM) auf (vgl. Abb. 12b).

Zusammenfassend führte die Stimulation humaner MSCs mit IL-1 β zu einer erhöhten eigenen Enzymaktivität der ALP. Zudem resultierte diese Stimulation in einem früheren Ansprechen/Erhöhung der Enzymaktivität in MG-63-GFP-Zellen an Tag 14 sowie zu einer frühzeitigeren Änderung mit reduzierter ALP-Aktivität an Tag 21.

3.3 Verminderte ^{45}Ca -Einlagerung nach IL-1 β -Stimulation

In Abhängigkeit vom Kulturmedium konnten deutliche Unterschiede in der Kalziumaufnahme gezeigt werden. So führte die Kultivierung von Zellen im Differenzierungsmedium zu einer vermehrten Einlagerung des radioaktiven Kalziums an Tag 21 im Vergleich zu Zellen, die im Kontrollmedium gehalten wurden.

Dieser Effekt konnte sowohl in hMSCs wie auch in Kulturen der MG-63-GFP-Zelllinie nachgewiesen werden (vgl. Abb. 13a und b). Eine zusätzliche IL-1 β -Stimulation von hMSCs führte zu einer Verringerung der Kalziumaufnahme an Tag 21 in hMSCs, wie auch in MG-63-GFP-Kulturen unabhängig vom verwendeten Kulturmedium.

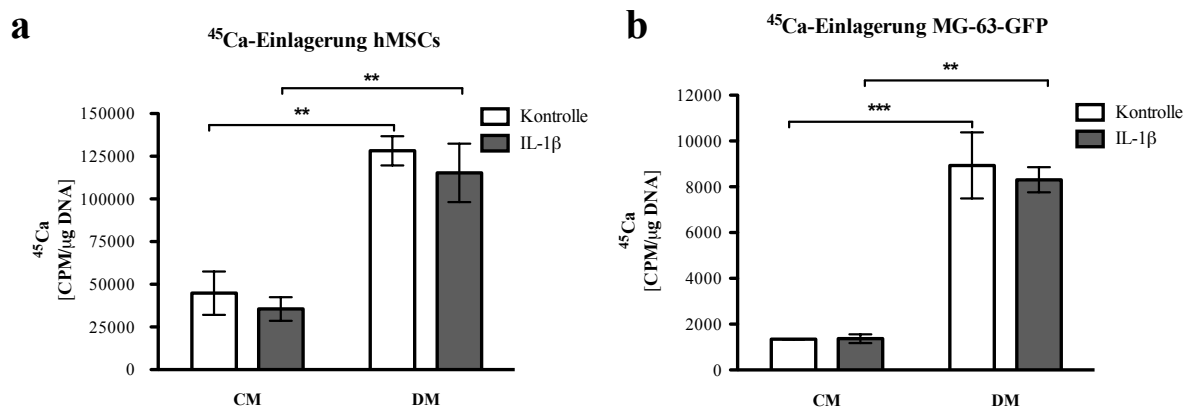


Abb. 13: ^{45}Ca -Einlagerung bezogen auf den absoluten DNA-Gehalt (cpm/ μg DNA; Mittelwert \pm SEM). **a)** humane MSC-Zellkulturen und **b)** MG-63-GFP-Zellkulturen; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

3.4 Alizarin-Red-S-Bestimmung

Neben der qualitativen Auswertung der ARS-Färbung wurde eine quantitative Analyse der gebundenen ARS-Partikel durchgeführt. Dabei wurde die Menge an gebundenem ARS auf den totalen DNA-Gehalt der jeweiligen Gruppe bezogen.

3.4.1 ARS-Quantifizierung

Die Kultivierung humaner MSCs sowie Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie im Differenzierungsmedium führte zu einer deutlich stärkeren ARS-Aufnahme im Vergleich zu einer Kultivierung im Kontrollmedium unabhängig davon, ob eine Stimulation humaner MSCs vorausging (vgl. Abb. 14a und b). Eine Stimulation humaner MSCs mit anschließender Kultivierung im Differenzierungsmedium führte zu einem verringerten Nachweis an gebundenem ARS im Vergleich zu der unstimulierten Kontrollgruppe (DM) (vgl. Abb. 14a).

Ein ähnlicher, jedoch deutlich geringerer Trend konnte durch die Kultivierung im Kontrollmedium nachgewiesen werden. Auch hier zeigten stimulierte Zellen (ARS = 5,5

(nmol/ μg DNA)) geringere ARS-Werte gegenüber unstimulierten Zellen (ARS = 5,4 (nmol/ μg DNA)).

Dem gegenüber führte eine Ko-Kultur von stimulierten hMSCs und MG-63-GFP-Zellkulturen zu signifikant erhöhten ARS-Werten ($p < 0,05$) sowohl wenn diese im Kontroll- wie auch im Differenzierungsmedium kultiviert wurden (vgl. Abb. 14b). Auch hier waren die Unterschiede ausgeprägter im Differenzierungsmedium (ARS = 5,6 nmol/ μg DNA) verglichen mit dem Kontrollmedium (ARS = 0,3 nmol/ μg DNA).

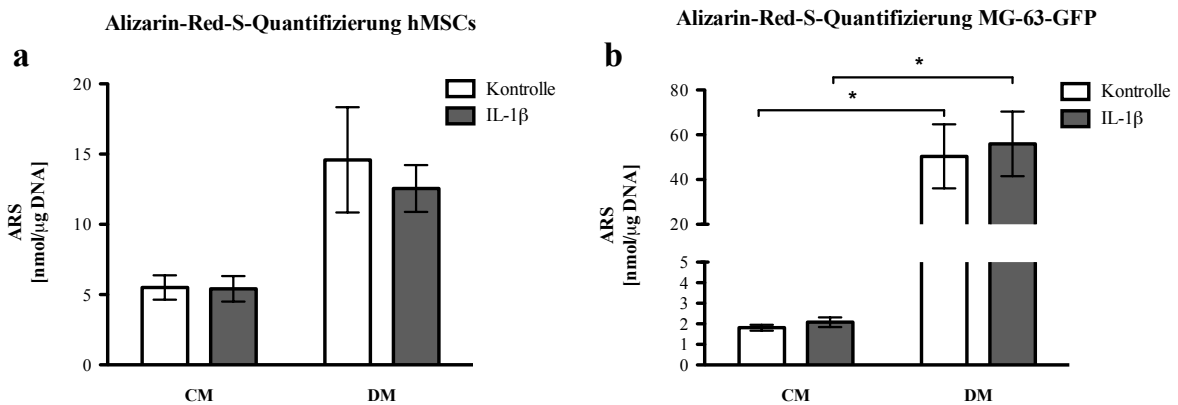


Abb. 14: Menge an gebundenem ARS bezogen auf den absoluten DNA-Gehalt (nmol/ μg DNA; Mittelwert \pm SEM). **a)** humane MSC-Zellkulturen und **b)** MG-63-GFP-Zellkulturen (DM \pm IL-1 β n = 2 pro Gruppe, CM \pm IL-1 β n = 3 pro Gruppe); * $p \leq 0,05$

3.4.2 ARS-Färbung von Zellkulturen

Die qualitative Analyse der ARS-Färbung zeigte eine vergleichbare Anfärbung beider Zellkulturen (hMSCs und MG-63-GFP), welche im gleichen Medium kultiviert wurden.

Die Kultivierung von hMSCs sowie MG-63-GFP-Zellen im Differenzierungsmedium führte zu einer deutlich stärkeren ARS-Färbung im Vergleich zum Kontrollmedium (vgl. Abb. 15). Hierbei konnte kein Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellkulturen nachgewiesen werden.

Die Färbungen der MG-63-GFP-Zellkulturen, die im Differenzierungsmedium kultiviert wurden (DM und DM +IL-1 β), zeigen in den niedrigeren Auflösungen eine Abgrenzung zwischen gefärbten und nicht gefärbten Bereichen (a). Die gefärbten Bereiche korrelierten mit der Größe und Form der zu Beginn des Experimentes geformten hochverdichteten Zellpellets.

Obwohl Zellen in höheren Auflösungen außerhalb dieser Farbgrenze detektiert werden konnten, zeigten diese Gebiete aufgrund der ausbleibenden ARS-Anfärbung reduzierte oder sogar fehlende Kalziumablagerungen. Entsprechend wurden nur die hochverdichteten Zellpelletformationen angefärbt oder Bereiche in unmittelbarer Umgebung zu dieser.

In Ergänzung zu der vermehrten ARS-Bindung begannen die Zellformationen der humanen MSCs aller drei Experimente, die während der Versuche in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, sich von der Unterlage zu lösen und Zellhaufen zu bilden, während Zellen im Kontrollmedium ihre ursprüngliche Formation beibehielten.

Auch die Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie in beiden Kulturmedien zeigten keine Veränderung hinsichtlich der Gestalt der Zellformation.

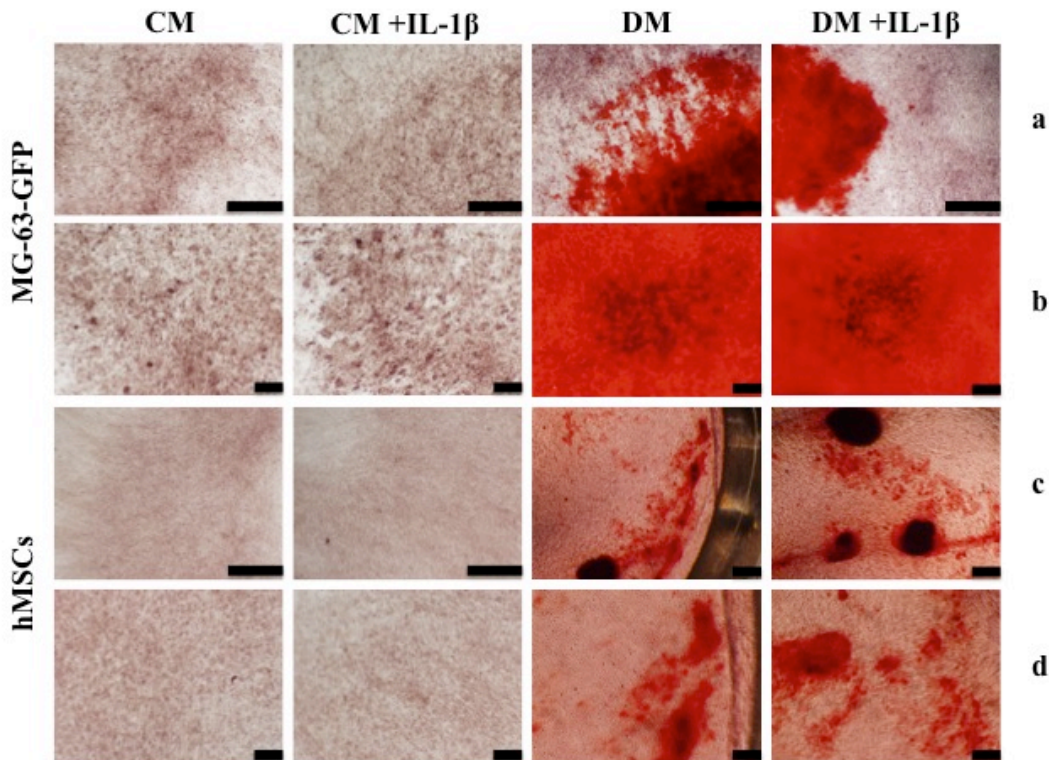


Abb. 15: Fotografische Aufnahme nach ARS-Färbung aller Gruppen; Aufnahmen repräsentieren die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe und ähnlichen Ergebnissen. **a)** und **c)** in 4-facher Vergrößerung; Maßstabsbalken CM und CM +IL-1 β : 1 mm; Maßstabsbalken DM und DM +IL-1 β : 500 μ m **b)** und **d)** in 10-facher Vergrößerung (Maßstabsbalken: 200 μ m).

3.5 mRNA-Expression nach IL-1 β -Stimulation

Um den Einfluss der IL-1 β -Stimulation auf humane MSCs und konsekutiv auf Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie analysieren zu können wurde das Genexpressionsmuster zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

3.5.1 Einfluss der IL-1 β -Stimulation auf die mRNA-Expression humaner MSCs

Im Anschluss an eine zweistündige Inkubation mit dem Interleukin-1 β konnte eine reduzierte Expression von Runx2-, ALP- und Kollagen Typ1 nachgewiesen werden wohingegen eine Überexpression von Sox9 beobachtet wurde (vgl. Abb. 16).

