

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Osteogene Differenzierung porciner mesenchymaler Stromazellen
unter Inhibition der TGF- β - und FGF-Rezeptoren

Dissertation

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

vorgelegt von
Sebastian Stefan Zensen

2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Bernd Bittersohl

Ein Traum ist unerlässlich, wenn man die Zukunft gestalten will.

Victor Hugo (1802 – 1885)

Zusammenfassung

Ausgeprägte Knochendefekte und eine reduzierte Knochenregeneration stellen therapeutisch eine große Herausforderung dar. Mesenchymale Stromazellen (MSCs) sind im Rahmen des Tissue Engineerings eine vielversprechende Therapieoption und werden in verschiedenen präklinischen Experimenten evaluiert, aber auch bereits in ersten klinischen Therapieansätzen genutzt. Die osteogene Differenzierung porciner MSCs aus dem Knochenmark (pBMSCs) und dem Fettgewebe (pASCs) wird durch verschiedene Signalwege, wie über TGF- β , BMP und FGF, beeinflusst. Den Einfluss dieser Signalwege auf die Osteogenese der MSCs aufzuklären und die Modifikation des Differenzierungsverhalten durch Wachstumsfaktoren und Inhibitoren zu optimieren, ist eine essentielle Aufgabe, um standardisierte klinische MSC-basierte Therapien gewährleisten zu können. Dazu wurden pASCs und pBMSCs mit *Bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) und spezifischen Inhibitoren der TGF- β - und FGF-Rezeptoren (BGJ398 – Inhibitor der FGF-Rezeptoren 1-3, Dorsomorphin – Inhibitor der BMP-Rezeptoren ALK2, 3, 6 und SB431542 – Inhibitor der TGF- β -Rezeptoren ALK4, 5, 7) in Passage 3 osteogen differenziert. Die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix als Parameter einer erfolgten Osteogenese wurde mit Alizarin-Rot-S visualisiert und die Progression der Differenzierung quantifiziert. pBMSCs zeigten über den gesamten Differenzierungsverlauf über 28 Tage eine deutlich stärkere Osteogenese im Vergleich zu pASCs, die insbesondere durch die Inhibition der TGF- β -Rezeptoren und unter BMP-2 auch durch die Inhibition der FGF-Rezeptoren signifikant gesteigert wurde. BMP-2 war für die Osteogenese der pASCs essentiell und steigerte bei pBMSCs die Differenzierungskapazität. Unter Inhibition der BMP-Rezeptoren war die Osteogenese der MSCs reduziert. Die Inhibition des TGF- β - und FGF-Signalweges schränkten die Osteogenese nicht ein, sondern verbesserten diese in pBMSCs sogar tendenziell. Eine kombinierte Inhibition des TGF- β - und FGF-Signalweges führte in pBMSCs zu einer signifikant gesteigerten osteogenen Differenzierung, wohingegen die Osteogenese der pASCs hierdurch nahezu unverändert blieb. Das osteogene Differenzierungspotential der pMSCs unterschied sich in Abhängigkeit vom histologischen Ursprung, wobei pBMSCs ein höheres osteogenes Differenzierungspotential aufwiesen. Die Osteogenese der pMSCs ließ sich durch Inhibition der TGF- β - und FGF-Rezeptoren modifizieren. Eine Inhibition des BMP-Signalweges bewirkte eine deutlich reduzierte Osteogenese, wohingegen die Inhibition des TGF- β - und FGF-Signalweges, und dies insbesondere in Kombination, in pBMSCs zu einem verbesserten osteogenen Differenzierungspotential führte. Die Modifikation osteoinduktiver Signalwege zur Optimierung der osteogenen Regenerationskapazität in der MSC-basierten Therapie stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um pathologische Knochenregeneration und Knochendefekte kritischer Größe therapeutisch anzugehen.

Summary

Bone defects and reduced bone regeneration pose a substantial therapeutic challenge. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are a promising therapeutic option within tissue engineering and are evaluated in various preclinical experiments, but are also used in basic clinical approaches. Osteogenic differentiation of porcine MSCs from bone marrow (pBMSCs) and fat tissue (pASCs) is influenced by various signaling pathways like TGF- β , BMP and FGF. Analyzing the impact of these signaling pathways on the osteogenesis of MSCs and optimizing differentiation by growth factors and inhibitors is essential to ensure standardised clinical MSC-based therapies. Therefore, pASCs and pBMSCs were differentiated with Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and specific inhibitors of signaling pathway receptors (BGJ398 – FGF receptor 1-3 inhibitor, Dorsomorphin – BMP ALK2, 3, 6 receptor inhibitor and SB431542 – TGF- β ALK4, 5, 7 receptor inhibitor). To visualize calcification of extracellular matrix, cells were stained with alizarin red S and progression of differentiation was subsequently quantified by extracted dye. Osteogenic potential of pBMSCs generally was superior compared to pASCs. Both inhibition of TGF- β -receptors and FGF-receptors significantly enhanced osteogenic differentiation potential of pBMSCs. Furthermore, combined inhibition of TGF- β - and FGF-signaling pathway improved osteogenic differentiation potential of pBMSCs significantly, whereas the osteogenesis of pASCs remained unchanged. BMP-2 was essential for osteogenesis of pASCs and increased the differentiation capability of pBMSCs, whereas inhibition of BMP-receptors reduced the osteogenesis of both cell types. Osteogenic differentiation potential of pMSCs differed depending on histological origin. Thus, pBMSCs generally indicated a superior osteogenic differentiation potential to pASCs. Osteogenesis of pMSCs could be modified by inhibition of both TGF- β - and FGF-receptors. Repression of BMP-signaling pathway distinctly reduced osteogenesis, whereas inhibition of TGF- β - and FGF-signaling pathway, and particularly in combination, increased the osteogenic differentiation potential of pBMSCs. To optimize osteogenic regeneration capacity, modification of osteogenic signaling pathways in MSC-based therapies is a promising clinical approach for treating pathological bone regeneration and critical size defects.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	h	<i>hour</i>
°C	Grad Celsius	<i>in vitro</i>	im Reagenzglas, hier: in Zellkulturgefäßen
µg	Mikrogramm	<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
µl	Mikroliter	KCl	Kaliumchlorid
µm	Mikrometer	kg	Kilogramm
µM	Mikromolar	l	Liter
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>	min	Minute
Abb.	Abbildung	mg	Milligramm
ALK	<i>Activin receptor-like kinase</i>	ml	Milliliter
a. u.	<i>arbitrary unit</i>	M	Molar
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein-2</i>	MSC	<i>Mesenchymal stromal cell</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	n =	Anzahl der Donoren
ca.	circa	NaCl	Natriumchlorid
CaCl₂	Calciumchlorid	ng	Nanogramm
CD	<i>cluster of differentiation</i>	nm	Nanometer
CO₂	Kohlenstoffdioxid	nM	Nanomolar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	OD	optische Dichte
DMSO	Dimethylsulfoxid	pASC	porcine <i>Adipose-derived stromal cell</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	pBMSC	porcine <i>Bone marrow-derived stromal cell</i>
et al.	et alia	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
EZM	extrazelluläre Matrix	PFA	Paraformaldehyd
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	Tab.	Tabelle
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor-2</i>	TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
FGF-R	<i>Fibroblast growth factor-receptor</i>	U	Unit
g	Gramm	U/min	Umdrehungen pro Minute
g	Vielfaches der Fallbeschleunigung		

