

**Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

**Evaluierung zellkulturbasierter Strategien
zur Optimierung von Proliferation und
osteogener Transdifferenzierung
humaner Fibroblasten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Daniel Eckhardt
(2016)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Suschek

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Mahotka

meiner Familie gewidmet

Abkürzungen

A. dest	destilliertes Wasser	IFN-γ	Interferon- γ
AKT	Bezeichnung für Genloci, welche für Serin/Threonin-Rezeptorkinasen kodieren	IκBα	<i>nuclear factor „kappa-light-chain gene enhancer in B-cells“ inhibitor alpha</i>
AP	alkalische Phosphatase	IU	<i>International Units</i>
APS	Ammoniumpersulfat	JNK	<i>c-JUN N-terminal Kinase</i>
ARS	<i>Alizarin Red staining</i> Alizarin Rot Färbung	JunB	Transkriptionsfaktor, welcher durch das Gen JUNB kodiert ist
α-SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>	K	Kontrolle
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> Bicinchonin-Säure	KCl	Kaliumchlorid
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>	kDa	kilo Dalton
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	LRP5	<i>Low density Lipoprotein Receptor-related Protein 5</i>
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>	MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
CaCl₂	Calciumchlorid	miRNA	<i>micro RNA</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
COX-2	Cyclooxygenase 2	MW	Medienwechsel
c-Fos	<i>cellular oncogene Fos</i> (isoliert aus retroviralem Onkogen <i>Fos</i>)	MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
c-Jun	<i>cellular V-Jun Avian Sarcoma Virus 17 Oncogene Homolog</i>	NEAA	nichtessentielle Aminosäuren
CPC	Cetylpyridiniumchlorid monohydrate	NaCl	Natriumchlorid
CRH	<i>Corticotropin-releasing Hormone</i>	NF-κB	<i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>	NO	<i>Nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid	pas \leq3	Zellen bis <i>einschließlich</i> in <i>-vitro</i> -Passage 3
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure	pas >3	Zellen ab <i>in vitro</i> -Passage 4
ERK1/2	<i>extracellular signal-related Kinase 1/2</i>	p53	Protein 53
FAS	<i>TNF superfamily receptor 6</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	pCO₂	Kohlendioxid-Partialdruck
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor 2(=basic FGF)</i>	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
GAPDH	Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	PFA	Paraformaldehyd
H₀	Nullhypothese	PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	RIPA	<i>RadioImmunoPrecipitation Assay</i>
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen D related</i>	RT	Raumtemperatur
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration	RunX 2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
IDO	Indolamin-2, 3-Dioxygenase	SASP	<i>senescence-associated secretory phenotype</i>
IL	Interleukin	SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
		STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
		StAw	Standardabweichung
		TBS-T	<i>Tris-buffered saline-Tween 20</i>

Td	Transdifferenzierung, Versuchsmodus	Wnt10	Volumen- pro Volumeneinheit Subtyp 10 der Proteinfamilie der Gene <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>	w/v	<i>weight per volume</i>
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor α		Gewichts- pro Volumeneinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute		
v/v	<i>volume per volume;</i>		

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
Inhaltsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1. Definition und klinische Bedeutung von <i>tissue engineering</i> und Transdifferenzierung	1
1.2. Anatomische und theoretische Grundlagen	3
1.3. Komplexität der Abgrenzung verschiedener Stammzell-Populationen	6
1.4. Effekte einzelner Zytokine, NO und Dexamethason auf Fibroblasten	8
1.5. Problematik der Festlegung geeigneter Kriterien der osteogenen Transdifferenzierung	13
1.5.1. Übersicht verwendeter Kriterien	14
1.5.2. Zeitliche Aspekte der Kriterien	15
1.6. Faktoren osteogener Transdifferenzierung	15
1.7. Fragestellung und Ziele der Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.2. Literaturrecherche	22
2.3. Statistische Auswertung und Aufbereitung der Daten	22
2.3.1. Hypothesen-Prüfung	22
2.4. Kultivierung von humanen dermalen Fibroblasten	24
2.4.1. Passagierung	25
2.4.2. Cryokonservierung und Auftauen	26
2.5. Isolierung dermalen Fibroblasten	26
2.6. Nachweisverfahren	27
2.6.1. Neubauer-Verfahren nach Lindl & Bauer (2000)	27
2.6.2. <i>Cell Viability Assay</i>	28
2.6.3. Bestimmung der Protein-Konzentration	29
2.6.4. Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (<i>AP-Assay</i>)	30
2.6.5. Alizarin Rot-Färbung, -Rücklösung und -Quantifizierung	31
2.6.6. <i>Western Blots</i> von RunX 2 und GAPDH	32
2.7. Proliferation juveniler und adulter Fibroblasten	35
2.7.1. Viabilitätstest humaner dermalen Fibroblasten	35
2.7.2. Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten	36
2.7.3. Zusammenhang von CO ₂ und pH-Wert im Dexamethason-Medium	36
2.8. Wirkung der Zytokine auf die Proliferation	36
2.8.1. Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2	37
2.8.2. Proliferationsreferenz	38

2.8.3.	Zytokin-Versuch.....	38
2.9.	Osteogene Transdifferenzierung	39
2.9.1.	Transdifferenzierungsreferenz.....	40
2.10.	Optimierung der osteogenen Transdifferenzierung.....	41
2.10.1.	Osteogene Transdifferenzierung und <i>in vitro</i> -Seneszenz.....	42
2.10.2.	Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3	42
2.10.3.	Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas >3	42
2.10.4.	Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium	42
2.10.5.	Osteogene Transdifferenzierung und Dexamethason-Konzentrationen.....	42
2.10.6.	Osteogene Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen	42
2.10.7.	Osteogene Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition.....	42
2.10.8.	Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium	43
2.11.	Interdependenzen	43
2.11.1.	Proliferativer Effekt des Dexamethason-Mediums	43
2.11.2.	Proliferationswirkung der Bestandteile des Dexamethason-Mediums.....	43
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Proliferation juveniler und adulter Fibroblasten	45
3.1.1.	Viabilitätstest humaner dermaler Fibroblasten.....	45
3.1.2.	Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten.....	45
3.1.3.	Zusammenhang von CO ₂ und pH-Wert im Dexamethason-Medium.....	46
3.2.	Wirkung der Zytokine auf die Proliferation	46
3.2.1.	Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2	46
3.2.2.	Proliferationsreferenz.....	47
3.2.3.	Zytokin-Versuch.....	48
3.3.	Osteogene Transdifferenzierung und deren Optimierung	53
3.3.1.	Transdifferenzierungsreferenz.....	53
3.3.2.	Osteogene Transdifferenzierung und <i>in vitro</i> -Seneszenz.....	55
3.3.3.	Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3	56
3.3.4.	Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas >3	58
3.3.5.	Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium	59
3.3.6.	Osteogene Transdifferenzierung und Dexamethason-Konzentrationen.....	60
3.3.7.	Osteogene Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen	60
3.3.8.	Osteogene Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition.....	62
3.3.9.	Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium	63
3.3.10.	Vergleich der Konfigurationen.....	64
3.4.	Interdependenzen	65
3.4.1.	Proliferativer Effekt des Dexamethason-Mediums	65

3.4.2. Proliferationswirkung der Bestandteile des Dexamethason-Mediums.....	66
4. Diskussion und Schlussfolgerungen.....	68
4.1. <i>Limitations of the Study</i>	68
4.2. <i>Cell Viability Assay</i>	68
4.3. Proliferation.....	69
4.4. Osteogene Transdifferenzierung.....	72
4.4.1. Transdifferenzierungsreferenz.....	72
4.4.2. <i>In vitro</i> -Seneszenz und Spenderalter.....	74
4.4.3. Auswahl der Transdifferenzierungsmedien.....	75
4.4.4. Änderung der Umgebungsbedingungen.....	77
4.4.5. Inhibition der DNA-Methylierung.....	77
4.4.6. Änderung des Mediums und Scherstress.....	78
4.4.7. Konfigurationen.....	79
4.5. Interaktionen zwischen Proliferation und Transdifferenzierung.....	82
4.6. Auswirkungen der Seneszenz auf Transdifferenzierung und Proliferation.....	83
4.6.1. <i>In vitro</i> -Seneszenz.....	83
4.6.2. Spenderalter.....	84
4.7. Schlussfolgerungen.....	86
4.7.1. Derzeitige Situation.....	86
4.7.2. Zukunft des <i>tissue engineerings</i> dermalen Fibroblasten.....	87
5. Zusammenfassung.....	90
Literatur- und Quellenverzeichnis.....	91
Literaturverzeichnis.....	91
Abbildungsverzeichnis.....	110
Tabellenverzeichnis.....	112
Formelverzeichnis.....	113
Anhang.....	114
Danksagung.....	
Eidesstattliche Versicherung.....	
Anlage.....	

1. Einleitung

1.1. Definition und klinische Bedeutung von *tissue engineering* und Transdifferenzierung

Um zu Beginn potentielle Interdependenzen und begriffliche Überschneidungen zwischen *tissue engineering* (TE) und Transdifferenzierung aufzuzeigen, soll einerseits der Begriff des *tissue engineering* im Sinne der Definition nach Skalak & Fox (1988) bzw. Nerem (1992) als „Anwendung technischer Prinzipien und Methoden in Kombination mit dem fundamentalen Verständnis der Struktur-Funktion-Beziehung in normalem und pathologischen Säugetiergewebe mit dem Ziel der Entwicklung biologischer Ersatzstoffe um die Funktionen wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern“ verwendet werden. Transdifferenzierung andererseits wurde erstmals von Eguchi 1995 als „Metamorphose“ durch „Änderung des Zell-Phänotyps von jenem einer zuvor spezialisierten (unipotenten) Gewebszelle zu einem differierenden Zelltyp auf zellulärer Ebene“ definiert. Diese Übersetzung von Eguchi (1995) paraphrasiert demnach eine mögliche Realisierung der Zielsetzung des TE („Entwicklung biologischer Ersatzstoffe“ (Skalak & Fox 1988; Nerem 1992)) und ordnet dadurch dieses Modell als Ressource zur Restitution oder Regeneration von Gewebsverbänden ein (Janicki & Schmidbauer 2011). Zugleich weist er darauf hin, dass zur Abgrenzung dieses Prozesses von der malignen Transition im Sinne der Metaplasie zwei Kriterien zu erfüllen seien:

- a. „Die differenzierten Zustände verschiedener voll differenzierter Zellen vor und nach der Transdifferenzierung können reliabel unterschieden und beschrieben werden.“ (Übersetzung nach Eguchi 1995)
- b. „Eine direkte Vorfahren-Nachkommen-Beziehung zwischen den funktionell differenzierten Zelltypen vor und nach dem Wechsel kann definitiv auf zellulärer Ebene bestätigt werden.“ (Übersetzung nach Eguchi 1995)

Zur Prüfung der Kriterien fordert er neben morphologischen auch biochemische und molekularbiologische Nachweisverfahren (Eguchi 1995).

Somit kann TE im Sinne von Skalak & Fox (1988) als Prozess der Generierung autologer Transplantate, wie in Abb. 1 illustriert, aufgefasst werden. Dieser Prozess umfasst damit neben der Exzision eines geeigneten Gewebes, Präparation und Kultivierung der gewünschten Zellpopulation, zuerst beschrieben von Leff (1983), auch die osteogene Transdifferenzierung als essentiellen Bestandteil. An diesem Punkt manifestiert sich eine beachtliche Zunahme der Transdifferenzierungsmethoden, Nachweisverfahren selbiger und Verfügbarkeiten geeigneter Zellreservoirs, was zu mannigfaltigen neuen Möglichkeiten der Erforschung des Transdifferenzierungspotenzials pluripotenter Stammzellen unter artifiziellen, kontrollierten Bedingungen führt (Pallua & Suschek 2011). Letztlich sollen diese differenzierten Zellen in den identischen Körper, aber an einen anderen Ort, implantiert werden (Gerges 2010).

Aus den in Abb. 1 vorgestellten Schritten des TE ergeben sich damit drei prinzipielle Ansatzpunkte zur Etablierung ökonomisch und medizinisch adäquater Modelle:

1. Auswahl quantitativ und qualitativ ergiebiger Reservoirs pluripotenter Stammzellen
Adulte Stammzellen wurden bisher erfolgreich aus Knochenmark (Caplan 1991), Wharton-Sulze (Wang et al. 2004), Fett (Zuk et al. 2001; Gronthos et al. 2001), Haut (Toma et al. 2001; Bartsch Jr et al. 2005; Toma et al. 2005) und Amnionflüssigkeit (De Coppi et al. 2007) als sogenannte „*non-embryonic stem cells*“ (non-ESC; Lee & Hui 2006) isoliert. Zuletzt konnten

verschiedene Autoren Fibroblasten der Subkutis (im Folgenden als „dermale Fibroblasten“ bezeichnet) ebenfalls multipotenten Charakter zuschreiben (Lee et al. 2011; Lysy et al. 2007; Lowry et al. 2008; Junker et al. 2009; Sommar et al. 2009; Blasi et al. 2011).

2. *In vitro*-Proliferation

Die Rolle gewisser Zytokine und NO (Stickstoffmonoxid) auf die mitotische und transdifferenzierende Aktivität von adulten Stammzellen wird kontrovers diskutiert (Hughes-Fulford & Li 2011; Lai et al. 2011; Lee et al. 2012; Yamaoka et al. 2011; Zhou et al. 2004; Chen et al. 2009). Ihre Wirkung auf die osteogene Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten ist bisher nicht beschrieben. Wechselwirkungen zwischen Proliferation und Transdifferenzierung im Hinblick auf die Entwicklung eines optimalen Gesamtkonzeptes des osteogenen *tissue engineerings* (für Zahnpulpa siehe Kim et al. (2010); Knochenmark: Kroll (2007), Stobbe (2008) und für Osteoblasten: Park (2011)) wurden für dermale Fibroblasten bisher nicht eruiert.

3. Osteogene Transdifferenzierung

Obwohl einige Autoren erfolgreiche Versuche mit Fibroblasten publiziert haben (Junker et al. 2009; Hee & Nicoll 2006; Hee & Nicoll 2009; Jacobs et al. 2013; Mostafa et al. 2011; Rakar et al. 2012; Rutherford et al. 2002; Byrne et al. 2007; Takahashi et al. 2007), bleiben diese Erkenntnisse umstritten (Alt et al. 2011; Chen et al. 2002; Donovan & Gearhart 2001; Terada et al. 2002; Takahashi & Yamanaka 2006).

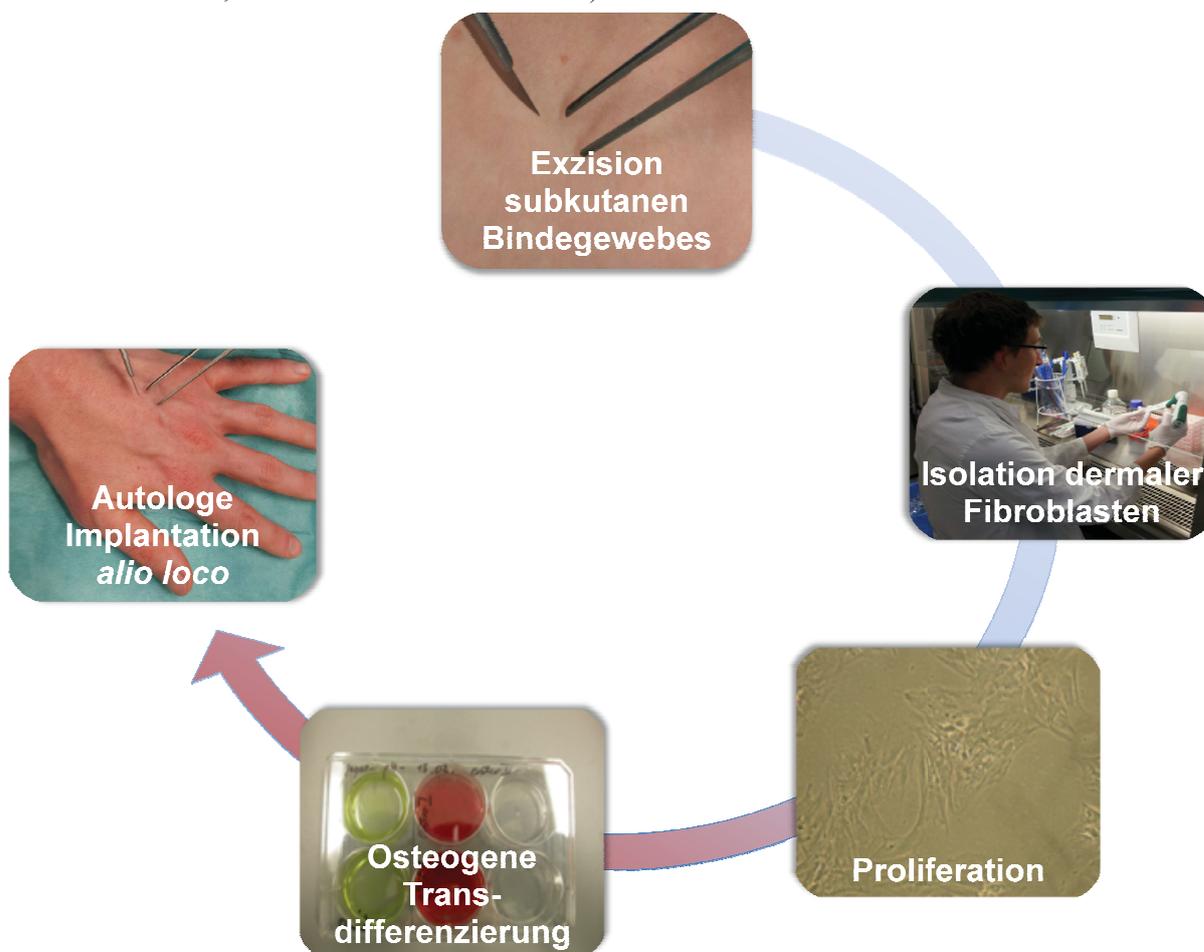


Abb. 1: **Prinzip des *tissue engineering***

In der Darstellung des TE als Zeit-Spirale folgt auf die chirurgische Gewinnung geeigneter Zellen („Exzision subkutanen Bindegewebes“) die Isolation multipotenter Zellen (hier dermale Fibroblasten). *In vitro* werden diese anschließend vermehrt („Proliferation“) und osteogen transdifferenziert. Abschließend soll das so entstandene, autologe Knochengewebe implantiert werden.

In den folgenden Abschnitten der Einleitung werden die bisherigen Erkenntnisse und Problematiken der in Abb. 1 illustrierten Schritte des TE erläutert. So beleuchtet Abschnitt 1.3 (Komplexität der Abgrenzung verschiedener Stammzell-Populationen) die Problematik der Distinktion einzelner, pluripotenter Zellpopulationen in einem Haut-Präparat (erster und zweiter Schritt des TE (siehe Abb. 1). Aktuelle Erkenntnisse zur Steigerung oder Reduktion der Proliferation (dritter Schritt in Abb. 1) werden in Abschnitt 1.4 (Effekte einzelner Zytokine, NO und Dexamethason auf Fibroblasten) dargestellt. Wichtige Einflussfaktoren auf die osteogene Transdifferenzierung finden sich in Abschnitt 1.6 (Faktoren osteogener Transdifferenzierung), wobei zuvor auf die Problematik unterschiedlicher Nachweisverfahren (Abschnitt 1.5: Problematik der Festlegung geeigneter Kriterien der osteogenen Transdifferenzierung) eingegangen wird. Deren Auswahl stellt eine notwendige Prämisse für nachfolgende Ergebnisse (Abschnitt 3.3: Osteogene Transdifferenzierung) dar. Formen und Methoden der Implantation transdifferenzierten Gewebes werden in dieser Arbeit nicht schwerpunktmäßig behandelt.

Um die klinische Bedeutung des TE zu verdeutlichen sei in diesem einleitenden Abschnitt auf die Therapiekosten von Erkrankungen des muskuloskeletalen Systems und des Bindegewebes (inklusive Osteoarthritis, Osteoporose und den rheumatischen Erkrankungen) der BarmerGEK[®] verwiesen: Im Jahr 2011 verursachten diese Kosten in Höhe von ca. 80€ pro GK-Versichertem und Jahr (ISEG et al. 2011). Dieser dritte Rang unter den von der BarmerGEK[®] ermittelten Ausgaben stationärer Behandlung beruht laut Angaben der Versicherung auf der langen Verweildauer und den Ansprüchen aus etwaigem Komplikationsmanagement („Komplikationen durch orthopädische Endoprothesen, Implantate oder Transplantate: 16,2 Tage/Fall“ (ISEG et al. 2011, S. 35)). Zu Bedenken ist nun, dass Endoprothesen und Implantate keine kurativen Ansätze darstellen, sodass eine Transplantation autologen Gewebes im Rahmen des TE zunehmend in Betracht gezogen wird (Griffith & Naughton 2002; Gerges 2010; Davatchi et al. 2011). Zudem wird diese Idee durch Nebenwirkungen von Knochentransplantationen eines *allografts* (Material eines genetisch varianten Spenders mit den Konsequenzen einer geringeren Zellzahl und schlechter Revaskularisation (Damien & Parsons 1991; Lane et al. 1999)) und langsamem Aufbau von Knochenmatrix (Oklund et al. 1986; Anderson et al. 1999), sowie immunogener und infektiöser Vorbehalte (Strong et al. 1996) unterstützt. In der Folge entstand die Hypothese autologe Stammzellen als Ressource für TE nutzbar zu machen (Yaszemski et al. 1996). Es ist jedoch anzumerken, dass hierbei die im Rahmen einer Gewebstransplantation üblichen (intra- und postoperativen) Komplikationen wie beispielsweise Morbidität, Hypersensitivität und Parästhesie im OP-Gebiet (Damien & Parsons 1991) einerseits und postoperativer Wundschmerz, Infektionen sowie Gefäßverletzungen (Carrington et al. 1996) andererseits auftreten können.

1.2. Anatomische und theoretische Grundlagen

Die anatomisch-physiologische Genese von Knochengewebe beruht auf einem konzertierten Verhältnis osteoinduktiver (vorzugsweise via Osteoblasten) und –destruierender Prozesse (Osteoklasten). Als elementare Grundlage dieses dynamischen Prozesses dienen die Pauwels'schen Theorien zur biomechanischen Anpassung der Trabekel an Zug- und Druckbelastung (Pauwels 1948): Mit dem Versuch eine ökonomische und biophysikalische Erklärung für den trabekulären Aufbau der Röhrenknochen zu entwickeln, etablierte er zugleich auch die bis heute gebräuchliche Vorstellung vom Knochen als dynamischem Gewebe, wonach dieser in seiner inneren Textur den äußeren Beanspruchungen Rechnung trage (Pauwels 1955). Seine Ausführungen über die embryologische Notwendigkeit der Ausrichtung der Trabekel anhand der Kraftvektoren sowie der quantitativen Verstärkung des Röhrenknochens auf der druckbelasteten Seite haben bis heute Gültigkeit (Skuban 2009).

Die mikroskopische Entwicklung von chondrogenem Knochengewebe, wie bei Benninghoff et al. (2008) beruht letztlich auf der sekundären Invasion von Chondroklasten und Osteoblasten in das präformierte Knorpelgerüst, wobei eine enchondrale Ossifikation aus dem Inneren der hyalinen Anlage von einer perichondralen Form zu unterscheiden ist. Letztere initiiert den Ossifikationsprozess durch osteoblastäre Zellen aus dem perichondralen Bindegewebe, welches später das Periost bilden wird. Die desmale Genese bestimmter, platter Knochen basiert hingegen auf dem Differenzieren mesenchymaler Stammzellen, welche mit dem zirkulierenden Blut eingeschwemmt werden. Alle Osteoblasten synthetisieren nun Osteoid, die alkalizogene Grundsubstanz des Knochens bestehend aus Kollagenen und Mucopolysacchariden. Erst in einem zweiten Schritt wird Hydroxylapatit (ein Calcium-Phosphat-Salz) und andere Salze per Fällung eingelagert (Long 2001; Benninghoff et al. 2008). Experimente an Embryonen haben gezeigt, dass die Synthese einer kollagenen Matrix prädisponierend ist für die Kalzifizierung (Gothard 2009). Diese zwei Schritte wiederum sind determinierend für die phänotypische Charakterisierung des Gewebes (Jaiswal et al. 2000).

Mit Blick auf mögliche Ansatzpunkte für osteoinduktive Methoden sollen im Folgenden intrazelluläre Mechanismen der Osteoblastogenese durch autokrine und parakrine Prozesse erläutert werden:

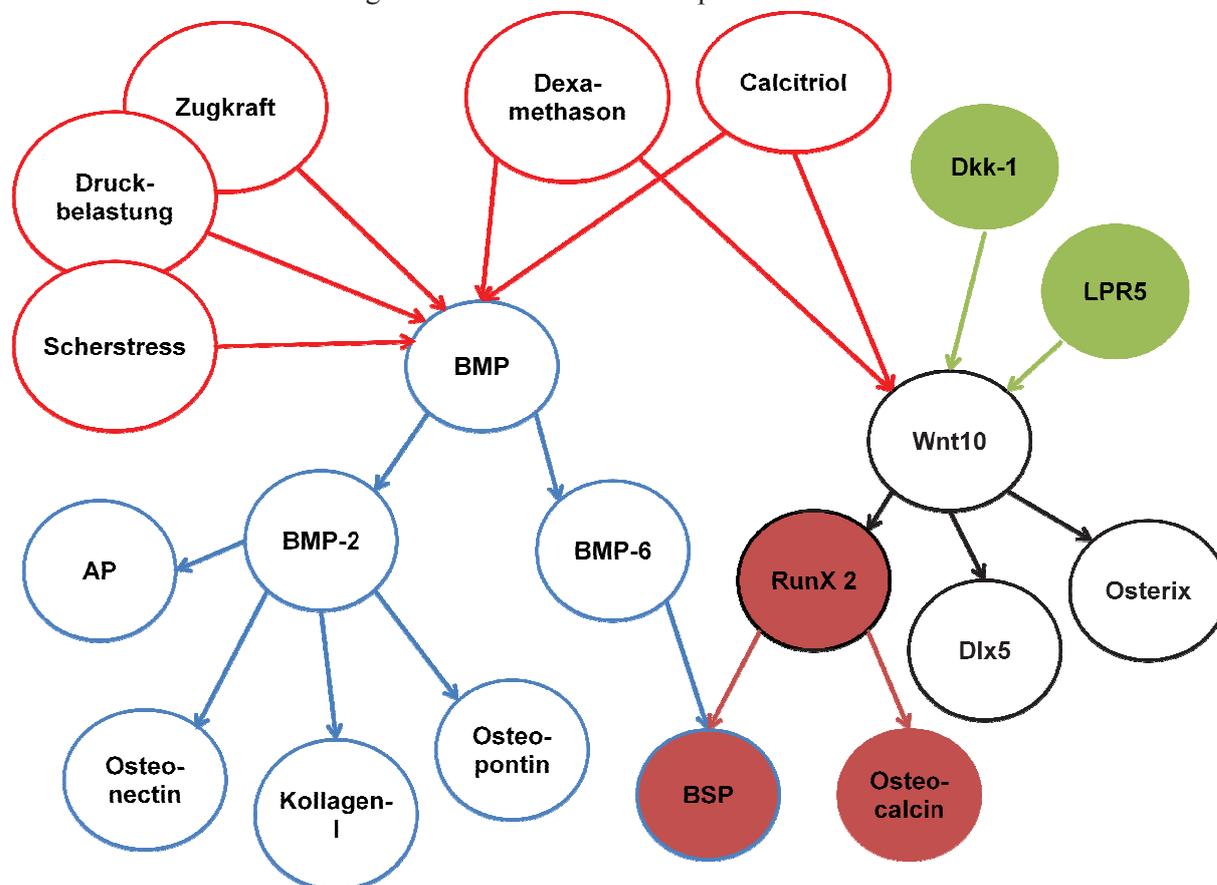


Abb. 2: Schema der osteogenen Proteinexpression

Die schematische Illustration von Wechselwirkungen verschiedener an der Osteogenese beteiligter Proteine basiert auf Erkenntnissen von Hall & Miyake (1992); Hall & Miyake (1995); Ducy et al. (1997); Lecanda et al. (1997); Enomoto et al. (2000); Rawadi et al. (2003); Bennett et al. (2005); Glowacki et al. (2009); Seib et al. (2009): Durch exogene Einflüsse (rot umrandet) oder Rezeptor-Stimulation unklarer Genese (grün markiert) werden primär intrazellulär BMPs (blau umrandet) und Wnt10 in ihrer Expression stimuliert, welche ihrerseits autonom die Genexpression osteogener Proteine induzieren (blau bzw. schwarz umrandet). Je nach Abhängigkeit von der vorherigen Ebene (BMP, Wnt10 und RunX 2) sind die nachfolgenden Osteogenese-Marker farblich markiert.

Wnt10 (Subtyp 10 der Proteinfamilie der Gene *Wingless* und *Int-1*) induziert die Proteine *runt-related transcription factor 2* (RunX 2), Homöoboxprotein 5 der *distal-less*-Genfamilie (Dlx5) und Osterix

(alle in Abb. 2 schwarz umrandet), wodurch sekundär eine Metamorphose zum Osteoblasten eingeleitet wird (Bennett et al. 2005; Rawadi et al. 2003). Die Expression von Wnt10 wiederum wird von *Low density Lipoprotein Receptor-related Protein 5* (LRP5), Dickkopf-1 (Dkk-1; in Abb. 2 grün unterlegt; Boyden et al. 2002; Gong et al. 2001) sowie Dexamethason und Calcitriol (rot umrandet in Abb. 2; Ducy et al. 1997) reguliert. RunX 2 (synonym mit *Osteoblast-specific factor 2 / core-binding protein subunit 1*; siehe Enomoto et al. 2000) gilt als Osteoblasten-spezifisches Protein, dessen „Expression im Rahmen der mesenchymalen Kondensation des sich entwickelnden Knochens initiiert wird“ (Ducy et al. 1997), weshalb es häufig als proteinogener Indikator für die osteogene Transdifferenzierung verwendet wird (bspw. Viereck et al. 2002; Phillips et al. 2007). Eine RunX 2-Expression fand sich jedoch auch in der Chondrogenese (Enomoto et al. 2000), T-Lymphozyten, Hoden und Gehirn (Jeong et al. 2008). Sammons et al. (2004) und Liu et al. (2008) verwendeten stattdessen *Bone Sialoprotein* (BSP) und Osteocalcin als Osteogenese-Marker, wengleich es sich um von RunX 2 sekundär induzierte Proteine handelt (vgl. Abb. 2).

***Bone Morphogenetic Proteins* (BMP;** Mitglieder der TGF- β -Familie (Miyazono et al. 2010)) erreichen auf einem RunX 2-unabhängigen Weg primär eine allgemeine Kondensierung von Stammzellen (Hall & Miyake 1992; Hall & Miyake 1995; Glowacki et al. 2009), BMP-2 wirkt zudem induktiv auf Quantität und Enzymaktivität von alkalischer Phosphatase (AP), Osteopontin, BSP, Osteocalcin und Kollagen-I (blau umrandet in Abb. 2; Lecanda et al. 1997; Seib et al. 2009). Zugleich stimulieren exogenes BMP-7 und Vitamin D₃ (1 α , 25-Dihydroxycholecalciferol, Calcitriol) wiederum adulte Stammzellen zur Expression weiterer osteogener Gene (Ducy et al. 1997).

Bei Experimenten an Stammzellen aus dem Knochenmark (*bone marrow mesenchymal stem cells*, BMSC) konnten Liu et al. (2008) zeigen, dass die Proteinexpression einem zeitlichen Muster folgt: Auf einen frühen Anstieg der Expression von AP, Kollagen Typ I, Osteonectin und Osteopontin folgten Steigerungen in der BSP- und Osteocalcin-Expression.

Weitere exogene Faktoren regulieren, wie in Abb. 2 schematisch dargestellt, die intrazelluläre Protein-Expression: Insbesondere Dexamethason stimuliert die BMP-2- (und Wnt10-) Expression (Zhou et al. 2006), wengleich dieser Effekt durch eine längere Inkubation mit Vitamin D₃ moduliert werden kann (Viereck et al. 2002). Gleichzeitig kam es bei Zhou et al. (2006) zu einer Reduktion der Osteocalcin-Konzentration. Parathormon, der physiologische Antagonist des Calcitriols, vermittelt die physiologische Wechselwirkung zwischen Osteoblasten und periostalen Fibroblasten (Van der Plas & Nijweide 1988). Bisher ist es jedoch nicht gelungen die Wechselwirkungen dieser exogenen Faktoren und deren Interdependenzen auf molekularbiologischer Ebene nachzuvollziehen.

Obwohl in Versuchen mittels viraler Transfektion weitere Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten (bspw.: Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc (Takahashi et al. 2007)), bleibt deren Rolle in der osteogenen Transdifferenzierung bei Versuchsanordnungen ohne Gen-/Proteintransfer derzeit unklar. Neben diesen Transkriptionsfaktoren wurden in den letzten Jahren ebenfalls micro-RNAs (miRNA) identifiziert, welche zum Teil erheblichen Einfluss auf diesen Prozess haben (Gao et al. 2011; Y. Zhang et al. 2011). Ihre Wirkung beruht wohl auf der Regulation einiger der zuvor beschriebenen Transkriptionsfaktoren (Baglio et al. 2013; Shi et al. 2013). Hierbei scheint insbesondere die konzertierte Regulation der Quantität von entscheidender Bedeutung zu sein (Eguchi et al. 2013; Gamez et al. 2013).

Auch bestimmte Zytokine, zumeist abhängig von deren Konzentration und Applikationsart, beeinflussen intrazelluläre Vorgänge im Zusammenhang mit Osteogenese oder osteogener Transdifferenzierung (Bruder & Fox 1999). So beschrieb Stobbe (2008) beispielsweise die supportive Wirkung von FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) und TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) bei der osteogenen Transdifferenzierung von *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs), derweil Sammons et al. (2004) Koinzidenten zwischen Calcitriol-Gabe und Interleukin-6-Sekretion beobachteten.

1.3. Komplexität der Abgrenzung verschiedener Stammzell-Populationen

Obwohl bereits seit einigen Jahren die Pluripotenz mesenchymaler Stammzellen belegt ist (Pittenger et al. 1999; Bartsch Jr et al. 2005; Jorgensen & Noel 2012), werden Fibroblasten vergleichbare Fähigkeiten mitunter in Abrede gestellt (Terada et al. 2002; Bartsch Jr et al. 2005). Terada et al. (2002) bzw. Bartsch Jr et al. (2005) gründeten ihre Ablehnung auf den unzureichenden Ausschluss von Kontaminationen, Bildung von Synzytien oder Abgrenzung verschiedener Stammzell-Populationen nach Isolation der Fibroblasten aus der Dermis. Deren Gewebsschichten können neben Fibroblasten auch MSCs, pluripotente Keratinozyten und hämatopoetische Stammzellen enthalten. Diese Kritikpunkte machen eine eindeutige Identifizierung und Abgrenzung von pluripotenten Fibroblasten gegenüber allen potenziell kontaminierenden Zellarten notwendig. Morphologisch konnte bisher keine eindeutige Abgrenzung vorgenommen werden (Sekiya et al. 2002; Alt et al. 2011; Blasi et al. 2011).

Aus den genannten Gründen dienen vor allem konstante Variationen an Oberflächenproteinen (*Cluster of Differentiation*; CD) zwischen den einzelnen Zellarten als distinktes Unterscheidungskriterium. Wie nun Abb. 3 und insbesondere Anhang 1 zu illustrieren versuchen, gelang dies verschiedenen Autoren nur durch negative Selektion der Fibroblasten:

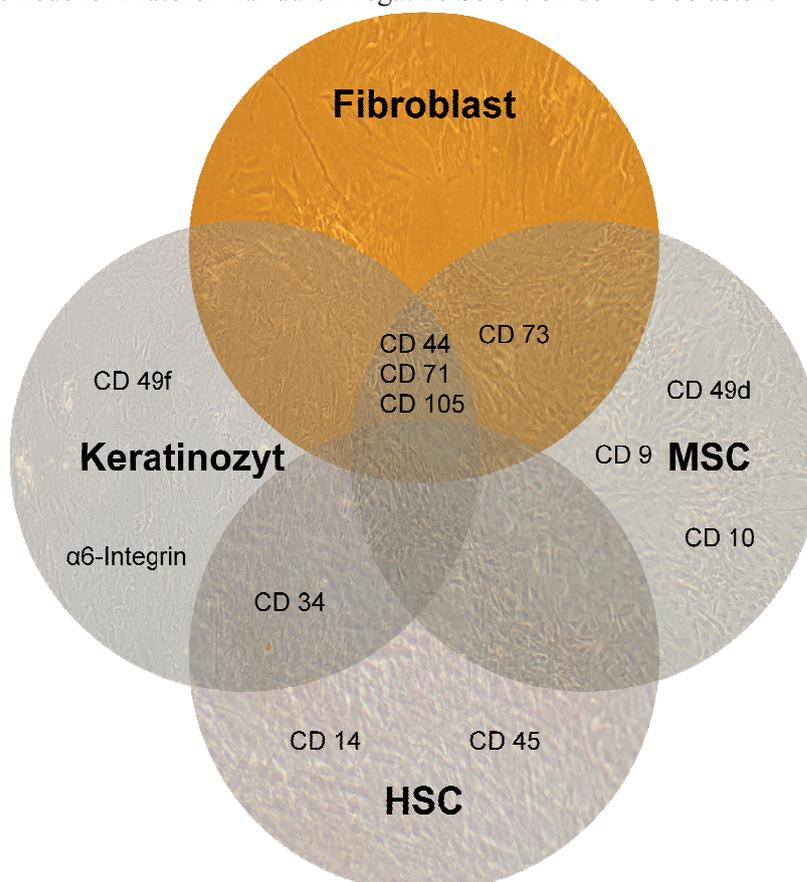


Abb. 3: Negative Selektion dermalen Fibroblasten anhand verschiedener CD

Die pluripotenten Zellarten (Fibroblast, MSC, Keratinozyt und hämatopoetische Stammzelle (HSC)) sind in dieser Grafik ikonografisch als runde Flächen abgebildet. Charakteristische Oberflächenmarker sind beispielhaft im zugehörigen Feld platziert worden. Während für MSCs (CD 9, CD 10 und CD 49d), HSC (CD 14, CD 45) und Keratinozyten (CD 49f, α6-Integrin) spezifische Marker existieren, exprimieren Fibroblasten nur unspezifische CD, welche sich ebenfalls auf anderen Zellarten nachweisen lassen (CD 73 auf MSC; CD 44, CD 71, CD 105 auf MSC und Keratinozyten). Dadurch kann eine Kontamination der isolierten Kulturen nur mittels negativer Selektion ausgeschlossen werden. Daten aus: Gronthos et al. (2001), Webb et al. (2004), Chamberlain et al. (2007), Crigler et al. (2007), Schlüter et al. (2011).

Für (dermale) **Fibroblasten** existieren derzeit keine derartigen, spezifischen Marker zur Identifizierung und Abgrenzung von anderen pluripotenten Zellen (siehe Anhang 1). Wie nun Abb. 3 illustriert, legten die Ergebnisse einiger Autoren (Gronthos et al. 2001; Webb et al. 2004; Chamberlain et al. 2007; Crigler et al. 2007; Schlüter et al. 2011) sogar ein hohes Maß an Übereinstimmung zwischen den Zellarten nahe. Eine hohe mitotische Aktivität der Zellen stellte ein funktionelles Kriterium für Fibroblasten dar (Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008). Lediglich mittels negativer Selektion wäre eine Abgrenzung dieser Zellart gegenüber MSCs, Keratinozyten und HSCs möglich. Innerhalb der Fibroblasten-Populationen existierten zudem weitere Unterschiede: Neben dem Expressionsmuster der Oberflächenmarker (HS68-Fibroblasten sind CD 105⁻ und CD 54⁺; Huang et al. 2010) variierten zwischen verschiedenen Zelllinien auch die Proliferationsantworten auf FGF-2 wegen Variationen im cAMP-Pfad (Jekabsons et al. 2011). Zudem illustrierte die Arbeit von Chen et al. (2007) einerseits die Präsenz von Fibroblasten-Klonen mit variabler Potenz (tri-, bi- und unipotente Zellen), andererseits implizierte dies die Existenz einer heterogenen Bindegewebspopulation in einem Präparat. Die Autoren identifizierten die tripotenten Zellen (6,4% der Population) als Nestin⁻ und Vimentin⁺, wodurch sie von bipotenten (19,1%) oder unipotenten Klonen (10,6%) zu unterscheiden waren. Um die geringe Konzentration von Stammzellen zu erhöhen wurden EGF (*Epidermal Growth Factor*) und FGF-2 eingesetzt (Ernst et al. 2010).

Zur Abgrenzung der zu isolierenden Fibroblasten von deren mitotisch-inaktiven Klonen, den Fibrozyten, konnte CD 34 verwendet werden. Dieser in Fibrozyten nachweisbare Marker (Bucala et al. 1994) fehlte in Fibroblasten oder MSCs (Blasi et al. 2011). Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass Bucala et al. (1994) jene Fibrozyten aus dem zirkulierenden Blut isolierten, weshalb der Hämatopoese-Marker CD 34 (Chamberlain et al. 2007) auf eine etwaige Kontamination hindeuten vermochte.

Mesenchymale Stammzellen konnten laut einem Review von Chamberlain et al. (2007) mittels positiver Nachweise für CD 73 und CD 105 identifiziert werden, obwohl Abb. 3 deren mangelnde Spezifität nahe legt. Die Autoren benannten jedoch mit CD 9, CD 10 und CD 49d Proteine, deren Präsenz in anderen pluripotenten Zellarten bisher nicht belegt werden konnte. Siegel et al. (2013) detektierten aber Differenzen in der Proteinexpression in Abhängigkeit vom Spenderalter: Einerseits werden CD 71, CD 146 sowie CD 274 bevorzugt von juvenilen MSCs exprimiert, andererseits war in dieser Gruppe auch die Dichte pro Zelle für CD 71, CD 90, CD 106, CD 140b, CD 166 bzw. CD 274 erhöht.

Hämatopoetische Stammzellen schlossen viele Autoren (Pittenger et al. 1999; Gronthos et al. 2001; Kern et al. 2006; Lysy et al. 2007; Reyes et al. 2009; Alt et al. 2011; Blasi et al. 2011) durch eine fehlende Expression von CD 14, CD 34, CD 45, CD 117, CD 133 und CD 146 aus.

Keratinozyten, welche ebenfalls in einem humanen Präparat der Haut/Unterhaut vorkommen, charakterisierten Webb et al. (2004), Crigler et al. (2007) und Schlüter et al. (2011) als CD 34⁺, CD 49f⁺, CD 71^{low} und CD 105⁺. CD 34, ein Hämatopoese-Marker, wurde von MSCs und Fibroblasten nicht exprimiert (Chamberlain et al. 2007; Blasi et al. 2011). Außerdem strebten Webb et al. (2004), Nowak & Fuchs (2009) sowie Schlüter et al. (2011) einen zusätzlichen α 6-Integrin-Nachweis an.

Um generell die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit anderen pluripotenten Stammzellen zu senken, beschränkten sich anerkannte Isolationsverfahren nach Aasen & Belmonte (2010) oder Kotton (2010) auf bestimmte Körperbereiche (Preputium penis und Periodontium). Dadurch sollte das Risiko einer Kokultivierung mit pluripotenten Keratinozyten aus Haarfollikel oder –balg (Jahoda et al. 2003; Crigler et al. 2007; Nowak & Fuchs 2009) ausgeschlossen werden (Benninghoff et al. 2008). Eine detaillierte Übersicht über die Expressionsmuster verschiedener Zellarten gewährt Anhang 1.

1.4. Effekte einzelner Zytokine, NO und Dexamethason auf Fibroblasten

Indem nun zytokin- oder chemokinbasierte Effekte auf Fibroblasten erläutert werden, sollen sowohl deren individuelle Wirkung im Rahmen des TE als auch mögliche Interaktionen zwischen den Substanzen aufgezeigt werden. Dazu interessieren insbesondere Anwendungen von Zytokinen, Chemokinen oder NO im Rahmen von Proliferation und osteogener Transdifferenzierung.

Zunächst allgemein auf die proliferative Kapazität blickend, wiesen He et al. (2011) für dermale Fibroblasten deutlich höhere Mitose-Raten verglichen mit MSCs verschiedener Reservoirs nach. Die Teilungsrate reduzierte sich jedoch mit zunehmenden Transfers bzw. Passage sowohl in MSCs als auch in Fibroblasten deutlich (He et al. 2011; Zhou et al. 2008); sie korrelierte jedoch nicht zwingend mit dem Spenderalter (Huschtscha et al. 2012). In höheren Passagen wurde konstitutiv STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) exprimiert, welches in seneszenten Zellphänotypen zum Ausdruck kam (Kojima et al. 2012). Eine hohe Aktivität von *senescence-associated β -Galactosidase* determinierte einen solchen "*senescence-associated secretory phenotype*" (SASP; Kojima et al. 2012). Zudem ging eine transiente Zunahme der Gen-Expression bestimmter Zytokine, unter anderem von Interleukin- (IL-) 1 α , IL-6 und IL-8, mit einem solchen Phänotyp einher (Orjalo et al. 2009; Kojima et al. 2012). IL-1 α regulierte diese Seneszenz-bedingte IL-6- bzw. IL-8-Sekretion (Orjalo et al. 2009).

Die im Folgenden erläuterten Erkenntnisse basieren auf *in vitro*-Experimenten, weil in physiologischen Geweben Wechselwirkungen unter Umständen zu konträren Effekten führen könnten: So induzierten beispielsweise IL-1, -6, TGF- β und *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) die Genese humaner Osteoklasten, partiell sogar via Stimulation von Fibroblasten oder Osteoblasten (Udagawa et al. 1995; Braun & Zwerina 2011). Zudem waren Superpositionseffekte und additional Effekte auf andere Zelltypen nicht auszuschließen (Danielyan et al. 2011; Ueno et al. 2011).

IL-1 β wird nicht nur über die im Folgenden aufgezeigten Transduktionswege von Fibroblasten sezerniert, sondern es stimuliert als „proinflammatorisches und Seneszenz-determinierendes Zytokin“ (Kojima et al. 2012) auch deren Proliferation sowie Funktion im Rahmen der Gewebsinflammation (siehe Tabelle 1) mittels komplexer intrazellulärer Interaktionen.

So synthetisierten Fibroblasten IL-1 β nach initialer Ligand-Rezeptor-Interaktion am IL-1-Rezeptor (IL1R) (Adhikari et al. 2007), was zur TGF- β *activated Kinase*-1-medierten *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*-(NF- κ B-) Aktivierung führte (Adhikari et al. 2007). Die dadurch entstandene Aktivierung von TNF- und *Toll-like Receptor 4* (TLR-4) Rezeptoren (Eskan et al. 2008) bedingte eine maximale mRNA-Quantität innerhalb von vier Stunden (Akutsu et al. 2013). Als intrazellulären Mechanismus der Signaltransduktion identifizierten sowohl Akutsu et al. (2013) als auch Sinfield et al. (2013) eine mittelbare Aktivierung des *Macrophage inducing protein-3 α* via *Mitogen Activated Protein-Kinase* (MAPK), *c-JUN N-terminal Kinase* (JNK) und NF- κ B-Signalweg, welcher durch TAK1-Stimulierung induziert worden war. Auch I κ B α (*nuclear factor „kappa-light-chain gene enhancer in B-cells“ inhibitor alpha*) war an der NF- κ B-Stimulation durch IL-1 β beteiligt (Lee et al. 2009).

Verstärkte Transkriptionen von *cellular V-Jun Avian Sarcoma Virus 17 Oncogene Homolog* (c-Jun), *JunB* (Transkriptionsfaktor, welcher durch das Gen JUNB kodiert ist), *cellular oncogene Fos* (c-Fos) und *fos-related antigen 1* (Chambers et al. 2013) sowie Inhibition von *Protein 53* (p53) (Schauer et al. 2013) vermittelten die proinflammatorischen Effekte von IL-1 β . Hierzu wurde zeitabhängig die Proteinbiosynthese von TNF- α und IFN- γ (Interferon- γ) initialisiert (Grimstad et al. 2011). NF- κ B wiederum regulierte eine zeit- und dosisabhängige Genexpression weiterer Zytokine, unter anderem IL-1 β , -6 und -8 sowie des IL-1 β -Rezeptors (Bertolini et al. 1994; Eskan et al. 2008; Dudás et al. 2011; Akutsu et al. 2013; Schauer et al. 2013; Sinfield et al. 2013). So benötigten Fibroblasten bei

Leclerc et al. (2013) nach Exposition von mindestens 5 ng/ml IL-1 β eine zwölfstündige Inkubationsdauer, wenngleich die maximale Sekretion von IL-6 und -8 bei Konzentrationen von 100 ng/ml Kulturmedium beobachtet wurde (Y.-A. Lee et al. 2012). Auch Selige et al. (2010, 2011) belegten eine konzentrationsabhängige DNA-Synthese in humanen Fibroblasten. Die Autoren begründeten dies mit der Induktion von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Prostaglandin E₂, welche einen logarithmischen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Folge hätten. Diese Blockade des Mitose-Zyklus in der G1-Phase konnte durch Kokultivierung mit FGF-2 potenziert werden. Zusätzlich induzierte IL-1 β die Bildung von *gap junctions* mittels Induktion von Connexin 43 (Niger et al. 2010; Qi et al. 2011).

Allerdings induzierte IL-1 β , insbesondere unter simultaner TGF- β -Exposition, Migration, Proliferation und Invasion maligner Zellen (Chen et al. 2009).

Mit Blick auf die Fragestellung der Funktionalität im Rahmen des *tissue engineering*s (vgl. Tabelle 1), demonstrierten Implantationen heterologen Materials in Fibroblasten einen Anstieg der Transkription von IL-1 β gegenüber der Verwendung von *Autografts* (Ji et al. 2010). Effekte auf Transdifferenzierungen sind nicht beschrieben.

IL-6, ein proinflammatorisches Zytokin (Chamberlain et al. 2013), wird durch vielfältige exogene Stimuli via komplexer, intrazellulärer Transduktionsprozesse von Fibroblasten synthetisiert. Nachfolgend werden Erkenntnisse zu Effekten dieses Zytokins auf Phänotyp und Proliferation der Fibroblasten vorgestellt, welche auch in Tabelle 1 überblickend dargestellt sind.

IL-1 β , TNF- α , STAT3 sowie in seneszenten Zellen via negativer Feedback-Schleifen aus IL-1 α , *Interleukin-1 receptor-associated Kinase 1*, miR-146a/b und *high mobility group box 1* (HMGB1; Miyazawa et al. 1998; Bhaumik et al. 2009; Siqueira et al. 2009; Mueller et al. 2010; Seidel et al. 2010; J. Zhang et al. 2011; Davalos et al. 2013; Ray et al. 2013; Sinfield et al. 2013) induzierten eine IL-6-Genexpression. Allerdings supprimierte intrazelluläres *high mobility group box 1*-Protein ebenfalls NF- κ B *in vitro*, wodurch die IL-6-Sekretion reduziert wurde (Gillespie et al. 2012; Davalos et al. 2013). In Analogie zum IL-8-Effekt (s. u.), sezernierten dermale Fibroblasten IL-6 *per continuitatem* (Orjalo et al. 2009; Paland et al. 2009; Mueller et al. 2010; Blasi et al. 2011).

Eine Reduktion der IL-6-Synthese vermittelte STAT1, unter anderem von IFN- γ dimerisiert (in murinen, embryonalen Fibroblasten; Carroll et al. 2013), während *Protein Inhibitors of activated STAT* STAT-dependente Signalmechanismen regulierte (Junicho et al. 2000; Gross et al. 2001). Es ist zudem zu beachten, dass die IL-6 *de novo*-Synthese mittels Dexamethason oder anderen Glucocorticoide inhibiert werden konnte (Miyazawa et al. 1998).

Intrazelluläre Effekte entwickelte IL-6 via *Janus Kinasen 1 und 2* sowie *Tyrosin Kinase 2* mit anschließender Phosphorylierung von Glykoprotein 130 (Stahl et al. 1994; Lehmann 2002). Dieser Signalweg konnte durch simultane Kultivierung mit IL-1 β potenziert werden (Sawada et al. 2013). Ohtani et al. (2000) zeigten, dass STAT1, 3 oder 5 nun an Glykoprotein 130 binden konnten. Via STAT3 induzierte IL-6 mittelbar sowohl die Glykolyse embryonaler Fibroblasten (Ando et al. 2010) als auch die Aktivierung der MAPK zur inflammatorischen Reaktion der Zelle (Barton 2005). Phosphoryliertes STAT 3 und ERK1/2 (*extracellular signal-related Kinase 1/2*) moderieren diesen Prozess (Hashizume et al. 2008). Zugleich vermittelte IL-6 sowohl durch Bindung an den (löslichen) Rezeptor als auch durch anschließende Phosphorylierung von STAT3 und p53 den durch einen Zuwachs der IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Konzentration verstärkten SASP (Tabelle 1; Kojima et al. 2012). In Fibroblasten adulter Donoren wurden ebenfalls erhöhte IL-6-mRNA-Konzentrationen nachgewiesen (Wolf et al. 2012).

In Bezug auf einen eventuellen Einsatz im Rahmen des TE ist zu erwähnen, dass IL-6 selbst die Osteosynthese und -resorption nicht beeinflusste. Vielmehr wird dieser Effekt durch Prostaglandin E₂ moderiert (Bertolini et al. 1994). In MSCs hingegen vermochte die Applikation von Calcitriol und Parathormon zur osteogenen Transdifferenzierung einen Anstieg der IL-6-Konzentration auszulösen (Sammons et al. 2004). Des Weiteren produzierte die IL-6-Gabe eine Steigerung der Sekretion von Kollagen Typ 1A1, einem osteogenen Marker (Ishiguro et al. 2013) dieser Zellart.

Im Folgenden werden Modulatoren der **IL-8**-Synthese, dessen Effekte sowie Interdependenzen in Form von Auto-Induktion oder Seneszenz beschrieben. Einen Überblick über TE-relevante Effekte ermöglicht Tabelle 1 am Ende dieses Abschnitts.

Fibroblasten sezernierten IL-8 konstitutiv (Orjalo et al. 2009; Paland et al. 2009; Grimstad et al. 2011), wengleich IL-1 β -, TNF- α - oder Lipopolysaccharid-vermittelte Signalkaskaden die Synthese steigerten (Adhikari et al. 2007; Eskan et al. 2008; Siqueira et al. 2009; Eleftheriadis et al. 2011; Jing Zhang et al. 2011; Akutsu et al. 2013; Fukui et al. 2013). Zur Induktion via IL-1 β waren jedoch Konzentrationen von mindestens 100 ng/ml Kulturmedium notwendig (Y.-A. Lee et al. 2012). Vorzugsweise seneszente Fibroblasten oder jene adulter Spender sezernierten dieses Chemokin bei adäquater Stimulation als Ausdruck des SASP (via IL-1 α : Bhaumik et al. (2009) bzw. Orjalo et al. (2009); via IL-6: Kojima et al. (2012); Wolf et al. 2012). Dies führte zu einer artifiziellen, aber kontinuierlichen IL-8-Sekretion durch dermale Fibroblasten oder humane MSCs (Blasi et al. 2011; Eleftheriadis et al. 2011) mittels autokriner Stimulation (Brochu et al. 2013). IL-8 reduzierte in pulmonalen Fibroblasten deren Mitoserate (Jing Zhang et al. 2011). Wirkungen auf die osteogene Transdifferenzierung wurden nicht beschrieben (vgl. Tabelle 1).

IFN- γ wirkt pro-inflammatorisch, Zytokin-regulierend und inhibiert u. a. TGF- β (siehe Tabelle 1).

IFN- γ wurde bei Grimstad et al. (2011) oder Chamberlain et al. (2013) zeitabhängig durch Bindung von IL-1 β an den zugehörigen Rezeptor synthetisiert.

Seine Wirkung vermittelte es via STAT1 (mit STAT3 und *Cyclin-dependent Kinase 8* mediiert; Bancerek et al. 2013). Dadurch steigerte IFN- γ in humanen Fibroblasten die IL-6-Sekretion und inhibierte jene von IL-1 β und TNF- α (Iwamoto et al. 2009). Zudem stimuliert dieses Interferon die HLA-DR- (*human leucocyte antigen D related*) Expression in Fibroblasten (Yan et al. 2011). Durch Inhibierung der Genexpression von α -SMA (*α -smooth muscle actin*), Kollagen-I und Fibronectin sowie deren Migration antagonisierte dieses pro-inflammatorische Zytokin die TGF- β -vermittelte, fibroblastäre Aktivierung (Bansal et al. 2012).

Bezüglich der osteogenen Transdifferenzierung zeigten Croitoru-Lamoury et al. (2011) für MSCs eine reduzierte osteogene Transdifferenzierung, indem IFN- γ die intrazelluläre Kynurenin-Kaskade durch Modulation von Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 und 2 (IDO 1 und 2) reguliert hatte. IL-1 β und insbesondere TNF- α potenzierten diesen Effekt (Meisel et al. 2011). Dies bewirkte eine Inhibition der Proliferation (Crop et al. 2010; Kronsteiner et al. 2011) und der Synthese von Osteopontin sowie *integrin-binding Sialoprotein* (Croitoru-Lamoury et al. 2011). Fibroblasten hingegen synthetisierten binnen 48 Stunden keine adäquaten Mengen von IDO (Wada et al. 2010).

TNF- α werden unter anderem antiapoptotische und antiproliferative Effekte zugleich zugeschrieben (Al-Zoubi et al. 2013; Tabelle 1).

Die TNF- α -Synthese begann via Aktivierung des IL-1 β -Rezeptors, analog zur Interferon- γ -Synthese (Chamberlain et al. 2013), via biphasischer Degradierung des NF- κ B-bindenden Moleküls I κ B α (Lee et al. 2013) oder durch autokrine Stimulation der Proteinsynthese (Chen & Thibeault 2010; Brochu et al. 2013). Zusätzlich erfolgte eine Regulation der Genexpression von IL-6 und -8, sodass eine Exazerbation der Zytokin-Synthese verhindert wurde (Tanaka et al. 2011). Ob dieses Peptid dabei konstitutiv sezerniert worden war, war umstritten (Paland et al. 2009; Gagnani et al. 2013; Lee et al. 2013).

In Analogie zu IL-1 β bewirkte eine Bindung an TNFR1 eine Vervierfachung der IL-6-Synthese in Fibrozyten (via Induktion und Aktivierung von NF- κ B oder *activator protein-1* (Mueller et al. 2010; Seidel et al. 2010; Gruchlik et al. 2012; Akutsu et al. 2013; David et al. 2013)), eine moderate Steigerung der aeroben Glykolyse in (embryonalen) Fibroblasten (Ando et al. 2010) sowie ein Sublimierung der FGF-Synthese (David et al. 2013; siehe Abb. 10). Die Zytokin-Induktion galt jedoch als weniger potent (Lee et al. 1993; Grimstad et al. 2011). Trotzdem bedingte die Exposition von

TNF- α an Fibroblasten eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation durch Suppression von *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3*, Fibronectin und Kollagen Typ III (Chen & Thibeault 2010). Forterre et al. (2011) konnten allerdings keine Reduktion der Zellzahl bei Konzentrationen bis zu 200 ng pro ml identifizieren, was sie durch die postulierte Existenz zweier, für TNF- α bzw. IL-1 β sensible Rezeptoren erklärten, welche unterschiedliche Signalkaskaden in Abhängigkeit vom Rezeptor aktivieren würden (Forterre et al. 2011; Grimstad et al. 2011). So verwiesen Hehlhans & Pfeffer (2005) in ihrem Review auf verschiedene Rezeptoren (TNF-Rezeptor I und II, FAS-Rezeptor (*fibroblast activation protein α*)), welche multiple Signalkaskaden steuern würden.

Bisher ist TNF- α im Rahmen des osteogenen *tissue engineering* nicht berücksichtigt worden, wobei *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* als strukturverwandtes Zytokin physiologisch die Genese von Osteoklasten mediierte (Lacey et al. 1998) und *in vitro* die Osteoblastogenese humaner MSCs inhibierte (Zhao et al. 2011). In Bezug auf Myofibroblasten konnten konzentrationsabhängige Effekte aufgezeigt werden: Eine zeitabhängige Induktion der Synthese von Prostaglandin E₂ durch 1 ng/ml TNF- α stimulierte deren Proliferation, während eine Konzentration von 10 ng/ml die Genexpression von α -SMA und Kollagen Typ I inhibierte (Mattyasovszky et al. 2010). Eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Fibroblasten wurde jedoch bezweifelt (Siqueira et al. 2009; Tanaka et al. 2011; Yan et al. 2011; Jing Zhang et al. 2011; Zhao et al. 2011; Nemenoff 2012). Außerdem wurde ein Anstieg des TNF- α -Levels nach *allografting* beobachtet (Iwamoto et al. 2009).

TGF- β fördert, wie in Tabelle 1 dargestellt, die Mitose der Zellen und deren Interaktion mit diversen Zytokinen, während es zusätzlich die Osteogenese induziert.

Wie Chung & Fu (2013) und Fuentes-Calvo et al. (2013) illustrierten, implementiert TGF- β durch autokrine Bindung an den Rezeptor die Transkription weiterer TGF- β -mRNA und *sonic hedge hoc proteins*, welche durch andere Signalkaskaden promitotische Effekte induzierten: Die Signalvermittlung basierte einerseits auf Phosphorylierung von PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)/AKT-Signalwegen sowie andererseits auf einer *Neuroblastoma-Rat sarcoma*-Regulation der Kaskade. Generell sezernierten dermale Fibroblasten TGF- β 1 in geringeren Konzentrationen (1 pg/10⁶ Zellen) als humane mesenchymale Stammzellen (3 pg/10⁶ Zellen; Blasi et al. 2011).

Neben vermehrter IL-6- und -8-Synthese exprimierten Fibroblasten nach TGF- β -Stimulation auch vermehrt Kollagen 1A1, 1A2, 3A1 und Fibrinogen, wodurch eine Wachstumsstimulation erklärt werden konnte (Felka et al. 2010; Pujols et al. 2011; Fuentes-Calvo et al. 2013). Andererseits wurde via *fibroblast activation protein α* Tumordinvasion, -migration und -proliferation begünstigt (Chen et al. 2009).

Konnte eine TGF- β -Applikation Transdifferenzierungsprozesse (chondrogene Stimulation (Seyedin et al. 1986; Galéra et al. 1992; Johnstone et al. 1998; Qi et al. 2003) oder osteogene Transdifferenzierung von MSCs und Fibroblasten (Viereck et al. 2002; Zhou et al. 2004; Kroll 2007; Stobbe 2008; Aloise et al. 2014)) induzieren, so musste zugleich eine Verstärkung dieses Effektes durch Kokultivierung mit IL-1 β berücksichtigt werden (Chen et al. 2009). Allerdings inhibierte TGF- β via Rezeptor I und *Activin receptor-like Kinase 5* auch BMP-7, was eine Verringerung der Zellmigration und Genexpression durch Interaktion mit *Mothers against decapentaplegic homolog 3* zur Folge hatte (Gronroos et al. 2012). *In vivo* erhöhte eine *Allograft*-Transplantation die basale Transkription binnen 72 Stunden (Ji et al. 2010).

Unter **FGF-2**-Einfluss hingegen kann die Proliferation gesteigert und die Osteogenese verzögert oder unterminiert werden (vgl. Tabelle 1).

FGF-2 stimulierte in erheblichem Maße die Proliferation humaner Fibroblasten, mit einem Maximum bei 10ng/ml Kulturmedium (Selige et al. 2010). Ein derartiger Effekt konnte durch anti-apoptotische und anti-seneszente Funktionen von FGF-2 auf verschiedene somatische Stammzellen zurückgeführt werden (Kim et al. 2010; Coutu & Galipeau 2011). Allerdings korrelierte eine nahezu verdoppelte Zellteilungsrate in Fibroblasten mit einer reduzierten vierzehntägigen Kapazität zur osteogenen

Transdifferenzierung, welche durch supprimierte Aktivitätsniveaus der alkalischen Phosphatase oder des Calcium-Depots charakterisiert worden war (J.-H. Lee et al. 2012). In Bezug auf die Inflammation konstatierten Kim et al. (2010), dass 10 ng/ml FGF-2 die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-6 und -8, in dentalen Fibroblasten stimulierten. In anderen Zellarten konnten jedoch weitergehende Effekte beobachtet werden, deren Übertragbarkeit auf Fibroblasten nicht beschrieben war: In humanen Osteoblasten förderte FGF-2 die DNA-Replikation, stimulierte somit deren Proliferation und inhibierte durch Hochregulieren der Gene für TGF- β , FGF-2, *early growth receptor protein 1* und COX-2 einerseits und *down regulation* von Genen für Kollagen Typ 1A1, Fibronectin, BMP-2, RunX oder Noggin andererseits deren Transdifferenzierung (Millie Hughes-Fulford & Li 2011; Park 2011). In MSCs beschleunigte sich die Osteogenese nach Ko-Stimulation mit BMP-6 leicht (Visser et al. 2012).