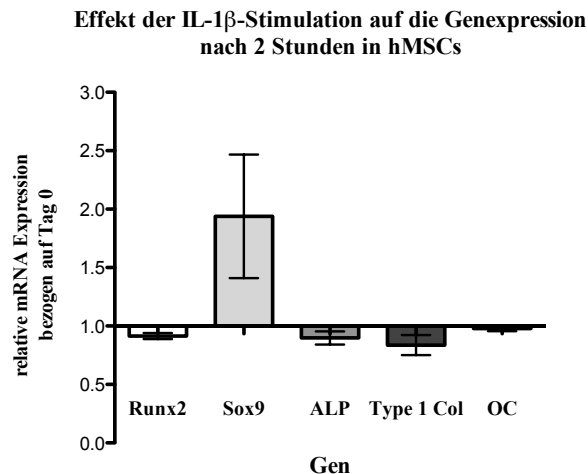


Abb. 16: Relative mRNA-Expression der aufgeführten Gene in stimulierten humanen MSCs gegenüber unstimulierten humanen MSCs in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) nach zweistündiger Stimulation an Tag 0 von sechs unabhängigen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n = 18 pro Gen; Mittelwertes \pm SEM).

3.5.1.1 *Runx2*

Die Stimulation humaner MSCs führte im Vergleich zu der jeweiligen unstimulierten Kontrollgruppe (CM und DM) in beiden Kulturmedien zu einer Überexpression von Runx2 an Tag 2 (vgl. Abb. 17a).

Eine Kultivierung humaner MSCs im Differenzierungsmedium führte zu einer insgesamt höheren Runx2-Expression an Tag 2 und Tag 21 im Vergleich zu Zellen, die im Kontrollmedium kultiviert wurden. Im Verlauf der Experimente zeigte sich eine abnehmende Runx2-Expression, die an Tag 21 langsam wieder anstieg (Abb. 17a und b).

Ein Unterschied war hierbei zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen im Kontrollmedium zu erkennen. Während an Tag 7 und 14 ähnliche Werte in der Runx2-Expression in beiden Gruppen des Kontrollmediums nachzuweisen waren, zeigten stimulierte Zellen (CM +IL-1 β) an Tag 21 deutlich höhere Runx2-Expressionen als unstimulierte Zellen (CM).

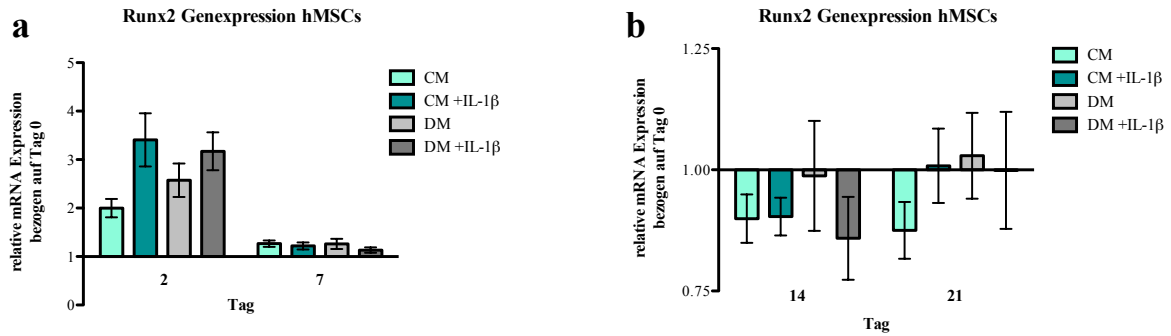


Abb. 17: Relative Runx2-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in humanen MSCs normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n = 9). **a)** Tag 2 und 7; **b)** Tag 14 und 21.

3.5.1.2 Sox9

Während eine Kultivierung in Differenzierungsmedium in einer deutlichen Herunterregulierung in der Sox9-Expression in hMSCs resultierte, führte die Kultivierung im Kontrollmedium zu einer deutlichen Zunahme der Sox9 Expression an Tag 2 (vgl. Abb. 18a).

Die Stimulation humaner MSCs zeigte im Differenzierungsmedium keinen eindeutigen Effekt über den gesamten Versuchszeitraum. Hingegen zeigte sich eine deutliche Herunterregulierung in stimulierten Zellen des Kontrollmediums (CM +IL-1β) im Vergleich zu unstimulierten Zellen (CM) an Tag 2. Im Verlauf näherten sich die Werte beider Gruppen an (vgl. Abb. 18a und b).

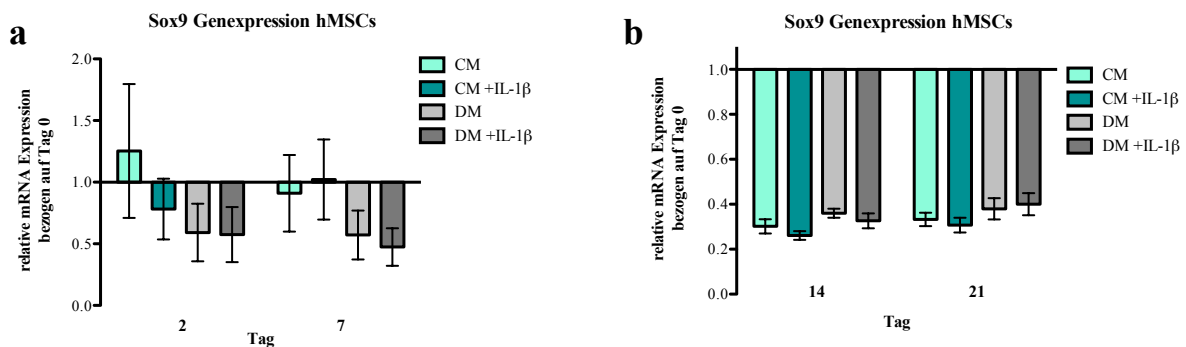


Abb. 18: Relative Sox9-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in humanen MSCs normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n = 9). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21

3.5.1.3 ALP

Die ALP-Expression aller Gruppen zeigte einen steigenden Verlauf über den gesamten Versuchszeitraum. In Gruppen des Differenzierungsmediums konnte ein Maximum der mRNA-Expressionswerte an Tag 14 detektiert werden, während Gruppen des Kontrollmediums erst an Tag 21 ihr Maximum erreichten.

Stimulierte Zellen zeigten im Vergleich zu unstimulierten Zellen des gleichen Kulturmediums eine geringere Herunterregulierung der ALP-Expression. Dieser Effekt wurde in den Gruppen des Differenzierungsmediums mit der Zeit ausgeglichen und zeigte sogar eine gegenläufige Tendenz in den Gruppen des Kontrollmediums (vgl. Abb. 19a und b).

Insgesamt zeigten Zellen, welche im Differenzierungsmedium kultiviert wurden ein früheres Ansprechen sowie insgesamt höhere Durchschnitts- und Maximalwerte der ALP-Expression.

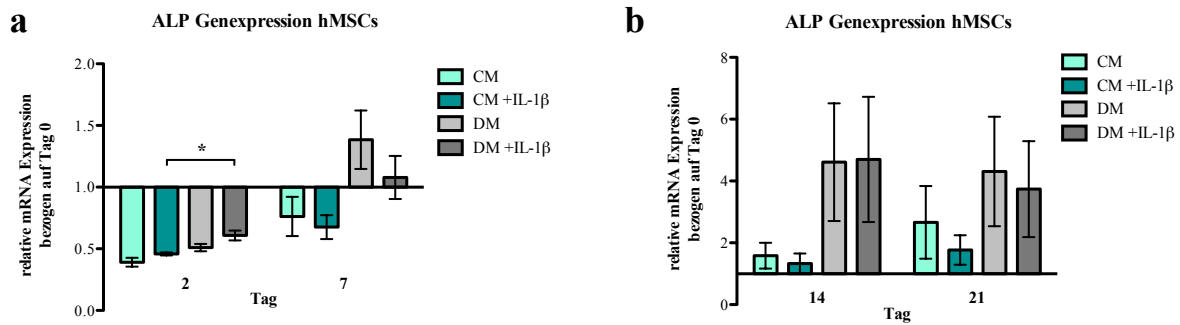


Abb. 19: Relative ALP-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in humanen MSCs normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n = 9). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21; * $p \leq 0,05$

3.5.1.4 Kollagen-Typ-1

Ein divergierender Effekt der Kollagen-Typ-1-Expression konnte in Abhängigkeit des Kulturmediums nachgewiesen werden.

HMSCs, die im Kontrollmedium kultiviert wurden zeigten an Tag 2 die höchsten Expressionswerte mit einem anschließenden abfallenden Verlauf. Zellen, die über den Verlauf im Differenzierungsmedium gehalten wurden zeigten einen Anstieg der Genexpression bis zum 14. Tag und in der Folge einen Abfall (vgl. Abb. 20a und b). Die Stimulation humaner MSCs führte in beiden Kulturmedien zu insgesamt deutlich höheren Werten in der Kollagen-Typ-1-Expression – mit unterschiedlicher Ausprägung während der einzelnen Zeitpunkte.

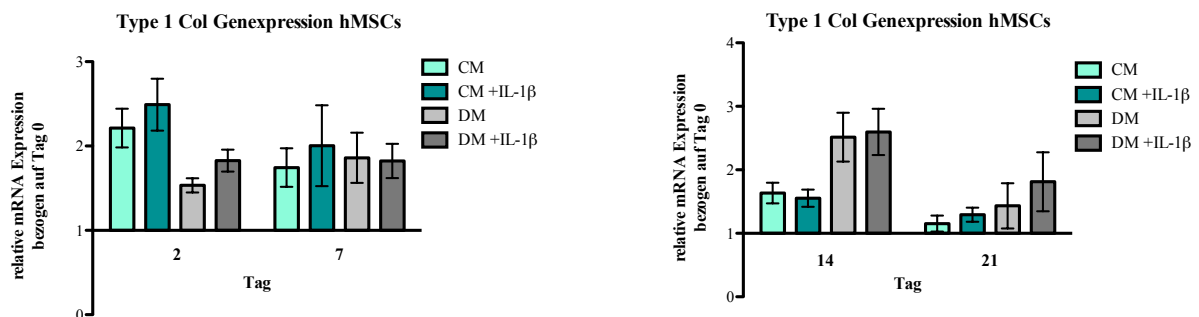


Abb. 20: Relative Type-1-Col-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in humanen MSCs normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n = 9). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21

3.5.1.5 Osteocalcin

Die Genexpression des humanen Osteocalcins zeigte sich in allen Gruppen über den gesamten Zeitverlauf herunterreguliert. Während an Tag 2 und 7 noch Unterschiede sowohl zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen des gleichen Kulturmediums als auch zwischen gleichen Behandlungsgruppen unterschiedlicher Kulturmedien detektiert werden konnten, war ab Tag 14 kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen nachweisbar (Abb. 21a und b).

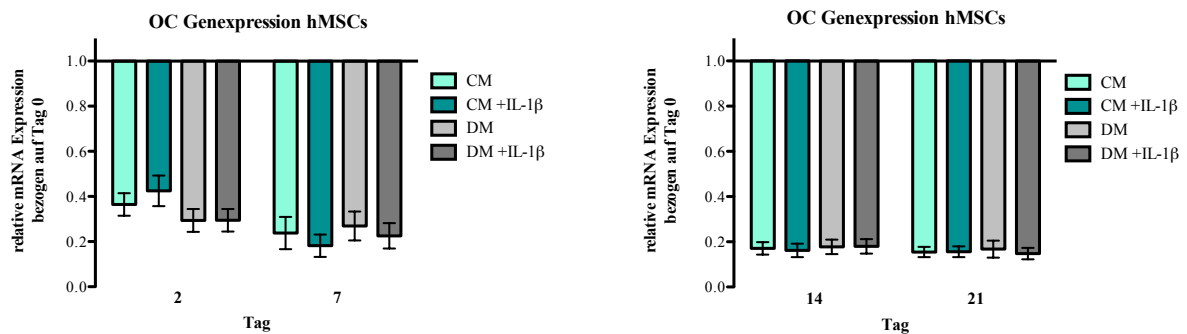


Abb. 21: Relative OC-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in humanen MSCs normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n = 9). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21

3.5.2 Runx2/Sox9-Quotient humaner MSCs

Die IL-1 β -Stimulation humaner MSCs resultierte in einem erhöhten Runx2/Sox9-Quotienten an Tag 2 im Vergleich zu unstimulierten Zellen unabhängig vom Kulturmedium.

An Tag 7 hingegen zeigten die unstimulierten Zellen beider Kulturmedien höhere Werte (Abb. 22a). Während an den Tagen 2 und 7 Zellen im Differenzierungsmedium einen insgesamt höheren Runx2/Sox9-Quotienten aufwiesen, war dieser Effekt zugunsten der Zellen im Kulturmedium ab Tag 7 umgedreht (Abb. 22b).

Insgesamt zeigten stimulierte hMSCs im Kontrollmedium an Tag 14 und 21 die höchsten Runx2/Sox9-Werte und einen klaren Unterschied im Vergleich zu unstimulierten Zellen (CM). Eine vergleichbare Differenz hinsichtlich der im Differenzierungsmedium kultivierten Zellen beider Gruppen (DM und DM +IL-1 β) konnte nicht detektiert werden.