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Interaktionsschema zwischen MSCs, Trägermatrix und Knochendefekt	3
Abb. 2: Übersicht des Projekts zur MSC-basierten Therapie von Critical-Size-Defekten	12
Abb. 3: Expression der Oberflächenantigene in Passage 3	26
Abb. 4: Titration des Inhibitors SB431542	27
Abb. 5: Titration des Inhibitors Dorsomorphin.....	28
Abb. 6: Titration des Inhibitors BGJ398.....	29
Abb. 7: Quantifizierung der osteogenen Differenzierung der pASCs.....	30
Abb. 8: Lichtmikroskopische Dokumentation der osteogenen Differenzierung der pASCs	31
Abb. 9: Quantifizierung der osteogenen Differenzierung der pBMSCs	32
Abb. 10: Lichtmikroskopische Dokumentation der osteogenen Differenzierung der pBMSCs .	32
Abb. 11 A – C: Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mit Alizarin-Rot-S-Rücklösung bei pASCs nach fakultativer BMP-2-Supplementation und unter Einfluss spezifischer Inhibitoren.....	35
Abb. 12: Lichtmikroskopische Dokumentation der osteogenen Differenzierung mit Alizarin-Rot-S-Färbung bei pASCs nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit Supplementation von SB431542, Dorsomorphin und BGJ398	37
Abb. 13 A – C: Quantifizierung der Alizarin-Rot-S-Rücklösung bei pBMSCs nach osteogener Differenzierung mit fakultativer BMP-2-Supplementation und unter Einfluss spezifischer Inhibitoren.....	40
Abb. 14: Lichtmikroskopische Dokumentation der osteogenen Differenzierung mit Alizarin-Rot-S-Färbung bei pBMSCs nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit Supplementation von SB431542, Dorsomorphin und BGJ398	42
Abb. 15 A – C: Quantifizierung der Alizarin-Rot-S-Rücklösung bei pASCs nach osteogener Differenzierung mit fakultativer BMP-2-Supplementation und unter Einfluss von Kombinationen spezifischer Inhibitoren.....	44
Abb. 16 A – C: Quantifizierung der Alizarin-Rot-S-Rücklösung bei pBMSCs nach osteogener Differenzierung mit fakultativer BMP-2-Supplementation und unter Einfluss von Kombinationen spezifischer Inhibitoren.....	48
Abb. 17: Vergleich der osteogenen Differenzierung porciner MSCs mit fakultativer BMP-2- und Inhibitorsupplementation	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte mit Herstellernachweis	14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien mit Herstellernachweis	15
Tabelle 3: Chemikalien, Zellkulturlösungen und Zytokine mit Herstellernachweis.....	16
Tabelle 4: Antikörper mit Herstellernachweis	17
Tabelle 5: Informationen zum biologischen Material	18
Tabelle 6: Kollagenaselösung	19
Tabelle 7: Zellkulturmedium.....	20
Tabelle 8: Osteogenes Differenzierungsmedium	24
Tabelle 9: Fakultativ koinkubierte Zusätze zum osteogenen Differenzierungsmedium.....	24

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Bone Tissue Engineering</i>	1
1.2 Mesenchymale Stromazellen (MSCs).....	3
1.2.1 Mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark (BMSCs)	6
1.2.2 Mesenchymale Stromazellen aus dem Fettgewebe (ASCs).....	7
1.3 Osteogenese der MSCs	7
1.3.1 TGF- β -Signalweg und Inhibition durch SB431542	9
1.3.2 BMP-Signalweg und Inhibition durch Dorsomorphin	10
1.3.3 FGF-Signalweg und Inhibition durch BGJ398	10
1.4 Projektpräsentation.....	11
1.5 Ziele der Arbeit	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Geräte	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Chemikalien, Zellkulturlösungen und Zytokine.....	15
2.4 Antikörper	16
2.5 Biologisches Material.....	17
2.6 Isolation porciner MSCs	18
2.6.1 Isolation porciner ASCs	18
2.6.2 Isolation porciner BMSCs.....	19
2.7 Methoden der Zellkultur	20
2.7.1 Kultivierung und Passagierung	20
2.7.2 Kryokonservierung porciner MSCs	20
2.7.3 Auftauen kryokonservierter MSCs.....	21

2.7.4	Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiter-Blue® <i>Cell Viability Assay</i>	21
2.7.5	Vitalitätstest und Lebendzellzahlbestimmung	22
2.8	Charakterisierung porciner MSCs mittels Durchflusszytometrie	22
2.9	Osteogene Differenzierung porciner MSCs	23
2.10	Differenzierungsnachweis mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und Quantifizierung mit Cetylpyridiniumchlorid.....	24
2.11	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Charakterisierung der MSCs	26
3.2	Osteogene Differenzierung der MSCs	27
3.2.1	Titration des Inhibitors SB431542	27
3.2.2	Titration des Inhibitors Dorsomorphin.....	27
3.2.3	Titration des Inhibitors BGJ398.....	28
3.2.2	Osteogene Differenzierung unter fakultativer BMP-2-Supplementation.....	29
3.2.3	Osteogene Differenzierung unter spezifischer Inhibition des TGF- β -, BMP- und FGF-Signalweges.....	33
4	Diskussion.....	51
4.1	Durchflusszytometrische Analyse porciner MSCs	52
4.2	Vergleich der osteogenen Differenzierung porciner MSCs unter fakultativer BMP-2-Supplementation.....	53
4.3	Vergleich der osteogenen Differenzierung unter spezifischer Inhibition des TGF- β -, BMP- und FGF-Signalweges	55
4.4	Schlussfolgerungen	61
4.4.1	Auswirkungen der BMP-2-Supplementation	61
4.4.2	Auswirkungen der Inhibition des TGF- β -, BMP- und FGF-Signalweges	62
4.5	Kritische Betrachtung.....	62
4.6	Ausblick	64
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	66
	Danksagung.....	

1 Einleitung

1.1 *Bone Tissue Engineering*

Tissue Engineering ist Gegenstand der Forschung in zahlreichen medizinischen Fachdisziplinen. Man versteht darunter die Regeneration oder den Ersatz von erkranktem, fehlendem oder geschädigtem Gewebe durch *in vitro* rekonstruiertes biologisches Gewebe. Die für das *Tissue Engineering* notwendigen wissenschaftlichen Prinzipien zur Kultivierung derart künstlich generierter Gewebe und geformter biologischer Strukturen erfordern eine interdisziplinäre Kombination aus Kenntnissen der Medizin, Naturwissenschaften und Ingenieurwissenschaften (Sittinger et al. 1996). Die technischen Herausforderung zur Herstellung von klinisch nutzbarem Gewebe sind vielfältig und beinhalten neben der Kultivierung geeigneter Zellpopulationen die Erforschung von Biomaterialien, die als Trägersubstanz dienen, und etwaig notwendige Wachstumsfaktoren, um *in vitro* die Herstellung und *in vivo* das Einwachsen des künstlich generierten Gewebes zu ermöglichen. Geeignete Zellpopulationen, um verschiedene Gewebe zu generieren, sind z. B. mesenchymale Stromazellen (MSCs). Die klinische Nutzung des *Bone Tissue Engineerings* erfordert aber nicht nur die bloße Kultivierung entsprechender Zellen, sondern auch die Herstellung eines funktionierenden Zell-Matrix-Verbundes und ist somit technisch deutlich aufwendiger. Vor einer sicheren Anwendung künstlich generierter Gewebe in klinischen Therapien müssen geeignete Zellpopulationen wie MSCs kultiviert und in das gewünschte Gewebe differenziert werden können. Gelingt dies *in vitro*, muss eine geeignete künstliche Leitstruktur etabliert werden, die sowohl eine bestmögliche Versorgung und Interaktion mit der genutzten Zellpopulation als auch mit dem Empfängerorganismus bietet. Derartige dreidimensionale Strukturen, sogenannte *Scaffolds*, sind im *Bone Tissue Engineering* häufig eine Hydroxylapatit- oder Calcibon-Trägermatrix, die mit un- oder differenzierten Zellen *in vitro* besiedelt oder *in vivo* appliziert werden. Diese Trägerstrukturen sollen die Implantation in das defekte, zu regenerierende Gewebe ermöglichen (Khan et al. 2012). Gelingt es die vielen Einflussfaktoren dieser Prozesse zu kontrollieren und optimieren, so können durch das *Tissue Engineering* defekte oder zerstörte Gewebe ersetzt, in ihrer Funktion eingeschränkte Gewebe unterstützt und Regenerationsprozesse verbessert werden. Die Nutzung des *Tissue Engineerings* ist für viele medizinische Fachdisziplinen eine hoffnungsvolle Therapieoption und wird daher