Eine potenzielle Anwendung im TE trat in Form des Zell-Enrichments pluripotenter Stammzellen aus der Haut in den Vordergrund (Ernst et al. 2010). Verstärkte es die *in vivo*-Osteogenese des roten Knochenmarks ovariektomierter Ratten durch Induktion der Transkription von RunX 2, Osteocalcin und Kollagen Typ I (Aguirre et al. 2007), so wurde für *in vitro* Versuche ein konträrer Effekt für humane MSCs aufgezeigt (Bertram 2002; Biver et al. 2012). Allerdings teilten sich 70% dieser Populationen mittels FGF-2 binnen 48 Stunden Inkubation, sodass unter BMP-2-Transfektion eine Steigerung der osteogenen Transdifferenzierung (gemessen an AP-Aktivität und Proteinexpression) erzeugt werden konnte (Bertram 2002). Denn FGF-2 supprimierte die Expression der *bone morphogenetic proteins* via Induktion von ERK/JNK-Signalkaskade (Biver et al. 2012), zugleich aktivierte es via MAPK/ERK-Weg die Expression von HLA-DR (Bocelli-Tyndall et al. 2010). Durch Phosphorylierungen der Signaltransduktionswege PI3K, MAPK und Proteinkinase C wurde NF- κ B reguliert, wodurch in dentalen Stammzellen eine Odontoblastogenese induziert worden war (Kim et al. 2010).

Stickstoffmonoxid (NO) wird in der Regel im Rahmen von *in vitro* Versuchen nur in gebundener Form angewendet, um Halbwertszeit und Kinetik der Freisetzung dieser genuin gasförmigen Substanz zu kontrollieren. Die Verwendung unterschiedlicher NO-Donoren beeinflusst unter Umständen die Reliabilität der Ergebnisse (Spitler et al. 2013). Die pro-apoptotische Wirkung von NO (siehe Tabelle 1) ist derzeit nicht vollständig verstanden, sie beruhte zum Teil auf direkter oder indirekter, Peroxynitrit-vermittelter Interaktion mit intrazellulären Kompartimenten (Forterre et al. 2011).

Zugleich detoxifizierten und konsumierten einige Zellarten via membranständiger Proteine, vor allem dem NADPH-abhängigen Cytochrom P450 Oxidoreduktase, dieses Molekül (Hall et al. 2009). Mit Hilfe von an S-Nitrosoglutathion gebundenem NO untersuchten Batista et al. (2013) dessen Interaktion mit Ras und die mitotische Wirkung auf Tumorzellen: Eine Nitrosylierung des Ras-Enzyms aktivierte MAPK, welche ihrerseits die Synthese weiterer Proteine steigerte (s. o.). In Fibroblasten genügte eine IC₅₀ (mittlere inhibitorische Konzentration) von 3,5-4,1 mM Deta/NO um Apoptose zu induzieren (Forterre et al. 2011). Ab einer Konzentration von 2mM Nitroprussid-Natrium als NO-Donor produzierten die Zellen vermehrt Bax sowie Cytochrom C; zwei mitochondriale, Apoptose-induzierende Proteine (Seo et al. 2011). Andere Autoren (Maragos et al. 1993) hingegen illustrierten Argumente für eine zytostatische anstelle einer zytotoxischen Wirkung von gebundenem NO; zumindest in Bezug auf Tumorzellen.

Dexamethason reduziert dosisabhängig das Zellwachstum ohne nachweisbare zytotoxische Effekte zu besitzen (Pujols et al. 2011) und wirkt osteoinduktiv (Junker et al. 2009; siehe Tabelle 1).

Als Glucocorticoid, wie auch *Corticotropin releasing hormon* (CRH), inhibierte es die Sekretion von IL-6 und -8 (Pujols et al. 2011; Rassouli et al. 2011), wobei zumindest für Ersteres dieser Effekt auf einer Inaktivierung der *de novo*-Synthese basierte (Miyazawa et al. 1998). Im Gegensatz dazu vermochte Calcitriol, ebenfalls ein Steroidhormon, in Kombination mit Parathormon die IL-6-

Synthese im Zuge der osteogenen Transdifferenzierung von MSCs zu stimulieren (Sammons et al. 2004).

Substanz	Effekt auf...	
	Proliferation	Transdifferenzierung
IL-1 β	Inflammation Regulation zahlreicher Zytokine Wirkung zeit- und dosisabhängig	
IL-6	Inflammation Induktion von SASP	Synthese von Osteogenese-Markern
IL-8	Auto-Stimulation der Synthese Marker für Seneszenz	
IFN- γ	Inflammation Regulation anderer Zytokine	Inhibition von TGF- β
TNF- α	Reduktion der Mitose-Rate fraglich	Inhibition d er Osteoblastogenese unklar
TGF- β	Mitose wird gefördert Interaktionen mit and. Zytokinen	Induktion osteogener Transdifferenzierung
FGF-2	Proliferation und Anti-Seneszenz	Verringerung d. Osteogenese-Potenzials
NO	Induktion von Apoptose	
Dexamethason	Reduktion d. Mitose-Rate	Osteoinduktion

Tabelle 1: **Übersicht über TE-relevante Effekte einzelner Zytokine, NO und Dexamethason**

Für die in der linken Spalte abgekürzten Substanzen werden zunächst bedeutsame Effekte bezüglich der Proliferation von Fibroblasten in der mittleren Spalte beschrieben. Die rechte Spalte enthält einen Überblick über die bekannten Effekte besagter Substanzen auf die (osteogene) Transdifferenzierung.

Quellen: (Viereck et al. 2002; Kroll 2007; Bhaumik et al. 2009; Iwamoto et al. 2009; Orjalo et al. 2009; Selige et al. 2010; Forterre et al. 2011; Grimstad et al. 2011; Millie Hughes-Fulford & Li 2011; Park 2011; Pujols et al. 2011; Fuentes-Calvo et al. 2013; Bansal et al. 2012; Kojima et al. 2012; Wolf et al. 2012; Al-Zoubi et al. 2013; Chamberlain et al. 2013; Chung & Fu 2013; Ishiguro et al. 2013)

1.5. Problematik der Festlegung geeigneter Kriterien der osteogenen Transdifferenzierung

Um geeignete Nachweisverfahren (in Abschnitt 2.6 aufgeführt) für die osteogene Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten auszuwählen, müssen zuvor adäquate Kriterien für diesen Prozess definiert worden sein. Dazu sollen im Folgenden Kriterien anderer Autoren vorgestellt werden

1.5.1. Übersicht verwendeter Kriterien

Die stagnierende **Zellzahl** als Kennziffer für die mitotische Aktivität diene als Negativ-Indikator für die Suffizienz eines osteoinduktiven Mediums (Van der Plas & Nijweide 1988). Außerdem ermöglichte sie Rückschlüsse auf den Status der Konfluenz der *in vitro*-Kulturen (Stobbe 2008). Mit Hilfe von Viabilitätstests konnte hingegen lediglich die Proliferation der Zellen indirekt nachvollzogen werden (Philips et al. 2010).

Stammzellen anhand von **morphologischen Aspekten** zu charakterisieren, zielte auf eine qualitative Einschätzung des Beginns der Osteoinduktion durch Änderung des Phänotyps ab (Lysy et al. 2007; Stobbe 2008; Ding et al. 2014). Partiiell wurden diese Ergebnisse anhand der Aspekte „Zellkonfluenz“ oder „Zellform“ ordinalskaliert (Stobbe 2008). Hierzu eigneten sich sogenannte *bone nodule formations* („Knochenestern“) als spezielle, morphologische Korrelate der Osteogenese, welche wiederum einerseits auf der qualitativen Identifizierung von Calcium-Depots und andererseits auf deren Summierung basierten (Guilak et al. 2006; Stobbe 2008). Somit implizierte dieser Parameter die Idee einer (qualitativen) Korrelation zwischen Formierung von Knochenestern und Progression der osteogenen Transdifferenzierung. Obwohl Stammzellen *in vivo* sehr selten fusionierten, war ein solcher Effekt nicht auszuschließen (Terada et al. 2002).

Einen qualitativen **Nachweis extrazellulären Calciums** erfolgte primär mittels geeigneter Färbungen (Stobbe 2008). Zumeist war eine Detektion jedoch erst zum Abschluss des Prozesses der osteogenen Transdifferenzierung möglich (Lavoie et al. 2009; Biver et al. 2012; Choi et al. 2011; N. Mostafa et al. 2012). In der Regel wurden Verfahren nach „von Kossa“ oder mit „Alizarin Rot“ genutzt, welche jedoch beide Mineralisierungen extrazellulärer Matrix mittels Calcium detektierten (Sammons et al. 2004; Lorenz et al. 2008; Lavoie et al. 2009). Über den Anteil der positiven Färbung am mikroskopischen Sichtfeld zur Bestätigung der Hypothese existierte keine abschließende Einigkeit (Stobbe 2008).

Um diese Detektion zu quantifizieren waren verschiedene Methoden etabliert, unter anderem semiquantitative Messungen der Intensität und Ausbreitung der Färbung (Stobbe 2008; Choi et al. 2011). Andererseits existierten auch spektralphotometrische *Assays* zur Messung der Farbstoff-Quantität als indirekten Nachweis des Hydroxylapatits (Sammons et al. 2004; Guilak et al. 2006; Biver et al. 2012), welche sich jedoch in ihrer Sensitivität unterschieden (Gregory et al. 2004). Eine singuläre quantitative Messung mündete zudem nach Mostafa et al. (2012) in der Problematik fehlender Informationen bezüglich der Verteilung des Calciums.

Diese Überlegungen mündeten somit in der Definition distinkter Kriterien bezüglich der Färbung: Einerseits muss eine ausreichende Fläche des Sichtfeldes mit Farbstoff qualitativ als mineralisiert zu identifizieren sein und andererseits erfordert ein Verwerfen der Nullhypothese (H_0) eine signifikante Zunahme der Farbstoffkonzentration in geeigneten Quantifizierungsverfahren.

Die **Expression und Synthese osteogener Proteine** konnte zum Einen anhand von temporären und sequentiellen Aspekten eingeteilt werden (Zhou et al. 2006). Zum Anderen berücksichtigte eine anatomische Klassifizierung („intra-“, oder „extrazellulär“) zusätzlich weitere Aspekte der Transdifferenzierung (Stobbe 2008). Außerdem existierten verschiedene Prinzipien des Nachweises, entweder basierend auf der direkten Detektion des Proteins (bspw. mittels Western Blot; Lysy et al. 2007; Seib et al. 2009) oder auf Amplifikation und Quantifizierung der DNA mittels Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*; PCR) (Lorenz et al. 2008; Seib et al. 2009; Philips et al. 2010; N. Mostafa et al. 2012).

Mit Blick auf die Auswahl geeigneter Marker müssen bestimmte Eigenschaften der in Anhang 2 charakterisierten Proteine berücksichtigt werden:

- Während Osteocalcin als spezifisch für Osteoblasten und Chondrozyten galt (Ducy et al. 1996), konnte BSP auch von malignen Zellen oder Osteoklasten synthetisiert werden (Seibel 2000).
- Alkalische Phosphatase (AP) wurde von verschiedenen humanen Zellen in mehreren Isoformen exprimiert, sodass die Reliabilität des Nachweises von der Spezifität des verwendeten Antikörpers oder Primers für osteoblastäre AP abhing (Seibel 2000). Mostafa et al. (2012) normierten zudem die gemessene Aktivität anhand der DNA-Menge, um die spezifische AP-Aktivität verschiedener Zellarten zu vergleichen und so den osteoinduktiven Effekt zu belegen.
- RunX 2 wurde zwar in Osteoblasten verstärkt exprimiert (Ducy et al. 1997), geringere Quantitäten offenbarten sich jedoch auch in anderen Gewebsarten, beispielsweise Hoden, Nebenhoden oder Gehirn (Jeong et al. 2008). Zudem induzierte RunX 2 Osteocalcin (Ducy et al. 1997). Osteopontin, BSP und Kollagen Typ I wurden jedoch von RunX 2 inhibiert (Ducy et al. 1999).

Dadurch kann keine abschließende Determinierung auf geeignete proteinogene Marker erfolgen.

1.5.2. Zeitliche Aspekte der Kriterien

Wie diese Darstellung impliziert, existieren keine allgemein verbindlichen Kriterien für eine osteogene Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten. So kategorisierte beispielsweise Stobbe (2008) potentielle Kriterien, und damit Nachweisverfahren, anhand von drei Aspekten: „physische“, „biochemische“ und „färbungsbezogene Parameter“. Die physischen Parameter schlossen Zellmorphologie, Zellzahl und Formierung von „Knochennestern“ ein, während unter biochemischen Aspekten die Detektion bestimmter intra- und extrazellulärer Proteine (vgl. Anhang 2) verstanden wurde. Die Färbung inkludierte vorwiegend die Calcifizierung der extrazellulären Matrix. Guilak et al. (2006) und Gothard (2009) hingegen verzichteten in ihren Arbeiten auf den direkten Proteinnachweis, sondern betonten die positiven, quantifizierten Ergebnisse der Alizarin Rot Färbung und des AP-Assays. Choi et al. (2011) aber postulierten auf Basis der Ergebnisse ihrer Experimente einen sequentiellen Ablauf der osteogenen Transdifferenzierung durch Proliferation, Differenzierung und Calcifizierung. Aus diesem Grund verwendeten die Autoren verschiedene, in ihrem zeitlichen Detektionsmuster differierende Messverfahren: So diente beispielsweise der AP-Assay der Identifizierung einer Initiation der Transdifferenzierung und als Beleg für die Proliferation der Fibroblasten. Die Quantifizierung der RNAs verschiedener Osteoblasten-spezifischer Proteine symbolisierte die zelluläre Differenzierung, während die Färbungen den finalen extrazellulären Aspekt beschrieben.

1.6. Faktoren osteogener Transdifferenzierung

Bereits 1999 vermuteten Pittenger et al., dass eine effiziente Transdifferenzierung abhängig sei von „Nährmedium, Zelldichte, Trägermatrix, mechanischer Belastung sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen“. In diesem Abschnitt wird ein Überblick über dokumentierte oder diskutierte potenzielle Moderator- und Mediatorvariablen der osteogenen Transdifferenzierung gegeben:

Scaffolds, Zellgerüste, traten zunächst als rudimentäre Faktoren des Transdifferenzierungsprozesses in den Vordergrund. Diese zumeist mikrofluiden Systeme basierten prinzipiell auf verschiedenen Substanzklassen, sodass nachteilige Effekte sich ebenfalls inhomogen präsentierten. So standen Bettinger et al. 2005 einerseits artifizielle Biogerüste aus Silikon, Poly-Dimethylsiloxan (PDMS), Poly-Lactoglycolsäure (PLGA) und Poly-Glycerolsebacat (PGS) und andererseits jene aus homologen Materialien, zumeist Spongiosa, zur Verfügung. Die körperfremden Materialien erschwerten unter

gewissen Umständen die Biokompatibilität durch mangelnde Biodegradation, Zytotoxizität oder rigide Strukturierung (Bettinger et al. 2005), was ihre klinische Verwendung limitierte. An Stelle der Verwendung eines Biogerüsts nutzten deshalb Jeney et al. (2000) Glasoberflächen, welche die adipogene Transdifferenzierung der Fibroblasten stimulierte. Auch die Anwendung von Fibronectin (Jacobs et al. 2013), Knochenpulver (Mizuno & Glowacki 2005) oder Gelatine (Sommar et al. 2009) reduzierte die Wahrscheinlichkeit einer Transposition ins klinische *Setting* (Gerges 2010).

Aus diesen Gründen wird in allen hier vorgestellten Versuchsanordnungen auf die Nutzung von *scaffolds* verzichtet, zumal diese keine obligate Voraussetzung für eine erfolgreiche osteogene Transdifferenzierung darstellten (Lorenz et al. 2008; Cattani et al. 2011).

Die Nutzung **viraler Vektoren** zur Transduktion bestimmter Proteine oder Gene (BMP-2 oder -7) in Fibroblasten ermöglichte ebenfalls eine osteogene Transdifferenzierung (bspw. Rutherford et al. 2002). Eine klinische Perspektive ergab sich bisher jedoch nicht (Gerges 2010). Eine ähnliche Situation widerfuhr der Idee von He et al. (2011) Osteoinduktion durch Selektion einer BMP-2-*Ib*⁺-Subpopulation zu optimieren.

Die Wirkung von **Zytokinen** auf die Transdifferenzierung ist lediglich für MSCs untersucht worden: Unter den Zytokin-Derivaten bewirkte TNF- α in MSCs eine pro-inflammatorische Priming, bei Fibroblasten jedoch nicht (Blasi et al. 2011). Die Auswirkungen auf die osteogene Transdifferenzierung wurden in diesen Experimenten jedoch nicht untersucht. Die zusätzliche Exposition von rekombinantem BMP-6 zu Calcitriol/Parathormon-Medium erhöhte nach zwölf Tagen signifikant Osteocalcin-Synthese und Calcium-Akkumulation von mesenchymalen Stammzellen (Sammons et al. 2004). TGF- β hingegen, welches zur BMP-Superfamilie gehörte (s. Abschnitt 1.4), stimulierte Fibroblasten einerseits zur Mitose (Rassouli et al. 2011) und andererseits zur (myogenen) Transdifferenzierung (Huang et al. 2010). IFN- γ modulierte via IDO II und Tryptophan die Osteoblastogenese humaner MSCs bei Applikation von 100 IU (*International Units*) / ml in entsprechendes Differenzierungsmedium (Croitoru-Lamoury et al. 2011), während zugleich IL-1 β die osteogene Transdifferenzierung medullärer MSCs bezüglich Calcifizierung oder BMP-2-Transkription verstärkte (Mumme et al. 2012).

Eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Fibroblasten wurde bisher nicht geklärt.

Nutzten Cattani et al. (2011) zur Terminierung der urothelialen Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten oder Urothelzellen ein **Scherstress**-Modell auf Basis von laminarer Strömung (0,1 dyn/cm²) und Hydrokompression (15cm H₂O), so gelang es Yourek et al. (2010) die Genexpression von BMP-2 und AP während der Osteogenese humaner MSCs mittels Scherstress zu steigern. Dazu dehnten Jacobs et al. (2013) Zellpopulation mittels einer speziell entwickelten Vorrichtung, welche durch Spannen einer elastischen Membran auf 101-105% der statischen Spannung für zwölf Stunden Scherstress erzeugte. Osteoblasten von Mai et al. (2013) steigerten allerdings schon nach singulärem Scherstress von 12 dyn/cm² die Aktivität der AP, RUNX 2- sowie BMP-2-Genexpression und die extrazelluläre Calcifizierung. Bei simpleren Methoden strömte das Differenzierungsmedium analog zur Physiologie (*oscillatory fluid shear stress*) zirkulär über die Zellen hinweg (45 U/min (Umdrehungen pro Minute) für 60min; Delaine-Smith et al. 2012). Nach dreiwöchiger Inkubation mit Dexamethason-Medium sowie simultaner Scherstress-Induktion, synthetisierten diese Zellen zwar signifikant mehr kalzifizierte Matrix (im Vergleich zur alleinigen Dexamethason-Applikation), die AP-Aktivität blieb aber konstant (Delaine-Smith et al. 2012). Letztere Beobachtung ließ sich auf die Dauer der Induktion oder die Zellart zurückführen, denn am siebten Tag einer je zwölfstündigen Stressinduktion von Odontoblasten aktivierten diese die alkalische Phosphatase (Honda et al. 2006).

Osteoinduktive Kulturmedien basieren zumeist auf der Verwendung von Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen: Eine suffiziente osteogene Transdifferenzierung von Fibroblasten konnte ab 100 nMol erzielt werden (Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Choi et al. 2011), obwohl auch andere Konzentrationen Hydroxylapatit-Fällungen auslösten (1000 nM bei Sommar et al. (2009), 10 nM bei Hee & Nicoll (2011)) bzw. zu frustrierten Ergebnissen führten (Wagner et al. 2005; Wada et al. 2010). Dieser Effekt ließ sich lediglich *in vitro* nachweisen, da ein erhöhtes Serum-Cortisol im Rahmen des Cushing-Syndroms negativ mit der OC-Konzentration korrelierte (Sereg et al. 2011).

Calcitriol initialisierte als weiteres Steroidhormon in einer Konzentration von 100nM die Genese humaner Osteoblasten aus Fibroblasten durch Regulation von BMP-4 und -6 (Hee & Nicoll 2009). In MSCs reichte eine Konzentration von 10 nM dieses Vitamins für vierzehn Tage zum Nachweis von RunX 2 und OC aus (Peng et al. 2008). Zu identischen Ergebnisse mit MSCs gelangten auch Sammons et al. (2004), wobei diese zusätzlich 200 ng/ml Parathormon, den physiologischen Antagonisten, verwendeten. Hingegen kalzifizierten bei Song et al. (2011) primäre Osteoblasten extrazellulär mittels Calcitriol (Konzentration: 1-1000 nM) nicht. Lediglich in Kombination mit 100 nM oder 1000 nM 17 β -Östradiol synthetisierten die Zellen Vitamin-D-Rezeptorproteine durch Phosphorylierung des ERK1/2-Signalweges, wodurch sich die extrazelluläre Kalzifizierung potenziert. An dieser Stelle ist zu bedenken, dass juvenile Fibroblasten im Gegensatz zu Adulten einen osteoblastären Phänotyp (BSP⁺, OC⁺, extrazelluläre Matrix) nach vierwöchiger Calcitriol-Exposition (100nM) exprimierten. Dadurch konnte ein selektiver Effekt in Abhängigkeit von Zellart oder -alter nicht ausgeschlossen werden.

In der Regel setzten verschiedene Autoren (bspw. Peng et al. 2008; Sommar et al. 2009; Song et al. 2011) zusätzlich zu diesen Cholesterin-Derivaten L-Ascorbinsäure (Vitamin C) in verschiedenen Konzentrationen ein, wobei Choi et al. (2008) einen pro-mitotischen Effekt, insbesondere bei 250 μ M, des stabilisierten L-Ascorbinsäure-2-Phosphat nach zweiwöchiger Inkubation aufzeigten. Die Autoren dokumentierten zudem einen supportiven Effekt auf die Kalzifizierung ab einer Konzentration von 50 μ M.

Neben dem Steroidhormon interferierte ebenfalls die Serum-Komponente mit den transdifferenzierenden Zellen: Zwar verkürzte die Nutzung autologen Serums die Mitosedauer im Vergleich zu *fetal bovine serum* (FBS), allerdings wirkte FBS osteoinduktiv (via *nmb*, *cytokin-receptor like protein 1*) und Zellzyklus arretierend (Shahdadfar et al. 2005). Konditionierte Medien, also die Verwendung des flüssigen Überstandes einer Osteoblasten-Kultur, als Nähr- und Differenzierungsmedium für andere Zellarten, generierten ebenfalls osteoinduktive Milieus (Ilmer, M 2009). Hier blieb jedoch eine Identifizierung der Wirkstoffe sowie deren sequentieller Wirkung schwierig (Van der Plas & Nijweide 1988; Ilmer, M 2009), denn MSCs beispielsweise transdifferenzierten nach simultaner Inkubation mit Osteoblasten nicht (Tsai et al. 2011).

Weitere wichtige Faktoren stellten **Inkubationsdauer und Messzeitpunkte** dar: Mit einer Zeitspanne von 21 Tagen und Messungen am 7., 14. und 21. Tag etablierten Choi et al. (2011), Dexheimer et al. (2011) und Hee & Nicoll (2009) eine vergleichsweise rasche Methode. Einige Autoren (Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Ilmer, M 2009; He et al. 2011) begrenzten hingegen die Inkubationsdauer auf vier Wochen, obwohl keine maximale Zeitspanne zu erkennen ist (bspw. drei Monate bei Sommar et al. (2009)).

In wieweit Zellen simultan **proliferieren** und transdifferenzieren, ist nicht abschließend geklärt: Choi et al. (2011) beschrieben die Entwicklung eines *multilayers* sowie Amplifikation der c-Fos-mRNA um den siebten Tag. Beides implizierte eine proliferative Aktivität auch nach Versuchsbeginn. Auch Dexheimer et al. (2011) beobachteten solche Zusammenhänge: MSCs mit initial erhöhter proliferativer Aktivität transdifferenzierten zuverlässiger und schneller.

Ein additionaler Faktor zur Steigerung der Proliferation und Transdifferenzierung beruhte auf Zell-**Hypoxie**: Hypoxische MSCs ($pO_2=5\%$; aus der Ratte) proliferierten schneller und bildeten mehr Kolonien bzw. Knochenmatrix nach Induktion als Populationen mit 20% Sauerstoff-Partialdruck (Lennon et al. 2001). Diese Entwicklung korrespondierte mit der gesteigerten Synthese von *hypoxia induced factor-1 α* (HIF-1 α) und Chondroitin-4-sulfat-Proteoglykan in chondrogen induzierten dermalen Fibroblasten (Mizuno & Glowacki 2005). Eine direkte Interaktion zwischen Hypoxie und osteogener Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten ist bisher nicht beschrieben worden.

In vitro-Seneszenz als zusätzlicher Faktor betraf ebenfalls sowohl Proliferation als auch Transdifferenzierung (Dexheimer et al. 2011; Koch et al. 2011).

So illustrierten Versuche an humanen und murinen Fibroblasten eine Sauerstoff-dependente, variable Proteinexpression mit zunehmender Mitoserate (Coppé et al. 2010). Da dieser Prozess weite Bereiche der Chromosomen umfasste, schloss dies Einflüsse auf weitere Funktionen der Zelle nicht aus (Coppé et al. 2010). Diesen Prozess der Seneszenz arretierend und Mitose induzierend, verwendeten Coutu & Galipeau (2011) Substrate aus der FGF-Familie. Ein hohes Proliferationspotential determinierte aber in einigen Fällen eine niedrige *in vitro*-Osteogenese (He et al. 2011).

Bezüglich der Kapazität zur Transdifferenzierung belegten einige Experimente mit Fibroblasten (und MSCs) lediglich in niedrigen Passagen (Passage 3 oder 4) deren pluripotentes Potenzial (Sekiya et al. 2002; Shahdadfar et al. 2005; Lysy et al. 2007) oder wiesen dieses in Höheren nicht nach (Passage 6: Wada et al. 2010). Lysy et al. (2007) begründeten dies mit fehlender Kalzifizierung ab Passage 4. Es muss jedoch bedacht werden, dass der Begriff „Passage“ kein exaktes Kriterium für die mitotische Aktivität der Zellen definierte. Eine Passagierung (das Ausbringen der Zellen eines Kulturgefäßes auf mehrere Neue) erfolgte ab einer individuell festzulegenden Zelldichte oder Konfluenz (Lysy et al. 2007).

Das **Spenderalter** schränkte bei Hee & Nicoll (2011) die osteogene Transdifferenzierung humaner Fibroblasten ein: Zellen neonataler Spender transdifferenzierten osteogen, während dies für jene adulter Spender weder mittels Dexamethason noch Calcitriol oder deren Kombination erreicht wurde. Für medulläre MSCs konnten solche Einschränkungen nicht verifiziert werden (Dexheimer et al. 2011; Siegel et al. 2013). Das Spenderalter beeinflusste laut Koch et al. (2011) die Methylierungsmuster fibrogener DNA, wobei eine osteogene Transdifferenzierung in keiner Gruppe (< 23 Jahre und > 60 Jahre) gelang. In MSCs hingegen war dieser Prozess erfolgreich, da die altersabhängige Methylierung dort differierte. Als möglicher Ansatzpunkt zur Beeinflussung der Methylierung fungiert 5'-Azacytidin, ein N-Methyltransferase-Inhibitor. Dieser funktionelle Antagonist beeinflusste die initiale Mitosefrequenz negativ (Montesano et al. 2013). Zudem limitierte er die Proteinmenge im Zellzyklusarrest von *Caspase 3*, *Growth arrest and DNA-damage inducible 45 alpha* (Gadd45a) sowie *Tumor susceptibility gene 101* (Tsg101), wodurch ein Restriktionspunkt im Zellzyklus zum Ausstieg, also zur Transdifferenzierung, genutzt werden konnte (Montesano et al. 2013).

Bisher ist es also nicht gelungen die Bedeutung einzelner Faktoren zu extrapolieren, weshalb Interaktionen zwischen verschiedenen Faktoren (rote Pfeile in Abb. 4) nicht auszuschließen sind:

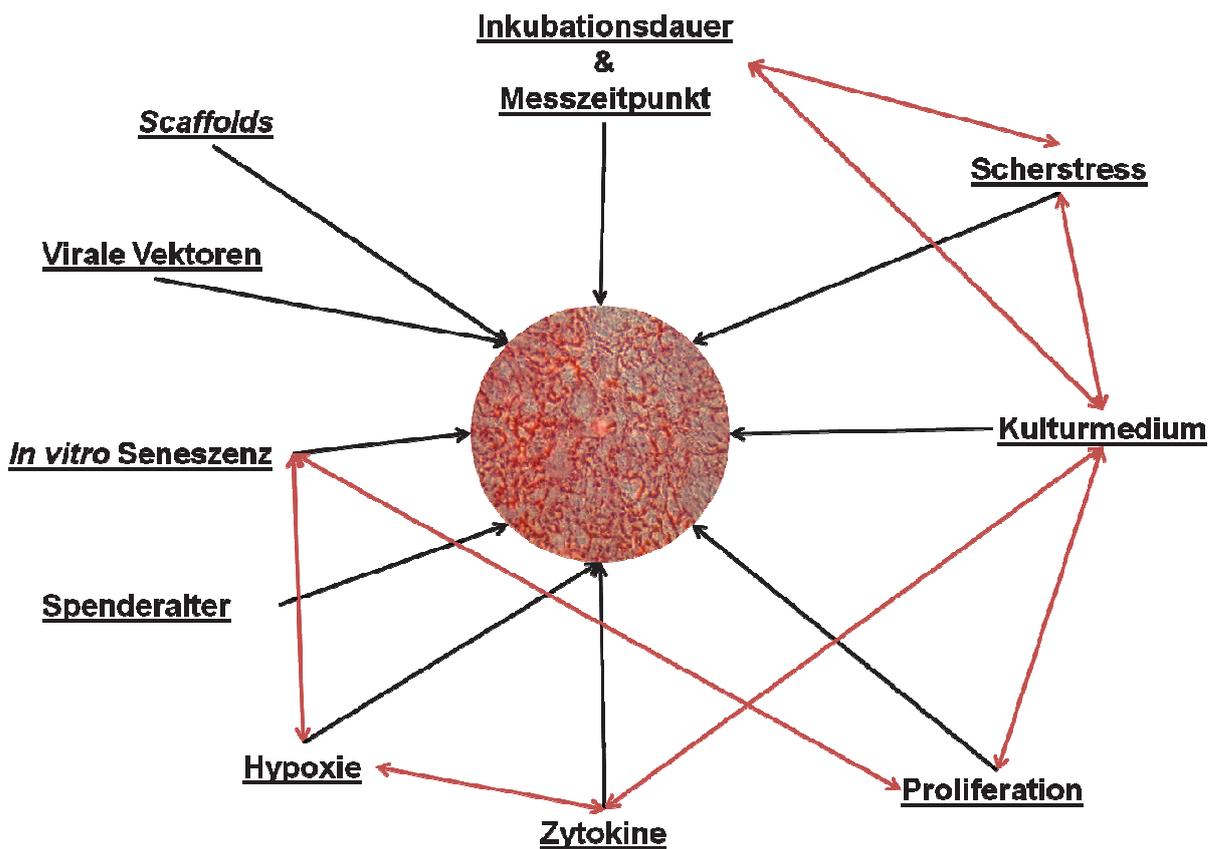


Abb. 4: **Direkte und indirekte Einflüsse auf die osteogene Transdifferenzierung**

Die durch schwarze Pfeile symbolisierten direkten Einflüsse verschiedener Faktoren auf die osteogene Transdifferenzierung werden durch Wechselwirkungen (rote Pfeile) zwischen bestimmten Faktoren ergänzt.

Quellen: (Lennon et al. 2001; Rutherford et al. 2002; Shahdadfar et al. 2005; Lorenz et al. 2008; Hee & Nicoll 2009; Sommar et al. 2009; Huang et al. 2010; Cattani et al. 2011; Choi et al. 2011; Koch et al. 2011; Delaine-Smith et al. 2012)

1.7. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Wie einleitend beschrieben, setzt sich das osteogene *tissue engineering* aus mehreren Schritten zusammen (siehe Abb. 1). Auf Grund der in Abschnitt 1.3 („Komplexität der Abgrenzung verschiedener Stammzell-Populationen“) erläuterten Inhomogenität bezüglich der Identifikation und Abgrenzung humaner Fibroblasten gegenüber anderen pluripotenten Stammzellen analysiert diese Arbeit den Schritt zur Isolation der dermalen Fibroblasten nicht. Mit der Fokussierung auf die *in vitro* durchzuführenden Schritte der Proliferation und osteogenen Transdifferenzierung sollen grundlegende Erkenntnisse zur Entwicklung von Modellen zum autologen TE des Knochensersatzes etabliert werden. Dazu werden zunächst beide Schritte getrennt betrachtet und in abschließenden Experimenten Interdependenzen zwischen beiden Eigenschaften eruiert:

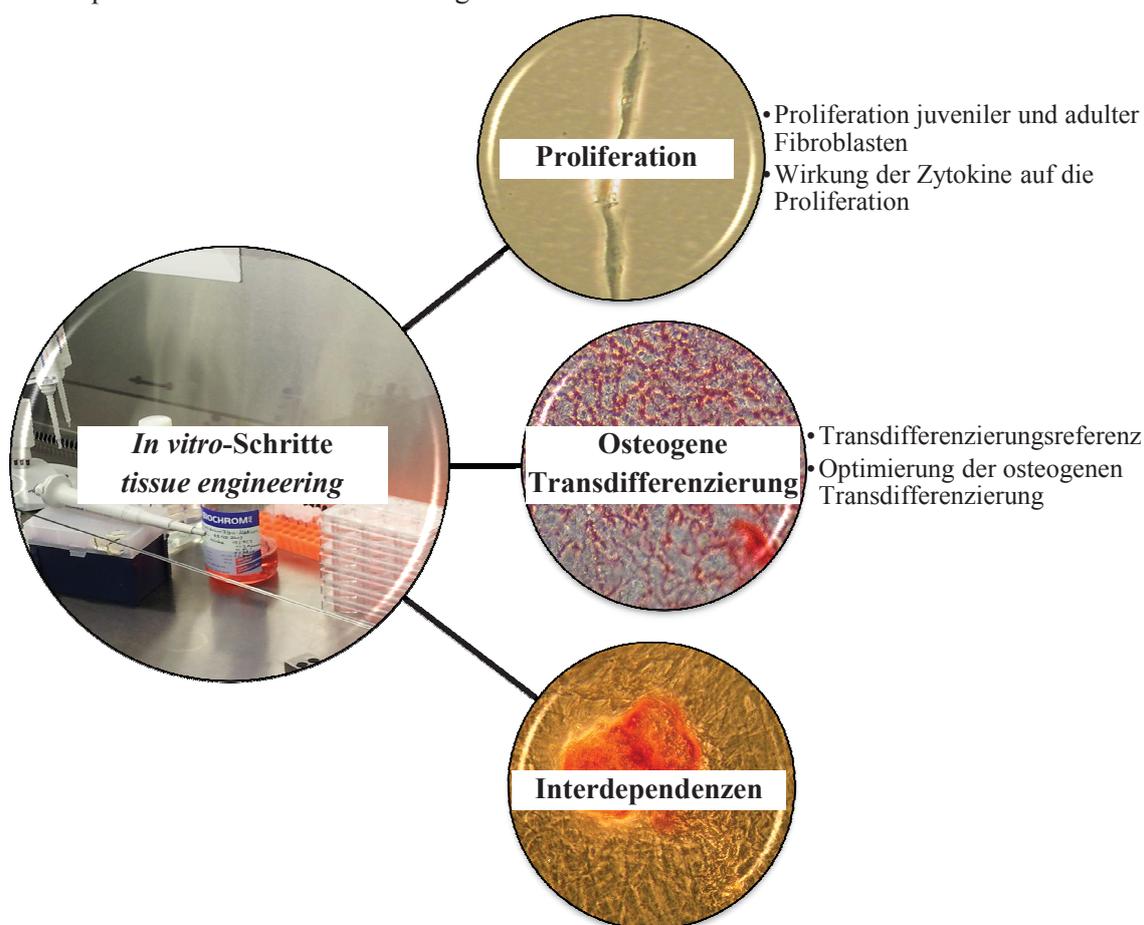


Abb. 5: **Thematische Unterteilung der Dissertation**

Die Beschränkung auf *in vitro*-Schritte des TE (linker Kreis) ermöglicht eine umfassende Analyse der proliferativen (Kreis rechts oben) und transdifferenzierenden (Kreis rechts mittig) Schritte sowie deren Interdependenzen (Kreis rechts unten). Die Unterpunkte verweisen auf Untergliederungen des Themenkomplexes.

Zunächst stellt sich deshalb die Frage, ob und wie sich dermale Fibroblasten von Spendern unterschiedlichen Alters bezüglich ihrer proliferativen Eigenschaften unterscheiden. Gleichzeitig interessiert die Fragestellung, ob ein solcher Effekt zumindest partiell auf einen gesteigerten Zellstoffwechsel (in Form des Resazurin-Umsatzes) zurückzuführen sein könnte. Darauf aufbauend lässt sich untersuchen, ob Fibroblasten mittels ausgewählter Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , FGF-2) bzw. NO in distinkten Konzentrationen (1IU/ml, 3IU/ml, 10IU/ml, 33IU/ml, 100IU/ml, 333IU/ml, 1000IU/ml) in ihrem initialen Wachstum manipuliert werden könnten. Dadurch könnte perspektivisch eine klinische Anwendung des TE optimiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt nun auf der Etablierung einer geeigneten Kombination von Nachweisverfahren für die osteogene Transdifferenzierung.

Mit dem Ziel der Etablierung einer Referenzmethode, deren Osteogenese nach den zuvor definierten Kriterien verifiziert werden kann, soll zunächst ein geeignetes *Setting* aufgebaut werden. Durch Variation der Referenzmethode anhand der in Abb. 4 illustrierten Faktoren soll die Hypothese multipler Transdifferenzierungsmethoden überprüft werden. Dazu sollen primär die Messwerte unter Versuchs- mit jenen unter Kontrollbedingungen verglichen und erst sekundär verschiedene Versuchskonfigurationen untereinander eruiert werden. Ziel ist in diesem Zusammenhang die Entwicklung einer unter quantitativen Gesichtspunkten optimalen Transdifferenzierungsmethode.

Die dritte Gruppe verfolgt die Frage nach der Interdependenz (siehe Abb. 5) zwischen Proliferation einerseits und osteogener Transdifferenzierung andererseits. Durch diese Junction der zuvor separat betrachteten Schritte rückt die klinische Perspektive des TEs wieder in den Fokus.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die in Anhang 3 in alphabetischer Reihenfolge aufgeführten Arbeitsgeräte wurden für diese Dissertation vom Forschungslabor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie zur Verfügung gestellt. Als Verbrauchsmaterialien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, Produkte von „Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT“ oder „Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA und Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D“ genutzt. So auch die Kulturgefäße, deren Füllungsvolumina und Grundflächen der Hersteller wie folgt angegeben:

	Fläche (in cm ² /Well)	Volumen (in ml/Well)
6-Well	9,6	1-3
12-Well	3,9	0,5

Tabelle 2: **Flächen und Volumina der Wells**

Nach Angaben von Greiner Bio-One International AG können 6-Well-Kulturgefäße mit einer Grundfläche von 9,6cm²/Well mit 1-3ml befüllt werden, während 12-Well-Platten mit einer Fläche von 3,9cm² je Well mit 0,5ml bedeckt werden sollen.

Eine detaillierte Aufstellung der Geräte und Verbrauchsmaterialien bieten Anhang 3 bzw. Anhang 4.

2.2. Literaturrecherche

Der elektronische Katalog der Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf ergänzte die Informationen aus den online-Datenbanken „pubmed“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) und „Cochrane Collaboration“ (www.cochrane.org). „Zotero 3.0“ (Center for History and New Media, George Mason University, Fairfax, USA) diente der digitalen Verwaltung der Quellen, während „Microsoft Office 2007[®]“ (Microsoft Corp., Redmond, USA) und „IBM SPSS Statistics 20[®]“ (IBM Corp., Armonk, USA) zur Niederschrift oder statistischen Berechnung verwendet wurden.

2.3. Statistische Auswertung und Aufbereitung der Daten

Die primäre Speicherung der Rohdaten und grafische Darstellung leistete Microsoft Excel 2007[®]. Deskriptiv- und Induktivstatistik errechnete IBM SPSS Statistics 20[®].

2.3.1. Hypothesen-Prüfung

Für die Induktivstatistik wurde zur Signifikanzprüfung ein p-Wert von <0,05 a priori festgelegt. Auf Basis der Übersicht nach (Bortz & Weber 2005) für metrische Skalen kristallisierten sich zwei distinkte Entscheidungsbäume zur Auswahl des geeigneten Hypothesen-Tests heraus:

Abb. 6 schematisierte zunächst den Entscheidungspfad für zwei Stichproben, deren primäre Unterteilung nach dem Charakter der beiden Stichproben (unabhängig vs. abhängig; Abb. 6 erstes rotes Feld) inhaltlich auf Basis der Versuchsanordnung zu treffen war. Im Anschluss ermittelte der Kolmogorov-Smirnow-Test für beide Arme des Entscheidungsbaumes die Verteilungsform der Daten (zweites rotes Feld in Abb. 6). Waren die Stichproben abhängig, so erfolgte die Hypothesen-Testung für normalverteilte Daten mittels „t-Test für abhängige Stichproben“ und für nicht normalverteilte Messwerte durch den „Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test“ (grüne Felder in Abb. 6). Unabhängige

Stichproben, welche sich zugleich nicht normalverteilt darstellten, beruhten in ihrer Prüfung der Nullhypothese auf dem Mann-Whitney-U-Test.

Der identische Test konnte zudem bei normalverteilten, aber bezüglich der Varianzen inhomogenen Messwerten genutzt werden (siehe grüne Felder in Abb. 6). Zeigte der „Levene-Test“ jedoch homogene Varianzen, so endete die Testauswahl in der Verwendung des „t-Tests für unabhängige Stichproben“.

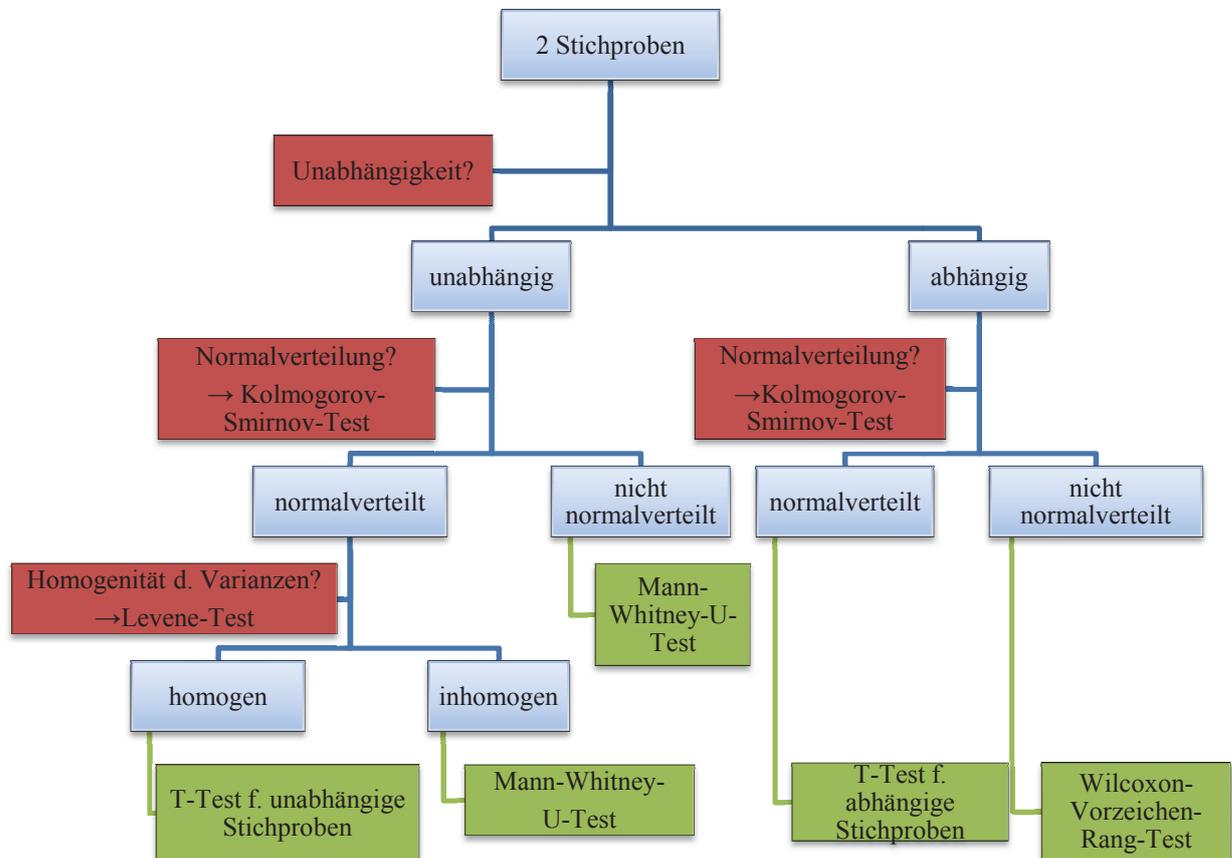


Abb. 6: Entscheidungsbaum Hypothesen-Prüfung für zwei Stichproben

Anhand der in rot eingefärbten Entscheidungen (und statistischen Tests) konnten die Stichproben kategorisiert werden (blaue Felder). Somit endete die Auswahl bei dem für dieses Versuchsdesign und Datenverteilung zulässigen statistischen Test zur Prüfung der H_0 (grüne Felder).

Quelle: Bortz & Weber (2005).

Im Vergleich dazu stellte sich der Entscheidungsbaum für $n > 2$ Stichproben analog dar (siehe Abb. 7): Nach der inhaltlichen Entscheidung über die Unabhängigkeit der einzelnen Stichproben untereinander schloss sich der Kolmogorov-Smirnow-Test zur Untersuchung der Datenverteilung (erstes rotes Feld auf Abb. 7) an. Abhängige Stichproben, welche sich nicht normalverteilten, konnten mittels „Friedman-Rangvarianzanalyse“ (grünes Feld rechts in Abb. 7) auf Signifikanz geprüft werden. Das normalverteilte Pendant, die „Varianzanalyse für abhängige Stichproben“, splittete sich in eine „einfache abhängige Varianzanalyse“ (nur Messwiederholung) und eine „zweifache abhängige VA“ (siehe grüne Felder rechts in Abb. 7) mit zusätzlichem unabhängigem Faktor auf.

Unabhängige, nicht normalverteilte Stichproben ließen sich mittels „Kruskal-Wallis-Test“ ebenso prüfen wie normalverteilte, aber inhomogene Daten (grüne Felder links auf Abb. 7). Widerlegte der „Levene-Test“ auf Homogenität der Varianzen hingegen die Annahme der Inhomogenität, so kam eine der „VA für unabhängige Stichproben“ zum Einsatz: Eine unabhängige Variable bedingte eine „einfaktorielle unabhängige VA“, obgleich bei zwei oder mehr unabhängigen Variablen ohne Kontrollvariable eine „mehrfaktorielle unabhängige VA“ angedacht war. Sollten bei Letzterer zusätzliche Kontrollvariablen berücksichtigt werden, so erfolgte eine „Kovarianzanalyse“ (siehe grüne Felder links auf Abb. 7). Bei der „einfaktoriellen unabhängigen VA“ konnten zur *post-hoc* Hypothesen-Prüfung „LSD-Test“, „Bonferroni-Prüfung“ und „Signifikanz-Test nach Sidak“ herangezogen werden.

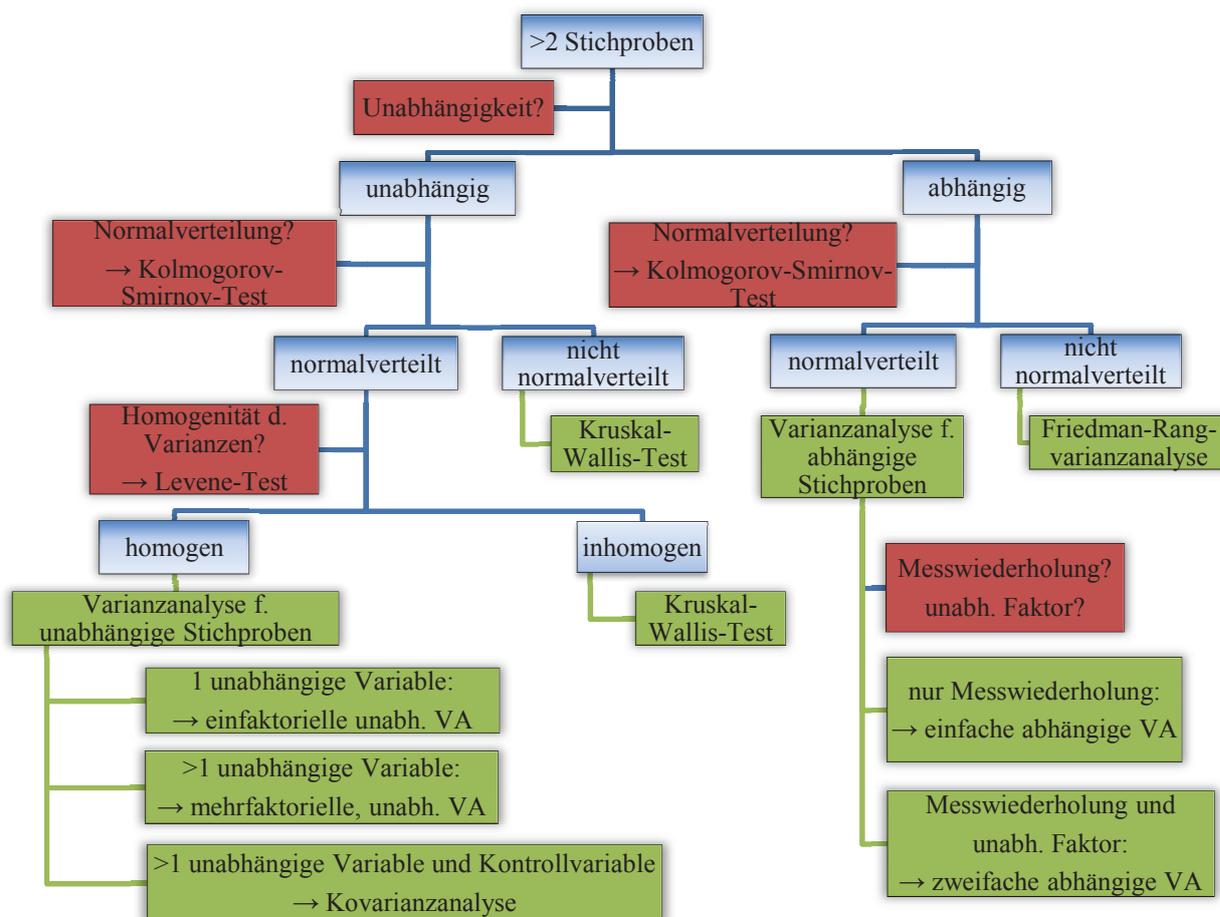


Abb. 7: Entscheidungsbaum Hypothesen-Prüfung für >2 Stichproben

Zum Ziel der Erfassung des geeigneten Hypothesen-Tests (grüne Felder) mussten die in rot gefärbten Eigenschaften der Stichproben ermittelt werden. Anhand deren Ergebnisse (blaue Felder) konnte abschließend besagter Test zur Prüfung der H_0 (Nullhypothese) ausgewählt werden (Bortz & Weber, 2005).

2.4. Kultivierung von humanen dermalen Fibroblasten

Alle Inkubationsschritte, sofern nicht anders beschrieben, erfolgten im Brutschrank, um eine konstante Temperatur ($T=37^\circ\text{C}$), Luftfeuchtigkeit ($H=95\%$) und Kohlendioxid-Partialdruck ($p\text{CO}_2=5\%$) zu garantieren. Zum Zwecke der Kultivierung mussten humane Fibroblasten in 75cm^2 -Zellkulturflaschen mit folgendem Kulturmedium zu inkubieren:

Kulturmedium
RPMI 1640 Medium; 2,1mM <i>L-Glutamine</i> ; 2,0g/L

NaHCO ₃
15% FBS
250 IU Penicillin / 250 µg Streptomycin
50 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) <i>Buffer Solution</i>
5 mM <i>Sodium Pyruvate Solution</i>
1% <i>non-essential amino acids</i> (NEAA)

Tabelle 3: **Bestandteile des Kulturmediums**

Auf der Basis von „RPMI 1640 Medium“ wurden „FBS“, Penicillin/Streptomycin, *HEPES Buffer Solution*, *Sodium Pyruvate* und NEAA hinzugegeben.

Zur Induktion der osteogenen Transdifferenzierung wurden einerseits ein Dexamethason-enthaltendes Medium (Dexamethason-Medium nach Junker et al. 2009; Sommar et al. 2009) und andererseits ein Calcitriol-inkludierendes Medium (Calcitriol-Medium nach Zhou et al. 2006; Hee & Nicoll 2011) verwendet:

Dexamethason-Medium	Calcitriol-Medium
DMEM (<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>); mit 4,5g/L Glucose, mit <i>L-Glutamine & Sodium Pyruvate</i> ; mit 3,7g/L NaHCO ₃ ; <i>sterile filtered</i>	DMEM; mit 4,5g/L Glucose, ohne <i>L-Glutamine & Sodium Pyruvate</i> ; mit 3,7g/L NaHCO ₃ ; <i>sterile filtered</i>
10% FBS	10% FBS
250 IU Penicillin / 250µg Streptomycin	250 IU Penicillin / 250µg Streptomycin
100nM Dexamethason	10nM 1α,25-Dihydroxycholecalciferol
50µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	50µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat
10mM β-Glycerophosphat	10mM β-Glycerophosphat

Tabelle 4: **Bestandteile von Dexamethason- und Calcitriol-Medium**

Beide Medien differieren nur in einem Zusatz: Im Dexamethason-Medium (nach Junker et al. 2009; Sommar et al. 2009) wurde zusätzlich 100 nM Dexamethason zugesetzt, während im Calcitriol-Medium nach Zhou et al. 2006 und Hee & Nicoll 2011 10 nM Calcitriol verwendet wurde.

Sowohl die Bestandteile als auch die gebrauchsfertigen Medien blieben mehrere Wochen bei 4 °C im Kühlschrank haltbar und steril verschlossen. Vor Gebrauch erwärmte ein Wasserbad die Medien bzw. deren Bestandteile auf 37 °C. Dies gilt ebenfalls für alle anderen applizierten Zusätze. Medienwechsel erfolgten in Abhängigkeit vom zu applizierenden Volumen im Abstand von drei bis vier Tagen (siehe Tabelle 2).

2.4.1. Passagierung

Unter sterilen Bedingungen vollzog sich die Passagierung, also das Ablösen der Zellen aus einer Kulturflasche bei circa 75-80% Konfluenz und erneutes Ausbringen mit einer Zelldichte von etwa 25%, wie folgt:

Nach Absaugen des Kulturmediums und Spülen mit 5ml „Dulbecco`s PBS“ (*phosphate buffered saline*) lösten sich die Fibroblasten binnen 5-7 min Inkubation bei 37°C mit Trypsin/EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) *Solution* vom Flaschenboden ab. Diese Reaktion mit 5-7ml Kulturmedium (Verhältnis Trypsin/EDTA versus Kulturmedium = 1:1) inhibierend, ließ sich die Suspension mittels 10ml-Pipette absaugen, in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen überführen und anschließend bei 1100 U/min zentrifugieren. Da der Überstand anschließend abzusaugen war, konnte das Pellet in 5ml Kulturmedium mit einer 5ml-Pipette resuspendiert werden. Einen reibungslosen Ablauf gewährleistet, wurden während der Zentrifugation in neue 75cm²-Zellkulturflaschen 17ml, in 6-Wells 3ml oder 1ml in 12-Wells Kulturmedium vorgelegt.

Um nun das für eine bestimmte Zellzahl nötige Volumen berechnen zu können, musste die Konzentration der Fibroblasten in der Suspension mit Hilfe des Neubauer-Verfahrens (Lindl & Bauer (2000); siehe auch Abschnitt 2.6.1) bestimmt werden. Die benötigte Zellzahl wurde mittels Versuchsanordnung festgelegt oder betrug in Kulturflaschen 3,6x10⁵ Zellen (entspricht einer Konfluenz von 25% der Oberfläche). Nach Invertieren konnte das entsprechende Volumen

entnommen, in die Kulturgefäße oder Platten pipettiert und diese anschließend in den Brutschrank transportieren werden.

2.4.2. Cryokonservierung und Auftauen

Die Cryokonservierung vollzog sich unter Nutzung eines anzusetzenden „Cryo-Mediums“, bestehend aus 90% FBS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) in partieller Analogie zur oben beschriebenen Passagierung:

Während bei dieser jedoch die Resuspendierung in Kulturmedium erfolgte, wurde nun 1ml Cryo-Medium pro Pellet (Zellzahl 1×10^6) verwendet. Diese Zellsuspension musste sofort in ein Cryo-Röhrchen überführt werden, damit eine schnelle Lagerung im -80°C -Gefrierschrank gewährleistet werden konnte. Die so konservierten Zellen erlangten auch Monate später ihre Viabilität durch kontrolliertes Auftauen der Suspension wieder.

Hierzu waren 10ml erwärmtes Kulturmedium in einem 15ml-„Falcon“ nötig, um dann 1000 μl davon in das Cryo-Röhrchen zu pipettieren. Die entstandene Flüssigkeit ließ sich nun in das „Falcon“ überführen und bei 1100 U/min für 5min zentrifugieren. Nachdem das vom Überstand befreite Pellet in 5ml Kulturmedium resuspendiert und komplett in die mit 13ml Kulturmedium vorbereitete 75cm²-Kulturflasche gefüllt worden war, inkubierten die Zellen bei 37°C und 5% pCO₂ im Brutschrank.

2.5. Isolierung dermalen Fibroblasten

Zur Isolierung humaner, dermalen Fibroblasten wurden männlichen Spendern circa 5 cm² große Hautareale im Rahmen anderweitiger Operationen exzidiert und direkt in 0,9%-NaCl-Lösung getränkte, sterile Kompressen eingeschlagen. Die Operationen hatte Herr Dr. Meier, tätig am Fachärzteezentrum am Kreiskrankenhaus St. Elisabeth, von-Werth-Straße 5, 41515 Grevenbroich, im Jahr 2012 nach vorheriger Einverständniserklärung der Patienten, bzw. bei Minderjährigen deren Erziehungsberechtigten, im Rahmen des vorliegenden Ethikvotums (Studiennummer 3634; genehmigt am 08.07.2011) sachgemäß durchgeführt sowie Spenderalter, -geschlecht und -nummer notiert und anonymisiert. Nach Beendigung der OP konnte das verpackte Material in mit sterilem MEM/F-12-Medium gefüllten Behältern gekühlt zur Präparation übergeben werden. Die Analyse der mehrgipfelter Verteilung der Spenderalter erfolgte anhand der Einteilung in juvenil (bis 15 Jahre) und adult (ab 16 Jahre). dadurch lag das mittlere Alter juveniler Donoren bei 4,52 Jahren (Median 4 Jahre) und jenes für adulte Spender bei 54,45 Jahren (Median 58 Jahre).

Die im Folgenden beschriebene Methode basierte auf Erkenntnissen von Toma et al. (2001) bzw. Toma et al. (2005):

Zuvor ließen sich vorbereitend die zur Isolierung nötigen Enzym-Lösungen herstellen und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahren:

Zur enzymatischen Trennung der Vollhautpräparate in Dermis (mit Subkutis) und Epidermis wurde folgende Dispase-II-Lösung steril angesetzt, der pH Wert auf 7,4 titriert und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt:

Dispase-II-Lösung
50mM HEPES <i>Buffer Solution</i>
2,4 IU/ml Dispase II (neutral protease grade II); Bacillus polymyxa; 1,4 IU/mg
in „Dulbecco`s PBS“ (1x; w/o Ca ²⁺ & Mg ²⁺)

Tabelle 5: **Dispase-II-Lösung**
Zur enzymatischen Trennung der Vollhaut wurden „HEPES *Buffer Solution*“ und Dispase II in Dulbecco`s PBS gelöst.

Für die Collagenase-I-Lösung wurde folgender Puffer hergestellt, pH=7,4 adjustiert und autoklaviert:

Collagenase-I-Lösung

150mM HEPES <i>Buffer Solution</i>
120mM NaCl
50mM KCl (Kaliumchlorid)
1mM CaCl ₂
5mM D-Glucose
in A. dest

Tabelle 6: **Collagenase-I-Lösung**

„HEPES *Buffer Solution*“, verschiedene Elektrolyte und Glucose werden in A. dest gelöst.

Erst unmittelbar vor Gebrauch wurde dem oben genannten Puffer 0,2% v/w Collagenase Type: CLS; 260 IU/mg und 1,5% v/w BSA zugesetzt und steril filtriert. Alle darauffolgenden Schritte wurden unter strenger Beachtung der Sterilität des Arbeitsplatzes unter der Werkbank durchgeführt:

Nach 24 Stunden Inkubation mit Dispase die Gewebestreifen samt Dispase-II-Lösung in eine sterile Petri-Schale überführend, konnten Epidermis und Dermis durch sanftes Schaben mit einem sterilen Skalpell separiert und Dermis samt Subkutis in 50ml-Zentrifugenröhrchen isoliert werden. In jene Röhrchen ließen sich nun jeweils 10ml Collagenase-I-Lösung pipettieren, wodurch ein Herauslösen der Zellen nach einer Inkubation für 45-60 min bei 37°C im Wasserbad erleichtert wurde.

Trotzdem blieb, nach Überführen in sterile Petri-Schale, eine mechanische Abscherung der Zellen aus der extrazellulären Matrix mittels Kompression des Streifens zwischen Kulturgefäß und Kolben einer 50ml-Spritze notwendig. Diese Suspension musste, unter Zuhilfenahme eines autoklavierten Glasrichters, anschließend durch ein autoklaviertes Sieb gepresst und in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden. Nach Spülen des Siebes mit „Dulbecco`s PBS“ sowie Zentrifugieren des Röhrchens für 10 min bei 300xg, gelang eine Resuspension des Pellets in Fibroblasten-Kulturmedium.

Um einerseits die Suspension aufzureinigen und andererseits spezifisch Fibroblasten anzuzüchten, wurden die humanen Zellen entweder in Petri-Schalen oder 75cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank für 24h inkubiert. Anschließend erfolgte ein Medienwechsel.

2.6. Nachweisverfahren

In diesem Abschnitt werden zuerst die Verfahren zur Quantifizierung der Proliferation vorgestellt und anschließend jene der osteogene Transdifferenzierung.

2.6.1. Neubauer-Verfahren nach Lindl & Bauer (2000)

Wie im Abschnitt 2.4 (Kultivierung von humanen dermalen Fibroblasten) erwähnt, konnte die Konzentration vitaler Zellen in einem Medium mit Hilfe des Hämocytometers bestimmt werden. Die Schritte bis zur Resuspendierung der *Pellets* sollten zwingend steril durchgeführt werden, während die eigentliche Zählung nicht steril durchgeführt werden musste. Hierzu wurden die Zellen analog zum beschriebenen Passagievorgang (siehe 2.4.1), vom Kulturboden abgelöst.

Nachdem ein entsprechendes Pellet durch Zentrifugieren geschaffen worden ist, sollte die Zugabe von 1ml Kulturmedium je *microtube* oder 5ml je Zentrifugenröhrchen, Pipettieren und Invertieren ein Suspendieren bewirken. Nach Entnahme von 50µl und Zugabe von 50µl Trypanblau in ein *Well* einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte konnte ein Tropfen gefärbter Suspension auf das mit einem alkoholisch gereinigten Deckplättchen versehene Hämocytometer gegeben werden.



Durch Summieren der vitalen (hellen) Zellen innerhalb von vier der in Abb. 8 dargestellten 4x4-Gruppenquadrate (laut Hersteller 0,0025mm² Fläche pro Quadrat; hier rot umrandet) konnte unter Zuhilfenahme folgender Gleichung die Konzentration in der Suspension errechnet werden:

Abb. 8: **Foto eines Zählbereiches**

Der rot umrandete Bereich begrenzt ein 4x4-Gruppenquadrat.

