

Aus dem
Julius Wolff Institute for Biomechanics and Musculoskeletal Regeneration
CharitéCentrum Orthopädie und Unfallchirurgie CC 9
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Direktor: Prof. Dr. Georg N. Duda

Habilitationsschrift

Der Einfluss des Immunsystems auf die regenerativen Vorgänge der Knochenheilung

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek

Eingereicht: Januar 2019
Dekan: Prof. Dr. A.R. Pries
1. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Ignatius, Ulm
2. Gutachter/in: Prof. Dr. H.-C. Pape, Zürich

Inhalt

Abkürzungen.....	3
1. Einleitung.....	4
Knochen.....	5
Knochenheilung.....	6
Interaktion von Knochen- und Immunzellen.....	8
Wechselwirkungen von Immunsystem und Regeneration.....	8
Ziel der Arbeit.....	9
2. Eigene Arbeiten.....	10
Vergleich einer narbig ausheilenden Muskelverletzung mit einer regenerativ heilenden Knochenverletzung in der initialen Heilungsphase.....	10
Schmidt-Bleek et al., 2009.....	12
Eine zeitgerechte Beendigung der pro-inflammatorischen Phase ermöglicht die Revaskularisierung als notwendigen Schritt zur erfolgreichen Heilung.....	17
Schmidt-Bleek et al., 2014.....	18
Revaskularisierung ein wichtiger Schritt in der Heilungskaskade.....	29
Lienau und Schmidt-Bleek et al., 2009.....	30
Gibt es Immunzellsubpopulationen, die sich auf die Heilung negativ auswirken?.....	38
Schmidt-Bleek et al., 2012.....	39
Der Einfluss der CD8 positiven T Zellen auf die Knochenheilung.....	46
Reinke et al., 2013.....	47
3. Diskussion.....	57
Bedeutung der Osteoimmunologie:.....	57
Bedeutung des adaptiven Immunsystems in der Knochenheilung.....	57
Immunmodulation als neue Therapieoption.....	65
Ursache und Wirkung.....	66
Herausforderung an Modellsysteme.....	67
Ausschalten des adaptiven Immunsystems? Warum ist dies keine gute Idee?.....	68
Wie hat sich das Bild der Knochenheilung in den letzten Jahren verändert.....	68
Wie könnten zukünftige Therapien aussehen?.....	70
Perspektive.....	70
4. Zusammenfassung.....	72
5. Literaturangaben.....	73
Danksagung.....	79
Erklärung.....	80

Abkürzungen

Ang	Angiopoietin
aSMA	alpha smooth muscle actin
ATP	Adenosin tri Phosphat
BMP	bone morphogenetic protein
CYR61	cysteine-rich angiogenic inducer 61
FGF2	fibroblast growth factor 2
GLUT1	Glukosetransporter 1
HIF1a	hypoxia inducible factor 1 alpha
HMOX1	heme oxygenase 1
IFNg	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL1b	Interleukin 1beta
MCSF	macrophage colony stimulating factor
MMP	matrix metalloproteinase
NAC	N-Acetylcystein
OAF	osteoclast-activating factor
OPG	Osteoprotegerin
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RAG	recombination activation gene
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
SPF	specific pathogen free
Std.	Stunde
TGFb	transforming growth factor beta
TLRs	toll like receptors
TNFa	tumor necrosis factor alpha
Treg	regulatorische T Zelle
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von Willbebrand Faktor

1. Einleitung

In den letzten 100 Jahren hat sich die durchschnittliche Lebenserwartung stetig erhöht (1), in Deutschland von ungefähr 40 Jahren am Ende des 19. Jahrhunderts auf etwa 80 Jahren heutzutage. Weltweit stieg die Lebenserwartung von 65,3 Jahren 1990 auf 71,5 Jahre 2013 (2). Für die Verbesserung der Lebenserwartung war zunächst eine Verbesserung der Hygiene verantwortlich. Durch die Entwicklung von künstlichem Dünger wurde der landwirtschaftliche Ertrag gesteigert und folglich konnten Hungersnöte mit tödlichen Folgen vermindert werden. Ein dritter entscheidender Faktor zur Verbesserung der Lebenserwartung waren die Entdeckung der Antibiotika und die Erkenntnisse der Immunisierung durch Impfung, was erheblich zur Reduzierung der Kindersterblichkeit beitrug. Diese Errungenschaften erhöhten die Lebenserwartung während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts entscheidend. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts setzte sich die Erhöhung der Lebenserwartung weiter fort, allerdings verschoben sich die Ursachen dafür. Die infektiösen Krankheiten als Todesursache traten in den Hintergrund und die degenerativen Erkrankungen gewannen an Bedeutung. Eine Verbesserung der diagnostischen und therapeutischen medizinischen Versorgung der Patienten mit degenerativen Erkrankungen steht nun im Vordergrund einer Erhöhung der Lebenserwartung in industriellen Ländern (3).

Für die Forschung ist es wichtig, schon heute die Themen zu adressieren, die in der nahen Zukunft eine Herausforderung an die medizinische Versorgung darstellen werden. Welches also sind gesundheitsrelevante Themen, die jetzt der Analyse und Untersuchung bedürfen, damit zukünftige Probleme bewältigt werden können?

1. Verbesserungen im Gesundheitssystem führen zwar weltweit zur Erhöhung der Lebenserwartung, allerdings gibt es auch immer noch Krankheiten, die die Lebenserwartung verschlechtern. Zu ihnen gehören Diabetes, chronische Nierenerkrankungen und muskuloskeletale Funktionsstörungen (2). – Muskuloskeletale Erkrankungen sind die häufigste Ursache für Invalidität, noch vor den Herz-Kreislauf- und Atemwegserkrankungen (4). Die Untersuchung und Erforschung der Verbesserung der Knochenheilung und Knochenregeneration ist also ein wichtiges Feld der Forschung, auch im Hinblick darauf, dass aktuell trotz einer exzellenten medizinischen Versorgung etwa 10% aller Knochenverletzungen zu einer verzögerten oder ausbleibenden Heilung führen (5).
2. Die Europäische Union ist zurzeit in Bezug auf die demografische Alterung am weitesten fortgeschritten (6). Der Anteil der älteren Bevölkerung nimmt auch weiterhin stark zu (7). In Verbindung mit der erhöhten Mobilität und Aktivität älterer Menschen steigt der Anteil der muskuloskeletalen Patienten, die die Klinik zukünftig sehen wird, weiter an (8-10). – Die alternde Bevölkerung und damit der „alte“ Patient sollte daher einen Fokus der zukünftigen Forschung bilden.
3. Knochen wird klassisch als inerte Struktur betrachtet, die für Form und Beweglichkeit unerlässlich ist. Kalziumspeicher und hämatopoetische Nische sind weitere bekannte Funktionen des Knochens. Die Erkenntnis, dass es eine sehr enge Verknüpfung des Knochen- und Immunsystems im Hinblick auf die Knochenformation gibt, ist noch nicht sehr lange bekannt, erst im Jahre 2000 wurde der Begriff der Osteoimmunologie geprägt (11). Die Osteoimmunologie ist daher ein junges, aktuelles Forschungsfeld.

Diese drei Aspekte bieten die Motivation für die in dieser Habilitationsschrift zusammengeführte Forschung: Die Wechselwirkungen des Knochensystems und der adaptiven Immunität, die maßgeblich durch die Antigenerfahrung und damit durch das Altern verändert wird, beeinträchtigen die Knochenheilung und sind ein noch junges Forschungsfeld, in dem aussichtsreiche zukünftige Therapieoptionen möglich scheinen. Daraus ergibt sich die Fragestellung dieser Habilitationsarbeit: Wie beeinflusst das Immunsystem die regenerativen Vorgänge der Knochenheilung.

Knochen

Knochen wurde lange als inertes Stützgewebe angesehen. Dabei ist der Knochen ein physiologisch sehr aktives Organ. Neben seiner Stütz- und Schutzfunktion (Schädel schützt das Hirn, Rippen schützen Herz und Lunge) ist der Knochen ein Speicherorgan für u.a. Kalzium und Phosphat, er ist das Organ, welches die Hämatopoese beherbergt; Knochen ist außerdem ein hormonelles Organ, involviert in die Prozesse der Glukosetoleranz und des Testosteronhaushaltes (12). In seiner Funktion als Endoskelett vereint Knochengewebe bemerkenswerte Belastbarkeit mit Leichtigkeit und Stabilität mit Elastizität. Dies wird durch seine Zusammensetzung ermöglicht, die zu 20-25% aus organischer, zu 60-70% aus anorganischer Substanz und zu 20-25% aus Wasser besteht. Die organische Substanz besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und der Hauptbestandteil der anorganischen Substanz sind Kalziumsalze in Form von Hydroxyapatit.

Das Organ Knochen setzt sich zusammen aus der mineralisierten Matrix, der Knochensubstanz in der die Osteozyten liegen (Abbildung 1 B, C). Diese Knochensubstanz entsteht, wenn knochenbildende Osteoblasten Osteoid synthetisieren und ablagern (Abbildung 1 A). Osteoid besteht zu einem großen Teil aus Kollagen I, an dessen Fibrillen sich das Hydroxyapatit anlagert. Während dieses Vorganges werden einige Osteoblasten in die Matrix eingemauert und differenzieren dort zu Osteozyten aus. Die reifen Osteozyten liegen in Lakunen, welche untereinander durch ein Netzwerk von Kanälen, den Kanalikuli, verbunden sind (Abbildung 1 C). So stehen die Osteozyten miteinander in Verbindung und können mechanische Verformungen des Knochens „spüren“ und darauf reagieren. Der Knochen passt sich so ständig seiner mechanischen Belastung an und unterliegt dabei einem fortwährenden Auf- und Abbau-Prozess. Neben den knochenaufbauenden Osteoblasten und -zyten spielen dabei die Osteoklasten als knochenabbauende Zellen eine wichtige Rolle im Remodeling-Prozess (Abbildung 1 D).

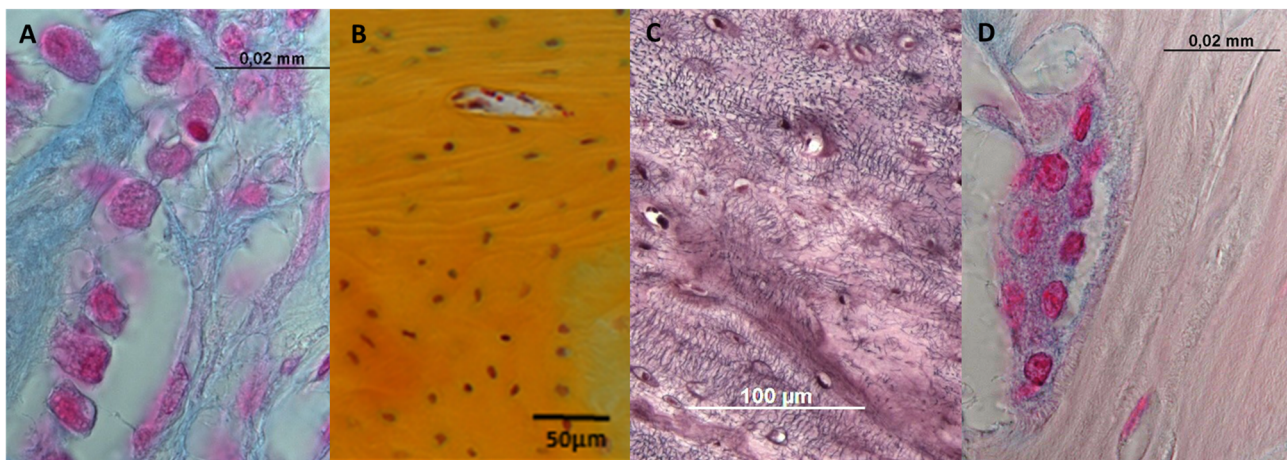


Abbildung 1: A) Sichtbar sind die auf der Knochenoberfläche palisadenartig angeordneten Osteoblasten in einer Alcian Blau Färbung. B) Lamellärer Knochen einer Maus ist in einer Movat Pentachrom Färbung dargestellt, in der Knochengewebe gelb erscheint. Deutlich sichtbar sind die in der Matrix eingebetteten Osteozyten; C) Wird der kortikale Knochen mit einer Bodian Färbung bearbeitet, werden die Kanalikuli sichtbar, die die Osteozytenlakunen miteinander verbinden; D) Osteoklasten liegen auf der Knochenoberfläche auf, hier an der Grenze zum Knochenmarkskanal, dargestellt in einer Alcian Blau Färbung. Deutlich zu erkennen ist, dass diese Zelle um ein Vielfaches größer ist als Osteoblast und Osteozyt und dass es sich hierbei um eine mehrkernige Zelle handelt. Unter dem Osteoklasten, an der Grenze zum lamellären Knochen ist die Resorptionszone erkennbar, die Howship-Lakune. (Histologische Präparate von Maus-Femurknochen, in Anlehnung an (13).)

Die mineralisierte Matrix wird von der Knochenhaut umgeben, an der Außenseite ist dies das Periost, zum Markkanal hin das Endost. Die Knochenhaut besteht aus zwei Schichten, dem Stratum fibrosum und dem Stratum cambium. Im letzteren befinden sich zahlreiche Vorläuferzellen, die speziell für die Knochenheilung wichtig sind. Die Knochenhaut ist auch für das Dickenwachstum des Knochens verantwortlich. In der Markhöhle verlaufen zahlreiche Gefäße, hier findet die Hämatopoese statt und

hier befinden sich auch die mesenchymalen Stamm-/ Stromazellen, denen ein großes Potential bei der Knochenformation zugeschrieben wird, da sie pluripotent und damit auch Vorläufer für knochenbildende Zellen sind.

Der lange Röhrenknochen unterteilt sich in unterschiedliche Zonen, die Diaphyse, die Metaphyse und die Epiphyse (Abbildung 2), wobei die Diaphyse kortikalen Knochen aufweist und zu den Knochenenden trabekulärer Knochen auftritt. Unter der Epiphyse liegt die Epiphysenfuge, die Wachstumsfuge, über die das Knochenlängenwachstum erfolgt. Hier liegt ein typischer knorpeliger Saum. Säulenartig angeordneter hyaliner Knorpel wird sukzessiv zu hypertrophem Knorpel, dieser atrophiert und wird durch neugeformte Knochenbälkchen abgelöst (Abbildung 2).

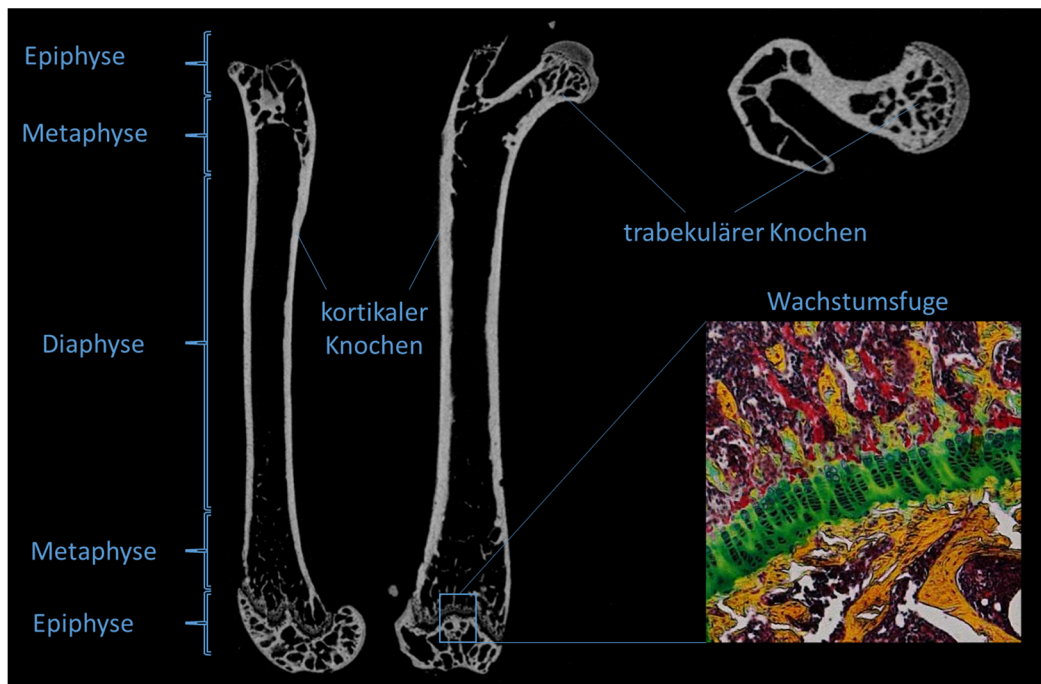


Abbildung 2: Ein langer Röhrenknochen, der Femur einer Maus, ist hier in einer micro-computertomografischen Aufnahme in drei Ebenen dargestellt. Das mineralisierte Gewebe ist hier erkennbar. Die unterschiedlichen Zonen des Knochens sind eingezeichnet, sowie der trabekuläre und kortikale Knochen. Die Wachstumsfuge im Femur der Maus ist in einer Movat Pentachrome Färbung dargestellt. Die Knorpelzone erscheint grün. Gut zu erkennen ist die säulenartige Anordnung der Knorpelzellen. Die Größe der Knorpelzellen nimmt zur Diaphyse hin zu, der großblasige Knorpel ist ein Anzeichen dafür, dass der Knorpel hypertroph wird. Im Anschluss ist die gute Vaskularisierung (rot) erkennbar, die zwischen den neugebildeten Knochenbälkchen (gelb) sichtbar ist. Das Knochenmark erscheint dunkel violett.