aktuell intensiv erforscht. Insbesondere die Nutzung von *in vitro* gezüchtetem Gewebe aus autologen Zellen stellt auch bei Knochendefekten eine vielversprechende Alternative zur kurativen Behandlung dar, da das Risiko von Abstoßungsreaktionen und mangelnder Biokompatibilität minimiert wird. Mögliche autologe Zellen, die dafür genutzt werden können, sind mesenchymale Stromazellen, wie sie aus dem Knochenmark (BMSCs), aus dem Fettgewebe (ASCs) oder der Zahnpulpa (DSCs) isoliert werden können (Gupta und Chang 2010). Dass MSCs ein multipotentes Differenzierungspotential besitzen, gut *in vitro* kultiviert werden können, hypoimmunogen, immunregulatorisch und so für verschiedene mögliche Therapieansätze zur Verfügung stehen, macht sie zu einem Hoffnungsträger in der regenerativen Medizin (Tissue engineering 2000). Die autologe MSC-basierte Therapie von Knochendefekten konnte bereits erfolgreich im Schafmodell demonstriert werden (Niemeyer et al. 2010). Dies war ein wegweisender Schritt für die klinische Etablierung des *Bone Tissue Engineerings* bei der Therapie von Critical-Size-Defekten, weil gezeigt werden konnte, dass diese mit autologen BMSCs therapiert werden können. Die Zellen wurden hierbei auf eine dreidimensionale Hydroxylapatit-Trägermatrix, die dem Knochendefekt in Form und Größe nachempfunden war, gegeben (Quarto et al. 2001). Für das *Bone Tissue Engineering* ist es für eine erfolgreiche Therapie von besonderer Bedeutung nicht nur geeignete Zellen zu identifizieren, sondern deren Interaktion mit einer Trägermatrix, also geeigneten Knochenersatzmaterialien, zu optimieren (Arealis und Nikolaou 2015). Diese biokompatible Trägermatrix stellt sicher, dass die autologen oder allogenen MSCs am Ort des Defekts verbleiben und bietet eine Leitstruktur, so dass ein Gewebewachstum möglich ist. Die osteoinduktive Interaktion der MSCs mit dem *Scaffold* beeinflusst neben der Integration der MSCs in das Zielgewebe auch die zelluläre Kommunikation mit ortsständigen Zellen, so dass durch die MSC-basierte Therapie auch das Regenerationspotential der bereits im Gewebe vorhandenen Zellen verbessert wird, u. a. durch eine Verbesserung der Regeneration, Angiogenese, Immunmodulation und Rekrutierung weiterer Zellen (Dimarino et al. 2013) (Abb. 1). Zur Geweberegeneration tragen also auch endogene MSCs bei, die durch die implantierten MSCs rekrutiert werden, die entweder aus dem Zielgewebe, dem Knochenmark oder anderen mesenchymalen Geweben entstammen und durch Proliferation und Differenzierung zerstörtes Gewebe ersetzen (Erices et al. 2000). Für die Geweberegeneration im Rahmen des *Bone Tissue Engineerings* ist die Mikroumgebung der MSCs von entscheidender Bedeutung, die durch

Differenzierungsfaktoren der Osteogenese von MSCs, wie z. B. *Bone morphogenetic proteins* (BMPs), beeinflusst wird. Zur Etablierung und klinischen Evaluation der verschiedenen Ansätze MSC-basierter Therapie bei Knochendefekten und systemischen Knochenerkrankungen ist es unverzichtbar, zu untersuchen, welche Wirkungen solche Faktoren wie BMPs auf die Differenzierung von MSCs haben, um die Erkenntnisse für die Optimierung einer MSC-basierten Therapie zu nutzen. Die Aufklärung molekularer Einflussfaktoren auf das Differenzierungsverhalten von MSCs und deren Modifikation durch Supplementation von Wachstumsfaktoren oder Inhibitoren ist eine essentielle Aufgabe auf dem Weg zu standardisierten klinischen MSC-basierten Therapien.

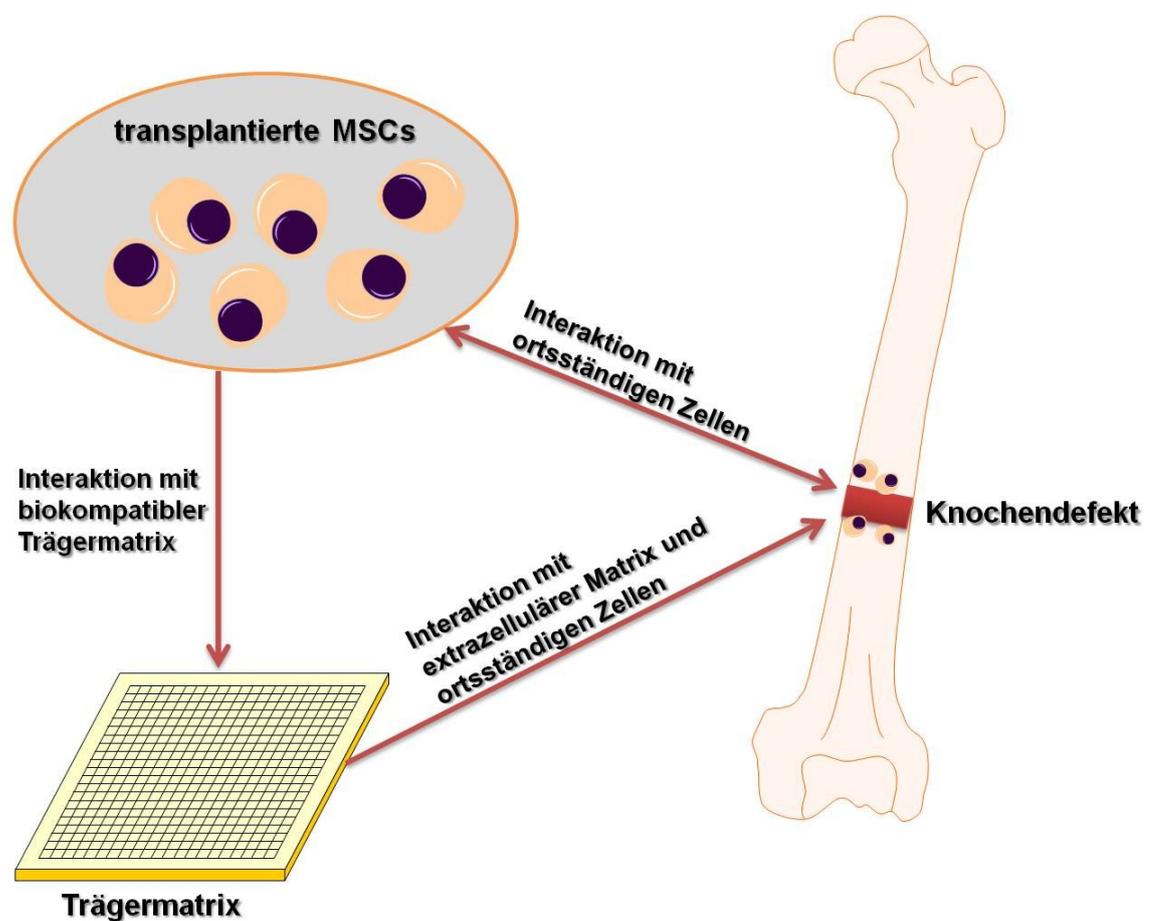


Abb. 1: Interaktionsschema zwischen MSCs, Trägermatrix und Knochendefekt

Das Regenerationspotential der MSC-basierten Therapie von Knochendefekten wird durch die Interaktion zwischen transplantierten mesenchymalen Stromazellen (MSCs), biokompatibler Trägermatrix, ortsständigen Zellen und der extrazellulären Matrix am Ort des Knochendefekts beeinflusst.