Auflösung: 400-fache Vergrößerung

Formel 1: $c = \frac{x}{4} * i * k$

- mit c = Konzentration (Zellen/ml)
- x = Summe 4 Gruppenquadrate
- i = Verdünnungsfaktor = 2 (Suspension : Trypanblau = 1:1)
- k = Neubauer-Faktor (1x10⁴ Zellen/ml)

Durch Einsetzen von Formel 2 in Formel 1 ließen sich entweder die Gesamtzellzahl in einem bekannten Volumen (Formel 3) oder das für eine definierte Zellzahl benötigte Suspensionsvolumen (Formel 4) berechnen:

Formel 2: $c=Y/V$
 mit Y = Zellzahl in Suspension
 V = Suspensionsvolumen (in ml)

Formel 3: $Y=X/4*2*1x10^4 \text{ Zellen/ml}*V$

Formel 4: $V=Y*4/(X*2*1x10^4 \text{ Zellen/ml})$

2.6.2. Cell Viability Assay

Diese Methode weißt indirekt die Zellzahl über den Resazurin-Umsatz nach, wobei Sterilbedingungen bis zur Inkubation einzuhalten sind. Denn vitale Zellen reduzieren das gering fluoreszierende Resazurin in stark fluoreszierendes Resorufin (579_{Ex}/584_{Em}). Das Resazurin wurde als „CellTiter-blue“-Kulturmedium-Gemisch nach Angaben des Herstellers (Promega Corp. 2011) im Verhältnis 1:4 dargeboten, nachdem zuvor das Kulturmedium abgesaugt wurde. Nach der Inkubation im Brutschrank für je nach Versuch 1-3 Stunden emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 590nm mittels „Victor³“ gemessen.

Das PC-Steuerungsprogramm wurde gestartet nachdem zuvor eine Platte ohne Deckel in den „Victor³“ eingelegt worden war. Die Prozedur *CytoTox-One*, Teil des Steuerungsprogramms *Wallac 1420 Workstation*, führte die einmalige Messung (8mm vom Plattenboden entfernt) nach folgender Prozedur aus:

Shake	
Duration	10,0s
Speed	normal
Diameter	0,1mm
Type	linear
Repeated Operation	yes
Fluorometry	
cw-Lamp energy	13417
Filter	P540-SlotA7
Emission Filter	P540-SlotA4
Emission Aperture	normal
Counterposition	top
Counter time	1

Tabelle 7: **Prozedur zur Auswertung des Cell Viability Assays**
 Im Rahmen von Mischung („Shake“) und Messung („Fluorometry“) war die korrekte Einstellung der aufgeführten Parameter von großer Bedeutung.

Zur Sicherung der Rohdaten wurde „Microsoft Excel 2007[®]“ verwendet.

Von den so gewonnenen Messwerten musste zwingend die Eigenfluoreszenz des Resazurins (*blank* genannt) abgezogen werden. Dazu wurden 500µl je Well eines „CellTiter-blue[®]“-Kulturmedium-Gemisches (1:4) in sechs Wells einer 12-Well-Platte ohne Fibroblasten pipettiert.

Ein analoges Prozedere ergibt sich bei Verwendung eines DMEM-basierten Mediums (bspw. Dexamethason-Medium); hier ist *CellTiter-blue[®]* mit entsprechendem Medium zu kombinieren.

2.6.3. Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration war einerseits für eine gleichmäßige Applikation einer bestimmten Proteinmenge im Rahmen des *Western Blottings* unabdingbar. Andererseits diente dieses Verfahren dem erklärten Ziel erstmalig sowohl die quantitativen Messwerte des Alkalische Phosphatase *Assay* als auch der Alizarin Rot-Färbung sowohl absolut als auch relativ zur Proteinkonzentration zu bestimmen und zu vergleichen. Die an dieser Stelle beschriebene Nachweismethode basiert auf einer Arbeit von Smith et al. (1985) zum „*BCA Protein Assay*“ (Bicinchonin-Säure Protein-Test).

RIPA-Puffer
50mM Tris pH=8
150mM NaCl
1% NP40
0,5% Na-deoxycholat
0,1% SDS (Sodium dodecylsulfate)
in A. dest

Tabelle 8: RIPA-Puffer

Der vorbereitend erzeugte „RIPA-Puffer“ (*RadioImmunoPrecipitation Assay*, Tabelle 8) nach Rezeptur der Firma abcam®, Cambridge, USA (abcam 1998) diente der Inhibition von Kinase-Aktivität und Protein-Protein-Interaktionen im Allgemeinen (Zusammensetzung siehe Tabelle 8). Durch Zugabe einer Tablette „*Complete*“ (Protease- und Phosphatase-Inhibitor) in 10ml RIPA-Puffer entstand die fertige RIPA+*Complete*-Lösung, welche für 12 Wochen bei -20°C aufbewahrt werden konnte.

Zur Isolierung der Proteine aus den Zellkulturplatten waren *Zell-Pellets*, deren Erzeugung im Abschnitt „*Passagierung*“ (2.4.1) bereits beschrieben ist, erforderlich. Dieses Pellet in 50µl RIPA+*Complete*-Lösung resuspendierend, bedurften die Proben einer anschließenden Sonifizierung (2x30s; Cycle 0,5; Amplitude 80) und Lagerung bei -80°C im Gefrierschrank um die Zellyse zu gewährleisten.

Zur Produktion eines BSA-Standards nach Anleitung des „*Pierce BCA Protein Assay Kit*®“ wurden 1ml-Ampullen BSA (2mg/ml) und folgende Konzentrationen BSA in „*Dulbecco`s PBS*“ verwendet: 0µg/µl; 0,025µg/µl; 0,125µg/µl; 0,25µg/µl; 0,5µg/µl; 0,75µg/µl; 1,0µg/µl; 1,5µg/µl; 2µg/µl. Die Sensitivität betrug nach Herstellerangaben 0,125-2µg/µl.

Ebenfalls nach Vorschlag dieses Kits schloss sich die Fertigung des „*BCA Working Reagent*“ an, indem Reagent A und Reagent B im Verhältnis 50:1 in „*50ml-cellstar tubes*“ pipettiert und gemischt wurden.

Um die Proteinkonzentration in 50µl RIPA+*Complete*-Lösung zu bestimmen, war zunächst ein langsames Auftauen der Suspension auf Eis nötig. Nach Vorlage von 20µl „*Dulbecco`s PBS*“ in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden 4µl Suspension nach vorherigem Mischen beigefügt um mittels 1:6-Verdünnung im optimalen Sensitivitätsbereich (s. o.) detektiert werden zu können. Die im Gefäß verbliebene Suspension konnte wieder tiefgefroren werden.

Nun konnten je 10µl Standard oder verdünnte Probe im Duplikat in eine Mikrotiter-Platte vorgelegt und anschließend mit 200µl *BCA Working Reagent* überschichtet werden. Des Weiteren zielten das Abdecken der Platte mit einer Folie und das Bewegen für 30s bei 75 U/min auf Schmutzabweisung, Verteilung und optimale Inkubation für 30min bei 37°C im Brutschrank ab. Abschließend konnte die Absorption bei 540nm mit Hilfe des „*Victor3*®“ und des Programms „*WorkOut 2.0*®“ mit nachfolgender Prozedur bestimmt werden:

<i>Raw</i>	
<i>Endpoint</i>	<i>Absorbance at 540nm</i>

<i>Reading Time</i>	0,1s
<i>Plate</i>	[12x8]
<i>Calculated</i>	
<i>corrected</i>	(Result of Blank Correction)
<i>Concs.</i>	(Result of Standard Curve Fit)
<i>% CV</i>	(Result of % CV)

Tabelle 9: **Prozedur zur Messung der Proteinkonzentration**

Mit Hilfe des Absorptionsvorganges („raw“) konnte die Absorption bei 540nm gemessen werden. Die anschließende Normierung anhand des BSA-Standards („Calculated“) erfolgte mittels „Microsoft Excel 2007“.

Zur Berechnung der tatsächlichen Konzentration in 50µl RIPA+Complete-Lösung wurden Rohwerte unter *Concs.* mit dem Verdünnungsfaktor (f=6) multipliziert:

Formel 5: **c := Concs.*f**
 mit c = Konzentration in RIPA-Suspension
 f = Verdünnungsfaktor (hier = 6)

Die Berechnung der Gesamtproteinkonzentration als Quotient aus Gesamtproteinmenge und Flächeninhalt eines Wells ließ sich wie folgt darstellen:

Formel 6 **C_{Protein} = (c*50µl)/A**
 mit C_{Protein} = Gesamtproteinkonzentration (in µg/cm²)
 A = Flächeninhalt 6-Well (hier 9,6cm²)

2.6.4. Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP-Assay)

Zu Beginn dieser, unter unsterilen Gegebenheiten durchgeführten Methode nach Magnusson & Farley (2002) und Magnusson et al. (2002) zur photometrischen Quantifizierung der AP-Aktivität wurde ein Glycin-Puffer nach Anleitung von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co. 1993; Sigma-Aldrich Co. 2011) bzw. Bartsch Jr et al. (2005) angesetzt:

Glycin-Puffer	
100mM Glycin	
1mM MgCl ₂	
1mM ZnCl ₂	
A. dest	

Tabelle 10: **Zusammensetzung Glycin-Puffer**

Die Zusammensetzung des Puffers orientierte sich an Bartsch Jr et al. (2005) und den Hersteller-Angaben (Sigma-Aldrich Co.1993; Sigma-Aldrich Co. 2011).

Der auf pH=10,4 adjustierte Puffer wurde nun mit 10mM p-Nitrophenylphosphat versetzt und 800µl davon auf ein zuvor mit 2ml „Dulbecco`s PBS“ gespülte Zellen pipettiert. Ohne die enzymatische Hydrolyse von farblosem Nitrophenylphosphat zu gelblichem p-Nitrophenol und anorganischem Phosphat mit Natriumhydroxid abzustoppen, schloss sich eine photometrische Absorptionsmessung (λ = 405nm) nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mittels „Victor³“ an. Eine Verdünnung, wie vom Hersteller empfohlen, wurde nicht durchgeführt: Die zu erwartende Enzymmenge war unbekannt und damit der Gesamtsubstratumsatz pro *Well* nicht *a priori* kalkulierbar.

Die Platten einlegend, ließ sich die zugehörige Prozedur „AP-Assay“ im Steuerungsprogramm „Wallac 1420 Workstation“ am PC starten:

Shake	
<i>Duration</i>	1,0s
<i>Speed</i>	fast
<i>Diameter</i>	0,1mm
<i>Type</i>	linear
<i>Repeated Operation</i>	yes
Photometry	
<i>Absorbance mode</i>	visible
<i>cw-Lamp Filter</i>	P405-Slot A1
<i>Excitation Aperture</i>	normal

Tabelle 11: **Prozedur zur Messung der Absorption von p-Nitrophenol**

Auf die Mischung der Lösung („shake“) folgte die photometrische Bestimmung der Absorption des gebildeten p-Nitrophenols („Photometry“).

Reading time	0,1s
Second measurement	

Die Daten der einmaligen Messung (Entfernung vom Boden der Platte: 8mm) wurden gespeichert und die Menge an p-Nitrophenol mittels Lambert-Beer'schem Gesetz (Beer (1852); Formel 7) bestimmt:

Formel 7: $E_{\lambda} := \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$

mit $\lambda =$ Wellenlänge 405nm

$E_{\lambda} =$ Extinktion bei Wellenlänge λ

$\epsilon_{\lambda} =$ Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ und Raumtemperatur (hier $1,83 \times 10^4$ L/(mol*cm)

$c =$ Konzentration des umgesetzten Substrates (mol/l)

$d =$ Schichtdicke des Strahlengangs (hier 0,8cm)

Die Verwendung der Produktinformation und des Protokolls von Sigma (Sigma-Aldrich Co. 2011; Sigma-Aldrich Co. 1993) sollte gewährleisten, dass $\epsilon_{405nm} = 1,83 \times 10^4$ L/(mol*cm) gilt und somit im folgenden die Enzymaktivität abgeleitet werden konnte:

Formel 8: $c := n/V$

mit $n =$ umgesetzte Substratmenge (mol)

$V =$ Volumen (hier $800 \mu\text{l} = 0,0008\text{L}$)

Durch Einsetzen von Formel 7 in Formel 8 und Umstellen nach n ergab sich:

Formel 9: $n = (V \cdot E_{\lambda}) / (\epsilon_{\lambda} \cdot d)$

Des Weiteren ließ sich die Enzymaktivität mit Hilfe von Formel 9 errechnen:

Formel 10: **Enzymaktivität := n/t**

mit Enzymaktivität = Substratumsatz pro Zeit ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$)

$t =$ Inkubationsdauer (hier 20min)

Formel 11: **Enzymaktivität = $(V \cdot E_{\lambda}) / (\epsilon_{\lambda} \cdot d \cdot t)$**

Die mittels Formel 11 errechnete absolute Enzymaktivität soll in dieser Arbeit gegen die Gesamtproteinkonzentration (aus Formel 6) normiert werden:

Formel 12: **rel. Enzymaktivität = Enzymaktivität / C_{Protein}**
 $= (V \cdot E_{\lambda}) / (\epsilon_{\lambda} \cdot d \cdot t) / (c \cdot 50 \mu\text{l}) / A$
 $= (V \cdot E_{\lambda} \cdot A) / (\epsilon_{\lambda} \cdot d \cdot t \cdot c \cdot 50 \mu\text{l})$

2.6.5. Alizarin Rot-Färbung, -Rücklösung und -Quantifizierung

Dieses Testverfahren besteht aus drei Abschnitten: Die Alizarin Rot-Färbung zum qualitativen, mikroskopischen Nachweis von Hydroxylapatit als Hauptbestandteil einer calcifizierten extrazellulären Matrix, der Rücklösung des Farbstoffs mittels CPC (Cetylpyridiniumchlorid *monohydrate*) und dessen anschließende Absorptionsmessung. Die Methode basiert chemisch auf dem Chelator Alizarin Rot, welcher Calciumphosphat-Salze, von Osteoblasten gebildet, bindet und hierdurch im Zuge einer Konformationsänderung sein Absorptionsspektrum verändert (Gothard 2009). Die folgenden Schritte orientieren sich an gängigen Methoden der Alizarin Rot-Färbung (Williams 1946; Pittenger et al. 1999; Gregory et al. 2004; Gregory & Prockop 2007; Jähn et al. 2010) um eine Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen zu ermöglichen:

Vor der Färbung mit Alizarin Rot musste der Zellkultur zur Fixierung das Medium entzogen, die Zellen mit 2ml „Dulbecco's PBS“ gespült und anschließend mittels 2ml 4% (v/v; volume per volume) PFA (Paraformaldehyd) in „Dulbecco's PBS“ binnen 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert werden. (4% (v/v) PFA in „Dulbecco's PBS“ ist bei -20°C für mehrere Wochen haltbar.) Anschließend wurde

die Fixierlösung abgesaugt und das Präparat zweimal mit je 2ml A. dest gewaschen. Die Farblösung, mit pH-Wert = 4,1-4,3, bestand aus 20mM *Alizarin Red S mono sodiumsalt* in A. dest. Unter ständigem Rotieren und Abdunkeln entstand eine gelbliche Lösung, von welcher nun auf die fixierten Fibroblasten / Osteoblasten 2ml je 6-Well pipettiert wurden. Nach 20min Inkubation bei 37°C im Brutschrank war bei qualitativ positivem Hydroxylapatit-Nachweis eine rötliche Färbung makroskopisch zu erkennen. Dazu die Kulturen aus dem Brutschrank entnehmend, musste der Überstand abgesaugt und die 9,6cm² umfassenden Präparate mehrmals mit A. dest gewaschen werden, bis sich der Überstand klärte. Mit der obligatorischen mikroskopischen Begutachtung und fotografischen Dokumentation des Ergebnisses endete der erste Abschnitt.

Die Rücklösung und Quantifizierung des ARS mittels CPC bezieht sich auf eine von Jähn et al. (2010) vorgestellte Methode, welche, im Gegensatz zu der unüblichen, aber vermeintlich sensitiveren Methode nach Gregory et al. (2004), reproduzierbare Ergebnisse erzielen soll.

Hierzu ließ sich unter einem Abzug eine auf A. dest basierende 10 prozentige (w/v; weight per volume) CPC-Lösung ansetzen. Die trübe Lösung mittels Rühr-/Heizblock erwärmend, entstand eine klare Flüssigkeit, deren pH-Wert auf 7,0 zu äquilibrieren ist. Daraufhin wurden 1000µl dieser Rücklösung pro 9,6cm² für 60min bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand anschließend in Photometer-Küvetten pipettiert. Sodann konnte die finale Messung mittels „BioPhotometer“ (8,5mm Lichtstrahlhöhe; 600nm Wellenlänge) durchgeführt werden, wobei die Kontrollgruppe als Kalibrierung (*blank*) diente.

Ermittelt wurde die absolute Menge der Alizarin Rot-Hydroxylapatit-Komplexe (im Vergleich zur Kontrolle) unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Beer 1852; Formel 7) und dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_\lambda = 165 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ (aus Gregory et al. (2004)):

Formel 7: $E_\lambda := \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$
mit $\lambda = 600\text{nm}$

Die Konzentration als Verhältnis von Stoffmenge zu Volumen (Formel 13) wurde hier erstmalig zum Vergleich der Effektivität verschiedener Differenzierungsmethoden in Bezug zur Proteinkonzentration gesetzt (Formel 15):

Formel 13: $c := n/V$
mit $n =$ absolute Farbstoffmenge (mol)
 $V =$ Volumen (hier 1000µl=0,001L)

Formel 14: $n = E_\lambda \cdot V / (\epsilon_\lambda \cdot d)$
 $= E_\lambda \cdot 7,576 \mu\text{mol}$

Formel 15: **rel. ARS-Menge := n/C_{Protein}**
mit $C_{\text{Protein}} =$ Proteinkonzentration (siehe Formel 6 $C_{\text{Protein}} = (c \cdot 50\mu\text{l})/A$)

2.6.6. *Western Blots* von RunX 2 und GAPDH

Die Bestimmung der Proteinexpression des Osteoblasten-spezifischen Proteins RunX 2 (Karsenty 1999) erfolgte mittels *Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophoresis* und *semi-dry Western Blot* (Laemmli 1970; Towbin et al. 1979). Um eine gleichmäßige Proteinbeladung des *Western Blots* zu illustrieren und die RunX 2-Expression im Vergleich zu einem *housekeeping*-Protein zu normieren, wurde das GAPDH-Antigen (Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) nachgewiesen.

Manche Puffer und Lösungen konnten wie folgt vorbereitet werden:

Elektrophorese-Puffer	25x Tris-Glycin-Transferpuffer	Blotting-Puffer	4x Trenngel-Puffer	4x Sammelgel-Puffer	TBS-Puffer
-----------------------	--------------------------------	-----------------	--------------------	---------------------	------------

25mM Tris (pH=8,3-8,8)	300mM Tris-Base	20ml 25x Tris-Glycin-Transferpuffer	1,5M Tris (pH=8,8)	0,5M Tris (pH=6,8)	7,7mM Tris (pH=7,5)
192mM Glycin	2,4M Glycin	25ml Methanol	0,4% (w/v) SDS	0,4% (w/v) SDS	150mM NaCl
0,1% (w/v) SDS in A. dest	in A. dest	ad 250ml A. dest	in A. dest	in A. dest	in A. dest

Tabelle 12: **Western Blot Puffer**

Die oben aufgeführten Puffer dienten als Basis für das *Immunoblotting*, waren zuweilen bei Raumtemperatur haltbar oder mussten eventuell weiter verdünnt werden.

Vor dem Gießen des Minigels sollten die Proteinlysate von -80°C auf 0°C erwärmt werden, da dieser Vorgang ca. 30-40 min dauerte. Mit dem Reinigen der Glasplatten (Tiefe der Gelplatte 0,75mm) mit 70% Ethanol und Zusammensetzen der Apparatur (bestehend aus Platten, *Casting Frames*, *Casting Stands*, siehe Anhang 3) begann der Gießprozess, welcher mit dem Ansetzen des *10%-Acrylamid-Trenngels*, für Proteingrößen von 40 bis 120 kDa (kilo Dalton), fortgesetzt wurde:

4x Tris-Glycine SDS Sample Buffer	10%-Acrylamid-Trenngel	10%-Acrylamid-Sammelgel
252mM Tris-HCl	2,5ml 30% Acrylamid	650 μl 30% Acrylamid
40% Glycerol	3,125ml A. dest	3ml A. dest
8% (w/v) SDS	1,875ml 4x Trenngel-Puffer	1,25ml 4x Sammelgel-Puffer
0,01% Bromphenolblau in A. dest	10 μl TEMED	10 μl TEMED
	25 μl 10% APS (Ammoniumpersulfat)	25 μl 10% APS

Tabelle 13: **4x Tris-Glycine SDS Sample Buffer, 10%-Acrylamid-Trenn- und Sammelgel**

Der SDS *Sample Buffer* war bei -4°C für sechs Monate haltbar, musste aber vor Gebrauch erwärmt worden sein um das SDS aufzulösen. Unter dem Abzug wurden 4 Teile Puffer mit einem Teil 2-Mercaptoethanol gemischt.

Das Gemisch musste nun unverzüglich mittels 5ml-Pipette zwischen die Glasplatten gegossen und anschließend mit 99% Ethanol überschichtet werden. Während des 20 minütigen Polymerisationsprozesses konnte das Sammelgel (siehe Tabelle 13) vorbereitet werden. Das Sammelgel wurde nach dem Abgießen der Ethanol-Schicht über dem Trenngel gleichmäßig verteilt und ein 0,75mm-*Slot*-Kamm eingesetzt. Während des erneuten obligatorischen 20-minütigen Polymerisationsprozesses konnten die zuvor aufgetauten Proteinlysate aufbereitet werden:

Hierzu wurde die tatsächliche Proteinkonzentration (Gesamtprotein pro RIPA+*Complete*-Lösung) aus dem Abschnitt Bestimmung der Protein-Konzentration (2.6.3) benötigt, damit pro Probentasche die Beladungen sowohl in Bezug auf die Proteinmasse (40 μg /Tasche) als auch auf das Volumen (24 μl /Tasche) identisch blieben. Hierzu erfolgte die Berechnung des zu entnehmende Volumen der Proteinlysate-RIPA+*Complete*-Suspension mittels Formel 16 und des in ein neues 1,5ml-*microtube* vorzulegende A. dest-Volumen ($V_{\text{A. dest}}$) aus Formel 17:

Formel 16: $V_{\text{Suspension}} = m/c$
mit $V_{\text{Suspension}}$ = Suspensionsvolumen für 40 μg Protein
 m = Proteinmasse (hier 40 μg)
 c = Proteinkonzentration in Suspension aus Formel 5: $c := \text{Concs.} \cdot f$

Formel 17: $V_{\text{A. dest}} = 18\mu\text{l} - V_{\text{Suspension}}$
mit $V_{\text{A. dest}}$ = Volumen vorzulegendes A. dest

Im Anschluss an das Vorlegen des A. dest und Mischen der Suspension wurde das benötigte $V_{\text{Suspension}}$ dazugegeben und unter dem Abzug 6 μl /Reaktionsgefäß verdünnte 4x Tris-Glycine SDS *Sample Buffer*

(Tabelle 13) appliziert. Nun wurde das heterogene Gemisch für 1min bei 13000 U/min zentrifugiert, 5min bei 95°C erhitzt und anschließend sofort gekühlt, um ein spontanes Renaturieren der durch Erhitzen denaturierten Proteine zu verhindern. In die *Western Blot*-Kammer die Gele samt Elektroden-Rahmen einsetzend, folgte, nach Befüllen der Kammer mit Laufpuffer und Entnahme des Kamms, die eigentliche Proteinbeladung der Taschen. wobei in Slot 1 5µl Marker zu pipettieren waren. Die weiteren Probestaschen wurden mit Proteinen der Kontroll- oder Versuchsgruppen beladen. Der Marker in Probestasche 1 diversifizierte sich während des Proteinlaufes in Proteine unterschiedlicher Größe, wodurch das interessierende Protein anhand seiner Größe eingegrenzt werden konnte.

Verschluss der Kammer und Anschluss an die Stromquelle leiteten die Gelelektrophorese ein: Zuerst ca. 20min bei 60V / 3,0A zum Durchwandern des Sammelgels; dann bei 160V / 3,0A für 1h, spätestens aber bei Auslaufen des Markers aus dem Gel. So wurden die Proteine anhand ihrer Größe (in kDa) aufgetrennt, weil das SDS alle Proteine mit Elektronen überlud. Dadurch wurde die Ladungsverteilung des Proteins unbedeutend für dessen Wanderungsgeschwindigkeit, sodass ausschließlich die Größe bedeutsam war: „Große“ Proteine wanderten aufgrund einer sterischen Hemmung durch das Acrylamid-Gel langsamer von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode (Laemmli 1970).

Im Anschluss an den Gellauf konnte das Trenngel von Glasplatten und Sammelgel durch einen Schaber getrennt und im Blotting-Puffer äquilibriert werden, während Blotting-Papier und -Membran zuzuschneiden und in Transfer-Puffer anzufeuchten waren. Nun folgte die Vorbereitung des Blottings mittels „Trans-Blot Turbo“ in dieser Schichtfolge: Kathode, *Blotting*-Papier, -Gel, -Membran, -Papier und Anode.

Das Gerät benötigt nach Verschließen der Kassetten bei 25V und 3A 30min zum Übertragen der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran. Zur Erfolgskontrolle wurde danach die Membran mit „Ponceau S“ für ca. 2min gefärbt. Mit dem Entfärben mittels A. dest und TBS-T (*Tris-buffered saline-Tween 20*) endet der *Blotting*-Vorgang.

Alle Inkubationsschritte der Immunmarkierung wurden im 50ml-Zentrifugenröhrchen unter beständigem Rollen ausgeführt: Nach dem potenziellen RunX 2-Nachweis wurde die Membran gestrippt und zum Nachweis von GAPDH erneut verwendet. Zuerst musste die Membran durch Inkubation mit 5ml TBS-T + 5% Magermilchpulver (→ Anti-RunX 2) bzw. +5% BSA (→ Anti-GAPDH) für 1h in Dunkelheit bei Raumtemperatur (RT) geblockt werden, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Auf das anschließende Waschen (3x 5min) mit TBS-T, ebenfalls im Dunkeln bei RT, folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper:

Antikörper	Host	Produzent	Inkubation
Anti-RunX 2	Hase	Sigma-Aldrich Co., St- Louis, USA	1:1000 in 4ml TBS-T+5% BSA; über Nacht bei 4°C
Anti-GAPDH	Maus	Imgenex Corp., San Diego, USA	1:10000 in 5ml TBS-T + 3% BSA; 2h bei RT

Tabelle 14: **Aufstellung Erstantikörper**

Die tierischen Erstantikörper banden spezifisch an das zu detektierende Protein.

Nach erneutem Waschen (3x 5min) mit 5ml TBS-T bei Dunkelheit und RT wurde mit dem jeweiligen Zweitantikörper für 1h bei RT inkubiert:

Antikörper	Host	Produzent	Inkubation
Goat anti Rabbit - Anti-RunX 2	Ziege	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK	1:1000 in 4ml TBS-T
Goat anti Mouse - Anti-GAPDH	Ziege	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK	1:1000 in 4ml TBS-T
Anti-Marker		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D	1:5000 in 4ml TBS-T

Tabelle 15: **Aufstellung Zweitantikörper**

Die Zweitantikörper waren gegen Aminosäure-Sequenzen des Erstantikörpers gerichtet, welche diesen als artfremd identifizierten.

Die Antikörper-Inkubation schloss mit drei Waschgängen nach oben beschriebenem Muster ab.

Zur Detektion der Antikörper-Antikörper-Reaktion mit Hilfe von „Ecl *Western Blotting Substrate*“, welche auf dem chemiluminiszenten Nachweis von HRP des Zweitantikörpers (Promega Corp. 2009) basierte, wurde eine Entwicklerlösung angesetzt: Je 1ml „*Solution A*“ und „*Solution B*“ wurde dazu auf der Membran verteilt und diese unverzüglich in die „*ChemiDoc XRS*“-Anlage eingebracht und mittels „*QuantityOne 4.6.5*“ fotografiert:

<i>Select</i>	Chemi Hi <i>Sensitivity</i>
<i>Live/Focus</i>	➔ Schärfe einstellen
<i>Live Acquire</i>	<i>Total Exposure Time</i> : 300sec
	<i>Starting Exposure Time</i> : 60sec
	<i>Number</i> : 5

Tabelle 16: **Einstellungen der Detektion des *Western Blots***

Anhand der Parameter „*Select*“, „*Live/Focus*“ und „*Live Acquire*“ konnte „*QuantityOne 4.6.5*“ kalibriert werden.

Die Fotografie nach 300 sec wurde gespeichert und später ausgewertet.

Um nun das *housekeeping*-Protein nachzuweisen, musste die Membran gestrippt und erneut wie oben beschrieben geblockt und inkubiert werden. Dazu konnte ein Stripping-Puffer (siehe Tabelle 17) verwendet werden, welcher direkt vor Gebrauch mit 100mM 2-Mercaptoethanol zu versetzen war.

Stripping-Puffer
62,5mM Tris (pH=6,8)
2% SDS
in A. dest

Tabelle 17: **Stripping-Puffer**

40ml Stripping-Lösung wurden pro Reaktionsgefäß/Membran benötigt, damit binnen 20min Inkubation bei 60°C im Wasserbad und anschließendem Waschen (3x5 min mit 5ml „*Dulbecco`s PBS*“ sowie 1x5min mit 5ml TBS-T; jeweils im Dunkeln bei RT) alle Antikörper entfernt werden konnten. Erst danach wiederholt sich die zuvor beschriebene Prozedur des Blockens, Immunmarkierens und Detektierens des Antikörpers.

Die *Western Blots* in „*QuantityOne 4.6.5*“ wurden als „*raw data*“ in TIFF-Format kopiert, damit eine densitrometrische Auswertung mit „*ImageJ*“ möglich war: Die zum entsprechenden Antigen gehörenden Banden (RunX 2: 55,1 kDa (Meyers et al. 1996); GAPDH: 36kDa (Barber et al. 2005)) wurden markiert, ausgewählt und die Intensitätsdichte mittels *Area under Curve*-Modell semi-quantitativ gemessen. Nach Berechnung des Quotienten aus absoluter Intensitätsdichte von RunX 2 und GAPDH war es möglich auch die relativen Werte statistisch zu vergleichen.

2.7. Proliferation juveniler und adulter Fibroblasten

Mit Blick auf die im Abschnitt Fragestellung und Ziele der Arbeit erläuterte Unterteilung dieser Dissertation beginnt auch die Vorstellung der Versuchsanordnungen mit jenen Experimenten zur nativen und Zytokin-vermittelten Proliferation:

2.7.1. Viabilitätstest humaner dermaler Fibroblasten

Um einen möglichen Bias des *Cell Viability Assay* (vergleiche Abschnitt 2.6.2) im Sinne eines Zellpassage-abgängigen, unterschiedlichen Resazurin-Grundumsatzes (Null-Hypothese: Zwischen dem Fluoreszenz-Signal von juvenilen Fibroblasten pas ≤ 3 (1.-3. Passage) und jenem von Zellen pas > 3 (ab Passage 4) gibt es vor Beginn der Wachstumsphase keinen Unterschied) zu untersuchen, wurden dermale Fibroblasten juveniler Spender in zwei Gruppen aufgeteilt. Je vier Populationen in Passage 3 und 5-9 (also „ > 3 “) wurden in Doppelbestimmung ausplattiert: Das Ausplattieren der

Fibroblasten entsprach dem Verfahren der Passagierung wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, wobei hier 1×10^4 Zellen pro cm^2 eines *12-Well*s zu pipettieren waren. Das Volumen des Zellkulturmediums pro *Well* betrug $500 \mu\text{l}$.

Nach 4,5h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 -Partialdruck im Brutschrank konnte nach Absaugen des Mediums der *Cell Viability Assay* (2h Inkubation; mit „*CellTiter-blue*®“: Zellkulturmedium = 1:4) durchgeführt werden. Im Rahmen dieses Experimentes wurde postuliert, dass eine suffiziente Adhäsion der Fibroblasten nach 4,5h wahrscheinlich sei. Die Rohdaten wurden um den *blank* reduziert und die Werte der Doppelbestimmung arithmetisch gemittelt. Ein Mann-Whitney-U-Test prüfte oben beschriebene Hypothesen.

2.7.2. Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten

Zur Verifizierung der im Folgenden aufgeführten Null-Hypothesen wurden vier Konfigurationen aus den Achsen „Alter der Spender“ und „Zelldichte“ klassifiziert:

- Die Proliferation, sowohl absolut als auch relativ, ist zwischen adulten und juvenilen Fibroblasten binnen 5 Tagen gleich.
- Die Zelldichte beeinflusst die Mitose-Rate nicht.

Der Eintritt in die Proliferationsphase der Zellen $\text{pas} > 3$ war definiert als der erste Tag, an dem sich die Zellzahl einer Konfiguration signifikant von jener des Tages 0 unterschied.

Die in Abschnitt 2.4.1 beschriebene Prozedur des Passagierens befolgend, wurden von je vier juvenilen und adulten Spendern Zellen in der Dichte von entweder $1 \times 10^3/\text{cm}^2$ oder $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ in fünfzehn *6-Well*s pro Gruppe ausgesät und mit 1ml Kulturmedium für 24h („Tag 0“) inkubiert.

An den Tagen 1-5 sollten die Zellkonzentrationen von drei *6-Well*s pro Spender und Gruppe nach dem Neubauer-Verfahren nach Lindl & Bauer (2000) (2.6.1) bestimmt werden. Das Suspensionsvolumen $V_{\text{Suspension}}$ betrug $333 \mu\text{l}$, sodass aus Formel 16 die Gesamtzahl an Fibroblasten im dazugehörigen *Well* errechnet werden konnte. Zudem sollte am ersten Tag das Kulturmedium erneuert werden, um damit tote Zellen zu entfernen und vitale Fibroblasten mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen.

Während der Mann-Whitney-U-Test oben genannte Hypothesen prüfte, eruierte eine einfaktorische, unabhängige Varianzanalyse mit *post hoc*-Tests Unterschiede zwischen einzelnen Konfigurationen. Vergleiche an einzelnen Tagen bedurften eines t-Tests für abhängige Stichproben.

2.7.3. Zusammenhang von CO_2 und pH-Wert im Dexamethason-Medium

Dass die Umgebungsbedingungen des Brutschranks in Form des pCO_2 keinen Einfluss auf das Dexamethason-Medium haben, sollte als Nullhypothese in diesem Versuch mit je 5ml steril pipettierten Dexamethason-Mediums in zwölf 50ml-Zentrifugenröhrchen untersucht werden. Hierzu wurden sechs davon direkt verschraubt und mit „Parafilm M“ luftdicht abgeschlossen und daraufhin alle Röhrchen in den Brutschrank ($T=37^\circ\text{C}$, $\text{pCO}_2=5\%$, 95% Humidität) verbracht. Somit befanden sich je sechs geöffnete und sechs abgedichtete Gefäße für 1h im Brutschrank.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer werden die Geöffneten im Brutschrank zugeschraubt, ebenfalls mit „Parafilm M“ umwickelt und zusammen mit den Geschlossenen umgehend mittels pH-Meter gemessen. Eine inferenzstatistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

2.8. Wirkung der Zytokine auf die Proliferation

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Versuche untersuchen die Effekte ausgewählter Zytokine auf die Proliferation dermalen Fibroblasten. Um eine schrittweise Entwicklung des Versuchsdesigns zu ermöglichen, werden die Ergebnisse aus den vorhergehenden Experimenten mit einbezogen und zunächst eine „Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2 “ (Abschnitt

2.8.1) vorgenommen. Anschließend soll eine Proliferationsreferenz etabliert (2.8.2) und diese mit den Ergebnissen des Zytokin-Versuchs (2.8.3) verglichen werden.

2.8.1. Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2

Um einerseits die optimale Ausgangszelldichte und andererseits die Wirkung von einmaliger versus täglicher Zytokin-Applikation zu untersuchen, wurden im Rahmen dieses Versuches dermale Fibroblasten von fünf juvenilen Donoren in den Passagen 4 bis 8 ausgewählt. Mit Fokus auf bereits publizierte proliferationsfördernde Effekte (siehe Abschnitt 1.4: Effekte einzelner Zytokine, NO und Dexamethason auf Fibroblasten) bzw. im Hinblick auf eine etwaige Anwendung zur osteogenen Transdifferenzierung (M Hughes-Fulford & Li 2011; Ueno et al. 2011) wurde rekombinantes FGF-2 ausgewählt. Die Auswahl von 333 IU/ml begründete sich in der Idee eines ressourcenschonenden und zugleich den kolportierten, maximalen Effekt abschätzenden Versuchsdesigns. Denn zur Gewährleistung der Linearität des *Cell Viability Assays* (unter 2.6.2), Voraussetzung für eine quantitative Versuchsauswertung, war eine zur Fluoreszenzintensität adäquate Inkubationsdauer obligatorisch (Promega Corp. 2011).

In Anlehnung an die Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten (2.7.2) mit den Konzentrationen 1×10^3 Zellen/cm² und 1×10^4 Zellen/cm² konnte hier ein detailliertes Schema gewählt werden:

Konfigurationen		Zelldichte (Zellen/cm ²)					
I	Kontrolle;	1×10^3	$2,5 \times 10^3$	4×10^3	6×10^3	$7,5 \times 10^3$	9×10^3
	Auswertung am 2. Tag;	2×10^3	3×10^3	5×10^3	7×10^3	8×10^3	1×10^4
II	Kontrolle;	1×10^3	$2,5 \times 10^3$	4×10^3	6×10^3	$7,5 \times 10^3$	9×10^3
	MW am 2. Tag; Auswertung am 5. Tag;	2×10^3	3×10^3	5×10^3	7×10^3	8×10^3	1×10^4
III	FGF-2 333 IU/ml;	1×10^3	$2,5 \times 10^3$	4×10^3	6×10^3	$7,5 \times 10^3$	9×10^3
	Applikation am 2. Tag; Auswertung am 5. Tag;	2×10^3	3×10^3	5×10^3	7×10^3	8×10^3	1×10^4
IV	FGF-2 333 IU/ml;	1×10^3	$2,5 \times 10^3$	4×10^3	6×10^3	$7,5 \times 10^3$	9×10^3
	Applikation am 2.-4. Tag; Auswertung am 5. Tag;	2×10^3	3×10^3	5×10^3	7×10^3	8×10^3	1×10^4

Tabelle 18: Schema Konfiguration x Zelldichte = Modus

Die Aufteilung in 48 distinkte Versuchsmodi (= 4 Konfigurationen x 12 Zelldichten) erfolgte pro Person nach oben gezeigtem Schema in Doppelbestimmung. Die Konfigurationen II-IV beinhalteten alle einen Medienwechsel (MW) am zweiten Tag, während III und IV zusätzlich eine erste Applikation von rekombinantem FGF-2 erhielten. In Konfiguration IV wurde dieser Schritt am dritten und vierten Tag wiederholt. Die Auswertung erfolgte für Konfiguration I am zweiten, sonst am fünften Tag.

Die Nullhypothese ging nicht von einem signifikanten Unterschied zwischen den Zelldichten aus. Auch in Bezug auf den Effekt mehrmaliger Zytokin-Applikationen wurde nicht von einem Unterschied ausgegangen. Die inferenzstatistische Prüfung erfolgte durch t-Tests für abhängige Stichproben oder Friedman-Rangvarianzanalysen.

Diese 48 Versuchsmodi wurden pro Person in Doppelbestimmung, wie in Kultivierung von humanen dermalen Fibroblasten (Abschnitt 2.4) beschrieben, in 12-Well-Platten mit anfänglich 1ml Kulturmedium pro Well ausplattiert. Die Zellen bei 37°C, 5% pCO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubierend, musste nach 48h ein Medienwechsel mit 500µl/Well für die Konfigurationen II-IV durchgeführt werden: Für die Modi der Kontrollkonfiguration (II) wurde Kulturmedium, für die anderen Modi (Konfigurationen III und IV) Kulturmedium + 333 IU/ml rekombinantes FGF-2 verwendet. Für jene Versuchsmodi, die zur Auswertung am 2. Tag bestimmt waren (Konfiguration I), erfolgte nach dem *Cell Viability Assay* (2.6.2) beschriebenen Protokoll (hier 500µl/Well Gemisch und 2h Inkubation). Am dritten und vierten Tag wiederum wiederholte sich für die Modi der Konfiguration

IV zuvor beschriebener Medienwechsel. Am fünften Tag wurde mittels *Cell Viability Assay* (s. o.) gemessen, der *blank* davon abgezogen und anschließend die Daten statistisch ausgewertet.

2.8.2. Proliferationsreferenz

Im Rahmen dieses Versuchsaufbaus sollte nun eine Referenz („Kontrolle“) für den Zytokin-Versuch etabliert, das Messschema überprüft und mögliche Zellpassage-bedingte *Biases a priori* ermittelt werden:

- Zwischen den Modi innerhalb einer Passage-Gruppe gibt es nur zufällige Unterschiede.
- Der Anstieg des Signals des *Cell Viability Assay* ist proportional zur Inkubationsdauer (Promega Corp. 2011)
- Passage-Gruppen mit identischen Modi unterscheiden sich nicht.

t-Test oder Varianzanalyse für abhängige Stichproben wurden zur Signifikanzprüfung dieser Hypothesen verwendet.

Von acht juvenilen Spendern (je vier Passage pas ≤ 3 und pas > 3) wurden Zellen in der Konzentration 3×10^3 Fibroblasten/cm² (siehe Ergebnisse Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2 unter 3.2.1) in je achtzehn *12-Well* appliziert und für 48h im Brutschrank mit den Einstellungen T=37°C, pCO₂=5%, H=95% mit 500µl/*12-Well* Kulturmedium inkubiert.

Danach wurde die Viabilität der dermalen Fibroblasten aus sechs *Wells* pro Spender (einem Drittel) mittels „*CellTiter-blue*“:Kulturmedium= 100µl:400µl und „*Victor³*“-Fluoreszenzsensor (Details siehe 2.6.2) für 1h, 2h und 3h Inkubation gemessen und gespeichert. In allen anderen Kulturen musste ein Medienwechsel (500µl/*12-Well* Kulturmedium) durchgeführt werden. Für sechs *12-Wells* pro Spender (ein Drittel) wurde der Medienwechsel am dritten und vierten Tag wiederholt, für die anderen Sechs nicht. Am fünften Tag schließlich wurden alle Kulturen wie zuvor beschrieben gemessen und die Daten gespeichert. Den *blank* abziehend, konnte eine deskriptive wie induktive Auswertung angeschlossen werden.

2.8.3. Zytokin-Versuch

Die Zielsetzung dieses Versuches war die Prüfung folgender Nullhypothesen in Bezug auf die Proliferation juveniler, dermalen Fibroblasten:

1. Zytokine beeinflussen die Proliferation juveniler Fibroblasten nicht.
2. Diskrete Konzentrationen einzelner Zytokine haben keinen Effekt auf die mitotische Aktivität juveniler Fibroblasten.
3. Die Sensitivität juveniler Fibroblasten auf bestimmte Zytokine/Konzentrationen von Zytokinen korrespondiert nicht mit deren Zellpassage.
4. NO hat in keiner Konzentration Einfluss auf die Viabilität dermalen Fibroblasten.

Für den optimalen Versuchsaufbau waren Erkenntnisse aus zwei zuvor durchzuführenden Versuchen notwendig: Der Zeitpunkt der ersten Zytokin-Applikation konnte mit Hilfe von Ergebnissen aus Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten (3.1.2) und der Proliferationsreferenz (3.2.2) auf den zweiten Tag determiniert werden. Außerdem ließ sich aus Ergebnissen der Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2 (3.2.1) eine sinnvolle Zellkonzentration ($=3 \times 10^3$ /cm²) eruieren. Das Zellmaterial, von acht juvenilen Donoren stammend, wurde anhand der *in vitro*-Passage kategorisiert: Je vier Populationen für pas ≤ 3 und pas > 3 . Die Zytokin-Dosierung erfolgte in sieben Konzentrationen (1 IU/ml, 3 IU/ml, 10 IU/ml, 33 IU/ml, 100 IU/ml, 333 IU/ml und 1000 IU/ml). Ausgewählt werden die in Bezug auf die Proliferation humaner Fibroblasten interessierende, rekombinant erzeugte Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , TGF- β und FGF-2). Sämtliche Konfigurationen wurden in Doppelbestimmung angelegt, wobei als Kontrolle Modus 3 (5 Tage Inkubation; Medienwechsel am 2., 3., 4. Tag) aus dem Versuch zur Proliferationsreferenz (3.2.2) diente. Alle Zytokine wurden gemäß Herstellerangaben in sterilem A. dest bzw. 99 prozentigem

Ethanol suspendiert. Zusätzlich sollte die Wirkung von Deta/NO in den Konzentrationen 5µM, 10µM, 20µM, 50µM und 100µM auf die Proliferation dermalen Fibroblasten untersucht werden. Dazu musste die Substanz direkt vor Verwendung in sterilem A. dest angesetzt und sofort appliziert werden.

In Anlehnung an die zuvor beschriebene Kultivierung von humanen dermalen Fibroblasten wurden auch in diesem Versuch die Zellen in einer Konzentration von $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ auf 12-Well-Platten verteilt. Zuvor war in jedes Well 500µl Zellkulturmedium vorzulegen, um eine stochastische Verteilung sowie geeignete Kulturbedingungen zu ermöglichen.

Nach 48h Inkubation konnten die in A. dest oder Ethanol suspendierten Zytokine aus dem Gefrierschrank (-20°C) aufgetaut bzw. Deta/NO in A. dest aufgelöst werden (s. o.). Anschließend ließen sich diese bei 3000 U/min in der jeweiligen Suspension mischen, um dann in einem 15ml-Zentrifugenröhrchen mit 4ml Kulturmedium pro Matrix (→ 4 Spender à 500µl) entsprechend der benötigten Konzentrationen verdünnt zu werden. Die beschrifteten und mit Zytokin-Kulturmedium-Gemisch befüllten Röhrchen mussten nun im Wasserbad auf 37°C temperiert werden. Währenddessen werden die Platten einzeln aus dem Brutschrank entnommen, die Zellen abgesaugt und mit PBS gewaschen. Das PBS absaugend, schloss sich die Applikation von je 500µl des zuvor durchgemischten Röhrcheninhalts (s. o.) in die gekennzeichneten Wells an. Nach diesem schnell durchzuführenden Medienwechsel wurden die Platten umgehend zurück in den Brutschrank transportiert. Abschließend mussten die Zytokine erneut bei -20°C eingefroren und das Deta/NO-A. dest-Gemisch entsorgt werden. Um nach 72h bzw. 96h eine Inkubation der Fibroblasten mit der identischen Konfiguration/Suspension wie am zweiten Tag zu gewährleisten, wiederholt sich der Medienwechsel an diesen Tagen streng nach zuvor beschriebener Vorgehensweise.

Die Nachweisphase via *Cell Viability Assay* begann nach 120h Versuchsdauer mit Abnehmen des Kulturmediums, Waschen mit PBS, erneutem Absaugen und endete in der Inkubation mit 500µl „CellTiter-Blue-Reagent“[®]-Kulturmedium-Gemisch für 1-3h bei 37°C. Um Validität und Reliabilität zu erhöhen wurden alle Platten zweimal vom Victor³[®] gemessen und die Rohdaten gespeichert: Dank des zuvor durchgeführten Ergebnisse der Proliferationsreferenz war es möglich, die Angaben des Herstellers bezüglich der Linearität des *Cell Viability Assay* für Inkubationszeiträume von 1-4h zu verifizieren. Deshalb war es zulässig im Zeitraum zwischen der 60. und 120. min alle Platten in aufsteigender Reihenfolge einzeln zu messen, diese unverzüglich zurück in den Brutschrank zu bringen und anschließend (121. - 180. min) die Prozedur in absteigender Reihenfolge zu wiederholen. Dadurch ergaben sich Messwert-Paare in dem Sinne, als dass eine Platte an zwei Zeitpunkten mit dem gleichen Abstand zum mittleren Messzeitpunkt (=120min) gemessen wird. Auf Grund der zuvor bestätigten Angabe des Herstellers bezüglich der Linearität der Fluoreszenz des *Cell Viability Assays* zwischen 1-4h (Promega Corp. (2011) und Abschnitt 3.2.2). Diese Messwert-Paare wurden gemittelt, wodurch der so errechnete Wert dem zu erwartenden Messwert zum Zeitpunkt 120min gleichen sollte. Somit wurden virtuell alle Proben zum gleichen Zeitpunkt ausgewertet: Innerhalb einer Passage-Klasse mittels t-Test oder Varianzanalyse für unabhängige Stichproben und zwischen den Passage-Klassen als t-Test für abhängige Stichproben. Um Signifikanzen zwischen Zytokinen auszuwerten, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

2.9. Osteogene Transdifferenzierung

Die hier vorgestellten Versuchsanordnungen beinhalten zunächst die Etablierung einer Referenzmethode zur osteogenen Transdifferenzierung und anschließend Modifikationen durch Variation einzelner Faktoren. Als Nachweisverfahren dienten AP-Assay, Alizarin Rot-Färbung, -Rücklösung und -Quantifizierung sowie gegebenenfalls *Western Blots* von RunX 2 und GAPDH.

Aus den in der Einleitung vorgestellten Kriterien (1.5: Problematik der Festlegung geeigneter Kriterien der osteogenen Transdifferenzierung) müssen nun eindeutige Maßstäbe zur osteogenen Transdifferenzierung definiert werden:

- Zur Detektion der gesteigerten Aktivität der AP während der osteogenen Transdifferenzierung wird ein signifikanter Zuwachs im AP-*Assay* gegenüber der Kontrollpopulation gefordert. Zudem soll zur Bestimmung einer postulierten Zunahme der Enzymdichte in der Zellmembran bzw. -synthese in der Zelle die Enzymaktivität gegen die Gesamtproteinmenge normiert werden.
- Eine positive Färbung mit dem Farbstoff Alizarin Rot ist lichtmikroskopisch in qualitativ ausreichendem Maße zu beobachten und mittels geeigneter Verfahren zu quantifizieren. Hierbei muss die Farbstoff-Konzentration signifikant jene der Kontrolle übersteigen.
- RunX 2, als ein vergleichsweise spezifisches Markerprotein (s. Abschnitt 1.5.1), muss in transdifferenzierenden Kulturen via Western Blot nachzuweisen sein. Seine Expression, standardisiert gegen jene von GAPDH, sollte signifikant jene der Kontrollgruppe übertreffen. Dieses Verfahren ist nur durchzuführen, wenn alle anderen auf eine osteogene Transdifferenzierung hindeuten.
- Zuletzt ist festzuhalten, dass nicht zwingend alle drei zuvor genannten Kriterien zum identischen Zeitpunkt erfüllt sein müssen. Innerhalb der vorgegebenen, gesamten Versuchsdauer werden alle drei Kriterien unabhängig voneinander mindestens einmal erfüllt.

Die Messwerte wurden gemäß den beschriebenen Protokollen hinterlegt und deskriptiv und induktiv ausgewertet.

Ziel jedes Experimentes und dessen Auswertung war also die Prüfung folgender Nullhypothesen:

- Zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe besteht in Bezug auf die zuvor genannten Kriterien kein Unterschied.
- Eine osteogene Transdifferenzierung, symbolisiert durch signifikante Steigerungen der Messwerte in der Versuchs- gegenüber der Kontrollgruppe, findet nicht statt.

2.9.1. Transdifferenzierungsreferenz

Auf Basis einer Versuchsanordnung von Junker et al. (2009) wurde hier die osteogene Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten binnen 21 Tagen (bei Junker et al. vier Wochen) untersucht. Hierzu wurden Fibroblasten von vier juvenilen Donoren in Passage 3 verwendet und wie folgt ausplattiert:

Auf Grund der Ergebnisse des „Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten“ konnte eine Konzentration von 1×10^4 Zellen/cm² vorgelegt und für drei Tage inkubiert werden. Mit Beginn der Wachstumsphase am Tag 3 wurde ein Medienwechsel vollzogen: Pro Spender wurden als Kontrollgruppe 18 *Wells* ausgewählt und mit 1ml Kulturmedium (siehe Tabelle 2) versetzt. Die anderen 18 *Wells* wurden mit 1ml Dexamethason-Medium (Zusammensetzung: Tabelle 4) inkubiert. Von nun an sollten die Platten täglich für zweimal 10min dem Brutschrank entnommen und den Raumbedingungen (pCO₂, pH-Wert, Temperatur) ausgesetzt werden. Den Nachweis für eine Veränderung einzelner Eigenschaften des Dexamethason-Mediums lieferte der zuvor durchgeführte Versuch „Zusammenhang von CO₂ und pH-Wert im Dexamethason-Medium. Zweimal pro Woche mussten zudem in den darauffolgenden Wochen Nähr- bzw. Transdifferenzierungsmedien erneuert werden.

Am 10., 17. und 24. Tag nach Ausplattieren, also ein, zwei oder drei Wochen nach dem ersten Medienwechsel, werden oben beschriebene Nachweisverfahren in Doppelbestimmung pro Kontroll- bzw. Versuchsgruppe durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test bzw. Varianzanalyse für abhängige Stichproben (oder Messwiederholung).

2.10. Optimierung der osteogenen Transdifferenzierung

Um *in vitro*-Seneszenz, Spenderalter, Transdifferenzierungsmedium, Dauer, Änderung der Umgebungsbedingungen, Scherstress und DNA-Methylierung bezüglich der osteoinduktiven Potenz zu Evaluieren wurden ausgehend von der Transdifferenzierungsreferenz bestimmte Parameter modifiziert (Tabelle 19). Durch Anwendung der quantitativen Messverfahren, sofern sie denn empirisch indiziert waren, konnten zwei statistische Vergleichsschritte vollzogen werden: Gegenüber der entsprechenden Kontrolle und gegenüber der Transdifferenzierungsreferenz.

Faktoren Konfigurationen	Passage	Spenderalter	Medium	Dauer	Änderung von pH-Wert, Bikarbonat, pCO ₂ und T	Scherstress	Methylierung
Transdifferenzierungsreferenz	pas ≤3	juvenil	D	3	2x10min täglich	Nein	Normal
<i>In-vitro</i> Seneszenz	pas >3	juvenil	D	3	2x10min täglich	Nein	Normal
adulte Spender pas ≤3	pas ≤3	adult	D	3	2x 10min täglich	Nein	Normal
adulte Spender pas >3	pas >3	adult	D	3	2x10min täglich	Nein	Normal
Calcitriol-Medium	pas ≤3	juvenil	C	3	2x 10min täglich	Nein	Normal
Dexamethason-Konzentrationen	pas >3	juvenil	1-1000nM D	3	2x 10min täglich	Nein	Normal
Konstanz der Umgebungsbedingung	pas ≤3	juvenil	D	3	Nein	Nein	Normal
DNA-Methyltransferase-Inhibition	pas >3	juvenil	D	3	2x 10min täglich	Nein	Inhibition mit 5'-Azacytidin
Dexamethason- und Calcitriol-Medium	pas >3	juvenil	D C	1.-2. 3.-4.	2x 10min täglich	2x 5min täglich	Normal

Tabelle 19: Übersicht Ansätze zur Optimierung der osteogenen Transdifferenzierung

Die verschiedenen Konfigurationen, als Kombination aus den Faktoren *in vitro*-Passage, Spenderalter, Transdifferenzierungsmedium, Inkubationsdauer, Änderung der Umgebungsbedingungen, Scherstress und Methylierung orientierten sich an jener der Transdifferenzierungsreferenz. Die Abweichungen von Letzterer sind rot markiert. Dexamethason- und Calcitriol-Medium werden hier mit „D“ oder „C“ abgekürzt.

Die statistische Auswertung geschah mittels t-Test bzw. Varianzanalyse für abhängige Stichproben in Bezug auf Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe.

Somit kam zusätzlich zu den unter 2.9 definierten Nullhypothesen für die Ansätze zur Optimierung folgende H₀ hinzu:

- Ein Unterschied zwischen den Messwerten der Versuchsgruppe der Transdifferenzierungsreferenz und den Messwerten der Versuchsgruppe der einzelnen Modifikationen besteht nicht.
- Die Versuchsgruppen der Modifikationen unterscheiden sich bezüglich der quantifizierten Messwerte untereinander nicht.

Diese Hypothesen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test oder Kruskal-Wallis-Test und anschließenden *post hoc*-Tests geprüft.

2.10.1. Osteogene Transdifferenzierung und *in vitro*-Seneszenz

Versuchsaufbau und -ablauf ähnelten jenem der Transdifferenzierungsreferenz, es wurden jedoch juvenile Fibroblasten in Passage 4 und 7 verwendet. Dadurch konnte die Hypothese verifiziert werden, dass die osteogene Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten unabhängig von der *in vitro*-Passage wären.

2.10.2. Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3

Das experimentelle *Design* wich nur durch die Nutzung adulter Fibroblasten von jenem der Transdifferenzierungsreferenz ab. Somit konnte die Nullhypothese, ob die osteogene Transdifferenzierung unabhängig vom Spenderalter wäre, überprüft werden.

2.10.3. Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas > 3

Zur Prüfung der Unabhängigkeit der osteogenen Transdifferenzierung von der Kombination aus *in vitro*-Seneszenz und Spenderalter (als Nullhypothese), verwendete dieses Experiment Zellen adulter Donoren in höheren Passagen. Der Versuchsablauf musste gegenüber jenem der Transdifferenzierungsreferenz nicht verändert werden (siehe Tabelle 19).

2.10.4. Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium

Um nun einen wissenschaftlichen Vergleich bezüglich des osteogenen Transdifferenzierungspotentials von 100nM Dexamethason und 10nM Calcitriol (siehe Tabelle 4) anzustrengen, wurden dermale Fibroblasten von vier juvenilen Spender in Passage ≤ 3 verwendet. Der Versuchsaufbau glich jenem der Transdifferenzierungsreferenz, wobei hier besagtes Calcitriol-Medium für die Versuchsbedingungen zu verwenden war (siehe Tabelle 19).

2.10.5. Osteogene Transdifferenzierung und Dexamethason-Konzentrationen

Versuchsaufbau und -ablauf ähnelten der Transdifferenzierungsreferenz, allerdings wurden dermale Fibroblasten von vier juvenilen Donoren in den Passagen 4-9 verwendet. Unter Versuchsbedingungen erfolgte eine Inkubation mit Dexamethason-Medium (Zusammensetzung in Tabelle 4), in welchem die Konzentrationen des Dexamethasons variiert wurden: 1nM, 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, 75nM, 100nM, 250nM, 500nM, 750nM und 1000nM. Für jede Konzentration erfolgte eine Quantifizierung der Alizarin Rot Färbung nach 14 und 21 Tagen Inkubation.

dadurch sollte die Nullhypothese eruiert werden, dass eine osteogene Transdifferenzierung juveniler Fibroblasten höherer Passagen nicht konzentrationsabhängig sei.

2.10.6. Osteogene Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen

Um den Einfluss konstanter Umgebungsbedingungen ($pCO_2 = 5\%$, pH-Wert und $T = 37^\circ C$) auf die osteogene Differenzierung binnen drei Wochen auszuschließen (H_0), wurden Fibroblasten analog zur Transdifferenzierungsreferenz ausgewählt und inkubiert. Die Methodik variierte dahingehend, dass Kontroll- und Versuchsgruppe nicht zweimal täglich für 10min den Umgebungsbedingungen exponiert wurden.

2.10.7. Osteogene Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition

Um einen Effekt initialer DNA-Methylierungsmuster auf die osteogene Transdifferenzierung seneszenten Fibroblasten auszuschließen (H_0), wurde das experimentelle *Design* der Transdifferenzierungsreferenz wie folgt verändert: Es wurden Fibroblasten juveniler Spender in den Passagen 4-13 ausgewählt und per Medienwechsel nach 24h mit 3ml Kulturmedium+1 μ Mol 5'-Azacytidin-Gemisch für 48h versetzt. Dadurch blieb der DNA-Methyltransferase-Inhibitor zu Beginn der Wachstumsphase am zweiten Tag, siehe Ergebnisse „Wachstumskinetik juveniler und adulter

Fibroblasten“ (3.1.2), als Cytidin-Analogon bioverfügbar. Ab dem dritten Tag wurden dann die im Referenzversuch beschriebenen mit dem Medienwechsel und Nachweisverfahren angewendet.

2.10.8. Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium

Dass eine sequentielle Inkubation mit je zwei Wochen Dexamethason-Medium und anschließend Calcitriol-Mediums (Tabelle 4) unter täglichem Scherstress keine osteogene Transdifferenzierung seneszenten Fibroblasten (juvenile Donoren; Passage 4-7) möglich wäre, war Nullhypothese dieses Experimentes. Dazu wurden besagte Zellen von vier Spendern in Analogie zum Referenzversuch behandelt. Abweichend wurden die Kulturen während der täglichen Wechsels der Umgebungsbedingungen für je 5 min bei 75 U/min geschwenkt, wodurch eine Induktion von Scherstress erzielt werden konnte. Zwischen dem dritten und siebzehnten Tag wurde die Versuchsgruppe mit Dexamethason-haltigem Medium inkubiert, während sie anschließend Calcitriol-Medium für zwei Wochen ausgesetzt waren. Die Messungen erfolgten hier abweichend nach zwei, drei und vier Wochen.

2.11. Interdependenzen

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen osteogener Transdifferenzierung und Proliferation der dermalen Fibroblasten wurden zwei weitere Versuchsdesigns entwickelt:

2.11.1. Proliferativer Effekt des Dexamethason-Mediums

Um die Fragestellung einer potenziellen Korrespondenz zwischen Transdifferenzierung und Proliferation juveniler Fibroblasten in Abhängigkeit von der Zellpassage ($pas \leq 3$ und $pas > 3$) zu untersuchen (H_0 : kein Zusammenhang), wurden erneut Aufbau und Durchführung der Transdifferenzierungsreferenz verwendet.

Abweichend vom Prozedere der Referenz erfolgte hier die Auswertung mittels Neubauer-Verfahren nach Lindl & Bauer (2000) nach 2, 10, 14 und 24 Tagen Inkubation und die Inferenzstatistik mit t-Test für abhängige Stichproben.

2.11.2. Proliferationswirkung der Bestandteile des Dexamethason-Mediums

Zeigten die Ergebnisse des vorhergehenden Versuches (unter 3.4.1) ein signifikantes Zellwachstum bei Inkubation mit Dexamethason-Medium, sollten in diesem Folgeversuch mögliche Effekte der einzelnen Bestandteile des Mediums auf die Proliferation und Kontaktinhibition dermalen Fibroblasten $pas > 3$ untersucht werden (H_0 : keine Effekte). Dazu wurden, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten (Abschnitt 3.1.2), juvenile Fibroblasten von vier Donoren (Passage 5-7) in den Konzentrationen $1 \times 10^3/\text{cm}^2$ und $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ in *12-Well*s ausplattiert. Da besagte Wachstumskinetik eine signifikante Proliferation nach dem 2. Tag offenbarte, mussten zu diesem Zeitpunkt die Inkubation mit 500 μl Kulturmedium im Brutschrank (37°C, 5% pCO_2 , 95% Luftfeuchtigkeit) durch 388 μl (1ml/6-Well \sim 388 μl /12-Well) der folgenden Medien geändert werden:

Basismedium	Zusatz	Bezeichnung
Kulturmedium	Kein Zusatz	neg. Kontrolle
Dexamethason-Medium	Kein Zusatz	pos. Kontrolle
DMEM	15% FBS; 250 IU Penicillin / 250 μg Streptomycin, 50mM HEPES Buffer Solution, 5mM Sodium Pyruvate Solution, 1% NEAA	DMEM
Kulturmedium	100nM Dexamethason	+Dexamethason
Kulturmedium	50 μM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	+Ascorbinsäure
Kulturmedium	10mM β -Glycerophosphat	+ β -Glycerophosphat

Tabelle 20: Nomenklatur einzelner Medien und Zusätze

Das Kulturmedium ohne Zusätze diente als negative Kontrolle und das Dexamethason-Medium als pos. Kontrolle. „DMEM“ bestand aus DMEM sowie den Zusätzen des Kulturmediums. Alle anderen Medien waren auf Basis des Kulturmediums mit entsprechenden Bestandteilen des Dexamethason-Mediums zusammen gesetzt.

Zweimal wöchentlich wurden die entsprechenden Medien erneuert, wobei am 7., 14. und 21. Tag nach diesem ersten Medienwechsel Zellen mittels *Cell Viability Assay* ausgewertet werden sollten. Dazu wird *CellTiter-blue*[®] 1:4 mit Kulturmedium (für die Gruppen „neg. Kontrolle“, „+Dexamethason“, „+Ascorbinsäure“ und „+β-Glycerophosphat“) oder mit DMEM (für die „DMEM“-basierten Medien „pos. Kontrolle“ sowie „DMEM“) verdünnt. Zur statistischen Auswertung wurde der *blank* von den Messwerten subtrahiert; der Vergleich der Konfigurationen erfolgte mittels t-Test für abhängige Stichproben.