Das Säugerskelett ist aus mehr als 200 Knochen aufgebaut, die sich in ihrer Form und Größe stark unterscheiden. Dabei wird die Knochenform stark von der mechanischen Belastung und damit von seiner Funktion beeinflusst. Eine starke Beanspruchung des Knochens resultiert in einem Zuwachs der Knochensubstanz (14, 15). Diese Tatsache wurde erstmals von Julius Wolff (1836-1902) erkannt, der daraufhin das Wolffsche Gesetz formulierte: Das Gesetz der Transformation der Knochen – 1892 (16). Kurz zusammengefasst könnte man sagen: Die Form folgt der Funktion.

Knochenheilung

Die Knochenheilung ist ein vielphasiger Prozess, an dem unterschiedliche Gewebe (Knochen, Knochenhaut, Knochenmark, Gefäße, angrenzende Muskulatur), eine Vielzahl von Zellen (Immunzellen, Knochenzellen, Fibroblasten; Vorläuferzellen) und ein streng reguliertes Muster an Signalstoffen beteiligt ist. Läuft dieser Prozess ungestört ab, so ist er sehr erfolgreich und mündet in einer vollständigen Wiederherstellung von Form und Funktion des verletzten Gewebes. Der Knochen ist damit zur Regeneration fähig.

Ein so komplexer Prozess ist allerdings auch sehr anfällig für Störfaktoren, die in allen Schritten der Knochenheilung den Vorgang beeinträchtigen und ihn damit verlangsamen oder ganz zum Erliegen

bringen können. Dies erklärt den hohen Anteil an Heilungsstörungen in der Klinik – was auch damit zusammenhängt, dass eine solche Störung klinisch oft erst durch eine ausbleibende Mineralisierung, die erst im Röntgenbild erkennbar ist, diagnostizierbar ist, obwohl die Störung schon viel früher auftrat (17). Mit den derzeit verfügbaren Verfahren sind Diagnostik und Therapie nicht hinreichend gerüstet, um frühe Heilungsstörungen und – verzögerungen zu behandeln bzw. vorzubeugen. Die einzelnen Knochenheilungsphasen laufen dabei sequentiell und auch teilweise überlappend ab (Abbildung 3). Die Heilung beginnt mit der unmittelbar nach der Verletzung einsetzenden Hämatom- und Entzündungsphase. Durch die Zerreißung von Gefäßen wird die Gerinnungskaskade aktiviert und phylogenetisch bedingt damit auch eine pro-inflammatorische Reaktion (18). Diese inflammatorische Reaktion ist für die Initiierung der Heilungskaskade wichtig (19), die hier ausgeschütteten Zytokine dienen der Rekrutierung der Zellen, die für die Heilung notwendig sind. Es folgt eine Granulationsphase, vom zellulären Bild liegen hier Fibroblasten vor und eine Revaskularisierung des Verletzungsgebietes hat begonnen. Dann erfolgt eine Transformation und ein weicher Kallus wird gebildet, er stellt ein Übergangsgewebe dar, welches relativ schnell synthetisiert werden kann und dem verletzten Knochen eine gewisse mechanische Kompetenz zurückgibt. Dieser Kallus besteht aus avaskulärem Knorpel. Anschließend hypertrophiert der Knorpel dieses weichen Kallus, seine Matrix mineralisiert, es kommt zur erneuten Gefäßeinsprossung und es entsteht ein harter Kallus durch die Ablagerung von Geflechtknochen. In der anschließenden Remodeling Phase wird nun der Knochen umgebaut und den mechanischen Belastungen angepasst. Geflechtknochen wandelt sich in Lamellenknochen um und die ursprüngliche Knochenform wird wiederhergestellt (20).

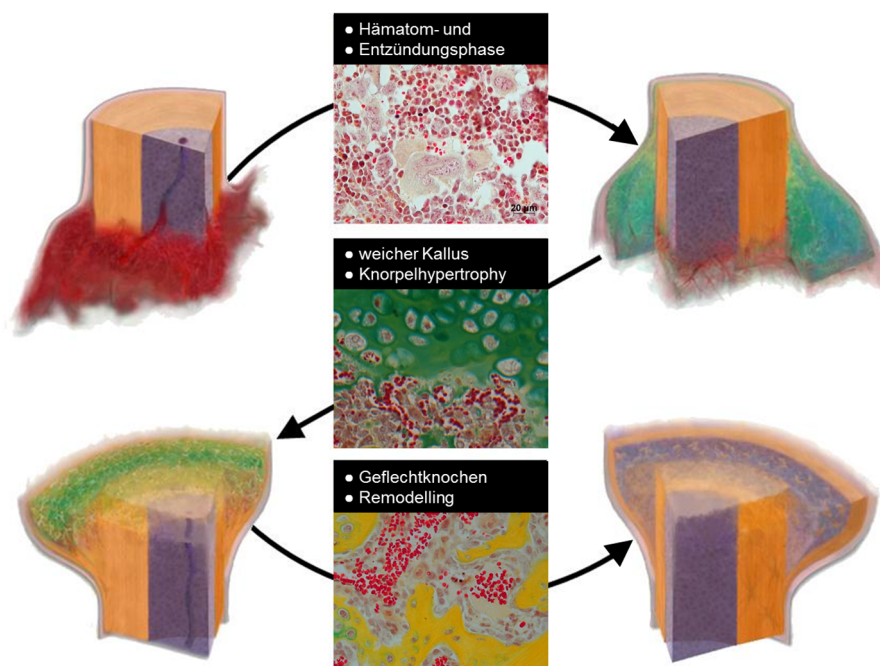


Abbildung 3: Die Knochenheilung, dargestellt in einem Frakturkallus, der in Viertel zerlegt wurde, wobei jedem Viertel eine Phase zugeordnet wurde. Die Farben der Gewebe sind einer Movat Pentachrome Färbung angeglichen, die ebenfalls den histologischen Abbildungen in der Mitte zugrunde liegt. Dargestellt sind Hämatomphase (oben links), weicher Kallus (Knorpel - oben rechts), harter Kallus (Geflechtknochen - unten links) und die Remodelingphase (unten rechts).

Diese Heilungsphasen laufen ab, wenn Knochen über eine sekundäre oder indirekte Ossifikation verheilt. Dies ist der Fall, wenn zwischen den Knochenenden ein Spalt liegt und/ oder die intrafragmentäre Beweglichkeit hoch ist. Das ist z.B. der Fall, wenn ein langer Röhrenknochen klinisch mittels interner Fixation minimal invasiv versorgt wird, ohne dass die Knochenfragmente direkt miteinander in Kontakt gebracht werden. Oft wird bei dieser Versorgung auch das ursprüngliche Hämatom intakt gelassen. Eine anatomische Reposition mit einer Kompression der Knochenfragmente und einer Entfernung eines eventuell vorhandenen Hämatoms erfolgt in der

Klinik z.B. bei der Versorgung einer Gelenkfraktur. Hier wird eine primäre oder direkte Knochenheilung angestrebt, bei der der Knochen über die „basic multicellular units“ (BMUs) direkt und ohne eine knorpelige Zwischenstufe repariert wird (20).

Interaktion von Knochen- und Immunzellen

Das Knochenmark ist nicht nur der Ort, an dem die Hämatopoese stattfindet, es ist auch der Ort, an dem viele Immunzellen gebildet werden. Schon allein diese örtliche Vernetzung legt nahe, dass es eine Interaktion zwischen Knochen- und Immunzellen gibt. Während knochenbildende Osteoblasten aus den mesenchymalen Stammzellen entstehen, so entsteht der Osteoklast aus der hämatopoetischen Stammzelle. Die hämatopoetische Stammzelle ist Vorläufer der lymphoiden und myeloiden Progenitorzelle. Während die Zellen des adaptiven Immunsystems (B Zelle, NK Zelle, T Zelle) aus der lymphoiden Vorläuferzelle hervorgehen, differenziert die myeloide Zelle zu Erythrozyten, Megakaryozyten (Vorläufer der Thrombozyten) und zu Myeloblasten. Diese Myeloblasten wiederum sind Vorläufer der Granulozyten und der Monozyten. Die weitere Differenzierung der Monozyten macht nun die enge Vernetzung des Knochen- und Immunsystems deutlich, da sie zu Makrophagen, dendritischen Zellen oder Osteoklasten ausdifferenzieren können (7). Die gemeinsamen Vorläufer legen auch nahe, dass sich die Zellen des Knochen- und Immunsystems viele Signalmoleküle „teilen“, d.h. sowohl gleiche Signalmoleküle sekretieren als auch erkennen können. Diese Vernetzung der Signalmoleküle wird z.B. bei der OPG-RANKL gesteuerten Osteoklastogenese sichtbar (21).

Wechselwirkungen von Immunsystem und Regeneration

Die Bedeutung des Immunsystems für die Heilung und die Regeneration hat schon Hippokrates erkannt, der im 5. Jahrhundert vor unserer Zeitrechnung die Entzündung als eine frühe Komponente der Heilungsvorgänge nach einer Verletzung beschrieb (22). Aulus Celsus (30 v. Chr. – 45 n. Chr.) beschrieb die vier Anzeichen für eine Entzündung: Rötung, Wärme, Schwellung und Schmerz (22), die nach einer Verletzung auftreten. Hier wird die Inflammation aber eher als ein Zeichen dafür beschrieben, dass die körpereigene Abwehr gegen Pathogene funktioniert. Allerdings wird in der Beschreibung von Aulus Celsus auch schon deutlich, dass es eine enge Wechselwirkung zwischen der Entzündungsreaktion und der Blutversorgung gibt (23). Inzwischen ist bekannt, dass die Revaskularisierung eine Reaktion ist, an der das Immunsystem maßgeblich beteiligt ist (23). John Hunter hat schon 1794 erkannt, wie wichtig die Wiederherstellung der Blutversorgung für eine erfolgreiche Heilung ist, als er den Begriff der „Angiogenese“ einführte (24).

Im frühen Heilungsgewebe, dem Hämatom, herrschen zunächst widrige Bedingungen. Das Fehlen von Sauerstoff führt dazu, dass die Energiegewinnung auf den anaeroben Stoffwechselweg wechselt, der mit der Generation von Laktat zu einer Senkung des pH Wertes im Gewebe führt (25). Unter hypoxischen Bedingungen ist auch die Natrium-Kalium-ATPase gestört, dadurch kommt es zu einem Anstieg von Kalium im Extrazellularraum, während intrazellulär Natrium stark ansteigt (26). Dieses Mikromilieu ist für viele Zellen unverträglich, während einige Immunzellsubsets mit diesen Bedingungen gut umgehen können. Dazu gehören unter anderem die Makrophagen und die T Zellen (27, 28). Immunzellen sind damit Zellen, die besonders in der frühen Heilungsphase eine essentielle Rolle spielen.

Erstaunliche regenerative Eigenschaften werden den Süßwasserpolyphen der Gattung *Hydridae* zugesprochen, die aus einer herunterzentrifugierten Einzelzellsuspension regenerieren können (29). Als Modell für die Regeneration von Gliedmaßen wird oftmals das Axolotl, ein Schwanzlurch, als Modell genutzt. Bei höheren Lebewesen dagegen ist das Regenerationspotential stark eingeschränkt. Ein weiterer Unterschied zwischen niederen und höheren Lebewesen findet man, wenn man das Immunsystem betrachtet. Das angeborene Immunsystem ist universell und bei allen Lebewesen in unterschiedlicher Ausprägung vorhanden. Das adaptive Immunsystem hingegen findet man nur bei höheren Wirbeltieren (30), also bei Tieren, deren Regenerationsfähigkeit eingeschränkt ist. Faszinierend ist hier die Beobachtung, dass bei Fröschen eine hohe Regenerationsfähigkeit vorliegt,

solange die Tiere im Larvenstadium sind; nach der Metamorphose lässt die Regenerationsfähigkeit schnell nach – mit der Metamorphose bildet sich beim Frosch auch das adaptive Immunsystem aus, welches im Larvenstadium noch nicht präsent ist (31). Gibt es also einen Zusammenhang zwischen der nachlassenden Regenerationsfähigkeit und dem Auftreten des adaptiven Immunsystems?

Der Einfluss der adaptiven Immunität auf die frühe Phase der Knochenheilung wird im Folgenden anhand von fünf Publikationen zum Prozess der Knochenregeneration in einem höheren Wirbeltier - mit einem Ausblick auf die Entwicklung möglicher Therapieansätze - näher betrachtet.

Ziel der Arbeit

In dieser Schrift sind fünf Publikationen zum Thema der frühen inflammatorischen Knochenheilungsphase zusammengefasst, die den Beginn der osteoimmunologischen Forschung in unserer Arbeitsgruppe widerspiegeln. Ziel war es die initiale Heilungsphase einer Knochenverletzung zu untersuchen. Diese hatte zu Beginn unserer Arbeit bisher noch nicht im wissenschaftlichen Fokus gestanden, vielmehr waren bisher hauptsächlich die späteren Heilungsphasen, in denen schon neues mineralisiertes Gewebe entstanden war, untersucht worden. Da der Knochen ein besonderes Gewebe darstellt, da er fähig ist nach einer Verletzung zu regenerieren, war uns daran gelegen ein geeignetes Vergleichsgewebe zu finden, welches über die Formation eines Ersatzgewebes, einer Narbe heilt, damit wir Unterschiede zwischen einer „guten“ und einer „schlechten“ Heilung aufdecken konnten. Als eine solche Vergleichsgruppe wurde der Muskel gewählt, der bei substantiellen Verletzungen narbig ausheilt. Die zelluläre Untersuchung des Knochen- und Muskelhämatoms in den ersten 60 Stunden nach der Verletzung war der Ausgangspunkt der Analysen der hier aufgeführten Daten. Die zelluläre Untersuchung wurde durch eine Expressionsanalyse der inflammatorischen Faktoren und die Analyse, der das Hämatom umgebenden Gewebe erweitert. Die Enge Vernetzung der Angiogenese und der initialen Entzündungsreaktion spiegelt sich in unseren Arbeiten wieder. Die Ergebnisse führten dann dazu, dass der Fokus unserer Forschung sich zum adaptiven Immunsystem und hier insbesondere zu den T Zellen verschob. Das Ziel der hier vorgestellten Forschungsarbeit ist die Untersuchung des Einflusses des adaptiven Immunsystems auf die frühe regenerative Knochenheilung.

2. Eigene Arbeiten

Vergleich einer narbig ausheilenden Muskelverletzung mit einer regenerativ heilenden Knochenverletzung in der initialen Heilungsphase

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Cellular Composition of the initial Fracture Hematoma Compared to a Muscle Hematoma: A Study in Sheep; **K. Schmidt-Bleek**, H. Schell, P. Kolar, C. Perka, F. Buttgerit, G.N. Duda, J. Lienau; *Journal of Orthopaedic Research*, 2009 Sep;27(9): 1147-51 [<http://doi.org/10.1002/jor.20901>](32)

“Eine knöcherner Verletzung initiiert eine Entzündungsreaktion, eine zelluläre Migration zum Verletzungsgebiet und eine Zellproliferation, die zu einer Wiederherstellung des Gewebes führen können. Während der frühen Heilungsphase sind besonders Immunzellen aktiv, über deren Zusammensetzung jedoch bisher wenig bekannt ist. Die Hypothese dieser Studie war, dass sich die Immunzellzusammensetzung in einem regenerativ heilenden Knochen von der eines narbig ausheilenden Muskels unterscheidet, und dass diese Unterschiede sich mit der Zeit verstärken. Die Immunzellzusammensetzung wurde zur Analyse der Fragestellung in einem standardisierten Osteotomie- und Muskeltraumamodell im Schaf ein und vier Stunden nach Verletzung durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 4). Es zeigte sich, dass sich die Zellzahl in den ersten vier Stunden nach der Verletzung zunächst gewebeunabhängig erhöht. Allerdings war der Anteil toter Zellen im Muskeltrauma größer als in dem knöchernen Hämatom. Auch wies das Knochenhämatom eine Stunde nach Verletzung einen geringeren Anteil an Granulozyten auf im Vergleich zum Muskeltrauma. Das Verhältnis der T Helfer Zellen zu den zytotoxischen T Zellen war zu beiden Zeitpunkten im Knochenhämatom größer als im Muskelhämatom. B Zellen zeigten einen Anstieg im Knochen-, jedoch nicht im Muskelhämatom von einer zu vier Stunden nach Verletzung. Dies war die erste Studie, die die Immunzellzusammensetzung zwischen einem regenerativ heilenden Knochen und einem narbig ausheilenden Muskel miteinander verglichen hat.“ (Übersetzung durch die Autorin.)