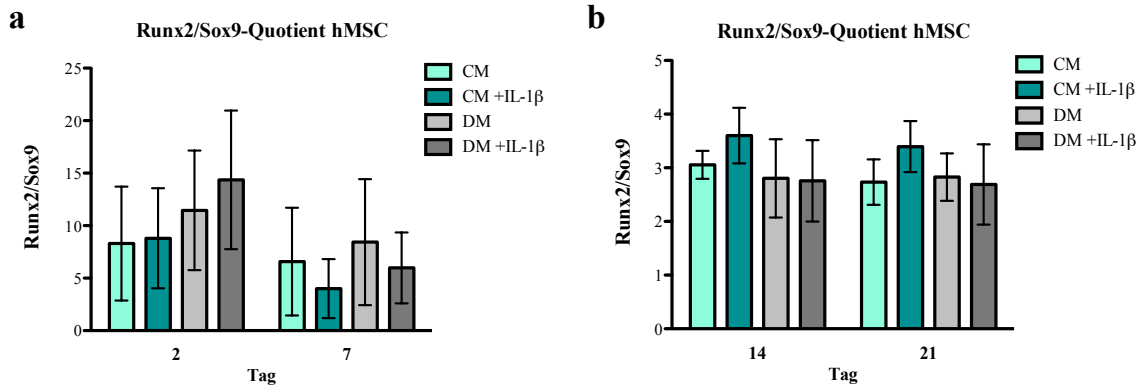


Abb. 22: Runx2/Sox9-Quotienten (Mittelwerte \pm SEM) in humanen MSCs von drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe. **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21

3.5.3 mRNA-Expression ko-kultivierter MG-63-GFP-Zellen

3.5.3.1 *Runx2*

MG-63-GFP-Zellen, die mit stimulierten hMSCs ko-kultiviert wurden, zeigten eine Hochregulierung in der Runx2-Genexpression an Tag 2 in beiden Kulturmedien (Abb. 23a).

Die Kultivierung von Osteosarkomzellen im Differenzierungsmedium führte unter dem Einfluss unstimulierter hMSCs (DM) zu einer weniger starken Runx2-Expression an Tag 2 als in der Kontrollgruppe (CM).

Während an Tag 7 insgesamt eine vermehrte Runx2-Expression in den Zellen nachgewiesen werden konnte, die in Differenzierungsmedium kultiviert worden waren (DM und DM +IL-1 β), wiesen Zellen in den Gruppen des Kontrollmediums (CM und CM +IL-1 β) an Tag 14 höhere Werte auf. Diese Unterschiede konnten an Tag 21 nicht mehr detektiert werden (Abb. 23b).

Entsprechend der Runx2-Genexpression in hMSCs zeigt die Genexpression in MG-63-GFP-Zellen einen vergleichbaren Verlauf über die Zeit mit hohen Genexpressionswerten an Tag 2, einem Abfall über die Tage 7 und 14 und einen konsekutiven Anstieg an Tag 21.

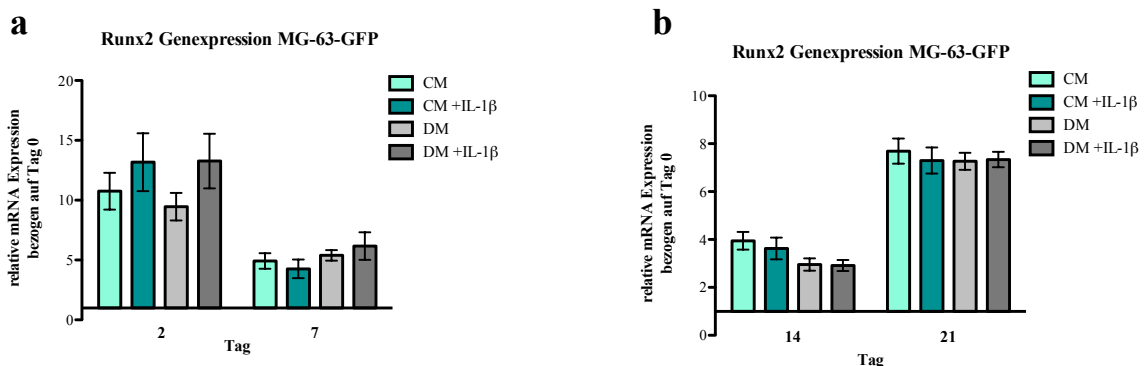


Abb. 23: Relative Runx2-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in MG-63-GFP-Zellen normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n=9 pro Gruppe). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21

3.5.3.2 Sox9

Ein analoger Trend zeigte sich hinsichtlich der Sox9-Genexpression. Die höchsten Werte konnten in allen 4 Gruppen an Tag 2 nachgewiesen werden. In den folgenden Tagen zeigte sich eine verminderte Hochregulation in allen Gruppen (Tag 7 und 14), welcher sich eine Zunahme an Tag 21 anschloss (Abb. 24a und b).

Auffällig war, dass die Genexpression entscheidend vom vorliegenden Kulturmedium abhing ($p < 0,05$), nicht jedoch vom Einfluss einer Stimulation ko-kultivierter hMSCs.

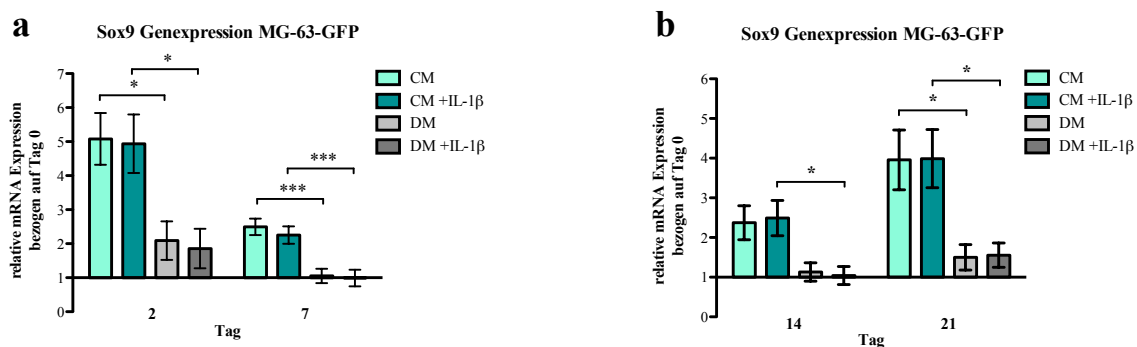


Abb. 24: Relative Sox9-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in MG-63-Zellen normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe ($n=9$ pro Gruppe). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

3.5.3.3 ALP

Im Vergleich zur ALP-Genexpression humaner MSCs zeigten Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie einen weitestgehend ähnlichen Verlauf. Während jedoch hMSCs im Differenzierungsmedium die höchsten Werte über die Zeit verzeichneten, zeigten MG-63-GFP-Zellen, welche im Kulturmedium kultiviert worden waren, die stärkste Genexpression mit deutlich signifikanten Unterschieden an Tag 14 und 21.

Insgesamt konnte ein Anstieg zwischen Tag 2 und Tag 14 mit anschließendem Abfall in der Genexpression an Tag 21 in allen 4 Gruppen detektiert werden (Abb. 25a und b).

MG-63-GFP-Zellen im Kontrollmedium zeigten unter dem Einfluss stimulierter hMSCs (CM +IL-1β) beständig höhere Werte im Vergleich zur CM-Kontrollgruppe. Wurden MG-63-GFP-Zellen hingegen im Differenzierungsmedium mit unstimulierten hMSCs ko-kultiviert, konnten höhere Werte im Vergleich zur stimulierten Gruppe (DM +IL-1β) nachgewiesen werden (kein Signifikanznachweis).

Auffällig ist hierbei die horizontale Spiegelung in der ALP-Genexpression. Während im Differenzierungsmedium kultivierte hMSCs (DM und DM +IL-1β) höchste Werte in der ALP-Genexpression zeigten, führte die Kultivierung im Kontrollmedium zu einer nur geringfügigen

Erhöhung (Abb. 19a und b). Im Gegensatz hierzu konnten höhere Genexpressionswerte in den im Kontrollmedium kultivierten Gruppen der MG-63-GFP-Zellen (CM und CM +IL-1 β) nachgewiesen werden. Die IL-1 β -Stimulation wies in den beiden Zelltypen – wenn diese im Kontrollmedium kultiviert worden waren – einen gegensätzlichen Effekt im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe auf (Abb. 19a und b sowie Abb. 25a und b).

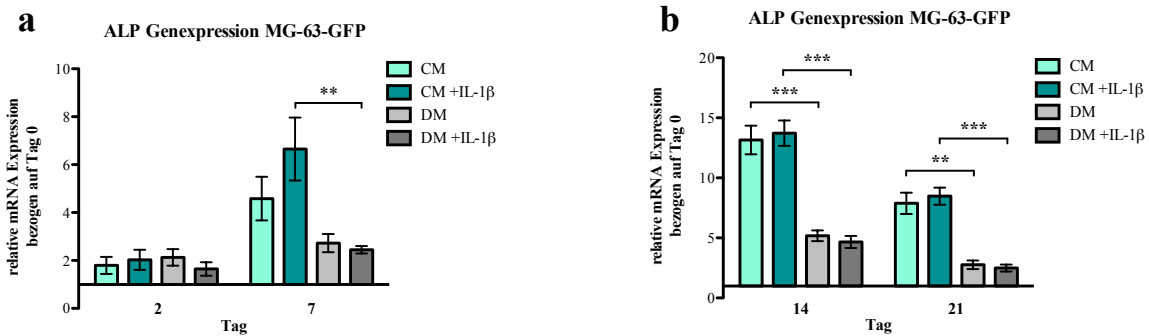


Abb. 25: Relative ALP-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in MG-63-GFP-Zellen normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n=9 pro Gruppe). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

3.5.3.4 Kollagen-Typ-1

Ein signifikanter Unterschied konnte hinsichtlich der Kollagen-Typ-1-Genexpression an Tag 2 zwischen den beiden Gruppen CM und CM +IL-1 β nachgewiesen werden ($p = 0,0121$). Im Gegensatz zu den genannten Gruppen wiesen MG-63-GFP-Zellen, die während des Versuches im Differenzierungsmedium kultiviert worden waren eine kontinuierliche Herunterregulation in der Kollagen-Typ-1-Genexpression über den gesamten Zeitraum auf.

Die Stimulation humaner MSCs hatte auf MG-63-GFP-Zellen im Differenzierungsmedium keinen Einfluss. Die Ko-Kultivierung MG-63-GFP-Zellen mit stimulierten hMSCs im Kontrollmedium führte hingegen zu einer stärkeren und vorzeitigeren Reaktion sowohl in Bezug auf ein Ansteigen (Tag 2) als auch ein Abfallen der Genexpression (Tag 7–21; Abb. 26a und b). Allen Gruppen gemein war jedoch der sinkende Genexpressionsverlauf über den Versuchszeitraum.

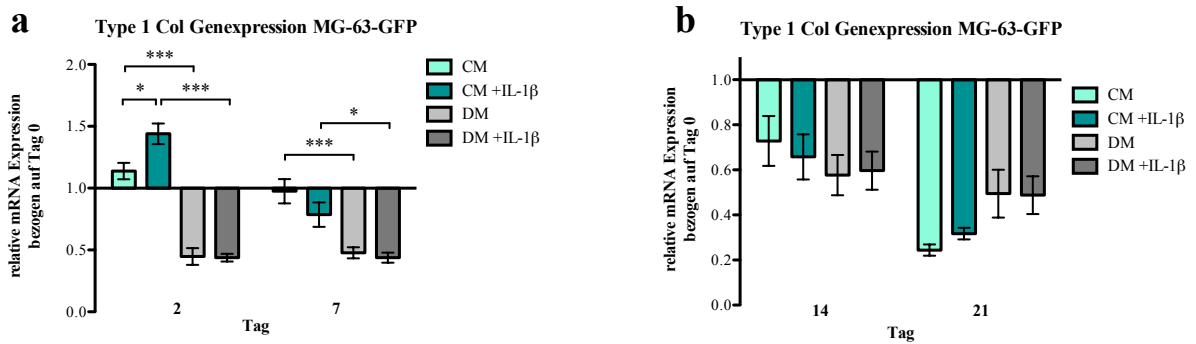


Abb. 26: Relative Typ-1-Col-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in MG-63-GFP-Zellen normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n=9 pro Gruppe). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

3.5.3.4 Osteocalcin

Die Osteocalcin-Genexpression zeigte in allen Gruppen einen abfallenden Verlauf mit Maximalwerten an Tag 7. In der Folge stiegen die Werte der Genexpression wieder an und wiesen ein Maximum der Werte an Tag 21 auf (Abb. 27a und b).