3. Ergebnisse

3.1. Proliferation juveniler und adulter Fibroblasten

3.1.1. Viabilitätstest humaner dermaler Fibroblasten

Nach 4,5h Inkubation im Brutschrank mit Kulturmedium und Messung mittels *Cell Viability Assay* differieren die Signale juveniler Zellen pas ≤ 3 (Mittelwert: $1,7 \times 10^6$ und Standardabweichung: $8,4 \times 10^5$) und juveniler Fibroblasten pas > 3 (Mittelwert: $8,4 \times 10^5$ und Standardabweichung: $1,8 \times 10^5$) laut Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant:

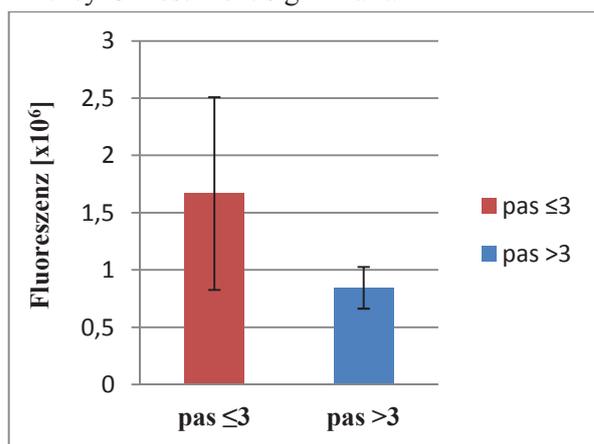


Abb. 9: Viabilitätstest nach 4,5h Inkubation

Es wird die Fluoreszenz (y-Achse) in Abhängigkeit von der Passage-Klasse (x-Achse) als Säulendiagramm dargestellt.

Die Zellviabilität juveniler Fibroblasten in Passage 3 (rote Säule) übersteigt jene der Zellen höherer Passage (blaue Säule) nicht signifikant.

3.1.2. Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten

Die Auswertung dieses Experimentes (Methodik siehe 2.7.2) mit Klassifizierung der Fibroblasten nach Spenderalter (juvenil und adult) und Zelldichte geschieht unter Berechnung der relativen Zellzahl zu Tag 0.

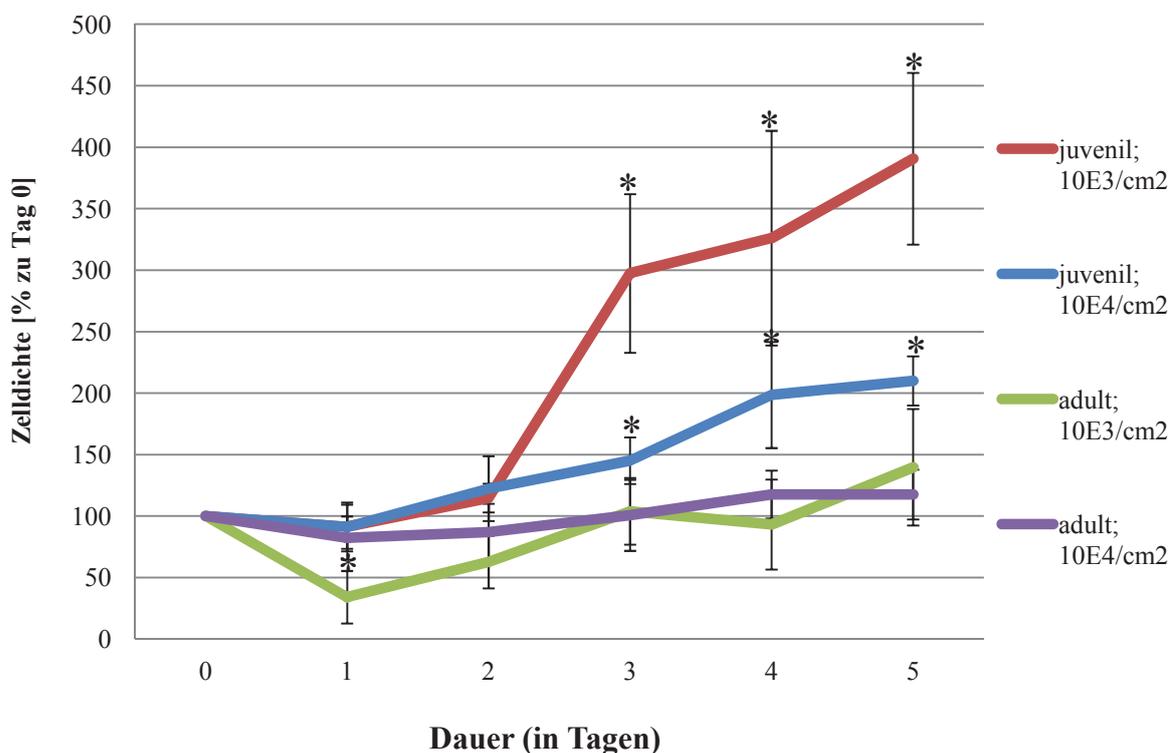


Abb. 10: Relatives Wachstum im Vergleich zu Tag 0

Diese Abbildung zeigt das relative Wachstum in Prozent zur Ausgangszell-dichte am Tag 0 (y-Achse) in Bezug zur Inkubationsdauer (x-Achse) verschiedener Gruppen, bestehend aus Spenderalter und initialer Zelldichte. Der signifikante Anstieg (*) von juvenilen Spendern; Ausgangsdichte $10^3/\text{cm}^2$ (rote Linie) ab dem dritten Tag auf bis zu 310% illustriert deutlich den Beginn der Wachstumsphase für diese Subpopulation. Ab demselben Tag kann für Zellen juveniler Spender, Zelldichte: $10^4/\text{cm}^2$ (blaue Linie) ein signifikantes Wachstum auf ca. 210% gemessen werden. Im Gegensatz dazu reduziert sich die Zellzahl adulter Fibroblasten in der Ausgangszelldichte von $10^3/\text{cm}^2$ (grüne Linie) signifikant auf 34% binnen eines Tages und erreicht ein nicht signifikantes Maximum von 140% am fünften Tag. In der höheren Zelldichte (adulte Zellen; $10^4/\text{cm}^2$; violette Linie) schwankt die relative Zellzahl nicht signifikant zwischen -18% und +17%.

Wie Abb. 10 illustriert, erreichen Gruppen mit juvenilen Fibroblasten (rote und blaue Linie) ab dem dritten Tag eine signifikante Zunahme ihrer Zellzahl durch Proliferation. Dieser Effekt ist für juvenile Zellen mit einer Ausgangszelldichte von $10^3/\text{cm}^2$ maximal. Währenddessen vermehren sich die Gruppen mit adulten Fibroblasten nicht signifikant, adulte Zellen mit einer initialen Dichte von $10^3/\text{cm}^2$ (grüne Linie in Abb. 10) fallen sogar auf 34% binnen eines Tages ab.

Bei Betrachtung der einzelnen Eigenschaften wird ein signifikanter Unterschied zwischen juvenilen (+200% am fünften Tag) und adulten Zellen (+30% am fünften Tag) ab dem zweiten Tag deutlich. Ein derartiger Unterschied zwischen den Zelldichten lässt sich jedoch nicht belegen.

3.1.3. Zusammenhang von CO_2 und pH-Wert im Dexamethason-Medium

Der Vergleich der pH-Werte des Dexamethason-Mediums nach einstündiger Inkubation bei $T = 37^\circ\text{C}$ und einem CO_2 -Partialdruck von entweder 0,04% (Raumluft) oder 5% (im Brutschrank) verifiziert einen signifikant erniedrigten pH-Wert bei pCO_2 von 5%.

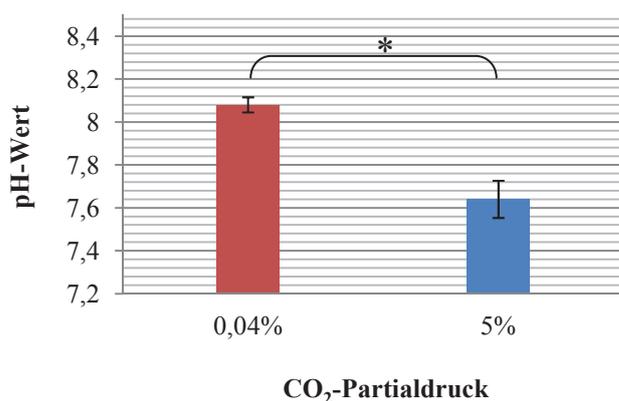


Abb. 11: **pH-Wert und pCO_2 im Dexamethason-Medium**

Das Säulendiagramm illustriert die Entwicklung des pH-Wertes (y-Achse) in Abhängigkeit vom pCO_2 (x-Achse).

Ein pCO_2 von 0,04% führt zu einer signifikanten Alkalisierung (*) des pH-Wertes von 8,08 (rote Säule; StAw: 0,04) auf 7,64 ($\text{pCO}_2 = 5\%$; StAw: 0,09) im Dexamethason-Medium.

3.2. Wirkung der Zytokine auf die Proliferation

3.2.1. Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2

Die absolute Fluoreszenz der „Messung Tag 2“ dient zur Normierung, da laut Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten noch nicht von einem signifikanten Wachstum auszugehen ist. Dadurch lassen sich signifikante Differenzen zwischen allen Konfigurationen zunächst unabhängig von der Ausgangszelldichte berechnen: Nach fünf Tagen ohne FGF-2-Gabe ist die Viabilität signifikant gegenüber der Messung am zweiten Tag angestiegen, jedoch signifikant niedriger als jene mit einmaliger Applikation von 333 IU/ml FGF-2 am zweiten Tag. Die Zytokin-Applikation am 2.-4. Tag wiederum übertrifft die anderen Konfigurationen signifikant.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zelldichten, eruiert der T-Test für abhängige Stichproben in den Ausgangszelldichten $3 \times 10^3/\text{cm}^2$ und $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ signifikante Proliferationszuwächse nach fünf Tagen und dreimaliger FGF-2-Gabe (violette Säule in Abb. 12) gegenüber den anderen Konfigurationen.

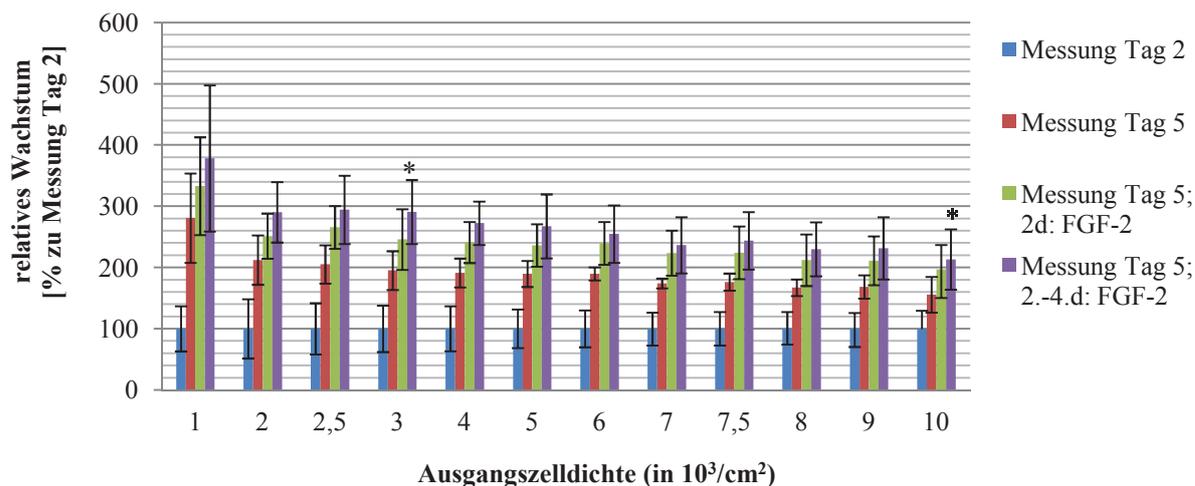


Abb. 12: **Abhängigkeit des Effektes dreimaliger FGF-2-Gabe von der Zelldichte**

Dieses Säulendiagramm verdeutlicht für bestimmte Zelldichten (x-Achse) das relative Wachstum gegenüber der Messung am zweiten Tag (y-Achse). Jene Konfiguration, welche ein signifikantes Wachstum gegenüber den anderen drei Konfigurationen bei einer bestimmten Zelldichte aufweist, wird mit * markiert.

In Relation zur Fluoreszenz nach zwei Tagen (Messung Tag 2, blauer Balken), kann diese in allen Konzentrationen bis zum fünften Tag auch ohne FGF-2-Zugabe (Messung Tag 5, roter Balken) intensiviert werden. Nimmt die Differenz zwischen diesen beiden Konfigurationen mit steigender Zelldichte auch ab, so ist diese Entwicklung auch für Konfigurationen mit Gabe von 333 IU/ml FGF-2 zu erkennen. Die dreimalige Applikation von FGF-2 (violette Säulen) übertrifft bei 3×10^3 Zellen/cm² und 1×10^4 /cm² alle anderen Konfigurationen, auch jene nach einmaliger Applikation (grüne Säulen), signifikant.

3.2.2. Proliferationsreferenz

Zunächst bestätigt sich die Annahme der Linearität der Fluoreszenz-Zunahme mit steigender Inkubationsdauer durch die in Abb. 13 aufgeführten geringen Streuungen zwischen den Messwerten.

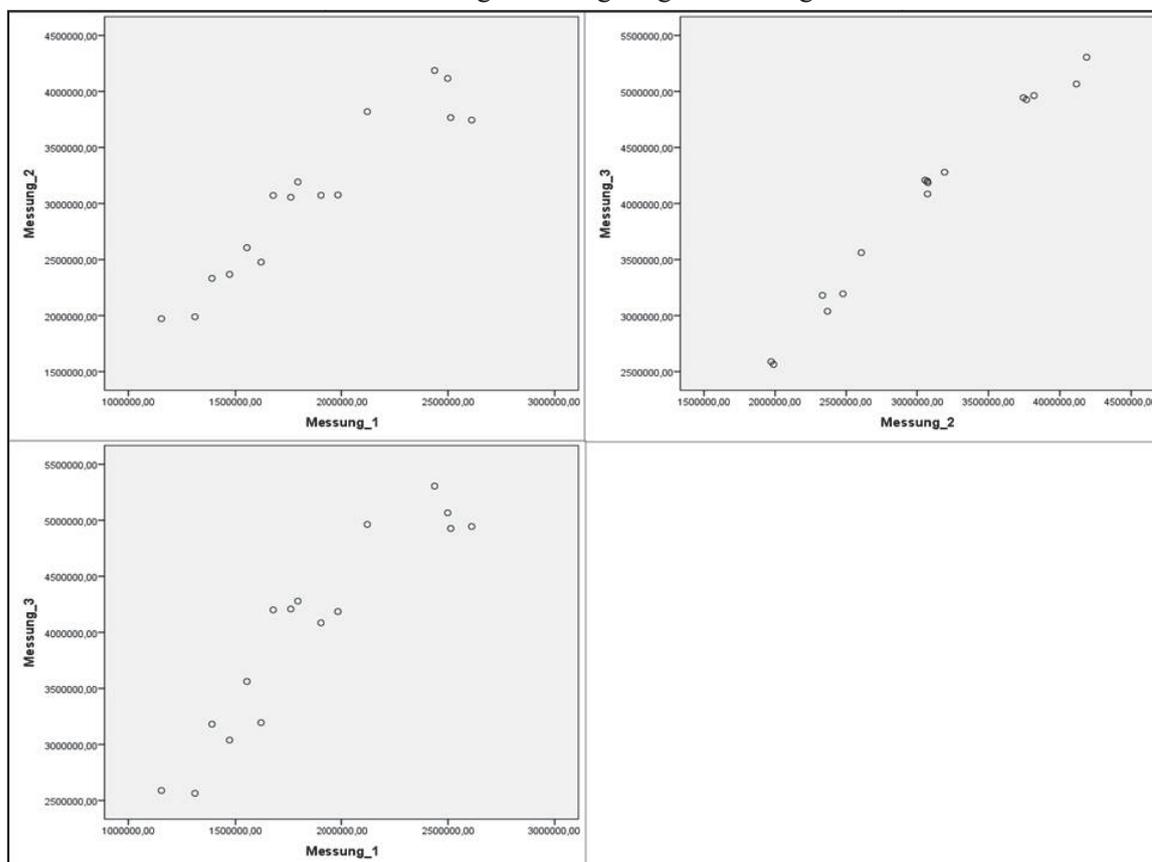


Abb. 13: **Streuungen, Residuen und Regressionsschätzer**

Aufgetragen sind die Residuen (x-Achse) gegen die Regressionsschätzer (y-Achse) einer Regressionsanalyse für Messungen 1h/2h, 1h/3h und 2h/3h. Die Linearität ist in allen Diagrammen deutlich zu sehen.

Quelle: IBM SPSS Statistics 20[®]

Es ist also zulässig anstatt einer Messung nach exakt 2h das arithmetische Mittel aus 1h und 3h zu bilden, da hier eine Korrelation von $r = 0,991$ ($B = 0,982$) berechnet werden kann.

Diese so aufbereiteten Daten auswertend, ergibt sich eine signifikante Zunahme der Proliferation binnen fünf Tagen für juvenile Fibroblasten pas >3 gegenüber Zellen niedriger Passagierung. Zudem verursacht ein Medienwechsel am 2., 3. und 4. Tag signifikante Zuwächse der Proliferation gegenüber einem einmaligen Medienwechsel. In der detaillierten Betrachtung der arithmetischen Mittelwerte der Messungen nach 1h und 3h entsteht so ein signifikanter Unterschied in der Proliferation juveniler Fibroblasten: Zellen in pas ≤3; MW 2. Tag wachsen signifikant langsamer als Zellen pas >3; MW 2. Tag bzw. pas >3; MW 2.-4. Tag (vgl. Abb. 14).

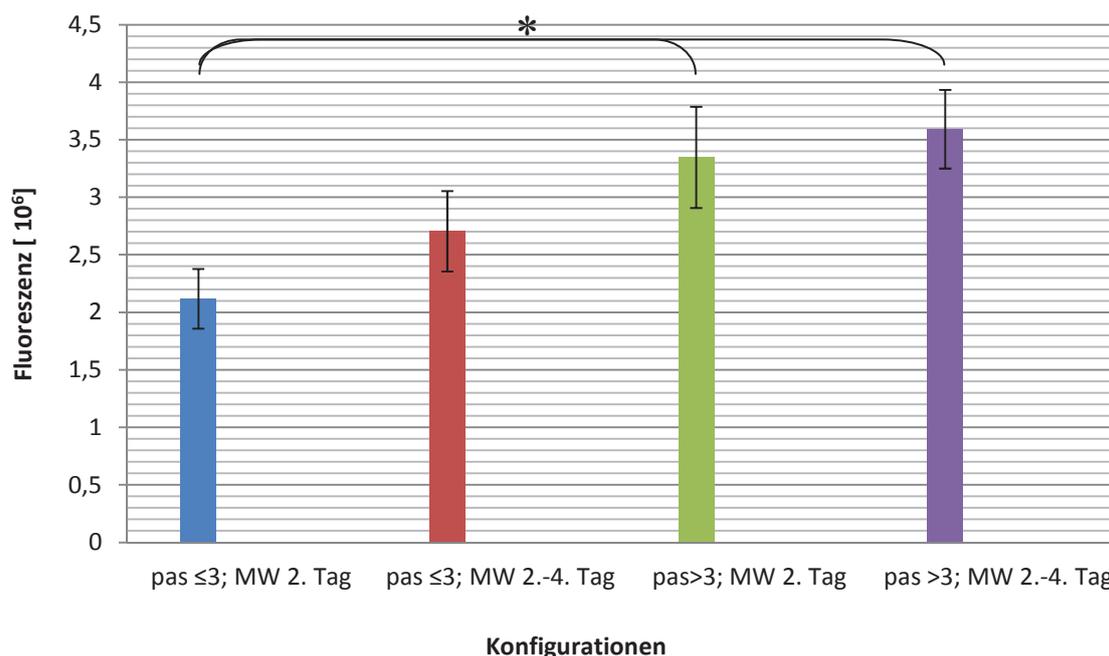


Abb. 14: **Proliferation in Abhängigkeit von Passage und Medienwechsel**

Die arithmetisch gemittelte Fluoreszenz nach ein- und dreistündiger Inkubation des *Cell Viability Assays* (y-Achse) verdeutlicht die signifikant reduzierte Proliferation der Konfiguration pas ≤3; MW 2. Tag (blaue Säule) gegenüber den Konfigurationen mit Fibroblasten höherer Passagen (grüne und violette Säule).

Somit muss im Zytokin-Versuch eine Auswertung für beide Passage-Klassen getrennt erfolgen. Als Referenz für diesen Versuch können pas ≤3; MW 2.-4. Tag und pas >3; MW 2.-4. Tag genutzt werden.

3.2.3. Zytokin-Versuch

Wie zuvor die Proliferationsreferenz (3.2.2) gezeigt hat, unterscheiden sich juvenile Fibroblasten früher und später Passagen (pas ≤3 und pas >3) bereits ohne Zugabe von Zytokinen signifikant. Somit können pas ≤3; MW 2.-4. Tag bzw. pas >3; MW 2.-4. Tag des vorhergehenden Experimentes als Referenz (Konzentration 0 IU/ml) für die relative Fluoreszenz verwendet.

Mit der Analyse des proliferativen Effektes von **IL-1β** beginnend, verdeutlicht Abb. 15 die parallele Steigerung der Fluoreszenz juveniler Fibroblasten pas ≤3 im Vergleich zu den Konzentrationen (90,99% bei 1 IU/ml auf 110,23% bei 1000 IU/ml; +21%). Es weicht keine Konfiguration (Passage x Zytokin x Konzentration) signifikant von der Referenz ab, weder in der Klasse pas ≤3 noch pas >3. Letztere entwickelt sich parabelförmig in Abhängigkeit von der Konzentration (MW: 104,71% →

115,11%) und übertrifft konzentrationsunabhängig signifikant das Wachstum juveniler Zellen in frühen Passagen.

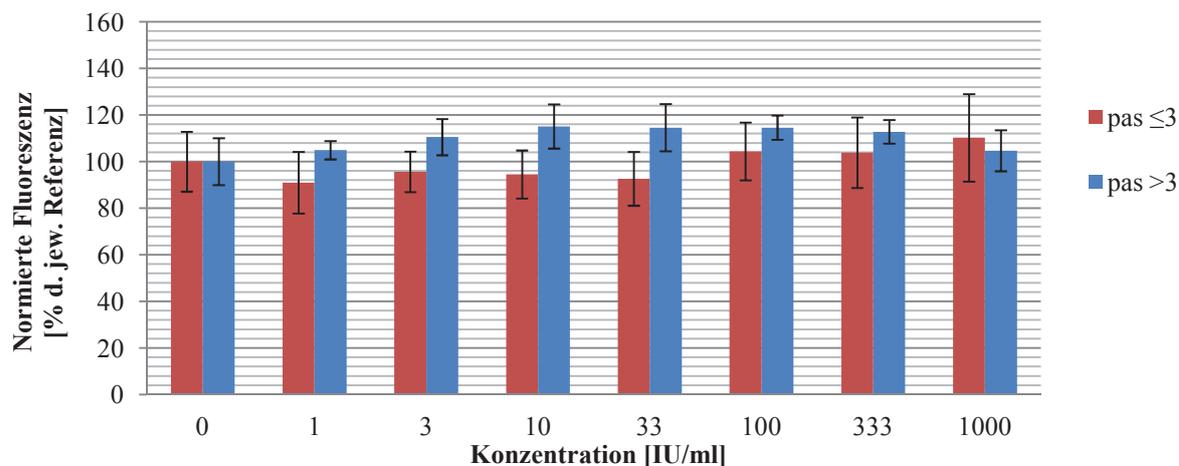


Abb. 15: **Effekt verschiedener IL-1 β -Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten**

Dieses Säulendiagramm zeigt für verschiedene Konzentrationen von IL-1 β (x-Achse) die relative Fluoreszenz (y-Achse) gegenüber der Passage-abhängigen Referenz (Konzentration 0 IU/ml).

Eine signifikante Abweichung einzelner Konfigurationen von der Referenz ist nicht zu belegen.

Wie aus Abb. 16 zu entnehmen ist, nehmen die Zelldichten juveniler Fibroblasten mit steigender **IL-6**-Konzentration zu: Zellen pas ≤ 3 beginnen mit 103,47% (1 IU/ml) der Referenz und erreichen maximal 124,82% bei 1000IU/ml. Fibroblasten pas > 3 entwickeln sich von 100,23% bei 1IU/ml zu 116,75% mit 33IU/ml. In Analogie zu den Effekten von IL-1 β weichen beide Klassen nicht signifikant von der jeweiligen Referenz ab, allerdings übersteigt das relative Wachstum von pas > 3 konzentrationsunabhängig jenes von pas ≤ 3 signifikant.

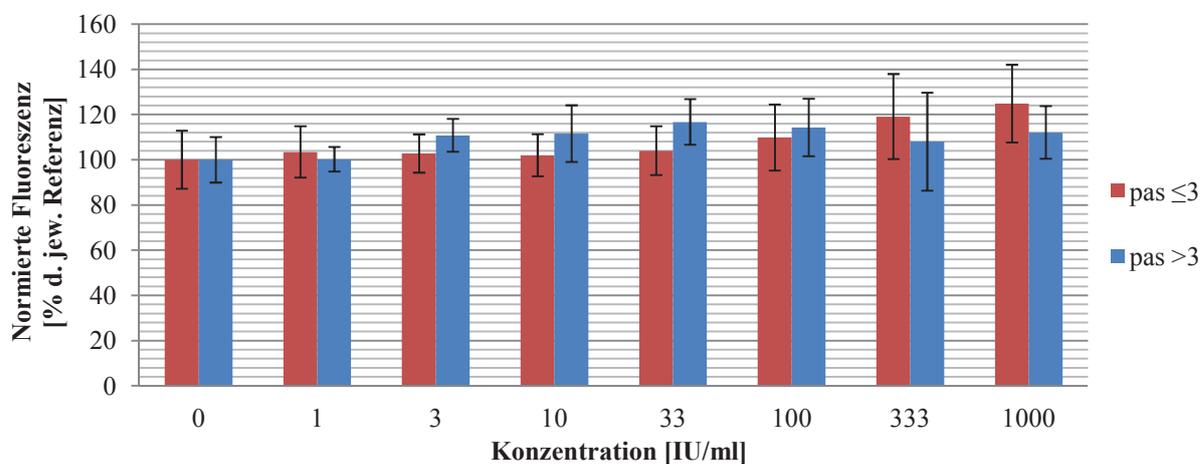


Abb. 16: **Effekt verschiedener IL-6-Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten**

Die gegenüber der Passage-spezifischen Referenz normierte Fluoreszenz (y-Achse) bei verschiedenen IL-8-Konzentrationen (x-Achse) wird in diesem Säulendiagramm für pas ≤ 3 und pas > 3 getrennt abgebildet.

Beide Klassen proliferieren auf 124,82% (1000IU/ml; pas ≤ 3 ; rote Linie) bzw. 116,75% (33IU/ml; pas > 3 ; blaue Linie). Unterscheiden sich beide auch nicht signifikant von deren Referenz, so weichen sie doch untereinander signifikant ab.

Die Effekte verschiedener **IL-8**-Konzentrationen (siehe Abb. 17) gleichen jenen der zuvor beschriebenen Zytokine: Weder pas ≤ 3 noch pas > 3 weichen signifikant von der Proliferationsreferenz ab, obwohl pas ≤ 3 bei 33 IU/ml eine maximale Abweichung von +22,97% und pas > 3 bei 100 IU/ml ein Maximum von +8,23% erreichen. Konzentrationsunabhängig proliferieren juvenile Fibroblasten pas ≤ 3 , relativ zur Referenz betrachtet, unter IL-8-Einfluss signifikant schneller als jene pas > 3 .

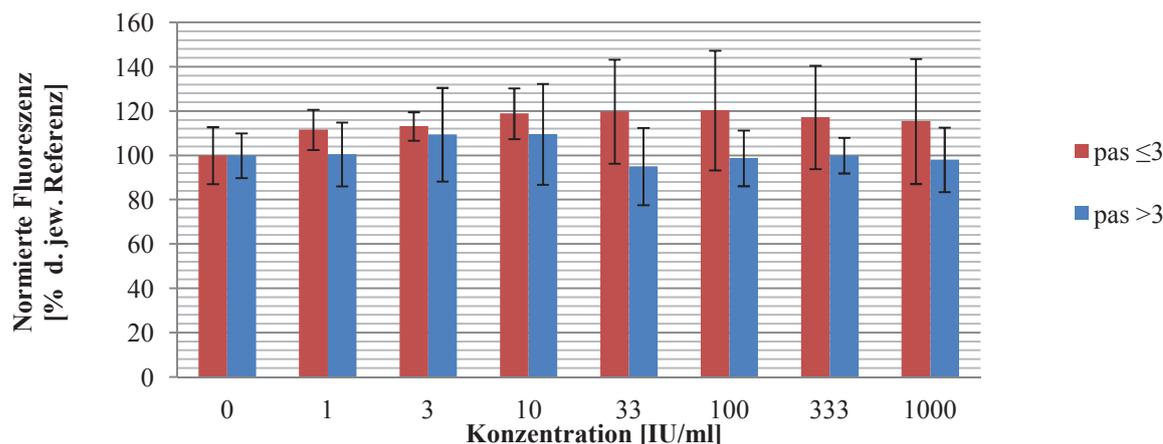


Abb. 17: **Effekt verschiedener IL-8-Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten**

Juvenile Fibroblasten in frühen Passagen ($\text{pas} \leq 3$, rote Säule) reagieren sensibler auf IL-8 als jene höherer Passagen ($\text{pas} > 3$; blaue Säule). Signifikante Unterschiede zur Referenz können für keine Konfiguration dokumentiert werden.

TNF- α induziert in juvenilen Zellen $\text{pas} \leq 3$ eine nicht signifikante Zunahme der Zelldichte um maximal +20,34% (100 IU/ml) bzw. +9,66% (10 IU/ml) bei $\text{pas} > 3$. Zudem signalisiert Abb. 18 den konzentrationsunabhängigen, aber signifikanten Abstand zwischen Zellen mit erhöhter TNF- α -Sensitivität ($\text{pas} \leq 3$) und jenen ohne erkennbare Sensitivität ($\text{pas} > 3$).

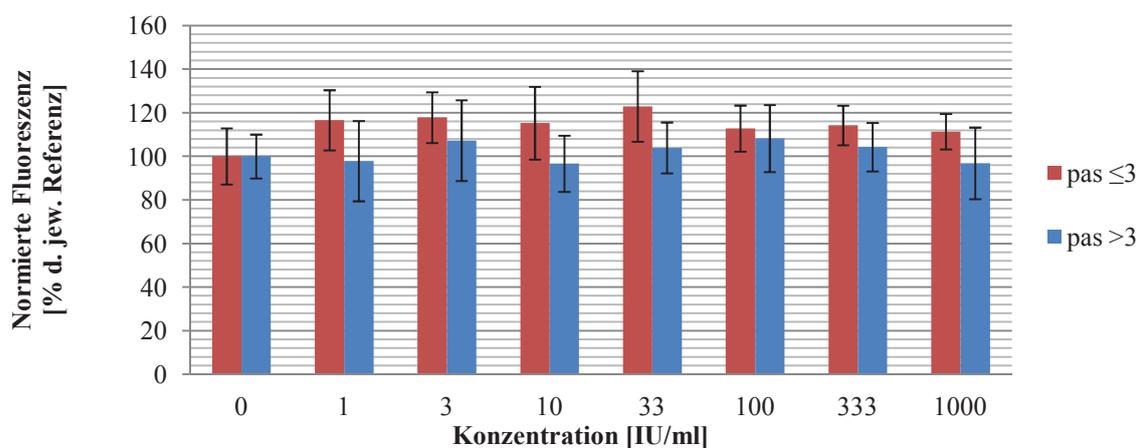


Abb. 18: **Effekte verschiedener TNF- α -Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten**

In diesem Säulendiagramm sind verschiedene TNF- α -Konzentrationen (x-Achse) gegen die normierte Fluoreszenz (y-Achse) von Fibroblasten in $\text{pas} \leq 3$ (rot) und $\text{pas} > 3$ (blau) aufgetragen.

Ein konzentrationsabhängiger Effekt von TNF- α kann nicht nachgewiesen werden.

IFN- γ hingegen reduziert bei einer Konzentration von 1000 IU/ml signifikant die normierte Fluoreszenz juveniler Fibroblasten $\text{pas} \leq 3$ um 24,79%. Auch niedrigere Dosierungen (siehe Abb. 19) proliferieren langsamer, allerdings nicht signifikant, während die Konfigurationen $\text{pas} > 3$ kaum von der Referenz abweichen (maximale Abweichung: +6,77% [1 IU/ml]). Dieses Zytokin bedingt jedoch ein signifikantes, konzentrationsunabhängiges Minderwachstum von $\text{pas} \leq 3$ gegenüber $\text{pas} > 3$.

TGF- β reduziert das Wachstum, im Gegensatz zu IFN- γ , nicht durch eine einzelne Konzentration signifikant, sondern konzentrationsunabhängig für juvenile Zellen bis Passage 3 (rote Säulen in Abb. 20) im Vergleich zur Referenz um bis zu 22,03% (333 IU/ml). Trotz der mit -22,79% (100 IU/ml) stärksten Amplitude kann für $\text{pas} > 3$ weder global noch konzentrationsabhängig eine signifikante

Veränderung zur Proliferationsreferenz belegt werden (siehe Abb. 20). Zugleich erzeugt TGF- β eine signifikantes, konzentrationsunabhängiges Minderwachstum von pas ≤ 3 im Vergleich zu pas >3 . In den bisher ausgewerteten Teilversuchen beschränkt sich die Sensitivität, definiert als signifikante Abweichung von der Proliferationsreferenz, auf Fibroblasten in Passage 3 oder früher und die Zytokine TGF- β sowie 1000 IU/ml IFN- γ . Außerdem illustrieren signifikante Abweichungen zwischen den relativen Fluoreszenz-Signalen der Passage-Klassen einen Passage-abhängigen Effekt.

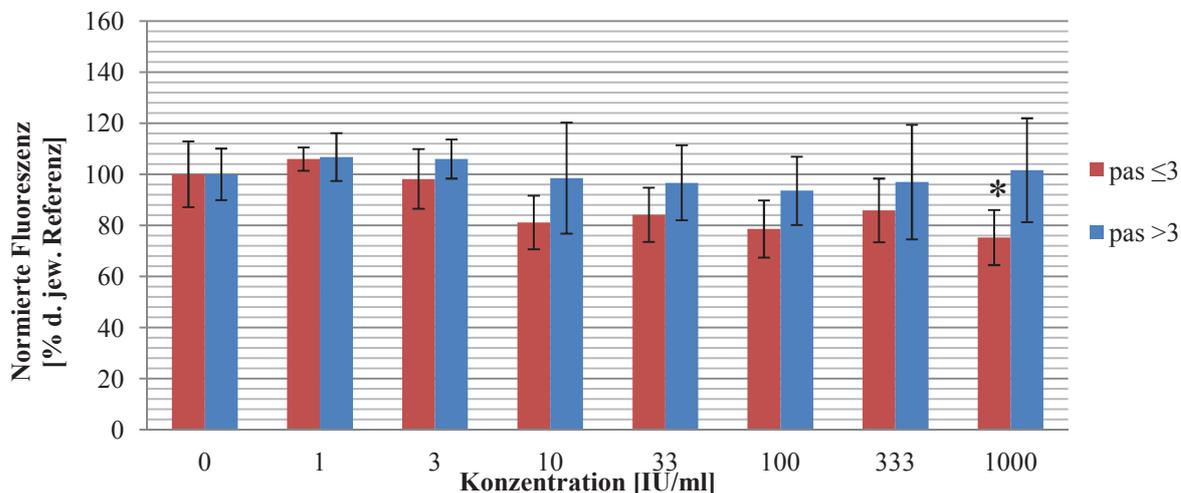


Abb. 19: Effekte verschiedener IFN- γ -Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten

Die normierte Fluoreszenz (y-Achse) verschiedener IFN- γ -Konzentrationen (x-Achse) weist bei 1000 IU/ml IFN- γ eine signifikante Reduktion von Fibroblasten pas ≤ 3 (*) auf.

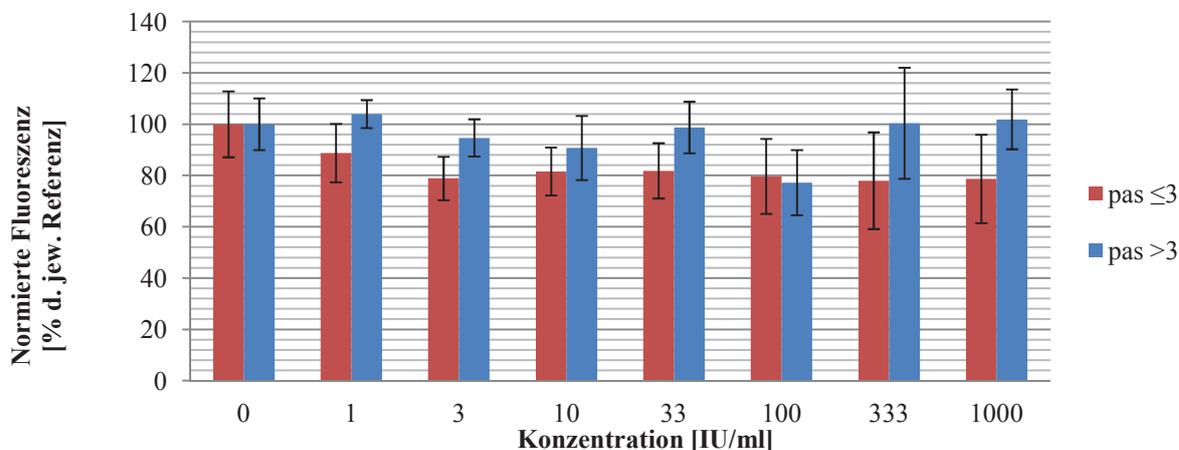


Abb. 20: Effekte verschiedener TGF- β -Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten

Obwohl TGF- β einen globalen, negativen Effekt auf die Proliferation (in Form der Fluoreszenz auf der y-Achse) von Zellen pas ≤ 3 hat, weichen die einzelnen Konzentrationen (x-Achse) nicht signifikant von der Referenz ab.

Obwohl die niedrigen und hohen FGF-2-Konzentrationen (1-100 IU/ml und 1000 IU/ml) für juvenile Fibroblasten pas ≤ 3 (in Abb. 21 rote Säulen) unter dem Kontrollniveau liegen (zwischen 82,81% und 94,52%) ist die Proliferation im mittleren Konzentrationsbereich (33-333 IU/ml) erhöht: 110,60% \rightarrow 119,36%. Während also für diese Klasse kein signifikanter Effekt gegenüber der Referenz zu detektieren ist, induziert FGF-2 konzentrationsunabhängig die Mitose von pas >3 -Populationen (blaue Säule in Abb. 21; von 1IU/ml: 116,84% bis 333IU/ml: 153,18%). Somit offenbart sich hier eine signifikant gesteigerte FGF-2-Sensitivität von pas >3 im Vergleich zu pas ≤ 3 .

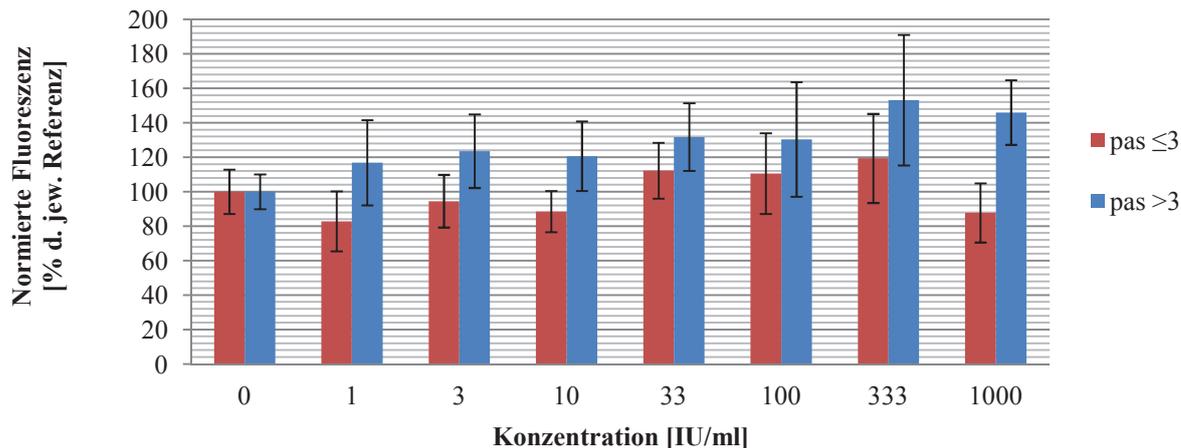


Abb. 21: Effekte verschiedener FGF-2-Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten

In Bezug auf einzelne FGF-2-Konzentrationen (x-Achse) existiert keine signifikante Abweichung zur Fluoreszenz (y-Achse) der Referenz.

FGF-2 regt allerdings konzentrationsunabhängig signifikant die Proliferation juveniler Fibroblasten pas >3 (blaue Säulen) im Vergleich zur normierten Referenz an, weshalb sich diese von weniger passagierten Populationen (pas ≤3; rote Säulen) ebenfalls signifikant abhebt.

NO verursacht auf Grund seiner hohen Schwankungsbreite von +15,16% (50 µmol/L) bis -7,48% (100 µmol/L) bei pas >3 keine signifikanten Abweichungen von der Referenz. Im Gegensatz dazu reagieren Zellen bis Passage 3 mit einer signifikanten Reduktion der Proliferation bei 5, 10, 20 und 100 µmol/L NO. Durch den Nachweis signifikanter Differenzen zwischen beiden Passage-Klassen, muss der zuvor beschriebene Effekt auf eine spezifische Sensitivität juveniler Fibroblasten pas ≤3 zurückzuführen sein:

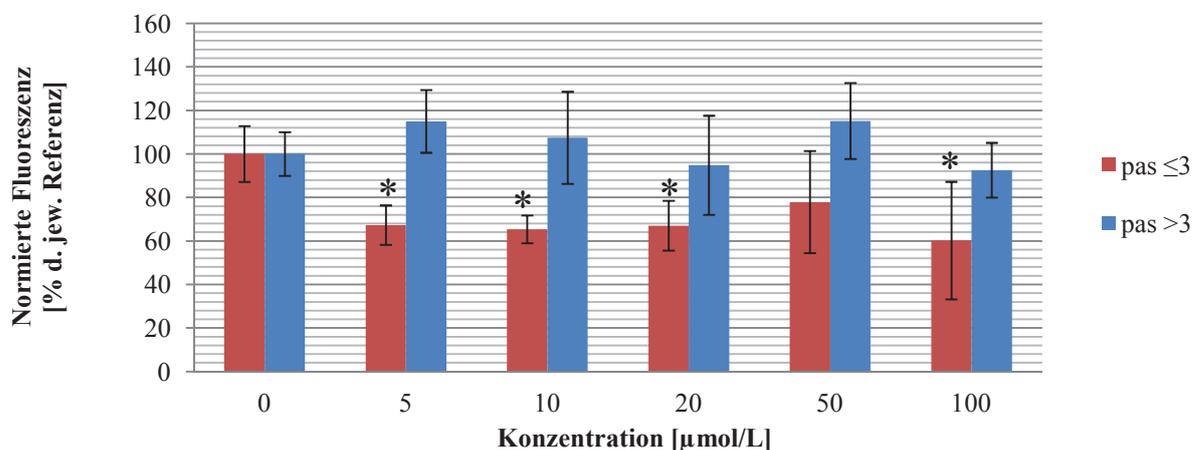


Abb. 22: Effekte verschiedener NO-Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten

Die Reduktion des Wachstums juveniler Fibroblasten pas ≤3 (rot) ist in den NO-Konzentrationen 5, 10, 20 und 100µM gegenüber der Referenz signifikant. Vergleichbare Effekte für pas >3 existieren nicht.

Durch getrennte Analyse beide Passage-Klassen, kann eine signifikante Zunahme der Proliferation für Fibroblasten in Passage 4-7 nach Inkubation mit FGF-2 gegenüber allen weiteren Zytokinen und der Referenz bei Fibroblasten in Passage 4-7 belegt werden. Dies wiederholt sich für Zellen bis Passage 3 jedoch nicht: Auffällig sind insbesondere die im Vergleich zu fast allen anderen Zytokinen sowie der Referenz signifikant reduzierten Proliferationsraten von mit TGF-β oder NO inkubierten Fibroblasten. Anhang 5 und Anhang 6 zeigen detailliert signifikante Abweichungen auf.

3.3. Osteogene Transdifferenzierung und deren Optimierung

Auf Grundlage der im Abschnitt Osteogene Transdifferenzierung (2.9) definierten Kriterien soll nun die Auswertung der Transdifferenzierungsreferenz und deren Modifikationen zunächst gegenüber der jeweiligen Kontrolle erfolgen. In einem weiteren Schritt lassen sich dann die Versuchsanordnungen bezüglich der quantifizierten Messdaten vergleichen.

3.3.1. Transdifferenzierungsreferenz

Mit der Analyse der Gesamtproteinkonzentration beginnend, präsentiert sich der zeitliche Verlauf der Kontrolle als signifikante Progression: Die Entwicklung von $10,60\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (erste Woche) auf $15,53\mu\text{g}/\text{cm}^2$ am letzten Tag ist mit signifikanten Steigerungen in allen drei Messungen vergesellschaftet. Analog entwickeln sich die Mittelwerte des Versuchsmodus, sodass die lineare Progression von $14,88\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach einer Woche auf maximal $32,96\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nach drei Wochen mit signifikanten Zuwächsen zu allen Zeitpunkten korrespondiert. Nach einer und drei Wochen existieren zudem signifikant erhöhte Proteinkonzentrationen im Versuchsmodus gegenüber der Kontrolle. Eine detaillierte Darstellung der Deskriptivstatistik aller Nachweisverfahren liefert Anhang 7.

Die Betrachtung der absoluten und zur Gesamtproteinkonzentration relativen Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase offenbart zunächst für die Kontrolle eine Progression von $+64,7\%$ ($135,72\mu\text{IU} \rightarrow 223,59\mu\text{IU}$) der absoluten Enzymaktivität binnen drei Wochen. Allerdings nimmt die relative Enzymaktivität im gleichen Zeitraum lediglich um $12,1\%$ (von $12,79\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ nach einer Woche auf $14,34\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ nach drei Wochen) zu. Signifikante Differenzen können jedoch nicht belegt werden. Die Pearson-Korrelationen beider Parameter (absolut vs. relativ) zum identischen Zeitpunkt deuten trotzdem hohe Zusammenhänge an: $r_{\text{Woche 1}} = 0,935$; $r_{\text{Woche 2}} = 0,838$; $r_{\text{Woche 3}} = 0,989$. In den zur Transdifferenzierung intendierten Fibroblasten steigt die absolute AP-Aktivität signifikant von Woche zu Woche von $190,37\mu\text{IU}$ (Woche 1) auf maximal $342,14\mu\text{IU}$ (Woche 3; siehe Abb. 23) an. Im Gegensatz zur Kontrolle entwickelt sich die relative Enzymaktivität hier, wenn auch nicht signifikant, regredient, von $12,79\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ (erste Messung) zu $10,40\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ (letzte Messung), wodurch ebenfalls die Korrelationen zwischen absoluten und relativen Werten mit zunehmender Versuchsdauer sinken: $r_{\text{Woche 1}} = 0,985$; $r_{\text{Woche 2}} = 0,657$; $r_{\text{Woche 3}} = 0,453$. Wie Abb. 23 illustriert, übertrifft die absolute Enzymaktivität der mit Dexamethason-Medium inkubierten Zellen (orange dargestellt) zu allen drei Zeitpunkten jene der Kontrolle (grün) signifikant. Unter Berücksichtigung der relativen Messwerte kehrt sich dieses Bild um und die Kontrolle nach dreiwöchiger Inkubation übertrifft jene des Versuchsmodus signifikant.

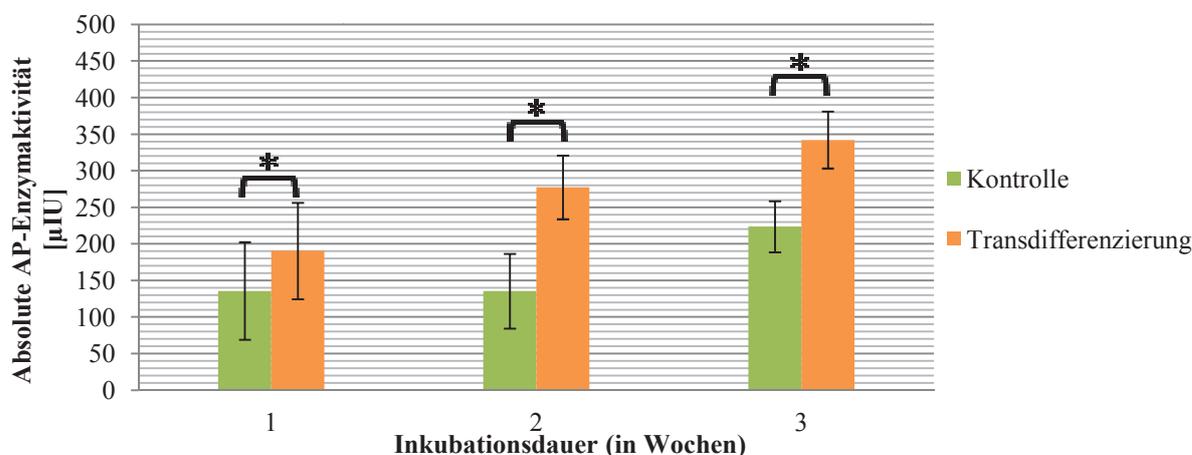


Abb. 23: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus der Transdifferenzierungsreferenz

Die absolute AP-Enzymaktivität (y-Achse) des Versuchsmodus (orange) übertrifft zu allen Zeitpunkten (x-Achse) jene der grün dargestellten Kontrolle signifikant (*).

Mit dem Verweis auf die Normierung der in Doppelbestimmung gemessenen ARS-Extinktionen ist eine relevante Entwicklung nicht zu erwarten, wengleich Standardabweichungen möglich sind. So konzentriert sich die exponentielle Zunahme des absoluten Alizarin Rot Farbstoffes (siehe Abb. 24) für den Versuchsmodus auf ein signifikantes Wachstum von 0,42 μmol (erste Messung) auf 9,48 μmol (dritte Messung). Dieses Wachstum binnen 14 Tagen um den Faktor 22,6, kulminiert in der signifikanten Differenz zur Kontrolle in der dritten Woche sowohl in Bezug zur absoluten wie auch relativen ARS-Menge.

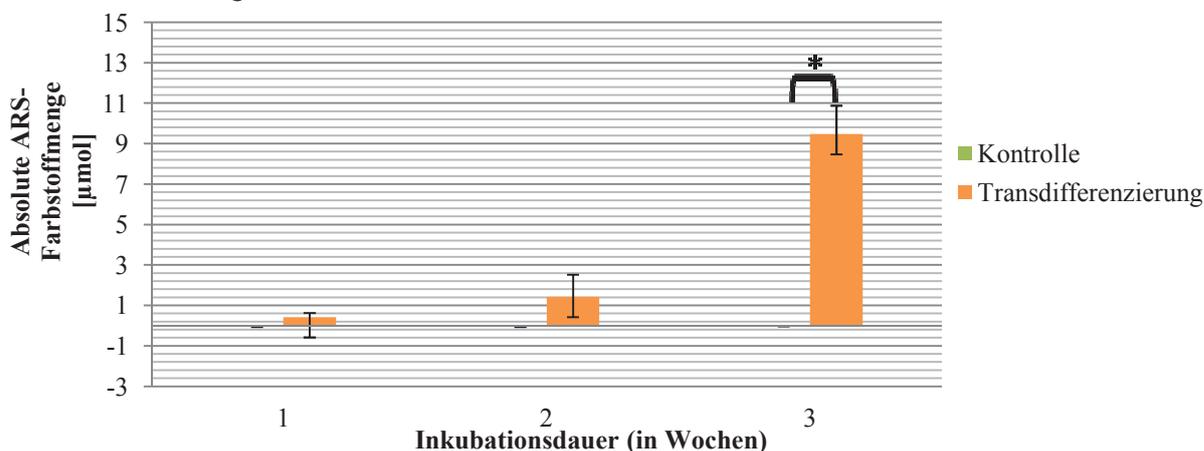


Abb. 24: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus der Transdifferenzierungsreferenz

In der dritten Woche (x-Achse) steigt die absolute Alizarin Rot Menge (y-Achse) auf, im Vergleich zur normierten Kontrolle (grün), signifikante 9,48 μmol (*; orange Säule).

Auch makroskopisch lässt sich erst nach drei Wochen eine entsprechende Färbung erkennen.

Als letzten Parameter wird die osteogene Proteinexpression in Form des RunX 2/GAPDH-Quotient analysiert. Wie in Abb. 25 grün dargestellt, variieren die Mittelwerte der Kontrollen zwischen 0,53 und 0,59 im nicht-signifikanten Bereich. Der Versuchsmodus (orange Säulen in Abb. 25) zum Vergleich beschreibt ein Maximum in der zweiten Woche mit 1,12 und einer relativen Signalstärke von +25% gegenüber den anderen Messungen.

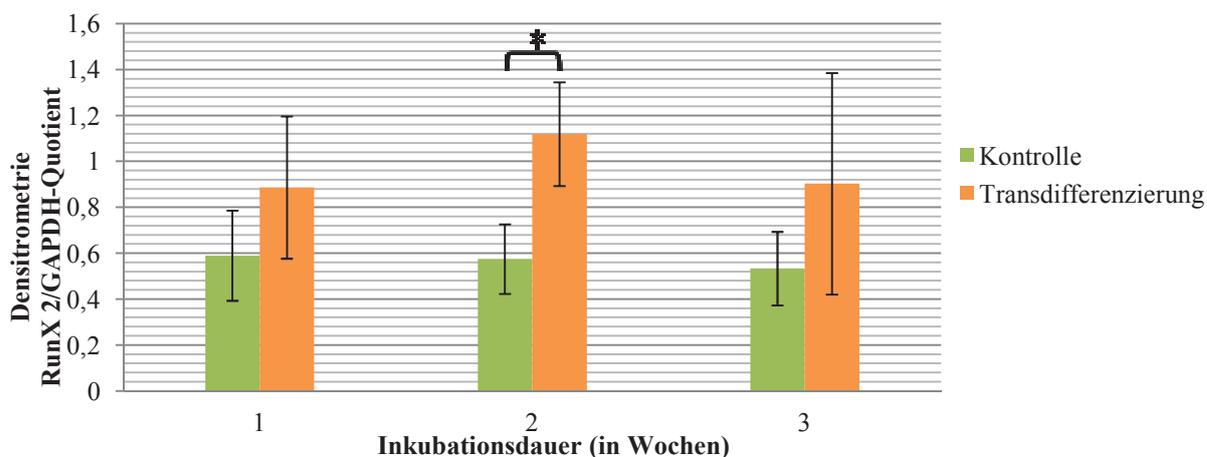


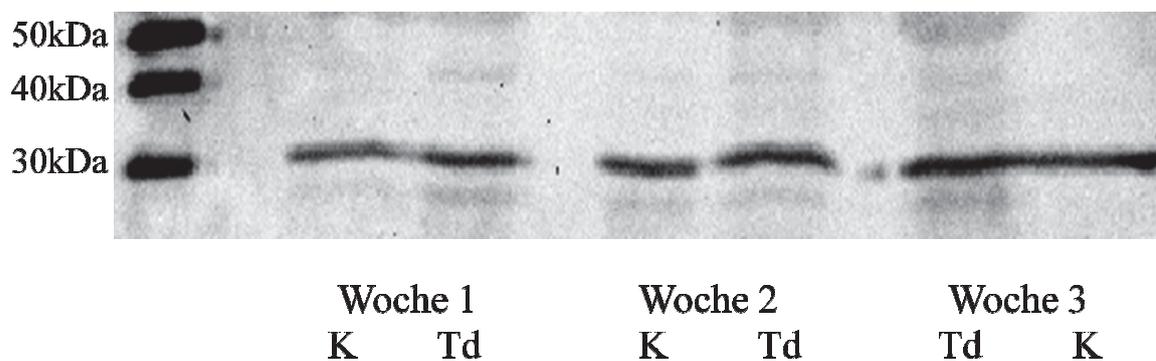
Abb. 25: Vergleich der RunX 2/GAPDH-Quotienten von Kontroll- und Versuchsmodus der Transdifferenzierungsreferenz

In der zweiten Woche (x-Achse) vollzieht sich eine signifikante (*) relative Zunahme der RunX 2-Expression (y-Achse) der zu transdifferenzierenden Fibroblasten (orange) gegenüber der Kontrolle (grün) auf 1,12 zu 0,57.

Signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten können für die Inkubation mit Dexamethason-Medium jedoch nicht belegt werden. In der zweiten Woche exprimiert die Transdifferenzierungskonfiguration im Verhältnis zur GAPDH signifikant mehr RunX 2 als die Kontrollkonfiguration (vgl. Abb. 26).

Immunoblotting

GAPDH



RunX2

Abb. 26: **Western Blotting Transdifferenzierungsreferenz**

Die nach Proteingröße beschrifteten (y-Achse) *Western Blots* wurden nach Messzeitpunkt und Modus (x-Achse) charakterisiert.

GAPDH-Banden (*Blot* oben; 30 kDa) sind sowohl für die Kontrollen (K) wie auch die Transdifferenzierung (Td) nachweisbar. RunX 2 (unten) kann insbesondere in der zweiten und dritten Woche des Versuchsmodus bei 40-50 kDa detektiert werden.

Damit können alle Kriterien erfüllt werden.

3.3.2. Osteogene Transdifferenzierung und *in vitro*-Seneszenz

Der nicht signifikante Verlauf der Kontroll-Mittelwerte bezüglich der Gesamtproteinkonzentration illustriert eine moderate Zunahme von 11,7% (von 14,23 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [Woche 1] auf 15,90 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [Woche 3]). Unter Verwendung von Dexamethason-Medium steigert sich die Proteinkonzentration signifikant von 19,57 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Woche 1) bzw. 25,71 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Woche 2) auf 36,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Woche 3). Im direkten Vergleich übertrifft der Versuchsmodus in den Wochen 1 und 3 signifikant die Kontrolle. Eine detaillierte Aufstellung der Deskriptivstatistik findet sich unter Anhang 8.

Die absolute AP-Enzymaktivität der Kontrolle reduziert sich im Verlauf des Experimentes ohne Signifikanz von 171,35 μIU (Woche 1) auf 132,68 μIU (Woche 3). Dadurch wird zugleich die nicht signifikante Reduktion der relativen Enzymaktivität zwischen erster (12,48 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) und dritter Woche (8,56 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) nachvollziehbar. Trotz der absolut steigenden Enzymaktivität im Versuchsmodus (203,66 μIU (Woche 1) \rightarrow 276,25 μIU (Woche 3)), offenbaren sich weder hier noch unter den relativen AP-Aktivitäten (10,38 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ (Woche 1) \rightarrow 7,56 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ (Woche 3)) signifikante Entwicklungen. Lediglich in der dritten Woche differieren beide Modi signifikant zu Gunsten der mit Dexamethason-Medium inkubierten Zellen.

Auf Grund der Normierung der Kontrollen weicht die dritte Messung der Transdifferenzierung bezüglich der absoluten ARS-Farbstoffmenge (1,73 μmol) signifikant von der Kontrolle ab (siehe Abb. 28), überschreitet aber eine relative ARS-Menge von 0,05 $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ nicht.

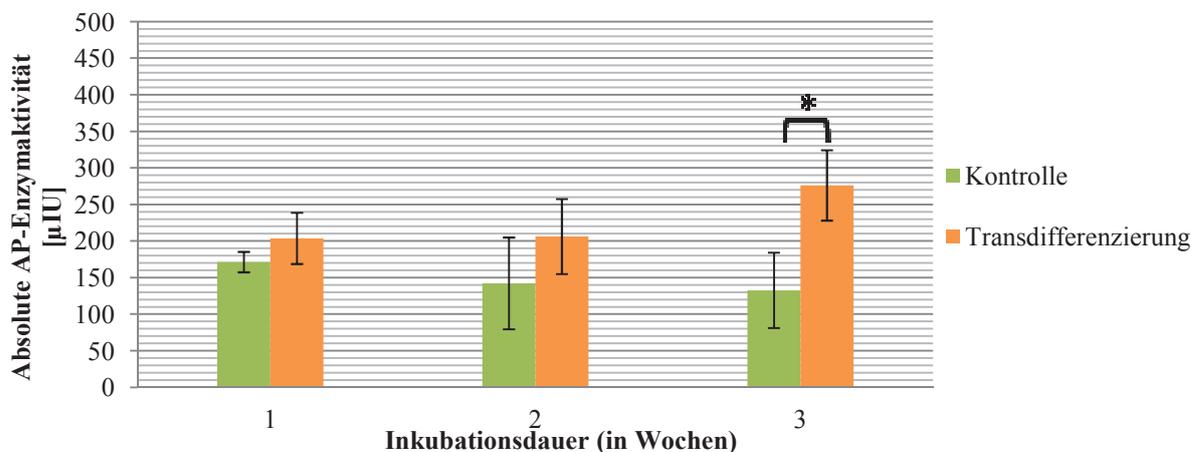


Abb. 27: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus zur Abhängigkeit von der *in vitro*-Seneszenz

Ein signifikanter Anstieg der auf der y-Achse dargestellten, absoluten AP-Enzymaktivität im Versuchsmodus (Transdifferenzierung, orange) zur Kontrolle (grün) beschränkt sich auf die Messung in Woche 3 (x-Achse; *).

Allerdings ist es nicht möglich eine eindeutig positive Färbung zu dokumentieren, weshalb die Differenzierung kulturseneszenter Fibroblasten als insuffizient zur Osteogenese gewertet wird. Aus diesem Grund wurde der *Western Blot* nur exemplarisch durchgeführt, welcher zudem keine markante RunX 2-Detektion erlaubte.

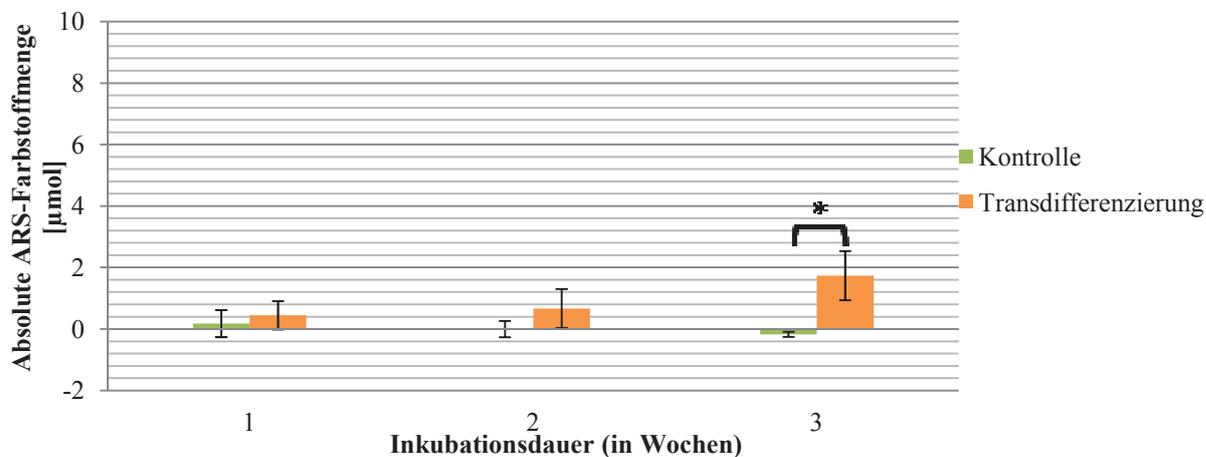


Abb. 28: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus zur Abhängigkeit von der *in vitro*-Seneszenz

In der dritten Woche nimmt die absolute ARS-Menge (orange Säule) signifikant im Vergleich zur normierten Kontrolle (grüne Säule) auf 1,73 μmol zu.

Somit kann nicht von einer vollständigen osteogenen Transdifferenzierung ausgegangen werden.

3.3.3. Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3

Die Gesamtproteinkonzentration analysierend, entwickelt sich dieser unter Kontrollbedingungen ebenfalls nur moderat und nicht signifikant: +13,3% (9,87 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Woche 1) \rightarrow 11,18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Woche 3)). Allerdings lässt sich ein signifikanter, linearer Zuwachs der Gesamtproteinkonzentration von +95,5%, begründet in der Entwicklung von 13,68 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf 26,75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zwischen der ersten und

dritten Woche, identifizieren. Ab der zweiten Woche übertreffen zudem die Versuchsbedingungen signifikant jene der Kontrolle. Deskriptive statistische Daten finden sich in Anhang 9.

Eine negative Entwicklung der absoluten und relativen AP-Enzymaktivität der Kontrolle (absolut: 136,08 μIU (Woche 1) auf 86,98 μIU (Woche 3; -36,1%); relativ: 13,83 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ auf 8,31 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) verläuft nicht signifikant. Unter Dexamethason-Einfluss reduziert sich jedoch die relative AP-Aktivität hingegen signifikant von 11,73 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ auf 6,84 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ innerhalb von drei Wochen. Die absolute Enzymaktivität, in Abb. 29 dargestellt, offenbart zwar einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg von 159,53 μIU (Woche 1) auf maximal 181,53 μIU (Woche 2; +13,8%). Zudem unterscheiden sich Kontroll- und Versuchsmodus weder in Bezug auf die absoluten noch auf die relativen Enzymaktivitäten signifikant.