1.2 Mesenchymale Stromazellen (MSCs)

Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSCs) entstehen durch asymmetrische Teilung und stellen eine undifferenzierte Zellpopulation im Gewebe dar (Pittenger et al.

1999). Teilt sich eine multipotente Stromazelle, so differenziert sich eine Tochterzelle in eine gewebespezifische Zelle, die andere Tochterzelle verbleibt im undifferenzierten, multipotenten Zustand und trägt so zum Erhalt der Zellpopulation der multipotenten Stromazellen durch ihre Autoreproduktion, die als *self renewal* bezeichnet wird, bei (Song et al. 2006). Diese Differenzierung der Tochterzelle wird durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gesteuert und sorgt dafür, dass diese Zelle sich über eine Progenitorzelle zu einer differenzierten Zelle eines Gewebes entwickelt. Dadurch wird die Differenzierung zu einem definierten Zelltyp erreicht (Knoblich 2001). Primär ist die Aufgabe der MSCs die zelluläre Homöostase und die Regeneration ihres Gewebes (Atari et al. 2012). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen sind MSCs multipotent. Ihr Differenzierungspotential ist also eingeschränkter und es besteht die Möglichkeit sich in verschiedene Zelltypen einer Linie wie Adipozyten, Chondrozyten oder Osteozyten zu differenzieren (Buddecke 2002). Jedoch konnte auch die Möglichkeit einer Transdifferenzierung der MSCs in Zellen aller drei Keimblätter nachgewiesen werden (Song und Tuan 2004). MSCs sorgen also für den Erhalt des Gewebes und können durch die Differenzierung einer Tochterzelle zugleich liniendeterminierte Progenitorzellen generieren und so die zelluläre Homöostase des Zielgewebes regulieren (Gilbert et al. 2006; Khan et al. 2012; Haas und Kronenwett 2005). In Abgrenzung dazu sind embryonale Stammzellen nach dem 8-Zell-Stadium pluripotent, das heißt jede Zelle ist im Stande in die Zelltypen der drei Keimblätter zu differenzieren. Vor dem 8-Zell-Stadium der Zygote ist außerdem die Differenzierung in extraembryonales Gewebe möglich; diese embryonalen Stammzellen werden als totipotent bezeichnet (Haas und Kronenwett 2005; Buddecke 2002). Um in der Nomenklatur eine Trennung zwischen multi- und pluripotentem Differenzierungspotential zu bewahren, wurde durch die *International Society for Cellular Therapy* vorgeschlagen, nur Zellen mit pluripotentem Differenzierungspotential als Stammzellen zu bezeichnen (Horwitz et al. 2005).

Aus verschiedenen Geweben lassen sich im adulten Organismus MSCs isolieren, die eine heterogene Zellpopulation mit einem multipotenten Differenzierungspotential darstellen (Friedenstein et al. 1966). 1960 wurden erstmals von A. J. Friedenstein MSCs im Knochenmark entdeckt, die als Stammzellquelle für Regenerationsprozesse im adulten Körper identifiziert werden konnten (Wong 2011). Aufgrund der auffälligen Homologie dieser Zellpopulation zu Fibroblasten bezüglich Morphologie und

Plastikadhärenz wurden diese als fibroblastoide Zellen beschrieben, von denen einige die Möglichkeit zur Bildung von Zellkolonien aufwiesen und die als *colony forming units fibroblasts* (CFU-F) bezeichnet wurden (Hanley et al. 2013; Horwitz und Dominici 2008). MSCs haben die Fähigkeit nach asymmetrischer Teilung zu differenzieren; in diesem Fall in Zelltypen mesenchymalen Ursprungs. Insbesondere ein osteogenes, chondrogenes und adipogenes Differenzierungspotential charakterisiert die von Friedenstein beschriebenen CFU-Fs (Caplan 1991; Wong 2011). Neben dem Knochenmark als Quelle zur Isolation von MSCs konnten mittlerweile auch verschiedene andere Gewebe wie das Fettgewebe und die Zahnpulpa als histologischer Ursprung adulter MSCs identifiziert werden (Gronthos et al. 2000; Zuk et al. 2001). Zur zellbasierten Therapie von Gewebe- und Organdefekten soll im Rahmen des *Tissue Engineerings* das Differenzierungspotential der MSCs genutzt werden. So können Defekte durch autologe multipotente Zellen, die in die Zielzellen des geschädigten Gewebes differenziert werden, regeneriert werden (Wang et al. 2012; Pourrajab et al. 2013). Forschung und Nutzung von MSCs ist hierbei im Vergleich zu Stammzellen embryonaler Herkunft, die für ähnliche Therapieansätze in Betracht kommen, neben der Möglichkeit zur autologen Gewinnung, auch ethisch unbedenklich und daher zu favorisieren (Monti und Redi 2011). Dennoch birgt der Einsatz einer MSC-basierten Therapie Risiken, die vor einem klinischen sicheren Einsatz evaluiert werden müssen: die Nutzung von MSCs bei Gewebedefekten erhöht das Risiko einer Tumorgenese und -proliferation, das bei embryonalen Stammzellen allerdings noch größer ist als bei MSCs (Werbowetski-Ogilvie et al. 2009; Shih et al. 2007; Blum und Benvenisty 2008). Allerdings konnte auch gegenteilig gezeigt werden, dass MSCs Tumoren positiv regulieren können, z. B. durch Apoptoseinduktion entarteter Zellen (Sun et al. 2009) und Inhibition der tumorinduzierten Angiogenese (Otsu et al. 2009). Nicht zuletzt muss bedacht werden, dass MSCs selbst zu Tumorzellen entarten können (Wong 2011). Für den klinischen Einsatz ist außerdem relevant, dass nach erfolgter Implantation der MSCs der Anteil vitaler Zellen häufig nur bei 40 – 60 % liegt und so der Gewebedefekt in aller Regel nicht vollständig mit vitalen MSCs besetzt wird und die Geweberegeneration auch von der Anzahl der Stammzellen in der Mischpopulation abhängt (Choi et al. 2008; Mauney et al. 2007).