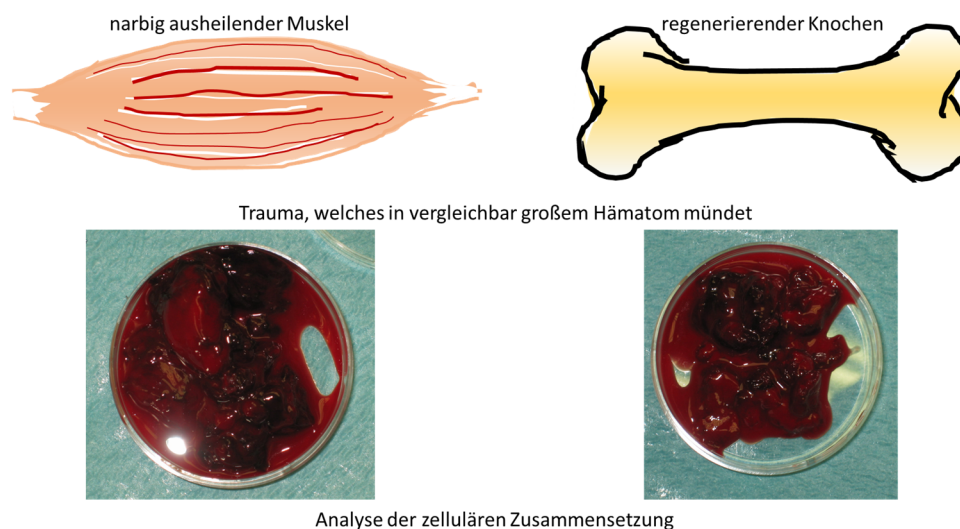


Abbildung 4: Die initiale Heilungsphase in Muskel und Knochen wurde untersucht, indem das Hämatom, welches sich nach einem gesetzten Trauma bildet, zu definierten Zeitpunkten entnommen wurde. Dabei wurde zunächst Muskel- und Knochenverletzung in einem Hinterbein induziert (4 Stunden Hämatome), dann wurde nach einer entsprechenden Wartezeit in dem anderen Hinterbein ebenso Muskel und Knochen verletzt (1 Stunde Hämatome). Das Tier ist aus der Narkose nicht erwacht, und kurz vor dem Finalisieren wurden die 4 Hämatome entnommen. Jeweils 1g jedes Hämatoms ging dann in eine Analyse der zellulären Zusammensetzung mittels Durchflusszytometrie. Prozentuale Veränderungen der Immunzellsubpopulationen wurden ermittelt. Die Werte wurden gegen individuelle Werte des peripheren Blutes (100%)

normalisiert.

Die Ergebnisse legten den Grundstein für die folgenden Untersuchungen zur Bedeutung des adaptiven Immunsystems in der Knochenheilung und zeigten deutlich, wie wichtig das Frakturhämatom für die initiale Heilungsphase und damit für den Knochenheilungserfolg ist.

Um die Ergebnisse dieser Studie besser zu verstehen wurde die Analyse des initialen Frakturhämatoms erweitert. Der Zeitraum, der betrachtet wurde, wurde auf die ersten 60 Stunden der Heilung ausgeweitet; es wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt, um die Entzündungsreaktion in ihrer Stärke besser zu beurteilen, und es wurde das an das initiale Hämatom angrenzende Knochenmark in die Analyse einbezogen.

Eine zeitgerechte Beendigung der pro-inflammatorischen Phase ermöglicht die Revaskularisierung als notwendigen Schritt zur erfolgreichen Heilung

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing; **K. Schmidt-Bleek**, H. Schell, J. Lienau, N. Schulz, P. Hoff, M. Pfaff, G. Schmidt, C. Martin, C. Perka, F. Buttgerit, H.-D. Volk and G.N. Duda, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2014** Feb;8(2):120-30 [doi: 10.1002/term.1505] (33)

„In der Knochenheilungskaskade folgt der Hämatom- und Entzündungsphase eine Phase, in der das entstehende Granulationsgewebe ausreift. Dabei ist die Revaskularisierung des Verletzungsgebietes ein unabdingbarer Schritt für eine erfolgreiche Heilung. Die Hypothese dieser Studie war, dass die narbenlose regenerative Knochenheilung von einer balancierten Entzündungsreaktion abhängig ist, die die notwendigen Revaskularisierungsschritte einleitet. Um dieser Hypothese zu untersuchen wurde die zelluläre Zusammensetzung und das Expressionsprofil eines Knochenhämatoms und eines narbig heilenden Muskelhämatoms in einem standardisierten Schafmodell über die ersten 60 Stunden des Heilungsprozesses untersucht. Die Hochregulation regulatorischer T Helfer Zellen und der anti-inflammatorischen Zytokin (Interleukin 10) Expression überschneiden sich dabei mit der Hochregulation der angiogenen Faktoren nur in dem regenerativ heilenden Knochenhämatom, nicht aber in dem narbig ausheilenden Muskelhämatom. Dieses Ergebnis legt nahe, dass eine zügige Eindämmung der pro-inflammatorischen Reaktion und die frühzeitige Initiation der Revaskularisierung miteinander verbunden sind und wichtige Schritte der regenerativen Heilung darstellen. Die in einem verzögert heilenden Knochenheilungsmodell gefundene verlängerte pro-inflammatorische Reaktion unterstützt diese Interpretation der Ergebnisse. Die umliegenden Gewebe unterscheiden sich bei einer knöchernen und einer muskulären Verletzung. Da diese Gewebe als Quellen der Zellen anzusehen sind, die an der Heilung beteiligt sind, ist eine im Verlauf der Heilung auftretende unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung des Hämatoms im Knochen bzw. im Muskel naheliegend und wurde in dieser Arbeit bestätigt. Diese zelluläre Zusammensetzung ist ausschlaggebend für die regenerative Heilung des Knochens bzw. die narbig ausheilende Verletzung im Muskel.“ (Übersetzung durch die Autorin.)

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die initiale Knochenheilungsphase unterteilt werden kann in einen pro-inflammatorischen Abschnitt, der die für die Initiierung der Heilung notwendigen Signalkaskaden zulässt und einen anti-inflammatorischen Abschnitt, der die pro-inflammatorische Signalgebung zeitgerecht terminiert und dadurch die Einleitung der wichtigen Revaskularisations - Phase ermöglicht.

In einer nächsten Studie wurde daher der Prozess der Revaskularisierung während der Knochenheilung näher untersucht.

Revaskularisierung ein wichtiger Schritt in der Heilungskaskade

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Differential Regulation of Blood Vessel Formation between Standard and Delayed Bone Healing; J. Lienau and **K. Schmidt-Bleek**, A. Peters, F. Haschke, G.N. Duda, C. Perka, H.J. Bail, N.Schütze, F. Jakob, H. Schell; *Journal of Orthopaedic Research*, **2009** Sep;27(9):1133-40 [doi: 10.1002/jor.20870] (shared first authorship) (34)

„Die Wiederherstellung der Blutversorgung ist eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Heilung. In dieser Studie haben wir die Hypothese untersucht, dass eine verzögerte Knochenheilung mit einer veränderten Regulation der Revaskularisierung einhergeht. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden zwei Heilungsgruppen miteinander verglichen: eine normal heilende, stabil fixierte Osteotomiegruppe und eine verzögert heilende, mechanisch rotationsinstabil fixierte Osteotomiegruppe eines Knochenheilungsmodells in der Schafttibia. 4, 7, 9, 11, 14, 21 und 42 Tage nach der Operation wurde das Heilungsgewebe entnommen, die RNA wurde extrahiert und eine Genexpressionsstudie von Markern der Angiogenese mittels qRT-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurde das Heilungsgewebe histologisch untersucht, wobei die ersten Gefäße 7 Tage nach der Operation in beiden Versuchsgruppen sichtbar waren. In der verzögert heilenden Gruppe war die Expression von vWF, Ang1, Ang2, VEGF, CYR61, FGF2, MMP2 und Timp1 an mehreren Zeitpunkten deutlich verringert im Vergleich mit der normal heilenden Gruppe. Aufgrund der Expressionsmuster konnten die Zeitpunkte 7 und 21 Tage nach der Operation als besonders kritisch für den Revaskularisierungsprozess identifiziert werden.“ (Übersetzung durch die Autorin.)

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Immunreaktion in der frühen Heilungsphase eine wesentliche Rolle spielt, und ein Unterschied in der Immunzellzusammensetzung eines regenerativen Knochenhämatoms im Vergleich zu einem narbig ausheilenden Muskelhämatom im Verhältnis der CD4: CD8 T Zellen bestand, das im Knochenhämatom hin zu den CD4 T Zellen verschoben war. Uns interessierte nun die Frage, ob es Immunzellsubpopulationen gibt, die sich positive bzw. negativ auf die Knochenheilung auswirken.

Gibt es Immunzellsubpopulationen, die sich auf die Heilung negativ auswirken?

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade; **K. Schmidt-Bleek**, H. Schell, N. Schulz, P. Hoff, C. Perka, F. Buttgereit, H.-D. Volk, J. Lienau, G.N. Duda; *Cell Tissue Research* **2012** Mar;347(3):567-73 [doi: 10.1007/s00441-011-1205-7] (35)

„Die Entzündungsreaktion zu Beginn einer Knochenheilung leitet den Prozess ein, der wenn er erfolgreich ist, zu einer vollständigen Regeneration des Knochens führt. Die Hypothese dieser Studie ist, dass eine unbalancierte Entzündungsreaktion zu einer verzögerten Knochenheilung führt und dadurch eine erfolgreiche Heilung gefährdet wird. In einem normal heilenden und einem mechanisch induziert verzögert heilenden Knochenheilungsmodell im Schaf wurden zur Überprüfung dieser Hypothese die Immunzellzusammensetzung und das Expressionsmuster angiogener Faktoren untersucht und verglichen. In der verzögert heilenden Gruppe traten dabei, im Vergleich zu der normal heilenden Gruppe, signifikant höhere T Zell Anteile sowohl im Knochenhämatom als auch im anliegenden Knochenmark auf. Dies spiegelte sich auch in den höheren Anteilen zytotoxischer T Zellen wieder, die in der verzögert heilenden Gruppe auftraten und eine verlängerte pro-inflammatorische Reaktion andeuten. In dem der knöchernen Verletzung anliegenden hochaktiven Periost konnte zudem in der verzögert heilenden Gruppe eine geringere Expression von Stammzellmarkern und angiogenen Faktoren, wie z.B. Heme Oxygenase und Vaschuar Endothelial Growth Factor, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen eine verzögerte Revaskularisierung durch eine verlängerte pro-inflammatorische Reaktion. Diese Studie legt nahe, dass es Immunzellsubpopulationen und Faktoren gibt, die die Knochenheilung negativ beeinflussen. Daraus ergibt sich, dass die Identifizierung positiver Komponenten für vielversprechende zukünftige Therapiekonzepte genutzt werden könnten, die diese negativen Einflüsse eliminieren.“ (Übersetzung durch die Autorin.)

Diese Studie legt die Vermutung nahe, dass die CD8 positiven T Zellen einen negativen Effekt auf die Knochenheilung haben. Diese Hypothese wurde in der nächsten Arbeit bestätigt.

Der Einfluss der CD8 positiven T Zellen auf die Knochenheilung

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Terminally differentiated CD8⁺ T cells negatively affect bone regeneration in humans; S. Reinke, S. Geissler, W.R. Taylor, **K. Schmidt-Bleek**, K. Juelke, V. Schwachmeyer, M. Dahne, T. Hartwig, L. Akyüz, C. Meisel, N. Unterwald, N.B. Singh, P. Reinke, N.P. Haas, H.-D. Volk, G.N. Duda; *Science Translational Medicine*, **2013** May 29;5(187):187er4 [doi: 10.1126/scitranslmed.3004754] (36)

„Es gibt zunehmende Anzeichen dafür, dass das adaptive Immunsystem am endogenen Reparaturprozess beteiligt ist: Zum Beispiel ist der endogene Knochenheilungsprozess von T Zellen moduliert und dies auch in Abwesenheit einer Infektion. Weil eine verzögerte oder ausbleibende Knochenheilung mit schlechten Langzeitprognosen und hohen sozioökonomischen Kosten einhergeht, haben wir in dieser Studie den Zusammenhang zwischen der individuellen Immunreaktion und dem Knochenheilungsergebnis untersucht. Diese Untersuchung zeigte, dass eine verzögerte Knochenheilung signifikant mit einem erhöhten Level an terminal differenzierten CD8⁺ Effektor Gedächtnis T (T_{EMRA}) Zellen (CD3⁺CD8⁺CD11a⁺⁺CD28⁻CD57⁺ T Zellen) im peripheren Blut korrelieren. Dieser Unterschied war langanhaltend und reflektierte damit das individuelle Immunprofil im Zusammenhang mit der lebenslangen Antigenexposition und nicht die Reaktion auf die Knochenverletzung. Die CD8⁺ T_{EMRA} Zellen reichern sich im Frakturhämatom an; diese Zellen waren die Hauptproduzenten von Interferon gamma und Tumor necrosis factor alpha, Faktoren, die die osteogene Differenzierung und das Überleben von humanen mesenchymalen Stromazellen vermindern. Die Depletion der CD8⁺ T Zellen in einem Maus Osteotomie Modell resultierte in einer verbesserten endogenen Knochenheilung, während ein adaptiver Transfer von CD8⁺ T Zellen den Heilungsprozess verzögerte. Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren den Einfluss des individuellen adaptiven Immunzellprofils auf den endogenen Knochenheilungsprozess. Die Quantifizierung der CD8⁺ T_{EMRA} Zellen stellt zudem einen möglichen Biomarker für eine Aussage über das individuelle Heilungspotential dar und öffnet damit neue Möglichkeiten für eine frühzeitige, gerichtete Intervention zur Verbesserung der Knochenheilung in betroffenen Patienten.“ (Übersetzung durch die Autorin.)

3. Diskussion

Bedeutung der Osteoimmunologie:

Die enge Vernetzung von Makrophagen und Osteoklasten, die die gleichen Vorläuferzellen besitzen und die Auswirkung der Immunzellen auf die Osteoklastenaktivität begründeten die Forschung zur Interaktion zwischen dem Skelett- und Immunsystem. Vor 46 Jahren beschrieben Horton et al., dass kultivierte Monozyten, die auf Knochen gegeben wurden, dessen Abbau induzierten (37). Sie vermuteten, dass diese Leukozyten einen Faktor sezernieren, der die Osteoklastenaktivität steigerte, den OAF (osteoclast-activating factor). Dies gilt als die erste Erwähnung der Immunzellen auf das Knochenystem. OAF wurde später re-klassifiziert als identisch mit Interleukin 1 beta, einem von T Zellen sezernierten pro-inflammatorischen Zytokin (38). TNFa (39) und IL6 (40) waren die nächsten Zytokine, beide ebenfalls pro-inflammatorisch, die als Regulatoren der Knochenzellfunktion identifiziert wurden. Pro-inflammatorische Zytokine der Immunzellen, die vornehmlich als Verstärker der Knochenresorption und als Aktivatoren der Osteoklastenaktivität angesehen wurden, ließen die Auswirkungen von Immunzellen auf den Knochen meist in einem negativen Licht erscheinen (41). Unsere Forschung hat gezeigt, dass das Immunsystem wichtige Funktionen bei der Knochenformation erfüllt, die nicht auf die pro-inflammatorische / entzündliche, der Abwehr dienenden Immunreaktion beschränkt sind. T- und B-Zellen sind maßgeblich an der frühen Knochenheilungsphase beteiligt, sind aber durchaus auch in den späteren Knochenheilungsphase wichtig, wie z.B. der Remodelingphase (42). T Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Kollagen I Deposition durch die Osteoblasten und bestimmen dadurch die Knochenqualität mit (43). Makrophagen sind für die Knochenheilung so essentiell, dass diese vollständig zum Erliegen kommt, wenn diese Zellen nicht vorhanden sind (44).

Osteoimmunologie war lange ein Synonym für die Erforschung von z.B. rheumatischer Arthritis, bei der die immunologischen Reaktionen für die Zerstörung des Knochens verantwortlich gemacht werden (45, 46) Das Immunsystem und seine Faktoren wurden vornehmlich als schädigende Komponenten betrachtet. Dazu hat auch beigetragen, dass aktivierte T Zellen RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B ligand) exprimieren, einen Faktor, der die Osteoklastogenese fördert und damit den Knochenabbau unterstützt (47). Das RANK/ RANKL/ OPG System ist ein weiteres in der Osteoimmunologie gut studiertes Kapitel, da es direkt die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität betrifft. Zolodronsäure wird beispielsweise in der Osteoporose Therapy eingesetzt, da es die Produktion von RANKL durch Osteoblasten reduziert (48). Gleichzeitig wird untersucht, dass dieses Medikament die RANKL Produktion durch Lymphozyten steigert, wodurch seine Wirkung vermindert werden könnte (49). Dies macht sehr deutlich, dass bei einer Therapie, die das Knochenystem adressiert, das Immunsystem mitbedacht werden muss: Nicht nur in dem Sinne, dass das Immunsystem die Wirkung verändert / minimieren könnte, sondern auch unter dem Aspekt, dass ein Medikament, welches auf Knochenzellen wirkt, das Immunsystem beeinträchtigen könnte und somit die Abwehrreaktion des Körpers schwächen und den Patienten für Infektionen anfällig machen könnte (50).

Bedeutung des adaptiven Immunsystems in der Knochenheilung

Heilung beginnt bei Verletzungen mit Blutgefäßschädigung mit einer Hämatom- und Entzündungsphase (51). In dem Pfeilschwanzkrebs, einem lebenden Fossil, werden beide Reaktionen noch von einer Zelle, dem Amöbozyt, bewältigt, der bei einer Verletzung der äußeren Hülle sowohl für den Verschluss als auch für die Abwehr gegen mögliche eingedrungene Pathogene verantwortlich ist (18). Im Laufe der Evolution entwickelten sich die heute in Säugern bekannte Koagulationskaskade und das hochkomplex Immunsystem, um diese zwei Aufgaben zu bewältigen. Die phylogenetische Kopplung dieser beiden Prozesse am Beginn einer Heilung ist bis heute gültig. Diese Entzündung, die zu Beginn der Heilung auftritt ist, zunächst ein positiver Prozess, der für die

Initiierung der Heilung wichtig ist.