Im Vergleich zu Zellen der CM-Gruppe konnte in Zellen der Gruppe CM +IL-1 β ein früheres Ansprechen in der Änderung der Genexpression mit einem früheren Abfall an Tag 2 sowie vorzeitigem Anstieg an Tag 7 detektiert werden.

Die geringsten Werte zeigten Zellen der DM +IL-1 β Gruppe an Tag 2, 7 und 14 im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Während an Tag 2 und 14 in Zellen der beiden Kontrollgruppen CM und DM höhere Werte im Vergleich zur jeweiligen stimulierten Gruppe nachgewiesen werden konnten, war dieses Verhältnis an Tag 7 teilweise und an Tag 21 vollständig entgegengesetzt. MG-63-GFP-Zellen der CM +IL-1 β -Gruppe wiesen an Tag 7 signifikant höhere Werte im Vergleich zu Zellen der Gruppe DM +IL-1 β auf ($p < 0,01$).

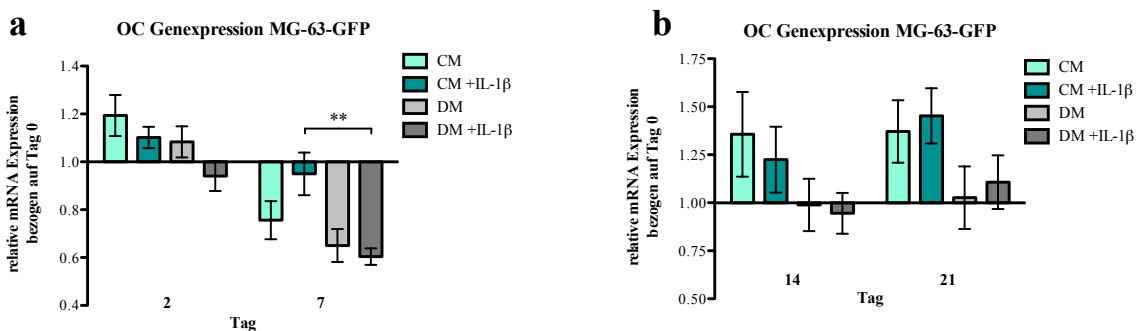


Abb. 27: Relative OC-mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM) in MG-63-GFP-Zellen normalisiert zur unstimulierten Kontrolle an Tag 0 in Bezug zum Referenzgen (RPLP0) von drei unterschiedlichen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe (n=9 pro Gruppe). **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21; ** $p \leq 0,01$

3.5.4 Runx2/Sox9-Quotient ko-kultivierter MG-63-GFP-Zellen

Die Kultivierung MG-63-GFP-Zellen im Differenzierungsmedium sowohl mit stimulierten als auch mit unstimulierten hMSCs führte zu einem höheren Runx2/Sox9-Quotienten im Vergleich zur Kultivierung im Kontrollmedium an allen getesteten Tagen (Abb. 28a und b).

MG-63-GFP-Zellen, welche mit stimuliertem hMSCs ko-kultiviert wurden, wiesen im Differenzierungsmedium durchgehend einen höheren Runx2/Sox9-Quotienten im Vergleich zum Kontrollmedium auf. An Tag 7 konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Während an Tag 2 noch höhere Quotienten in stimulierten Gruppen beider Kulturmedien detektiert werden konnten, war dieser Effekt noch nur noch in der DM+IL-1 β -Gruppe an Tag 7 und 14 vorhanden. An Tag 21 zeigten bei beiden Medien die Kontrollgruppen (CM und DM) höhere Quotienten.

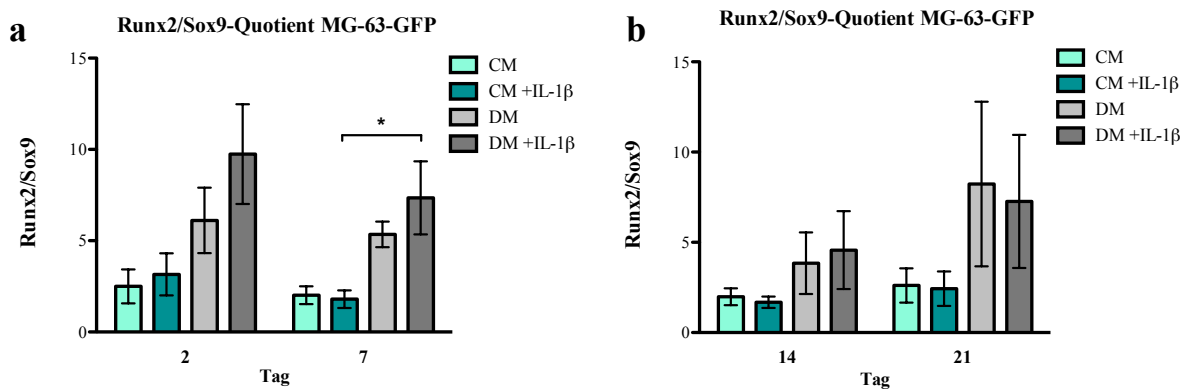


Abb. 28: Runx2/Sox9-Quotienten (Mittelwerte \pm SEM) in MG-63-GFP-Zellen von drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten pro Gruppe. **a)** Tag 2 und 7, **b)** Tag 14 und 21; * $p \leq 0,05$

4 DISKUSSION

Ausgedehnte knöcherne Substanzdefekte erfordern – unabhängig von ihrer zugrunde liegenden Pathogenese – neben einer notwendigen Ruhigstellung in korrekter anatomischer Ausrichtung der beteiligten Fragmente weitere Behandlungsschritte, um den knöchernen Defekt zu überbrücken und somit zur Defektrekonstruktion und Knochenregeneration beizutragen (92). Knöcherne Defektsituationen resultieren zum einen aus tumor- oder infektassoziierten operativen Resektionen/Eingriffen, können aber auch im Zusammenhang mit einer beeinträchtigten Frakturheilung auftreten. So tritt zum Beispiel bei etwa jedem 10. Patienten mit einer Fraktur eine verzögerte oder ausbleibende Frakturheilung auf, die weitere invasivere Behandlungsstrategien notwendig macht und eine große soziale sowie ökonomische Belastung darstellt (33).

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt stellt die autologe Knochentransplantation den Goldstandard in der Therapie kritischer knöcherner Defekte dar. Durch die limitierte Verfügbarkeit von autologem Knochen sowie der Gefahr von Hebedefektmorbidity ist die Entwicklung alternativer Behandlungsmöglichkeiten und -strategien erforderlich.

Die Verwendung alloplastischer Materialien stellt eine mögliche Behandlungsoption dar und wird zum Beispiel im Rahmen von dentoalveolären Knochenaugmentationen eingesetzt. Aufgrund der unterschiedlichen Nachteile – u.a. der fehlenden Osteoinduktion – (49) ist diese Anwendung auf die Therapie kleinerer Defekte limitiert.

Die Therapie mit knochenspezifischen Wachstumsfaktoren galt als Durchbruch in der Behandlung knöcherner Defekte, doch ist auch diese Therapieform mit z.T. schweren Nebenwirkungen verbunden (93).

Pro Jahr werden in Europa etwa eine Millionen chirurgische Knochenrekonstruktionen durchgeführt – mit steigender Tendenz (33). Daten aus den Vereinigten Staaten von Amerika beschreiben ebenfalls einen deutlichen Anstieg der jährlich stattfindenden Knochenrekonstruktionen aufgrund unterschiedlicher Indikationen (92). Die steigenden Zahlen verdeutlichen in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer und effizienterer Behandlungsstrategien.

Als eine mögliche Alternative in der Therapie ausbleibender Frakturheilung wird der Verwendung konzentrierter Knochenmarksaspirationen (*bone marrow aspirate concentrate* – BMAC) beschrieben (94). Positive Ergebnisse sind bisher in unterschiedlichen Studien an Tieren beschrieben worden (95). Eine Art Weiterentwicklung zum BMAC-Verfahren stellt die

Verwendung spezieller Anteile der Zellfraktion bzw. spezieller Zellarten wie z.B. von Stamm- bzw. Stromazellen oder Osteoblasten aus BMAC-Proben dar (96, 97).

Über die gezielte Selektion entsprechender Anteile der Zellfraktionen von Knochenmarksproben können Zellen isoliert und ggf. über anschließende Zellkulturen weiter differenziert und proliferiert werden. Aufgrund ihrer Multipotenz ist eine zielgerichtete Stimulation in Richtung einer osteogenen Differenzierung erforderlich, um ein Knochenwachstum zu unterstützen bzw. zu induzieren.

Seit Jahren wird die Existenz einer mesenchymalen Stammzelle als „Ursprungszelle“ kontrovers diskutiert. Denkbar wäre auch das Vorhandensein einer heterogenen Zusammensetzung von Zellen mit unterschiedlichem Reifegrad (Progenitorzellen sowie unterschiedliche Stadien entdifferenzierter Zellen) im Knochenmark, welche nach entsprechendem Stimulus in die Differenzierung einer bestimmten Zelllinie eintreten würden (52, 54). Eine zielgerichtete Stimulation dieser „Ursprungszelle“ sowie bereits „vordifferenzierter“ Stammzellen wäre somit durchaus möglich.

Die Effektivität von Stammzellstimulationen konnte bereits in verschiedenen Versuchen nachgewiesen werden. So veröffentlichte im Jahr 2012 die Gruppe um Lu et al. Ergebnisse über den weitreichenden Effekt einer Kurzzeitstimulation muriner Stammzellen mit dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1 (*Insulin-like growth factor* – IGF) unter ischämischen Bedingungen bei Myokardischämie (98).

Proinflammatorische Zytokine – allen voran das Interleukin-1 β –, welche in der initialen Phase der Frakturheilung ausgeschüttet werden, sind maßgeblich an der Zellantwort und der folgenden knöchernen Reparaturprozesse beteiligt (10, 20).

Während eine Vielzahl von Studien auf der Grundlage einer kontinuierlichen Applikation (3–28 Tage) von IL-1 β in humanen MSC-Kulturen basieren (22, 80, 81, 99) konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine zweistündige IL-1 β -Stimulation humaner MSCs bereits eine signifikante Veränderung des Genexpressionsmusters dieser Zellen hervorruft (100, 101).

Neben dem direkten Einfluss der IL-1 β -Stimulation auf die Differenzierung humaner MSCs, ist das Sekretom dieser stimulierten Zellen auf das umliegende Zellmilieu von großer Relevanz. So konnte in verschiedenen Studien belegt werden, dass die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen über eine parakrine Signalübertragung erheblichen Einfluss auf das angiogene Potential anderer Zellen ausübt (102, 103).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind die Auswirkungen einer gezielten osteogenen Differenzierung humaner MSCs auf periphere Zellen unklar. Eine zielgerichtete Beeinflussung

sowohl der mesenchymalen Stammzelle als auch umliegender Zellen offenbart jedoch vielversprechende Behandlungsoptionen im Rahmen moderner *tissue engineering* Ansätze.

Eine Kurzzeitstimulation von intraoperativ gewonnenen Knochenmarkszellen könnte in diesem Zusammenhang eine kostengünstigere und zeitlich umsetzbare Alternative für den klinischen Alltag im Gegensatz zu Langzeitstimulationsprotokollen kultivierter Zellen darstellen.

4.1 Einfluss der Kurzzeitstimulation von hMSCs auf mRNA-Ebene

Eine zweistündige Interleukin-1 β -Stimulation humaner MSCs führte in dieser Studie zu einer unmittelbaren Herunterregulierung von Genen, welche maßgeblich im Rahmen der Osteogenese exprimiert werden (Runx2, ALP und Typ-1-Kollagen). Zeitgleich konnte eine Hochregulierung der Sox9-Genexpression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Gruppe, bei der 48 Stunden nach einer zweistündigen Stimulation humaner MSCs mit IL-1 β eine signifikante Herabregulierung der mRNA-Expression der Knochenmarker Runx2 und Sox9 beobachtet wurde. Analog zu früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe konnten wir hier eine Donor-abhängige Variabilität der Sox9-Genexpression nachweisen (100).

Wieso es zu dieser früheren Herunterregulation kommt ist aktuell noch nicht vollständig geklärt. Bisherige Versuchsmodelle basieren häufig auf Zellversuchen, in denen die Zellen in einer Ein-Zell-Schicht (sog. *monolayer*) kultiviert wurden. Diese Ein-Zell-Schichten stehen jedoch im Kontrast zu der physiologischen Struktur z.B. eines Frakturhämatoms, welches eine dreidimensionale Ausrichtung aufweist und aus Zellen, Fibrinanteilen und weiteren Bestandteilen zusammengesetzt ist. Aus diesem Grund haben wir hier sog. hochverdichtete Zellhaufen verwendet, die einer natürlicheren 3D-Situation *in vivo* nachempfunden sind.