MSCs sind eine heterogene Zellpopulation, die aus zahlreichen Geweben isoliert werden können. Um nach der Isolation zu verifizieren, dass es sich um MSCs handelt,

werden die Stromazellen auf bestimmte Kriterien überprüft, die von der *International Society for Cellular Therapy* festgelegt worden sind. Demnach sollen MSCs nach der Isolation in der Zellkultur plastikadhärent sein und ein osteogenes, chondrogenes und adipogenes Differenzierungspotential aufweisen (Bourin et al. 2013; Dominici et al. 2009). Ferner werden die MSCs immunphänotypisch auf die Ausprägung bestimmter Oberflächenantigene, den *Cluster of Differentiation*, untersucht. Dabei sollten die MSCs eine Expression von CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 zeigen (Wong 2011). Nicht exprimieren sollten die MSCs allerdings die Antigene CD14, CD34 und CD45 (Dominici et al. 2006). Zu beachten ist allerdings, dass MSCs für CD34 in frühen Passagen positiv sind (Gimble et al. 2007). Relativiert wird das Kriterium der Oberflächenantigene zusätzlich durch die Beobachtung, dass deren Expression durch Kulturseneszenz verändert wird und vom histologischen Ursprung der MSCs und deren Entnahmeort abhängt (Keating 2012; Mitchell et al. 2006).

1.2.1 Mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark (BMSCs)

MSCs aus dem Knochenmark sind die am längsten und meisten genutzten adulten multipotenten Zellen im Rahmen des *Tissue Engineering*s (Seong et al. 2010; Baksh et al. 2007). Die Nutzung autologer BMSCs ist jedoch limitiert und mit einer erhöhten Entnahmemorbidität im Vergleich zu anderen histologischen Quellen für MSCs verbunden. Immunphänotypische Analysen der BMSCs zeigen, dass es sich auch hier um eine heterogene Zellpopulation handelt, von denen nur ein Teil multipotente Stammzelleigenschaften und ein Differenzierungspotential in Osteoblasten, Chondroblasten oder Adipozyten besitzt (Kuznetsov et al. 1997). Zur klinischen Etablierung der MSC-basierten Therapie sind entsprechende Tiermodelle notwendig. Das Schwein eignet sich als Modellorganismus, insbesondere zur Untersuchung der Frakturheilung, besonders gut, weil die Morphologie des Knochens und die Knochenneubildungsrate dem humanen System am meisten ähneln (Aerssens et al. 1998). 2012 wurden auch auf zellulärer Ebene die Eigenschaften humaner und porciner MSCs verglichen und es konnte gezeigt werden, dass die Isolation, Kultivierung und der Immunphänotyp, sowie auch das Differenzierungspotential der multipotenten Zellen weitestgehend ähnlich sind (Noort et al. 2012). Analog zu den BMSCs konnten auch im porcinen System MSCs im Fettgewebe identifiziert werden, wodurch diese beiden histologischen Quellen für MSCs zwischen Mensch und Schwein gut vergleichbar sein sollten (Qu et al. 2007).

1.2.2 Mesenchymale Stromazellen aus dem Fettgewebe (ASCs)

MSCs adipogener Herkunft werden als *Adipose-derived stromal cells* bezeichnet (ASCs). In der regenerativen MSC-basierten Therapie gewinnen diese Zellen zunehmend an Bedeutung, da das Fettgewebe für den Patienten als Entnahmeort aufgrund geringerer Invasivität vorzuziehen ist (Bray 2004). Im Gegensatz zur Entnahme von Knochenmark ist die Liposuktion ein vielfach durchgeführter, elektiver Eingriff, bei dem in Abhängigkeit von der Körperkonstitution des Patienten bis zu 3 Liter Aspirat entnommen werden können, die in der Regel verworfen werden (Bray 2004). Neben dem Liposuktionsaspirat können ASCs aber auch aus dem Unterhautfettgewebe oder abdominalen Fettpolstern problemlos und risikoarm minimalinvasiv gewonnen werden (Nakagami et al. 2006). Dies ist ein erheblicher Vorteil zur klinischen Nutzung von BMSCs, die nur aufwendig invasiv und deutlich risikobehafteter bei geringerer Zellausbeute gewonnen werden können (Lee et al. 2003). ASCs besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung und zeigen im humanen System immunphänotypisch eine Ähnlichkeit von etwa 90 % zu BMSCs (Zuk et al. 2002). Es konnte ferner gezeigt werden, dass humane ASCs im Gegensatz zu BMSCs keine Reduktion des osteogenen Differenzierungspotentials mit steigendem Alter des Donors aufweisen, was für eine klinische Anwendung von Bedeutung sein kann (Chen et al. 2012). Darüber hinaus lassen sich aus Liposuktionsaspirat deutlich mehr ASCs gewinnen als BMSCs aus Knochenmarkaspirat (Fraser et al. 2006).

1.3 Osteogenese der MSCs

Durch Supplementation entsprechender bioaktiver Faktoren lassen sich MSCs osteogen, chondrogen und adipogen differenzieren (Pittenger et al. 1999). Bei Kultivierung unter basalen Proliferationsbedingungen ist die gleichzeitige Expression spezifischer Gene für die osteogene (Osterix), chondrogene (SOX9) und adipogene (PPAR γ) Zelllinie in humanen MSCs nachweisbar. Bei der gerichteten osteogenen Differenzierung in eine ausdifferenzierte Gewebszelle durch Koinkubation mit entsprechenden Faktoren wird die Expression der chondrogenen und adipogenen Transkriptionsfaktoren herunterreguliert (Ahdjoudj et al. 2001).

Für die Osteogenese humaner MSCs konnten Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure als essentielle Differenzierungsfaktoren identifiziert werden (Pittenger et al. 1999). Die osteogene Differenzierung der MSCs verläuft über Osteoprogenitorzellen, Präosteoblasten, Osteoblasten zu Osteozyten. Die einzelnen Differenzierungsstufen werden durch Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren reguliert. Die osteogene Differenzierung lässt sich u. a. in die Stadien Proliferation, Matrixreifung und Mineralisation der extrazellulären Matrix einteilen. Die sich aus den Osteoprogenitorzellen entwickelnden Präosteoblasten sind ebenfalls weiter proliferativ und zeigen eine erhöhte Alkalische-Phosphatase-Aktivität; außerdem bilden sie Kollagen Typ I (Shui et al. 2003; Qi et al. 2003). Bei der Differenzierung zu Osteoblasten verlieren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit, synthetisieren aber in großem Umfang Komponenten der Knochenmatrix wie Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin (Ducy et al. 2000; Siggelkow et al. 2004). Glukokortikoide wie Dexamethason sind osteoinduktiv und für die Bildung der extrazellulären Matrix von großer Bedeutung (Bellows et al. 1987; Cheng et al. 1996). Durch entsprechende Supplementation des Differenzierungsmediums wird die Expression osteospezifischer Marker wie der Alkalischen Phosphatase und RUNX2 zunächst hochreguliert (Cheng et al. 1994; Viereck et al. 2002; Beloti und Rosa 2005). Allerdings konnte gezeigt werden, dass darüber hinaus in Abhängigkeit von der Konzentration des Glukokortikoids neben der Osteogenese auch die adipogene Differenzierung in BMSCs induziert wird (Bennett et al. 1991; Yin et al. 2006). Ascorbinsäure ist für die Osteogenese notwendig, weil es für die enzymatische Hydroxylierung des Kollagens benötigt wird, das dadurch seine Struktur und Stabilität erhält (Murad et al. 1981). Zusätzlich übt Vitamin C in MSCs einen osteogenen Stimulus durch Induktion der Kollagen- und Alkalische-Phosphatase-Synthese aus (Franceschi und Young 1990). In der Zellkultur wird das Derivat L-Ascorbinsäure-2-phosphat genutzt, das stabiler als Vitamin C ist (Takamizawa et al. 2004). So ist für die enzymatische Hydroxylierung von Prolin und Lysin in Prokollagen Vitamin C als Cofaktor notwendig (Vater et al. 2011). Somit liegt die Bedeutung von Vitamin C für die osteogene Differenzierung insbesondere in der Bildung von Kollagen, das für die extrazelluläre Matrix benötigt wird. Die Bildung von Kollagen durch die MSCs ist Voraussetzung für die weitere Differenzierung der Osteoblasten, da diese eine kollagenhaltige extrazelluläre Matrix benötigen (Xiao et al. 2002). Ferner wird für die Mineralisation der extrazellulären Matrix β -Glycerophosphat genutzt, das der Alkalischen Phosphatase als Substrat dient (Tenenbaum et al. 1992). Neben der

Funktion als Phosphatquelle für die Mineralisierung der extrazellulären Matrix und Bildung des Hydroxylapatits, beeinflusst vermutlich β -Glycerophosphat wie BMP-2 auch intrazellulär die Expression von Genen, die bei der osteogenen Differenzierung eine wichtige Funktion übernehmen (Tada et al. 2011).