Zu Beginn unserer Arbeit zur Interaktion des Immunsystems und des Skelettsystems haben wir die Hypothese aufgestellt, dass sich diese Entzündungsreaktion in den verschiedenen muskuloskeletalen Geweben unterscheidet (32). Dahinter verbirgt sich auch die Hypothese, dass die Entzündungsreaktion und die Immunzellen, die an der Heilung beteiligt sind, einen Einfluss darauf haben, ob die Heilung erfolgreich ist.

Der größte Heilungserfolg ist in der Regeneration eines Gewebes zu sehen. Knochen ist eines der wenigen Gewebe im Säuger, das zu einer Regeneration und zu einer Wiederherstellung von Form und Funktion fähig ist. Ein reparierendes Heilungsergebnis wäre in einer Narbenbildung zu sehen, wodurch die Gewebeintegrität, jedoch oft nicht die vollständige Funktion wiedererlangt wird. Eine solche narbige Heilung tritt zum Beispiel bei einer größeren Muskelverletzung auf. Daher wurden diese beiden Gewebe, der Knochen und der Muskel, in Bezug auf die initiale Heilungsphase untersucht, um Unterschiede in der initialen Entzündungsreaktion zu analysieren und so ein besseres Verständnis zu erlangen, warum der Knochen ein regeneratives Gewebe ist.

Als Modellsystem wurde das Schaf gewählt, welches aufgrund der mit dem Menschen vergleichbaren Tibiaform oft als Versuchstier in der orthopädischen Forschung eingesetzt wird (52). In der Tibia wurde ein Knochendefekt erzeugt, wobei der Muskelschaden minimal gehalten wurde, und im M. gracilis derselben Gliedmaße wurde ein Muskeltrauma gleichen Ausmaßes gesetzt, das wiederum keine Verbindung zum Knochen hatte. Die entstehenden Hämatome wurden nach einer und nach vier Stunden entnommen und auf ihre Immunzellzusammensetzung hin untersucht (32).

Diese Analyse zeigt, dass sich das Hämatom, welches sich nach einer Verletzung bildet, schon in den ersten vier Stunden verändert, so dass man davon ausgehen kann, dass schon in diesem Zeitfenster erste spezifische Heilungsprozesse ablaufen (32). Tatsächlich wurde von Mizuno et al. gezeigt, dass das Frakturhämatom schon nach 4 Stunden ein osteogenes Potential ausgebildet hat (53). Diese Entwicklungen in der zellulären Komposition des frühen Hämatoms waren im Knochenhämatom und im Muskelhämatom unterschiedlich, was unsere Hypothese einer gewebsspezifischen Immunreaktion nach Verletzung bestätigte.

Bei näherer Betrachtung scheint die zelluläre Zusammensetzung jedoch einen geringeren Anteil an pro-inflammatorischen Zellen im initialen Knochenhämatom im Vergleich zum Muskelhämatom zu zeigen (32).

Deutlich geringere Anteile an Granulozyten im Knochenhämatom könnten für eine leichtere Entzündungsreaktion sprechen, die über eine verringerten oxidativen „Burst“ für den geringeren Anteil an abgestorbenen Zellen zum vier Stundenzeitpunkt im Knochenhämatom mitverantwortlich wäre. Dafür sprechen auch die Ergebnisse einer weiteren Studie, bei der die Auswirkungen der ROS (reactive oxygen species) über die orale Gabe von NAC (N-Acetylcystein) während der Knochenheilung reduziert wurde. Diese Studie wurde in einem Knochenheilungsmodell der Ratte durchgeführt, in dem die Entzündungsphase über eine instabile Fixation der Fraktur verlängert wurde. Das Antioxidant NAC könnte in diesem Modell die Knochenheilung verbessern, was auch auf die Verminderung der negativen Effekte des oxidativen „Burst“ und der hierbei entstehenden ROS zurückzuführen ist (54). Ein weiterer Unterschied in der zellulären Zusammensetzung der frühen Hämatome im Knochen und Muskel ist die Verschiebung im Verhältnis der CD4 positiven T Helferzellen und der CD8 positiven cytotoxischen T Zellen. Im Knochen war dieses Verhältnis zu einem höheren Anteil an CD4 positiven T Helferzellen verschoben.

Nach der Analyse der zellulären Zusammensetzung des 1 und 4 Stunden alten initialen Hämatoms, wie in der ersten Arbeit beschrieben (32), wurden zum besseren Verständnis der initialen Entzündungsreaktion das Zeitfenster der Untersuchung auf bis zu 60 Stunden nach Verletzung erweitert (33). In diesem Gewebe wurde neben der zellulären Analyse auch eine Expressionsanalyse von pro- (Interleukin 1beta (IL1b), Interleukin 6 (IL6), macrophage colony stimulating factor (MCSF); tumor necrosis factor alpha (TNFa)) und anti- (transforming growth factor beta (TGFb); Interleukin 10 (IL10)) inflammatorischen Faktoren durchgeführt. Für die Expression der Entzündungsmediatoren ergab sich ein unterschiedliches Muster, wenn man das regenerative Knochenhämatom und das narbig ausheilende Muskelhämatom miteinander vergleicht. Im

Folgenden sind diese Ergebnisse grafisch dargestellt (Abbildung 5).

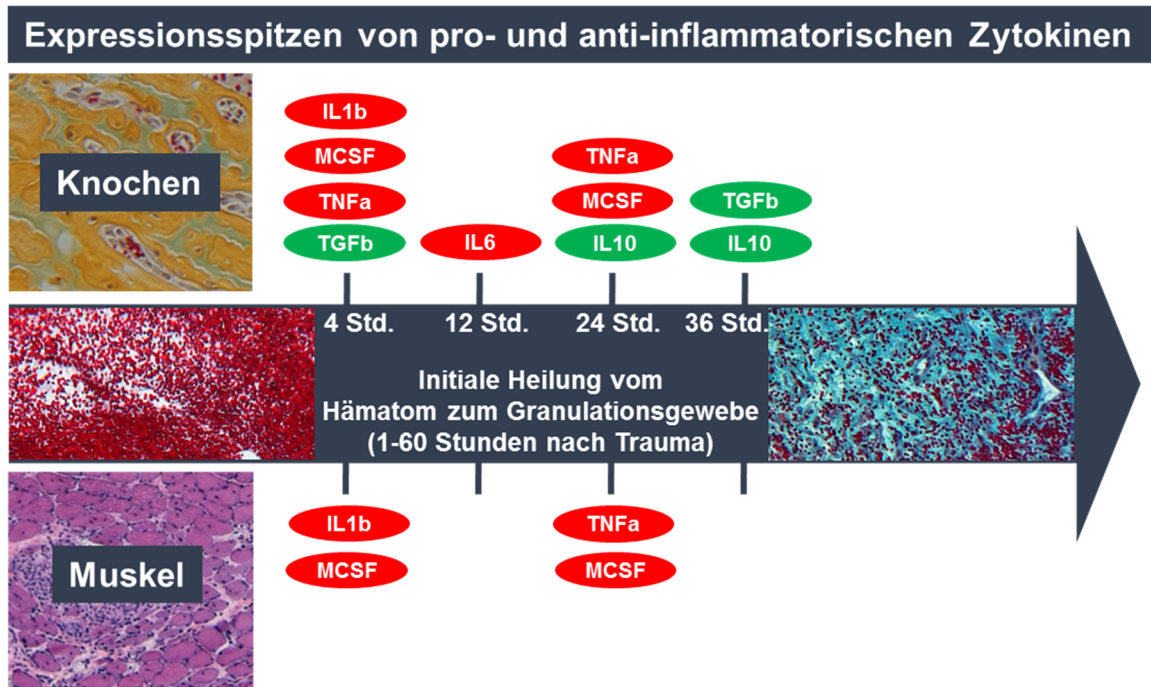


Abbildung 5: Expressionsspitzen der pro- (rot) und anti- (grün) inflammatorischen Zytokine der initialen Heilungsphase in Knochen und Muskel sind schematisch abgebildet. (Histologische Abbildungen: Knochen – Movat Pentachrome Färbung, Muskel und Hämatom – Hämatoxylin Eosin Färbung, Granulationsgewebe – Masson Goldner Färbung) (Grafische Darstellung der Ergebnisse aus (33))

Betrachtet man die komplexen Expressionsmuster schematisch, so wird deutlich, dass die initiale inflammatorische Reaktion im Knochen, wie von uns postuliert, zunächst intensiver ist als im Muskel, wobei auch die Gegenregulation, also die Hochregulierung der anti-inflammatorischen Zytokine im Knochenhämatom deutlicher ausfällt (Abbildung 6).

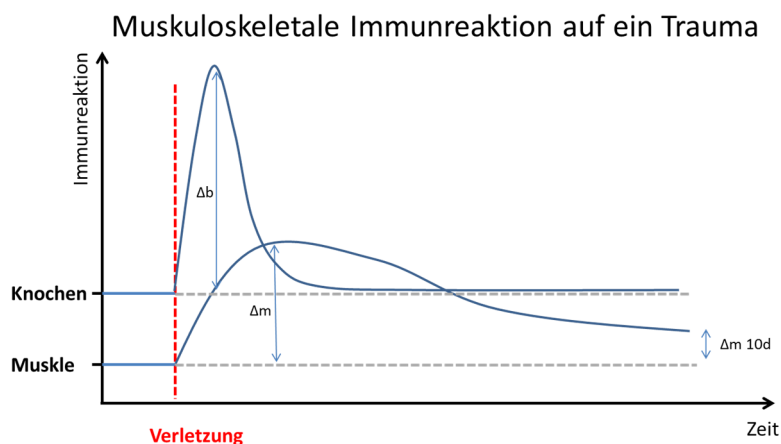


Abbildung 6: Grafischer Vergleich der Immunreaktion in Folge eines Traumes des Knochens und des Muskels: Die Stärke der immunologischen Reaktion und ihr zeitlicher Verlauf unterscheiden sich zwischen den unterschiedlichen muskuloskelettalen Geweben. Knochen mit seiner Nähe zum Knochenmark, wo nicht nur Immunzellen generiert werden, sondern auch memory B und T Zellen residieren, hat eine unmittelbare starke pro-inflammatorische Reaktion, was zu einer schnellen Gegenregulation führt. Im Muskel werden Immunzellen mit der Blutung eingeschwemmt die Hochregulierung der Entzündungsreaktion ist im Vergleich zum Knochen langsamer. (grafische Darstellung der Ergebnisse aus (32-34, 55))

Noch deutlicher wird der Einfluss der initialen entzündlichen Reaktion, wenn man die Expressionsmuster inflammatorischen Zytokine in der initialen Heilungsphase eines normal und eines verzögert heilenden Knochens miteinander vergleicht. Um dies zu untersuchen wurde der

normal heilenden Gruppe eine Gruppe mit einer mechanisch induzierten verzögerten Heilung gegenübergestellt (56).

Eine Untersuchung der Expression von Zytokinen 60 Stunden nach Osteotomie ergibt eine signifikant höhere Expression pro-inflammatorischer Signalmoleküle in dem instabil fixierten Knochen: IL1b (p=0,01), TNFa (p=0,002), IL6 (p=0,01). Eine verlängerte pro-inflammatorische Phase korreliert folglich mit einer verzögerten Heilung (34, 57).

Die initiale Entzündungsreaktion ist eng vernetzt mit der Revaskularisierung des Verletzungsgewebes. Die Gefäßversorgung stellt sowohl die Energiegewinnung der Zellen über die Versorgung mit Sauerstoff sicher, sie bringt Zellen und Metaboliten, die für die Heilung notwendig sind, vor Ort, und sie ist auch für den Abtransport schädlicher Metaboliten notwendig. Die Revaskularisierung ist ein essentieller Prozess der frühen Knochenheilung (58, 59). Um dies im Zusammenhang mit der Entzündungsreaktion zu untersuchen, haben wir die Expressionsmuster angiogener Signale (HIF1a (hypoxia inducible factor 1 alpha), HMOX1 (heme oxygenase 1), VEGF (vascular endothelial growth factor)) analysiert. In unserem Modell sehen wir eine Hochregulierung der Expression angiogener Faktoren im Frakturhämatom zur gleichen Zeit, in der auch die anti-inflammatorischen Zytokine hochreguliert werden. Im Muskelhämatom ist dies nicht zu beobachten. Im Folgenden sind diese Ergebnisse grafisch dargestellt (Abbildung 7):

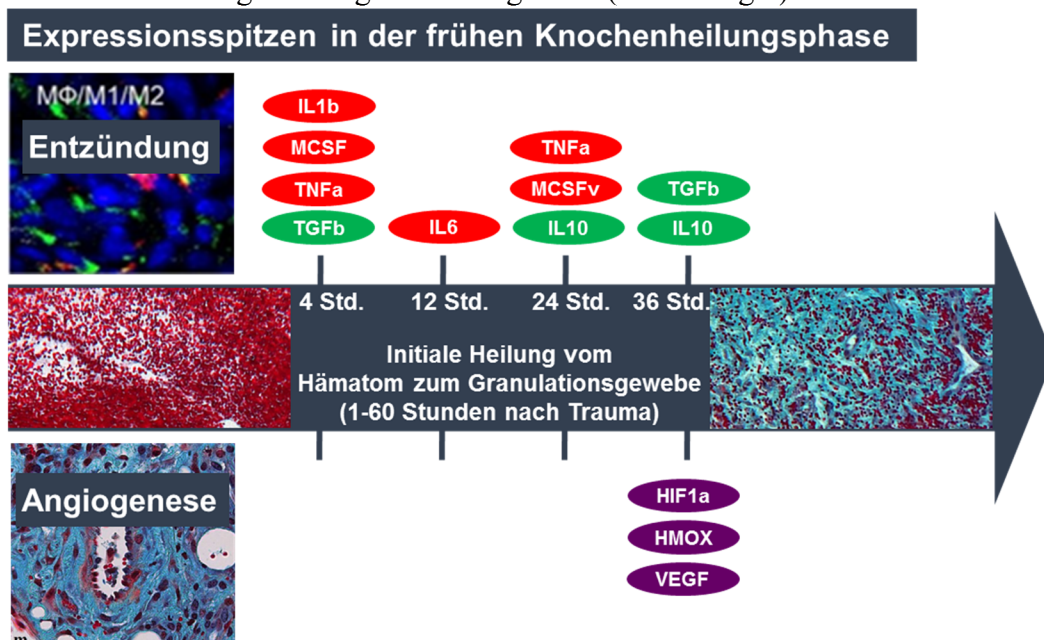


Abbildung 7: Im Knochenhämatom erfolgt die Hochregulation der angiogenen Faktoren (lila) zeitgleich mit der Hochregulation der anti-inflammatorischen Zytokine (grün). Schematisch dargestellt sind Expressionsspitzen. (Entzündung: Immunhistologische Färbung der Makrophagen in der frühen Knochenheilung, Hämatom – Hämatoxylin Eosin Färbung, Granulationsgewebe und Angiogenese: Masson Goldner) (Grafische Darstellung der Ergebnisse aus (33))

Die Ergebnisse unserer Studien legen nahe, dass die initiale Knochenheilungsphase unterteilt werden kann in einen pro-inflammatorischen Abschnitt, der die für die Initiierung der Heilung notwendigen Signalkaskaden zulässt und einen anti-inflammatorischen Abschnitt, der die pro-inflammatorische Signalgebung zeitgerecht terminiert und dadurch die Einleitung der wichtigen Revaskularisations-Phase ermöglicht.

Mit der Verletzung und der Zerreißung der Blutgefäße kommt die Ver- und Entsorgung des Heilungsgebietes zum Erliegen. Ein erster wichtiger Schritt hin zu einer erfolgreichen Heilung ist daher die Wiederherstellung der Versorgung, die Revaskularisierung (23, 60). In unseren Untersuchungen im Schaf konnten wir sieben Tage nach einer Knochenverletzung Gefäße histologisch wieder nachweisen (Abbildung 8).

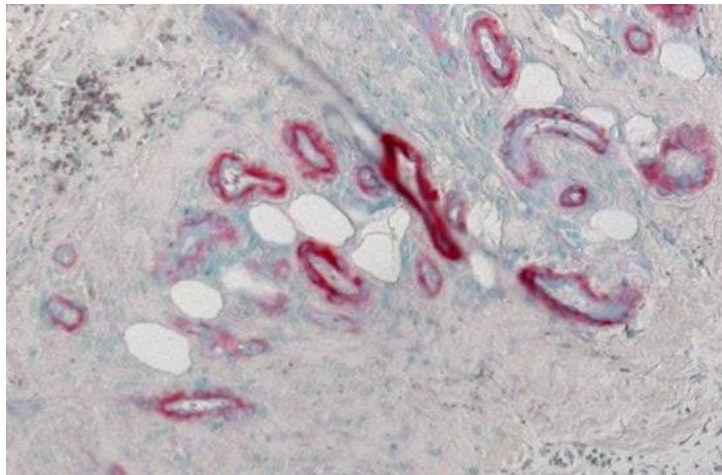


Abbildung 8: Gefäße in einem 9 Tage alten Granulationsgewebe in einem Osteotomiespalt im Schaf bei stabiler Fixation. Gefäße wurden mit einer immunhistologischen Färbung gegen aSMA (alpha smooth muscle antigen) sichtbar gemacht.