Hochverdichtete Zellhaufen aus Knochenmarkstammzellen zeigten bereits in *in vitro* Versuchen eine dem Knorpel ähnliche Entwicklung (104). Eine Herunterregulierung – wie wir sie initial nach einer IL-1-Stimulation nachweisen konnten – könnte also im Zusammenhang mit einer frühen Knorpelentwicklung stehen. Die Arbeitsgruppe um Mumme veröffentlichte Daten, die auf eine frühe und späte enchondrale Knochenentwicklung nach IL-1-Stimulation humaner Knochenmarkszellen hinweisen (22).

Denkbar wäre demnach, dass die initiale Herunterregulation mit der Initiierung einer Knorpelmatrix steht, welche im Verlauf durch weitere Genveränderungen kalzifizieren würde.

4.1.1 Veränderte Runx2/Sox9-Expression von hMSCs nach IL-1 β -Stimulation

Im Einklang mit anderen Daten unserer Arbeitsgruppe ist die Veränderung der Genexpression maßgeblich von der Reaktion der Zellen des jeweiligen Spenders abhängig. Insgesamt konnte unsere Arbeitsgruppe aber ein ähnliches Expressionsmuster der Zellen unterschiedlicher Spender nachweisen (100).

Runx2 wird als ein entscheidender Transkriptionsfaktor in der Differenzierung von Osteoblasten und der Bildung von Knochengewebe angesehen (5, 105). Im Anschluss an die Herunterregulation durch die IL-1 β -Stimulation humaner MSCs konnten wir einen deutlichen Anstieg nachweisen, was auf eine osteogene Differenzierung hinweist.

Interessanterweise erfuhr hingegen die Genexpression des Sox9 – ein Transkriptionsfaktor der im Zusammenhang mit der Chondrogenese und der chondralen Knochenbildung steht – zu Beginn eine erhöhte Expression und erst im Verlauf eine starke Herunterregulierung. Die Veränderung der Genexpression ist bisher in dieser Form nicht beschrieben worden und verdeutlicht zum einen die Effektivität der Kurzzeitstimulation auf mRNA-Ebene, zum anderen könnte die im Verlauf auftretende Herunterregulation ebenfalls als Indiz für eine osteogene Ausrichtung gelten.

Neben der eigentlichen Genexpression der einzelnen Gene (Runx2 und Sox9) gilt v.a. das Zusammenspiel der Runx2- und Sox9-Genexpression als entscheidender Faktor in der direkten Knochenbildung (105, 106). Die hier beschriebene Stimulation humaner MSCs durch das Interleukin-1 β hatte einen deutlichen Einfluss auf die Genexpression sowohl des Transkriptionsfaktors Runx2 als auch des Sox9, besonders zu frühen Zeitpunkten (Tag 2 und 7) nach der Stimulation.

Während stimulierte hMSCs nicht nur eine deutliche Hochregulation der Runx2-Genexpression im Kontrollmedium (CM +IL-1 β) an Tag 2 und 21 und im Differenzierungsmedium (DM +IL-1 β) an Tag 2 aufwiesen, führte die Stimulation der hMSCs parallel zu einer starken Herunterregulation der Sox9-Genexpression.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Murakami et al. in murinen Chondrozyten (83) und durch Wehling et al. bei humanen MSCs beschrieben (82). Die Herunterregulation der Sox9-Genexpression konnte zudem in Zellen der nicht-stimulierten Gruppe nachgewiesen werden, welche im Differenzierungsmedium (DM) kultiviert wurden und steht im Einklang mit Ergebnissen früherer Arbeiten (106).

Das Runx2/Sox9-Verhältnis wurde erst kürzlich als ein wichtiger frühzeitiger Indikator für die Empfindlichkeit humaner knochenmarksspezifischer MSCs hinsichtlich ihres osteogenen Differenzierungspotentials beschrieben (106). Durch die Erhöhung der Runx2-Expression in Verbindung mit einer parallel abnehmenden Sox9-Expression IL-1 β -stimulierter hMSCs konnten wir in dieser Arbeit ein höheres Runx2/Sox9-Verhältnis sowohl in Kulturen mit Differenzierungs- als auch im Kontrollmedium zu frühen Zeitpunkten nachweisen (Höchstwerte in der DM +IL-1 β -Gruppe an Tag 2). Diese Veränderungen weisen auf eine frühe osteogene Ausrichtung der mRNA-Expression nach IL-1-Stimulation hin.

Während Loebel et al. das Runx2/Sox9-Verhältnis am 7. Tag als relevanten Prädiktor für eine osteogene Entwicklung beschrieben (106), bestätigen die hier präsentierten Daten den 2. Tag als ebenfalls aussagekräftigen Zeitpunkt. Auf die Frakturheilung *in vivo* übertragen verdeutlichen diese Ergebnisse die Bedeutung der initialen Phase der Heilungskaskade. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass eine Kurzzeitstimulation humaner MSCs einen vorgezogenen positiven Einfluss auf die Frakturheilung ausüben würde.

Stimulierte Zellen, die im Kontrollmedium kultiviert wurden, zeigten im Verlauf (Tag 14 und 21) ein höheres Runx2/Sox9-Verhältnis als stimulierte Zellen im Differenzierungsmedium. Eine entsprechende Erklärung für dieses Verhalten wäre, dass diese Zellen eine verzögerte, spontane Differenzierung durchlaufen und dementsprechend erst im Verlauf veränderte mRNA-Werte aufweisen würden.

4.1.2 Einfluss der IL-1 β -Stimulation von hMSCs auf Gene der Osteoblastendifferenzierung

Im Rahmen der Osteoblastendifferenzierung können anhand der Genexpression drei unterschiedliche Phasen voneinander abgegrenzt werden: (1) eine Proliferationsphase, (2) eine Phase der Entwicklung der Extrazellulärmatrix sowie (3) eine Phase der Mineralisation des gebildeten Matrixgerüsts (5, 107). Während der Differenzierung zu Osteoblasten exprimieren prä-osteoblastische Zellen im Verlauf der entsprechenden Phasen verschiedene Gene (z.B. Kollagen-Typ-1), welche sowohl die Proliferation als auch die Bildung extrazellulärer Matrixproteine vermitteln (5).

Die Kollagen-Typ-1-Genexpression wird normalerweise in der Proliferationsphase hochreguliert und ist für die Bildung eines Fibrillengeflechts verantwortlich, welches anschließend das Grundgerüst für die Extrazellulärmatrix bildet.

In unserer Studie bestätigte die Kollagen-Typ-1-Genexpression die positive Wirkung der IL-1 β -Stimulation hinsichtlich der Induzierung einer osteogenen Differenzierung humaner MSCs in

beiden Kulturmedien. Die Kultivierung stimulierter hMSCs im Kontrollmedium führte zu einem frühzeitigeren und höheren Anstieg der Kollagen-Typ-1-Genexpression im Vergleich zu stimulierten Zellen im Differenzierungsmedium.

Die ALP-Genexpression hingegen wird in der frühen Phase der Matrixsynthese hochreguliert, erreicht um den 14. Tag das Maximum und vermittelt die Reifung und Mineralisierung des Matrixgerüsts (107). Mit dem Einsetzen der Matrixmineralisation wird die Genexpression des Osteocalcins induziert, welches als Marker für differenzierte/ausgereifte Osteoblasten angesehen wird. Die vorausgegangene Bildung der Matrix ist somit eine wesentliche Voraussetzung für die anschließende Genexpression des Osteocalcins (107). Die Auswirkung der IL-1 β -Stimulation auf die ALP-Genexpression hMSCs ist in diesem Zusammenhang bisher nicht endgültig geklärt.

Obwohl in unseren Untersuchungen an Tag 2 ein leichter Unterschied in der Hochregulierung der stimulierten Gruppen nachweisbar war (CM +IL-1 β und DM +IL-1 β), war dieser Trend über die Zeit nicht reproduzierbar. Insgesamt zeigten Zellen, die im Differenzierungsmedium kultiviert wurden über den gesamten Verlauf eine höhere ALP-Genexpression im Vergleich zu Zellen im Kontrollmedium und spiegelten einen ähnlichen Trend wider, wie er von Lian und Stein bereits beschrieben wurde (107).

Während die mRNA-Expression von Kollagen-Typ-1 und ALP einen dynamischen Verlauf aufwies, zeigte die Osteocalcin-Expression einen über die gesamte Zeit negativen Verlauf. Der Grund für die durchgehende Herunterregulierung der Osteocalcin-Genexpression aller Gruppen während des gesamten Experiments könnte an einem zu frühen Zeitpunkt der Genanalyse liegen. Lian und Stein veröffentlichten diesbezüglich Ergebnisse von *in vitro* Differenzierungsstudien an murinen Zellen, welche ein Expressionsmaximum um den 20. Tag nachwies (107). Möglich wäre in diesem Zusammenhang ein abweichendes Expressionsmuster von Zellen unterschiedlichen Ursprungs (murin vs. human). Dies würde erklären, warum alle vier Gruppen ein vergleichbares Expressionsmuster über die Zeit aufwiesen.

Darüber hinaus bezweifeln Jaiswal et al. zudem die Zuverlässigkeit des Osteocalcins als aussagekräftigen Marker für die osteogene Differenzierung in Zellkulturen. Demnach würde das im Differenzierungsmedium enthaltene Dexamethason einen hemmenden Effekt auf die Osteocalcin-mRNA-Expression ausüben und zudem Rückschlüsse erschweren (89).

Insgesamt waren die Veränderungen in der Genexpression aller getesteten Gene nicht nur zu frühen Zeitpunkten nachweisbar – wie sie auch von Czekanska et al. beschrieben wurden (100) – sondern konnten in den hier beschriebenen Versuchen bis zum 21. Tag in humanen MSC-Zellkulturen bestätigt werden.

Diese Ergebnisse waren bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt völlig unbekannt. Sie verdeutlichen, dass auch eine kurze Stimulation humaner MSCs prinzipiell ausreicht, um eine Veränderung auf Genebene für mehrere Wochen zu induzieren. Bislang war lediglich eine starke Induzierung der Differenzierung humaner MSCs in Richtung eines osteoblastischen Phänotyps während mehrtägiger kontinuierlicher IL-1 β -Stimulation durch unterschiedliche Arbeitsgruppen beschrieben worden (22, 81, 99).

Interessanterweise waren in unseren Versuchen die Auswirkungen der induzierten Differenzierung von hMSCs in Richtung einer osteogenen Differenzierung über die Zeit auch bereits nach einer zweistündigen Stimulation detektierbar.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte jedoch beachtet werden, dass die vorteilhafte Wirkung der IL-1 β -Kurzzeitstimulation besonders zu frühen Zeitpunkten nach Intervention deutlich wird. Der Einfluss der Stimulation erfolgt demnach während eines kritischen und entscheidenden Zeitpunktes der Knochenheilung (Anfangsphase).

4.2 Einfluss der IL-1 β -Stimulation von hMSCs auf Proteinebene

Neben Veränderungen auf mRNA-Ebene untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Zytokinspiegel im Medium stimulierter hMSCs. Die Stimulation mit IL-1 β hatte eine starke Auswirkung sowohl auf die Proteinsynthese als auch auf die Sekretion von Proteinen humaner MSCs, die Einfluss auf die Chemotaxis, Inflammation, Angiogenese und Knochenbildung ausüben (100). Diese Ergebnisse weisen auf einen Effekt sowohl auf der Genebene wie auch auf der Proteinebene von humanen MSCs nach IL-1 β -Stimulation hin.

4.2.1 Auswirkung der IL-1 β -Stimulation auf den Gesamt-DNA-Gehalt

Die hier aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen, dass auch eine Kurzzeitstimulation von zwei Stunden keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate humaner MSCs zur Folge hat. Im Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen konnte kein Nachweis einer reduzierten Zellüberlebensrate nach IL-1 β -Stimulation humaner MSCs beobachtet werden. Loebel et al. bestätigten zudem, dass eine kontinuierliche Applikation von IL-1 β über mehrere Tage zu einer Erhöhung des Gesamt-DNA-Gehaltes humaner MSCs in Zellkulturen führte (99). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte die Gruppe um Gowen eine Zunahme der Proliferation humaner Knochenzellen belegen, wenn diese in IL-1-haltigem Medium kultiviert worden waren (108). Darüber hinaus wurde eine Abhängigkeit des DNA-Gehaltes in Verbindung mit dem vorliegenden Kulturmedium deutlich. Die Kultivierung im Differenzierungsmedium führte zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamt-DNA-Gehaltes in

humanen MSC-Kulturen (DM und DM +IL-1 β). Der positive Effekt der Bestandteile des Differenzierungsmediums auf die Proliferation und damit den DNA-Gehalt ist diesbezüglich bereits beschrieben worden (109). Die bisherigen Ergebnisse basieren jedoch einheitlich auf der kontinuierlichen Applikation von IL-1 β .