Inhibitoren tragen entscheidend zur Aufklärung spezifischer Signalwege bei und demonstrieren, welche Bedeutung distinkte Signalwege für zelluläre Prozesse haben und können so auch für klinische Therapien von Bedeutung sein (Blake et al. 2000). Zur Evaluation der Bedeutung der für die Osteogenese vermeintlich bedeutsamen Signalwege, wie *Transforming growth factor- β* (TGF- β), BMP und *Fibroblast growth factor* (FGF), ist also der Einsatz spezifischer Inhibitoren dieser Signaltransduktionswege eine sinnvolle Möglichkeit, um ein tieferes Verständnis der molekularen Mechanismen bei Differenzierungsprozessen in porcinen MSCs zu untersuchen.

1.3.1 TGF- β -Signalweg und Inhibition durch SB431542

TGF- β , BMP und Activine gehören zur TGF- β -Superfamilie, die sekretierte Wachstumsfaktoren darstellen. Die Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie läuft über zwei Typen von Serin-/Threoninrezeptorkinasen, wobei entsprechende Liganden zunächst an den Typ-2-Rezeptor binden, der daraufhin den Typ-1-Rezeptor aktiviert (Massagué 1998). Zu den TGF- β -Typ-1-Rezeptoren gehören verschiedene *Activin receptor-like kinases* (ALK) wie ALK4, ALK5 und ALK7. Durch diesen Rezeptorkomplex wird intrazellulär Smad2/3-abhängig Smad4 aktiviert und so die Expression TGF- β -spezifischer Zielgene, wie Kollagen Typ I beeinflusst (Bubnoff und Cho 2001). Interessanterweise wird nicht nur beim TGF- β -Signalweg, sondern auch beim BMP-Signalweg der Einfluss auf die Expression osteogenesespezifischer Signalwege über Smad4 vermittelt. Proteine der TGF- β -Familie tragen somit zur Osteogenese der MSCs bei, obwohl ebenso gezeigt wurde, dass in späten Phasen TGF- β einen inhibierenden Einfluss hat (Janssens et al. 2005; Canalis et al. 2003). Für die frühe osteogene und chondrogene Differenzierung ist der TGF- β -Signalweg von besonderer Bedeutung, wohingegen die spätere Differenzierung der Osteoblasten gehemmt wird.

Die TGF- β -Signaltransduktion kann durch den reversiblen Inhibitor SB431542 gehemmt werden (Ho und Whitman 2008). Spezifisch wird hierbei die durch ALK4 und ALK5 induzierte Phosphorylierung von Smad2 inhibiert. BMP-induzierte

Signalkaskaden über ALK2, ALK3 und ALK6 werden nicht gehemmt (Inman et al. 2002; Laping et al. 2002). SB431542 wurde in dieser Arbeit daher zur selektiven Inhibition des TGF- β -Signalweges genutzt.

1.3.2 BMP-Signalweg und Inhibition durch Dorsomorphin

BMPs gehören zur TGF- β -Proteinfamilie, die die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten induzieren können (Phimphilai et al. 2006). Von über 20 verschiedenen BMP-Homo- und Heterodimeren spielt insbesondere BMP-2 im humanen System bei der induzierten Osteogenese von MSCs eine wichtige Rolle (Rahman et al. 2015). Die positive Wirkung von BMP-2 auf die osteogene Differenzierung von MSCs konnte in verschiedenen Experimenten sowohl im humanen System als auch in Tiermodellen gezeigt und bestätigt werden. Der osteogene Stimulus durch BMP-2 konnte im Tiermodell am Critical-Size-Defekt evaluiert werden: hier konnte die Koinkubation des Wachstumsfaktors erheblich zur Regeneration der Knochendefekte beitragen (Chen et al. 2004). Für BMPs existieren TGF- β -Typ-1- und Typ-2-Rezeptoren. Von den sieben bekannten TGF- β -Typ-1-Rezeptoren binden BMPs an ALK2, ALK3 und ALK6; demgegenüber binden TGF- β s und Activine u. a. an ALK4, ALK5 und ALK7 (Deschaseaux et al. 2009). Bei Bindung eines entsprechenden Liganden durch die BMP-Rezeptoren werden intrazellulär Smad1, Smad5 und Smad8 phosphoryliert, die dadurch Smad4 aktivieren. Durch diesen Komplex wird die Expression BMP-spezifischer Zielgene wie Osterix (Zhang 2010) und RUNX2 stimuliert (Javed et al. 2009).

Der irreversible Inhibitor Dorsomorphin, der synonym als Compound C erforscht wird, blockiert die durch verschiedene BMP-Liganden induzierte Aktivierung der Rezeptoren ALK1, ALK2, ALK3 und ALK6 und somit die Phosphorylierung von Smad1, Smad5 und Smad8, so dass Dorsomorphin hemmend auf BMP-Typ-1-Rezeptoren wirkt. In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Dorsomorphin potent die osteogene Differenzierung *in vitro* in MSCs inhibieren kann (Hong und Yu 2009). Dorsomorphin wurde in dieser Arbeit zur gezielten Hemmung des BMP-induzierten Signalweges genutzt.

1.3.3 FGF-Signalweg und Inhibition durch BGJ398

Die FGF-Familie zählt zu den Wachstumsfaktoren, die Proliferations- und Differenzierungsprozesse regulieren. *Fibroblast growth factor receptor* (FGF-R) sind

zellmembranständige Rezeptoren und stellen molekularbiologisch Rezeptortyrosinkinasen dar, die durch Ligandenbindung mit anschließender Autophosphorylierung intrazellulär weitere Phosphorylierungsschritte initiieren (Lee et al. 1989). FGF-2 hat dabei auch Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und wird von Adipozyten sekretiert (Kühn et al. 2012). So ist auch der FGF-Signalweg für die osteogene Differenzierung der MSCs von Bedeutung (Ng et al. 2008).

Der Inhibitor BGJ398, der auch als Infigratinib klinisch genutzt wird, hemmt die FGF-Rezeptortyrosinkinasen 1, 2 und 3 (Konecny et al. 2013). Durch die reversible Inhibition der Kinaseaktivität wird der FGF-Signalweg blockiert (Tan et al. 2014). Zu diesem Zweck wurde BGJ398 in dieser Arbeit zur Untersuchung der osteogenen Differenzierung in MSCs genutzt.