Uns beschäftigte nun die Frage, inwiefern eine verzögerte Heilung mit einer Veränderung der Revaskularisierung einhergeht. Um auch die frühen Mechanismen der Angiogenese detektieren zu können wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurde eine gute Knochenheilung mit einer mechanisch induzierten verzögerten Knochenheilung, die wiederum im Schafmodell realisiert wurde, verglichen.

Tatsächlich gibt es in der Knochenheilung zwei Phasen, in denen die Angiogenese eine wichtige Rolle spielt: In der ersten Heilungsphase, in der die durch die Verletzung unterbrochene Blutversorgung wiederhergestellt wird, und in der Phase der enchondralen Knochenformation, in der avaskulärer Knorpel revaskularisiert wird, wenn die Formation des Geflechtknochen beginnt (7). Für die Regulation der Blutgefäßformation werden zwei Signalwege vorgeschlagen, einer, der über den Wachstumsfaktor VEGF reguliert wird und ein zweiter, der über Angiopoietin reguliert wird (61, 62). In der frühen Heilungsphase (Tag 7) war die Genexpression von VEGF hochreguliert (34). Hohe Konzentrationen an VEGF zeigen, dass dem Knochenhämatom ein angiogenes Potential innewohnt (25). In der späteren Heilungsphase der intramembranösen und enchondralen Ossifikation (Tag 21) war Angiopoietin in unserer Studie hochreguliert, was darauf hindeutet, dass dieser Signalweg in der späteren Heilungsphase für die Revaskularisierung ausschlaggebend ist (34). Beide Faktoren waren in der Gruppe der verzögerten Knochenheilung weniger stark exprimiert, was auf eine verzögerte Revaskularisierung hindeutet (34).

Insgesamt zeigten angiogene Faktoren in der verzögerten Heilung eine verspätete oder reduzierte Expression (34). Zeitgleich wurde eine zweite Analyse durchgeführt, die die osteogenen Faktoren analysierte (63). Diese Untersuchung ergab, dass in der verzögert heilenden Gruppe, in der die Revaskularisation verzögert erfolgt, auch die Expression der osteogenen Faktoren signifikant verzögert war. Dies galt u.a. für die „bone morphogenetic proteins“ (BMP2, BMP4) und für das Kollagen 1a1. Dies zeigt, dass zusammen mit der erhöhten und verlängerten Entzündungsreaktion eine Verzögerung der Revaskularisierung und auch eine Verminderung der pro-osteogenen Signalgebung einhergehen.

Die Immunzellen, die an den frühen Heilungsphasen beteiligt sind, werden über das Blut eingeschwemmt, das bei der Verletzung der Gefäße freigesetzt wird. Sie wandern zusätzlich im Verlauf der Heilung den chemotaktischen Signalen folgend aus den die Verletzungszone umgebenden Geweben ein. Eine Analyse der Immunzellzusammensetzung des frühen Knochenhämatoms und des an die Verletzung anliegenden Knochenmarks war daher der nächste Schritt bei der Untersuchung der frühen Knochenheilungsphase (64, 65). Immunzellen, die im Zusammenhang mit Knochen untersucht wurden, umschließen Makrophagen (44, 66), neutrophile Granulozyten (67), Mastzellen (68), Megakaryozyten (69), Natural Killer Zellen (70, 71), B Zellen (42, 72, 73) und T Zellen (46, 74, 75). Diese Liste ist wahrscheinlich nicht vollständig. Die Suche nach Osteoimmunologie und

Fraktur ergibt in der NCBI RMC Bibliothek gerade 6 Paper für den 5 Jahres Zeitraum 2002 - 2007, während in den letzten 5 Jahren 312 Paper zu finden sind. Dies dokumentiert das steigende Interesse an diesem Themenkomplex. Unsere Untersuchungen zu diesem Thema starteten 2007 fokussiert in der zellulären Analyse auf Leukozyten, Monozyten, B Zellen, T Zellen, zytotoxische T Zellen und T Helferzellen. Untersucht wurde nun die zelluläre Zusammensetzung 60 Stunden nach Trauma in einem Knochenhämatom einer normal heilenden und einer verzögert heilenden Gruppe, wiederum im Schafmodel (55). Das unmittelbar an das Hämatom angrenzende Knochenmark und Periost wurden nun ebenfalls in die Untersuchung mit einbezogen.

Leukozyten sind im Hämatom bei Probenentnahme in geringerem Anteil vertreten als im peripheren Blut, interessanterweise sind im an das Hämatom angrenzenden Knochenmark bei einer verzögerten Heilung deutlich mehr Leukozyten zu finden als bei der normalen Heilung ($p=0,004$) (55). Dies deutet schon an, dass die Immunzellzusammensetzung entsprechend des Heilungsverlaufs unterschiedlich ist. Bei den Monozyten und den B Zellen sind allerdings keine deutlichen prozentualen Unterschiede zu detektieren. Diese finden sich erst bei der Betrachtung der T Zellen, die im dem Hämatom der verzögerten Heilung angrenzenden Knochenmark ebenfalls deutlich erhöht sind ($p=0,026$) (55). Daher wurden die Teilpopulationen der T Zellen näher analysiert.

CD8 positive zytotoxische T Zellen nehmen in den ersten Stunden nach der Hämatombildung in einer ungestörten Heilung prozentual ab, so dass nach 60 Stunden nur noch 50% der initial vorhandenen CD8 positiven T Zellen verbleiben (55). Diese Abnahme bleibt bei einer verzögerten Heilung aus. Nach 60 Stunden bewegt sich der Anteil der CD8 T Zellen in der verzögert heilenden Gruppe immer noch auf dem Level, welches direkt nach der Hämatomformation vorlag. Der Unterschied zwischen den CD8 T Zellen in der normalen gegen die verzögerte Heilung ist mit $p=0,52$ deutlich (Abbildung 9). Noch deutlicher wird allerdings der Unterschied in der Immunzellzusammensetzung und der damit einhergehenden Zytokinexpression, wenn das Verhältnis der CD4:CD8 T Zellen betrachtet wird ($p=0,017$) (55).

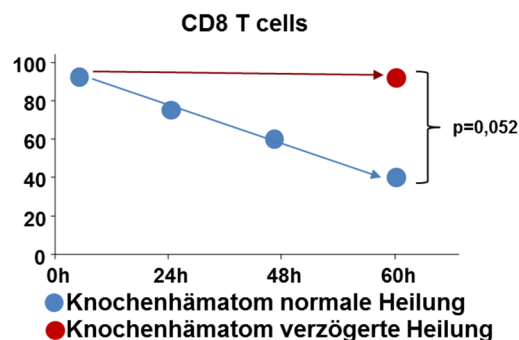


Abbildung 9: In der initialen Heilungsphase nimmt der Anteil der CD8 T Zellen in einer normalen Heilung stetig ab, in der verzögerten Heilung ist der CD8 Anteil 60 Stunden nach Trauma noch auf dem Level, das eine Stunde nach Trauma im Hämatom vorliegt. Dadurch unterscheiden sich die CD8 Anteile zwischen einer normalen und einer verzögerten Heilung um $p=0,052$. (Darstellung des entscheidenden Ergebnisses aus (55))

Die Dysregulation der Entzündungsreaktion, mit einem hohen Anteil an pro-inflammatorischen CD8 T Zellen und einem signifikant veränderten Verhältnis der CD4:CD8 T Zellen, stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorherigen Analysen, wo eine verlängerte Pro-Inflammation mit der Heilungsverzögerung in Verbindung gebracht wurde, da die CD8+ T Zellen über ihre zytotoxischen Eigenschaften eher pro-inflammatorisch reagieren, während die regulatorischen, anti-inflammatorischen T Zellen bei den CD4+ Zellen zu finden sind.

Diese Studie legt die Vermutung nahe, dass die CD8 positiven T Zellen einen negativen Effekt auf die Knochenheilung haben.

Zeitgleich mit diesen Analysen wurde in einer klinischen Studie, in die Patienten mit einer Tibiakopffraktur eingeschlossen wurden, die Knochenheilung über einen definierten Zeitraum überwacht (36). Dabei wurden nicht nur radiologische Verfahren angewandt, sondern auch die Wiedererlangung der Funktion über die Belastung der verletzten Gliedmaße mittels Bodenreaktionskraftmessung analysiert. So wurde eine Gruppe von Patienten identifiziert, die normal

und eine weitere, die verzögert heilt. Den Patienten wurde während der Heilungszeit Blut abgenommen, das auf die zelluläre Zusammensetzung hin untersucht wurde. Es zeigte sich, dass die Patienten, die eine verzögerte Heilung aufwiesen, einen signifikant höheren Anteil an terminal differenzierten CD8 positiven T Zellen aufwiesen im Vergleich zu den normal heilenden Patienten (36).

Dies schien unsere Hypothese, dass CD8 T Zellen einen negativen Einfluss auf die Knochenheilung haben, zu bestätigen.

Um diese Annahme weiter zu untermauern wurden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigten, dass diese Zellen besonders hohe Level der pro-inflammatorischen Zytokine TNFa (tumor necrose factor alpha) und IFNg (interferon gamma) aufweisen (36). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Zytokine die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stamm-/ Stromazellen hemmen (36). Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich diese terminal differenzierten CD8 T Zellen im Frakturhämatom ansammeln und somit für eine erhöhte pro-inflammatorische Reaktion verantwortlich sein könnten (36).

Um diese Ergebnisse weiter zu festigen wurde die Knochenheilung im standardisierten Maus Osteotomiemodell untersucht. Die Maus als Modell bietet den Vorteil, dass Immunzellpopulationen gezielt manipuliert werden können. Wir nutzen in unserer Analyse eine Kontrolle, die in dem Beobachtungszeitraum von 21 Tagen keine vollständige Heilung zeigt, so dass eine Heilungsverbesserung zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden kann. Dazu wurde der Mausfemur osteotomiert, so dass ein 0,7mm breiter Spalt entstand und es erfolgte eine Fixation mit einem stabilen externen Fixateur (MausExFix, RIsystem, Davos).

Im Zuge dieser Untersuchung wurde deutlich, dass die „normale“ Labormaus, die in einer spezifisch Pathogen (SPF/WT) freien Umgebung gehalten wird und dadurch einen geringen Kontakt mit Antigenen hat, ein adaptives Immunsystem hat, welches einen geringen Anteil an Effektor Memory Zellen aufweist. Die Patientenstudie hatte aber gezeigt, dass die terminal differenzierten CD8 T Zellen und damit Effektor Memory CD8 T Zellen in den verzögert heilenden Patienten erhöht waren. Daher wurden die Mäuse für unsere Untersuchungen mindestens 4 Wochen vor der Osteotomie aus der SPF-Haltung genommen und vor die Barriere gesetzt (non-SPF/WIexp). Der Publikumsverkehr erfolgte nun ohne Kleiderwechsel, Mundschutz oder Haube, und der Raum befand sich neben den Schaf- und Schweinehaltungen unserer tierexperimentellen Abteilung. Dadurch gelang es den Anteil an Effektor-Memory CD8 T Zellen in den Tieren zu erhöhen, ohne dass die Tiere dadurch gesundheitlich beeinträchtigt waren (13). Diese Veränderung des Effektor-Memory T Zellpools führte auch zu einer Veränderung des Heilungspotentials in unseren Kontrolltieren. Die Tiere, die vor der Barriere gehalten wurden und dadurch eine Immunzellzusammensetzung hatten, die der eines Patienten eher entsprach als eine SPF Labormaus, zeigten eine im micro Computertomograf sichtbare Verringerung des Knochenvolumens im Verhältnis zum gesamten Gewebevolumen (BV/TV) und eine geringere Knochendichte im heilenden Frakturspalt (13).

Die drei Gruppen in unserem Experiment sind die non-SPF Kontrolle (WTextp), eine zweite Gruppe, die zum Zeitpunkt der Osteotomie durch eine Depletion mittels Antikörper keine CD8 T Zellen hat (CD8-) und die daher eine verbesserte Knochenheilung aufweisen sollte, wenn unsere Hypothese, dass CD8 T Zellen die Knochenheilung verschlechtern, stimmt, und eine dritte Gruppe, der vor der Osteotomie über einen adaptiven Transfer zusätzlichen CD8 T Zellen gegeben werden als negative Kontrolle (CD8+). Bei Depletion der CD8 positiven T Zellen in der frühen Heilungsphase war es möglich, die Knochenheilung signifikant zu verbessern. Gleichzeitig war die Knochenheilung signifikant verschlechtert, wenn CD8 positive T Zellen über einen adaptiven Transfer erhöht wurden (Abbildung 10) (36).

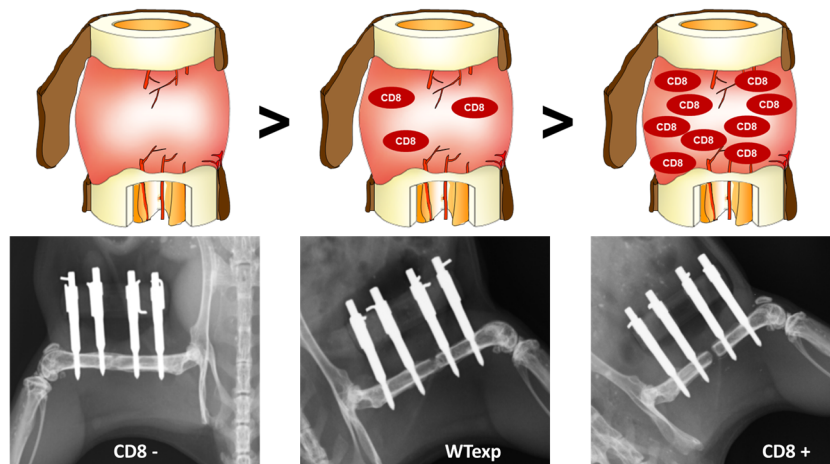


Abbildung 10: Die Untersuchung in einem Maus Osteotomie Modell zeigte, dass die Knochenheilung bei einer geringen CD8 T Zellpopulation zum Zeitpunkt der Knochenverletzung das beste Heilungsergebnis aufwies (Grafische Darstellung eines Ergebnisses aus (36)).

Diese Untersuchungen zeigen, dass eine spezifische Subpopulation der CD8 positiven T Zellen einen negativen Effekt auf die Knochenheilung haben. Diese terminal differenzierten / Effektor Memory T Zellen sind besonders bei einem erfahrenen Immunsystem, welches mit einer Vielzahl von Antikörpern in Kontakt getreten ist, stark ausgeprägt. Dies trifft unter anderem für ältere Patienten zu (Abbildung 11).

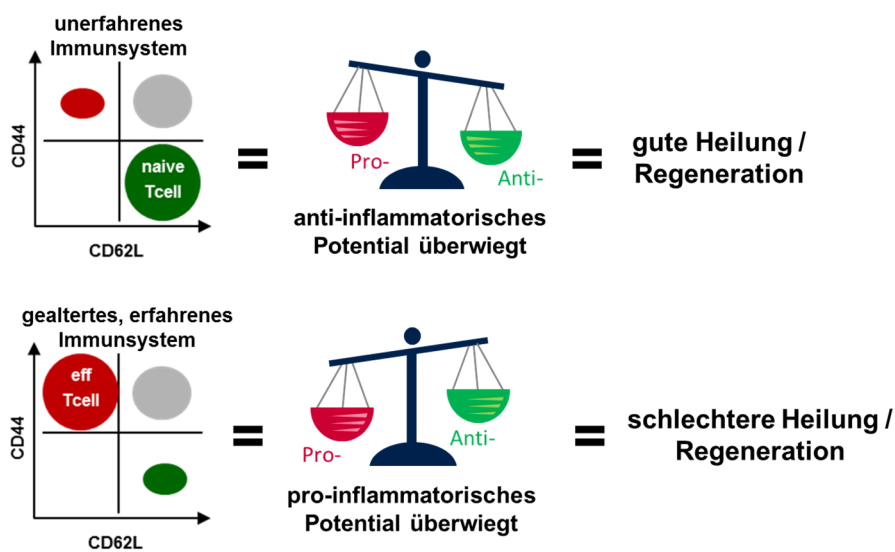


Abbildung 11: Das junge, unerfahrene Immunsystem zeichnet sich durch einen hohen Anteil an naiven T Zellen aus (CD44 negative CD62L positive T Zellen), der Organismus hat noch nicht so viele Antigene gesehen und dementsprechend weniger Effektor-Memory T Zellen ausgebildet. Daher herrscht im Organismus ein weniger pro-inflammatorisches Milieu und bei Verletzungen gibt es ein hohes Heilungspotential. Mit dem Alter und der Antigenexposition nimmt der Anteil der Gedächtniszellen, der Effektor-Memory T Zellen (CD44 positive CD62L negative T Zellen) stetig zu, gealtertes-erfahrenes Immunsystem, das Milieu wird deutlich pro-inflammativ und das Heilungspotential nimmt ab.

Die Tatsache, dass sich die Knochenheilung durch die Depletion von CD8 positiven T Zellen in der Maus verbessern lässt, legt den Schluss nahe, dass in Patienten mit einem hohen Anteil an terminal differenzierten T Zellen die Knochenheilung über eine Immunmodulation verbessert werden kann. Die Untersuchung einer Immunmodulation zur Verbesserung der Knochenheilung ist inzwischen in den Fokus der osteoimmunologischen Forschung gerückt (64). Die Ergebnisse dieser Studie haben zu einem Patent geführt, welches über die Bestimmung des Anteils an terminal differenzierten T Zellen im peripheren Blut die Identifizierung von Patienten erlauben wird, die ein erhöhtes Risiko für

eine verzögerte Knochenheilung haben.