4.2.2 Erhöhte ALP-Aktivität bei beeinträchtigter Kalziumeinlagerung

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird als eine Art „Indikator“ in der osteoblastischen Zelldifferenzierung gesehen (82, 107), die Maximalwerte bereits während früher Stadien der Matrixreifung erreicht (110).

Die Kurzzeitstimulation humaner MSCs mit IL-1 β führte in unseren Versuchen zu einer Erhöhung der ALP-Aktivität. Dieser Effekt war besonders deutlich, wenn die Zellen im Differenzierungsmedium kultiviert wurden und sind kongruent mit veröffentlichten Ergebnissen, die eine Induktion der ALP-Aktivität in Zellkulturen unter dem Einfluss von Dexamethason beschreiben (109, 111).

In der Vergangenheit wurden Versuche durchgeführt, welche die Auswirkungen beider Substanzen im Einzelnen untersuchten. Bemerkenswerterweise konnten Ferreira et al. jedoch keine Veränderungen der ALP-Aktivität in IL-1 β -stimulierten hMSCs (ohne zusätzliche Dexamethasontherapie) im Vergleich zu hMSCs nachweisen, die lediglich mit Dexamethason kultiviert wurden. Dies könnte zum einen durch die Langzeitkultivierung/Stimulation mit dem Interleukin erklärt werden. Zum anderen erfolgte die Kultivierung in diesen Experimenten in einer Ein-Zell-Schicht und nicht wie hier beschrieben in einer dreidimensionalen Zellformation, welche einen anderen Einfluss auf die Zelldifferenzierung ausübt (84, 104).

Die Quantifizierung des eingelagerten radioaktiven ⁴⁵Ca ergab geringfügig niedrigere Werte in stimulierten Zellgruppen beider Behandlungsmedien im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Ähnliche Ergebnisse konnten hinsichtlich der ARS-Quantifizierung nachgewiesen werden. Dieser Effekt kann nicht durch eine hemmende Interaktion zwischen dem Dexamethason und dem IL-1 β erklärt werden, da die Wirkung sowohl im Kontroll- als auch im Differenzierungsmedium auftrat. Darüber hinaus wurde hinsichtlich der Kalziumeinlagerung eine additive Wirkung der Kombination von Dexamethason und IL-1 β beschrieben, wenn IL-1 β kontinuierlich appliziert wurde (99).

Ferreira et al. kamen zu ähnlichen Resultaten, als sie die Kalziumeinlagerung von Zellen untersuchten, die entweder in einem Kulturmedium kultiviert wurden, welches entweder mit Dexamethason oder 10 ng/ml IL-1 β supplementiert worden war. Die IL-1 β -Stimulation führte zu einer geringeren Kalziumeinlagerung in Zellkulturen nach 21 Tagen im Vergleich zur

Dexamethasongruppe. Dieser Effekt war zudem dosisabhängig: 10 ng/ml IL-1 β führte zu deutlich höheren Mengen an eingelagertem Kalzium im Vergleich zu 0,01 ng/ml IL-1 β (84).

Bei der Interpretation der hier aufgeführten Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass die Bestimmung der Kalzium-45-Einlagerung an Tag 21 erfolgte und demnach eine Momentaufnahme des ablaufenden Mineralisationsprozesses darstellt. Dieser individuell sehr unterschiedliche Prozess erlaubt nur eine Aussage über eine Kalzium-45-Aufnahme zu einem bestimmten Zeitpunkt (hier der 21. Tag der Zellkultur). Er kann zu Fehlinterpretationen führen, da eine vorzeitig einsetzende und damit bereits abgeschlossene Mineralisation eine geringere Kalziumaufnahme aufweisen würde, als ein aktuell ablaufender Kalzifikationsprozess. Der quantitative und qualitative Vergleich der ARS-Färbung hingegen beschreibt die Gesamtkalzifikation der Zellkultur.

Der qualitative Vergleich der ARS-Färbung zeigte einen klaren Unterschied zwischen beiden verwendeten Kulturmedien. Während Zellkulturen im Kontrollmedium keine ARS-Färbung aufwiesen, zeigten Zellkulturen im Differenzierungsmedium eine starke Färbung – dies lässt sich primär durch die Bestandteile des Differenzierungsmediums erklären.

Für eine effektive Kalzifikation bedarf es sowohl der Ascorbinsäure als auch dem Glycerolphosphat – beides Bestandteile, welche nur im Differenzierungsmedium vorliegen. Hinsichtlich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen konnte hingegen kein klarer Unterschied zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Gruppen nachgewiesen werden.

Folgt man der Erklärung von Ferreira et al. bedarf es einer kontinuierlichen IL-1 β -Anwendung von mindestens 14 Tagen um eine Induzierung der Mineralisation zu erreichen (84). Diese Vermutung könnte eine Erklärung für die reduzierten Werte der ⁴⁵Ca-Einlagerung sowie der ARS-Quantifizierung darstellen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Sonomoto et al. und Loebel et al. veröffentlicht, die das IL-1 β für 10 oder 28 Tage kontinuierlich verabreichten um einen deutlichen Unterschied nachweisen zu können (81, 99).

4.3 Auswirkung stimulierter hMSCs auf ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen

4.3.1 Stimulierte hMSCs evozieren Genveränderung in MG-63-GFP-Zellen
MG-63-GFP-Zellen, die unter dem Einfluss stimulierter hMSCs standen, zeigten eine stärkere Reaktion in der Kollagen-Typ-1-Genexpression an Tag 2 im Kontrollmedium (CM +IL-1 β) im Vergleich zu Zellen der Differenzierungsgruppen (DM und DM +IL-1 β). Im Verlauf der Experimente kam es zu einer Abnahme der Kollagen-Typ-1-Genexpression und einem

zeitgleichen Anstieg der ALP-Genexpression in MG-63-GFP-Zellen, welche mit stimulierten hMSCs im Kontrollmedium ko-kultiviert worden waren (CM +IL-1 β).

Beginnend ab Tag 14 führte die Ko-Kultivierung sowohl mit stimulierten als auch unstimulierten hMSCs zu einem Anstieg in der Osteocalcin-Genexpression in Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie (CM und CM +IL-1 β). Diese Effekte konnten entweder nicht oder nur in leichter Ausprägung nachgewiesen werden wenn die Zellen im Differenzierungsmedium ko-kultiviert worden waren (DM und DM +IL-1 β).

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Veränderung auf Genexpressionsebene können zwei verschiedene Effekte voneinander abgegrenzt werden.

1. Differenzierte hMSCs (Kultivierung im Differenzierungsmedium mit konsekutiver Hochregulation der mRNA von Runx2, ALP und Kollagen-Typ-1 bei paralleler Herunterregulation der Sox9-mRNA) wiesen eine deutliche Beeinträchtigung der Fähigkeit auf, ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen in ihrer Differenzierung zu beeinflussen bzw. zu stimulieren.

2. Die Stimulation und anschließende Kultivierung humaner MSCs im Kontrollmedium (CM +IL-1 β) rief eine weniger starke osteogene Differenzierung dieser Zellen hervor, erhielt damit jedoch zeitgleich ihre Fähigkeit regulatorisch bzw. stimulierend auf ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen einzuwirken und somit das Genexpressionsmuster dieser Zellen entscheidend zu beeinflussen.

Bemerkenswert ist zudem, dass die hier beschriebene Kollagen-Typ-1-, ALP- sowie Osteocalcin-Genexpression der MG-63-GFP-Zellen in Ko-Kultur mit hMSCs im Vergleich zu bereits veröffentlichten Ergebnissen (112) wesentlich höhere Werte aufwiesen. Gründe hierfür könnten sowohl die dreidimensionale Architektur der Zellenformation sowie die Ko-Kultur mit humanen MSCs sein, die zu einer vermehrten Stimulation der Zellen dieser Zelllinie führt und somit die Veränderung der Genexpression hervorruft.

4.3.2 Osteogene Differenzierung MG-63-GFPs unter dem Einfluss stimulierter hMSCs

Der Gesamt-DNA-Gehalt von MG-63-GFP-Zellkulturen, die mit stimulierten hMSCs im Differenzierungsmedium ko-kultiviert wurden (DM +IL-1 β), war deutlich geringer als in der Kontrollgruppe (DM). Dieser Effekt war nur nachweisbar, wenn die Zellen im Differenzierungsmedium kultiviert wurden.

In Versuchen mit dieser Osteosarkomzelllinie beschrieben Dedhar et al. eine Abhängigkeit in der Regulation der Expression von Zelladhäsionsrezeptoren – hauptsächlich von Integrinen –, eine erhöhte ALP-Aktivität sowie eine beeinträchtigte Zellproliferation im Zusammenhang mit einer

direkten IL-1 β -Stimulation von MG-63-Zellen. Dedhar et al. schlussfolgerten daraus, dass der Stimulus in erster Linie Zellen mit einer hohen Proliferationsrate inhibieren würde und es somit zu einer Verlagerung in Richtung eines differenzierteren Osteoblastenphänotypen käme. Diese würde dann zu einer höheren Aktivität der ALP führen (113).

In den hier beschriebenen Experimenten wurden nur humane MSCs mit dem Interleukin IL-1 β stimuliert, nicht jedoch ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen. Die Erkenntnisse von Dedhar et al. sind hinsichtlich der Auswirkung einer IL-1 Stimulation auf humane MSCs dennoch sehr aufschlussreich. Czekanska et al. konnten in diesem Zusammenhang eine Hochregulation der IL-1 β -Genexpression 72 Stunden nach Stimulation humaner MSCs mit IL-1 β detektieren (100). Eine Sekretion von IL-1 β wäre demnach sehr wahrscheinlich und würde unsere Ergebnisse in Bezug auf die Erkenntnisse Dedhar's erklären.

Czekanska et al. beschrieben in früheren Arbeiten ebenfalls eine niedrige ALP-Aktivität mit einem Maximum der Enzymaktivität am 28. Tag in MG-63-GFP-Ein-Zell-Schicht-Zellkulturen, die in einem osteogenen Medium kultiviert worden waren (112). Die von uns bestimmte ALP-Aktivität zeigte ihr Aktivitätsmaximum um den 14. Tag, mit einem anschließenden Absinken um den 21. Tag. Diese Ergebnisse korrespondieren mit dem ALP-Genexpressionsmuster, welches ebenfalls um den 14. Tag Höchstwerte in MG-63-GFP-Zellenkulturen aufwies (Kontrollmedium). Die Ko-Kultivierung der MG-63-GFP-Zellen mit stimulierten hMSCs führte in der Folge zu einem früheren ALP-Aktivitätspeak in MG-63-GFP-Zellen im Vergleich zu anderen Gruppen. Der frühere ALP-Peak im Zusammenhang mit der Genexpression deutet auf eine gesteigerte bzw. vorgezogene osteogene Differenzierung der MG-63-GFP-Zellen hin, welche im Zusammenhang mit der dreidimensionalen Zellformation sowie dem Einfluss der parakrinen Sekretion der ko-kultivierten hMSCs steht.

Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang der Nachweis eines entgegengesetzten ALP-Genexpressionsmusters im Vergleich zwischen humanen MSCs und MG-63-GFP-Zellen. Während im Differenzierungsmedium kultivierte hMSCs die höchste ALP-Genexpression aufwiesen, zeigten MG-63-GFP-Zellen eine starke Hochregulation der ALP-Genexpression auf wenn diese im Kontrollmedium kultiviert worden waren. MG-63-GFP-Zellen, welche im Differenzierungsmedium kultiviert wurden zeigten lediglich einen leichten Anstieg.

Neben der erwähnten Beobachtung konnte ein zusätzlicher Effekt der \pm IL-1 β -Behandlung nachgewiesen werden. Stimulierte hMSCs (CM +IL-1 β) zeigten ein gegensätzliches Expressionsmuster im Vergleich zu MG-63-GFP-Zellen (Ko-Kulturviert CM +IL-1 β hMSCs). Der gleiche Effekt war zwischen unstimulierten hMSCs im Kontrollmedium (CM) und MG-63-

GFP-Zellen (CM) nachweisbar. Eine Hochregulierung der ALP-Genexpression in hMSCs (+IL-1 β) führte zu einer Herabregulation der MG-63-GFP ALP-Genexpression und umgekehrt.

Eine erhöhte ALP-Expression kann in diesem Zusammenhang als eine „vermehrte“ osteogene Differenzierung betrachtet werden.