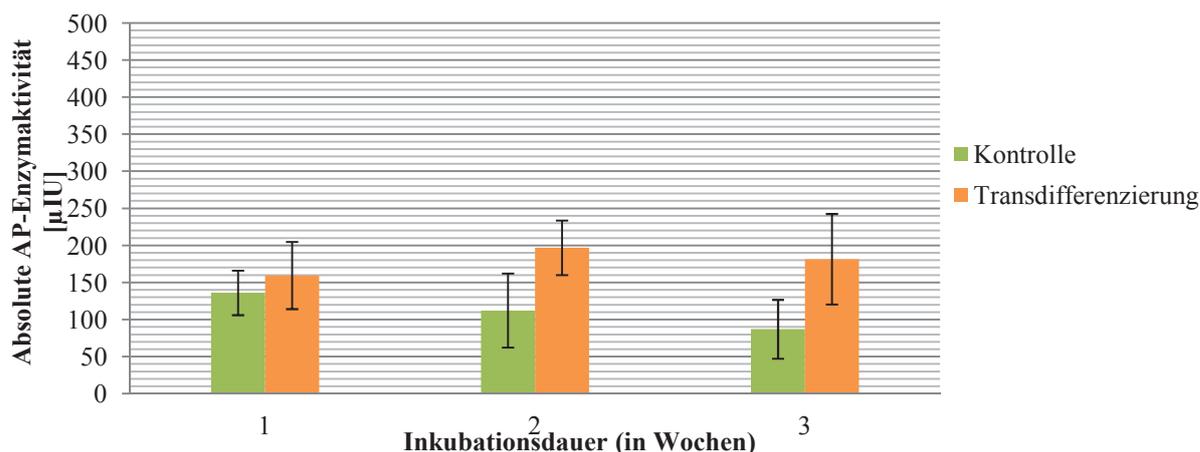


Abb. 29: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus adulter Spender $\text{pas} \leq 3$

Bezüglich der absoluten AP-Enzymaktivität (y-Achse) differieren die Messungen (x-Achse; Kontrolle (grün) und Transdifferenzierung (orange)) nicht signifikant untereinander.

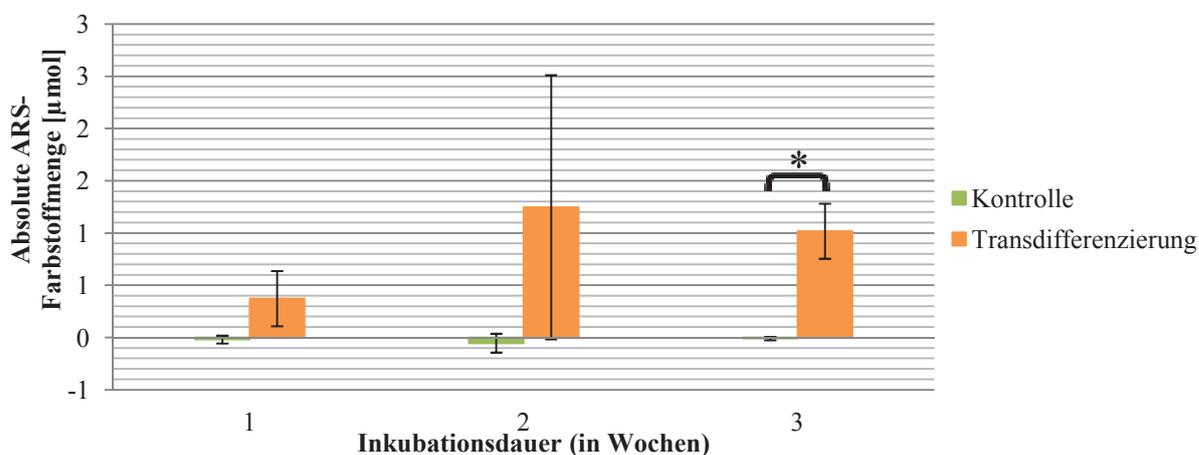


Abb. 30: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus adulter Spender $\text{pas} \leq 3$

In der dritten Woche übertreffen 1,02 μmol Alizarin Rot in mit Dexamethason-Medium inkubierten Kulturen (orange) signifikant die Kontrolle (grün; *).

In der ARS-Quantifizierung dienen die Kontrollen als Normierung, sodass eine signifikante Abweichung untereinander auszuschließen ist (grüne Säulen in Abb. 30). Zu Beginn des Versuchs bindet der Versuchsmodus 0,37 μmol (orange Säule in Abb. 30) und steigt dann signifikant auf 1,02 μmol an. Die relative ARS-Farbstoffmenge persistiert jedoch in allen Messungen unter $0,1 \text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ (siehe Anhang 9), wobei signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsmodus in der ersten und letzten Woche (hier auch für die absolute Farbstoffmenge, siehe Abb. 30) nachzuweisen sind.

Auf Grund der fehlenden Signifikanz in der absoluten AP-Enzymaktivität sowie der mikroskopisch nicht zu bestätigenden ARS-Färbung (beispielhaft in Anhang 10 gezeigt) wird eine osteogene Transdifferenzierung ausgeschlossen. Der *Western Blot* wurde nur exemplarisch durchgeführt.

3.3.4. Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas >3

Die Gesamtproteinkonzentration der Kontrolle nimmt von der ersten ($9,96\mu\text{g}/\text{cm}^2$) zur dritten Woche ($12,31\mu\text{g}/\text{cm}^2$) signifikant zu. Im gleichen Zeitraum induziert das „Dexamethason-Medium“ eine Progression von 99% (von $10,29\mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf maximal $20,48\mu\text{g}/\text{cm}^2$), welche jedoch auf Grund der hohen Standardabweichung nicht signifikant verläuft. Eine detaillierte, deskriptive Statistik findet sich in Anhang 11.

Absolute und relative Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase beschreiben unter Kontrollbedingungen keine signifikante Zunahme (absolut: $116,36\ \mu\text{IU}$ (Woche 1) \rightarrow $162,43\ \mu\text{IU}$ (Woche 3); relativ: $10,24\ \text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ (Woche 1) \rightarrow $14,47\ \text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ (Woche 2)). Während unter Versuchsbedingungen die absolute AP-Enzymaktivität signifikant von $134,46\mu\text{IU}$ (Woche 1) auf $279,48\mu\text{IU}$ (Woche 3) steigt, ist ein derartiger Effekt für den relativierten Parameter ($12,97\ \text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ \rightarrow $16,93\ \text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) im identischen Zeitraum nicht zu belegen. Diesen Antagonismus imponiert auch in den sich negativierenden Pearson-Korrelationen zwischen absoluten und relativen Messwerten ($r_{\text{Woche 1}} = 0,670$; $r_{\text{Woche 2}} = -0,658$ und $r_{\text{Woche 3}} = -0,874$). Zwischen den Modi existieren keine signifikanten Unterschiede:

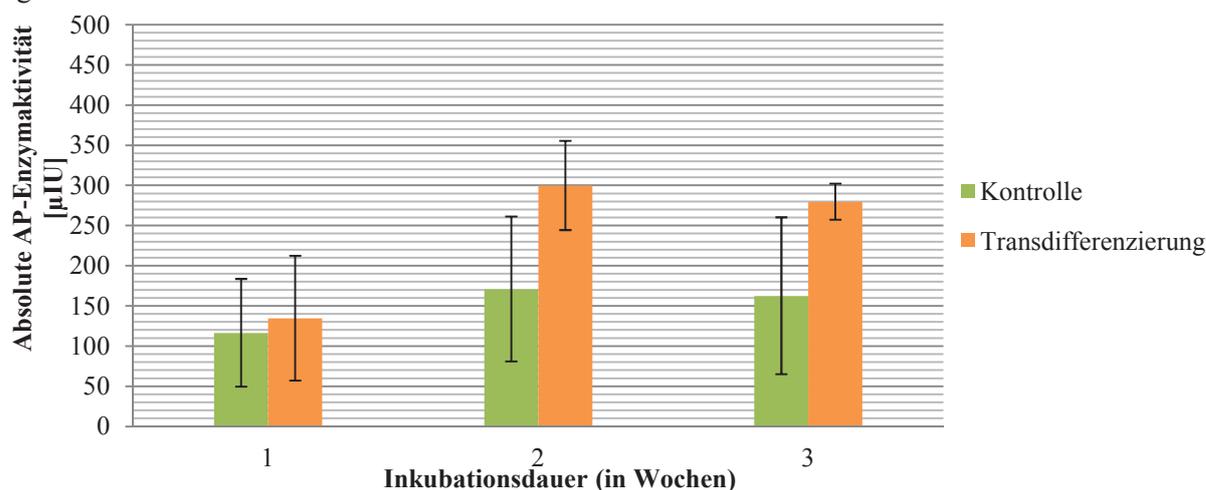


Abb. 31: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus adulter Spender pas >3

In Bezug auf die AP-Aktivität (y-Achse) ergibt sich im Verlauf (x-Achse) kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle (grün) und Transdifferenzierung (orange).

Gegenüber der normierten Kontrolle entwickelt sich in keiner der drei Wochen eine signifikante absolute ARS-Farbstoffmenge ($0,35\ \mu\text{mol}$ \rightarrow $1,39\ \mu\text{mol}$) durch Inkubation mit Dexamethason-Medium (siehe Abb. 32). Auch die relative ARS-Menge mit einem Maximum von $0,13\ \text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ ist ebenso wenig signifikant wie die Entwicklungen innerhalb der Versuchsbedingung. Es ist allerdings anzumerken, dass einer der vier Spender ab der zweiten Woche deutlich, mikroskopisch sichtbar positiv mit Alizarin Rot gefärbt ist. Auf Grund der fehlenden Signifikanz des AP Assay und der ARS-Quantifizierung kann nicht von einer osteogenen Transdifferenzierung ausgegangen werden. Der *Western Blot* wurde aus diesem Grund lediglich exemplarisch ausgeführt.

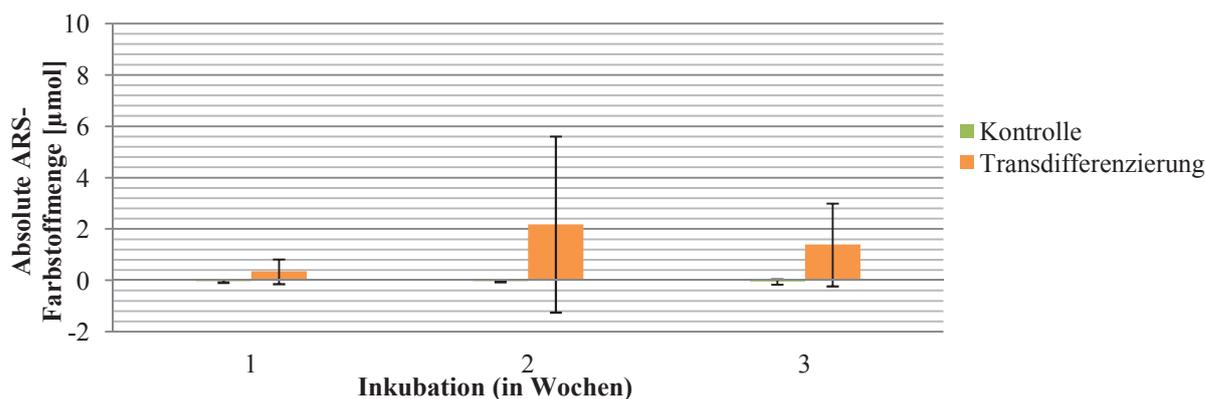


Abb. 32: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus adulter Spender pas >3

Eine signifikante Entwicklung unter Versuchsbedingungen (orange) gegenüber der normierten Kontrolle (grün) ist nicht nachzuweisen.

3.3.5. Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium

Die deskriptive Auswertung wird mit der Betrachtung der Gesamtproteinkonzentration eingeleitet, wobei der moderate Anstieg der Mittelwerte der Kontrolle von $9,58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zur ersten Messung auf $12,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ zur letzten Messung auffällt. Weder mit Blick auf die Modi getrennt, noch in Kontrast von Kontroll- und Versuchsgruppe (von $9,51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf $16,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) zeigen sich signifikante Abweichungen. Die vollständige Deskriptivstatistik ist in Anhang 12 aufgelistet.

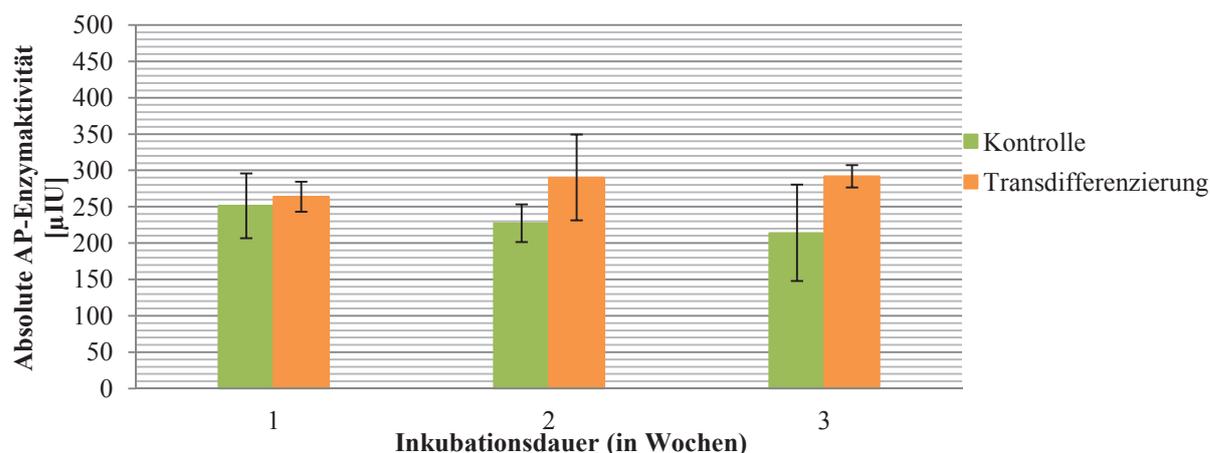


Abb. 33: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus mit Calcitriol-Medium

Signifikante Entwicklungen und Differenzen zwischen Kontrolle (grün) und Versuchsmodus (orange) der Enzymaktivität (y-Achse) sind in diesem Säulendiagramm für keinen Inkubationszeitraum (x-Achse) zu belegen.

Entwickelt sich die absolute AP-Enzymaktivität des Kontrollmodus im zeitlichen Verlauf regredient (von $251,28 \mu\text{IU}$ (Woche 1) auf $213,94 \mu\text{IU}$ (Woche 3)), so illustriert Abb. 33 eine leichte Zunahme unter Versuchsbedingungen (1. Woche: $263,63 \mu\text{IU}$; 2. Woche: $290,20 \mu\text{IU}$). Im Vergleich dazu reduzieren sich die relativen Enzymaktivitäten sowohl in der Kontrolle ($26,83 \text{ IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g} \rightarrow 17,17 \text{ IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) als auch der Transdifferenzierung ($27,81 \text{ IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g} \rightarrow 18,4 \text{ IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) zwischen der ersten und letzten Woche. Signifikante Unterschiede können keine aufgezeigt werden.

Sowohl die absolute wie auch relative ARS-Farbstoffmenge des Versuchsmodus (orange Säulen in Abb. 34) im Vergleich mit der Kontrolle (grüne Säulen in Abb. 34) entwickeln sich nicht signifikant. Dies bestätigen auch die nicht anzufärbenden Kulturen.

Auf Basis der fehlenden Signifikanzen bezüglich Aktivität der alkalischen Phosphatase und unzureichender Alizarin Rot Färbung kann eine osteogene Transdifferenzierung ausgeschlossen werden, weshalb auf den Nachweis der RunX-Expression verzichtet wurde.

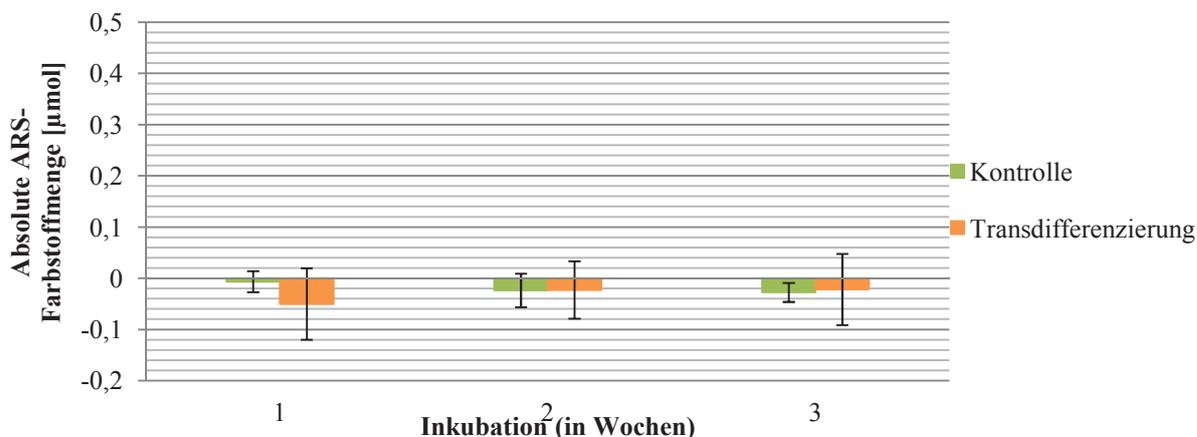


Abb. 34: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus mit Calcitriol-Medium

Zu keinem Zeitpunkt unterscheiden sich die Kontrolle (grün) und Versuchsmodus (orange) signifikant. Letzterer entwickelt sich zudem geringfügig negativ im Vergleich zur normierten Kontrolle.

3.3.6. Osteogene Transdifferenzierung und Dexamethason-Konzentrationen

Mit dem deskriptiven Anteil der Auswertung beginnend, wird ersichtlich, dass keine Konfiguration (Inkubationsdauer*Konzentration) eine mikroskopisch positive Färbung erreicht haben kann, da die absoluten Farbstoffmengen zu niedrig sind (vgl. Abb. 35). Sie schwanken zwischen 0,1 µmol und 1,34 µmol ohne ein erkennbares Muster zu implizieren oder sich signifikant von der Kontrolle abzusetzen (siehe Anhang 13).

Kontrolle und Konfigurationen korrelieren nach Pearson nach einem bestimmten Muster miteinander: In den niedrigen (1 – 75 nM) und den hohen Dosierungen (500 – 1000 nM) werden mittlere Korrelationen beobachtet, im Gegensatz zu 100 nM und 250 nM ($r_{\text{Kontrolle}} = -0,030 - 0,003$). Signifikante Entwicklungen von der zweiten zur dritten Woche können nicht belegt werden. Eine osteogene Kalzifizierung findet also bei diesen juvenilen Fibroblasten pas >3 nicht statt.

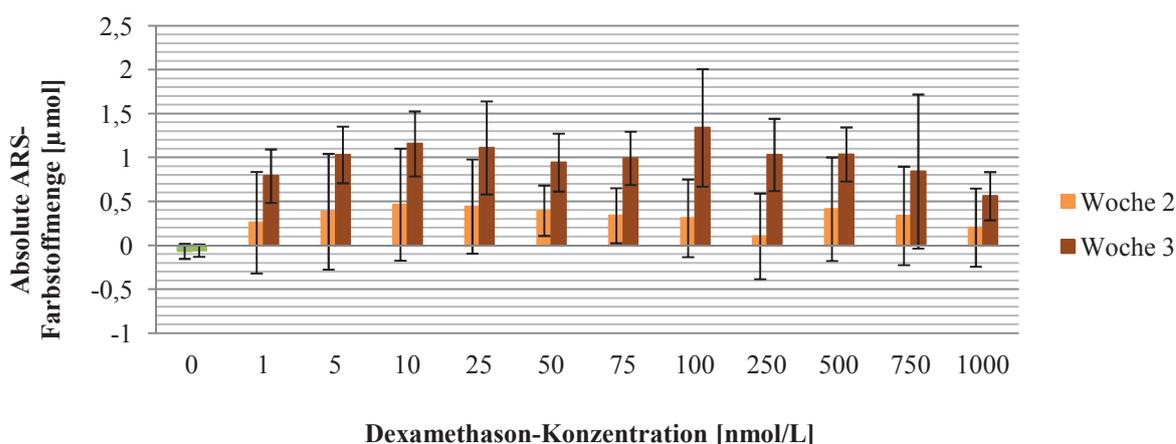


Abb. 35: Absolute ARS-Farbstoffmenge in Abhängigkeit der Dexamethason-Konzentration

Der Anstieg der ARS-Farbstoffmenge (y-Achse) in der zweiten (orange) und dritten Woche (braun) gegenüber der Kontrolle (Konzentration 0 nmol/L) verhält sich moderat und über alle Konzentrationen (x-Achse) nicht signifikant.

3.3.7. Osteogene Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen

Die Progression der Proteinkonzentration in Kontroll- (von 8,96 µg/cm² nach einer Woche auf 9,40 µg/cm² nach drei Wochen) und Versuchsgruppe (14,31 µg/cm² zu Versuchsbeginn und 29,55 µg/cm²

am Versuchsende) ist signifikant ausgeprägt. In Anhang 14 finden sich alle deskriptiven Daten in Tabellenform.

Während die absolute Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase unter Kontrollbedingungen von 135,53 μIU auf 181,66 μIU binnen drei Wochen nicht signifikant zulegt, offenbart sich ein derartiger Effekt unter Versuchsbedingungen zwischen der ersten (145,31 μIU) und letzten Messung (258,97 μIU). Zum identischen Zeitpunkt differieren die Modi nicht signifikant voneinander (vgl. Abb. 36). In Kontrast dazu übertrifft die Kontrolle der relativen Enzymaktivität in der letzten Messung signifikant jene der Versuchsbedingung (0,26 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ zu 0,12 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$).

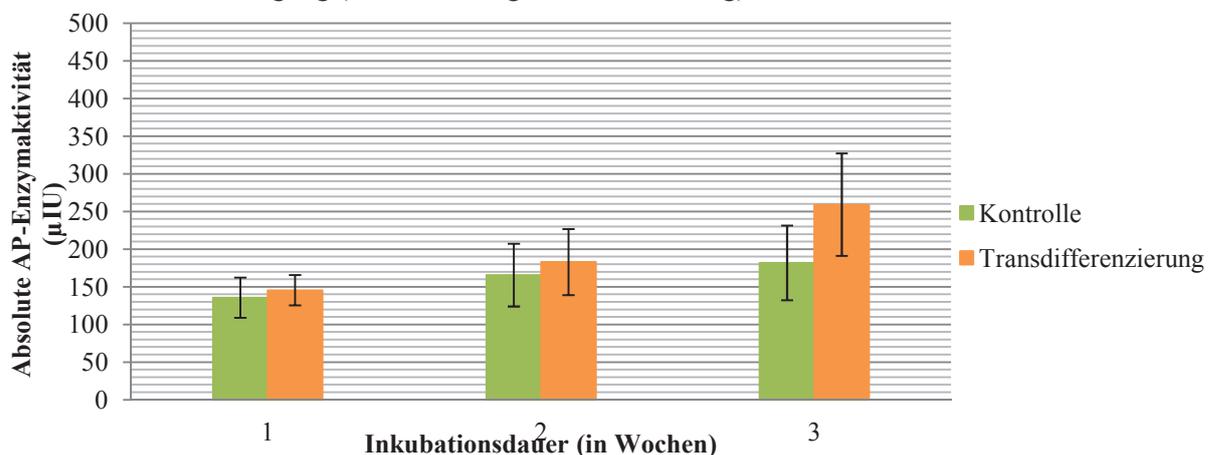


Abb. 36: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus unter konstanten Umgebungsbedingungen

In Bezug auf die AP-Aktivität (y-Achse) ist eine fehlende Signifikanz zwischen Kontroll- (grün) und Versuchsbedingung (orange) zum identischen Zeitpunkt (x-Achse) zu konstatieren.

Der fulminante Anstieg der Transdifferenzierung auf 4,87 μmol in der dritten Woche (siehe orange Säulen in Abb. 37) gegenüber der Kontrolle (grün) ist nicht nur absolut sondern auch in Relation zur Gesamtproteinmenge signifikant.

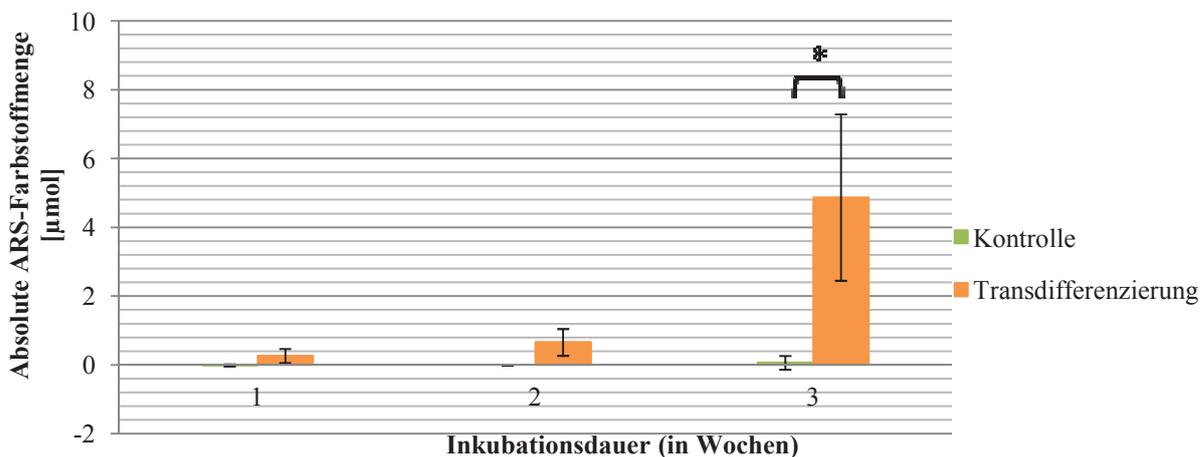


Abb. 37: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus unter konstanten Umgebungsbedingungen

Die dritte Messung (x-Achse) unter Versuchsbedingungen (orange) hebt sich signifikant von allen anderen Messungen (inklusive der Kontrolle (grün)) der absoluten ARS-Menge (y-Achse) ab (*).

In Analogie dazu werden für zwei der vier Populationen deutlich positive Alizarin Rot-Färbungen beobachtet. Auf eine Analyse der Proteinexpression wurde auf Grund der fehlenden Signifikanz des AP-Assays verzichtet und die Frage nach osteogener Transdifferenzierung verneint.

3.3.8. Osteogene Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition

Mit der Gesamtproteinkonzentration der Kontrollen mit (Kontrolle + Aza) und ohne 5'-Azacytidin (Kontrolle - Aza) einleitend, darf von einem nicht-signifikanten linearen Anstieg ausgegangen werden. In Konkordanz stellt sich für die mit Dexamethason-Medium inkubierten Proben zeitlich betrachtet eine analoge Progression dar: Sowohl der Anstieg von $12,80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ auf $27,00 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Transdifferenzierung - Aza), als auch jener von $13,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis $27,53 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Transdifferenzierung + Aza) zeigen einen ähnlichen linearen Anstieg. Auch zwischen den einzelnen Konfigurationen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Eine detaillierte Aufstellung der Deskriptivstatistik bietet Anhang 15.

Als zweiten Parameter imponiert die AP-Enzymaktivität durch signifikante Differenzen zwischen Kulturen mit und ohne 5'-Azacytidin bzw. mit und ohne Dexamethason-Medium. Für die vier Konfigurationen, also in Superposition der zuvor genannten Eigenschaften, lassen sich derartige Effekt nicht belegen. So nimmt die Aktivität von Kontrolle + Aza (dunkelgrüne Säulen in Abb. 38) von $168,29 \mu\text{IU}$ auf $157,5 \mu\text{IU}$ sogar leicht ab, während jene ohne Cytidin-Analogon stagniert ($165,41 \mu\text{IU} \rightarrow 172,24 \mu\text{IU}$). Im identischen Zeitraum steigert sich die Aktivität der Transdifferenzierung + Aza von $171,01 \mu\text{IU}$ auf $238,62 \mu\text{IU}$. Unter Berücksichtigung der Gesamtproteinkonzentration minimieren sich diese Differenzen zusätzlich.

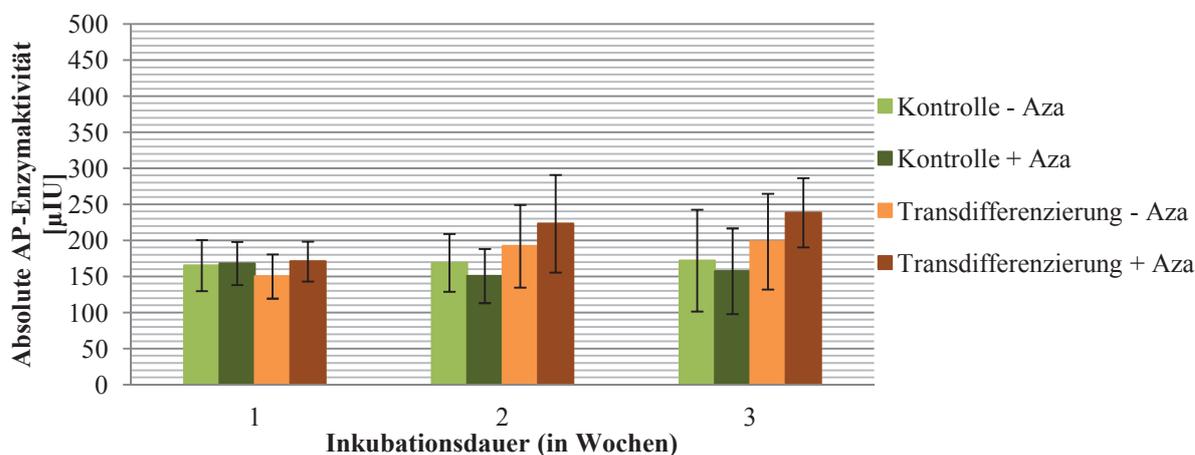


Abb. 38: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodi mit DNA-Methyltransferase-Inhibition

Signifikante Unterschiede zwischen den Konfigurationen zum identischen Zeitpunkt (x-Achse) bezüglich der Enzymaktivität (y-Achse) sind nicht nachzuweisen.

Auch die Versuchsbedingungen in Bezug auf die absolute ARS-Farbstoffmenge übertreffen die Kontrollen nicht signifikant:

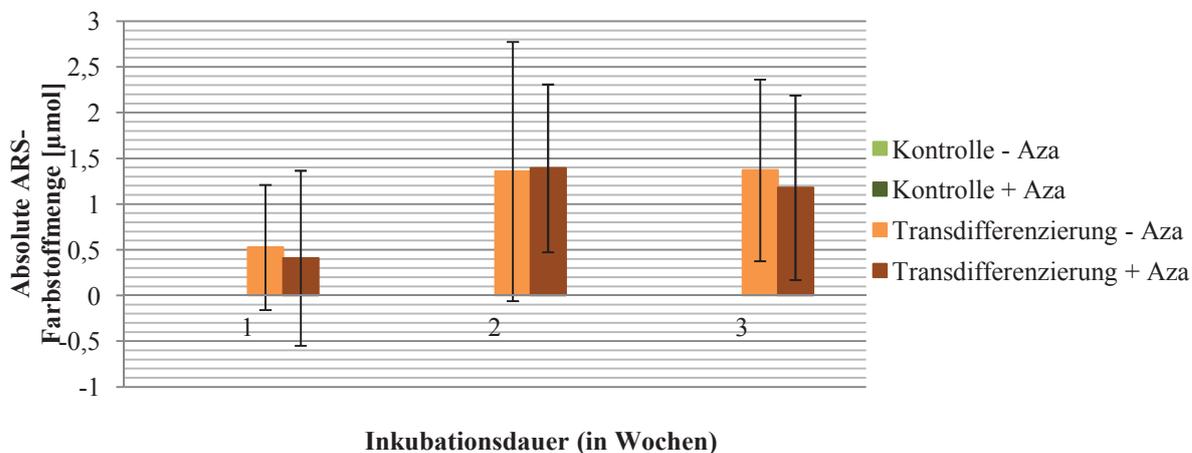


Abb. 39: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodi mit DNA-Methyltransferase-Inhibition

Signifikante Unterschiede zwischen den Konfigurationen existieren nicht.

Die relative Farbstoffmenge minimiert diese Effekte mit einem maximalen Wert von $0,07 \text{ mol} \cdot \text{cm}^2/\text{g}$, wobei signifikante Differenzen sowohl in Abhängigkeit vom Medium als auch von der 5'-Azacytidin-Applikation existieren, nicht jedoch für einzelne Konfigurationen.

Zusammenfassend kann also nicht von einer osteogenen Transdifferenzierung ausgegangen werden.

3.3.9. Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium

Zu Beginn der letzten Modifikation auf die Gesamtproteinkonzentration eingehend, reduziert sich diese ohne signifikante Differenzen aufzuweisen in der Kontrolle zwischen der zweiten und vierten Woche um 27% ($19,16 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in Woche 2 \rightarrow $14,00 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Woche 4; siehe Anhang 17). Dem entgegen nimmt die Proteinkonzentration unter Versuchsbedingungen von $31,03 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (17. Tag) auf $38,88 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (31. Tag) ohne sich jedoch signifikant zu unterscheiden. Wie die Spearman-Korrelationen zwischen Kontroll- und Versuchsbedingungen bereits implizieren ($r_{\text{Woche } 2} = 0,655$; $r_{\text{Woche } 3} = r_{\text{Woche } 4} = 0,873$) induzieren Scherstress und Transdifferenzierungsmedien ab der dritten Woche eine signifikante Zunahme der Gesamtproteinkonzentration im Vergleich zur Kontrolle.

In Bezug auf die absolute AP-Enzymaktivität (siehe Abb. 40) bedeutet der moderate Anstieg in der Kontrolle ($181,31 \text{ } \mu\text{IU}$ (Woche 2) \rightarrow $222,62 \text{ } \mu\text{IU}$ (Woche 4)) keine signifikante Entwicklung, ebenso wie jene der Versuchsgruppe (zweite Woche: $255,54 \text{ } \mu\text{IU}$ \rightarrow vierte Woche: $326,91 \text{ } \mu\text{IU}$). Die parallele Entwicklung beider Gruppen korrespondiert mit den hohen Spearman-Korrelationen zwischen diesen ($r_{\text{Woche } 2} = r_{\text{Woche } 3} = 0,873$; $r_{\text{Woche } 4} = 0,655$). Ab der dritten Woche lässt sich eine signifikante Zunahme der Enzymaktivität unter Versuchsbedingungen gegenüber der Kontrolle belegen (vgl. Abb. 40). Im Gegensatz dazu bestätigt die signifikante Varianzanalyse bei relativen Enzymaktivitäten eine Progression der Kontrolle ($10,78 \text{ IU} \cdot \text{cm}^2/\text{g} \rightarrow 16,19 \text{ IU} \cdot \text{cm}^2/\text{g}$), während die Inkubation mit Calcitriol-Medium keinen Effekt ($8,59 \text{ IU} \cdot \text{cm}^2/\text{g} \rightarrow 8,77 \text{ IU} \cdot \text{cm}^2/\text{g}$) zu haben scheint. So lässt sich ein antiparalleler Verlauf zwischen der absoluten und der relativen AP-Enzymaktivität aufzeigen.

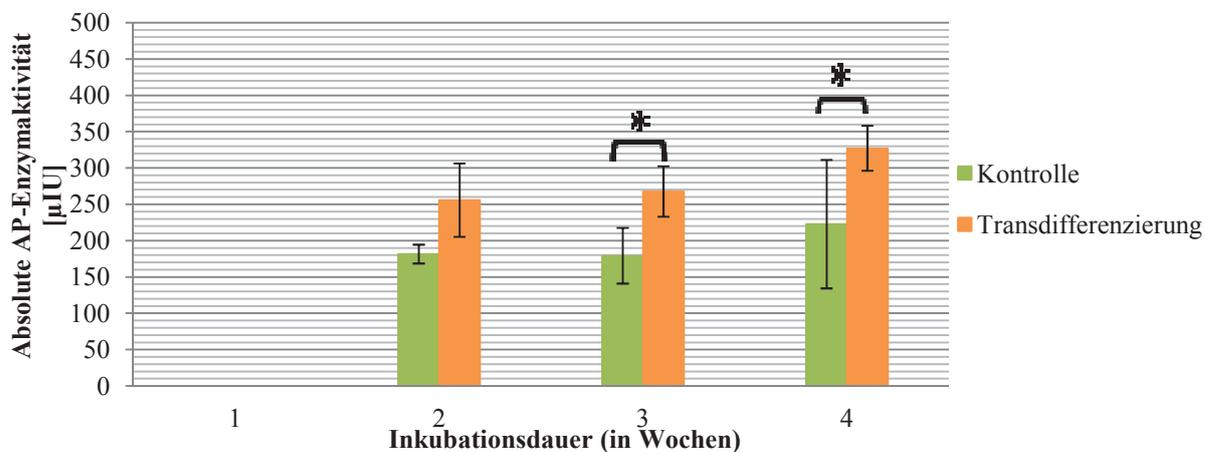


Abb. 40: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium

Im dargestellten Säulendiagramm der absoluten Enzymaktivität (y-Achse) wurden nach einer Woche Inkubationsdauer (x-Achse) keine Messwerte erhoben. Es ist zu bedenken, dass im Versuchsmodus (orange) nach der Messung Woche 2 statt Dexamethason- nun Calcitriol-Medium verwendet wurde.

Die Progredienz unter Versuchsbedingungen induziert in der dritten und vierten Woche eine signifikante Zunahme (*) der Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (grün).

Die gegen die Kontrolle normierten absoluten ARS-Farbstoffmengen der Versuchsbedingungen offenbaren in Abb. 41 (orange) keine signifikante Progression ($1,22 \text{ } \mu\text{mol}$ in der ersten Messung und $18,84 \text{ } \mu\text{mol}$ in der letzten Messung). Auch in der relativen Betrachtung persistiert dieser Effekt. Somit kann eine osteogene Transdifferenzierung ausgeschlossen werden.

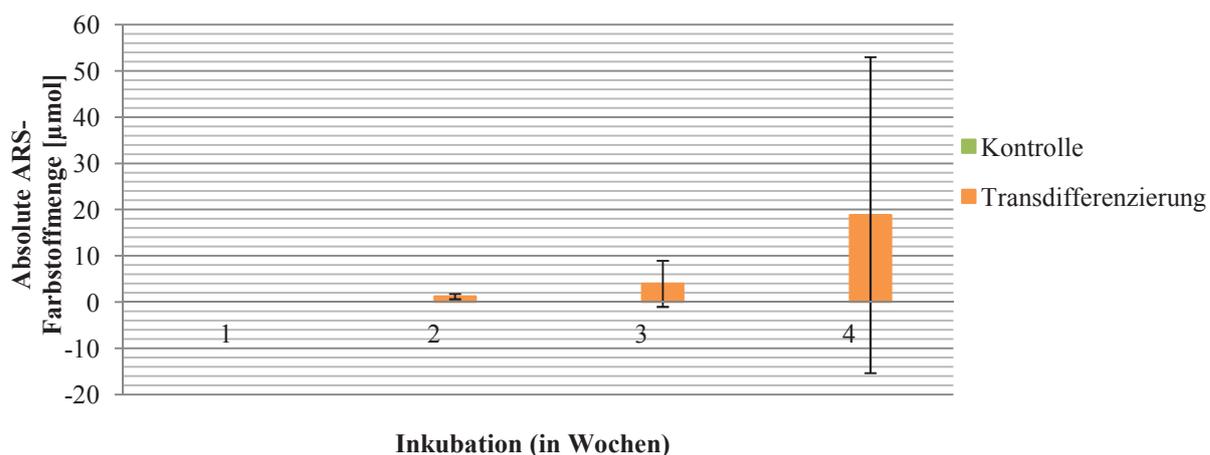


Abb. 41: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus mit Dexamethason- und Calcitriol-Mediums

Die absolute Farbstoffmenge (y-Achse) wurde in der ersten Woche (x-Achse) nicht gemessen. Nach zwei Wochen erfolgte eine Änderung des Mediums für die Transdifferenzierung: von Dexamethason- auf Calcitriol-Medium.

Die Progredienz der absoluten ARS-Farbstoffmenge auf 18,84 µmol unter Versuchsbedingungen (orange) ist gegenüber der normierten Kontrolle nicht signifikant.

3.3.10. Vergleich der Konfigurationen

In dem nach Inkubationsdauer geordneten Vergleich zwischen den Versuchsmodi der einzelnen Modifikationen bzw. der Transdifferenzierungsreferenz, können bereits in der ersten Woche signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Konfigurationen identifiziert werden: Signifikante Abweichungen existieren zwischen den Konfigurationen in Bezug auf Gesamtproteinkonzentrationen und absoluter AP-Enzymaktivität. *Post hoc*-Testungen grenzen die Zunahme der Gesamtproteinkonzentration auf die Differenzen zwischen den Konfigurationen zur osteogenen Transdifferenzierung mit adulten Spendern pas ≤ 3 , adulten Spendern pas > 3 und Calcitriol-Medium ein. Im Gegensatz dazu setzt sich die Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium mit der stärksten AP-Enzymaktivität (263,63 µIU) signifikant von den zwei Niedrigsten (Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas > 3 : 134,46 µIU sowie Osteogene Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen: 145,31 µIU) ab. In Bezug auf die absolute oder relative ARS-Farbstoffmenge sind keine signifikanten Abweichungen zu erheben. Somit hebt sich die Transdifferenzierungsreferenz in der ersten Woche in keinem Parameter signifikant von den anderen Konfigurationen ab.

Auch nach der nächsten Messung existieren keine Signifikanzen in Bezug auf die quantifizierte ARS-Färbung. Jedoch weist der gleiche Test signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsanordnungen in den Parametern Gesamtproteinkonzentration sowie absolute und relative AP-Enzymaktivität auf: Allerdings reduziert die Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium (11,66 µg/cm²) die Gesamtproteinkonzentration gegenüber einer Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium (31,03 µg/cm²). Die Performance des Calcitriol-Mediums wurde bereits zuvor als Ursache signifikant reduzierter Proteineexpression identifiziert (s. o.). *Post-hoc* differieren keine zwei Konfigurationen in Bezug auf die absolute AP-Enzymaktivität signifikant voneinander. Nach zweiwöchiger Inkubation mit Calcitriol (25,09 IU*cm²/g) stellen sich erneut signifikante Differenzen zu anderen Konfigurationen (juvenile Spender pas > 3 , adulte Spender pas ≤ 3 und mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium) ein. Auch zu diesem Zeitpunkt können keine signifikanten Effekte der Transdifferenzierungsreferenz aufgezeigt werden.

Bei der dritten Messung variieren alle Parameter signifikant voneinander. So variieren *post-hoc* jene Konfigurationen mit der maximalen (Osteogene Transdifferenzierung und *in vitro*-Seneszenz: 36,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) und minimalen Proteinexpression (Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium) signifikant voneinander. Auch in Bezug auf die absolute AP-Enzymaktivität unterscheidet sich die Transdifferenzierungsreferenz (342,14 μIU) von der Konfiguration mit der schwächsten Enzymaktivität (Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3 : 181,53 μIU). Zugleich wird durch Inkubation mit Calcitriol-Medium auch in dieser Messung eine signifikante Induktion der relativen AP-Enzymaktivität (Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium: 18,42 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) gegenüber der Osteogene Transdifferenzierung und *in vitro*-Seneszenz: 7,56 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$ bzw. Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3 : 6,82 $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) erreicht.

Die absolute ARS-Farbstoffmenge der Transdifferenzierungsreferenz (9,48 μmol) übertrifft signifikant alle weiteren Konfigurationen mit Ausnahme der Osteogene Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen (4,87 μmol). Die Transdifferenzierungsreferenz färbt sich mit signifikant höheren, relativen Mengen Alizarin Rot als die meisten anderen Konfigurationen (0,29 $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$), mit Ausnahme der bereits zuvor beschriebenen Konstanz der Umgebungsbedingungen (0,14 $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$) bzw. der Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium (0,16 $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$).

Da eine vierte Messung nur im Rahmen der Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium durchgeführt wurde, kann ein Vergleich hier nicht erfolgen.

3.4. Interdependenzen

3.4.1. Proliferativer Effekt des Dexamethason-Mediums

Die Kontrolle pas ≤ 3 proliferiert binnen drei Wochen (Tag 24 in Abb. 42) nicht signifikant auf das 2,5-fache der Aussaatdichte. Werden jene Zellen hingegen mit Dexamethason-Medium ab dem dritten Tag inkubiert, so nimmt ihre Zelldichte binnen 21 Tagen signifikant im Vergleich zu Ausgangsdichte und Kontrolle zu (1017 Zellen/ cm^2 am 3. Tag \rightarrow 6246 Zellen/ cm^2 nach 3 Wochen). Diese Zunahme der Zelldichte gegenüber der Ausgangszelldichte beruht hier, wie in Abb. 42 (orange Linie) zu sehen, insbesondere auf Veränderungen in der ersten (+318,7%; $r_{\text{Tag}3; \text{Tag}10} = 0,639$) und letzten Woche (+51,2%; $r_{\text{Tag}17; \text{Tag}24} = 0,977$). Zu beobachten ist zudem ein Anstieg des Pearson-Koeffizienten vom erhöhten auf hohes Niveau ($r_{\text{Tag}10; \text{Tag}17} = 0,959$) trotz der starken Zunahme der Dichten. Eine detaillierte Übersicht der Deskriptivstatistik bietet Anhang 18.

Bereits mit einer frühzeitigen Proliferation um +69,3% in den ersten drei Tagen auf das 4,7-fache der Aussaatdichte zu Versuchsende entwickelt sich die Kontrolle pas > 3 ab der zweiten Woche gegenüber Versuchsbeginn signifikant. Gleichzeitig weisen die Korrelationskoeffizienten auf hohe Zusammenhänge der einzelnen Wochen hin: $r_{\text{Tag}3; \text{Tag}10} = 0,958$; $r_{\text{Tag}10; \text{Tag}17} = 0,720$; $r_{\text{Tag}17; \text{Tag}24} = 0,747$. Allerdings nehmen die mit Dexamethason-Medium versetzten Populationen auf 14349 Zellen/ cm^2 (12,8-fache) binnen drei Wochen zu. Diese stetige mitotische Aktivität (siehe Abb. 42) korrespondiert nur bedingt mit den Korrelationskoeffizienten: $r_{\text{Tag}3; \text{Tag}10} = 0,717$; $r_{\text{Tag}10; \text{Tag}17} = 0,019$ und $r_{\text{Tag}17; \text{Tag}24} = 0,989$ und gestaltet sich ab der ersten Woche als signifikante Zunahme zur Aussaatdichte. Eine Woche später hebt sich diese signifikant von der Kontrolle ab.

Zwischen den Passage-Klassen besteht sowohl für Kontroll- wie auch Versuchsbedingungen ab der zweiten Woche ein signifikanter Unterschied auf Grund der erhöhten Mitoserate juveniler Fibroblasten ab *in vitro*-Passage 4.

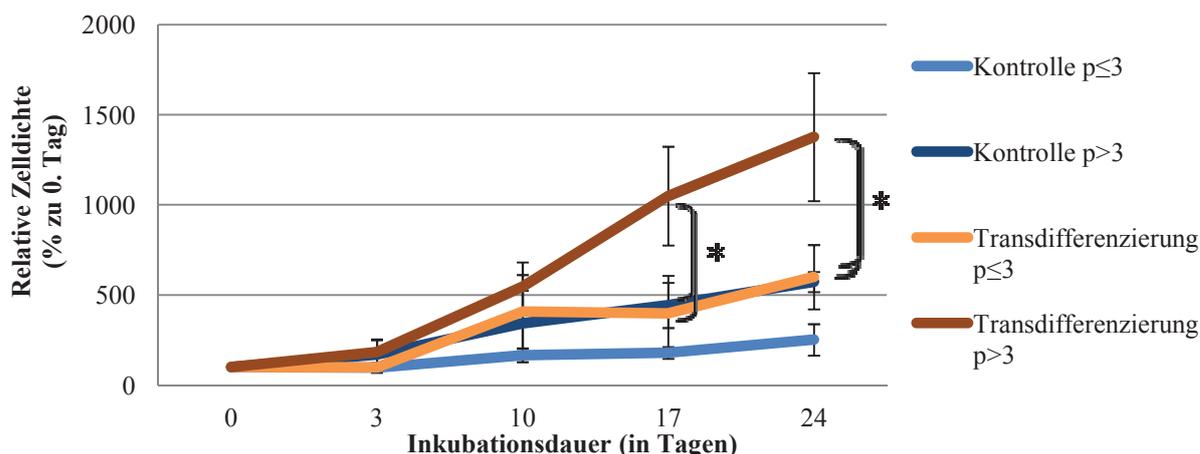


Abb. 42: **Relative Zelldichte der Konfigurationen**

Dieses Liniendiagramm stellt Zelldichten relativ zur Ausgangszelldichte (y-Achse) für verschiedene Messzeitpunkte (x-Achse) und Konfigurationen vor.

Mit Ausnahme der Kontrolle pas \leq 3 (hellblau) entwickeln sich alle Konfigurationen signifikant zur Ausgangszelldichte (Tag 0). Auffällig ist die signifikante Zunahme der Dichte juveniler Fibroblasten, pas $>$ 3 unter Transdifferenzierungsbedingungen (braun) gegenüber deren Kontrolle (dunkelblau) und der analogen Versuchsanordnung für Zellen pas \leq 3 (orange) ab der zweiten Woche (*).

3.4.2. Proliferationswirkung der Bestandteile des Dexamethason-Mediums

Die sechs Inkubationsmedien werden in Abb. 43 für die Ausgangszelldichte 1×10^3 Fibroblasten/cm² dargestellt und in Relation zur Kontrolle (blaue Säule) der entsprechenden Woche ausgewertet. Dadurch ist zwar eine mögliche absolute Veränderung der Signalstärke im zeitlichen Verlauf nicht mehr zu erkennen, allerdings wird dieser Informationsverlust durch die Kompatibilität zwischen beiden Zelldichten (siehe auch Abb. 44) ersetzt. Details sind in Anhang 19 zu finden.

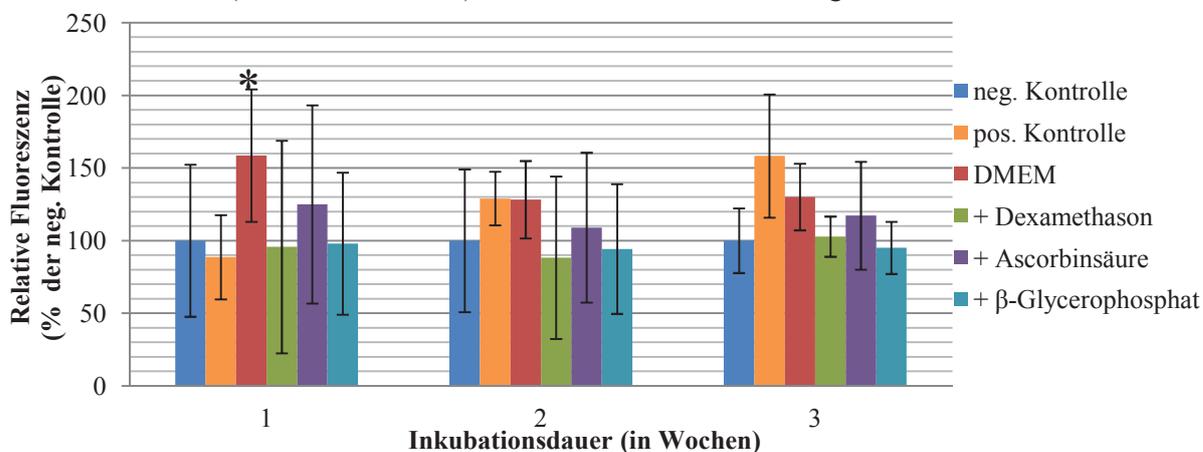


Abb. 43: **Relative Fluoreszenz der Bestandteile des Dexamethason-Mediums bei initial 1×10^3 Zellen/cm²**

Die an der neg. Kontrollen (blau) normierten Signalstärken (y-Achse) verdeutlichen einen Anstieg der relativen Proliferation für das zur Transdifferenzierung eingesetzte Dexamethason-Medium (pos Kontrolle; orange) mit zunehmender Inkubationsdauer (x-Achse). Außerdem fördert der Austausch von RPMI gegen DMEM (rot) in der ersten Woche die relative Fluoreszenz signifikant im Vergleich zur neg. Kontrolle (*).

Beide Diagramme zusammenfassend, offenbart sich für das vollständige Dexamethason-Medium, hier als „pos. Kontrolle“ bezeichnet, eine positive Entwicklung der Signalstärke auf 158,3% (1×10^3 Zellen/cm²; nicht signifikant) bzw. 153,3% (1×10^4 Zellen/cm²). Während Letztere einen signifikanten Anstieg binnen dreiwöchiger Inkubation darstellt, induzieren Gemische aus Kulturmedium und den Komponenten 100 nM Dexamethason sowie 50 μ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat keine derartige Entwicklung. Zwar signalisiert das mit 50 μ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat versetzte Kulturmedium einen zumindest leichten Zuwachs zu allen Zeitpunkten und Zelldichten (1×10^3 Zellen/cm², Tag 10:

125,1%; 1×10^4 Zellen/cm², Tag 17: 117,8%). Anders verhält sich bei einer Aussaatdichte von 1×10^3 Fibroblasten pro cm² jene Konfiguration, welche mit einem Kulturmedium auf Basis von DMEM (rote Säule in Abb. 43) statt RPMI für sieben Tage inkubiert wurde: Die Fluoreszenz impliziert eine signifikant erhöhte Proliferation von +58,6% im Vergleich zur neg. Kontrolle. Bei 1×10^4 Zellen/cm² reduzieren 10mM β -Glycerophosphat nach dreiwöchiger Inkubation in Kulturmedium (türkise Säule in Abb. 44) signifikant die Proliferation um 7,03%.

Eine signifikante Erhöhung der Zelldichten in beiden Experimenten als Kontaktinhibition, kann auf Basis der absoluten Fluoreszenz nicht verifiziert werden.

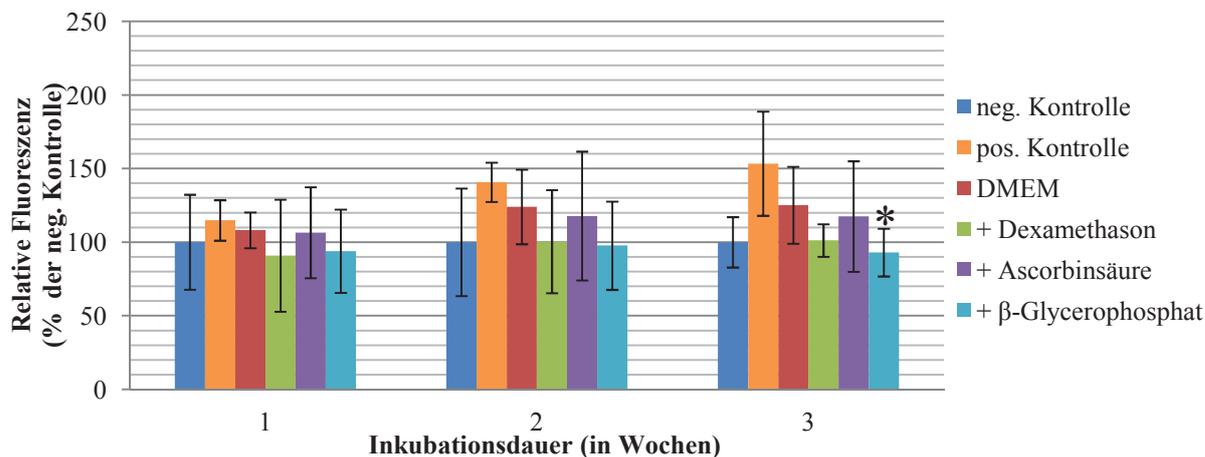


Abb. 44: **Relative Fluoreszenz der Bestandteile des Dexamethason-Mediums bei initial 1×10^4 Zellen/cm²**
 Die Fluoreszenz (y-Achse) der Bestandteile des Dexamethason-Mediums innerhalb von drei Wochen Inkubationsdauer (x-Achse) wird hier in Relation zur neg. Kontrolle normiert.
 In Analogie zum vorherigen Diagramm entwickelt sich auch hier die relative Proliferation der pos. Kontrolle (orange) zunehmend positiv, während β -Glycerophosphat nach drei Wochen Inkubation die Fluoreszenz signifikant senkt (*).

4. Diskussion und Schlussfolgerungen

4.1. *Limitations of the Study*

An dieser Stelle soll auf einige Limitierungen der Aussagekraft der Daten hingewiesen werden:

Mit Blick auf die zu Beginn der Arbeit aufgezeigte Kontroverse um die Abgrenzung dermalen Fibroblasten von anderen multipotenten Stammzellen muss der Verzicht auf eigenständig durchgeführte Bestimmungen von Zellmembranproteinen an Fibroblasten wegen mangelnder Eindeutigkeit und fehlendem internationalem Konsens über deren Charakterisierung konstatiert werden.

Des Weiteren sind die angewendeten Fallzahlen je Versuchsaufbau ($n = 3$ oder 4) niedrig, sodass statistisch signifikante Ergebnisse nur durch enorme Unterschiede zwischen den Gruppen nachzuweisen sind. Die Begrenzungen sind sowohl der Anzahl der Versuche als auch dem Gedanken eines rationalen und rationellen Einsatzes der Ressourcen zuzuschreiben. Zudem sind vergleichbare Fallzahlen nicht unüblich (Beresford et al. 1994; Lysy et al. 2007; He et al. 2011).

Außerdem bedeutet die Konzentrierung des *Western Blots* auf die Transdifferenzierungsreferenz einen Verlust an Validität in Bezug auf andere Versuche. Zurückzuführen ist dies auf das Kriterium des empirischen Einsatzes: Waren andere Indikatoren (AP-Enzymaktivität bzw. ARS-Farbstoffmenge) der osteogenen Transdifferenzierung bereits nicht signifikant, so wurde auf dieses aufwändige und kostenintensive Verfahren zu Gunsten zusätzlicher, erfolgversprechender Versuchsansätze verzichtet. Dadurch reduziert sich der Informationsverlust auf die Vergleichbarkeit verschiedener Experimente zur osteogenen Transdifferenzierung, nicht jedoch auf die Bewertung von deren Endpunkten.

4.2. *Cell Viability Assay*

Die Anwendung des *Cell Viability Assays*, welcher auf dem Resazurin-Stoffwechsel basiert (Promega Corp. 2011), bedarf einer hohen Sensitivität im Rahmen der Fluoreszenz-Messung. Zur Etablierung dieses Verfahrens sind Ergebnisse verschiedener Experimente zu betrachten:

Wie im Viabilitätstest humaner dermalen Fibroblasten aufgezeigt, differieren die Stoffwechsel-Aktivitäten juveniler Fibroblasten in Passage 3 (Fluoreszenz: $1,7 \times 10^6$) oder höher (Fluoreszenz: $8,5 \times 10^5$) nicht signifikant. Dadurch ist eine vergleichende Analyse der Proliferation anhand des Resazurin-Umsatzes für beide Gruppen gewährleistet. Im Rahmen der Etablierung einer Proliferationsreferenz verifiziert sich die Annahme der Linearität auf Grund simultaner Linearität der Regressionsgeraden und fehlenden signifikanten Abweichungen zwischen dem Mittelwert aus den Daten nach einer und drei Stunden im Vergleich mit jenen nach 2h (Bortz & Weber 2005). Zusätzlich illustrieren die verschiedenen Zelldichten in der Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2 eine lineare, parallele Zunahme der Signalstärke nach zweitägiger Inkubation. Wie aus der Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten ersichtlich wird, existiert keine signifikante Proliferation für Zellen juveniler Donoren zu diesem Zeitpunkt. Insgesamt bestätigt dies den vom Hersteller postulierten, linearen Zusammenhang von Zellzahl und Fluoreszenz (Promega Corp. 2011) einerseits und etabliert ein Verfahren zur Messung der Proliferation auf Basis der Viabilität dermalen Fibroblasten andererseits.

4.3. Proliferation

Im Viabilitätstest humaner dermaler Fibroblasten induziert eine Inkubation bei 5% pCO₂ eine signifikante Reduktion des pH-Wertes im Kulturmedium der Fibroblasten von 8,08 auf 7,64. Basiert dieser Effekt auf dem Puffern des Mediums mit zunehmender Konzentration von Bikarbonat, so ist eine Interferenz mit der Genese der extrazellulären, mineralischen Matrix der Osteoblastogenese nicht auszuschließen (Seibel 2000). Deshalb wurden alle weiteren Versuche so standardisiert, dass Experimente zur Proliferation mit möglichst kurzfristigen pH-Änderungen assoziiert waren, während jene zur Transdifferenzierung regelmäßige Änderungen der Umgebungsbedingungen beinhalteten.

Zusätzlich offenbart die Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten unter 3.1.2 signifikante Differenzen zwischen den Kategorien und Konfigurationen: Während sich die Zellzahl juveniler Spender binnen fünf Tagen verdreifacht, stagniert diese in Bezug auf die adulten Donoren. Ein analoger Effekt ist für mesenchymale Stammzellen bereits beschrieben worden (Zhou et al. 2008; Dexheimer et al. 2011). Diese signifikante Differenz zwischen den Merkmalen spiegelt sich in den signifikanten Unterschieden juveniler Zellen in Abhängigkeit von der Aussaatdichte ab dem dritten Tag wieder. Die zunächst abfallende Zellzahl in den ersten zwei Tagen nach Ausbringen der Fibroblasten adulter Spender könnte auf eine insuffiziente Adhäsion älterer Zellen zurückzuführen sein. Die im Vergleich niedrigere Mitose-Rate bietet hingegen nur eine begrenzte Erklärung für diese Entwicklung, da alle Konfigurationen aus Aussaatdichte und Alter, außer juvenile Spender; 1×10^3 Zellen/cm², weisen ab dem dritten Tag keine signifikanten Unterschiede mehr auf. Somit proliferieren juvenile Fibroblasten in hoher Zelldichte (1×10^4 Zellen/cm²) in einer vergleichbaren Geschwindigkeit wie Adulte, unabhängig von deren Dichte. Die niedrigen beziehungsweise negativen Korrelationen zwischen Proliferation und Spenderalter, welche andere Autoren (Dexheimer et al. 2011; Huschtscha et al. 2012) aufzeigen, könnten hierin begründet sein.

Eine signifikante Entwicklung auf Basis der Zelldichte ist jedoch nicht zu beobachten, weshalb von einem Seneszenz-bedingten Effekt auszugehen ist. Aus diesen Ergebnissen können nun bestimmte Aspekte zukünftiger Versuchsdesigns definiert werden, unter Anderem die bevorzugte Verwendung von 1×10^4 Zellen/cm² für Experimente mit reduziertem Wachstumsbedarf. Im Rahmen der weiteren Proliferations- und Zytokinversuche wird eine Dichte von 1×10^3 Zellen/cm² eingesetzt. Zwar sind die diesbezüglichen Ergebnisse nicht signifikant zu unterscheiden, doch wird eine Differenz von 265,2%-163,8%=101,4% am letzten Versuchstag als hinreichend kategorisiert. Zu ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf Zelldichte und MSCs gelangten Sekiya et al. (2002), wobei lediglich Zellen eines Spenders verwendet wurden.

Auch wenn die Ergebnisse dieser beiden Versuche eine seneszenz Transformation der Fibroblasten mittels Proliferation oder Spenderalter nahe legen, kann die Entwicklung eines SASP nicht verifiziert werden. Hierzu müssten quantitative Detektionen von STAT3, IL-1 α , IL-6 und IL-8 erfolgen (Orjalo et al. 2009; Kojima et al. 2012). Auf Grund der Fokussierung auf das TE-Potenzial humaner Fibroblasten wurde von der Bestimmung eines sekretorischen Phänotyps abgesehen, wenngleich die Reaktion der juveniler Zellen unterschiedlicher Passagen auf verschiedene IL-6- bzw. -8-Bedingungen quantifiziert werden.