Immunmodulation als neue Therapieoption

Der Knochenheilungsprozess rekapituliert bis zu einem gewissen Grad den embryonalen Entwicklungsprozess des knöchernen Skelettes (61). Folglich ist dies ein Prozess, der auf einer komplexen Interaktion verschiedener Zelltypen und auf einer Vielzahl von fein abgestimmten zellulären Prozessen beruht. Gerstenfeld et al. haben 2003 eine Studie veröffentlicht, in der eine Vielzahl von molekularen Prozessen der Knochenheilung anhand von Expressionsanalysen dargestellt wurde (61). Betrachtet man die Zytokinmuster, so wird deutlich, dass Zytokine im Laufe der Knochenheilung spezifisch hoch und runterreguliert werden. Nimmt man z.B. TNFa, so ist dieses Zytokin in der initialen Heilungsphase präsent, wird dann jedoch vollständig runterreguliert, um während des Überganges der Geflechtknochenphase hin zum Remodeling und der Wiederherstellung der mechanisch regulierten Knochenform wieder hochreguliert zu werden. Die enge Regulierung dieses Zytokins wird noch deutlicher, wenn Studien herangezogen werden, die TNFa moduliert haben. Wird TNFa während der frühen Knochenheilungsphase ausgeschaltet, so wurde die Knochenheilung nicht initiiert (76, 77). Geringe Dosen TNFa sind in dieser Phase notwendig, um Vorläuferzellen in das Heilungsgebiet zu steuern (78). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass hohe Dosen TNFa die Osteoblastendifferenzierung stören und damit einen hemmenden Effekt auf die Knochenheilung ausüben (79, 80). Diese Dichotomie der inflammatorischen Zytokine, die einerseits die Knochenformation fördern und andererseits die Knochenheilung stören oder dessen Abbau begünstigen, findet man mehrfach. IFNg wird als Zytokin beschrieben, welches die Knochenresorption durch eine Steigerung der RANKL und TNFa Produktion durch T Zellen verstärkt (81), aber auch als eine Zytokin, welches über eine Aktivierung von TLRs (toll like receptor) die Osteoklastogenese und damit die Resorption hemmen kann (82). In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die terminal differenzierten CD8 positive T Zellen ein hohes Maß an TNFa und IFNg exprimieren, und dass diese beiden Zytokine in Kombination besonders effektiv die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen hindern kann (36). Im weiteren Verlauf unserer Forschung konnten wir aber auch zeigen, dass eine Beeinflussung der Immunreaktion zum frühen Zeitpunkt der Knochenheilung die Knochenheilung verbessern kann. In einem „proof of concept“ Experiment wurden die Zytokine IL4 und IL13 genutzt, um die Immunreaktion früh in eine M2/Th2 Antwort zu steuern. IL4 und IL13 sind Zytokine, die die Makrophagenpolarisation von den pro-inflammatorischen M1 Makrophagen hin zu den regulatorischen M2 Makrophagen induzieren (83, 84), und M2 Makrophagen sind essentiell für die Gewebsregeneration (85). Gleichzeitig regulieren IL4 und IL13 die pro-inflammatorische Signalgebung herunter (86), was ihren Einsatz in der frühen Knochenheilungsphase sinnvoll macht. Wir konnten die Knochenformation signifikant verbessern durch den Einsatz von IL4 und IL13 in der initialen Heilung (44). Besonders interessant ist dieser Ansatz, da im Alter die Gewichtung M1:M2 zugunsten der M1 Makrophagen verschoben ist und diese verstärkt TNFa produzieren (87). Diese Betrachtungen machen deutlich, dass ältere Patienten aufgrund ihrer Immunzellzusammensetzung: Hohe Anteile von pro-inflammatorischen terminal differenzierten CD8 positiven T Zellen, die über eine jahrelange Antigenexposition entstanden sind und eines verstärkten Anteils an pro-inflammatorischen M1 Makrophagen – der eine Verschlechterung des Knochenheilungspotentials bedingt,- von einer therapeutischen Immunmodulation zur Verbesserung der Knochenheilung profitieren könnten.

Die bisherige Betrachtung legt nahe, dass es in unserem Immunsystem Zellen gibt, die sich negativ auf die Knochenheilung auswirken. Wenn dies der Fall ist stellt sich die Frage, ob es auch Zellen gibt, die „dagegenhalten“ und damit als Immunzellen angesehen werden können, die die Knochenheilung unterstützen. Eine Immunzellpopulation, die als anti-inflammatorisch gilt, ist die CD4 positive regulatorische T Zelle (Treg). Tregs regulieren überschießende Immunantworten und sind für die Immun-Homöostase wichtig (88). Es konnte gezeigt werden, dass Tiere, die einen hohen Anteil an Tregs besitzen, über eine erhöhte Knochenmasse verfügen, was dafürspricht, dass diese Zelle die Knochenformation unterstützt (89). Dies könnte über eine Eindämmung der pro-inflammatorischen

Reaktion die Knochenheilung verbessern (90, 91). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Kombination von einer Erhöhung der Tregs und einer Applikation von Stammzellen die Knochenheilung fördern konnte (92, 93). In unserem Versuch zur Verbesserung der Knochenheilung durch eine Depletion der CD8 T Zellen ist bei der Überprüfung der Immunzellzusammensetzung aufgefallen, dass auch die Tregs reduziert waren in den Tieren, die keine CD8 T Zellen hatten (unpublizierte Daten). Dies deutet darauf hin, dass diese Zellsubpopulationen sich als zelluläre Gegenspieler gegenseitig regulieren, und dass die Tregs in einem System, in dem proinflammatorische Zellen aktiv sind, die den regenerativen Prozess hindern könnten, hochreguliert werden, um diesem Effekt entgegenzuwirken. Damit würden sich Tregs als immunmodulatorisches Therapeutikum anbieten. Allerdings deutet eine solche Abhängigkeit auch an, dass der Empfänger einer solchen Therapie auf seine Immunzellzusammensetzung und die zu erwartende Immunreaktion hin untersucht werden muss, um die richtige Therapiedosis abzuwägen. Weiterhin muss auch der Zeitpunkt der Therapie abgestimmt sein auf die Heilungsphase, die für die Therapie den besten Ansatzpunkt bietet (94).

Die osteoimmunologische Forschung bietet somit Ansatzpunkte für neue therapeutische Optionen, die besonders im Hinblick auf die alternde Bevölkerung von Interesse sind (7). Der Einsatz immunmodulatorischer Strategien muss jedoch sehr genau abgestimmt werden, sowohl auf den Heilungsprozess, als auch auf den individuellen Patienten, wenn er aussichtsreich sein soll.

Ursache und Wirkung

Ein häufig auftretender Diskussionspunkt der hier vorgestellten Forschung ist die Frage, ob zunächst die verzögerte Knochenheilung (z.B. induziert durch die mechanisch instabile Fixation) oder die erhöhte CD8 T Zell Population vorhanden war. Was also ist Auslöser und was ist Folge in dem Zusammenhang der Erkenntnis, dass eine verzögerte Heilung mit einer erhöhten CD8 T Zell Population einhergeht. Die ersten Untersuchungen, bei der wir eine verzögerte Heilung mittels einer mechanisch instabilen Fixation herstellten, konnten diese Frage in der Tat nicht beantworten. Die instabile Mechanik wird die Neubildung der Blutversorgung erschweren und dadurch die Heilung verzögern, außerdem werden neue Gefäße bei erhöhter mechanischer Verformung wieder geschädigt werden, ein Prozess, der ebenfalls die Entzündung verlängert. Auffallend bei diesem Versuch war, dass die Immunzellpopulation, die im Vergleich zur normalheilenden Kontrollgruppe vornehmlich durch diese Prozesse verändert war, die CD8 positive T Zell Population war. Die Versuche im Maus Osteotomie Modell haben dann die Tatsache, dass die CD8 Zellen die Heilung verzögern, weiter erhärtet. In diesen Versuchen waren die unterschiedlichen Gruppen alle gleich fixiert, die Gruppen unterschieden sich lediglich in ihrem Gehalt an CD8 T Zellen. Eine Verbesserung der Heilung war deutlich, wenn zum Zeitpunkt der Osteotomie diese Zellen mittels Antikörper depletiert waren. Knock-Out Modelle wurden absichtlich nicht eingesetzt, da das Immunsystem die fehlenden Zellpopulationen oft durch eine Anpassung der verbleibenden Immunzellsubpopulationen ausgleicht (RAG -/- Tiere, die keine reifen T und B Zellen haben, haben z.B. eine veränderte NK Zellantwort (95)). Daher wurde in diesem Ansatz bewusst eine Depletionsstrategie verwandt. Die Depletion wurde über eine FACS Untersuchung bestätigt und diese zeigte, dass die CD8 T Zellen tatsächlich zum Zeitpunkt der Osteotomie nicht vorhanden waren. Im Laufe des Heilungsverlaufes (21 Tage) erholte sich die CD8 Population wieder, war aber auch zum Zeitpunkt der Finalisierung der Tiere noch signifikant niedriger als in den Kontrolltieren(36). Der Unterschied in den Tieren der beiden experimentellen Gruppen lag demzufolge nur in der Immunzellzusammensetzung, welche somit für den veränderten Heilungsverlauf verantwortlich gemacht werden konnte. Die klinische Kohorte, die hier referiert wird, bestand aus 15 Patienten, die aufgrund ihrer funktionellen Wiederherstellung und der konventionellen röntgenologischen Überwachung in eine gut-heilende und eine verzögernd-heilende Gruppe eingeteilt wurden (36). Hier konnte gezeigt werden, dass der Unterschied in der Immunzellzusammensetzung signifikant war in Bezug auf die CD8 T Zellpopulation und dass diese hohen CD8 T Zell Anteile von der Fraktur unabhängig waren. D.h. ein Patient mit einem systemischen

hohen terminal differenzierten CD8 T Zell Anteil ist ein Patient mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine verzögerte Knochenheilung.

Zusammengefasst ergibt dies ein sehr starkes Argument dafür, dass tatsächlich die Veränderung in der CD8 positiven T Zellpopulation als Ursache für eine verzögerte Knochenheilung stichhaltig ist. Dabei ist nicht auszuschließen, dass die Veränderung der Immunzellzusammensetzung nur ein Faktor in einer multifaktoriellen Ursachenkette ist, die die Knochenheilung stört.

Das hier dargestellte Vorgehen Forschung, die experimentelle *in vivo* Arbeiten mit klinischen Beobachtungen am Patienten verbindet und diese über *in vitro* Studien absichert, führte zu einem Kommentar von Dr Edwin Horwitz (Nationwide Childrens Hospital, Columbus) in der Zeitung: Science Translational Medicine, in dem er diesen Ansatz als ideal bezeichnet für transnationale Forschung in der regenerativen Medizin (96).

Herausforderung an Modellsysteme

Während unserer Arbeit zum besseren Verständnis der Interaktion des Knochen- und Immunsystems wurde sehr deutlich, dass die *in vivo* Untersuchungen sehr stark von dem „richtigen“ Tiermodell abhängen. Unsere Analysen wurden zunächst im Schaf durchgeführt. Da dies landwirtschaftliche Nutztiere waren und wir nur ausgewachsene Tiere eingesetzt haben, hatten diese Tiere ein gut ausgeprägtes Gedächtnis der adaptiven Immunität. Das gleiche galt auch für die Patienten, die bei der Identifizierung der für die Knochenheilung schädliche Immunzellpopulation herangezogen wurden. Bei dem Versuch der Übertragung unserer Erkenntnisse in das Mausmodell zur besseren Analyse des zugrundeliegenden Mechanismus stießen wir aber auf unerwartete Schwierigkeiten. Für Labortiere gilt, dass zur besseren Standardisierung und vor allem auch aus Hygienegründen die Tiere weitgehend sauber/ steril zu halten sind. Ein Tiermodell gilt immer noch als besonders gut, wenn die Tiere „rein“ gehalten werden. Damit schaffen wir aber im Hinblick auf das Immunsystem einen artifiziellen Organismus, der, egal welches Alter er erreicht im Hinblick auf das Immunsystem immer einem sehr jungen entspricht. Für die Untersuchung der Gewebsheilung und jegliche Studien der Regeneration in diesen Tiermodellen vernachlässigen wir damit einen wichtigen Faktor, der für die spätere Übertragung hin zum Patienten essentiell ist. Entgegen großer Skepsis gelang es uns, in der Tierhaltung einen Mausraum zu etablieren, in dem die Tiere nicht so „rein“ gehalten werden. Durch das Verbringen der Tiere vor die Barriere, die keinen Kleider- und Schuhwechsel, keine Haube-, Maske-, Kittelnutzung und keine Desinfektion der Hände beinhaltet, in unmittelbare Nachbarschaft zu den Schafs- und Schweinhaltungsräumen, dem Flur der Ratten-, Meerschwein- und Kaninchenhaltung, waren die Mäuse innerhalb von 4 Wochen einer genügend hohen Anzahl von (nicht krankheitsverursachenden) Pathogenen ausgesetzt, so dass das Immunsystem einen höheren Anteil an Effektor Memory T Zellen aufwies. Entgegen aller Erwartungen schnitten diese Tiere bei der üblichen Gesundheitsüberwachung der Versuchstiere nach dem FELASA Standard besser ab als die Tiere, die hinter der Barriere gehalten wurden – ihr Immunsystem hatte gelernt, mit Stressoren umzugehen. Erst diese Umstellung des Tiermodells ermöglichte uns die Analyse der Auswirkungen des adaptiven Immunsystems auf die Knochenheilung. Inzwischen nutzen wir diese „exponierte“ Maus wenn immer möglich für unsere Knochenheilungsanalysen, wobei eine ständige Überwachung der Immunzellzusammensetzung der Tiere erforderlich ist, da die Pathogenexposition in diesem System nicht standardisiert ist. Kürzlich hat ein renommierter Wissenschaftler – Stephen Badylak (Professor of Surgery at the McGowan Institute for Regenerative Medicine in Pittsburgh, Pennsylvania, und stellvertretender Direktor von npj Regenerative Medicine) - einen „Outlook“ in Nature publiziert und darin ebenfalls betont, dass wir das Immunsystem in unserer Forschung bedenken müssen, um näher am Patienten zu forschen (97): *„Then there is the immune system: the body's highly regulated method for orchestrating processes such as ... repair and reconstruction. ... but the tissue-engineering community has tended to conduct studies in immunocompromised rodent models that fail to take into account the potential effect of these factors on downstream clinical outcomes.“*

Ausschalten des adaptiven Immunsystems? Warum ist dies keine gute Idee?

Die bisherigen Betrachtungen könnten zu dem Schluss leiten, dass eine Eradikation des adaptiven Immunsystems in der regenerativen Heilung das regenerative Potential soweit steigern könnte, dass eine vollständige Wiederherstellung des verletzten Gewebes wieder möglich wäre. Abgesehen davon, dass dieses Vorgehen den Organismus für eine Infektion sehr anfällig machen würde, ist die Annahme, dass sich die Evolution „geirrt“ haben sollte bei der Ausbildung des in höheren Organismen vorherrschenden Immunsystems, unwahrscheinlich.

Eine Untersuchung der Knochenformation in Tieren, die keine reifen T und B Zellen haben (RAG-/-Mausmodell), hat gezeigt, dass die Mineralisierung in diesen Tieren im Knochendefekt früher erfolgt als in Tieren, die über funktionelle T und B Zellen verfügen (43). Dies legte den Gedanken nahe, dass die eigentliche Mineralisierung nicht der kritische Punkt bei der Knochenheilung darstellt. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass wir im Körper tatsächlich unerwünschte Mineralisierung finden, z.B. Gefäßverkalkungen (98) oder Steinbildung im Harntrakt (99). Wenn also ohne T und B Zellen die Mineralisierung während der Knochenheilung „unkontrollierter“ abläuft, haben diese Zellen des adaptiven Immunsystems dann vielleicht eine Funktion bei der Steuerung der Ablagerung der Extrazellulärmatrix während der Knochenheilung? Eine genauere Untersuchung ergab, dass die T Zellen des adaptiven Immunsystems die Lokalisation/ Verteilung der Osteoblasten(-vorläufer) (Osteocalcin positive Zellen) im Frakturkallus beeinflussen und das Muster der Kollagen I Formation im Kallus deutlich verändert ist wenn diese Zellen fehlen (43). Dies beeinflusst die Mineralisierung, da das Kollagen als Scaffold für die Ablagerung des Hydroxyapatits dient (100). Tatsächlich konnten wir zeigen, dass die Knochenqualität ohne T und B Zellen eine höhere Frakturanfälligkeit vermuten lassen, da ihnen die Elastizität fehlte, die die Wildtypknochen auszeichnete (43). Die Beteiligung der T Zellen an der optimalen Knochenstruktur wird auch dadurch gestützt, dass diese Zellen besonders häufig in der Remodelingphase von heilendem Knochen zu finden sind (42).