In diesem Fall verdeutlicht das reziproke Expressionsmuster von hMSCs und MG-63-GFPs das komplexe Zusammenspiel beider Zellen. Kam es durch die Stimulation zu einer Differenzierung der hMSCs, wurde dadurch ein „hemmender“ Effekt auf ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen ausgeübt. Erfuhren die hMSCs hingegen keine Stimulation blieb eine osteogene Differenzierung aus und eine erhöhte ALP-Expression in MG-63-GFP-Zellen mit einer entsprechend ausgeprägteren osteogenen Ausrichtung war die Folge.

4.3.3 Kalzifikation von MG-63-GFP-Zellen durch Zellkommunikation?

Trotz der deutlichen Auswirkung auf der Genexpressionsebene sowie der ALP-Aktivität in MG-63-GFP-Zellen, welche mit hMSCs im Kontrollmedium ko-kultiviert wurden, konnte keine Kalzifikation nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass ein wichtiger Baustein zur weiteren Differenzierung von MG-63-GFP-Zellen fehlt, der nicht durch die parakrine Aktivität der humanen, ko-kultivierten Stammzellen bereitgestellt wird. Im Gegensatz hierzu konnte in MG-63-GFP-Zellen eine suffiziente Kalzifikation nachgewiesen werden, wenn diese im Differenzierungsmedium mit hMSCs ko-kultiviert worden waren.

Dies ist insofern überraschend, als man bisher davon ausging, dass eine Kalzifikation von MG-63-GFP-Zellen nicht möglich sei. Bereits veröffentlichte Studien machten in diesem Zusammenhang eine verringerte Proteinsynthese in Kombination mit einer erniedrigten ALP-Aktivität für eine insuffiziente Matrixreifung verantwortlich. Dies hätte eine ausbleibende Kalzifikation der MG-63-GFP-Zellen zur Folge (86, 112). Zwar konnte eine dichte Zellschicht aus MG-63-Zellen im Differenzierungsmedium einer Monolayer-Zellkultur nachgewiesen werden, jedoch waren auch nach 28 Tagen der Zellkultur keine Anzeichen einer Kalziumabscheidung nachweisbar (112, 114).

In den hier beschriebenen Versuchen konnten wir eine klare Matrix-Mineralisation am 28. Tag im Differenzierungsmedium (DM und DM +IL-1 β) nachweisen, die unseres Wissens in dieser Form bisher nicht beschrieben wurde.

Ein Grund für diese Mineralisation könnte die unterschiedliche Formation der Zellverbände sein. Während die meisten veröffentlichten Arbeiten Ein-Zell-Schichten verwenden, basieren unsere Versuche auf einem 3D-Zellmodell, welches die *in vivo* Situation unserer Ansicht nach deutlich besser widerspiegelt.

In bisher nicht veröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe war es jedoch nicht möglich, in 3D-Zellhaufen von MG-63-GFP-Zellen eine Mineralisation hervorzurufen, wenn eine zeitgleiche Ko-Kultivierung mit hMSCs ausblieb (unveröffentlichte Daten von Czekanska et al.). Unter Berücksichtigung der hier verwendeten Ko-Kulturen mit unstimulierten oder stimulierten hMSCs wäre es auch möglich, dass unter dem Einfluss indirekter Zellkommunikation (zwischen MG-63-GFP-Zellen und hMSCs), MG-63-GFP-Zellen mit der Einlagerung von Kalzium beginnen würden. Diese Überlegung stützt sich auf die Tatsache, dass nur Bereiche mit ARS eingefärbt werden konnten, die sich direkt unter den hMSC-Zellhaufen befanden. Dementsprechend wären hMSCs für die Initiierung einer Mineralisation von MG-63-GFP-Zellen (mit-)verantwortlich.

Eine mögliche Erklärung hierfür liefern sekretierte Moleküle der humanen MSCs, die die Membran der Zellkulturböden passieren und durch die ausübende Schwerkraft auf die direkt darunter befindlichen MG-63-GFP-Zellen sinken, anstatt frei im Medium verteilt zu flotieren. Somit würden nur die MG-63-GFP-Zellen durch das sog. Sekretom humaner MSCs stimuliert bzw. beeinflusst werden, welche sich direkt unterhalb der hMSC-Zellformation befinden. Während sich lösliche parakrine Substanzen gleichmäßig im Medium verteilen sind sogenannte extrazelluläre Vesikel eine mögliche Erklärung für das beschriebene Phänomen.

Extrazelluläre Vesikel beinhalten Proteine, mRNA sowie microRNA und nehmen eine entscheidende Rolle in der parakrinen Stammzellaktivität ein (115, 116). Zu den extrazellulären Vesikeln werden sogenannte Exosomen und Mikrovesikel gezählt. Exosomen weisen einen Durchmesser von 30–100 nm auf und sind endozytischen Ursprungs. Mikrovesikel sind mit einem Durchmesser zwischen 100 nm–1 μ m deutlich größer und werden direkt von der Zellmembran abgeschieden (115, 116). Die Vesikel von sich osteogen-differenzierenden hMSCs wären in der Lage, die Poren der Membran zu passieren, direkt auf die darunter liegenden Zellverbände der MG-63-GFP-Zellen zu sinken und dort ihre Wirkung auszuüben.

Der Aufbau der Zell-Ko-Kultur stellt die *in vivo* Bedingungen in einem stark vereinfachten Modell dar. Eine Form des „Absinkens“ parakriner Stoffe im Frakturhämatom eines lebenden Organismus ist sehr unwahrscheinlich. Dennoch verdeutlicht die Reaktion der Osteosarkomzellen in diesem Zusammenhang die Bedeutsamkeit der interzellulären Kommunikation und Stimulation.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Stimulation humaner MSCs sowie die Ko-Kultivierung mit Zellen der MG-63-GFP-Zelllinie in unterschiedlichen Kulturmedien zeigten verschiedene Auswirkungen:

1. Die IL-1 β -Kurzzeitstimulation humaner MSCs und anschließende Kultivierung in osteogenem Medium ermöglichte die Induzierung einer osteogenen Differenzierung dieser Zellen.
2. Die eingeleitete Differenzierung humaner MSCs beeinträchtigte gleichzeitig die Fähigkeit, ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen in ihrer weiteren Differenzierung zu beeinflussen.
3. Die Stimulation humaner MSCs und folgende Kultivierung im Kontrollmedium resultierte hingegen in einem undifferenzierten Zellstadium und erhielt somit die Fähigkeit, ko-kultivierte MG-63-GFP-Zellen in ihrem Differenzierungsverhalten zu dirigieren bzw. zu beeinflussen.
4. Neben Zell-Zell-Kontakten scheinen indirekte Zell-Interaktionen durch die Sekretion eines breiten Spektrums an Zytokinen und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der Zelldifferenzierung des umliegenden Zellmilieus zu spielen.

Lange Zeit wurde bisher das Ziel verfolgt, Einfluss auf die eigentliche Differenzierung der Stammzelle zu nehmen. Heutzutage gewinnt jedoch immer mehr die Modulation des umliegenden Zellmilieus an Bedeutung.

Eine zweistündige Kurzzeitstimulation humaner mesenchymaler Stammzellen mit dem proinflammatorischen Interleukin-1-beta hatte nachweislich einen eindeutigen Effekt sowohl auf die Differenzierung der Stammzellen selbst, als auch auf das Potential dieser Zellen, umliegende, ko-kultivierte Osteosarkomzellen in ihrer Differenzierung zu beeinflussen. Obwohl die Versuche zu dieser Arbeit an einer geringen Fallzahl an Stammzellspendern durchgeführt wurden, verdeutlichen die Ergebnisse das enorme Potential einer kurzzeitigen Zellstimulation *in vitro*.

Langfristig wäre in diesem Zusammenhang eine Stammzelltherapie denkbar, die direkt im Rahmen eines klinischen Umfelds Anwendung findet und auf der Stimulation von intraoperativ gewonnenem Material beruht. Die Zellgewinnung, Kurzzeitstimulation sowie anschließende Re-Implantation der stimulierten Zellen wären ein denkbares Verfahren um aufwendige, teure und fehleranfällige Langzeitzellkultivierungen zu ersetzen. Um diese interessante Form des *tissue engineering* weiter zu entwickeln und zu optimieren bedarf es jedoch weiterer Versuche mit translationaler Übertragung und entsprechenden *in vivo* Modellen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Welsch U, Sobotta J. Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie; Elsevier, Urban & Fischer; 2006.
2. Drenckhahn D. Anatomie: Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
3. AOFoundation.
http://www.aovideo.ch/~aoelearn/aot_launch/aot_bh/lib/launch.html?bone_healing.
4. Wolf JH. [Julis Wolff and his "law of bone remodeling"]. Orthopade. 1995;24(5):378-86.
5. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. Cell Tissue Res. 2011;343(2):289-302.
6. Hill PA. Bone remodelling. Br J Orthod. 1998;25(2):101-7.
7. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: Thieme; 2012.
8. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem : LernAtlas der Anatomie: Thieme; 2005.
9. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. Eur Cell Mater. 2008;15:53-76.
10. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury. 2005;36(12):1392-404.
11. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? Mech Dev. 1999;87(1-2):57-66.
12. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem. 2003;88(5):873-84.
13. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br. 1978;60-B(2):150-62.
14. Willenegger H, Perren SM, Schenk R. [Primary and secondary healing of bone fractures]. Chirurg. 1971;42(6):241-52.
15. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998(355 Suppl):S7-21.
16. Probst A, Spiegel HU. Cellular mechanisms of bone repair. J Invest Surg. 1997;10(3):77-86.

17. Perren SM, Rahn B, Cordey J. [Mechanics and biology of fracture healing]. *Fortschr Kiefer Gesichtschir.* 1975;19:33-7.
18. Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med.* 2000;28(9 Suppl):S77-80.
19. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res.* 1999;14(11):1805-15.
20. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res.* 1995;10(8):1272-81.
21. Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003;3(4):297-303; discussion 20-1.
22. Mumme M, Scotti C, Papadimitropoulos A, Todorov A, Hoffmann W, Bocelli-Tyndall C, Jakob M, Wendt D, Martin I, Barbero A. Interleukin-1beta modulates endochondral ossification by human adult bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater.* 2012;24:224-36.
23. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2001;16(6):1004-14.
24. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Mielau T, 3rd, Marcucio RS. Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res.* 2010;28(6):778-84.
25. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, Einhorn TA. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(3):285-94.
26. Gowen M. *Cytokines and Bone Metabolism*: Taylor & Francis; 1991.
27. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature.* 1985;315(6021):641-7.
28. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J.* 1994;8(15):1314-25.
29. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, White MR, Dinarello CA, Apte RN. IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol.* 2011;187(9):4835-43.
30. Murphy K. *Janeway's Immunobiology, Eighth Edition*: Garland Science; 2011.
31. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(6):940-56.

32. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012;7(10):1918-29.
33. Gomez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone.* 2015;70:93-101.
34. Mills LA, Simpson AH. The relative incidence of fracture non-union in the Scottish population (5.17 million): a 5-year epidemiological study. *BMJ Open.* 2013;3(2).
35. Zura R, Xiong Z, Einhorn T, Watson JT, Ostrum RF, Prayson MJ, Della Rocca GJ, Mehta S, McKinley T, Wang Z, Steen RG. Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. *JAMA Surg.* 2016:e162775.
36. Hernandez RK, Do TP, Critchlow CW, Dent RE, Jick SS. Patient-related risk factors for fracture-healing complications in the United Kingdom General Practice Research Database. *Acta Orthop.* 2012;83(6):653-60.
37. Kanakaris NK, Giannoudis PV. The health economics of the treatment of long-bone non-unions. *Injury.* 2007;38 Suppl 2:S77-84.
38. Lonie S, Herle P, Paddle A, Pradhan N, Birch T, Shayan R. Mandibular reconstruction: meta-analysis of iliac- versus fibula-free flaps. *ANZ J Surg.* 2016;86(5):337-42.
39. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS, Vaccaro AR, Albert TJ. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2003;28(2):134-9.
40. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3(3):192-5.
41. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res.* 1996(329):300-9.
42. Elsalanty ME, Genecov DG. Bone grafts in craniofacial surgery. *Craniofacial Trauma Reconstr.* 2009;2(3):125-34.
43. Bhatt RA, Rozental TD. Bone graft substitutes. *Hand clinics.* 2012;28(4):457-68.
44. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res.* 1989(238):249-81.
45. Kesemenli C, Subasi M, Kirkgoz T, Kapukaya A, Arslan H. Treatment of traumatic bone defects by bone transport. *Acta Orthop Belg.* 2001;67(4):380-6.
46. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408.
47. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S324-35.