Zur Installation des definitiven Versuchsdesigns des „Zytokin-Versuches“, muss zunächst eine Bestimmung der optimalen Ausgangszelldichte mittels 333 IU/ml FGF-2 abgeschlossen werden. Die Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten grenzt die Spanne geeigneter Aussaatdichten ein, sodass eine detaillierte Analyse der optimalen Zelldichte unter Applikation von 333IU/ml FGF-2 evaluiert werden kann. Die Auswahl von FGF-2 basiert auf Erkenntnissen anderer Autoren zum pro-mitotischen oder anti-apoptotischen Effekt dieses Zytokins auf verschiedene Zellarten (Bertram 2002; Bocelli-Tyndall et al. 2010; Kim et al. 2010; Coutu & Galipeau 2011; Biver et al. 2012). Auch wenn die partiellen Korrelationen nach fünftägiger Inkubation zwischen der Kontrolle und ein- bzw.

dreimaliger FGF-2-Applikation $>0,9$ sind, so variieren diese doch für einige Dichten signifikant: Aus diesem Grund wurde für nachfolgende Zytokin-Versuche die Zelldichte von 3×10^3 Fibroblasten pro cm^2 eruiert, zumal bei dieser ein signifikanter Effekt der täglichen Gabe von FGF-2 nachzuweisen ist. Allerdings kann ein derartiger Effekt nicht eindeutig auf das Zytokin zurückgeführt werden, weil ein täglicher Wechsel des Kulturmediums *per se* als Mediatorvariable (beispielsweise durch Entfernen toxischer Metabolite und Zugabe benötigter Substanzen) oder Moderatorvariable (wie zuvor vermutet durch Applikation aktiver Zytokin-Moleküle) die Proliferation beeinflussen kann. Mittels Etablierung einer Proliferationsreferenz (Ergebnisse unter 3.2.2) kann der tägliche Wechsel des Kulturmediums als Moderatorvariable identifiziert und dieser Versuchsablauf als Standard etabliert werden. Verifizieren He et al. (2011) eine gesteigerte Proliferation juveniler Fibroblasten früher Passagen verglichen mit adipogenen oder medullären MSCs, so identifiziert Abschnitt 3.2.2 (Proliferationsreferenz) hingegen eine signifikante Differenz in der Proliferation juvenile Fibroblasten pas ≤ 3 zu Gunsten jener höherer Passagen. Deshalb muss der anschließende Zytokin-Versuch anhand dieses Merkmals separat durchgeführt und die jeweilige Proliferationsreferenz als Kontrolle verwendet werden. Im Vergleich zu MSCs bedeutet dies eine konträre Entwicklung, da dort die Mitose-Frequenz mit steigender Passage abnimmt (Dexheimer et al. 2011). Zudem ist ein Vergleich beider Klassen nur nach Normierung anhand der zugehörigen Kontrollaktivität sinnvoll.

Im Zytokin-Versuch (Abschnitt 3.2.3) werden unter anderem etwaige, konzentrationsunabhängige Effekte der sieben Zytokine und von NO gegenüber der normierten Referenz (s. o.) identifiziert. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass ein Vergleich mit Arbeiten anderer Autoren (Mackay et al. 1998; Miettinen et al. 2011) bisweilen auf Grund der Konzentrierung nach *International Units* erschwert ist. Wie im Abschnitt 4.2 zum *Cell Viability Assay* ausgeführt, darf bei Variation der Viabilität von einer Änderung der Zellzahl ausgegangen werden.

Mit den Beobachtungen von Maragos et al. (1993) und Forterre et al. (2011) korrespondiert die signifikante, konzentrationsunabhängige Reduktion der Viabilität juveniler Fibroblasten bis zur dritten Passage während einer Inkubation mit NO (60,21% \rightarrow 77,89% der Referenz). Obwohl in der Literatur unterschiedliche NO-Donoren (in dieser Arbeit: Deta) verwendet werden, weshalb die Ergebnisse unter Umständen nicht sehr reliabel sind (Spitler et al. 2013), implizieren die Erkenntnisse von Seo et al. (2011) eine Aktivierung zweier pro-apoptotischer Enzyme ab einer Dosierung von 2 mM Nitroprussid-Natrium: Bax und Cytochrom C. Während Forterre et al. (2011) auf eine Suffizienz von Konzentrationen zwischen 3,5 und 4,1 mM zur Reduktion der Proliferation in Fibroblasten verweisen, induzieren in oben genanntem Versuch Konzentrationen zwischen 5 und 100 μM einen analogen Effekt. Dieser konzentrationsneutrale Effekt ist jedoch lediglich für jene Populationen bis Passage 3 nachweisbar, sodass eine Änderung der Sensitivität juveniler Fibroblasten bezüglich NO nicht auszuschließen ist. Somit kann nur hypothetisch von einer spezifischen Phosphorylierung der MAP-Kinase und des Zellzyklus-Proteins 38 (Seo et al. 2011) in juvenilen Fibroblasten in Passage 3 ausgegangen werden. Zugleich ist jedoch denkbar, dass Fibroblasten höherer *in vitro* Passagen weniger sensitiv auf NO reagieren, weshalb deutlich höher konzentrierte Lösungen (siehe bspw. Seo et al. (2011)) notwendig gewesen wären.

Eine ähnliche Tendenz lässt sich in Bezug auf TGF- β erkennen, weil dieses Zytokin die Proliferation in pas ≤ 3 ebenfalls signifikant minimiert (Mittelwerte: 88,73% \rightarrow 77,97% der Referenz) jedoch nicht in höheren Passagen. Armatas et al. (2014) beobachteten einen konträren Effekt: TGF- β stimulierte die Proliferation juveniler Fibroblasten (und unter zusätzlicher Verwendung von Fibronectin auch jene adulter Fibroblasten). Hier ergibt sich somit eine Schnittstelle zur Transdifferenzierung, welche durch TGF- β induziert werden kann (Miyazono et al. 2005; Aloise et al. 2014). In Anbetracht der Sensitivität juveniler Fibroblasten pas ≤ 3 für dieses Zytokin sowie deren Potenzial zur Osteogenese in der Transdifferenzierungsreferenz kann eine Koinzidenz in Betracht gezogen werden. Interessant ist zudem der Vergleich mit MSCs, da TGF- β hier initial die Matrixsynthese supprimiert und erst später

die Aggregation in Zellnestern fördert (Stobbe 2008). Im Gegensatz dazu identifizieren andere Autoren (Pujols et al. 2011; Fuentes-Calvo et al. 2013) einen proliferativen Effekt dieses Zytokins auf Fibroblasten, welcher einerseits auf der gesteigerten Sekretion anderer Chemokine und andererseits auf der Synthese von Kollagen 1A1, 1A2, 3A1 und Fibrinogen beruhen soll. Die juvenilen Fibroblasten in den Passagen 4-7 offenbaren keine signifikanten Effekte.

FGF-2 hingegen steigert konzentrationsunabhängig die Proliferation von Zellen $\times 3$ (auf 116,84% bis 153,18% der Referenz), was auch mit den Erkenntnissen anderer Autoren (J.-H. Lee et al. 2012) in Übereinstimmung zu bringen ist. Die Untersuchungen von Rose (2011) auf dieses Setting übertragend, kann die proliferierende Wirkung von FGF-2 unter Umständen durch eine etwaige Stabilisierung dieses Zytokins mittels ATP erfolgt sein. Dies würde hypothetisch die Koinzidenz aus bereits erhöhter intrinsischer Proliferation (s. o.) und Zytokin-Effekt erklären. Außerdem könnte hier eine potenzielle Anwendung im Rahmen des *tissue engineering*s erzielt werden, wie dies für MSCs bereits diskutiert wird (Stobbe 2008; N. Mostafa et al. 2012; Visser et al. 2012). Ob dies nun auf eine Induktion der Mitose (Bertram 2002; Biver et al. 2012; Visser et al. 2012) oder eine Reduktion von Nekrose und Apoptose wie bei MSCs (Bocelli-Tyndall et al. 2010) zurückzuführen ist, kann nicht eruiert werden. Allerdings diskriminieren die Experimente den Effekt auf Zellen höherer Passagen, welches als „anti-seneszente Wirkung“ (Coutu & Galipeau 2011; Kim et al. 2012) oder „*stem-state persistence*“ (Stobbe 2008) bekannt ist.

Weiterhin inhibieren **1000 IU/ml IFN- γ** in juvenilen Fibroblasten bis Passage 3 deren mitotische Aktivität. Dieser konzentrationsabhängige IFN- γ -Effekt korrespondiert mit Untersuchungsergebnissen zur Kynurenin-/ IDO-Kaskade (Crop et al. 2010; Croitoru-Lamoury et al. 2011; Kronsteiner et al. 2011), wobei hier andere Zellarten untersucht wurden. Dermale Fibroblasten, welche mit IFN- γ stimuliert wurden, exprimieren zwar vermehrt IDO, eine gesteigerte *inducible nitric oxide synthases*-Aktivität wurde jedoch ausgeschlossen (Wada et al. 2010). Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang nicht nur die Abhängigkeit von der Konzentration, welche auch in anderen Experimenten mit Fibroblasten detektiert wurde (Iwamoto et al. 2009), sondern auch deren Dependenz von der Zellpassage. Zugleich kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass dieser spezifische Effekte auf einer gesteigerte IL-6-Synthese basiert (Iwamoto et al. 2009). Korrelieren die Autoren eine Zunahme der IL-6-Sekretion humaner Fibroblasten mit Steigerung der IFN- γ -Konzentration, so kann im Zytokin-Versuch keine signifikante Wirkung von IL-6 gemessen werden. Aus diesem Grund darf von einer direkten Inhibition der Proliferation seitens Interferon- γ ausgegangen werden.

In einer zusammenfassenden Betrachtung widersprechen die vorgelegten Daten jenen von Zhou et al. (2008) und He et al. (2011), entgegen deren Beobachtung eine Zunahme der intrinsischen Proliferation mit zunehmender Passage nachweisbar ist. In besonderem Maße spiegelt sich diese Erkenntnis in der proliferativen Reaktion der juvenilen Zellen auf die Applikation verschiedener Zytokine (IFN- γ , TGF- β sowie FGF-2) und NO wider. Gleichzeitig impliziert die signifikante Zunahme der Zellzahl juveniler Donoren binnen fünf Tagen gegenüber jenen adulter Spender, eine Dependenz der mitotischen Frequenz vom Spenderalter, welches die Erkenntnisse von Huschtscha et al. (2012) bestätigt. Die kritische Würdigung des Versuchsdesigns beinhaltet eine Relativierung der Ergebnisse auf Grund der kurzen Inkubations- und Expositions-dauer, da andere Autoren deutlich längere Sequenzen nutzen (Miettinen et al. 2011). Allerdings unterscheiden sich dermale Fibroblasten bezüglich ihrer mitotischen Antwort nicht nur untereinander (Passage-abhängig), sondern auch von mesenchymalen Stammzellen abzugrenzen sind: Diese steigern ihre Proliferation nach viertägiger Applikation von 1 ng/ml TNF- α (Miettinen et al. 2011), was hier nicht zu detektieren ist.

Mit Blick auf eine Anwendung zur Optimierung des *tissue engineering*s (Janicki & Schmidbauer 2011) muss die Entwicklung einer individuellen Strategie gefordert werden, da die Proliferation dermalen Fibroblasten bereits durch zwei Merkmale (Alter der Spender und *in vitro*-Passagierung) limitiert wird. Es konnten für juvenile Fibroblasten in frühen Passagen lediglich wachstumshemmende

Zusätze (NO, TGF- β und 1000 IU/ml IFN- γ) identifiziert werden, welche zudem bereits von primären Fibroblasten autonom synthetisiert werden (Wada et al. 2010). Hierdurch könnte deren Sensitivität für autokrine oder parakrine Interaktionen erklären werden. Andererseits bewirken IL-6 und -8, welche ebenfalls synthetisiert werden (Wolf et al. 2012), keine signifikanten Effekte. Für jene Fibroblasten höherer Passagen kann zwar FGF-2 konzentrationsunabhängig zur Maximierung der Proliferation genutzt werden, doch reduziert dessen Anwendung die Kapazität der Osteoblastogenese (J.-H. Lee et al. 2012).

Im Abschnitt zur Seneszenz dermalen Fibroblasten werden diese Erkenntnisse mit jenen aus weiteren Experimenten in Bezug gesetzt.

4.4. Osteogene Transdifferenzierung

A priori wurden Kriterien der osteogenen Transdifferenzierung als signifikante Zunahmen quantitativer Messwerte gegenüber der Kontrolle bezüglich Aktivität der alkalischen Phosphatase, Alizarin Rot Färbung und der Detektion von RunX 2 definiert. Die Auswahl der Nachweisverfahren repräsentiert hierbei die von Choi et al. (2011) definierten Stadien „Proliferation, Differenzierung und Kalzifizierung“. Auf Basis der eingangs festgestellten Problematik der Festlegung geeigneter Kriterien der osteogenen Transdifferenzierung wurden aus dort beschriebene Faktoren (aus 1.5: Scherstress, osteoinduktive Medien, Inkubationsdauer und Messzeitpunkte, Proliferation, Hypoxie, *in vitro*-Seneszenz und Spenderalter) ein suffizientes Modell als Transdifferenzierungsreferenz etabliert. Anschließend diskriminierten Modifikationen der Referenz besagte Faktoren, um mittels quantifizierbarer Messungen Erklärungen für die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf dermale Fibroblasten zu geben (Lorenz et al. 2008; Junker et al. 2009; Koch et al. 2011). Um die Potenz des Versuchsdesigns verbessern zu können, dienen diese Modifikationen auch der Prüfung auf Relevanz verschiedener Faktoren bzw. deren Kombination (Koch et al. 2011). Hierzu ist es notwendig eine Analyse der Effekte der Versuchsmodi gegenüber der Kontrolle vom Vergleich der Versuchsmodi der Modifikationen bzw. der Transdifferenzierungsreferenz zu unterscheiden.

4.4.1. Transdifferenzierungsreferenz

Das Ziel der Etablierung eines geeigneten Modells zur osteogenen Transdifferenzierung impliziert die Auswahl dermalen Fibroblasten primär anhand der *in vivo*- und *in vitro*-Seneszenz (juvenil und pas ≤ 3), weil eine derartige Aufteilung auf Basis der zuvor beschriebenen Ergebnisse der eigenen Proliferationsversuche (siehe 4.3) und Transdifferenzierungsexperimente anderer Autoren indiziert ist (Junker et al. 2009; Koch et al. 2011). Da *scaffolds* bisher die Wahrscheinlichkeit einer klinischen Transposition reduzierten (Gerges 2010) und keine Notwendigkeit darstellten (Lorenz et al. 2008; Cattani et al. 2011) wurde eine Anwendung vermieden. Aus ähnlichen Überlegungen konnte auf die Verwendung viraler Vektoren verzichtet werden (Takahashi & Yamanaka 2006; Gerges 2010; Lee et al. 2011). Allerdings gründet die Wahl der ursprünglichen Zelldichte auf den Erkenntnissen aus der Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten, da 1×10^4 Zellen/cm² eine deutliche, wenn auch nicht signifikante, Reduktion der Proliferation binnen fünf Tagen aufweisen. Legt dieses Experiment den dritten Tag als Beginn der Wachstumsphase und baldiges Erreichen der Konfluenz nahe, so eignet sich dieser Zeitpunkt zur initialen Inkubation mit Dexamethason-Medium. Dieses Medium beinhaltet 100 nM Dexamethason welches als suffiziente, osteoinduktive Konzentration (Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Choi et al. 2011) gilt. Die ebenfalls enthaltenen 50 μ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat induzierten ebenfalls die Osteogenese, hatten jedoch keinen proliferativen Effekt (Shahdadfar et al. 2005; Choi et al. 2011). Die Applikation von Zytokinen oder anderen Mediatoren wurde vorerst ausgeschlossen, zumal als Konsequenz aus den Ergebnissen des Zytokin-Versuchs für

juvenile Fibroblasten in frühen Passagen lediglich wachstumshemmende Substanzen zur Verfügung stehen. Unter der Prämisse einer raschen Osteoinduktion beschränkt sich die Inkubation mit diesem Medium auf drei Wochen (analog zu Hee & Nicoll 2009, Choi et al. 2011 und Dexheimer et al. 2011; siehe auch Abb. 45).

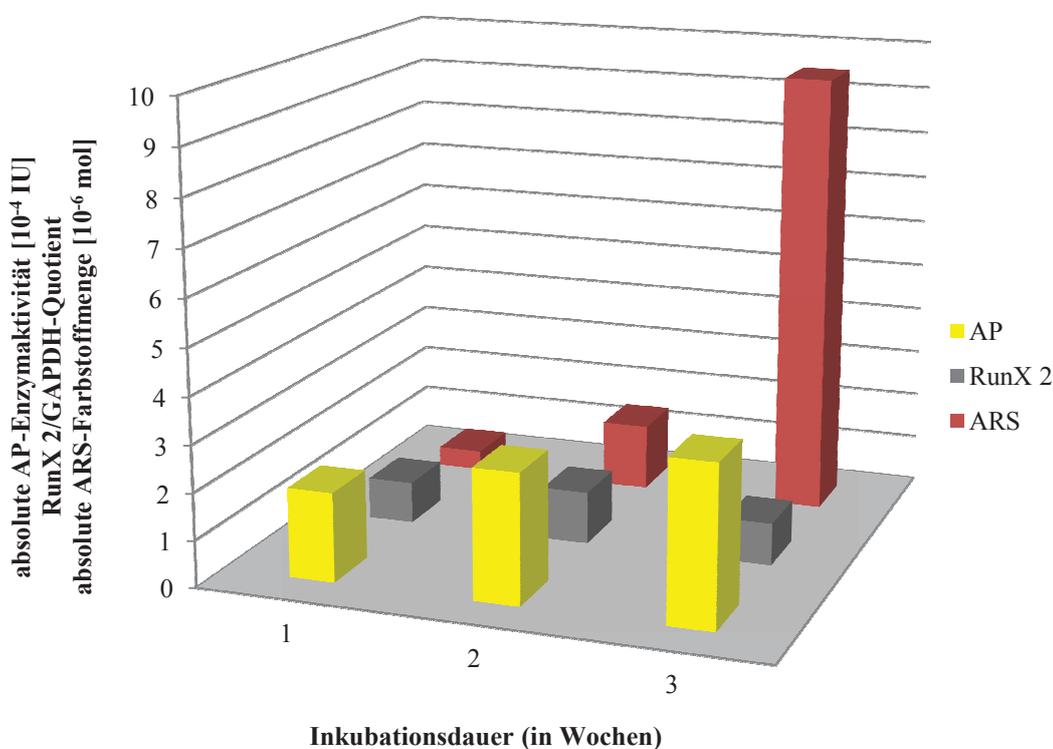


Abb. 45: **Entwicklung der Parameter der Transdifferenzierungsreferenz**

In diesem Säulendiagramm werden in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (x-Achse) die Mittelwerte der absoluten AP-Enzymaktivität („AP“), des RunX 2/GAPDH-Quotienten („RunX 2“) und der absoluten ARS-Farbstoffmenge („ARS“) quantitativ (y-Achse) dargestellt.

Während die AP-Enzymaktivität eine stetige Zunahme verzeichnet, verläuft die RunX 2-Expression parabelförmig mit einem Maximum in der zweiten Woche. Die ARS-Farbstoffmenge hingegen zeichnet sich durch einen deutlichen Anstieg in der dritten Woche aus. Dieser Verlauf verdeutlicht eine stufenförmige, osteogene Transdifferenzierung (Choi et al. 2011).

Aus dem Wunsch nach Vergleichbarkeit der Signifikanzen absoluter und normierter Parameter erklärt sich die Relevanz der Progression der Gesamtproteinkonzentration binnen 21 Tagen, denn sowohl Kontroll- als auch Transdifferenzierungsreferenz erfahren zwischen der ersten und der letzten Messung einen signifikanten linearen Zuwachs. Zugleich differieren beide Modi an diesen Messungen signifikant zu Gunsten der Transdifferenzierungsreferenz voneinander. So korrespondiert eine signifikante Zunahme der absoluten AP-Enzymaktivität von 190,37 μ IU (erste Messung) auf 342,14 μ IU (dritte Messung; Abb. 45) mit einer Reduktion der relativen Enzymaktivität im gleichen Zeitraum von 12,79 IU* cm^2/g auf 10,40 IU* cm^2/g . Der frühe, signifikante Anstieg der absoluten Enzymaktivität durch das Dexamethason-Medium kann als Ausdruck des „*multilayer formation stage*“ aufgefasst werden (Choi et al. 2011). Dies wiederum illustriert zusätzlich die Diskrepanz zwischen der signifikanten Zunahme der absoluten Enzymaktivität nach dreiwöchiger Inkubation mit Dexamethason-Medium im Vergleich zur Kontrolle und dem konträren Ergebnis in Bezug auf die relative Aktivität. Nach zwei Wochen deutet die signifikante Zunahme der RunX 2-Expression (RunX 2/GAPDH-Quotient: Kontrolle 0,57; Transdifferenzierung 1,12; Abb. 45), welche Choi et al. (2011)

als „*mineralization stage*“ definieren, auf eine Synthese osteogener Proteine in „*Clustern*“ (Choi et al. 2011) hin. Sieben Tage später wird in diesem Versuch eine signifikante Differenz der extrazellulären Kalzifizierung zu Gunsten der Transdifferenzierungsreferenz (Kontrolle: $-0,01 \mu\text{mol}$; Differenzierung: $9,48 \mu\text{mol}$; Abb. 45) detektiert. Dieser letzte Schritt in der sequentiellen Kategorisierung von Choi et al. (2011) wird als „*post-mineralization stage*“ bezeichnet und inhaltlich durch die deutliche Zunahme der Mineralisierung und *Cluster* gekennzeichnet. Somit darf mit Blick auf die eingangs definierten Kriterien von einer abgeschlossenen osteogenen Transdifferenzierung ausgegangen werden, welche in Übereinstimmung mit den von Choi et al. (2011) definierten Schritten vollzogen wird. Gleichzeitig beschleunigt diese Versuchsanordnung die Osteogenese juveniler Fibroblasten im Vergleich zu anderen Autoren mit analogen Designs über vier oder mehr Wochen (Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Sommar et al. 2009).

4.4.2. *In vitro*-Seneszenz und Spenderalter

Im Vergleich dazu ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Modi für **juvenile Fibroblasten pas >3** aus Osteogene Transdifferenzierung und *in vitro*-Seneszenz bezüglich der absoluten AP-Enzymaktivität erst nach der letzten Woche zu verifizieren (Kontrolle: $132,68 \mu\text{IU}$; Transdifferenzierung: $276,25 \mu\text{IU}$). Des Weiteren lässt sich eine signifikante Kalzifizierung in der dritten Woche messen, welche jedoch fotografisch nicht zu bestätigen ist. Möglicherweise begründet sich dies mit methodischen Mängeln oder unspezifischer Restitution des Farbstoffs in einer kollagenen Matrix. Andererseits deuten diese Entwicklungen auf Verzögerungen im Modell der Transdifferenzierung hin (Choi et al. 2011), welche unter Umständen durch längere Inkubationsphasen zu kompensieren wären (Sommar et al. 2009). Auf Grund der dadurch auszuschließenden osteogenen Transdifferenzierung wurde die RunX 2-Synthese nur beispielhaft ausgewertet, wenngleich eine Passage-unabhängige, osteogene Transdifferenzierung binnen vier Wochen möglich scheint (Lorenz et al. 2008). Andererseits korrespondieren die eigenen Ergebnisse mit jenen von Lysy et al. (2007), welche ebenfalls lediglich eine Osteogenese bis Passage 3 nachweisen konnten.

Mit **adulten Zellen bis Passage 3** (aus Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3) illustriert der identische experimentelle Ablauf weder für die AP-Enzymaktivität noch für eine extrazelluläre Kalzifizierung signifikante Differenzen zur Kontrolle, womit sich diese inhaltlich deutlich von MSCs identischen Alters und Passage unterscheiden (Dexheimer et al. 2011). Allerdings beschrieben Zhou et al. (2008) auch für MSCs eine Reduktion der Osteogenese-Parameter mit zunehmendem Alter der Spender. Obwohl auch hier die Expression von RunX 2 nur exemplarisch gezeigt wird, deuten die Ergebnisse nicht auf einen Abschluss der osteogenen Transdifferenzierung nach den zuvor genannten Kriterien hin. Somit muss die zum Teil fehlende Charakterisierung und Diskrimination der Fibroblasten einiger Autoren (Lysy et al. 2007; Junker et al. 2009; Sommar et al. 2009) bezüglich Seneszenz und Alter der Donoren kritisch gesehen werden.

Für die dermalen Fibroblasten **adulter Spender in Passage 4-7** im Experiment zur Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas >3 nivellieren sich die Differenzen zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe im AP- und ARS-*Assay*, sodass, wie in den Gruppen zuvor, eine negative Gesamtbeurteilung des Transdifferenzierungsprozesses abgegeben werden kann.

Somit ist festzustellen, dass Seneszenz in der hier definierten Form einen entscheidenden Einfluss auf den Prozess der osteogenen Transdifferenzierung ausübt: In der spezifischen Analyse der vier bisher besprochenen Konfigurationen zeigen die Ergebnisse der letzten Messung eine herausragende, signifikante Kalzifizierung juveniler Zellen in Passage 3 (Transdifferenzierungsreferenz) sowohl als absoluter wie relativer Parameter. Mit Blick auf die zuvor erfolgte Evaluation der vier Gruppen anhand der Osteogenese-Kriterien konstatieren diese Daten lediglich für dermale Fibroblasten in frühen Passagen eine suffiziente osteogene Transdifferenzierung. Dies widerspricht den Daten von Junker et al. (2009), welche eine osteogene Transdifferenzierung für *single-cell clones* in Passage 2-4

beschreiben ohne Angaben über das Spenderalter aufzuführen und Sommar et al. (2009), welche keine Angaben über Passagierung und Spenderalter machen. Dadurch muss eine inhaltliche Superposition aus juvenilem Spenderalter und geringer Passagierung als obligate Voraussetzung angesehen werden. In wie weit dies durch andere, externe Faktoren modifiziert bzw. auf weitere Populationskonfigurationen ausgedehnt werden kann, ist Gegenstand weiterer Experimente.

4.4.3. Auswahl der Transdifferenzierungsmedien

Mit Blick auf die Ergebnisse der zuvor mit Dexamethason-Medium realisierten Experimente zur Augmentation bzw. Induktion der osteogenen Transdifferenzierung verwendet die Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium, ein weiteres Cholesterin-Derivat, dessen osteogenes Potenzial umstritten ist: Wie im Abschnitt über die Faktoren der osteogenen Transdifferenzierung erläutert, genügen 10 – 100 nM Vitamin D₃ zur Osteoblastogenese humaner Fibroblasten bzw. MSCs (Peng et al. 2008; Hee & Nicoll 2009; He et al. 2011), wenngleich dieser Effekt sich auf juvenile Zellen beschränken könnte (Peng et al. 2008). Außerdem verwenden Sammons et al. (2004) bzw. Song et al. (2011) zusätzliche Substanzen, um ein suffizientes Ergebnis zu erzeugen (siehe Tabelle 21). Unter Berücksichtigung der Problematik der Seneszenz (s. o.) wurden für diesen Versuch juvenile Fibroblasten bis Passage 3 ausgewählt, welche mit Calcitriol-Medium nach ansonsten identischen Bedingungen kultiviert wurden (vgl. auch He et al. 2011). Somit wären jegliche zu quantifizierende Änderungen der Daten singularär auf dieses Steroidhormon zurückzuführen.

In Analogie zu den zuvor vorgestellten Experimenten nimmt auch im Rahmen dieser Versuchsanordnung die Gesamtproteinmenge der Calcitriol-Gruppe im Verlauf des Experimentes zu, jedoch ist diese Entwicklung nicht signifikant von jener der Kontrollgruppe zu differieren. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kommt die inferenzstatistische Auswertung der AP-Enzymaktivität: Denn trotz Progression der absoluten Enzymaktivität auf 291,67 µIU unterscheidet sich diese nicht signifikant von 213,94 µIU der Kontrollgruppe. In analogen Experimenten war ein Abstand von 400% zwischen beiden Gruppen binnen sieben Tagen gemessen worden (He et al. 2011) und in humanen MSCs ließ sich eine deutliche Progression detektieren (Beresford et al. 1994; Zhou et al. 2006; N. Mostafa et al. 2012). Im Kontrast zu dieser Datenlage wird die Regression der relativen Enzymaktivität unter Versuchsbedingungen deutlich. Unter Einschluss der negativen Entwicklung der Alizarin Rot Rücklösung im Vergleich zur Kontrolle kann im Gegensatz zu He et al. (2011) keine osteogene Transdifferenzierung konstatiert werden. Ob dieser Prozess durch Kokultivierung mit Osteoblasten oder zusätzlichen Faktoren (bspw. BMP-2, 17β-Östradiol oder Parathormon), wie bei Sammons et al. (2004), Song et al. (2011) oder N. Mostafa et al. (2012), beschrieben für dermale Fibroblasten zu optimieren ist, kann hier nicht geklärt werden (vgl. Tabelle 21). Damit wird gezeigt, dass Calcitriol ohne Applikation weiterer induktiver Substanzen binnen drei Wochen juvenile Fibroblasten pas ≤3, welche in der Transdifferenzierungsreferenz mit Dexamethason-Medium transdifferenziert werden konnten, nicht adäquat stimulieren kann. Durch die fehlende Signifikanz der AP-Enzymaktivität kann letztlich nicht zwingend eine prinzipielle Induktion dieses Prozesses verifiziert werden, wenngleich dies anderen Autoren (He et al. 2011) unter vergleichbaren Bedingungen gelungen ist. Gleichzeitig weisen diese auf eine quantitative und qualitative Reduzierung der Osteogenese dermaler Fibroblasten im Vergleich zu adipogenen oder medullären Stammzellen hin.

Versuchsbezeichnung / Autor	Passage	Alter Donor	Medium	Dauer (Wochen)	Nachweis
Transdifferenzierungsreferenz	≤3	juvenil	Dexamethason-Medium	3	AP-Enzymaktivität, ARS-Farbstoffmenge <i>Western Blot</i>

	Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium	≤3	juvenil	Calcitriol-Medium	3	AP-Enzymaktivität, ARS-Farbstoffmenge
MSC	Peng et al. 2008	3-6	juvenil	10 nM Calcitriol	2	AP-Enzymaktivität PCR
	Hee & Nicoll 2009	-	juvenil	100 nM Calcitriol	3	AP-Enzymaktivität RT-PCR
	He et al. 2011	3	juvenil	10 nM Calcitriol	4	AP-Enzymaktivität ARS-Färbung RT-PCR
MSC	Sammons et al. 2004	2-3	-	10 nM Calcitriol, 200 ng/ml Parathormon	2	AP-Enzymaktivität ELISA ARS-Färbung
	Song et al. 2011	Osteoblasten		1 µM-1 nM Calcitriol 10 nM 17β-Östradiol	3	AP-Enzymaktivität, ARS-Färbung Western Blot
MSC	Mostafa et al. 2012	-	juvenil adult	100 nM Dexamethason 10/50 nM Calcitriol	3	AP-Enzymaktivität Ca ²⁺ -Deposition

Tabelle 21: Vergleich einzelner Arbeiten mit Calcitriol

Die hier aufgeführten Versuchsanordnungen zur Osteogenese mittels Calcitriol unterscheiden sich in den rot markierten Faktoren von der Transdifferenzierungsreferenz. Ein Vergleich der Ergebnisse ist auf Grund der unterschiedlichen Nachweisverfahren (rechte Spalte) nicht möglich.

Die Idee der Osteogene Transdifferenzierung und Dexamethason-Konzentrationen basiert auf der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen dieses Glucocorticoids in anderen Arbeiten (10 nM: Hee & Nicoll 2009; Beresford et al. 1994; 100 nM: Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Choi et al. 2011; 1000 nM: Sommar et al. 2009; 10-5000 nM: N. Mostafa et al. 2012) und deren zum Teil konträren Ergebnissen. So war es beispielsweise Wagner et al. (2005) oder Wada et al. (2010) *per se* nicht möglich eine suffiziente, osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason zu induzieren. Auf Grund der mangelhaften Ergebnisse juveniler Fibroblasten in höheren Passagen zu transdifferenzieren, unter anderem fehlt eine qualitativ erkennbare Kalzifizierung, sollte in diesem experimentelle Aufbau die Wirkung unterschiedlicher Dexamethason-Konzentrationen im entsprechenden Medium mittels ARS-Färbung verglichen werden. In Übereinstimmung zwischen qualitativer und quantitativer Messung dieses Parameters kann keine Konzentration den Osteogenese-Prozess im Verlauf von drei Wochen induzieren, sodass von einer konzentrationsunabhängigen Insuffizienz juveniler Fibroblasten pas >3 auszugehen ist. N. Mostafa et al. (2012) hatten hingegen für 10 und 100 nM eindeutige Calcifizierungen gingivaler Fibroblasten in Passage 4 quantifiziert, was auf Wechselwirkungen zwischen Dexamethason-Konzentrationen und endogenen Faktoren (bspw. Seneszenz, Spenderalter oder Herkunft der Zellen) schließen lässt (Wagner et al. 2005; Wada et al. 2010).

Zusammenfassend beruht der Vergleich beider Transdifferenzierungsmedien, eines mit 100 nM Dexamethason und eines mit 10 nM Calcitriol, bei ansonsten identischer Zusammensetzung, auf der ausschließlichen Wirkung beider Substanzen. Die gewählten Konzentrationen basieren auf experimentellen Beobachtungen anderer Autoren zur osteogenen Transdifferenzierung von Fibroblasten oder mesenchymalen Stammzellen (Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Peng et al. 2008; Hee & Nicoll 2009; Choi et al. 2011). Allerdings beschrieben einige Autoren insuffiziente Versuche mit Calcitriol (Song et al. 2011; Hee & Nicoll 2009) oder eine notwendige, additive Stimulation mit Parathormon (Sammons et al. 2004) oder 17β-Östradiol (Song et al. 2011). Insbesondere Hee & Nicoll (2009) verwiesen auf die inadäquate Reaktion adulter Zellen auf die

Applikation von Calcitriol, sodass sie eine alters-adjustierte Sensitivität der Zellen diesbezüglich vermuteten. Aus diesem Grund erfolgten die Versuche primär an juvenilen Fibroblasten, welche jedoch in Übereinstimmung mit Daten von Song et al. (2011) nicht vollständig osteogen zu transdifferenzieren waren.

Eine Anwendung im *tissue engineering* gestaltet sich schwierig, weil 10 nM Calcitriol in Analogie zu He et al. (2011) früh die Synthese der alkalischen Phosphatase (und damit deren Enzymdichte), aber nicht die extrazelluläre Kalzifizierung induzieren. Dies gilt insbesondere, weil zumeist juvenile Fibroblasten, pas ≤ 3 verwendet wurden, also jene Subpopulation welche in der Transdifferenzierungsreferenz nachweislich alle Kriterien der Osteogenese erfüllen. Die Entwicklung der alkalischen Phosphatase unter Calcitriol-Medium fokussierend, offenbart sich eine paradoxe Auswertung: Verifiziert die statistische Analyse in Abschnitt 3.3.5 (Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium) keine signifikante Differenz zwischen Kontroll- und Calcitriol-Konfiguration, identifiziert der Vergleich der Transdifferenzierungsmedien einen solchen in der ersten Messung. Außerdem ist zu beachten, dass das Gros der Dexamethason-basierten Experimente keine signifikante Progression der AP-Aktivität binnen sieben Tagen aufwies. Unter Würdigung aller Aspekte und der globalen Entwicklung aller Parameter kann eine singuläre Kausalität der osteogenen Transdifferenzierung durch eines der hier verwendeten Medien ausgeschlossen werden. Denn obwohl sich die Inkubation mit Calcitriol-Medium binnen drei Wochen als insuffizient für juvenile Fibroblasten erwiesen hat, vermag auch das Dexamethason-Medium nur unter Berücksichtigung weiterer Faktoren Fibroblasten zu transdifferenzieren (im Gegensatz zu MSCs: Grigoriadis et al. 1988; Dexheimer et al. 2011).

4.4.4. Änderung der Umgebungsbedingungen

Da sich der pH-Wert des Dexamethason-Mediums bei einstündiger Inkubation im Brutschrank ($pCO_2=5\%$) signifikant reduziert (Zusammenhang von CO_2 und pH-Wert im Dexamethason-Medium), darf auf Grund der Konstanz weiterer Faktoren kausal auf den Kohlendioxid-Partialdruck geschlossen werden. Laut Henry-Gesetz (Henry 1803) erzwingt ein gesteigerter pCO_2 von 5% im Brutschrank eine inkriminierende Entwicklung der negativ geladenen Bikarbonat-Ionen in der Lösung, welche als Puffer fungieren. Ein Einfluss auf die Fällung der Calcium-Ionen (Ca^{2+}) kann nicht ausgeschlossen werden, weshalb das Design der Transdifferenzierungsreferenz eine tägliche, wiederholte Exposition der Raumluft für 15 Minuten vorsieht (siehe 2.9.1). In der Osteogene Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen wird nun keine Exposition vorgenommen, um einen konstanten pH-Wert (= 8,08) zu gewährleisten. Trotz der nur minimalen Modifikation des Versuchsdesigns und der Verwendung juveniler Fibroblasten in Passage 3 illustriert die Quantifizierung deutliche Unterschiede: Sowohl die absolute AP-Enzymaktivität als auch die ARS-Farbstoffmenge steigen signifikant an, es kann jedoch eine mikroskopische, positive Alizarin Rot-Färbung lediglich in zwei von vier Populationen nach drei Wochen beobachtet werden. Mit Blick auf die unzureichende qualitative Kalzifizierung kann nicht von einer vollständigen osteogenen Transdifferenzierung aller Kulturen ausgegangen werden, weshalb der Effekt dieses Faktors als moderat einzuschätzen ist.

Bisher beschrieben andere Autoren einen derartigen Zusammenhang nicht, wenngleich die hier vorgestellten Erkenntnisse die Bedeutung des Puffer-Systems nahe legen. Somit kann auch nicht geklärt werden, ob die Konstanz des pH-Wertes/Bikarbonat-Konzentration die Synthese von für die Osteogenese entscheidender Faktoren (bspw. AP) beeinflusst oder deren Funktion. Eine abschließende Einschätzung der Wirkung auf die Ca^{2+} -Deposition ist nicht möglich.

4.4.5. Inhibition der DNA-Methylierung

Auf Grund der bisher unzureichenden osteogenen Transdifferenzierung von Zellen nach Passage 3 werden diese juvenilen Fibroblasten in der Osteogene Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase experimentell mit 5'-Azacytidin kurz nach Versuchsbeginn inkubiert. Zu diesem

Zeitpunkt beginnt laut Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten (Abschnitt 3.1.2) und Proliferationsreferenz (Abschnitt 3.2.2) die Wachstumsphase dieser Zellart. Nur in dieser Phase kann während direkt nach der Mitose eine Methylierung der Promotoren der Klone für „Differenzierung, Immunabwehr und Hormonsekretion“ (Koch et al. 2011) antagonisiert werden (Bagci & Fisher 2013). Das Alter der Spender verhindert den Transdifferenzierungsprozess nicht (Koch et al. 2011; Katz et al. 2013), wenngleich analoge Veränderungen der Methylierung durch Passagierung auftreten (Koch et al. 2011).

Eine signifikante Veränderung der absoluten AP-Enzymaktivität von Konfigurationen mit (+ Aza) gegenüber jenen ohne 5'-Azacythidin (- Aza) konnte genauso wenig dokumentiert werden (siehe Abb. 46) wie eine signifikante ARS-Färbung. Damit kollidieren diese Aspekte mit den Erkenntnissen anderer Autoren zur Osteogenese dermalen Fibroblasten, welche deren Insuffizienz auf eine verändertes Methylierungsmuster zurückführen (Koch et al. 2011). Cho et al. (2014) war es zudem gelungen in Fibroblasten binnen drei Tagen nach Inkubation mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren eine signifikante Zunahme der AP-Aktivität zu messen. Die Autoren verwendeten jedoch zusätzlich Wnt3a zur Induktion des BMP2-Signalweges um die Synthese osteogener Proteine zu steigern. Somit kompensiert eine simple Inhibition der Methylierung und anschließende Inkubation mit Dexamethason-Medium die Seneszenz-Effekte nicht ausreichend.

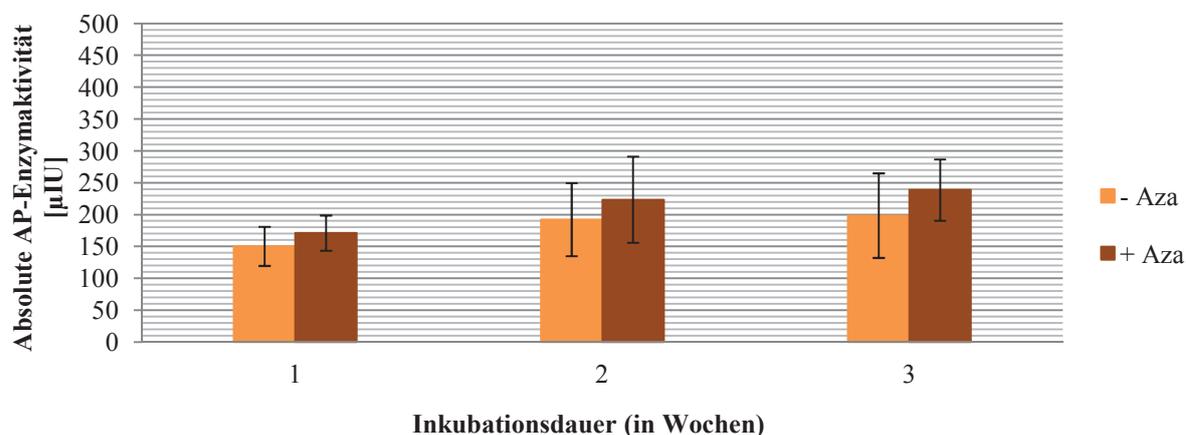


Abb. 46: **Absolute AP-Enzymaktivität der Transdifferenzierungsmodi mit und ohne 5'-Azacythidin**
Die absolute Enzymaktivität (y-Achse) des Versuchsmodus ohne DNA-Methyltransferase-Inhibitor (orange) unterscheidet sich zu keinem Zeitpunkt (x-Achse) signifikant von jener mit 5'-Azacythidin (braun).

Mit Blick auf die von Harris et al. 2011 präsentierten Daten, wonach dermale Fibroblasten zur hämatopoetischen Transdifferenzierung im Gegensatz zu MSCs wiederholte Aza-Applikationen benötigten, liegen unzureichende Quantität und Expositionsdauer oder mangelhafte Responsibilität der dermalen Fibroblasten als mögliche Erklärungsansätze nahe. Im Hinblick auf die langfristige Zielsetzung einer klinischen Anwendung wird auf die weitere Nutzung dieses Kanzerogens verzichtet, zumal bisher der Grund für die hier beschriebene Insuffizienz unklar bleibt.

4.4.6. Änderung des Mediums und Scherstress

Aus der Insuffizienz der ausschließlichen Calcitriol-Exposition und der Abhängigkeit Proteinexpression vom verwendeten Steroidhormon (Zhou et al. 2006), wurde der Ablauf aus je zweiwöchiger Dexamethason- und anschließender Calcitriol-Applikation abgeleitet. Eine serielle Inkubation in Analogie zu Beresford et al. (1994) war notwendig, weil eine simultane Applikation beider Steroide den möglichen osteoinduktiven Effekt konzentrationsabhängig aufzuheben (Chen et al. 2012) oder nur unzureichend zu stimulieren vermag (Guilak et al. 2006; N. Mostafa et al. 2012). Zur Optimierung der Kalzifizierung wurde zweimal täglich für je fünf min Rotationsscherstress induziert (Delaine-Smith et al. 2012).

Während die absolute Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase unter Versuchsbedingungen (267,42 µIU) jene der Kontrolle (178,96 µIU) signifikant übertrifft, objektiviert der t-Test bezüglich der relativen Enzymaktivität in der Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium ein gegenteiliges Bild (Kontrolle: 13,52 IU*cm²/g; Transdifferenzierung: 10,47 IU*cm²/g). Die positive Wirkung dieser Kombination von Glucocorticoiden zeigt sich ebenfalls in Versuchen mit MSCs (Beresford et al. 1994). Währenddessen bleibt es auch binnen 28 Tagen Versuchsdauer trotz Scherstress unmöglich eine extrazelluläre Kalzifizierung zu detektieren, sodass auch diese Versuchsanordnung dermalen Fibroblasten nicht zu transdifferenzieren vermag. Versuche mit analogem Aufbau verwenden allerdings andere Zellen (MSCs: Beresford et al. (1994); Guilak et al. (2006) oder qualitative Kriterien (Osteopontin- und Osteocalcin-mRNA: Beresford et al. (1994)). Nur Guilak et al. (2006) nutzten identische Nachweisverfahren für die Detektion der Osteogenese ihrer adipogenen Stammzellen unter Inkubation von je 10 nM Dexamethason und Calcitriol und erreichten eine Erfolgsquote von 48%.

Somit bleibt auch der von Delaine-Smith et al. (2012) propagierte Effekt des Scherstresses sowohl im Dexamethason- als auch im Calcitriol-Zeitraum aus. Delaine-Smith et al. (2012) beobachteten nach drei Wochen einen entsprechenden Effekt, welcher sich jedoch in Bezug auf die alkalische Phosphatase nicht wiederholen ließ. An dieser Stelle ist einzuschränken, dass die Autoren eine langsamere Frequenz bei längerer Laufzeit (45/min; 60 min) verwendeten. Mit Blick auf die damit verbundene Änderung der Umgebungsbedingungen, deren Einfluss unter 4.4.4 bereits diskutiert wurde, fiel die Entscheidung im Versuchsaufbau eine andere Frequenz und Laufzeit zu wählen.

Durch die Änderung des Versuchsaufbaus in mehr als einem Faktor gegenüber Referenz bzw. Honda et al. (2006) oder Delaine-Smith et al. (2012) ist eine eindeutige, kausale Erklärung für die fehlende Transdifferenzierung nicht möglich:

Name	Passage	Spenderalter	Medium	Dauer (Wochen)	Änderung d. Umgebungsbed.	Scherstress
Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium	pas >3	juvenil	Dexamethason	1.-2.	täglich	75 U/min; 2x5 min
			Calcitriol	3.-4.		
Transdifferenzierungsreferenz	pas ≤3	juvenil	Dexamethason	1.-3.	täglich	Nein
Delaine-Smith et al. 2012	pas ≤3	1 Person; Alter unklar	Dexamethason	1.-3.	täglich	45 U/min; 60 min
Honda et al. 2006	Odontoblasten vom Schwein; Alter und Passage unklar		Kulturmedium	1	täglich	40, 90 oder 120 U/min; 2h

Tabelle 22: Vergleich der Versuchsanordnungen zur Osteogenese mittels Scherstress

Gegenüber dem Design der osteogenen Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium bestehen in allen Versuchsanordnungen mehr als eine Abweichung (rot). Deshalb ist eine Ableitung der Kausalität für die insuffiziente Osteogenese nicht möglich.

Dehnung von Untergrund und Zellen (Jacobs et al. 2013; Mai et al. 2013), laminare Strömung oder Hydrokompression (Yourek et al. 2010) bieten alternative Ansätze zur Erforschung des osteogenen Scherstress-Potenzials. Insbesondere die vielfältigen Kombinationen aus Methoden, Frequenzen und Dauer erschweren bei gleichzeitig nicht-standardisierten Kriterien der Osteogenese deren Aussagekraft und Vergleichbarkeit.

4.4.7. Konfigurationen

Unter Berücksichtigung der zuvor besprochenen Eigenschaften lassen sich die Voraussetzungen und Versuchsaufbau für die osteogene Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten nicht monofaktoriell

erklären. Gleichzeitig illustriert die Transdifferenzierungsreferenz eine prinzipielle Kapazität dieser Zellart. Dadurch kristallisiert sich eine Konfiguration an Faktoren heraus, welche im nachfolgenden Abschnitt diskutiert werden soll:

Bereits **nach einer Woche** Versuchsdauer verdeutlichen die Ergebnisse der Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium unter 3.3.5 den Unterschied zwischen (absoluter) Enzymaktivität und Enzymdichte (relative AP-Enzymaktivität): Existieren keine signifikanten Unterschiede in der absoluten AP-Enzymaktivität gegenüber der Transdifferenzierungsreferenz, so differieren beide bezüglich der Enzymdichte signifikant. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten N. Z. Mostafa et al. (2012) in ihrer Untersuchung von Effekten des Calcitriols auf die Osteogenese, wengleich Zhou et al. (2006) dies auf unterschiedliche Expressionsmuster während der osteogenen Transdifferenzierung zurückführten. Gleichzeitig relativiert diese Erkenntnis den Status der alkalischen Phosphatase als frühem Indikator der Osteogenese (Beresford et al. 1994; Choi et al. 2011; N. Mostafa et al. 2012), denn obwohl die Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium gegenüber der Kontrolle als insuffizient zu betrachten ist, liegt eine signifikante Zunahme der Enzymdichte im Vergleich zur suffizienten Transdifferenzierungsreferenz vor. Zugleich ist dieser Parameter Ausdruck des „*multilayer formation stage*“ (Choi et al. 2011; siehe Abb. 47), zumal in keiner Konfiguration eine Kalzifizierung nachweisbar ist.

In der zweiten Woche ergeben sich identische Ergebnisse in Bezug auf die extrazelluläre Deposition von Hydroxylapatit, wobei dieser sequentielle Ablauf jenem der Stadien nach Choi et al. (2011) entspricht. Analog dazu differieren die absoluten Aktivitäten der alkalischen Phosphatase in Abhängigkeit von der Konfiguration nicht signifikant. Anders als zuvor, reduziert sich der Unterschied zwischen Referenz und Konfiguration mit Calcitriol-Medium auf ein nicht-signifikantes Niveau. Gleichzeitig treten auch nach zwei Wochen keine signifikanten Entwicklungen der Transdifferenzierungsreferenz im Vergleich zu den Transdifferenzierungsbedingungen anderer Versuche auf; lediglich in Bezug auf die Kontrolle sind derartige Effekte in Bezug auf die RunX 2-Expression nachweisbar. Eine starke Proteinexpression als Ausdruck der Initiation der Osteogenese mittels 10 nM Calcitriol, wie von Zhou et al. (2006) für transdifferenzierende MSCs beschrieben, kann auf Fibroblasten nicht übertragen werden.

Auch **in der dritten Woche** übersteigt die Enzymdichte der Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium, in Konkordanz zu Ergebnissen mit MSCs (N. Mostafa et al. 2012), erneut nicht signifikant jene der Transdifferenzierungsreferenz. Allerdings ist anzumerken, dass die absolute Enzymaktivität jener ersten Konfiguration signifikant gegenüber einer Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3 erhöht ist. Beide Gruppen unterscheiden sich jedoch lediglich im Alter der Spender, wengleich ein derartiger Effekt dieses Faktors zuvor nicht nachzuweisen war. Simultan detektiert die Alizarin Rot-Färbung jedoch in dieser Messung eine signifikante Progression der extrazellulären Kalzifizierung juveniler Fibroblasten bis Passage 3 bei Inkubation mit Dexamethason-Medium, was als „*post-mineralization stage*“ (Choi et al. 2011; siehe Abb. 47) definiert wurde. In der näheren Betrachtung bestätigt sich dieser Effekt gegenüber allen anderen Konfigurationen, mit Ausnahme der Osteogene Transdifferenzierung und. Somit ist in diesem Zusammenhang die exponierte Rolle der Transdifferenzierungsreferenz zu erkennen:

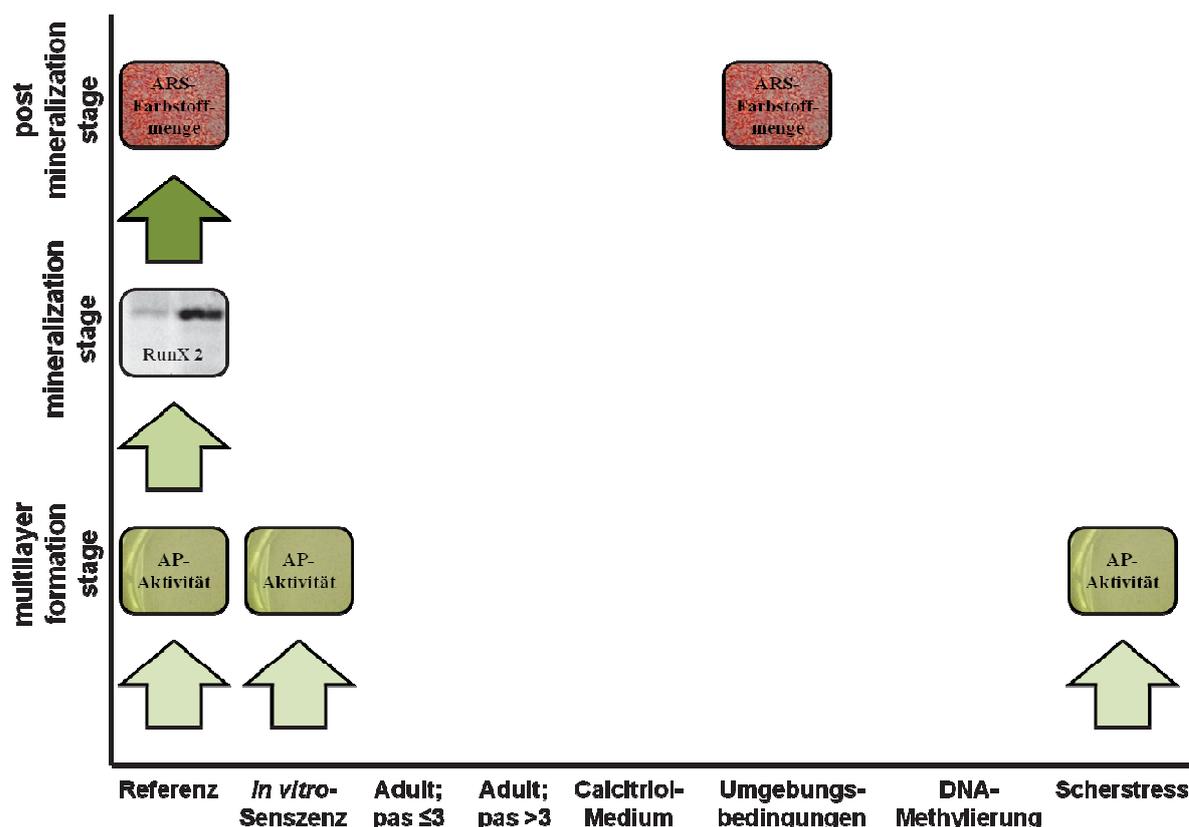


Abb. 47: Übersicht der erreichten Stadien der osteogenen Transdifferenzierung

Die Einteilung in drei Stadien (y-Achse) nach Choi et al. (2011) kann nur für die Transdifferenzierungsreferenz („Referenz“) vollständig nachvollzogen werden. Je nach Faktor (x-Achse) ergeben sich zwar Belege für einzelne Stadien, jedoch nie für einen vollständigen Prozess.

Berücksichtigt wurde nur das erstmalige Auftreten einer signifikanten Zunahme des Parameters gegenüber der Kontrolle. *Western Blots* erfolgten nur bei Signifikanz in den anderen Nachweisverfahren.

In der Gesamtbetrachtung der Auswertung von Unterschieden zwischen den Konfigurationen imponieren zwei unabhängige Effekte: Zum Einen impliziert die Inkubation mit Calcitriol-Medium eine deutliche Steigerung der Enzymdichte in juvenilen Fibroblasten früher Passagen, welche sogar jene der Transdifferenzierungsreferenz übersteigt. Damit müssen allerdings Versuchsanordnungen mit alleiniger AP-Detektion (Beresford et al. 1994; Lavoie et al. 2009; Seib et al. 2009; Philips et al. 2010; Choi et al. 2011; N. Mostafa et al. 2012) als unzureichend eingestuft und Testverfahren zur Nachweis sequentieller Abläufe (Choi et al. 2011) gefordert werden. Zum Anderen manifestiert sich lediglich durch die Kombination von vier Faktoren eine suffiziente Osteogenese: Als obligate Faktoren können juveniles Spenderalter und geringe Passagierung aufgefasst werden. Weiterhin schränkt die unzureichende Transdifferenzierung mittels Calcitriol-Medium die Auswahl von suffizienten Medien auf die Verwendung von Medien mit Dexamethason oder ohne Zusatzstoffe (N. Mostafa et al. 2012) ein. Der Einfluss anderer Bestandteile der Medien (beispielsweise *FBS* (Shahdadfar et al. 2005)) bleibt ungeklärt. Unter zeitlichen Aspekten betrachtet, erfolgt die Erfüllung aller *a priori* definierten Kriterien in Konkordanz mit dem Modell von Choi et al. (2011) erst nach 21 Tagen. Eine kurzfristige Änderung der Umgebungsbedingungen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Osteogenese.

Als mögliche Erklärung für die von einigen Autoren (Wagner et al. 2005; Wada et al. 2010) nicht festzustellende osteogene Transdifferenzierung von Fibroblasten binnen vier Wochen bieten sich die nicht eindeutig definierte Passage bzw. Alter an.

Als Fazit der Analyse der osteogenen Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten lassen sich mehrere Erkenntnisse extrapolieren:

1. Eine Einschätzung bezüglich der osteogenen Transdifferenzierung (dermaler Fibroblasten) ist nur auf Basis allgemeingültiger Kriterien möglich. Dahingehend definiert diese Arbeit umfassende, aber in Kombination eindeutige Kriterien und verwendet zur Quantifizierung geeignete Nachweisverfahren.
2. Nur mittels einer spezifischen Kombination von extrinsischen und intrinsischen Faktoren ist eine suffiziente osteogene Transdifferenzierung möglich. Dazu sind sowohl Juvenilität der Spender, geringe *in vitro*-Passagierung als auch eine Inkubation mit Dexamethason-Medium über mindestens drei Wochen nötig.
3. Calcitriol-Medium, DNA-Methyltransferase-Inhibition und Scherstress haben in den hier getesteten Konzentrationen bzw. Intensitäten nicht die Kapazität zur osteogenen Transdifferenzierung.

4.5. Interaktionen zwischen Proliferation und Transdifferenzierung

Bestätigen die Ergebnisse aus der Transdifferenzierungsreferenz ein osteogenes Potenzial juveniler Fibroblasten $pas \leq 3$, so legen Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten, Proliferationsreferenz und Zytokin-Versuch einen bisher nicht untersuchten Zusammenhang von Proliferation und Transdifferenzierung nahe. Belege liefert das Experiment zum Proliferativer Effekt des Dexamethason-Mediums, welches den Versuchsablauf der Transdifferenzierungsreferenz nachbildet, aber durch seine Auswertung mittels Neubauer-Verfahren nach Lindl & Bauer (2000) Aufschluss über die parallele Proliferation liefert:

Stagnieren die Kontrollen bei juvenilen Zellen $pas \leq 3$ auf Grund der Kontaktinhibition (He et al. 2011), so wachsen die identischen Zellen mit Dexamethason-Medium signifikant zu Kontrolle und Ausgangszellichte während sie sich laut Transdifferenzierungsreferenz parallel transdifferenzieren. Hieraus lässt sich zunächst ein Widerspruch zur Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten (1×10^3 Zellen/cm²) ableiten, da diese in Übereinstimmung mit Ergebnissen zu MSCs (Dexheimer et al. 2011) bereits binnen fünf Tagen ein signifikantes Wachstum Zellen juveniler Donoren belegt. Allerdings differenziert dieses Experiment nicht nach Passage, sodass der zuvor genannte Effekt auch ausschließlich auf Fibroblasten höherer Passagen beruhen könnte. Auch He et al. (2011) verwendeten ausschließlich juvenile Fibroblasten in Passage 3.

Die Proliferation juveniler Zellen $pas > 3$ hebt sich ab der zweiten Woche sowohl in der Kontroll- wie in der Versuchsgruppe signifikant vom *Pendant* $pas \leq 3$ ab. Unter Einfluss des Dexamethason-Mediums kann zwar keine osteogene Transdifferenzierung im Versuch zur Osteogene Transdifferenzierung und *in vitro*-Seneszenz nachvollzogen werden, eine maximale, signifikante Proliferation auf 1049,7% der Ausgangsdichte lässt sich jedoch belegen. Somit implizieren diese Aspekte einen negativen Zusammenhang von Transdifferenzierung und Proliferation (He et al. 2011), wengleich einige Autoren mit Blick auf MSCs dies konträr bewerteten (Dexheimer et al. 2011). Lysy et al. (2007) erklärten dies mit prinzipiellen Unterschieden beider Zellarten. Einen monokausalen Zusammenhang schließen jedoch fehlende Transdifferenzierungen mit adulten Fibroblasten aus (siehe Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender $pas \leq 3$ und Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender $pas > 3$), obwohl diese laut Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten kaum Wachstum aufweisen.

Wie Pujols et al. 2011 publizierten, reduziert Dexamethason dosisabhängig die Proliferation bestimmter Zellarten, was jedoch im Rahmen dieses Versuches für dermale Fibroblasten nicht zu verifizieren ist.

Demonstrierten He et al. (2011) für Kontrollgruppen eine Kontaktinhibition, legt die Wachstumskurve dermaler Fibroblasten juveniler Spender $pas > 3$ aus dem zuvor besprochenen Versuch dessen Aufhebung nahe. Zu diesem Zweck erforscht ein weiteres Experiment die Proliferationswirkung der

Bestandteile des Dexamethason-Mediums auf juvenile Fibroblasten zwischen Passage vier und acht in zwei unterschiedlichen initialen Zelldichten (1×10^3 Zellen/cm² wie im Versuch zuvor und 1×10^4 Zellen/cm²). Hierzu werden die Bestandteile des Dexamethason-Mediums aufgesplittet, einzeln dem Kulturmedium zugesetzt und dieses dann für insgesamt drei Wochen inkubiert. Da sich eine signifikante Zunahme auf die Inkubation mit Dexamethason-Medium bei 1×10^4 Zellen/cm² beschränkt, beeinflusst Dexamethason *per se* die Proliferation nicht (N. Mostafa et al. 2012), wohl aber das Dexamethason-Medium die Kontaktinhibition (und Proliferation).

Die zuvor diskutierten Effekte beeinflussen jedoch auch die Aussagekraft und theoretischen Vorstellungen zu Kriterien der osteogenen Transdifferenzierung, weil hier ein „*multilayer formation stage*“ (Choi et al. 2011) nicht zwingend die osteogene Transdifferenzierung einleitet. Vielmehr scheint eine endogener Antagonismus zur Proliferation und eine Kontaktinhibition notwendig zu sein, wie der Vergleich im Proliferativer Effekt des Dexamethason-Mediums zwischen juvenilen Fibroblasten pas >3 und pas ≤3 gezeigt hat. Zugleich bleibt zu konstatieren, dass adulte Fibroblasten sich sowohl seltener teilen (Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten) als auch nicht transdifferenzieren lassen (*In vitro*-Seneszenz und Spenderalter).

Diese Erkenntnisse werfen jedoch auch Fragen bezüglich der Aussagekraft des *AP-Assays* auf, da dessen Spezifität für den osteoblastären Subtyp gering ist (Seibel 2000; Biver et al. 2012). Zugleich implizieren die in diesem Abschnitt besprochenen Zunahmen der Zelldichte juveniler Zellen pas >3 auch einen globalen Zuwachs der aktiven, fibrogenen alkalischen Phosphatase, wenngleich die Enzymdichte auf der Membran der Fibroblasten nicht zwingend erhöht sein muss. Diese Überlegung liefert nun eine potenzielle (Teil-)Erklärung für die Steigerung der Gesamtproteinmenge und der daraus resultierenden Tendenz zur Abnahme der relativen Parameter im Verlauf der Osteogene Transdifferenzierung.

4.6. Auswirkungen der Seneszenz auf Transdifferenzierung und Proliferation

Wie im Abschnitt über die Effekte einzelner Zytokine, NO und Dexamethason auf Fibroblasten erläutert, beruht eine der möglichen Definitionen von Seneszenz auf dem SASP, welcher durch eine entsprechende Morphologie, Aktivität von *senescence-associated β-Galactosidase* sowie der Genexpression von IL-1α, -6 oder -8 determiniert ist (Orjalo et al. 2009; Kojima et al. 2012). Im folgenden Abschnitt sollen Aspekte der Seneszenz in Bezug auf *in vitro*-Kultivierung und Spenderalter diskutiert werden:

4.6.1. *In vitro*-Seneszenz

Eine zunehmende Passagierung reduziert die Frequenz der Mitosen humaner Fibroblasten und mesenchymaler Stammzellen, was als Ausdruck der *in vitro*-Seneszenz aufgefasst werden kann (Zhou et al. 2008; He et al. 2011). Diese Beobachtung widerspricht den Erkenntnissen der Proliferationsreferenz, wonach eine signifikante Zunahme der Proliferation bei juvenilen Fibroblasten ab Passage 4 zu messen ist. Ein systematischer Bias, durch differierende Stoffwechselaktivitäten in Bezug auf den fluoreszierenden Resazurin-Farbstoff, erwies sich im zuvor erfolgten Viabilitätstest humaner dermaler Fibroblasten als deutlich, aber nicht signifikant. In diesem Versuch emittierte die identische Anzahl an Zellen eine ca. 100% höhere Signalstärke sofern sie in einer niedrigeren Passage (pas ≤3) ausgebracht worden war. Somit kann eine gesteigerte Proliferation, binnen fünf Tagen, in den Passagen 4-8 gegenüber jenen bis Passage 3 belegt werden, was eine Separierung juveniler Fibroblasten anhand dieses Merkmals für weitere Versuchsanordnungen (insbesondere Zytokin-Versuch und Osteogene Transdifferenzierung) zur Folge hat:

Trotz Normierung des Wachstums anhand der individuellen Kontrollgruppe offenbart der Zytokin-Versuch eine deutliche Diskrepanz auf Grundlage des Merkmals *in vitro*-Passage: So kann eine globale, konzentrationsunabhängige Proliferationsreduktion der juvenilen Zellen durch TGF- β und D α /NO für die Gruppe pas ≤ 3 identifiziert werden, wenngleich lediglich FGF-2 Zellen pas >3 in ihrem Wachstum augmentiert. Somit kann eine Seneszenz-abhängige Sensitivität der Populationen postuliert werden.