Erstaunlicherweise ist auch die regenerative Fähigkeit im Menschen hoch, solange das Immunsystem unerfahren ist. So ist bekannt, dass im ersten Drittel der Schwangerschaft Wunden ohne Narbenbildung heilen (101), und bei Kindern kann man eine vollständige Wiederherstellung abgetrennter Fingerglieder feststellen, bis sie ca. 11 Jahre alt sind (102). In beiden Fällen ist das Immunsystem noch naiv – man kann also davon ausgehen, dass das naive adaptive Immunsystem keine negativen Auswirkungen auf die Knochenheilung hat. Dies wird auch unterstützt durch eine unserer Studien, in der wir naive CD31 positive periphere Blutzellen (die eine Vielzahl von naiven Immunzellen enthalten) in einen Frakturspalt in einem Ratten Osteotomiemodell gegeben haben und so in der Lage waren, die Knochenheilung zu verbessern (60).

Schlussfolgern kann man aus diesen Überlegungen, dass das adaptive Immunsystem für die Knochenformation wichtig ist, und nur ein erfahrenes Immunsystem mit einem ausgeprägten Immungedächtnis eine negative Auswirkung auf die Heilung hat, so dass ein Therapieansatz darauf abzielen sollte, die negative Reaktivität erfahrener Immunzellen (z.B. terminal differenzierter CD8 positiver Zellen) einzudämmen. Ein Forschungsschwerpunkt unserer Gruppe liegt daher zurzeit darauf zu untersuchen, wie die Aktivierung dieser Gedächtnis T Zellen im Zuge einer Knochenverletzung abläuft, um mögliche Ansatzpunkte für deren Regulation zu finden.

Wie hat sich das Bild der Knochenheilung in den letzten Jahren verändert

Unsere Untersuchung der frühen Knochenheilungsphase hat gezeigt, dass schon in dieser Zeit eine Vielzahl von Prozessen abläuft, die für das spätere Heilungsergebnis wichtig sind (19, 103). Eine Verlängerung der pro-inflammatorischen Reaktion am Beginn der Heilung kann zu einer Verzögerung führen, und so die Heilung beeinträchtigen. Die Beendigung dieser Reaktion ist also ein wichtiger Schritt in der Frakturheilung, auch weil er einhergeht mit der Initiation der Revaskularisierung, die ein weiterer essentieller Schritt hin zu einer erfolgreichen Heilung ist.

Das Bild der Knochenheilung würde damit um eine weitere Phase ergänzt werden, die bisher keine

Beachtung gefunden hat, eine Anti-inflammatorische Phase. Der Ablauf der Knochenheilung würde damit in 5 Schritte gegliedert werden: Hämatom und Entzündungsphase – Anti-inflammatorische und angiogene Phase – knorpelige Phase des weichen Kallus – Geflechtknochen und harte Kallus Phase – Remodelingphase zur Wiederherstellung der mechanisch diktierten Knochenform (Abbildung 12).

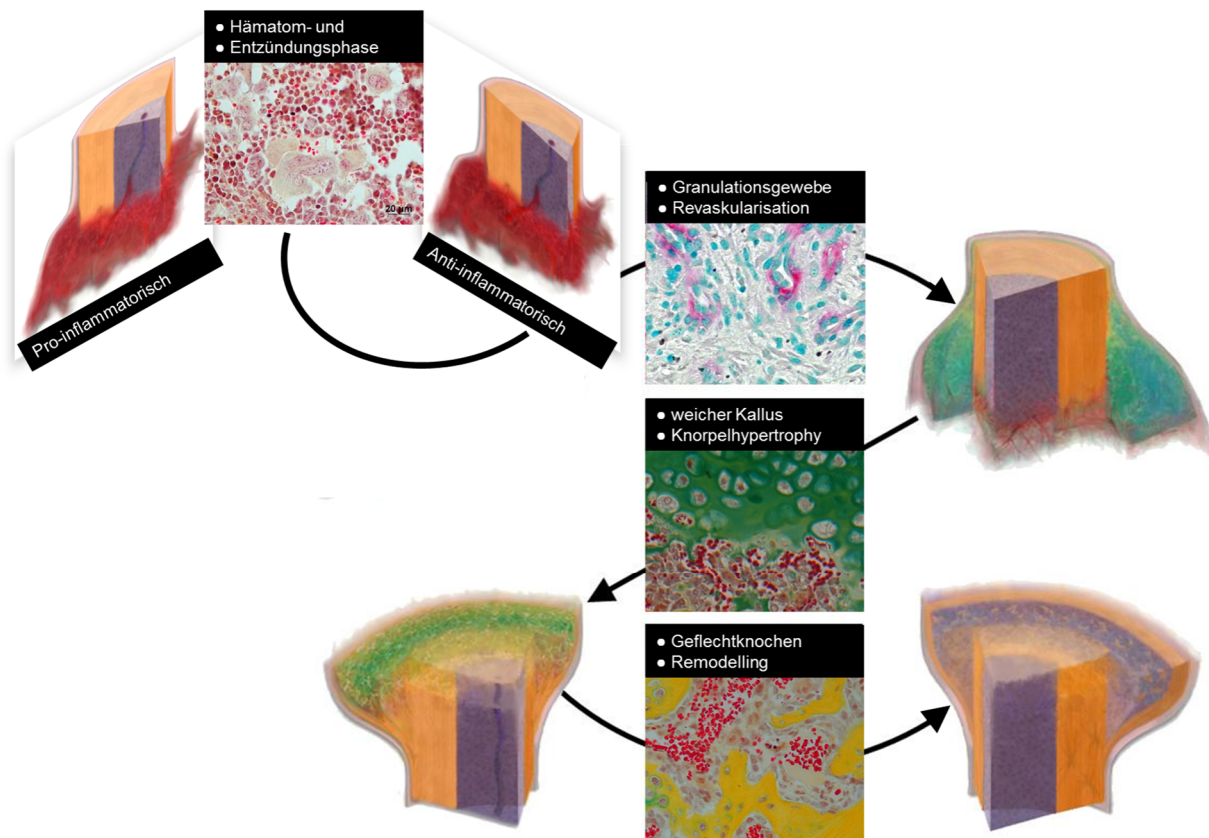


Abbildung 12: Die Untersuchung der frühen Knochenheilungsphase hat dazu geführt, dass unser Verständnis der Knochenheilung verändert wurde. Die in Abbildung 4 dargestellte Knochenheilungssequenz wird um eine weitere Phase ergänzt. Die Knochenheilung ist dargestellt in einem Frakturkallus, der in Viertel zerlegt und jedem Viertel eine Phase zugeordnet wurde. Das ehemals der Hämatom- und Entzündungsphase vorbehaltene Viertel ist weiter unterteilt und die neue Phase der Anti-Inflammation und Angiogenese wurde eingefügt. Die Farben der Gewebe sind einer Movat Pentachrome Färbung angeglichen, die ebenfalls in den histologischen Einschüben in der Mitte zugrunde liegt. Dargestellt sind Hämatomphase (oben ganz links), Anti-inflammatorische Phase (oben links), weicher Kallus (oben rechts), harter Kallus (unten links) und die Remodellingphase (unten rechts). (Adaptiert nach (13)).

Die Bedeutung des adaptiven Immunsystems für die Knochenheilung wurde dargelegt mit besonderem Hinblick darauf, dass es hier sowohl vorteilhafte als auch nachteilige Immunzellen für die Knochenformation gibt. Deutlich wurde, dass die Erfahrung, das immunologische Gedächtnis, entscheidend für die Immunreaktion in der Knochenheilung ist. Eine „Verjüngung“ der Immunantwort könnte eine mögliche zukünftige Therapieoption darstellen (31, 104, 105). Dabei spielen die Immunzellzusammensetzung des Patienten eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit der Therapie, sowie der Zeitpunkt der Applikation, d.h. die Knochenheilungsphase, die durch die Therapie anvisiert wird (Abbildung 13).

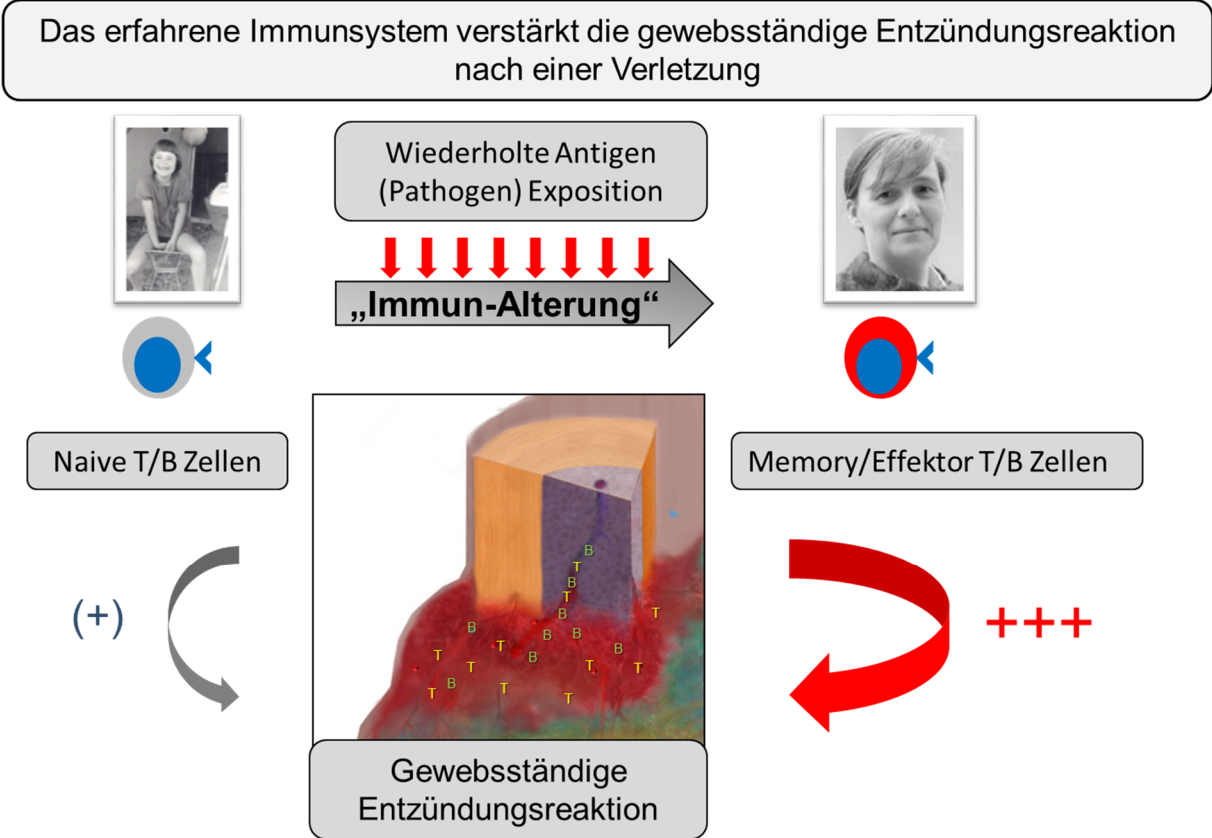


Abbildung 13: In einem jungen Individuum, das nur eine geringe Exposition von Pathogenen erfahren hat, ist ein großer Prozentsatz der Zellen des adaptiven Immunsystems noch naiv. Dies ändert sich im Laufe des Lebens, es sammeln sich immer mehr Effektor- und Gedächtniszellen im Körper, die eine optimale Abwehr von Pathogenen gewährleisten. Allerdings sind diese reaktiven Immunzellen auch in der Lage, die Entzündungsreaktion nach einer Verletzung wesentlich zu verstärken und so den Heilungsprozess zu verzögern. Dies wird auch als Inflamm-aging bezeichnet, was ausdrückt, dass mit fortschreitendem Alter das Milieu im Körper in steigender Masse pro-inflammatorisch wird (106).

Wie könnten zukünftige Therapien aussehen?

Zu Beginn unserer Studien zur Interaktion der Immunzellen in der Knochenheilung war dies ein neues, noch relativ unbekanntes Forschungsfeld, was inzwischen unter dem Begriff „Osteoimmunologie“ zusammengefasst wurde und internationale Bedeutung gewonnen hat (45). Die Betrachtung des adaptiven Immunsystems im Hinblick auf eine Verbesserung oder Verschlechterung der Knochenheilung ist allerdings immer noch ein oft vernachlässigter Aspekt der Osteoimmunologie. Dabei bietet eine Immunmodulation des adaptiven Systems Möglichkeiten für zukünftige Therapieansätze.

Eine gleichzeitige Hemmung der CD8 positiven T Effektorzellen und Unterstützung der anti-inflammatorischen regulatorischen T Zellen ist ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung von immunmodulatorischen Strategien zur Verbesserung der Knochenheilung. Möglich ist dies z.B. durch eine Erhöhung des cAMP Spiegels im Verletzungsgebiet (91). Dies ließe sich z.B. durch eine lokale Verabreichung von Prostacyclinen erreichen, eine Möglichkeit, die wir präklinisch evaluiert und in ein Patent überführt haben (EP 171888134/ CH 833/2016). Diese Therapie kann besonders in älteren Patienten und Patienten, die einen hohen Anteil an CD8 positiven terminal differenzierten Effektor-Memory T Zellen aufweisen, für ein schnelleres Heilungsergebnis sorgen. Dazu kann eine Stratifizierung der Patientenkohorten mittels prognostischem Marker erfolgen, der ebenfalls aus Teilen dieser Studien heraus patentiert wurde (EP 13702481.6/ CH 592/2011).

Perspektive

Die Vielfältigkeit und die hohe Plastizität des Immunsystems machen ein Verständnis der Interaktion

der Immunzellen mit dem regenerativen Knochenheilungsprozess schwierig und lassen die Forschung interessant bleiben. Auch wenn wir erste Einblicke gewonnen haben, sind wir noch weit davon entfernt, den Prozess vollständig aufgeklärt zu haben. Diese Plastizität näher zu untersuchen wird eine wichtige Komponente in der zukünftigen Forschung sein. Beispielsweise ist ein sehr aktuelles osteoimmunologisches Forschungsthema die CD4 positive T Helferzelle 17 (Th17), eine weitere Zelle des adaptiven Immunsystems (107), die die Knochenheilung fördert (108), aber auch verantwortlich ist für pathologischen Knochenabbau (109). Diese Zelle exprimiert das Leitzytokin IL17, welches ebenfalls ambivalent diskutiert wird: als Faktor, der Osteoblasten inhibiert (110) oder dessen Differenzierung fördert (111). Die genaue Rolle der Th17 Zellen und der IL17 Wirkung während der Knochenheilung zu entschlüsseln ist besonders interessant, da diese Immunzellsubpopulation unter bestimmten Milieuvoraussetzungen einem Phänotypenwechsel zu einer Treg unterlaufen kann (und vice versa), einer Zelle also, die wir als knochenheilungsfördernd eingestuft haben (112-115). Ein besseres Verständnis dieser Wandelbarkeit der Immunzellen in Abhängigkeit der Knochenheilungsphasen wird nötig sein, um eine immunmodulatorische Therapie sicher anwenden zu können. Eine solche Therapie aber wird mit der immer älter werdenden Bevölkerung und der stark wachsenden Patientenkohorte der muskuloskeletal Erkrankten ein wichtiges Thema der nahen Zukunft sein.

4. Zusammenfassung

Die Wechselwirkungen des Immun- und Knochensystems gewinnen immer größere Bedeutung. Das spannende Feld der Osteoimmunologie wurde hier anhand der frühen Knochenheilungsphase untersucht. Diese zeichnet sich durch eine Entzündungsphase aus, die die vollständige Heilung und damit eine Regeneration des Knochens initiiert. Schon in den ersten Tagen der Heilung entwickelt sich im Hämatom ein angiogenes und ein osteogenes Potential. Das allerdings erfolgt nur dann optimal, wenn die Entzündungsphase streng kontrolliert abläuft und zeitgerecht terminiert wird. Eine verstärkte oder verlängerte Inflammation kann zu einer Heilungsverzögerung bei der Knochenregeneration führen.

In Studien am Großtier (Schaf), an der Maus und an einer kleinen klinischen Kohorte konnte dargestellt werden, dass es spezifische Immunzellsubpopulationen gibt, die die Knochenheilung nachteilig beeinflussen. Die CD8 positiven T Zellen, und hier besonders die Effektor- und Gedächtniszellen, waren in verzögerten Knochenheilungsmodellen vermehrt vorhanden und zeigten auch einen signifikant höheren Prozentsatz im peripheren Blut verzögert heilender Patienten.

Dies hat besondere Bedeutung, da diese Zellpopulation mit dem Alter zunimmt. Besonders in der Patientenkohorte älterer Menschen mit Knochenschädigungen könnten Effektor Memory CD8 positive T Zellen für eine Heilungsverzögerung verantwortlich sein. Hier eröffnet sich ein neues Feld möglicher Therapieoptionen, die besonders in einer Zeit der demografischen Alterung bedeutsam werden könnten.

Immunmodulatorische Ansätze könnten helfen, die Knochenheilung zu verbessern. Eine Depletion der CD8 positiven T Zellen führte im Maus Osteotomie Modell zu einer verbesserten Heilung. Dies weist die Richtung für zukünftige Forschung, die im Idealfall lokal die Wirkung der für die Frakturheilung schädlichen Immunzellen unterbindet, während sie die übrigen, für die Knochenformation relevanten zellulären Populationen unbeeinträchtigt lässt oder sogar stärkt.