1.4 Projektpräsentation

In Anlehnung an ein in der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf etabliertes Tiermodell zur Therapie von Critical-Size-Defekten des Knochens soll im Rahmen dieser Arbeit die osteogene Regenerationskapazität von porcinen ASCs und BMSCs untersucht werden (Jungbluth et al. 2010). Diese Knochendefekte kritischer Größe, wie sie beispielsweise nach einem schweren Trauma oder Tumor entstehen können, sind dadurch charakterisiert, dass sie ohne Zuhilfenahme einer Knochenersatztherapie wie z. B. der Spongiosaplastik, einer autologen Transplantation von Spongiosa, nicht spontan heilen können (Schmitz und Hollinger 1986). Aufgrund der Entnahmemorbidität und der begrenzten Verfügbarkeit sucht man nach vielversprechenden Alternativen zur Spongiosaplastik. MSCs lassen sich gut expandieren und osteogen differenzieren, so dass sie eine vielversprechende Quelle sind, um auch große Knochendefekte zu therapieren. Um die Regeneration solcher Defekte zu optimieren, sollen MSCs entnommen, *in vitro* expandiert und in osteoblastoide Zellen differenziert und in den Defekt auf ein Knochenersatzmaterial als Trägermatrix implantiert werden. Von relevanter Bedeutung ist die Fragestellung, welche MSCs für diese Therapie zu favorisieren sind und wie der Regenerationsprozess durch osteoinduktive Differenzierung der Zellen zu optimieren ist. Dabei steht die Aufklärung molekularer Mechanismen, die die osteogene Differenzierung der MSCs beeinflussen, im Fokus. Im Tiermodell wird der zu therapierende Critical-Size-Defekt an der Tibia der Göttingen Minipigs durch ein standardisiertes Verfahren erzeugt und

das Regenerationspotential *in vitro* differenzierter MSCs nach erfolgter Reimplantation verglichen. Nach Euthanasie der Versuchstiere werden histologische Analysen Aufschlüsse über das Regenerationspotential der MSCs liefern. Die Ergebnisse der Bedeutung der histologischen Herkunft, der Optimierung der Osteogenese durch Zugabe von Wachstumsfaktoren und der In-vivo-Untersuchung werden wegweisende Erkenntnisse über die Anwendbarkeit MSC-basierter Therapie bei Critical-Size-Defekten liefern und so als Grundlage für weitere Studien und eine klinische Anwendung am Menschen dienen.

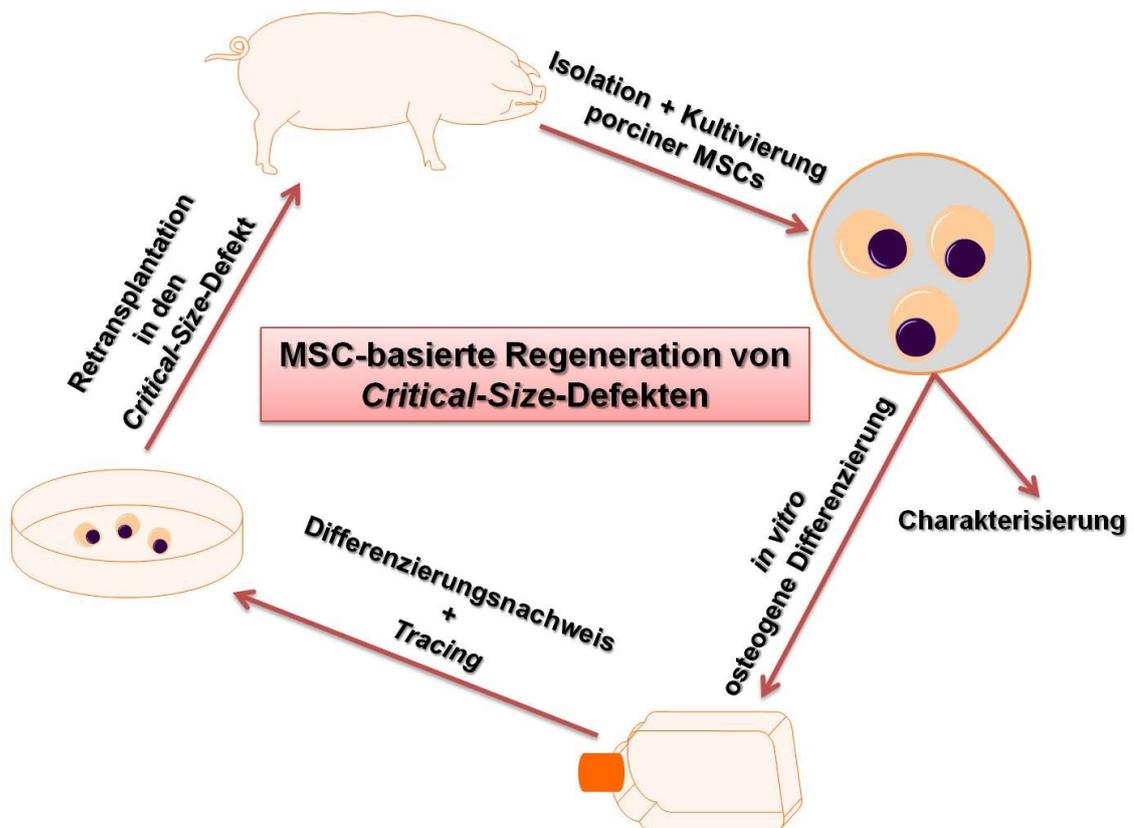


Abb. 2: Übersicht des Projekts zur MSC-basierter Therapie von Critical-Size-Defekten

Mesenchymale Stromazellen (MSCs) verschiedenen histologischen Ursprungs werden isoliert und *in vitro* osteogen differenziert. Nach erfolgreichem Differenzierungsnachweis der MSCs werden diese in einen künstlich hervorgerufenen Critical-Size-Defekt transplantiert und anschließend das Regenerationspotential histologisch evaluiert.

1.5 Ziele der Arbeit

MSCs sind eine vielversprechende Therapieoption für die Knochenregeneration und werden bereits in ersten klinischen Therapieansätzen genutzt. Das osteogene Differenzierungspotential der MSCs ist abhängig von verschiedenen Parametern wie unter anderem dem Gewebeansprung, den Kulturbedingungen und von etwaig