In der Transdifferenzierungsreferenz erkennt man keine signifikanten Unterschiede bezüglich Gesamtproteinmenge und AP-Enzymaktivität. In der dritten Woche differieren allerdings die Hydroxylapatit-Messungen der Konfigurationen signifikant zu Gunsten der Transdifferenzierungsreferenz mit juvenilen Zellen pas ≤ 3 . Deshalb ist eine osteogene Transdifferenzierung nach den eingangs definierten Kriterien, ähnlich wie bei Delaine-Smith et al. (2012) nur von diesen Fibroblasten erzielt worden. Es existieren jedoch kaum systematische Vergleiche beider Gruppen. Allerdings beschränkt sich diese Unterscheidung auf diesen Versuchsaufbau, weil sich in weiteren Anordnungen mit juvenilen Fibroblasten weder frühe noch späte Passagen osteogen transdifferenzieren lassen (vgl. Osteogene Transdifferenzierung unter 4.4). Somit ist eine Interaktion zwischen spezifischen, externen Faktoren und intrinsischen Eigenschaften nicht auszuschließen. Gleichzeitig ist die artifizielle Kultivierung der Fibroblasten notwendig, weil eine *in vivo* Applikation von Cortisol / Dexamethason zu Osteoporose und Reduktion der Aktivität physiologischer Osteoblasten führen kann (Sereg et al. 2011).

In der Modifikation zur osteogenen Transdifferenzierung variieren die Messwerte beider Gruppen nicht signifikant, weder in Bezug auf Gesamtproteinmenge oder alkalische Phosphatase noch extrazelluläre Kalzifizierung (ARS-Farbstoffmenge). Somit reicht als Voraussetzung zur Osteogenese dermalen Fibroblasten eine geringe Passagierung, wie von Lysy et al. (2007) postuliert, nicht aus. Wird die insuffiziente Osteogenese auf ein verändertes Methylierungsmuster zurückgeführt (Koch et al. 2011), so kann eine derartige monokausale Erklärung mittels unzureichender Osteogenese nach Inkubation mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5'-Azacythidin (Ergebnisse unter 3.3.8) verworfen werden.

Somit haben juvenile Fibroblasten pas ≤ 3 nicht nur die Eigenschaft zur osteogenen Transdifferenzierung mittels Dexamethason-Medium, sondern auch zur parallelen, signifikanten Proliferation gegenüber der Kontrolle (Interaktionen zwischen Proliferation und Transdifferenzierung; Abb. 48). Deshalb erscheint eine Fokussierung auf Zellen früher Passagen (Passage 3 bis 4), unabhängig von Spenderalter oder Zellspezies (Grigoriadis et al. 1988; Guilak et al. 2006; Junker et al. 2009; Dexheimer et al. 2011; Koch et al. 2011; Delaine-Smith et al. 2012; N. Mostafa et al. 2012) sinnvoll, wenngleich diese nicht immer angegeben wird (Beresford et al. 1994; Lorenz et al. 2008; Sommar et al. 2009; Choi et al. 2011). Seneszenz juvenile Zellen transdifferenzieren nicht, wachsen signifikant schneller (gegenüber pas ≤ 3) bzw. ohne Kontaktinhibition (Interaktionen zwischen Proliferation und Transdifferenzierung) und reagieren auf Zytokine anders. Dies widerspricht den Ergebnissen von humanen MSCs, welche eine Konkordanz aus Proliferation und Transdifferenzierung postulieren (Dexheimer et al. 2011). Allerdings belegen Lysy et al. (2007) eine generelle Insuffizienz der Transdifferenzierung ab Passage 4 auch für adipogene, osteogene oder hepatogene Stammzellen.

4.6.2. Spenderalter

Im Vergleich der Wirkungen und Eigenschaften von Fibroblasten juveniler zu adulter Spender bemerken Huschtscha et al. (2012) eine Abhängigkeit der Proliferation in Abhängigkeit vom (juvenilen) Alter der Spender. Die Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten verdeutlicht diesen Zusammenhang durch ein signifikantes Zellwachstum juveniler Spender binnen fünf Tagen. Ein analoger Effekt wird für MSCs kolportiert (Zhou et al. 2008). Deshalb wurde die Sensitivität adulter Fibroblasten auf Zytokine nicht erforscht, wenngleich es Hinweise auf abweichende Effekte gibt (Wolf et al. 2012).

Lassen sich nur juvenile Fibroblasten pas ≤ 3 osteogen transdifferenzieren (Transdifferenzierungsreferenz), während Zellen adulter Spender pas ≤ 3 hierzu nicht befähigt scheinen (Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤ 3 ; Abb. 48), so kommen andere Autoren zu konträren Ergebnissen: Vishnubalaji et al. (2012) beschrieben vergleichbare Prozesse der Osteogenese für juvenile und adulte Fibroblasten ohne jedoch die Passage erfasst zu haben. Doch auch MSCs werden diesbezüglich kontrovers diskutiert, wenngleich lediglich eine Reduktion der proliferativen und osteoinduktiven Kapazität zur Disposition steht (Grigoriadis et al. 1988; Zhou et al. 2008; Dexheimer et al. 2011). Es bleibt allerdings fraglich, in wieweit solche Effekte unabhängig von der Passagierung erörtert werden können (siehe Abb. 48). Deren konträre Auswirkungen auf Transdifferenzierung und Proliferation waren im Abschnitt zuvor diskutiert worden.

Die geringen Kapazitäten im Bereich der Proliferation und Transdifferenzierung adulter Fibroblasten begründen die Konzentration der Ressourcen und Experimente auf die Klasse der juvenilen Zellen, insbesondere da deren teilweise konträre Entwicklung entlang der Passagierungen bisher unverstanden bleibt.

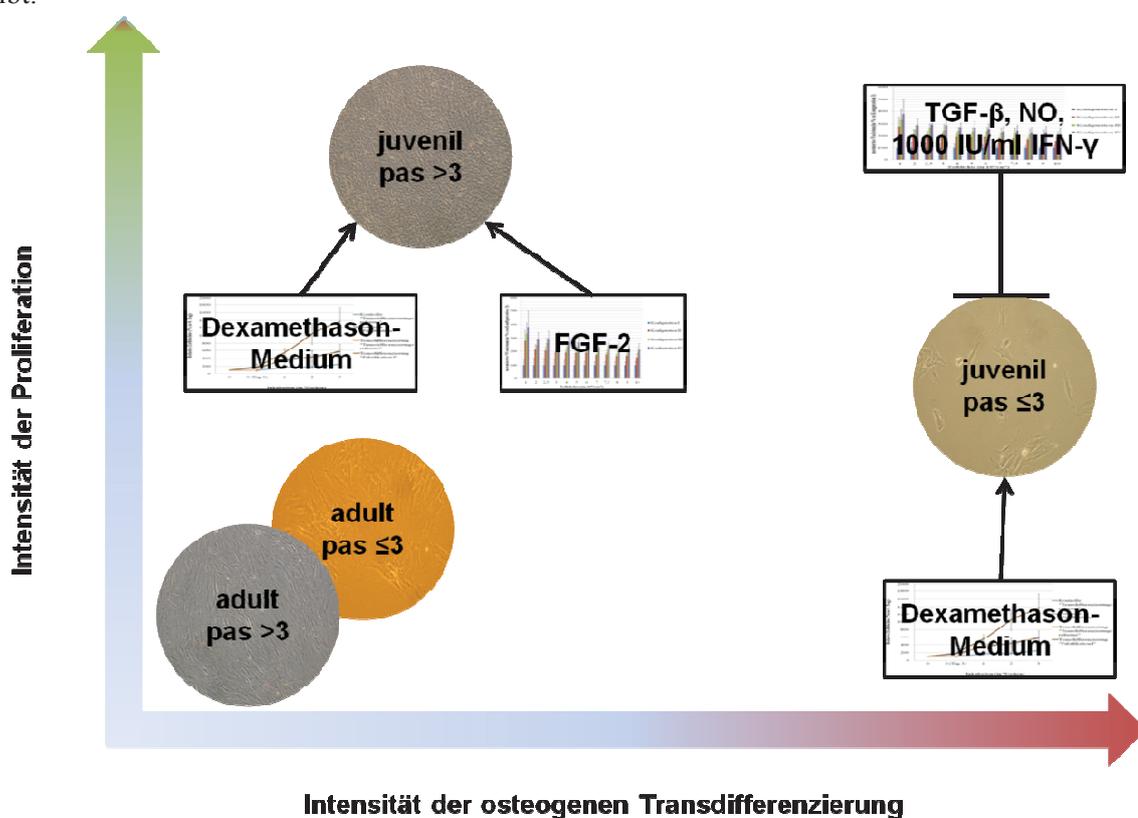


Abb. 48: Schema zu Auswirkungen von Seneszenz und Spenderalter

Die schematische Gegenüberstellung von Proliferation (y-Achse) und der Transdifferenzierung (x-Achse) verdeutlicht deren Intensitäten in Abhängigkeit von Seneszenz und Spenderalter. Adulte Zellen (unterteilt nach Passage; Kreise links unten) weisen in Bezug auf beide Achsen nur eine geringe Entwicklung auf. Juvenile Fibroblasten pas >3 (Kreis links oben) hingegen proliferieren *per se* signifikant schneller, wobei sich dieser Effekt mittels Dexamethason-Medium und FGF-2 steigern lässt. In früheren Passagen (Kreis rechts) ist eine osteogene Transdifferenzierung bei mittlerer Proliferation möglich. Letzteres kann mittels Dexamethason-Medium gesteigert und mit TGF- β , NO oder 1000 IU/ml IFN- γ reduziert werden.

4.7. Schlussfolgerungen

4.7.1. Derzeitige Situation

Da keine standardisierte Methodik zur osteogenen Transdifferenzierung autologer Gewebe, bestehend aus geeigneter Versuchsanordnung und quantifizierender Nachweisverfahren, existieren, sollte ein solches im Rahmen dieser Dissertation für dermale Fibroblasten etabliert werden. Zugleich bedarf jene Standardisierung eine detaillierte Definition des *Designs* und der Kriterien um potenzielle Moderator- oder Mediatorvariablen zu identifizieren (Seong et al. 2010). Zugleich fehlen jedoch Konzepte zur Steigerung des *Outcomes* beim *tissue engineering* von Fibroblasten insgesamt, sodass zusätzlich zur Transdifferenzierung auch die Proliferation primärer Zellen in den Fokus rückt. Letzteres ist ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit, wenngleich die Zytokin-vermittelte Induktion der Proliferation variable, weil durch intrinsische Faktoren moderierte, Effekte aufzeigt (Abschnitt 4.4: Osteogene Transdifferenzierung).

In Folge der Etablierung der Transdifferenzierungsreferenz für die osteogene Transdifferenzierung diskriminieren weitere, modifizierte Versuchsanordnungen systematisch die Relevanz und Effektstärke bereits zuvor beschriebener potenzieller Moderator- oder Mediatorvariablen: Im Gegensatz zur anfänglichen Annahme der Relevanz singulärer Faktoren, muss nun von obligaten Konfigurationen aus Juvenilität, niedriger Passage, Dexamethason-Medium und Variation der Umgebungsbedingungen ausgegangen werden. Damit schließt sich jedoch die Existenz weiterer Faktoren nicht aus, wenngleich deren Effektivität nicht nachzuweisen war. Eine Verwendung von Calcitriol-Medium, Scherstress oder Konstanz der Umgebungsbedingungen boten keine zu detektierende Augmentation der Osteogenese. Auch die Applikation von 5'-Azacytidin zur Kompensation der veränderten Methylierung in höheren Passagen offenbart keinen signifikanten Effekt. Eine abschließende Bewertung dieser Faktoren gestaltet sich jedoch schwierig, da deren Linearität in Bezug auf Intensität, Konzentration oder Dauer (vergleiche bspw. Sommar et al. 2009) nicht vollumfänglich berücksichtigt werden kann. Außerdem sind diese Faktoren stets Bestandteil bestimmter Konfigurationen, sodass eine Abhängigkeit dieser Variablen von anderen Effektoren nicht auszuschließen ist. So könnte beispielsweise ein positiver Einfluss von Calcitriol von der Präsenz weiterer Faktoren abhängig sein (Song et al. 2011). Während also Viereck et al. (2002), Zhou et al. (2006), Hee & Nicoll (2011) sowie N. Mostafa et al. (2012) eine erfolgreiche Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium beschreiben, kommt diese Arbeit wie auch jene anderer Autoren (Beresford et al. 1994; Chen et al. 2012) zu einem konträren Ergebnis.

Mit Blick auf die Proliferation dermalen Fibroblasten kristallisiert sich eine Differenzierung dermalen Fibroblasten heraus, welche sich einerseits auf deren genuine Aktivität und andererseits auf die variable Sensitivität gegenüber bestimmten Zytokinen / Chemokinen stützt: So wachsen adulte Zellen initial signifikant langsamer als ihr juveniles Pendant (Wachstumskinetik juveniler und adulter Fibroblasten). Juvenile Fibroblasten mit geringer Passagierung proliferieren moderat, wenngleich dies durch NO, TGF- β (einem pro-osteogenen Zytokin (Viereck et al. 2002; Stobbe 2008)) und 1000 IU/ml IFN- γ reduziert werden kann, und können mittels Dexamethason-Medium binnen 21 Tagen prinzipiell osteogen transdifferenziert werden. NO interferierte laut Moeen Rezakhanlou et al. (2011) nur geringfügig mit deren Kollagen-Synthese-Kapazität. Juvenile Fibroblasten in fortgeschrittenen Passagen teilen sich mit hoher Frequenz, welche durch FGF-2 zu steigern ist, exprimieren aber keinen osteoblastären Phänotyp. Zu vergleichbaren stimulierenden FGF-2 Effekten gelangte Stobbe (2008) in Bezug auf MSCs, während Song et al. (2013) eine anti-osteogene Wirkung dieses Proteins für MSC-Populationen diskutierten. Außerdem impliziert der fehlende Zellzyklusarrest nach Applikation von Interferon- γ zur Aktivierung von STAT5 unter Umständen eine mangelnde Tumorsuppression in diesen Zellen (Yu et al. 2010). Adulte Fibroblasten, unabhängig von ihrer Passagierung, wachsen

vergleichsweise langsam und transdifferenzieren nicht. Zugleich diskutierten Zhou et al. (2008) analoge Effekte der genuinen Proliferation und Transdifferenzierung für mesenchymale Stammzellen, insbesondere mit Blick auf die abnehmende Kapazität beider Entitäten mit zunehmendem Alter.

Wenngleich bislang keine anerkannte Charakterisierung dermalen Fibroblasten auf Basis von Phänotypisierung oder Genexpression existiert (siehe Komplexität der Abgrenzung verschiedener Stammzell-Populationen) erscheinen die zuvor genannten funktionalen Eigenschaften eine relevante Varianz zwischen Subpopulationen oder heterogenen Suspensionen nahe zu legen (Vishnubalaji et al. 2012). Eine Detektion diskreter Oberflächenproteine erfolgte nicht, weil eine allgemeinverbindliche Definition obligater Marker fehlte (Paunescu et al. 2011, Anhang 1). Zugleich minimiert dies eine potenzielle Abgrenzung zu mesenchymalen Stammzellen (Lysy et al. 2007; Brohem et al. 2013). Viele der diskutierten Faktoren und Versuchsmodi basieren auf experimentellen Transpositionen von MSCs auf das Setting dermalen Fibroblasten. Bisher bietet sich jedoch auf Grund der fehlenden Quantifizierung nicht die Möglichkeit, die *Performances* beider Zellarten vergleichen zu können, zumal zum Teil andere Nachweisverfahren angewendet wurden (bspw. von Kossa Färbung vs. Alizarin Rot Färbung, PCR vs. Western Blot; Lysy et al. 2007; Seong et al. 2010; Vishnubalaji et al. 2012).

Zusätzlich spezifizieren verschiedene Autoren die intrazellulären Abläufe der Transdifferenzierung weiter (Li et al. 2013). Trotz der fehlenden Verifizierung der eingesetzten Zellen als dermale Fibroblasten ist es unzulässig, ein entsprechendes Potenzial zur Transdifferenzierung auszuschließen. Denn auch für diese Haltung fehlen wissenschaftlich fundierte Ergebnisse oder es können analoge Effekte (insbesondere für die Seneszenz) identifiziert werden (Zhou et al. 2008). Zugleich fanden andere Arbeitsgruppen (Jäger et al. 2012) Indizien für „differierende molekulare Mechanismen der Transdifferenzierung“ von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen.

4.7.2. Zukunft des *tissue engineering*s dermalen Fibroblasten

Zunächst bedarf es einer exakten Phänotypisierung und Abgrenzung dermalen Fibroblasten, zumal ausschließlich morphologische Charakterisierung (Revell et al. 2006) unzureichend sind. Insbesondere die mangelhafte Abgrenzung zu mesenchymalen Stammzellen (siehe Anhang 1) oder Keratinozyten impliziert Kontaminationen mit anderen pluripotenten Zellen, welche die hier verwendeten Kulturen zur Osteogenese durch Transdifferenzierung dieser MSCs (Lennon et al. 2000) oder Kokultivierung verschiedener (pluripotenter) Populationen (Terada et al. 2002; Ying et al. 2002; Tsai et al. 2011) befähigen könnten. Dadurch bliebe das Transdifferenzierungspotenzial von Fibroblasten unklar. Um diese Thesen zu Verifizieren sind die Bestimmung distinkter Marker und der quantifizierbare Vergleich proliferativer und osteogener Eigenschaften zu gewährleisten, wenngleich sich dies bisher als schwierig erwies (Vishnubalaji et al. 2012). Zudem erscheint es weiterhin sinnvoll durch Relativierung der quantitativen Messung anhand eines adäquaten Maßes für die Zellzahl (hier anhand der Gesamtproteinkonzentration) die Effektivität des Modells zu bestimmen.

Des Weiteren bedingt die Etablierung quantifizierbarer Nachweisverfahren einen Vergleich der Kapazitäten von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen zur Validierung der Ausbeute des *tissue engineering*. Sekundär ermöglicht die Etablierung einer Referenz eine weitergehende Analyse einzelner Faktoren in bestimmten Konzentrationen und Intensitäten beziehungsweise neue Kombinationen singulärer Parameter, wie dies im Rahmen dieser Dissertationsschrift bereits geschehen ist. Von großem Interesse dürfte die Identifizierung der Kausalität von Seneszenz und Spenderalter in Bezug auf eine osteogene Transdifferenzierung von Fibroblasten und MSCs (Zhou et al. 2008) sein. Diese beinhaltet additional zu einer Abgrenzung von Fibroblasten zu MSCs, um potenzielle Kontaminationen als Biases auszuschließen, auch Ansätze zur Analyse von Proteom und DNA-Methylierung in beiden Zellarten (Stocum 1998; Schellenberg et al. 2011). Zudem diskutieren

Mikuła-Pietrasik et al. (2013) die Idee einer „*bystander senescence*“, eine Form der Zell-Zell-vermittelten Expansion der Seneszenz, in mesothelialen Fibroblasten als Ursache für die konzentrierte Transformation in den seneszenten Phänotyp mittels TGF- β .

Im Hinblick auf die zielsetzende Entwicklung eines vollständigen Modells zur autologen Osteogenese aus dermalen Fibroblasten bedarf es der Verknüpfung zwischen Proliferation einerseits und Transdifferenzierung andererseits (Stocum 1998). Die im Rahmen dieser Dissertation präsentierten Ergebnisse legen nun aber den Schluss nahe, dass beide Aspekte durch gemeinsame Moderatorvariablen (Spenderalter und Passage) korrespondieren. Deshalb erscheinen weitere Forschungsanstrengungen notwendig, um dieses Konzept zu realisieren, zu optimieren und weitere Faktoren zu identifizieren (*FBS*: Shahdadfar et al. 2005). Die hier besprochenen Zytokine scheinen nicht geeignet, da sie einen konträren Einfluss auf die Proliferation juveniler Fibroblasten ausüben. So reduzieren NO, TGF- β und 1000 IU/ml Interferon- γ die Mitose-Frequenz juveniler Fibroblasten in Passage 3 anstatt diese zu steigern. Eine derartige degressive Entwicklung würde jedoch die Bestrebungen zur Etablierung einer klinischen Perspektive konterkarieren. An diesem Punkt muss eine erweiterte Erforschung dieses Komplexes, wie dies durch Rassouli et al. (2011) mittels *CRH*-Stimulation geschehen ist, ansetzen um eine klinische Perspektive der osteogenen Transdifferenzierung dermalen Fibroblasten zu eröffnen. Bisher umfasst dies lediglich eng umschriebene Einsatzfelder mesenchymaler Stammzellen (Gerges 2010).

Unter ökonomischen Gesichtspunkten, welche für einen etwaigen Einsatz von Relevanz sein dürften, ist eine Berechnung der Kosten entscheidend um gegen andere Verfahren rentabel zu sein (ISEG et al. 2011) und die hohe Fallzahlen abdecken zu können (1,65 Millionen stationäre Aufenthalte im Jahr 2009 wegen muskulo-skelettaler Beschwerden; statistisches Bundesamt 2009). Diese wiederum beinhaltet sowohl die Effektivität des Modells im Vergleich zu autologen Transplantationen (Pradel et al. 2006) als auch klinische Aspekte (Transplantationen beinhalten Risiken der Tumorgenese, Wundheilungsstörungen, Infektionen, Abstoßungsreaktion; Vacanti & Vacanti 2007). Andererseits imponiert die einfache Verfügbarkeit und rasche Vermehrung dermalen Fibroblasten im Vergleich zu MSCs (Delaine-Smith et al. 2012). Der grundlagenorientierte Ansatz dieser Arbeit wurde deshalb gegen die Gesamtproteinkonzentration relativiert, wenngleich Letztere als Divisor nur eingeschränkt aussagekräftig ist. An diesem Punkt müssen weitere experimentelle *Settings* ansetzen um Vergleiche zwischen verschiedenen Modellen des *tissue engineering* einerseits und gegenüber konventionellen Methoden andererseits zu gewährleisten. Des Weiteren muss eine Adaptation des Modells an die Erfordernisse klinischer Anwendungen stattfinden, indem beispielsweise das potenziell infektiöse bzw. antigene *FBS* (Shahdadfar et al. 2005) durch geeignete Nährlösungen ersetzt wird (für Proliferation genügt ein Serum-freies Medium: Naveau et al. 2011).

Vielversprechende erste Ergebnisse liefert beispielsweise der komplementäre Ansatz zur Verwendung von miRNAs, welche via Interferenz mit größeren RNA-Sequenzen intrazelluläre Signalkaskaden zur Osteoblastogenese regulieren (Review von He & Hannon 2004; Zhang et al. 2011). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit gezielt die sequentielle Expression bestimmter Proteine und zellulärer Änderungen in Funktion und Morphologie zu beeinflussen (Krause 2008; Gao et al. 2011; Y. Zhang et al. 2011). Zugleich öffnen sich neue Ansätze zur direkten oder indirekten Stimulierung der Proliferation bzw. Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Xie et al. 2013) und der Interdependenzen zwischen externen Einflüssen und miRNAs (Gordeladze et al. 2009).

Weiterhin wird es notwendig sein, intensiv nach Möglichkeiten zu suchen die implantierten Zellen postoperativ vor Apoptose oder Nekrose zu schützen (Stocum 1998; Vacanti & Vacanti 2007). Transdifferenzierte, implantierte Zellen beeinflussen wahrscheinlich auf bisher unbekannt Art und Weise physiologische Prozesse: Unter anderem könnte eine Verwendung von Dexamethason zur artifiziellen Osteoblastogenese osteoporotische Wirkungen (Sereg et al. 2011) nach Implantation

führen. Hierbei dürfte die Sensitivität der Osteoklasten eine entscheidende Rolle spielen (Lacey et al. 1998). Auch die Funktion von Calcitriol unter physiologischen Bedingungen auf die Differenzierung von Prä-Osteoblasten ist umstritten (De Kok et al. 2006). Andererseits eröffnen Erkenntnisse aus derartigen *in vitro*-Experimenten unter Umständen neue Ansätze zur Therapie osteopener Erkrankungen (Nuttall & Gimble 2000; Griffith & Naughton 2002).

5. Zusammenfassung

Um die Nutzung humaner Hautfibroblasten für medizinisch-regenerative Therapieansätze zu optimieren, sucht diese Arbeit nach Faktoren zur Beschleunigung von Proliferation und osteogener Transdifferenzierung. Diesbezügliche Effekte wurden u. a. Zytokinen, Stickstoffmonoxid (NO), Spenderalter, DNA-Methylierung, Passagierung, Transdifferenzierungsmedien, Scherstress und Inkubationsdauer zugeschrieben. Eine systematische Evaluierung dieser Faktoren bzw. deren Wirkung in bestimmten Kombinationen anhand quantifizierbarer Merkmale war bisher nicht erfolgt.

Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte mittels Neubauer-Verfahren oder *Cell Viability Assay*. Nach Kategorisierung nach Spenderalter und Passage konnte das Zellwachstum im Laufe von fünf Tagen verglichen werden. In einem weiteren Schritt wurden Zellen juveniler Donoren in Passage 3 ($pas \leq 3$) und später ($pas > 3$) zwischen dem dritten und fünften Tag mit verschiedenen Konzentrationen von Interleukin-1 β , -6, -8, Interferon- γ , *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF-2) und NO inkubiert und gemessen.

Zur Bestätigung der Transdifferenzierung wurde alkalische Phosphatase (AP) mittels *AP-Assay*, RunX 2 mittels *Western Blot* und Alizarin Rot Färbung (ARS) mittels -Rücklösung detektiert. Um eine Transdifferenzierungsreferenz zu etablieren, wurden juvenile Fibroblasten $pas \leq 3$ über drei Wochen mit Dexamethason-Medium (u. a. 100 nM Dexamethason) inkubiert und die Umgebungsbedingungen täglich kurz verändert. Variationen dieses *Designs* nach Spenderalter, Passage, DNA-Methylierung, Transdifferenzierungsmedium, Umgebungsbedingungen oder Scherstress sollten der Vergleichbarkeit von Ergebnissen der Referenz mit ihren Modifikationen dienen.

Das Wachstum in der Transdifferenzierungsreferenz wurde mittels Neubauer-Verfahren gemessen, um später unter ähnlichen Bedingungen Zellen mit einzelnen Bestandteilen des Dexamethason-Mediums zu inkubieren und mittels *Cell Viability Assay* deren abhängige Proliferation zu quantifizieren.

Die Proliferation juveniler Fibroblasten übertrifft nicht nur signifikant jene adulter Spender, auch nimmt das Wachstum für juvenile Zellen $pas > 3$ gegenüber $pas \leq 3$ signifikant zu. Weiterhin reduzieren TGF- β , 1000 IU/ml Interferon- γ und NO signifikant das Wachstum juveniler Zellen $pas \leq 3$, während FGF-2 die Proliferation für $pas > 3$ verstärkt. Eine osteogene Transdifferenzierung mit jeweils signifikanter AP-Enzymaktivität ab der ersten Woche, RunX 2-Expression eine Woche später und ARS-Quantifizierung in Woche 3 entwickelt sich in der oben beschriebenen Transdifferenzierungsreferenz. Der Vergleich der Ergebnisse der Modifikationen mit jenen der Referenz macht eine Abhängigkeit der Osteogenese von juvenilem Spenderalter, geringer Passagierung und Verwendung von Dexamethason-Medium deutlich. Im Hinblick auf die Interaktion zwischen Proliferation und osteogener Transdifferenzierung zeigt sich eine signifikante Stimulation des Wachstums ausschließlich durch das gesamte Dexamethason-Medium für juvenile Fibroblasten; auch hier mit signifikantem Unterschied zu Gunsten von $pas > 3$ gegenüber $pas \leq 3$.

Somit zeigt diese Arbeit die prinzipielle Potenz humaner Fibroblasten zur osteogenen Transdifferenzierung und damit zur möglichen klinischen Anwendung. Eine Darstellung der Transdifferenzierung als quantifizierbaren, stufenweisen Prozess mittels sequentiellen Nachweisen von AP, RunX 2 bzw. ARS, kann als Ausgangspunkt für weitere Ansätze zur Optimierung dienen. Entgegen bisherigen Erkenntnissen beeinflussen Spenderalter, Seneszenz und Medium sowohl Proliferation als auch Transdifferenzierung erheblich und determinieren damit das Potenzial einer Nutzung dieser Zellart im Rahmen medizinisch-regenerativer Therapieansätze.

Literatur- und Quellenverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Aasen, T. & Belmonte, J.C.I., 2010. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 5(2), pp.371–382.
- abcam, 1998. Buffers and Stock solutions. www.abcam.com. Available at: <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/Buffers%20and%20stock%20solutions.pdf> [Accessed November 1, 2012].
- Adhikari, A., Xu, M. & Chen, Z.J., 2007. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*, 26(22), pp.3214–3226.
- Aguirre, J.I. et al., 2007. Effects of basic fibroblast growth factor and a prostaglandin E2 receptor subtype 4 agonist on osteoblastogenesis and adipogenesis in aged ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(6), pp.877–888.
- Akutsu, M. et al., 2013. Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on macrophage inflammatory protein-3 α production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 42(6), pp.491–498.
- Aloise, A.C. et al., 2014. TGF-beta1 on induced osteogenic differentiation of human dermal fibroblast. *Acta Cirurgica Brasileira*, 29, pp.01–06.
- Alt, E. et al., 2011. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biology of the Cell*, 103(4), pp.197–208.
- Amoh, Y. et al., 2008. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle*, 7(12), pp.1865–1869.
- Anderson, M. et al., 1999. Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes. *Clin Orthop Relat Res.*, 364, pp.231–239.
- Ando, M. et al., 2010. Interleukin 6 enhances glycolysis through expression of the glycolytic enzymes hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3. *J Nihon Med Sch.*, 77(2), pp.97–105.
- Armatas, A.A. et al., 2014. The differential proliferative response of fetal and adult human skin fibroblasts to TGF- β is retained when cultured in the presence of fibronectin or collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), pp.2635–2642.
- Arrington, E. et al., 1996. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (329), pp.300–309.
- Bagci, H. & Fisher, A.G., 2013. DNA Demethylation in Pluripotency and Reprogramming: The Role of Tet Proteins and Cell Division. *Cell Stem Cell*, 13(3), pp.265–269.
- Baglio, S.R. et al., 2013. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene*, 527(1), pp.321–331.

- Bancerek, J. et al., 2013. CDK8 Kinase Phosphorylates Transcription Factor STAT1 to Selectively Regulate the Interferon Response. *Immunity*, 38(2), pp.250–262.
- Bansal, R. et al., 2012. Selective Targeting of Interferon to Stromal Fibroblasts and Pericytes as a Novel Therapeutic Approach to Inhibit Angiogenesis and Tumor Growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(11), pp.2419–2428.
- Barber, R.D. et al., 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological Genomics*, 21(3), pp.389–395.
- Barton, B., 2005. Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 9, pp.737–752.
- Bartsch Jr, G. et al., 2005. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem cells and development*, 14(3), pp.337–348.
- Batista, W.L. et al., 2013. S-Nitrosoglutathione and Endothelial Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide Regulate Compartmentalized Ras S-Nitrosylation and Stimulate Cell Proliferation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(3), pp.221–238.
- Beer, A., 1852. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Annalen der Physik und Chemie*, 86(3), pp.78–88.
- Bennett, C.N. et al., 2005. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 102(9), pp.3324–3329.
- Benninghoff, A. et al., 2008. *Anatomie* 17th ed., München: Elsevier, München.
- Beresford, J. et al., 1994. The effects of dexamethasone and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Archives of oral biology*, 39(11), pp.941–947.
- Bertolini, D.R. et al., 1994. Interleukin 6 production in fetal rat long bone cultures is correlated with PGE₂ release and does not correlate with the extent of bone resorption. *Cytokine*, 6(4), pp.368–375.
- Bertram, H., 2002. *Untersuchungen zur Osteogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen*, Braunschweig: gemeinsame Naturwissenschaftliche Fakultät d. TU Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- Bettinger, C.J. et al., 2005. Three-Dimensional Microfluidic Tissue-Engineering Scaffolds Using a Flexible Biodegradable Polymer. *Adv Mater.*, 18(2), pp.165–169.
- Bhaumik, D. et al., 2009. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8.
- Biver, E. et al., 2012. Fibroblast growth factor 2 inhibits up-regulation of bone morphogenic proteins and their receptors during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(4), pp.737–742.
- Blasi, A. et al., 2011. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Journal of Angiogenesis Research*, 3(1), pp.1–14.

- Bocelli-Tyndall, C. et al., 2010. Fibroblast growth factor 2 and platelet-derived growth factor, but not platelet lysate, induce proliferation-dependent, functional class II major histocompatibility complex antigen in human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.*, 62(12), pp.3815–3825.
- Bortz, J. & Weber, R., 2005. *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler* Springer Medizin verlag., Heidelberg.
- Boyden, L.M. et al., 2002. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *New England Journal of Medicine*, 346(20), pp.1513–1521.
- Braun, T. & Zwerina, J., 2011. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*, 13(4), p.235.
- Brochu, C. et al., 2013. NF- κ B-Dependent Role for Cold-Inducible RNA Binding Protein in Regulating Interleukin 1 β I. E. Gallouzi, ed. *PLoS ONE*, 8(2), p.e57426.
- Brohem, C. et al., 2013. Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. *International Journal of Cosmetic Science*.
- Bruder, S. & Fox, B., 1999. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res.*, 367(Suppl.), pp.68–83.
- Bucala, R. et al., 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.*, 1(1), pp.71–81.
- Byrne, J.A. et al., 2007. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 450(7169), pp.497–502.
- Calenic, B. et al., 2010. Characterization of oral keratinocyte stem cells and prospects of its differentiation to oral epithelial equivalents. *Rom J Morphol Embryol*, 51, pp.641–645.
- Caplan, A., 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*, 9(5), pp.641–650.
- Carroll, C.J. et al., 2013. Regulation of Myocardial Interleukin-6 Expression by p53 and STAT1. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, p.130515073456001.
- Cattan, V. et al., 2011. Mechanical Stimuli-induced Urothelial Differentiation in a Human Tissue-engineered Tubular Genitourinary Graft. *European urology*.
- Chamberlain, C.S. et al., 2013. Interleukin Expression after Injury and the Effects of Interleukin-1 Receptor Antagonist I. P. Androulakis, ed. *PLoS ONE*, 8(8), p.e71631.
- Chamberlain, G. et al., 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11), pp.2739–2749.
- Chambers, M. et al., 2013. IL-4 inhibition of IL-1 induced Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) expression in human fibroblasts involves decreased AP-1 activation via negative crosstalk involving of Jun N-terminal Kinase (JNK). *Experimental Cell Research*, 319(10), pp.1398–1408.
- Chen, F.G. et al., 2007. Clonal analysis of nestin- vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *Journal of Cell Science*, 120(16), pp.2875–2883.
- Chen, H. et al., 2009. TGF- β -induced fibroblast activation protein expression, fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM. *Experimental and molecular pathology*, 87(3), pp.189–194.

- Chen, X. & Thibeault, S.L., 2010. Role of tumor necrosis factor- α in wound repair in human vocal fold fibroblasts. *The Laryngoscope*, 120(9), pp.1819–1825.
- Chen, Y.-C. et al., 2002. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 86(2), pp.348–356.
- Chen, Y.-C. et al., 2012. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 57(5), pp.453–459.
- Choi, K. et al., 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng*, 105(6), pp.586–594.
- Choi, M.-H. et al., 2011. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro*. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 41(4), p.167.
- Cho, Y.-D. et al., 2014. Epigenetic Modifications and Canonical Wnt/Int-1 Class (WNT) Signaling Enable Trans-differentiation of Nonosteogenic Cells into Osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 289(29), pp.20120–20128.
- Chung, Y. & Fu, E., 2013. Crosstalk between Shh and TGF- β Signaling in Cyclosporine-Enhanced Cell Proliferation in Human Gingival Fibroblasts M. Wang, ed. *PLoS ONE*, 8(7), p.e70128.
- Chunmeng, S. & Tianmin, C., 2004. Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. In *Transplantation proceedings*. pp. 1578–1581.
- Coppé, J.-P. et al., 2010. A Human-Like Senescence-Associated Secretory Phenotype Is Conserved in Mouse Cells Dependent on Physiological Oxygen M. V. Blagosklonny, ed. *PLoS ONE*, 5, p.e9188.
- De Coppi, P. et al., 2007. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, 25(1), pp.100–106.
- Coutu, D.L. & Galipeau, J., 2011. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)*, 3(10), p.920.
- Crigler, L. et al., 2007. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. *FASEB J.*, 21(9), pp.2050–2063.
- Croituru-Lamoury, J. et al., 2011. Interferon- γ Regulates the Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Activation of Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO) T. Ikezu, ed. *PLoS ONE*, 6, p.e14698.
- Crop, M. et al., 2010. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.*, 162(3), pp.474–486.
- Damien, C.J. & Parsons, J.R., 1991. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater.*, 2(3), pp.187–208.
- Danielyan, L. et al., 2011. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. *Rejuvenation Res.*, 14(1), pp.3–16.
- Davalos, A.R. et al., 2013. p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *The Journal of Cell Biology*, 201(4), pp.613–629.
- Davatchi, F. et al., 2011. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *International journal of rheumatic diseases*, 14(2), pp.211–215.

- David, M.S., Kelly, E. & Zoellner, H., 2013. Opposite cytokine synthesis by fibroblasts in contact co-culture with osteosarcoma cells compared with transwell co-cultures. *Cytokine*, 62(1), pp.48–51.
- Delaine-Smith, R.M., MacNeil, S. & Reilly, G.C., 2012. Matrix production and collagen structure are enhanced in two types of osteogenic progenitor cells by a simple fluid shear stress stimulus. *European Cells and Materials*, 24.
- Dexheimer, V. et al., 2011. Reduced Reactivation from Dormancy but Maintained Lineage Choice of Human Mesenchymal Stem Cells with Donor Age M. C. Capogrossi, ed. *PLoS ONE*, 6(8), p.e22980.
- Ding, Q.J. et al., 2014. Induction of Trabecular Meshwork Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.
- Donovan, P.J. & Gearhart, J., 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *NATURE-LONDON*-, pp.92–97.
- Ducy, P. et al., 1999. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.*, 13(8), pp.1025–36.
- Ducy, P. et al., 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382(6590), pp.448–452.
- Ducy, P. et al., 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5), pp.747–754.
- Dudás, J. et al., 2011. Tumor-produced, active Interleukin-1 [beta] regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts. *Experimental Cell Research*.
- Eguchi, G., 1995. Introduction: Transdifferentiation. *Seminar in Cell Biology*, 6(3), pp.105–108.
- Eguchi, T. et al., 2013. OstemiR: A Novel Panel of MicroRNA Biomarkers in Osteoblastic and Osteocytic Differentiation from Mesenchymal Stem Cells S. Gronthos, ed. *PLoS ONE*, 8(3), p.e58796.
- Eleftheriadis, T. et al., 2011. Lipopolysaccharide and hypoxia significantly alters interleukin-8 and macrophage chemoattractant protein-1 production by human fibroblasts but not fibrosis related factors. *Hippokratia*, 15(3), p.238.
- Enomoto, H. et al., 2000. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem.*, 275(12), pp.8695–8702.
- Ernst, N. et al., 2010. An improved, standardised protocol for the isolation, enrichment and targeted neural differentiation of Nestin⁺ progenitors from adult human dermis. *Experimental Dermatology*, 19(6), pp.549–555.
- Eskan, M.A. et al., 2008. Interleukin-1 Modulates Proinflammatory Cytokine Production in Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 76(5), pp.2080–2089.
- Felka, T. et al., 2010. Transforming Growth Factor- β 1 and Laminin-111 Cooperate in the Regulation of Expression of Interleukin-6 and Interleukin-8 in Synovial Fibroblasts. *International journal of biomedical science: IJBS*, 6(4), p.289.
- Forterre, S., Zurbriggen, A. & Spreng, D., 2011. In vitro effect of different mediators of apoptosis on canine cranial and caudal cruciate ligament fibroblasts and its reversibility by pancaspase inhibitor zVAD.fmk. *Vet Immunol Immunopathol.*, 139(2-4), pp.264–270.

- Fuentes-Calvo, I. et al., 2013. The small GTPase N-Ras regulates extracellular matrix synthesis, proliferation and migration in fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), pp.2734–2744.
- Fukui, A. et al., 2013. Interleukin-8 and CXCL10 expression in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors. *Microbiol Immunol*, 57(3), pp.198–206.
- Galéra, P. et al., 1992. Effect of transforming growth factor-[beta] 1 (TGF-[beta] 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process* 1. *Experimental cell research*, 200(2), pp.379–392.
- Gamez, B. et al., 2013. MicroRNA-322 (miR-322) and Its Target Protein Tob2 Modulate Osterix (Osx) mRNA Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 288(20), pp.14264–14275.
- Gao, J. et al., 2011. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem.*, 112(7), pp.1844–1856.
- Gerges, C., 2010. *Evidenzbasierte Evaluation der Publikationen im Bereich Tissue Engineering und Regenerative Medizin*, Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf.
- Gillespie, E.F. et al., 2012. Interleukin-6 Production in CD40-Engaged Fibrocytes in Thyroid-Associated Ophthalmopathy: Involvement of Akt and NF- κ B. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(12), pp.7746–7753.
- Glowacki, J., Zhou, S. & Mizuno, S., 2009. Mechanisms of osteoinduction/chondroinduction by demineralized bone. *J Craniofac Surg.*, 20(Suppl 1), pp.634–638.
- Gong, Y. et al., 2001. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107(4), pp.513–523.
- Gordeladze, J. et al., 2009. Concerted stimuli regulating osteo-chondral differentiation from stem cells: phenotype acquisition regulated by microRNAs. *Acta Pharmacol. Sin.*, 30(10), pp.1369–1384.
- Gothard, D., 2009. *Enhanced osteogenic differentiation via chemically engineered aggregation of mouse embryonic stem cells.*, Nottingham: University of Nottingham, UK.
- Gragnani, A. et al., 2013. Keratinocyte growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta gene expression in cultured fibroblasts and keratinocytes from burned patients. *Acta Cirurgica Brasileira*, 28(8), pp.551–558.
- Gregory, C.A. et al., 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*, 329(1), pp.77–84.
- Gregory, C.A. & Prockop, D.J., 2007. Fundamentals of Culture and Characterization of Mesenchymal Stem/Progenitor Cells (MSC) from Bone Marrow Stroma. In *Culture of human stem cells*. Hoboken, NY, pp. 207–232.
- Griffith, L.G. & Naughton, G., 2002. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*, 295(5557), pp.1009–1014.
- Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N. & Aubin, J.E., 1988. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *The Journal of cell biology*, 106(6), pp.2139–2151.

- Grimstad, O. et al., 2011. Cellular sources and inducers of cytokines present in acute wound fluid. *Wound Repair Regen.*, 19(3), pp.337–347.
- Gronroos, E. et al., 2012. Transforming Growth Factor Inhibits Bone Morphogenetic Protein-Induced Transcription through Novel Phosphorylated Smad1/5-Smad3 Complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 32(14), pp.2904–2916.
- Gronthos, S. et al., 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), pp.54–63.
- Gross, M. et al., 2001. Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells. *Oncogenetics*, 20(29), pp.3880–3887.
- Gruchlik, A. et al., 2012. Effect of Gly-Gly-His, Gly-His-Lys and their copper complexes on TNF- α -dependent IL-6 secretion in normal human dermal fibroblasts. *Acta poloniae pharmaceutica*, 69(6), pp.1303–1306.
- Guilak, F. et al., 2006. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 206(1), pp.229–237.
- Hall, B.K. & Miyake, T., 1995. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *International Journal of Developmental Biology*, 39, pp.881–894.
- Hall, B. & Miyake, T., 1992. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anatomy and Embryology*, 186(2), pp.107–124.
- Hall, C.N., Keynes, R.G. & Garthwaite, J., 2009. Cytochrome P450 oxidoreductase participates in nitric oxide consumption by rat brain. *Biochemical Journal*, 419(2), p.411.
- Harris, D.M. et al., 2011. Transformation of Human Mesenchymal Cells and Skin Fibroblasts into Hematopoietic Cells M. Rojas, ed. *PLoS ONE*, 6(6), p.e21250.
- Hashizume, M., Hayakawa, N. & Mihara, M., 2008. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF- α and IL-17. *Rheumatology (Oxford)*, 47(11), pp.1635–1640.
- Hee, C.K. & Nicoll, S.B., 2009. Endogenous bone morphogenetic proteins mediate 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-induced expression of osteoblast differentiation markers in human dermal fibroblasts. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(2), pp.162–168.
- Hee, C.K. & Nicoll, S.B., 2006. Induction of osteoblast differentiation markers in human dermal fibroblasts: potential application to bone tissue engineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, 1, pp.521–524.
- Hee, C. & Nicoll, S., 2011. Differential surface antigen expression and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ responsiveness distinguish human dermal fibroblasts with age-dependent osteogenic differentiation potential from marrow-derived stromal cells in vitro. *Cytotherapy*, 13(5), pp.528–538.
- Hehlgans, T. & Pfeffer, K., 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115(1), pp.1–20.
- He, J. et al., 2011. Bone morphogenetic protein receptor IB as a marker for enrichment of osteogenic precursor-like cells in human dermis. *Arch Dermatol Res.*
- He, L. & Hannon, G., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.*, 5(7), pp.522–531.

- Henry, W., 1803. Experiments on the Quantity of Gases Adsorbed by Water, at Different Temperatures, and under Different Pressures. *Phil. Trans. R. Soc. London*, 93, pp.29–274.
- Honda, M.J. et al., 2006. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. *Bone*, 39(1), pp.125–133.
- Huang, H.-I. et al., 2010. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Engineering Part A*, 16(5), pp.1491–1501.
- Hughes-Fulford, M. & Li, C., 2011. The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization. *J Orthop Surg Res.*, 6(8).
- Hughes-Fulford, M. & Li, C.-F., 2011. The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization. *J Orthop Surg Res*, 6(1), p.8.
- Huschtscha, L. et al., 2012. Enhanced isolation of fibroblasts from human skin explants. *BioTechniques*, 53(4).
- Ilmer, M. I., 2009. *Osteoblasten-induzierte frühe Osteogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen durch Aktivierung des Wnt-Signalweges*, München: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- ISEG et al., 2011. *BARMER GEK Krankenkasse - 26.07.2011 - Report Krankenhaus 2011*
- Ishiguro, Y., Ishiguro, H. & Miyamoto, H., 2013. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition up-regulates interleukin-6 in cancer cells and induces subsequent development of interstitial pneumonia. *Oncotarget*, 4(4), pp.550–559.
- Iwamoto, T. et al., 2009. Influences of interferon-gamma on cell proliferation and interleukin-6 production in Down syndrome derived fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, 54(10), pp.963–969.
- Jäger, K. et al., 2012. RNA-Seq Analysis Reveals Different Dynamics of Differentiation of Human Dermis- and Adipose-Derived Stromal Stem Cells W. Wagner, ed. *PLoS ONE*, 7(6), p.e38833.
- Jacobs, C. et al., 2013. Osteogenic differentiation of periodontal fibroblasts is dependent on the strength of mechanical strain. *Archives of Oral Biology*.
- Jähn, K. et al., 2010. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *European Cells and Materials*, 20, pp.149–161.
- Jahoda, C. et al., 2003. Hair follicle dermal cells differentiate into adipogenic and osteogenic lineages. *Exp Dermatol.*, 12(6), pp.849–859.
- Jaiswal, R.K. et al., 2000. Adult Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation to the Osteogenic or Adipogenic Lineage Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of biological chemistry*, 275(13), pp.9645–9652.
- Janicki, P. & Schmidbauer, G., 2011. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*.
- Jekabsons, K. et al., 2011. Culture-expanded human dermal stem cells exhibit donor to donor differences in cAMP generation. *Cell and Tissue Research*, 345(2), pp.253–263.
- Jeney, F. et al., 2000. Cytochemical studies on the fibroblast-preadipocyte relationships in cultured fibroblast cell lines. *Acta Histochem.*, 102(4), pp.381–389.

- Jeong, J.-H. et al., 2008. Expression of Runx2 transcription factor in non-skeletal tissues, sperm and brain. *Journal of Cellular Physiology*, 217(2), pp.511–517.
- Ji, J. et al., 2010. Activation of adventitial fibroblasts in the early stage of the aortic transplant vasculopathy in rat. *Transplantation*, 89(8), pp.945–953.
- Jin, K. & Greenberg, D.A., 2003. Tales of transdifferentiation. *experimental Neurology*, 183(2), pp.255–257.
- Johnstone, B. et al., 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.*, 238(1), pp.265–272.
- Jorgensen, C. & Noel, D., 2012. Mesenchymal stem cells in osteoarticular diseases: an update. *Int J Mol Cell Med Winter*, 1(1), p.2.
- Junicho, A. et al., 2000. Protein Inhibitor of Activated STAT3 Regulates Androgen Receptor Signaling in Prostate Carcinoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(1), pp.9–13.
- Junker, J.P. et al., 2009. Adipogenic, Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Clonally Derived Human Dermal Fibroblasts. *cells tissue organs 2010*, 191, pp.105–118.
- Karsenty, G., 1999. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.*, 13(23), pp.3037–51.
- Katz, L.S., Geras-Raaka, E. & Gershengorn, M.C., 2013. Reprogramming Adult Human Dermal Fibroblasts to Islet-Like Cells by Epigenetic Modification Coupled to Transcription Factor Modulation. *Stem Cells and Development*, 22(18), pp.2551–2560.
- Kern, S. et al., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24(5), pp.1294–1301.
- Kim, S.S. et al., 2012. Differentiation and characteristics of undifferentiated mesenchymal stem cells originating from adult premolar periodontal ligaments. *The Korean Journal of Orthodontics*, 42(6), p.307.
- Kim, Y. et al., 2010. Effects of fibroblast growth factor-2 on the expression and regulation of chemokines in human dental pulp cells. *J Endod.*, 36(11), pp.1824–1830.
- Koch, C.M. et al., 2011. Specific Age-Associated DNA Methylation Changes in Human Dermal Fibroblasts F. Lyko, ed. *PLoS ONE*, 6(2), p.e16679.
- Kojima, H. et al., 2012. The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle*, 11(4), pp.730–739.
- De Kok, I.J. et al., 2006. Effect of vitamin D pretreatment of human mesenchymal stem cells on ectopic bone formation. *Journal of Oral Implantology*, 32(3), pp.103–109.
- Kotton, D.N., 2010. SOP for Human Dermal Fibroblast Isolation.
- Krause, S., 2008. *Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung auf mRNA- und microRNA-Ebene*, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Kroll, K., 2007. *Die Rolle aktivierter Leukozyten für die Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks*, Hohe Medizinische Fakultät der Ruhr-Universität Bochum:

Chirurgische Klinik und Poliklinik am genossenschaftlichen Universitätsklinikum Bergmannsheil der Ruhr-Universität Bochum.

- Kronsteiner, B. et al., 2011. Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Amnion Influence T-Cells Depending on Stimulation Method and Presence of Other Immune Cells. *Stem Cells and Development*, p.110419131928099.
- Lacey, D.L. et al., 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2), pp.165–176.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lai, W., Krishnappa, V. & Phinney, D., 2011. Fibroblast Growth Factor 2 (Fgf2) Inhibits Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Inducing Twist2 and Spry4, Blocking Extracellular Regulated Kinase Activation, and Altering Fgf Receptor Expression Levels. *Stem Cells*, 29(7), pp.1102–1111.
- Lane, J., Tomin, E. & Bostrom, M., 1999. Biosynthetic bone grafting. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (367 Suppl.), pp.107–117.
- Lavoie, J.-F. et al., 2009. Skin-Derived Precursors Differentiate Into Skeletogenic Cell Types and Contribute to Bone Repair. *Stem Cells and Development*, 18(6), pp.893–906.
- Lecanda, F., Avioli, L. & Cheng, S., 1997. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem.*, 67(3), pp.386–396.
- Leclerc, P. et al., 2013. IL-1 β /HMGB1 Complexes Promote The PGE₂ Biosynthesis Pathway in Synovial Fibroblasts. *Scandinavian Journal of Immunology*, 77(5), pp.350–360.
- Lee, A. et al., 2013. Tumor Necrosis Factor α Induces Sustained Signaling and a Prolonged and Unremitting Inflammatory Response in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, 65(4), pp.928–938.
- Lee, E.H. & Hui, J.H., 2006. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*, 88(7), pp.841–851.
- Lee, J.-H. et al., 2012. Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Cell and Tissue Research*, 348(3), pp.475–484.
- Lee, S.-T. et al., 2011. Direct Generation of Neurosphere-Like Cells from Human Dermal Fibroblasts D. T. Covas, ed. *PLoS ONE*, 6(7), p.e21801.
- Lee, T.H. et al., 1993. Transcriptional regulation of TSG6, a tumor necrosis factor-and interleukin-1-inducible primary response gene coding for a secreted hyaluronan-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), pp.6154–6160.
- Lee, Y. et al., 2009. Inhibition of IL-1 β -mediated inflammatory responses by the IkappaB alpha super-repressor in human fibroblast-like synoviocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 378(1), pp.90–94.
- Lee, Y.-A. et al., 2012. Synergy between adiponectin and interleukin-1 β on the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in fibroblast-like synoviocytes. *Experimental & Molecular Medicine*, 44(7), p.440.

- Leff, D., 1983. New biological assembly line. In *The Cell: inter- and intra-relationship*. New Jersey: Avery Publishing Group, pp. 20–27.
- Lehmann, U., 2002. SHP2 and SOCS3 Contribute to Tyr-759-dependent Attenuation of Interleukin-6 Signaling through gp130. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), pp.661–671.
- Lennon, D. et al., 2000. Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Dev Dyn.*, 219(1), pp.50–62.
- Lennon, D., Edmison, J. & Caplan, A., 2001. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J Cell Physiol.*, 187(2), pp.345–355.
- Lindl, T. & Bauer, J., 2000. *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, Heidelberg: Spektrum, akademischer Verlag.
- Liu, F. et al., 2008. Changes in the expression of CD106, osteogenic genes, and transcription factors involved in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of bone and mineral metabolism*, 26(4), pp.312–320.
- Li, Y. et al., 2013. Namp1 expression increases during osteogenic differentiation of multi- and omnipotent progenitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(1), pp.117–123.
- Long, M., 2001. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis.*, 27(3), pp.677–690.
- Lorenz, K. et al., 2008. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts - Experimental Dermatology. , 17(11), pp.925–932.
- Lowry, W.E. et al., 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 105(8), pp.2883–2888.
- Lu, W. et al., 2011. Mixture of Fibroblasts and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Can Improve Epidermal Morphogenesis of Tissue-Engineered Skin. *Cells Tissues Organs*.
- Lysy, P.A. et al., 2007. Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology*, 46(5), pp.1574–1585.
- Mackay, A.M. et al., 1998. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.*, 4(4), pp.415–428.
- Magnusson, P. & Farley, J.R., 2002. Differences in sialic acid residues among bone alkaline phosphatase isoforms: a physical, biochemical, and immunological characterization. *Calcified Tissue Int*, 71(6), pp.508–518.
- Magnusson, P., Sharp, C.A. & Farley, J.R., 2002. Different distributions of human bone alkaline phosphatase isoforms in serum and bone tissue extracts. *Clinica chimica acta*, 325(1), pp.59–70.
- Mai, Z. et al., 2013. Single Bout Short Duration Fluid Shear Stress Induces Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Cells via Integrin β 1 and BMP2 Signaling Cross-Talk X.-M. Shi, ed. *PLoS ONE*, 8(4), p.e61600.
- Maragos, C.M. et al., 1993. Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the in vitro proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer research*, 53(3), pp.564–568.

- Mattyasovszky, S.G. et al., 2010. The effect of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α on human joint capsule myofibroblasts.
- Meisel, R. et al., 2011. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Leukemia*, 25(4), pp.648–654.
- Meyers, S. et al., 1996. AML-2 is a potential target for transcriptional regulation by the the t(8;21) and t(12;21) fusion proteins in acute leukemia. *Oncogene*, 13(2), pp.303–312.
- Miettinen, J. et al., 2011. Tumor necrosis factor alpha promotes the expression of immunosuppressive proteins and enhances the cell growth in a human bone marrow-derived stem cell culture. *Exp Cell Res.*, 317(6), pp.791–801.
- Mikuła-Pietrasik, J. et al., 2013. Bystander senescence in human peritoneal mesothelium and fibroblasts is related to thrombospondin-1-dependent activation of transforming growth factor- β 1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(9), pp.2087–2096.
- Miyazawa, K., Mori, A. & Okudaira, H., 1998. Regulation of interleukin-1 β -induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by glucocorticoids. *J Biochem.*, 124(6), pp.1130–1137.
- Miyazono, K., Kamiya, Y. & Morikawa, M., 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.*, 147(1), pp.35–51.
- Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T., 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(3), pp.251–263.
- Mizuno, S. & Glowacki, J., 2005. Low Oxygen Tension Enhances Chondroinduction by Demineralized Bone Matrix in Human Dermal Fibroblasts in vitro. *Cells Tissues Organs*, 180(3), pp.151–158.
- Moeen Rezakhanlou, A. et al., 2011. Gaseous nitric oxide exhibits minimal effect on skin fibroblast extracellular matrix gene expression and immune cell viability. *Cell Biology International*, 35(4), pp.407–415.
- Montesano, A. et al., 2013. Modulation of Cell Cycle Progression by 5-Azacytidine Is Associated with Early Myogenesis Induction in Murine Myoblasts. *International Journal of Biological Sciences*, 9(4), pp.391–402.
- Mostafa, N. et al., 2012. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured with dexamethasone, vitamin D3, basic fibroblast growth factor, and bone morphogenetic protein-2. *Connect Tissue Res.*, 53(2), pp.117–131.
- Mostafa, N.Z. et al., 2011. In vitro osteogenic induction of human gingival fibroblasts for bone regeneration. *The open dentistry journal*, 5, p.139.
- Mostafa, N.Z. et al., 2012. Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Cultured with Dexamethasone, Vitamin D3, Basic Fibroblast Growth Factor, and Bone Morphogenetic Protein-2. *Connective Tissue Research*, 53(2), pp.117–131.
- Mueller, L. et al., 2010. TNF- α similarly induces IL-6 and MCP-1 in fibroblasts from colorectal liver metastases and normal liver fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.*, 397(3), pp.586–591.

- Mumme, M. et al., 2012. Interleukin-1 β modulates endochondral ossification by human adult bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater*, 24, pp.224–236.
- Naveau, A. et al., 2011. Phenotypic Study of Human Gingival Fibroblasts in a Medium Enriched With Platelet Lysate. *Journal of Periodontology*, 82, pp.632–641.
- Nemenoff, R., 2012. Wound Healing: a Role for HDACs in Inhibition of Fibroblast Proliferation Through Repression of PDGF Receptor- . Focus on “Repression Of PDGF-R- After Cellular Injury Involves TNF- , Formation of a c-Fos-YY1 Complex, and Negative Regulation by HDAC.” *AJP: Cell Physiology*, 302(11), pp.C1588–C1589.
- Nerem, R.M., 1992. Tissue engineering in the USA. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 30(4), pp.CE8–CE12.
- Niger, C., Howell, F.D. & Stains, J.P., 2010. Interleukin-1 β increases gap junctional communication among synovial fibroblasts via the extracellular-signal-regulated kinase pathway. *Biology of the Cell*, 102(1), pp.37–49.
- Nowak, J.A. & Fuchs, E., 2009. Isolation and Culture of Epithelial Stem Cells. In J. Audet & W. L. Stanford, eds. *Stem Cells in Regenerative Medicine*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 215–232.
- Nuttall, M.E. & Gimble, J.M., 2000. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone*, 27(2), pp.177–184.
- Ohtani, T. et al., 2000. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3-and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity*, 12(1), pp.95–105.
- Oklund, S. et al., 1986. Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop Relat Res.*, 205, pp.269–291.
- Orjalo, A.V. et al., 2009. Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(40), pp.17031–17036.
- Paland, N. et al., 2009. Differential influence of normal and cancer-associated fibroblasts on the growth of human epithelial cells in an in vitro cocultivation model of prostate cancer. *Mol Cancer Res.*, 7(8), pp.1212–1223.
- Pallua, N. & Suschek, C. eds., 2011. *Tissue Engineering: From Lab to Clinic*, Aachen: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Park, J., 2011. Effects of fibroblast growth factor 2 on osteoblastic proliferation and differentiation by regulating bone morphogenetic protein receptor expression. *J Craniofac Surg.*, 22(5), pp.1880–1882.
- Paunescu, V. et al., 2011. Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J Cell Mol Med.*, 15(3), pp.635–646.
- Pauwels, F., 1948. Die Bedeutung der Bauprinzipien des Stütz- und Bewegungsapparates für die Beanspruchung der Röhrenknochen - Erster Beitrag zur funktionellen Anatomie und kausalen Morphologie des Stützapparates. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 144, pp.129–166.
- Pauwels, F., 1955. Über die Verteilung der Spongiosadichte im coxalen Femurende und ihre Bedeutung für die Lehre vom funktionellen Bau des Knochens - Siebenter Beitrag zur funktionellen Anatomie und kausalen Morphologie des Stützapparates. *Morph. Jb*, 95, pp.35–54.

- Peng, L. et al., 2008. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem Cells and Development*, 17(4), pp.761–774.
- Philips, N. et al., 2010. Stimulation of cell proliferation and expression of matrixmetalloproteinase-1 and interleukin-8 genes in dermal fibroblasts by copper. *Connect Tissue Res.*, 51(3), pp.224–229.
- Phillips, J.E., Guldborg, R.E. & García, A.J., 2007. Dermal Fibroblasts Genetically Modified to Express Runx2/Cbfa1 as a Mineralizing Cell Source for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 13(8), pp.2029–2040.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), pp.143–147.
- Van der Plas, A. & Nijweide, P., 1988. Cell-cell interactions in the osteogenic compartment of bone. *Bone*, 9(2), pp.107–111.
- Pradel, W., Eckelt, U. & Lauer, G., 2006. Bone regeneration after enucleation of mandibular cysts: comparing autogenous grafts from tissue-engineered bone and iliac bone. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101(3), pp.285–290.
- Promega Corp., 2011. Cell Viability. In *Protocols & Applications Guide*. pp. 401–423.
- Promega Corp., 2009. *ECL Western Blotting Substrate*, USA: Promega Corp.
- Pujols, L. et al., 2011. Lower sensitivity of nasal polyp fibroblasts to glucocorticoid anti-proliferative effects. *Respir Med.*, 105(2), pp.218–225.
- Qi, H. et al., 2003. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(6), pp.3305–3310.
- Qi, J. et al., 2011. Gap junctions in IL-1 β -mediated cell survival response to strain. *J Appl Physiol.*, 110(5), pp.1425–1431.
- Rakar, J. et al., 2012. Interpreted gene expression of human dermal fibroblasts after adipo-, chondro- and osteogenic phenotype shifts. *Differentiation*, 84(4), pp.305–313.
- Rassouli, O. et al., 2011. A Novel Role of Peripheral Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) on Dermal Fibroblasts I. A. Hansen, ed. *PLoS ONE*, 6(7), p.e21654.
- Rawadi, G. et al., 2003. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res.*, 18(10), pp.1842–1853.
- Revell, C.M. et al., 2006. Characterization of fibroblast morphology on bioactive surfaces using vertical scanning interferometry. *Matrix biology*, 25(8), pp.523–533.
- Reyes, M. et al., 2009. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 113(10), pp.2615–2625.
- Rose, K., 2011. Interaction of ATP with fibroblast growth factor 2: biochemical characterization and consequence for growth factor stability. *BMC biochemistry*, 12(1), p.14.
- Rutherford, R.B. et al., 2002. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. *Tissue Engineering*, 8(3), pp.441–452.

- Sammons, J. et al., 2004. The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: Effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D3. *Stem cells and development*, 13(3), pp.273–280.
- Sawada, S. et al., 2013. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6. *Biomedical Research*, 34(1), pp.31–40.
- Schauer, I.G. et al., 2013. Interleukin-1 β Promotes Ovarian Tumorigenesis through a p53/NF- κ B-Mediated Inflammatory Response in Stromal Fibroblasts. *Neoplasia (New York, NY)*, 15(4), p.409.
- Schellenberg, A. et al., 2011. Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *Aging (Albany NY)*, 3(9), p.873.
- Schlüter, H. et al., 2011. Functional Characterization of Quiescent Keratinocyte Stem Cells and Their Progeny Reveals a Hierarchical Organization in Human Skin Epidermis. *Stem Cells*, 29(8), pp.1256–1268.
- Seibel, M., 2000. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporosis International*, 11(Supplement 6), pp.S18–29.
- Seib, F.P. et al., 2009. Endogenous bone morphogenetic proteins in human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *European journal of cell biology*, 88(5), pp.257–271.
- Seidel, P. et al., 2010. Inhibition of NF- κ B and AP-1 by dimethylfumarate correlates with down-regulated IL-6 secretion and proliferation in human lung fibroblasts. *Swiss Med Wkly.*, 140.
- Sekiya, I. et al., 2002. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, 20(6), pp.530–541.
- Selige, J. et al., 2010. Cytokine-dependent balance of mitogenic effects in primary human lung fibroblasts related to cyclic AMP signaling and phosphodiesterase 4 inhibition. *J Cell Physiol.*, 223(3), pp.317–326.
- Selige, J., Hatzelmann, A. & Dunkern, T., 2011. The differential impact of PDE4 subtypes in human lung fibroblasts on cytokine-induced proliferation and myofibroblast conversion. *J Cell Physiol.*, 226(8), pp.1970–1980.
- Seong, J.M. et al., 2010. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical Materials*, 5, p.062001.
- Seo, T. et al., 2011. Synergic induction of human periodontal ligament fibroblast cell death by nitric oxide and N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 41(1), p.17.
- Sereg, M. et al., 2011. Diagnostic performance of salivary cortisol and serum osteocalcin measurements in patients with overt and subclinical Cushing's syndrome. *Steroids*, 76(1-2), pp.38–42.
- Seyedin, S. et al., 1986. Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.*, 261(1), pp.5693–5695.
- Shahdadfar, A. et al., 2005. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*, 23(9), pp.1357–1366.