5. Literaturangaben

1. Blagosklonny MV. Why human lifespan is rapidly increasing: solving "longevity riddle" with "revealed-slow-aging" hypothesis. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(4):177-82.
2. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117-71.
3. Simm A, Sieber C. Treatment of elderly patients: The challenge of the future. *Exp Gerontol*. 2017;87(Pt B):137-8.
4. United States Bone and Joint Initiative: The Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States. 3rd ed: United States Bone and Joint Initiative; 2014.
5. Haas NP. [Callus modulation--fiction or reality?]. *Chirurg*. 2000;71(9):987-8.
6. Jakovljevic MM, Netz Y, Buttigieg SC, Adany R, Laaser U, Varjadic M. Population aging and migration - history and UN forecasts in the EU-28 and its east and south near neighborhood - one century perspective 1950-2050. *Global Health*. 2018;14(1):30.
7. Bucher C.H. LH, Duda G.N., Volk H.-D., Schmidt-Bleek K. . The Role of Immune Reactivity in Bone Regeneration. *Advanced Techniques in Bone Regeneration*. 2016.
8. de Vries R, Reininga IHF, Pieske O, Lefering R, El Moumni M, Wendt K. Injury mechanisms, patterns and outcomes of older polytrauma patients-An analysis of the Dutch Trauma Registry. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190587.
9. Kallinen M, Markku A. Aging, physical activity and sports injuries. An overview of common sports injuries in the elderly. *Sports Med*. 1995;20(1):41-52.
10. Stathokostas L, Theou O, Little RM, Vandervoort AA, Raina P. Physical activity-related injuries in older adults: a scoping review. *Sports Med*. 2013;43(10):955-63.
11. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*. 2000;408(6812):535-6.
12. Guntur AR, Rosen CJ. Bone as an endocrine organ. *Endocr Pract*. 2012;18(5):758-62.
13. Schlundt C. SH, Goodman S.B., Vunjak-Novakovic G., Duda G.N., Schmidt-Bleek K. Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration. *Journal of Experimental Orthopaedics*. 2015;2(1).
14. Frost HM. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. *Angle Orthod*. 1994;64(3):175-88.
15. Chen JH, Liu C, You L, Simmons CA. Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *J Biomech*. 2010;43(1):108-18.
16. Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Charité - Berlin, Julius Wolff Institut, Pro Business digital: G. Bergmann, G.N. Duda; 2010. 300 p.
17. Schlundt C, Bucher CH, Tsitsilonis S, Schell H, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Clinical and Research Approaches to Treat Non-union Fracture. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(2):155-68.
18. Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med*. 2000;28(9 Suppl):S77-80.
19. Schell H, Duda GN, Peters A, Tsitsilonis S, Johnson KA, Schmidt-Bleek K. The haematoma and its role in bone healing. *J Exp Orthop*. 2017;4(1):5.
20. Schmidt-Bleek K, Petersen A, Dienelt A, Schwarz C, Duda GN. Initiation and early control of tissue regeneration - bone healing as a model system for tissue regeneration. *Expert opinion on biological therapy*. 2014;14(2):247-59.
21. Weitzmann MN. Bone and the Immune System. *Toxicol Pathol*. 2017;45(7):911-24.
22. Granger N. SE. *Inflammation and the Microcirculation, Chapter 2: Historical Perspectives.*: Morgan & Claypool Life Science; 2010.
23. Schmidt-Bleek K, Kwee BJ, Mooney DJ, Duda GN. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015.
24. Natale G, Bocci G, Lenzi P. Looking for the Word "Angiogenesis" in the History of Health Sciences: From Ancient Times to the First Decades of the Twentieth Century. *World J Surg*. 2017;41(6):1625-34.

25. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res.* 2000(378):224-37.
26. Grinwald PM, Brosnahan C. Sodium imbalance as a cause of calcium overload in post-hypoxic reoxygenation injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19(5):487-95.
27. Gaber T, Schellmann S, Erekul KB, Fangradt M, Tykwinska K, Hahne M, et al. Macrophage migration inhibitory factor counterregulates dexamethasone-mediated suppression of hypoxia-inducible factor-1 alpha function and differentially influences human CD4+ T cell proliferation under hypoxia. *J Immunol.* 2011;186(2):764-74.
28. Gaber T, Haupl T, Sandig G, Tykwinska K, Fangradt M, Tschirschmann M, et al. Adaptation of human CD4+ T cells to pathophysiological hypoxia: a transcriptome analysis. *J Rheumatol.* 2009;36(12):2655-69.
29. Bosch TC. Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Dev Biol.* 2007;303(2):421-33.
30. Litman GW, Rast JP, Fugmann SD. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(8):543-53.
31. Harty M, Neff AW, King MW, Mescher AL. Regeneration or scarring: an immunologic perspective. *Dev Dyn.* 2003;226(2):268-79.
32. Schmidt-Bleek K, Schell H, Kolar P, Pfaff M, Perka C, Buttgerit F, et al. Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep. *J Orthop Res.* 2009;27(9):1147-51.
33. Schmidt-Bleek K, Schell H, Lienau J, Schulz N, Hoff P, Pfaff M, et al. Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012.
34. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, et al. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res.* 2009;27(9):1133-40.
35. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res.* 2012;347(3):567-73.
36. Reinke S, Geissler S, Taylor WR, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, et al. Terminally Differentiated CD8+ T Cells Negatively Affect Bone Regeneration in Humans. *Sci Transl Med.* 2013;5(177):177ra36.
37. Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen SE. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science.* 1972;177(51):793-5.
38. Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol.* 1985;135(4):2562-8.
39. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature.* 1986;319(6053):516-8.
40. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol.* 1990;145(10):3297-303.
41. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(4):292-304.
42. Konnecke I, Serra A, El Khassawna T, Schlundt C, Schell H, Hauser A, et al. T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion. *Bone.* 2014;64:155-65.
43. El Khassawna T, Serra A, Bucher CH, Petersen A, Schlundt C, Konnecke I, et al. T Lymphocytes Influence the Mineralization Process of Bone. *Frontiers in immunology.* 2017;8:562.
44. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone.* 2018;106:78-89.
45. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol*

Med. 2005;83(3):170-9.

46. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000;408(6812):600-5.
47. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999;402(6759):304-9.
48. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res*. 2004;19(1):147-54.
49. Abe T, Sato T, Kokabu S, Hori N, Shimamura Y, Sato T, et al. Zoledronic acid increases the circulating soluble RANKL level in mice, with a further increase in lymphocyte-derived soluble RANKL in zoledronic acid- and glucocorticoid-treated mice stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Cytokine*. 2016;83:1-7.
50. Ferrari-Lacraz S, Ferrari S. Do RANKL inhibitors (denosumab) affect inflammation and immunity? *Osteoporos Int*. 2011;22(2):435-46.
51. Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(11):3118-26.
52. Sturmer KM, Schuchardt W. [New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing (author's transl)]. *Unfallheilkunde*. 1980;83(7):341-5.
53. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br*. 1990;72(5):822-9.
54. Geissler S, Textor M, Schmidt-Bleek K, Klein O, Thiele M, Ellinghaus A, et al. In serum veritas-in serum sanitas? Cell non-autonomous aging compromises differentiation and survival of mesenchymal stromal cells via the oxidative stress pathway. *Cell death & disease*. 2013;4:e970.
55. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res*. 2011.
56. Schell H, Thompson MS, Bail HJ, Hoffmann JE, Schill A, Duda GN, et al. Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results. *J Biomech*. 2008;41(14):3066-72.
57. Hausman MR, Rinker BD. Intractable wounds and infections: the role of impaired vascularity and advanced surgical methods for treatment. *Am J Surg*. 2004;187(5A):44S-55S.
58. Loi F, Cordova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016;86:119-30.
59. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014;6(265):265sr6.
60. Sass FA, Schmidt-Bleek K, Ellinghaus A, Filter S, Rose A, Preininger B, et al. CD31+ Cells From Peripheral Blood Facilitate Bone Regeneration in Biologically Impaired Conditions Through Combined Effects on Immunomodulation and Angiogenesis. *J Bone Miner Res*. 2016.
61. 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.
62. Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, et al. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone*. 2003;33(6):889-98.
63. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Weber H, Bail HJ, Duda GN, et al. Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(1):191-9.
64. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008.
65. Filbin MT. How inflammation promotes regeneration. *Nat Neurosci*. 2006;9(6):715-7.

66. Sinder BP, Pettit AR, McCauley LK. Macrophages: Their Emerging Roles in Bone. *J Bone Miner Res.* 2015;30(12):2140-9.
67. Recknagel S, Bindl R, Kurz J, Wehner T, Schoengraf P, Ehrnthaller C, et al. C5aR-antagonist significantly reduces the deleterious effect of a blunt chest trauma on fracture healing. *J Orthop Res.* 2011.
68. Ramirez-GarciaLuna JL, Chan D, Samberg R, Abou-Rjeili M, Wong TH, Li A, et al. Defective bone repair in mast cell-deficient Cpa3Cre/+ mice. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174396.
69. Ciovacco WA, Cheng YH, Horowitz MC, Kacena MA. Immature and mature megakaryocytes enhance osteoblast proliferation and inhibit osteoclast formation. *J Cell Biochem.* 2010;109(4):774-81.
70. Feng S, Madsen SH, Viller NN, Neutzsky-Wulff AV, Geisler C, Karlsson L, et al. Interleukin-15-activated natural killer cells kill autologous osteoclasts via LFA-1, DNAM-1 and TRAIL, and inhibit osteoclast-mediated bone erosion in vitro. *Immunology.* 2015;145(3):367-79.
71. Soderstrom K, Stein E, Colmenero P, Purath U, Muller-Ladner U, de Matos CT, et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(29):13028-33.
72. Weitzmann MN. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica.* 2013;2013:125705.
73. Raggatt LJ, Wullschlegel ME, Alexander KA, Wu AC, Millard SM, Kaur S, et al. Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification. *Am J Pathol.* 2014;184(12):3192-204.
74. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood.* 2007;109(1):228-34.
75. Takayanagi H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(12):667-76.
76. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, et al. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res.* 2003;18(9):1584-92.
77. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, et al. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs.* 2001;169(3):285-94.
78. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1585-90.
79. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 2002;277(4):2695-701.
80. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology.* 2000;141(11):3956-64.
81. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, et al. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.* 2007;117(1):122-32.
82. Ji JD, Park-Min KH, Shen Z, Fajardo RJ, Goldring SR, McHugh KP, et al. Inhibition of RANK expression and osteoclastogenesis by TLRs and IFN-gamma in human osteoclast precursors. *J Immunol.* 2009;183(11):7223-33.
83. Kuroda E, Ho V, Ruschmann J, Antignano F, Hamilton M, Rauh MJ, et al. SHIP represses the generation of IL-3-induced M2 macrophages by inhibiting IL-4 production from basophils. *J Immunol.* 2009;183(6):3652-60.
84. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
85. Brown BN, Londono R, Tottey S, Zhang L, Kukla KA, Wolf MT, et al. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically

- derived surgical mesh materials. *Acta Biomater.* 2012;8(3):978-87.
86. Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol.* 1996;156(2):758-64.
87. Gibon E, Loi F, Cordova LA, Pajarinen J, Lin T, Lu L, et al. Aging Affects Bone Marrow Macrophage Polarization: Relevance to Bone Healing. *Regen Eng Transl Med.* 2016;2(2):98-104.
88. Kanamori M, Nakatsukasa H, Okada M, Lu Q, Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* 2016;37(11):803-11.
89. Zaiss MM, Axmann R, Zwerina J, Polzer K, Guckel E, Skapenko A, et al. Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum.* 2007;56(12):4104-12.
90. Zaiss MM, Frey B, Hess A, Zwerina J, Luther J, Nimmerjahn F, et al. Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis. *J Immunol.* 2010;184(12):7238-46.
91. Lei H, Schmidt-Bleek K, Dienelt A, Reinke P, Volk HD. Regulatory T cell-mediated anti-inflammatory effects promote successful tissue repair in both indirect and direct manners. *Frontiers in pharmacology.* 2015;6:184.
92. Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med.* 2011;17(12):1594-601.
93. Pilat N, Granofszky N, Wekerle T. Combining Adoptive Treg Transfer with Bone Marrow Transplantation for Transplantation Tolerance. *Curr Transplant Rep.* 2017;4(4):253-61.
94. Winkler T, SFA, Duda G.N., Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering. *Bone & Joint Research.* 2018(7):232-43.
95. Paust S, Senman B, von Andrian UH. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev.* 2010;235(1):286-96.
96. Horwitz EM. Advancing regenerative medicine the translational way. *Sci Transl Med.* 2013;5(177):177fs9.
97. Badylak S. Perspective: Work with, not against, biology. *Nature.* 2016;540(7632):S55.
98. Liberman M, Marti LC. Vascular Calcification Regulation by Exosomes in the Vascular Wall. *Adv Exp Med Biol.* 2017;998:151-60.
99. Rodger F, Roditi G, Aboumarzouk OM. Diagnostic Accuracy of Low and Ultra-Low Dose CT for Identification of Urinary Tract Stones: A Systematic Review. *Urol Int.* 2018.
100. Unal M, Creecy A, Nyman JS. The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2018.
101. Larson BJ, Longaker MT, Lorenz HP. Scarless fetal wound healing: a basic science review. *Plast Reconstr Surg.* 2010;126(4):1172-80.
102. Illingworth CM. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *J Pediatr Surg.* 1974;9(6):853-58.
103. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):427-34.
104. Sattler S, Rosenthal N. The neonate versus adult mammalian immune system in cardiac repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(7 Pt B):1813-21.
105. Baht GS, Silkstone D, Vi L, Nadesan P, Amani Y, Whetstone H, et al. Exposure to a youthful circulator rejuvenates bone repair through modulation of beta-catenin. *Nature communications.* 2015;6:7131.
106. Clark D, Nakamura M, Miclau T, Marcucio R. Effects of Aging on Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep.* 2017.
107. Ono T, Okamoto K, Nakashima T, Nitta T, Hori S, Iwakura Y, et al. IL-17-producing gammadelta T cells enhance bone regeneration. *Nature communications.* 2016;7:10928.
108. Ono T, Takayanagi H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep.*

2017;15(4):367-75.

109. Cho KA, Park M, Kim YH, Ryu KH, Woo SY. Mesenchymal stem cells inhibit RANK-RANKL interactions between osteoclasts and Th17 cells via osteoprotegerin activity. *Oncotarget*. 2017;8(48):83419-31.

110. Zhang JR, Pang DD, Tong Q, Liu X, Su DF, Dai SM. Different Modulatory Effects of IL-17, IL-22, and IL-23 on Osteoblast Differentiation. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5950395.

111. Wang Z, Tan J, Lei L, Sun W, Wu Y, Ding P, et al. The positive effects of secreting cytokines IL-17 and IFN-gamma on the early-stage differentiation and negative effects on the calcification of primary osteoblasts in vitro. *Int Immunopharmacol*. 2018;57:1-10.

112. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*. 2007;178(11):6725-9.

113. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008;29(1):44-56.

114. Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AM, Joosten I. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*. 2008;112(6):2340-52.

115. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood*. 2009;113(18):4240-9.

Danksagung

Ohne Dr. Hanna Schell und Dr. Jasmin Lienau wäre diese Arbeit nie zustande gekommen, da sie mir die Möglichkeit gaben, in ihrer Arbeitsgruppe am Julius-Wolff-Institut anzufangen. Nach einem rigorosen Vorstellungsprogramm inklusive eines Vortrages, in dem ich, noch ganz neu in der Thematik, meine Ideen darlegen sollte, wie ich ein noch völlig neues Thema wissenschaftlich angehen würde, sagten sie mir die Stellung an der Charité zu.

Prof. Dr. Georg Duda, gilt besonderer Dank, für die Überlassung eines sehr spannenden Forschungsthemas, das ich entwickeln und bearbeiten durfte, und für eine Zusammenarbeit, die nun schon das 10-jährige Jubiläum hinter sich gelassen hat, und die zukünftig hoffentlich noch zu weiteren interessanten wissenschaftlichen Erkenntnissen führen wird.

Prof. Dudas Institut bietet ein Arbeitsumfeld mit vielen spannenden Kollegen, und ich möchte allen Mitarbeitern danken für die kooperative Zusammenarbeit der letzten Jahre – hier alle zu nennen würde den Rahmen sprengen, daher sollte sich jeder angesprochen fühlen, wenn ich mich hier für die gute Zusammenarbeit bedanke.

Norma Schulz begleitet mich seit meinem ersten Tag hier am Institut und hat großen Anteil daran gehabt, die Arbeitsgruppe so aufzubauen, wie sie heute besteht; bei ihr möchte ich mich besonders bedanken.

Lil Ahrens danke ich sehr dafür, dass sie mir gezeigt hat, wie man mit Aufgeschlossenheit und Interesse eine positive Einstellung zu Arbeit und Leben erreicht – sie hat es vorgelebt, aber ich werde es nicht schaffen, es ihr gleichzutun.

Hinrich Ahrens hat wie kein anderer meinen Umgang mit Menschen und damit meine Kommunikation und das Miteinander mit Kollegen, Freunden und Familie geprägt – ein weiteres Vorbild, an dem ich mich orientieren darf.

Die LOA Company bereichert mein Leben unbeschreiblich und hat teilweise auch sehr aktiv an meiner wissenschaftlichen Arbeit teilgehabt – es ist schön, dass sie sich für die Wissenschaft begeistern – allen dreien gebührt Dank.

Und Chris – nun, jemand Besseren könnte es in meinem Leben nicht geben und ohne ihn wäre auch mein beruflicher Werdegang nicht möglich gewesen.

Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

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

.....
Datum

.....
Unterschrift