48. Pape HC, Evans A, Kobbe P. Autologous bone graft: properties and techniques. *J Orthop Trauma*. 2010;24 Suppl 1:S36-40.
49. Al-Nawas B, Schiegnitz E. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Oral Implantol*. 2014;7 Suppl 2:S219-34.
50. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*. 2005;85(2):635-78.
51. Bulgin D, Hodzic E, Komljenovic-Blitva D. Advanced and prospective technologies for potential use in craniofacial tissues regeneration by stem cells and growth factors. *J Craniofac Surg*. 2011;22(1):342-8.
52. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001;105(7):829-41.
53. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16(3):381-90.
54. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
55. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-50.
56. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217(2):318-24.
57. Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck RL, Semino CE, Stoddart MJ. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater*. 2013;25:248-67.
58. Odabas S, Elcin AE, Elcin YM. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 2014;1109:47-63.
59. Harichandan A, Buhring HJ. Prospective isolation of human MSC. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(1):25-36.
60. Colnot C. Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17(6):449-57.
61. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*. 2008;129(3):163-73.
62. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.

63. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-13.
64. Bara JJ, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: Implications for basic research and the clinic. *Stem Cells*. 2014.
65. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):11-5.
66. Lin CS, Xin ZC, Dai J, Lue TF. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histol Histopathol*. 2013;28(9):1109-16.
67. Whitney MJ, Lee A, Ylostalo J, Zeitouni S, Tucker A, Gregory CA. Leukemia inhibitory factor secretion is a predictor and indicator of early progenitor status in adult bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(1):33-44.
68. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
69. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
70. Clause KC, Liu LJ, Tobita K. Directed stem cell differentiation: the role of physical forces. *Cell Commun Adhes*. 2010;17(2):48-54.
71. Caplan AI. New era of cell-based orthopedic therapies. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009;15(2):195-200.
72. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995;18(12):1417-26.
73. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998;176(1):57-66.
74. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 1998;16(4):406-13.
75. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:605-31.
76. Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol*. 2010;222(2):268-77.

77. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006;98(5):1076-84.
78. Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol.* 2013;4:201.
79. Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noel D, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(7):392-9.
80. Ding J, Ghali O, Lencel P, Broux O, Chauveau C, Devedjian JC, Hardouin P, Magne D. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sci.* 2009;84(15-16):499-504.
81. Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. Interleukin-1beta induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. *Arthritis Rheum.* 2012;64(10):3355-63.
82. Wehling N, Palmer GD, Pilapil C, Liu F, Wells JW, Muller PE, Evans CH, Porter RM. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. *Arthritis Rheum.* 2009;60(3):801-12.
83. Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3687-92.
84. Ferreira E, Porter RM, Wehling N, O'Sullivan RP, Liu F, Boskey A, Estok DM, Harris MB, Vrahas MS, Evans CH, Wells JW. Inflammatory cytokines induce a unique mineralizing phenotype in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. *J Biol Chem.* 2013;288(41):29494-505.
85. Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, De Somer P. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977;12(1):11-5.
86. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater.* 2012;24:1-17.
87. Czekanska E. In vitro cell and culture models for osteoblast and their progenitors [Ph.D. Thesis]. Wales: Cardiff University; 2014.
88. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(2):413-9.

89. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997;64(2):295-312.
90. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
91. Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem.* 1980;102(2):344-52.
92. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN, American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological I. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98-103.
93. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J.* 2011;11(6):471-91.
94. Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(7):896-902.
95. Gianakos A, Ni A, Zambrana L, Kennedy JG, Lane JM. Bone Marrow Aspirate Concentrate in Animal Long Bone Healing: An Analysis of Basic Science Evidence. *J Orthop Trauma.* 2016;30(1):1-9.
96. Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK, Im SA, Won YD, Sung YB, Jeon TS, Chang CH, Jang JD, Lee SB, Kim HC, Lee SY. A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast(Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord.* 2009;10:20.
97. Liebergall M, Schroeder J, Mosheiff R, Gazit Z, Yoram Z, Rasooly L, Daskal A, Khoury A, Weil Y, Beyth S. Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: a randomized and prospective preliminary study. *Mol Ther.* 2013;21(8):1631-8.
98. Lu G, Ashraf M, Haider KH. Insulin-like growth factor-1 preconditioning accentuates intrinsic survival mechanism in stem cells to resist ischemic injury by orchestrating protein kinase calpha-erk1/2 activation. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(3):217-27.
99. Loebel C, Czekanska EM, Staudacher J, Salzmann G, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. The calcification potential of human MSCs can be enhanced by interleukin-1beta in osteogenic medium. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014.
100. Czekanska EM, Ralphs JR, Alini M, Stoddart MJ. Enhancing inflammatory and chemotactic signals to regulate bone regeneration. *Eur Cell Mater.* 2014;28:320-34.
101. Overman JR, Farre-Guasch E, Helder MN, ten Bruggenkate CM, Schulten EA, Klein-Nulend J. Short (15 minutes) bone morphogenetic protein-2 treatment stimulates osteogenic

- differentiation of human adipose stem cells seeded on calcium phosphate scaffolds in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(3-4):571-81.
102. Bara JJ, McCarthy HE, Humphrey E, Johnson WE, Roberts S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells become antiangiogenic when chondrogenically or osteogenically differentiated: implications for bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(1-2):147-59.
103. Hoch AI, Binder BY, Genetos DC, Leach JK. Differentiation-dependent secretion of proangiogenic factors by mesenchymal stem cells. *Plos One*. 2012;7(4):e35579.
104. Muraglia A, Corsi A, Riminucci M, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Bianco P, Quarto R. Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 14):2949-55.
105. Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet*. 2003;19(8):458-66.
106. Loebel C, Czekanska EM, Bruderer M, Salzmann G, Alini M, Stoddart MJ. In Vitro Osteogenic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Is Predicted by Runx2/Sox9 Ratio. *Tissue Eng Part A*. 2014.
107. Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J*. 1995;15:118-40.
108. Gowen M, Wood DD, Russell RG. Stimulation of the proliferation of human bone cells in vitro by human monocyte products with interleukin-1 activity. *J Clin Invest*. 1985;75(4):1223-9.
109. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*. 2000;21(11):1095-102.
110. Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteoprogenitors] to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng*. 2007;13(9):2311-20.
111. Park JB. The effects of dexamethasone, ascorbic acid, and beta-glycerophosphate on osteoblastic differentiation by regulating estrogen receptor and osteopontin expression. *J Surg Res*. 2012;173(1):99-104.
112. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(8):2636-43.
113. Dedhar S. Regulation of expression of the cell adhesion receptors, integrins, by recombinant human interleukin-1 beta in human osteosarcoma cells: inhibition of cell proliferation and stimulation of alkaline phosphatase activity. *J Cell Physiol*. 1989;138(2):291-9.

114. Dedhar S, Mitchell MD, Pierschbacher MD. The osteoblast-like differentiated phenotype of a variant of MG-63 osteosarcoma cell line correlated with altered adhesive properties. *Connect Tissue Res.* 1989;20(1-4):49-61.
115. De Jong OG, Van Balkom BW, Schiffelers RM, Bouten CV, Verhaar MC. Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine. *Front Immunol.* 2014;5:608.
116. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-83.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Jan Oliver Voß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Einfluss der Interleukin-1 β -Kurzzeitstimulation humaner mesenchymaler Stammzellen in Ko-Kulturen mit Osteosarkomzellen*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Dr. med. Jan Oliver Voß hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

VOSS, J. O., LOEBEL, C., BARA, J. J., FUSSINGER, M. A., DUTTENHOEFER, F., ALINI, M. & STODDART, M. J. 2015. Effect of Short-Term Stimulation with Interleukin-1beta and Differentiation Medium on Human Mesenchymal Stromal Cell Paracrine Activity in Coculture with Osteoblasts. *Biomed Res Int*, 2015, 714230

Beitrag im Einzelnen:

- eigenständige Planung und Durchführung sämtlicher *in vitro* Zellversuche sowie deren Analysen und statistischen Auswertungen
- Erstellung und Einreichung des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

PUBLIKATIONSLISTE

2016

PATERKA, M.*, VOSS, J. O.*, WERR, J.*, REUTER, E., FRANCK, S., LEUENBERGER, T., HERZ, J., RADBRUCH, H., BOPP, T., SIFFRIN, V. & ZIPP, F. 2016. Dendritic cells tip the balance towards induction of regulatory T cells upon priming in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun.*

* These authors contributed equally to this work

VOSS, J. O., HARTWIG, S., DOLL, C., HOFFMEISTER, B., RAGUSE, J. D. & ADOLPHS, N. 2016. The "tight orbit": Incidence and management of the orbital compartment syndrome. *J Craniomaxillofac Surg.*

VOSS, J. O., DIEKE, T., DOLL, C., SACHSE, C., NELSON, K., RAGUSE, J. D. & NAHLES, S. 2016. Retrospective long-term analysis of bone level changes after horizontal alveolar crest reconstruction with autologous bone grafts harvested from the posterior region of the mandible. *J Periodontal Implant Sci*, 46, 72-83.

RAGUSE, J. D., CZABANKA, M., VOSS, J. O., HARTWIG, S., VAJKOCZY, P., VOSS, P. & DOLL, C. 2016. The lower trapezius island myocutaneous flap in tunnelled technique to cover complicated tissue defects located between the craniocervical and cervicothoracic junction following spinal surgery. *J Craniomaxillofac Surg.*

HARTWIG, S., DOLL, C., VOSS, J. O. & RAGUSE, J. D. 2016. Severe tooth loss after root damage caused by predrilled intermaxillary fixation screw: a case report. *Dent Traumatol.*

DOLL, C., NAHLES, G., VOSS, J. O., SACHSE, C., NELSON, K., DAMASKOS, W. & NAHLES, S. 2016. Age-Related Changes of the Orolabial Region in Caucasian Women: An Anthropometric Analysis. *J Oral Maxillofac Surg.*

HARTWIG, S., DOLL, C., VOSS, J. O., HERTEL, M., PREISSNER, S. & RAGUSE, J. D. 2016. Treatment of Wound Healing Disorders of Radial Forearm Free Flap Donor Sites Using Cold Atmospheric Plasma: A Proof of Concept. *J Oral Maxillofac Surg.*

HARTWIG, S., BOETTNER, A., DOLL, C., VOSS, J. O., HERTEL, M., PREISSNER, S. & RAGUSE, J. D. 2016. Drill-related root injury caused by intraoperative intermaxillary fixation. An analysis of 1067 screw-applications. *Dent Traumatol.*

2015

VOSS, J. O., VARJAS, V., RAGUSE, J. D., THIEME, N., RICHARDS, R. G. & KAMER, L. 2015b. Computed tomography-based virtual fracture reduction techniques in bimaxillary fractures. *J Craniomaxillofac Surg.*

VOSS, J. O., LOEBEL, C., BARA, J. J., FUSSINGER, M. A., DUTTENHOEFER, F., ALINI, M. & STODDART, M. J. 2015. Effect of Short-Term Stimulation with Interleukin-1beta and Differentiation Medium on Human Mesenchymal Stromal Cell Paracrine Activity in Coculture with Osteoblasts. *Biomed Res Int*, 2015, 714230.

PATERKA, M.*, SIFFRIN, V.*, **VOSS, J. O.***, WERR, J.*, HOPPMANN, N., GOLLAN, R., BELIKAN, P., BRUTTGER, J., BIRKENSTOCK, J., JUNG, S., ESPLUGUES, E., YOGEV, N., FLAVELL, R. A., BOPP, T. & ZIPP, F. 2015. Gatekeeper role of brain antigen-presenting CD11c+ cells in neuroinflammation. *EMBO J.*

*** These authors contributed equally to this work**

VOSS, J. O., RAGUSE, J. D., HOFFMEISTER, B. & ADOLPHS, N. 2015a. Magnetic resonance imaging induced acute midfacial pain - incidental finding of a dislocated dental bur. *European journal of oral implantology*, 8, 183-7.

DANKSAGUNG

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater PD Dr. Dr. Jan-Dirk Raguse für die fortwährende Förderung und Ermutigung, die klinischen Anregungen sowie für die Möglichkeit zur Durchführung der Doktorarbeit im fernen Davos.

Außerdem möchte mich ganz besonders bei meinem Betreuer Prof. Dr. Martin Stoddart bedanken, welcher mir die gesamte Zeit über mit seinen Ideen und Anregungen, seiner konstruktiven Kritik und seinem umfassenden Fachwissen zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich Dr. Jennifer Bara, Dalila Petta, Dr. Christian Doll und Dr. Stefan Hartwig für den freundschaftlichen und kollegialen Austausch danken.

Darüber hinaus möchte ich meinem guten Freund Dr. Gernot Lang von ganzem Herzen danken. Die vielen gemeinsamen Stunden auf den Gebirgspfaden in den Davoser Bergen, bei Trainingseinheiten oder während andauernder Versuchsreihen im Labor waren Motivation, Zuspruch und Ansporn.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer und tiefer Dank meiner Frau und meinen Eltern für ihre durchweg uneingeschränkte Unterstützung, für ihr Vertrauen sowie für ihr unglaubliches Verständnis, welches sie mir über all die Jahre entgegen gebracht haben.