- Shi, K. et al., 2013. MicroRNA-214 suppresses osteogenic differentiation of C2C12 myoblast cells by targeting Osterix. *Bone*, 55(2), pp.487–494.
- Siegel, G. et al., 2013. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC medicine*, 11(1), p.146.
- Sigma-Aldrich Co., 1993. Enzymatic Assay of Phosphatase, Alkaline (EC 3.1.3.1) - Glycine Assay.
- Sigma-Aldrich Co., 2011. ProductInformation - Phosphatase Substrates.
- Sinfield, J.K. et al., 2013. p38 MAPK alpha mediates cytokine-induced IL-6 and MMP-3 expression in human cardiac fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), pp.419–424.
- Siqueira, M.F. et al., 2009. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- α dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia*, 53, pp.378–388.
- Skalak, R. & Fox, C.F., 1988. *Tissue engineering: proceedings of a workshop*, Lake Tahoe, USA: Liss, New York.
- Skuban, T., 2009. *Funktionsorientierte Analyse der Trabekelstruktur des proximalen Femurs*. München, Univ., Diss., 2009.
- Smith, P.K. et al., 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), pp.76–85.
- Sommar, P. et al., 2009. Engineering three-dimensional cartilage- and bone-like tissues using human dermal fibroblasts and macroporous gelatine microcarriers. *Journal of plastic, reconstructive and aesthetic surgery*, 63(6), pp.1036–1046.
- Song, L., Zhang, X. & Zhou, Y., 2011. A synergetic role of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in 17 β -estradiol induced-proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Eur J Pharmacol.*, 659(2-3), pp.273–280.
- Song, T. et al., 2013. Fibroblast growth factor 2 inhibits bone morphogenetic protein 9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by repressing Smads signaling and subsequently reducing Smads dependent up-regulation of ALK1 and ALK2. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Spitler, R. et al., 2013. Nitrosyl-cobinamide (NO-Cbi), a new nitric oxide donor, improves wound healing through cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Cellular Signalling*.
- Stahl, N. et al., 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, 263(5143), pp.92–95.
- statistisches Bundesamt, 2009. *Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle)*, statistisches Bundesamt Deutschland.
- Stewart, K. et al., 2003. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell and Tissue Research*, 313(3), pp.281–290.
- Stobbe, D., 2008. *The Role of bFGF, IGF-I, PDGF and TGF- β in the Expression of the Osteogenic Phenotype in Human Marrow-Derived Bone-Like Cells In Culture*, München: LMU München.

- Stocum, D., 1998. Regenerative biology and engineering: strategies for tissue restoration. *Wound Repair Regen.*, 6(4), pp.276–290.
- Strong, D.M. et al., 1996. Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (326), pp.107–114.
- Takahashi, K. et al., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), pp.861–872.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), pp.663–676.
- Tanaka, Y. et al., 2011. Six-transmembrane epithelial antigen of prostate4 (STEAP4) is a tumor necrosis factor alpha-induced protein that regulates IL-6, IL-8, and cell proliferation in synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology*.
- Terada, N. et al., 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416(6880), pp.542–545.
- Toma, J.G. et al., 2005. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 23(6), pp.727–737.
- Toma, J.G. et al., 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.*, 3(9), pp.778–784.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9), pp.4350–4354.
- Tsai, M.-T. et al., 2011. Osteogenic differentiation is synergistically influenced by osteoinductive treatment and direct cell–cell contact between murine osteoblasts and mesenchymal stem cells. *International Orthopaedics*, 36(1), pp.199–205.
- Udagawa, N. et al., 1995. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), pp.1461–1468.
- Ueno, M. et al., 2011. Influence of internal fixator stiffness on murine fracture healing: two types of fracture healing lead to two distinct cellular events and FGF-2 expressions. *Exp Anim.*, 60(1), pp.79–87.
- Vacanti, J.P. & Vacanti, C.A., 2007. The History and Scope of Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering*, 3(Chapter I), pp.1–4.
- Viereck, V. et al., 2002. Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem.*, 86(2), pp.348–356.
- Vishnubalaji, R. et al., 2012. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells. *BMC developmental biology*, 12(1), p.7.
- Visser, R. et al., 2012. Basic fibroblast growth factor enhances the osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic protein-6 in vitro and in vivo. *Cytokine*, 58(1), pp.27–33.
- Wada, N., Bartold, P.M. & Gronthos, S., 2010. Human foreskin fibroblasts exert immunomodulatory properties by a different mechanism to bone marrow stromal/stem cells. *Stem cells and development*, 20(4), pp.647–659.

- Wagner, W. et al., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33(11), pp.1402–1416.
- Waldherr, K. & Christodoulides, P., 2008. Psychologische Methodenlehre und Statistik II.
- Wang, H.-S. et al., 2004. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*, 22(7), pp.1330–1337.
- Webb, A., Li, A. & Kaur, P., 2004. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*, 72(8), pp.387–395.
- Williams, T.W.J., 1946. The differentiation of placoid, ctenoid and cycloid scales by means of alizarin red S. *Stain Technol.*, 21, pp.55–58.
- Wolf, J. et al., 2012. The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts. *Experimental Gerontology*, 47(9), pp.749–753.
- Xie, Y.-F. et al., 2013. MicroRNA-146 inhibits pro-inflammatory cytokine secretion through IL-1 receptor-associated kinase 1 in human gingival fibroblasts. *Journal of Inflammation*, 10(1), p.20.
- Yamaoka, E. et al., 2011. Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells. *Int J Oncol.*, 39(1), pp.5–11.
- Yan, S. et al., 2011. Effects of technetium-99 methylenediphosphonate on cytokine-induced activation of retro-ocular fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. *Nucl Med Commun.*, 32(2), pp.142–146.
- Yaszemski, M.J. et al., 1996. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials*, 17(2), pp.175–185.
- Ying, Q.L. et al., 2002. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416(6880), pp.545–548.
- Yourek, G. et al., 2010. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regenerative Medicine*, 5(5), pp.713–724.
- Yu, J. et al., 2010. The transcription factors signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A) and STAT5B negatively regulate cell proliferation through the activation of cyclin-dependent kinase inhibitor 2b (Cdkn2b) and Cdkn1a expression. *Hepatology*, 52(5), pp.1808–1818.
- Zhang, J., Wu, L. & Qu, J.M., 2011. Inhibited proliferation of human lung fibroblasts by LPS is through IL-6 and IL-8 release. *Cytokine*.
- Zhang, J., Wu, L. & Qu, J.-M., 2011. Inhibited proliferation of human lung fibroblasts by LPS is through IL-6 and IL-8 release. *Cytokine*, 54(3), pp.289–295.
- Zhang, Y. et al., 2011. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(24), pp.9863–9868.
- Zhao, L. et al., 2011. TNF Inhibits Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Osteoblasts via the Ubiquitin E3 Ligase Wwp1. *Stem Cells*.
- Zhou, S. et al., 2008. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, 7(3), pp.335–343.

- Zhou, S., Glowacki, J. & Yates, K., 2004. Comparison of TGF-beta/BMP pathways signaled by demineralized bone powder and BMP-2 in human dermal fibroblasts. *J Bone Miner Res.*, 19(10), pp.1732–1741.
- Zhou, Y.S., Liu, Y.S. & Tan, J., 2006. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? *Chin Med J.*, 119(15), pp.1278–1286.
- Al-Zoubi, M. et al., 2013. Creating a tumor-resistant microenvironment: cell-mediated delivery of TNF α completely prevents breast cancer tumor formation in vivo. *Cell Cycle*, 12(3), pp.480–490.
- Zuk, P.A. et al., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 7(2), pp.211–228.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prinzip des <i>tissue engineering</i>	2
Abb. 2: Schema der osteogenen Proteinexpression	4
Abb. 3: Negative Selektion dermalen Fibroblasten anhand verschiedener CD	6
Abb. 4: Direkte und indirekte Einflüsse auf die osteogene Transdifferenzierung	19
Abb. 5: Thematische Unterteilung der Dissertation	20
Abb. 6: Entscheidungsbaum Hypothesen-Prüfung für zwei Stichproben	23
Abb. 7: Entscheidungsbaum Hypothesen-Prüfung für >2 Stichproben	24
Abb. 8: Foto eines Zählbereiches	27
Abb. 10: Relatives Wachstum im Vergleich zu Tag 0	45
Abb. 9: Viabilitätstest nach 4,5h Inkubation	45
Abb. 11: pH-Wert und pCO ₂ im Dexamethason-Medium	46
Abb. 12: Abhängigkeit des Effektes dreimaliger FGF-2-Gabe von der Zelldichte	47
Abb. 13: Streuungen, Residuen und Regressionsschätzer	47
Abb. 14: Proliferation in Abhängigkeit von Passage und Medienwechsel	48
Abb. 15: Effekt verschiedener IL-1 β -Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten	49
Abb. 16: Effekt verschiedener IL-6-Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten	49
Abb. 17: Effekt verschiedener IL-8-Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten	50
Abb. 18: Effekte verschiedener TNF- α -Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten	50
Abb. 19: Effekte verschiedener IFN- γ -Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten	51
Abb. 20: Effekte verschiedener TGF- β -Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten	51
Abb. 21: Effekte verschiedener FGF-2-Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten	52
Abb. 22: Effekte verschiedener NO-Konzentrationen auf die Proliferation juveniler Fibroblasten	52
Abb. 23: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus der Transdifferenzierungsreferenz	53
Abb. 24: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus der Transdifferenzierungsreferenz	54
Abb. 25: Vergleich der RunX 2/GAPDH-Quotienten von Kontroll- und Versuchsmodus der Transdifferenzierungsreferenz	54
Abb. 26: <i>Western Blotting</i> Transdifferenzierungsreferenz	55
Abb. 28: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus zur Abhängigkeit von der <i>in vitro</i> -Seneszenz	56
Abb. 27: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus zur Abhängigkeit von der <i>in vitro</i> -Seneszenz	56
Abb. 29: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus adulter Spender pas ≤ 3	57
Abb. 30: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus adulter Spender pas ≤ 3	57

Abb. 31: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus adulter Spender pas >3	58
Abb. 33: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus mit Calcitriol-Medium	59
Abb. 32: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus adulter Spender pas >3	59
Abb. 34: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus mit Calcitriol-Medium	60
Abb. 35: Absolute ARS-Farbstoffmenge in Abhängigkeit der Dexamethason-Konzentration	60
Abb. 36: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus unter konstanten Umgebungsbedingungen	61
Abb. 37: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus unter konstanten Umgebungsbedingungen	61
Abb. 38: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodi mit DNA-Methyltransferase-Inhibition	62
Abb. 39: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodi mit DNA-Methyltransferase-Inhibition	62
Abb. 40: Vergleich der absoluten AP-Enzymaktivität von Kontroll- und Versuchsmodus mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium	63
Abb. 41: Vergleich der absoluten ARS-Farbstoffmenge von Kontroll- und Versuchsmodus mit Dexamethason- und Calcitriol-Mediums	64
Abb. 42: Relative Zelldichte der Konfigurationen	66
Abb. 43: Relative Fluoreszenz der Bestandteile des Dexamethason-Mediums bei initial 1×10^3 Zellen/cm ²	66
Abb. 44: Relative Fluoreszenz der Bestandteile des Dexamethason-Mediums bei initial 1×10^4 Zellen/cm ²	67
Abb. 45: Entwicklung der Parameter der Transdifferenzierungsreferenz	73
Abb. 46: Absolute AP-Enzymaktivität der Transdifferenzierungsmodi mit und ohne 5'-Azacythidin	78
Abb. 47: Übersicht der erreichten Stadien der osteogenen Transdifferenzierung	81
Abb. 48: Schema zu Auswirkungen von Seneszenz und Spenderalter	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über TE-relevante Effekte einzelner Zytokine, NO und Dexamethason	13
Tabelle 2: Flächen und Volumina der Wells	22
Tabelle 4: Bestandteile von Dexamethason- und Calcitriol-Medium	25
Tabelle 3: Bestandteile des Kulturmediums	25
Tabelle 5: Dispase-II-Lösung	26
Tabelle 6: Collagenase-I-Lösung	27
Tabelle 7: Prozedur zur Auswertung des <i>Cell Viability Assays</i>	28
Tabelle 8: RIPA-Puffer	29
Tabelle 9: Prozedur zur Messung der Proteinkonzentration	30
Tabelle 10: Zusammensetzung Glycin-Puffer	30
Tabelle 11: Prozedur zur Messung der Absorption von p-Nitrophenol	30
Tabelle 12: Western Blot Puffer	33
Tabelle 13: 4x Tris-Glycine SDS Sample Buffer, 10%-Acrylamid-Trenn- und Sammelgel	33
Tabelle 14: Aufstellung Erstantikörper	34
Tabelle 15: Aufstellung Zweitantikörper	34
Tabelle 17: Stripping-Puffer	35
Tabelle 16: Einstellungen der Detektion des <i>Western Blots</i>	35
Tabelle 18: Schema Konfiguration x Zelldichte = Modus	37
Tabelle 19: Übersicht Ansätze zur Optimierung der osteogenen Transdifferenzierung	41
Tabelle 20: Nomenklatur einzelner Medien und Zusätze	44
Tabelle 21: Vergleich einzelner Arbeiten mit Calcitriol	76
Tabelle 22: Vergleich der Versuchsanordnungen zur Osteogenese mittels Scherstress	79

Formelverzeichnis

Formel 1:	$c = X4 * i * k$	28
Formel 2:	$c=Y/V$	28
Formel 3:	$Y=X/4*2*1x10^4 \text{ Zellen/ml} * V$	28
Formel 4:	$V=Y*4/(X*2*1x10^4 \text{ Zellen/ml})$	28
Formel 5:	$c := \text{Concs.} * f$	30
Formel 6	$C_{\text{Protein}} = (c*50\mu\text{l})/A$	30
Formel 7:	$E_{\lambda} := \epsilon_{\lambda} * c * d$	31
Formel 8:	$c := n/V$	31
Formel 9:	$n = (V * E_{\lambda}) / (\epsilon_{\lambda} * d)$	31
Formel 10:	Enzymaktivität := n/t	31
Formel 11:	Enzymaktivität = (V * E_λ) / (ε_λ * d * t)	31
Formel 12:	rel. Enzymaktivität = Enzymaktivität / C_{Protein}	31
Formel 13:	$c := n/V$	32
Formel 14:	$n = E_{\lambda} * V / (\epsilon_{\lambda} * d)$	32
Formel 15:	rel. ARS-Menge := n / C_{Protein}	32
Formel 16:	$V_{\text{Suspension}} = m/c$	33
Formel 17:	$V_{\text{A. dest}} = 18\mu\text{l} - V_{\text{Suspension}}$	33

Anhang

Anhang 1: Übersicht Oberflächenmarker verschiedener pluripotenter Zellen

Cluster of Differentiation	Fibroblasten	Fibrozyten	Mesenchymale Stammzellen	Keratinozyten	Publikation
CD 9			+		(Gronthos et al. 2001)
CD 10	(HS68 neg.)		+		(Gronthos et al. 2001; Wagner et al. 2005)
CD 13	+		+		(Gronthos et al. 2001; Wagner et al. 2005; Lysy et al. 2007; Vishnubalaji et al. 2012)
CD 14	-		-		(Pittenger et al. 1999; Wagner et al. 2005; Kern et al. 2006; Chamberlain et al. 2007; Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Wada et al. 2010; Alt et al. 2011; Jekabsons et al. 2011; Vishnubalaji et al. 2012; Brohem et al. 2013; Siegel et al. 2013)
CD 19			-		(Siegel et al. 2013)
CD 24	(HS68 neg.)				(Wagner et al. 2005)
CD 26	+		-		(Lysy et al. 2007; Hee & Nicoll 2011)
CD 29	+		+		(Pittenger et al. 1999; Gronthos et al. 2001; Wagner et al. 2005; Kern et al. 2006; Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Blasi et al. 2011; Paunescu et al. 2011; Vishnubalaji et al. 2012; Brohem et al. 2013; Siegel et al. 2013)
CD 31	-				(Wagner et al. 2005; Lorenz et al. 2008; Alt et al. 2011; Vishnubalaji et al. 2012)
CD 34	-	+	-	+	(Bucala et al. 1994; Pittenger et al. 1999; Gronthos et al. 2001; Wagner et al. 2005; Kern et al. 2006; Chamberlain et al. 2007; Crigler et al. 2007; Lysy et al. 2007; Amoh et al. 2008; Lorenz et al. 2008; Peng et al. 2008; Reyes et al. 2009; Wada et al. 2010; Blasi et al. 2011; Nowak & Fuchs 2009; Vishnubalaji et al. 2012; Siegel et al. 2013)
CD 36	(HS68 neg.)				(Wagner et al. 2005)
CD 38	(HS68 neg.)				(Wagner et al. 2005)
CD 40	-				(Wada et al. 2010)
CD 43			-		(Siegel et al. 2013)
CD 44	+		+	+	(Pittenger et al. 1999; Gronthos et al. 2001; Chunmeng & Tianmin 2004; Wagner et al. 2005; Kern et al. 2006; Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Peng et al. 2008; Reyes et al. 2009; Calenic et al. 2010; Wada et al. 2010; Alt et al. 2011; Blasi et al. 2011; Paunescu et al. 2011; Vishnubalaji et al. 2012; Siegel et al. 2013)

CD 133	- (HS68 neg.)		-			(Wagner et al. 2005; Kern et al. 2006; Lorenz et al. 2008; Blasi et al. 2011; Siegel et al. 2013)
CD 140b			+			(Siegel et al. 2013)
CD 144			-			(Kern et al. 2006)
CD 146			-			(Gronthos et al. 2001; Blasi et al. 2011)
CD 166	+		+			(Gronthos et al. 2001; Stewart et al. 2003; Wagner et al. 2005; Lorenz et al. 2008; Huang et al. 2010; Wada et al. 2010; Siegel et al. 2013)
CD 243	(HS69 pos.)		-			(Siegel et al. 2013)
HLA-DR	- (HS68 neg.)		-			(Wagner et al. 2005; Lysy et al. 2007; Reyes et al. 2009; Wada et al. 2010; Jekabsons et al. 2011; Vishnubalaji et al. 2012; Brohem et al. 2013)
Vimentin	+	+	+			(Bucala et al. 1994; Toma et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Alt et al. 2011; Paunescu et al. 2011)
Collagen	+	+				(Bucala et al. 1994; Lorenz et al. 2008; Alt et al. 2011)
Fibronectin						(Toma et al. 2005)
α_6-Integrin				+		(Webb et al. 2004; Nowak & Fuchs 2009; Calenic et al. 2010; Schlüter et al. 2011)
Nestin	+/- (tripotent)		+	+		(Toma et al. 2005; Chen et al. 2007; Amoh et al. 2008; Lorenz et al. 2008; Paunescu et al. 2011)

Anhang 1: Übersicht Oberflächenmarker verschiedener pluripotenter Zellen

Die in der linken Spalte aufgelisteten Oberflächenmarker dienen dem Nachweis und der Abgrenzung verschiedener Zellarten voneinander. Mit Hilfe der Detektion dieser Proteine auf der Zellmembran (oder intrazellulär) soll dadurch die Homogenität des isolierten Materials bezeugt und Kontaminationen ausgeschlossen werden. Es ist den rechts aufgeführten Autoren jedoch nicht gelungen, geeignete Marker zu identifizieren, welche sowohl eine eindeutige Identifizierung humaner Fibroblasten erlauben als auch eine distinkte Abgrenzung gegenüber MSCs und Keratinozyten ermöglichen. Alle diese pluripotenten Zellen sind nativ, also ohne spezielle Isolierungsverfahren, in Dermis und Subkutis nachzuweisen.

Anhang 2: Einteilung proteingener Marker der Osteogenese

Protein	zeitliche Expression			sequentielle Induktion		Histologie		Quellen
	früh	mittel	spät	direkt	indirekt	intrazellulär	extrazellulär	
alkalische Phosphatase	x				x		x	(Beresford et al. 1994; Lavoie et al. 2009; Seib et al. 2009; Philips et al. 2010; Choi et al. 2011; N. Mostafa et al. 2012)
BMPR1a	x						x	(Seib et al. 2009; Biver et al. 2012)
BMPR2	x						x	(Seib et al. 2009; Biver et al. 2012)
BMP-2	x			x			x	(Zhou et al. 2006; Seib et al. 2009; Choi et al. 2011; Biver et al. 2012)

BMP-4										(Biver et al. 2012)
BMP-6	x							x		(Zhou et al. 2006; Seib et al. 2009; Choi et al. 2011)
Bone Sialoprotein	x								x	(Zhou et al. 2006; Lysy et al. 2007; Seib et al. 2009; Philips et al. 2010; N. Mostafa et al. 2012)
Collagen Typ I									x	(Zhou et al. 2006; Lysy et al. 2007; Stobbe 2008; Lavoie et al. 2009)
Osteocalcin									x	(Beresford et al. 1994; Sammons et al. 2004; Zhou et al. 2006; Lysy et al. 2007; Lorenz et al. 2008; Stobbe 2008; Lavoie et al. 2009; Philips et al. 2010; Choi et al. 2011)
Osteonectin										(N. Mostafa et al. 2012)
Osteopontin										(Beresford et al. 1994; Lorenz et al. 2008; Lavoie et al. 2009)
RunX 2	x								x	(Zhou et al. 2006; Seib et al. 2009; Philips et al. 2010; N. Mostafa et al. 2012)

Anhang 2: Einteilung proteinogener Marker der Osteogenese

Anhand der Quellenlage (letzte Spalte) wird eine Einteilung der osteogenen Proteine (erste Spalte) im Hinblick auf zeitliche, sequentielle und histologische Eigenschaften (mittlere Spalten) vorgenommen. Dadurch soll eine ökonomische Auswahl spezifischer Marker ermöglicht werden, welche untereinander distinkt differieren sollen: Ihre initiale Expression erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten, sie werden differenziert induziert und ihre Anreicherung ist histologisch zu lokalisieren

Anhang 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Produktbezeichnung	Produzent
Absauganlage	Vacuboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH
Pumpe	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, D
A. dest	Demi-Wasser	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, D
A. dest (RNase, DNase free)	distilled water	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Autoklav	Laboklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, D
Bechergläser		vwr International GmbH, Darmstadt, D
Brutschrank	BINDER CO ₂ Brutschrank - Serie CB 1501	BINDER GmbH, Tuttlingen, D
Butan-Gas		APRAGAZ A.S.B.L., Brüssel, D
ChemiDoc XRS System	ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
CO ₂ -Gas	UN 1013	Linde AG, München, D
Eismaschine	AF 80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Pipettenröhrchen (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	microtubes	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Ethanol (70%)	Wet Task	Kimberly-Clark Corp., Neenah, USA
Ethanol (99%)	Ensure; Ethanol for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, D
Zentrifugenröhrchen (15ml / 50ml)	celltubes (15ml/50ml)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Gasflamme	Fuego SCS basic RF	WLD-Tec, Göttingen, D
Gefrierschrank		
20°C	Premium NoFrost	LIEBHERR-International AG, Bulle, CH
80°C	HeraFreeze	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
gläserne Pasteurpipetten	Pasteurpipetten aus Glass	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Glastrichter		vwr International GmbH, Darmstadt, D
Handschuhe L	Micro-Touch Nitrile, Powder free	Ansell GmbH, München, D
Heizblock	dry bath	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Heiz- und Magnetrührplatte	IKAMAG RH	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, D
Kamera	Coolpix 4500	Nikon Europe B.V., Amsterdam, NL
NaCl-Lösung 0,9%	NaCl 0,9% Ecotainer	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Kühlschrank (T=4°C)		LIEBHERR-International AG, Bulle, CH
Mikroskop	Axio vert. A1, 10x Vergrößerung	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Mikrotiterplatte	96 well ELISA microplates	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Folie	Plates sealers	Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, USA
Multipette	Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Spitzen (0,5ml, 5ml, 10ml)	Combitips plus steril/unsteril	Eppendorf AG, Hamburg, D
„Neubauer-Kammer“ / Häemocytometer	Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshöfen, D
Parafilm	Parafilm "M"	Bemis Company Inc., Neenah, USA

PC		Dell Inc., Round Rock, USA
Petri-Schale	tissue culture dish; sterile 100x20mm	STARLAB GmbH, Hamburg, D
pH-Meter	HI 221	HANNA Instruments, Smithfield, USA
Photometer	BioPhotometer; Lichtstrahlhöhe 8,5mm; OD 600	Eppendorf AG, Hamburg, D
Küvetten	Cuvettes aus Polyesterol, klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Pipetten	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
1-10µl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
10-100µl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
100-1000µl	eppendorf research plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
0,5-5ml	ErgoOne	STARLAB GmbH, Hamburg, D
Spitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, D
Spitzen (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	costar stripette	Corning Inc., Corning, USA
Spitze (5ml)	ErgoOne	STARLAB GmbH, Hamburg, D
Pipettierhilfe	accu-jet pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Programme		
Wallac 1420	Wallac 1420	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
WorkOut 2.0	WorkOut 2.0	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
Quantity One 4.6.5		Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Excel	Microsoft Excel 2007	Microsoft Corp., Redmond, USA
SPSS 20	IBM SPSS Statistics 20 [©]	IBM Corp., Armonk, USA
ImageJ	ImageJ - Image Processing and Analysis in Java	National Institute of Health, Bethesda, USA
Rüttelplatte	KM-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
schwarze Tonne	Kontaminationsabfall	MAUSER-Werke GmbH, Brühl, D
Ultrasonic	DU 50 H (Cycle 0,5; Amplitude 80%)	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, D
Sicherheitswerkbank mit Abzug		Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, D
Sterile Becher		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
sterile Werkbank	SAFE 2020	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Sterilgut-Behälter	Steriking	Wipak Medical, Bomlitz, D
Vial / Cryoröhrchen	Cryo.S	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Victor	Victor ³	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
Vortexer	IKA MS3 basic (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, D
Waage	Kern ABJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern, D
Wärme-Bad 37°C	Aqualine AL 12	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshöfen, D
Desinfektionsmittel	BAD STABIL	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Western Blot		
Deckplatten, Gelplatte	Glasplatte 0,75mm	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Kammer	Mini-Protean TetraCell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules,

	PowerPac HC	USA
Rock`n Roller	RM 5	CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen, D
Gießrahmen		Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Spannungsquelle	Mini-Protean TetraCell PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
sterile Becher		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Turbo-Blotter	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Vial	Cryo.S	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, AT
Zellschaber	Cell scraper	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge	HERAEUS Fresco 17 centrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
6-Well-Platte	6 well cell culture plate, sterile with lid	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
12-Well-Platte	12 well cell culture plate, sterile with lid	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT
75cm ² -Zellkulturflasche	cell culture flasks; sterile, red filter cap 75cm ²	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, AT

Anhang 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle hier aufgeführten Produkte stellte das Zell- und molekularbiologische Labor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie zur Verfügung. In der linken Spalte finden sich neutrale Bezeichnungen für die mit Handelsnamen (mittlere Spalte) versehenen Güter diverser Hersteller (rechte Spalte).

Anhang 4: Zusätze und andere Substanzen

Substanz	Produktbezeichnung	Produzent
Acrylamid	30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid "Rotiphorese Gel 30"	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Alizarin Rot	AlizarinRedS mono sodiumsalt	Merck KGaA, Darmstadt, D
APS	Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ascorbinsäure	L-Ascorbic acid 2-phosphate sequimagnesium salt hydrate	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Aza	5'-Azacythidine 100mg (in DMSO 50mg/ml)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Blotting Membran	Nitrocellulose Blotting-Membran (Porengröße 0,2µm)	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, D
Blotting Papier	Blotting Filter Paper 2,5mm thick	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Bromphenolblau	3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
BSA	Bovine Serum Albumin Fraktion V	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Calcitriol	1α,25-Dihydroxyvitamin D3; 10µg/1ml; HPCC	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
CaCl ₂	Calciumchlorid zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, D
CellTiter-Blue	CellTiter-Blue Reagent	Promega Corp., Madison, USA
Collagenase	Collagenase Type: CLS; 260 U/mg	Biochrom AG, Berlin, D
Complete	Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Darmstadt, D
CPC	Cetylpyridinium chloride monohydrate	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Deta/NO		Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dexamethason	Dexamethason	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Dispase II	Dispase II (neutral protease grade II); Bacillus polymyxa; 1,4U/mg	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
DMEM	DMEM; with 4,5g/L Glucose; without L- Glutamine, Sodium Pyruvate; with 3,7g/L NaHCO ₃ ; sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
DMEM/F12	DMEM/F12; without L-Glutamine; with 1,2g/L NaHCO ₃ ; sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
DMSO	Dimethyl Sulphoxide Hybri-Max	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
FCS	Fetal Bovine Serum Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
FGF-2	recombinant Human FGF-Basic	PeptoTech Inc., Rocky Hill, USA
Fibronectin	human-Fibronectin 1,0mg/ml 1ml	Biochrom AG, Berlin, D
GAPDH	Monoclonal antibody to GAPDH; Mouse-IgG	Imgenex Corp., San Diego, USA
Glucose	D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, D
Glycerol	Rotipuran	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Glycerophosphat	Beta-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Glycin	Glycine	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Goat anti Mouse	Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Goat anti Rabbit	Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Hepes	HEPES Buffer 1M 100ml sterile	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
IFN-gamma	Interferon-gamma; human; recombinant	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
IL-1beta	Interleukin-1beta; human; recombinant	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
IL-6	10µg Interleukin 6; human; recombinant	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
IL-8	10µg Interleukin 8; human; recombinant	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
KCl	Kaliumchlorid zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, D
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol, for electrophoresis	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Methanol	Methanol for analysis; Ensure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Milch	Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
NaCl	Natriumchlorid zu Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, D
Na-deoxycholat	Deoxycholic acid sodium salt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
NEAA	MEM NEAA 100x	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
NP40	Nonident-P40	Biomol GmbH, Hamburg, D
PBS	„Dulbecco's PBS“ (1x); without Ca ²⁺ & Mg ²⁺ ; sterile	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Pen/Strep	Pen Strep / Penicillin Streptomycin	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Petri-Schale	tissue culture dish; sterile 100x20mm	STARLAB GmbH
PFA	Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, D
p-Nitrophenol	4-Nitrophenol solution 10mM	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ponceau S	Ponceau S (0,2% Ponceau; 3%ige TCA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Protein Assay Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH
RPMi	RPMi 1640 Medium; with L-Glutamine, 2,0g/L NaHCO ₃ ; low endotoxine	Biochrom AG, Berlin, D
Anti-RunX 2	Anti-RunX 2, antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
SDS	Sodium dodecylsulfate	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Sodium Pyruvat	Sodium Pyruvate 100mM	Life Technologies Ltd., Paisley, UK

NO								x	
----	--	--	--	--	--	--	--	---	--

Anhang 6: **Übersicht signifikanter, wechselseitiger Zytokin/NO-Beziehungen für pas >3**
Ausschließlich FGF-2 regt signifikant das Wachstum an.

Anhang 7: Deskriptivstatistik zur Transdifferenzierungsreferenz

Deskriptivstatistik							
Transdifferenzierungsreferenz		Woche 1		Woche 2		Woche 3	
		K	Td	K	Td	K	Td
Gesamtproteinkonzentration (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
	Mittelwert	10,60	14,88	14,90	24,14	15,53	32,96
	Standardabweichung	1,64	0,79	3,78	3,90	1,35	3,39
absolute AP-Enzymaktivität (in μIU)							
	Mittelwert	135,72	190,37	135,42	277,35	223,59	342,14
	Standardabweichung	66,68	65,80	50,94	43,53	34,87	38,96
relative AP-Enzymaktivität (in $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	12,79	12,79	9,35	11,66	14,34	10,40
	Standardabweichung	6,14	4,39	3,85	2,30	0,97	0,77
absolute ARS-Farbstoffmenge (in μmol)							
	Mittelwert	-0,01	0,42	-0,02	1,43	-0,01	9,48
	Standardabweichung	0,06	0,21	0,04	1,09	0,02	1,40
relative ARS-Farbstoffmenge (in $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	0,00	0,03	0,00	0,06	0,00	0,29
	Standardabweichung	0,01	0,01	0,00	0,05	0,00	0,03
RunX 2/GAPDH-Quotient							
	Mittelwert	0,59	0,89	0,57	1,12	0,53	0,90
	Standardabweichung	0,20	0,31	0,15	0,23	0,16	0,48

Anhang 7: **Deskriptivstatistik zur Transdifferenzierungsreferenz**

Für die verschiedenen Parameter werden Mittelwert und Standardabweichung der drei Zeitpunkte für Kontroll- (K) und Versuchsmodus (Transdifferenzierung; Td) aufgelistet.

Anhang 8: Deskriptivstatistik zur osteogene Transdifferenzierung und *in vitro*-Seneszenz

Deskriptivstatistik							
Osteogene Transdifferenzierung und <i>in vitro</i> -Seneszenz		Woche 1		Woche 2		Woche 3	
		K	Td	K	Td	K	Td
Gesamtproteinkonzentration (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
	Mittelwert	14,23	19,57	14,90	25,71	15,90	36,35
	Standardabweichung	2,77	1,70	3,27	8,45	1,84	2,98
absolute AP-Enzymaktivität (in μIU)							
	Mittelwert	171,35	203,66	142,20	206,23	132,68	276,25

Standardabweichung		13,97	34,99	62,71	51,25	51,59	48,19
relative AP-Enzymaktivität (in IU*cm²/g)							
Mittelwert		12,48	10,38	10,46	9,27	8,56	7,56
Standardabweichung		3,22	1,24	6,12	5,27	3,94	0,87
absolute ARS-Farbstoffmenge (in µmol)							
Mittelwert		0,18	0,44	-0,01	0,66	-0,18	1,73
Standardabweichung		0,44	0,46	0,26	0,63	0,08	0,80
relative ARS-Farbstoffmenge (in mol*cm²/g)							
Mittelwert		0,01	0,02	0,00	0,02	-0,01	0,05
Standardabweichung		0,03	0,02	0,02	0,03	0,00	0,02
RunX 2/GAPDH-Quotient							
Messwerte		0,42	0,33	0,81	0,14	0,44	0,37

Anhang 8: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und *in vitro*-Seneszenz

Die Detektion von RunX 2 erfolgte nur exemplarisch, weshalb für dieses Nachweisverfahren weder Mittelwert noch Standardabweichung für Kontrolle (K) bzw. Versuchsmodus (Td) berechnet wurden.

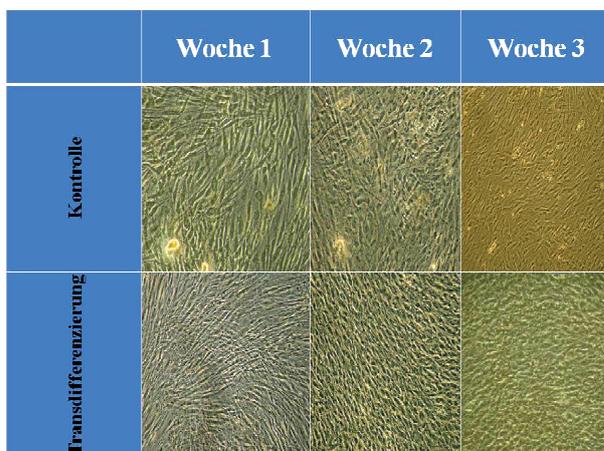
Anhang 9: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤3

Deskriptivstatistik							
Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas ≤3	Woche 1		Woche 2		Woche 3		
	K	Td	K	Td	K	Td	
Gesamtproteinkonzentration (in µg/cm²)							
Mittelwert	9,87	13,68	10,75	21,06	11,18	26,75	
Standardabweichung	1,58	3,50	3,24	6,25	1,71	7,14	
absolute AP-Enzymaktivität (in µIU)							
Mittelwert	136,08	159,53	112,27	196,79	86,98	181,53	
Standardabweichung	30,08	45,36	50,05	36,87	39,72	60,95	
relative AP-Enzymaktivität (in IU*cm²/g)							
Mittelwert	13,83	11,73	11,81	9,58	8,31	6,84	
Standardabweichung	2,53	2,30	6,35	1,42	4,70	1,41	
absolute ARS-Farbstoffmenge (in µmol)							
Mittelwert	-0,02	0,37	-0,05	1,25	-0,01	1,02	
Standardabweichung	0,04	0,26	0,09	1,26	0,02	0,26	
relative ARS-Farbstoffmenge (in mol*cm²/g)							
Mittelwert	0,00	0,02	0,01	0,06	0,00	0,04	
Standardabweichung	0,00	0,01	0,01	0,07	0,00	0,01	
RunX 2/GAPDH-Quotient							
Messwerte	0,58	0,42	0,32	0,66	0,49	0,55	

Anhang 9: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung adulter Spender pas ≤3

Auch hier wurde der *Western Blot* nur exemplarisch durchgeführt.

Anhang 10: ARS-Färbung im Rahmen der osteogenen Transdifferenzierung adulter Spender pas ≤ 3



Anhang 10: ARS-Färbung zur osteogenen Transdifferenzierung adulter Spender pas ≤ 3

Wie hier beispielhaft gezeigt wird, kann in keiner Färbung ein mikroskopisch positiver Hydroxylapatit-Nachweis geführt werden.

Anhang 11: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und adulte Spender pas >3

Deskriptivstatistik							
Osteogene Transdifferenzierung und adulte Spender pas >3		Woche 1		Woche 2		Woche 3	
		K	Td	K	Td	K	Td
Gesamtproteinkonzentration (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
	Mittelwert	9,96	10,29	9,87	16,02	12,31	20,48
	Standardabweichung	3,32	4,58	4,18	8,36	3,23	11,61
absolute AP-Enzymaktivität (in μIU)							
	Mittelwert	116,36	134,46	170,80	299,58	162,43	279,48
	Standardabweichung	66,97	77,76	90,17	55,45	97,61	22,58
relative AP-Enzymaktivität (in $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	10,24	12,97	20,70	23,02	14,47	16,93
	Standardabweichung	6,88	5,12	12,54	12,70	8,71	8,34
absolute ARS-Farbstoffmenge (in μmol)							
	Mittelwert	-0,04	0,35	-0,04	2,18	-0,05	1,39
	Standardabweichung	0,05	0,48	0,03	3,43	0,11	1,61
relative ARS-Farbstoffmenge (in $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	0,00	0,02	0,00	0,13	0,00	0,08
	Standardabweichung	0,01	0,03	0,00	0,22	0,01	0,11
RunX 2/GAPDH-Quotient							
	Messwerte	0,43	0,88	0,42	0,62	0,31	0,49

Anhang 11: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und adulte Spender pas >3

Weder die absolute AP-Enzymaktivität noch die ARS-Farbstoffmenge differieren zwischen Kontroll- und Versuchsmodus signifikant.

Anhang 12: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium

Deskriptivstatistik							
Osteogene Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium		Woche 1		Woche 2		Woche 3	
		K	Td	K	Td	K	Td
Gesamtproteinkonzentration (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
	Mittelwert	9,58	9,51	11,19	11,66	12,53	16,12
	Standardabweichung	1,04	0,61	0,88	0,64	1,36	2,69
absolute AP-Enzymaktivität (in μIU)							
	Mittelwert	251,28	263,63	227,33	290,20	213,94	291,67
	Standardabweichung	44,62	20,53	25,88	59,02	66,29	15,39
relative AP-Enzymaktivität (in $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	26,83	27,81	20,35	25,09	17,17	18,42
	Standardabweichung	7,41	2,90	2,27	6,27	5,13	2,74
absolute ARS-Farbstoffmenge (in μmol)							
	Mittelwert	-0,01	-0,05	-0,02	-0,02	-0,03	-0,02
	Standardabweichung	0,02	0,07	0,03	0,06	0,02	0,07
relative ARS-Farbstoffmenge (in $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Standardabweichung	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00

Anhang 12: **Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung mit Calcitriol-Medium**

Die Entwicklung der ARS-Farbstoffmenge, welche sich unter Versuchsbedingungen (Td) sogar gegenüber der Kontrolle (K) erniedrigt zeigt, weist keine deutliche Zunahme auf.

Anhang 13: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und Dexamethason-Konzentrationen

Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und Dexamethason-Konzentrationen													
c (nM)	0	1	5	10	25	50	75	100	250	500	750	1000	
Absolute ARS-Farbstoffmenge													
2	MW	-0,07	0,26	0,38	0,46	0,44	0,40	0,34	0,31	0,10	0,41	0,34	0,20
	StAw	0,09	0,58	0,66	0,64	0,54	0,29	0,31	0,44	0,49	0,59	0,56	0,44
3	MW	-0,06	0,79	1,03	1,16	1,11	0,94	0,99	1,34	1,03	1,04	0,84	0,56
	StAw	0,07	0,30	0,32	0,37	0,53	0,33	0,30	0,67	0,41	0,31	0,88	0,27
Pearson-Korrelationen													
r_{Woche}	0,10	0,49	0,68	0,68	0,68	0,88	0,88	0,88	0,88	0,49	0,29	0,49	
$r_{\text{Kontrolle}}$	1,00	0,48	0,56	0,38	0,53	0,58	0,40	-0,03	0,00	0,85	0,69	0,68	

Anhang 13: **Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und Dexamethason-Konzentrationen**

Für die einzelnen Konzentrationen (c in nM) werden nach zwei und drei Wochen Mittelwert (MW) sowie Standardabweichung (StAw) bestimmt und anschließend die Pearson-Korrelationen bezüglich der Inkubationsdauer (r_{Woche}) oder gegenüber der Kontrolle (c = 0nM; $r_{\text{Kontrolle}}$). Keine Dexamethason-Konzentration führt zu einem signifikanten Anstieg der ARS-Menge.

Anhang 14: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen

Deskriptivstatistik							
Osteogene Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen		Woche 1		Woche 2		Woche 3	
		K	Td	K	Td	K	Td
Gesamtproteinkonzentration (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
	Mittelwert	8,96	14,31	12,10	19,70	9,40	29,55
	Standardabweichung	1,30	5,08	4,30	7,42	1,95	6,61
absolute AP-Enzymaktivität (in μIU)							
	Mittelwert	135,53	145,31	165,42	182,74	181,66	258,97
	Standardabweichung	26,78	20,15	41,56	43,83	49,52	67,92
relative AP-Enzymaktivität (in $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	0,19	0,14	0,18	0,13	0,26	0,12
	Standardabweichung	0,05	0,05	0,05	0,08	0,14	0,07
absolute ARS-Farbstoffmenge (in μmol)							
	Mittelwert	0,00	0,27	0,00	0,66	0,07	4,87
	Standardabweichung	0,03	0,21	0,00	0,39	0,20	2,42
relative ARS-Farbstoffmenge (in $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	0,00	0,02	0,00	0,03	0,01	0,16
	Standardabweichung	0,00	0,01	0,00	0,02	0,02	0,06

Anhang 14: **Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und Konstanz der Umgebungsbedingungen**

Während die absolute AP-Enzymaktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe zeigt, kann dies für die dritte Woche der absoluten ARS-Farbstoffmenge belegt werden.

Anhang 15: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition

Deskriptivstatistik													
Osteogene Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition	Woche 1			Woche 2			Woche 3						
	K	Td	Td	K	Td	Td	K	Td	Td	K	Td	Td	
	-Aza	+Aza	-Aza	-Aza	+Aza	-Aza	+Aza	-Aza	+Aza	-Aza	+Aza	-Aza	+Aza
Gesamtproteinkonzentration (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)													
Mittelwert	11,24	10,39	12,80	13,17	12,85	13,30	13,30	21,14	21,30	13,72	13,25	27,00	27,53
Standardabweichung	2,55	2,51	2,58	3,43	3,13	3,97	3,97	4,34	5,07	3,57	4,23	13,24	13,58
absolute AP-Enzymaktivität (in μIU)													
Mittelwert	165,41	168,29	150,32	171,01	169,15	150,86	150,86	192,25	223,49	172,24	157,50	198,49	238,62
Standardabweichung	35,42	30,01	30,72	27,65	39,98	37,49	37,49	57,32	67,69	70,62	59,42	66,34	48,08
relative AP-Enzymaktivität (in $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)													
Mittelwert	15,58	17,50	12,40	14,03	13,71	12,69	12,69	9,27	10,66	14,18	13,10	9,21	10,75
Standardabweichung	6,27	7,17	4,85	5,67	4,08	6,53	6,53	2,80	2,98	9,30	7,36	6,30	6,28
absolute ARS-Farbstoffmenge (in μmol)													
Mittelwert	0,00	0,00	0,53	0,41	0,00	0,00	0,00	1,36	1,39	0,00	0,00	1,37	1,18
Standardabweichung	0,00	0,00	0,68	0,96	0,00	0,00	0,00	1,42	0,92	0,00	0,00	0,99	1,01
relative ARS-Farbstoffmenge (in $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)													
Mittelwert	0,00	0,00	0,05	0,04	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,00	0,00	0,05	0,04
Standardabweichung	0,00	0,00	0,07	0,10	0,00	0,00	0,00	0,06	0,04	0,00	0,00	0,02	0,03

Anhang 15: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition

In dieser Tabelle werden Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontrollen (K) mit (+Aza) und ohne 5'-Azacythidin (-Aza) jenen der Transdifferenzierung (Td) gegenüber gestellt. Die Auswertung nach Inkubationsdauer erfolgt anhand von Gesamtproteinkonzentration, AP-Enzymaktivität und ARS-Farbstoffmenge.

Anhang 16: Korrelationen bei der osteogenen Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition

Korrelationen		K vs. Td	Dauer	+/- Aza	Abs. AP-Enzymaktivität	Abs. ARS-Farbstoffmenge	Gesamtproteinkonzentration	rel. AP-Enzymaktivität	rel. ARS-Farbstoffmenge
K vs. Td	Spearman		0	0	0,289	0,772	0,532	-0,280	0,740
Dauer	Spearman	0		0	0,192	0,197	0,413	-0,265	0,168
+/- 5'-Azacytidin	Spearman	0	0		0,123	-0,077	-0,024	0,063	-0,058
Absolute AP-Enzymaktivität	Pearson	0,312	0,224	0,101		0,226	0,145	0,469	0,248
Absolute ARS-Farbstoffmenge	Pearson	0,603	0,191	-0,027	0,226		0,689	-0,307	0,837
Gesamtproteinmenge	Pearson	0,500	0,429	0,001	0,145	0,689		-0,655	0,292
relative AP-Enzymaktivität	Pearson	-0,295	-0,217	0,063	0,469	-0,307	-0,655		-0,044
relative ARS-Farbstoffmenge	Pearson	0,580	0,012	-0,020	0,248	0,837	0,292	-0,044	

Anhang 16: Korrelationen in der osteogenen Transdifferenzierung und DNA-Methyltransferase-Inhibition

Die Korrelationen zwischen den am Zeilen- und Spaltenanfang dunkelblau unterlegten Eigenschaften finden sich im jeweiligen Feld dieser Matrix. Mittlere bis hohe Korrelationen finden sich bevorzugt zwischen absoluten und deren relativen Parametern. Außerdem existiert hohe Zusammenhänge zwischen Modi (K vs. Td) und absoluten bzw. relativen ARS-Farbstoffmengen.

Kontrolle und Transdifferenzierung werden mit K bzw. Td, mit oder ohne 5'-Azacythidin als +/- Aza und absolut als abs. abgekürzt.

Anhang 17: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium

Deskriptivstatistik							
Osteogene Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium		Woche 1		Woche 2		Woche 3	
		K	Td	K	Td	K	Td
Gesamtproteinkonzentration (in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
	Mittelwert	19,16	31,03	13,13	25,93	14,00	38,88
	Standardabweichung	8,00	7,30	1,86	5,26	4,13	10,08
absolute AP-Enzymaktivität (in μIU)							
	Mittelwert	181,31	255,54	178,96	267,42	222,62	326,91
	Standardabweichung	12,96	50,49	38,29	34,72	88,48	31,04
relative AP-Enzymaktivität (in $\text{IU}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	10,78	8,59	13,52	10,47	16,19	8,77
	Standardabweichung	4,40	2,76	1,21	1,37	5,48	1,98
absolute ARS-Farbstoffmenge (in μmol)							
	Mittelwert	0,00	1,22	0,00	3,98	0,00	18,84
	Standardabweichung	0,00	0,56	0,00	4,97	0,00	34,18
relative ARS-Farbstoffmenge (in $\text{mol}\cdot\text{cm}^2/\text{g}$)							
	Mittelwert	0,00	0,04	0,00	0,14	0,00	0,40
	Standardabweichung	0,00	0,03	0,00	0,17	0,00	0,71

Anhang 17: Deskriptivstatistik zur osteogenen Transdifferenzierung mit Dexamethason- und Calcitriol-Medium

Standardabweichung und Mittelwert der bekannten Parameter sind hier für die Wochen 2 – 4 abgebildet. Bis einschließlich Ende der zweiten Woche (erste Messung) wurde im Versuchsmodus Dexamethason-Medium verwendet, anschließend Calcitriol-Medium.

Anhang 18: Deskriptivstatistik zum proliferativen Effekt des Dexamethason-Mediums

Zelldichte (Zellen/ cm^2)		pas ≤ 3		pas > 3	
		K	Td	K	Td
Tag 0	MW	1042	1042	1042	1042
	StAw	0	0	0	0
Tag 3	MW	1001	1017	1764	1897
	StAw	289	95	835	758
Tag 10	MW	1722	4249	3565	5692
	StAw	387	2122	1897	1405
Tag 17	MW	1869	4132	4615	10938
	StAw	341	2189	1307	2852
Tag 24	MW	2622	6246	5964	14349
	StAw	910	1860	580	3699

Anhang 18: Deskriptivstatistik zum proliferativen Effekt des Dexamethason-Mediums

In dieser Tabelle sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (StAw) der absoluten Zelldichten für Kontrolle (K) und Transdifferenzierungsmedium (Td) aufgeführt.

Anhang 19: Deskriptivstatistik der Bestandteile des Dexamethason-Mediums

relative Fluoreszenz (% d. neg. Kontrolle)		neg. Kontrolle	pos. Kontrolle	DMEM	+ Dexamethason	+ L-Ascorbinsäure	+ β -Glycerophosphat
1×10^3 Zellen/cm²							
Woche 1	MW	100,00	88,67	158,65	95,74	125,06	98,04
	StAw	52,29	29,02	45,52	73,17	68,18	48,88
Woche 2	MW	100,00	129,04	128,28	88,35	109,03	94,32
	StAw	49,11	18,46	26,61	55,94	51,58	44,62
Woche 3	MW	100,00	158,30	130,14	102,84	117,22	95,05
	StAw	22,22	42,44	22,92	13,83	37,12	17,92
1×10^4 Zellen/cm²							
Woche 1	MW	100,00	114,84	108,10	90,88	106,44	93,89
	StAw	32,27	13,76	12,14	38,06	30,91	28,30
Woche 2	MW	100,00	140,71	123,97	100,49	117,79	97,70
	StAw	36,56	13,32	25,31	35,00	43,76	30,01
Woche 3	MW	100,00	153,34	125,08	101,20	117,50	92,97
	StAw	17,13	35,38	26,11	11,05	37,55	16,20

Anhang 19: **Deskriptivstatistik der Bestandteile des Dexamethason-Mediums**

Die Fluoreszenz der neg. Kontrolle in der jeweiligen Woche dient als Referenz für pos. Kontrolle sowie dessen in Kulturmedium gelöste Bestandteile. In dieser Tabelle sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (StAw) in Relation zur neg. Kontrolle aufgeführt.

Danksagung

Diese Dissertation ist das Ziel einer langen Reise; eine Reise, welche ohne die Begleitung einiger wichtiger Personen nicht so erfolgreich verlaufen wäre:

So gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek für die Möglichkeiten und Freiheiten meine Schwerpunkte selbstständig setzen und Ideen ausprobieren zu dürfen. Auch seine Ansprachen und Anregungen haben mich stets motiviert.

Frau Dr. rer. nat. Vera Grotheer bin ich nicht nur für ihre Geduld, ihre zahlreichen Nachfragen und Anregungen, sondern auch für ihre aufbauenden Worte sehr dankbar.

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek und Herrn PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka für das Verfassen der Gutachten und dem damit verbundenen Zeit- und Arbeitsaufwand.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich dem Team des Zell- und Molekularbiologischen Labors der Klinik für Unfall- und Handchirurgie und meinen Kommilitonen, denn ihre Gelassenheit und Freude hat mich des Öfteren angesteckt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

12.01.2015

Daniel Eckhardt

Anlage

Folgende Quellen existieren nicht als Druckversion und werden daher hier angefügt:

abcam (1998):

Buffers and stock solutions



Cytoskeletal bound proteins extract buffer

10 mM Tris, pH 7.4
100 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 mM NaF
20 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$
2 mM Na_2VO_4
1% Triton X-100
10% glycerol
0.1% SDS
0.5% deoxycholate

Soluble protein buffer

20 mM Tris-HCl, pH 7.5
1 mM EGTA (Ca^{2+} chelator)

RIPA buffer (RadioImmunoPrecipitation Assay) buffer

RIPA buffer contains the ionic detergent sodium deoxycholate as an active constituent and is particularly used for nuclear membrane disruption for nuclear extracts. A RIPA buffer gives low background but can denature kinases. It can also disrupt protein-protein interactions (and may therefore be problematic for immunoprecipitations/pull down assays).

50mM Tris HCl pH 8
150 mM NaCl
1% NP-40
0.5% sodium deoxycholate
0.1% SDS

The 10% sodium deoxycholate stock solution (5 g into 50 ml) must be protected from light.

The 100 mM EDTA stock solution is made with 1.86 g into 40 ml H_2O and then add NaOH to dissolve and adjust pH to 7.4. Finally, adjust the total volume to 50 ml). Store the buffer at 4°C.

Nonidet-P40 (NP-40) buffer

20 mM Tris HCl pH 8
137 mM NaCl
10% glycerol
1% nonidet P-40
2 mM EDTA

Sodium orthovanadate preparation

This needs to be done under the fume hood

1. Prepare a 100 mM solution in double distilled water.
2. Set pH to 9.0 with HCl.
3. Boil until colorless.
4. Cool to room temperature.

Discover more at abcam.com/technical

5. Set pH to 9.0 again.
6. Boil again until colorless.
7. Repeat this cycle until the solution remains at pH 9.0 after boiling and cooling.
8. Bring up to the initial volume with water.
9. Store in aliquots at -20°C.

Note: do not permit great changes in volume during boiling; put a loose lid on the container to protect from evaporation.

Discard if the samples turn yellow.

TBS 10x (concentrated TBS)

24.23 g Trizma HCl
80.06 g NaCl
Mix in 800 ml ultra pure water.
pH to 7.6 with pure HCl.
Top up to 1 L.

TBST

For 1 L: 100 ml of TBS 10x + 900 ml ultra pure water + 1ml Tween20

Medium stripping buffer

Make fresh stripping buffer:
15 g glycine
1 g SDS
10 ml Tween20
Set the pH to 2.2
Make up to 1 L with ultrapure water

Harsh stripping buffer

To be done under the fumehood
For 100 ml:
20 ml SDS 10%
12.5 ml Tris HCl pH 6.8 0.5M
67.5 ml ultra pure water
Add 0.8ml β-mercaptoethanol under the fumehood.

Nuclear fractionation protocol reagents

Buffer A – 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.05% NP40 (or 0.05% Igepal or Tergitol) pH 7.9

To prepare 250 ml stock of buffer A –
HEPES: 1M = 238.3 g/L, therefore 10 mM = 0.59 g/250 ml
MgCl₂: 1M = 203.3 g/L, therefore 1.5 mM = 0.076 g/250 ml
KCl: 1M = 74.5 g/L, therefore 10 mM = 0.187 g/250 ml
DTT: 1M = 154.2 g/L, therefore 0.5 mM = 0.019 g/250 ml
NP40 = 0.05%

Buffer B – 5 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 26% glycerol (v/v), pH 7.9

To prepare 250 ml stock of buffer B –
HEPES: 1M = 238.3 g/L, therefore 5 mM = 0.295 g/250 ml
MgCl₂: 1M = 203.3 g/L, therefore 1.5 mM = 0.076 g/250 ml
EDTA: 1M = 372.2 g/L, therefore 0.2 mM = 0.0186 g/250 ml
DTT: 1M = 154.2 g/L, therefore 0.5 mM = 0.019 g/250 ml
26% Glycerol (v/v) = 65 ml

Discover more at abcam.com/technical

4.6 M NaCl - 87.66 g/326 ml

TBS (Tris Buffered Saline) pH 7.6-7.8:

For 10 litres: | 60.6 g TRIS HCl
| 13.9 g TRIS base
| 87.66 g NaCl
| 10 litres Ultra pure water (H₂O)

TBS 0.025% Triton X-100:

For 1 litre: | 250 µl Triton X-100
| 999.75 ml TBS pH 7.6-7.8

1.6% H₂O₂ (Hydrogen Peroxide) in TBS:

For 400 ml: | 6.4 ml H₂O₂ (GPR = 30% w/w)
| 393.6 ml TBS pH 7.6-7.8

10% NS (Normal Serum) with 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Fraction 5) in TBS:

For 1 ml: | 100 µl NS
| 10 mg BSA
| 900 µl TBS pH 7.6-7.8

Primary antibody made up in TBS with 1% BSA:

(Example is of primary antibody used at a dilution of 1:10)

For 0.1 ml: | 100 µl Primary antibody
| 10 mg BSA
| 900 µl TBS pH 7.6-7.8

Secondary biotinylated antibody made up in TBS with 1% BSA:

(Example is of secondary biotinylated antibody used at a dilution of 1:200)

For 1 ml: | 5 µl Secondary biotinylated antibody
| 995 µl TBS pH 7.6-7.8

ABC (Avidin-Biotin) complex in TBS:

(Example is of ABC complex, each part used at a dilution of 1:100)

For 1 ml: | 10 µl Streptavidin
| 10 µl HRP (or AP)-Biotin
| 980 µl TBS pH 7.6-7.8

Bicarbonate/carbonate coating buffer (100 mM): 3.03 g Na₂CO₃, 6.0 g NaHCO₃ (1 L distilled water) pH 9.6,
PBS: 1.16 g Na₂HPO₄, 0.1 g KCl, 0.1 g K₂PO₄, 4 g NaCl (500 ml distilled water) pH 7.4

Sigma-Aldrich Co. (1993):

**Enzymatic Assay of PHOSPHATASE, ALKALINE
(EC 3.1.3.1)
Glycine Assay**

PRINCIPLE:

p-Nitrophenyl Phosphate $\xrightarrow{\text{Alkaline Phosphatase}}$ p-Nitrophenol + P_i

CONDITIONS: T = 37°C, pH = 10.4, A_{410nm}, Light path = 1 cm

METHOD: Spectrophotometric Stop Rate Determination

REAGENTS:

- A. 100 mM Glycine Buffer with 1 mM Magnesium Chloride, pH 10.4 at 37°C
(Prepare 50 ml in deionized water using Glycine, Prod. No. G-7126, and Magnesium Chloride Hexahydrate, Prod. No. M-0250. Adjust to pH 10.4 at 37°C with 1 M NaOH. **PREPARE FRESH.**)
- B. 15.2 mM p-Nitrophenyl Phosphate Solution (PNPP)
(Prepare 2 ml in deionized water using Sigma Phosphatase Substrate, Stock No. 104-0. **PREPARE FRESH.**)
- C. Phosphatase, Alkaline Enzyme Solution
(Immediately before use prepare a solution containing 0.1 - 0.2 units/ml of Alkaline Phosphatase in cold deionized water.)
- D. 20 mM Sodium Hydroxide Solution (NaOH)
(Prepare 100 ml in deionized water using Sodium Hydroxide, Stock No. 505-8.)

**Enzymatic Assay of PHOSPHATASE ALKALINE
(EC 3.1.3.1)
Glycine Assay**

PROCEDURE:

Pipette (in milliliters) the following reagents into suitable cuvettes:

	<u>Test</u>	<u>Blank</u>
Deionized Water	----	0.10
Reagent A (Buffer)	0.50	0.50
Reagent B (PNPP)	0.50	0.50

Mix by inversion and equilibrate to 37°C. Monitor the A_{410nm} until constant, using a suitably thermostatted spectrophotometer. Then add:

Reagent C (Enzyme Solution)	0.10	----
-----------------------------	------	------

Immediately mix by inversion and incubate for exactly 10 minutes. Then add:

Reagent D	10.00	10.00
-----------	-------	-------

Record the A_{410nm} for both the test and blank.

CALCULATIONS:

$$\text{Units/mg protein} = \frac{(\Delta A_{410nm} \text{ Test} - \Delta A_{410nm} \text{ Blank}) (11.1)}{(10) (18.3) (\text{mg protein/RM})}$$

11.1 = total volume

10 = Time of Assay (Unit Definition)

18.3 = Millimolar extinction coefficient for p-nitrophenol

RM = Reaction Mix

UNIT DEFINITION:

One unit will hydrolyze 1.0 μmole of p-nitrophenyl phosphate per minute at pH 10.4 at 37°C.

FINAL ASSAY CONCENTRATIONS:

In a 1.1 ml reaction mix, the final concentrations are 45 mM glycine, 0.45 mM magnesium chloride, 6.9 mM p-nitrophenyl phosphate and 0.01 to 0.02 units alkaline phosphatase.

Enzymatic Assay of PHOSPHATASE ALKALINE
(EC 3.1.3.1)
Glycine Assay

NOTES:

1. All product and stock numbers, unless otherwise indicated, are Sigma product and stock numbers.

This procedure is for informational purposes. For a current copy of Sigma's quality control procedure contact our Technical Service Department.



SIGMA-ALDRICH

3050 Sarnes Street
Saint Louis, Missouri 63103 U.S.A.
Telephone 800-325-5832 • (314) 775-5765
Fax (314) 286-7826
email: techserv@aa.com
sigma-aldrich.com

Product Information

Phosphatase Substrates

Capsules

Storage Temperature: -0°C
Preweighed 40 mg Capsules, Prod. No. P5744
Preweighed 100 mg Capsules, Prod. No. P5869

Tablets

Storage Temperature: -0°C
5 mg Tablets, Prod. No. S0942
40 mg Tablets, Prod. No. P5904

Powder

Storage Temperature: -0°C
Powdered Substrate, Prod. No. P4744
 $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2\text{PNa}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
FW 371.1

p-Nitrophenol (Hydrolysis Product) Standards

p-Nitrophenol, Prod. No. N0286
Storage Temperature: RT

p-Nitrophenol 10 mM Solution, Prod. No. N7660

Storage Temperature: 2 to 8°C
 $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$
FW 139.1

Product Description

p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP) is a soluble substrate for use with alkaline phosphatase in ELISA procedures. It may also be used for the determination of alkaline and acid phosphatase activity in physiological fluids and other aqueous solutions. This substrate produces a

soluble end product that is yellow in color and can be read spectrophotometrically at 405 nm. The pNPP reaction may be stopped with 3M NaOH and read at 405 nm.

Preparation Instructions

Dissolve tablets or contents of capsules in either 0.1 M glycine buffer containing 1 mM MgCl_2 and 1 mM ZnCl_2 , pH 10.4 or 1M diethanolamine buffer containing 0.5 mM MgCl_2 , pH 9.8, to the desired concentration (typically a pNPP concentration of 1 mg/ml is used).

To prepare 0.1 M glycine buffer, 1 mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 , pH 10.4: Add 7.51 g of glycine (Product No. G 7126), 203 mg MgCl_2 (Product No. M0250) and 136 mg ZnCl_2 (Product No. Z4875) to approximately 980 ml dH_2O and mix. Adjust the pH to 10.4 with 19 N NaOH and adjust the volume to 1 L with dH_2O .

To prepare 1 M diethanolamine buffer 0.5 mM MgCl_2 , pH 9.8: Add 97 ml diethanolamine (Product No. D 8885), 100 mg MgCl_2 (Product No. M0250) and 0.2 g sodium azide (Product No. S2002) to 800 ml dH_2O , adjust the pH to 9.8 with 10 M HCl and adjust the volume to 1 L with dH_2O .

The reaction may be stopped by the addition of 50 μl of 3 N NaOH per 200 μl of reaction mixture.

p-Nitrophenol standard solutions can be prepared in 0.02 to 1 N sodium hydroxide.

RG 1/03

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.