verwendeten Knochenersatzmaterialien. Insbesondere humane BMSCs sind gut charakterisiert und im Vergleich zu MSCs anderer histologischer Herkunft besonders gut erforscht. Zur standardisierten Evaluation einer MSC-basierten Therapie ist die Nutzung geeigneter Tiermodelle unverzichtbar. Hierfür ist das Minipigmodell besonders geeignet, weil die Anatomie, Morphologie und das Remodelling des Knochens den humanen physiologischen Gegebenheiten am meisten ähnelt (Pearce et al. 2007). Zur sicheren Evaluation geplanter In-vivo-Experimente ist es unabdingbar die Differenzierungseigenschaften porciner MSCs vorab *in vitro* genau zu untersuchen, um anschließend in einem autologen Therapieansatz im Tiermodell das Regenerationpotential bewerten zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der osteogene Differenzierungsprozess porciner MSCs aus dem Knochenmark und dem Fettgewebe sowie die Bedeutung spezifischer Signalwege über 28 Tage analysiert werden, um die Ursachen des unterschiedlichen Differenzierungsverhaltens in Abhängigkeit vom histologischen Ursprung der autologen Zellen aufzuklären. Die MSCs werden dazu standardisiert *in vitro* osteogen differenziert, um das Differenzierungspotential und die Progression der Osteogenese der MSCs beurteilen und vergleichen zu können. Für die Aufklärung osteoregenerativer Mechanismen und die klinische Nutzung der MSC-basierten Therapie muss darüber hinaus in präklinischen Experimenten analysiert werden, welche molekularen Mechanismen der zelltypspezifischen osteogenen Differenzierung zu Grunde liegen, wie diese mit bestimmten Faktoren wechselwirken und inwieweit sich das osteogene Differenzierungspotential dementsprechend optimieren lässt. Die Inhibition des FGF-, TGF- β - und BMP- Signalweges soll Aufschluss darüber geben, welche Bedeutung diese Signalkaskaden für den Differenzierungsprozess der genutzten MSCs haben, wie sie sich bezüglich ihres Gewebeansprungs unterscheiden und ob durch gezielte Inhibition oder Induktion entsprechender Signalwege die Osteogenese optimiert werden kann. Die entsprechenden Ergebnisse sollen dazu beitragen, Differenzierungsprozesse der porcinen ASCs und BMSCs aufzuklären, so dass qualitative Rückschlüsse auf eine In-vivo-Untersuchung getroffen werden können, um zukünftig geplante zellbasierte Therapien unter standardisierten, sicheren und bestmöglichen Ergebnissen der knöchernen Regeneration gewährleisten zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Abzug	Waldner
Brutschrank	Thermo Electron Corporation HERAcell® 150
Durchflusszytometer	BD Biosciences FACSCalibur
Kryo-Einfriergerät	Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen Cryo-Einfriergerät Mr. Frosty
Heizbad	Fisher Scientific drybath
Magnetrührer	IKA® RET control/t IKAMAG® safety control
Mikroskop	Zeiss Axiovert 40
Multipipette	Eppendorf Multipipette® plus
pH-Meter	HANNA instruments® HI 2211 Basic pH/ORP Benchtop Meter
Photometer	Eppendorf Biophotometer plus
Pipettierhelfer	Brand accu-jet® pro
Pipetten	Eppendorf Research® fix 0,5 – 10 µl
	Eppendorf Research® fix 10 – 100 µl
	Eppendorf Research® fix 100 – 1000 µl
	Thermo Scientific DH09306
Taumel-Rollenmischer	RM5-V 1750
	RM5-V80 1752
Multiplattenlesegerät	Perkin Elmer VICTOR3™ V Multilabel Counter model 1420
Waage	KenABJ Log NoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204 No WB1150494
	Ken 440-45
Werkbank	Thermo Electron Corporation HERAsafe®
Zentrifuge	Thermo Electron Corporation Heraeus Fresco 17 Centrifuge
	Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R
	Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Mirocentrifuge

Tabelle 1: Geräte mit Herstellernachweis

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 0,5 ml
1,5 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT Reagiergefäß 1,5 ml EASY CAP
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 1,5 ml
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 2 ml
15 ml Falcons	GREINER bio-one Art.-Nr.: 188171
50 ml Falcons	GREINER bio-one Art.-Nr.:227261
6-Well Platten	CytoOne 6-well TC plate
12-Well Platten	GREINER 12-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
96-Well Platten	GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
Blotting Filter Papier	Invitrogen, 2,55 mm thick, Cat.-Number: LC2010
Einfrierröhrchen	GREINER bio-one Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™
Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH + Co KG Pasteurpipetten ISO 7712
Pasteurpipetten aus Plastik	Ratiolab-GmbH, Pasteur-Plast Pipetten 3 ml Makro, graduiert, 150 mm, unsterile, Box a 500 Art.-Nr.-2600111
Stripetten 5 ml	Costar® 5 mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Stripetten 10 ml	Costar® 10 mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Stripetten 25 ml	Costar® 25 mL Shorty Stripette® Serological Pipets
T25er-Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 25 cm ² red filter cap
T75er-Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap
Zählkammer	Neubauer Zählkammer
Zellschaber	GREINER BioOne Cell Scraper, blue, 40 cm

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien mit Herstellernachweis

2.3 Chemikalien, Zellkulturlösungen und Zytokine

Substanz	Hersteller
1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	VWR® 1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat TECHNICAL
Alizarin-Rot-S	Merck KGaA 106278 Alizarin red S mono sodiumsalt (C.I. 58005)
Aqua dest. (steril)	Aqua B. Braun, 1000 mL
BGJ398	ApexBio Technology, Cat.-Number: A3014
BMP-2, Recombinant Human	Peptidech, Cat.-Number: 120-02
CellTiter Blue	Promega CellTiter Blue®-Cell Viability Assay

Dexamethason	SIGMA Dexamethasone D1756 - ≥ 98 % (HPLC), powder
DMEM (4,5 g/l Glucose)	Gibco
DMSO	SIGMA-ALDRICH® Dimethyl sulfoxide D2650 – Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥ 99.7 %
Dorsomorphin	Tocris, Cat.-Number: 3093
Ethanol zur Desinfektion	Merck KGaA 100974 Ethanol denatured with about 1 % methyl ethyl ketone for analysis EMSURE®
FBS	PAA Fetal Bovine Serum Gold
Isopropanol	Merck KGaA 818766 2-Propanol EMPLURA®
Kollagenase Typ I	Biochrom AG Collagenase Typ I, CLS I
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	SIGMA-ALDRICH® L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate A8960 ≥ 95 %
L-Glutamin	Life Technologies™ L-Glutamine – 200 mM (100X), liquid
PBS	Biochrom AG PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco) PBS-Lösung mit Ca^{2+} , Mg^{2+}
Penicillin / Streptomycin	Gibco® Penicillin-Streptomycin 100X Solution (1000 units)
β -Glycerophosphat	SIGMA-ALDRICH® β -Glycerophosphate disodium salt hydrate G9422 BioUltra, suitable for cell culture, suitable for plant cell culture, ≥ 99.0 % (titration)
SB431542	Tocris, Cat.-Number: 1614
Trypsin/EDTA	Biochrom AG Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}

Tabelle 3: Chemikalien, Zellkulturösungen und Zytokine mit Herstellernachweis

2.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
CD14	MOUSE ANTI HUMAN CD14, Monoclonal Mouse IgG, Bio-Rad Cat.-Number: MCA1568GA
CD26	CD26 antibody (202-36) [Allophycocyanin], Monoclonal Mouse IgG, Novus Biologicals Cat.-Number: NB600-552APC
CD29	Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Pig CD29, Monoclonal Mouse IgG, BD Pharmingen Cat.-Number: 561496
CD31	Porcine CD31/PECAM Antibody, Polyclonal Goat IgG, R&D Systems Cat.-Number: AF3387
CD34	Anti-CD34 antibody, Monoclonal Rabbit antibody,

	abcam Cat.-Number: 81289
CD44	PE-Cy TM 5 Rat Anti-Mouse CD44, Monoclonal Rat, BD Pharmingen Cat.-Number: 553135
CD45	MOUSE ANTI PIG CD45:FITC, Monoclonal Mouse IgG, Bio-Rad Cat.-Number: MCA1222F
CD73	Mouse/Porcine 5'-Nucleotidase/CD73 Antibody, Polyclonal Sheep IgG, R&D Systems Cat.-Number: AF4488
CD79	MOUSE ANTI HUMAN CD79a, Monoclonal Mouse IgG, Bio-Rad Cat.-Number: MCA2538GA
CD90	APC Mouse Anti-Human CD90, Monoclonal Mouse IgG, BD Pharmingen Cat.-Number 559869
CD105	Endoglin/CD105 Antibody (MEM-229) [Allophycocyanin], Monoclonal Mouse IgG, Novus Biologicals Cat.-Number: NB110-58718APC
HLADR	MOUSE ANTI PIG SLA CLASS II DR:FITC, Monoclonal Mouse IgG, Bio-Rad Cat.-Number: MCA2314F

Tabelle 4: Antikörper mit Herstellernachweis

2.5 Biologisches Material

Für den alleinigen Zweck dieser Arbeit wurden keine Tiere getötet. Die pASCs entstammten Schlachtvieh, deren Fettgewebe von einem lokal ansässigen Schlachthof bezogen wurde. Die pASCs wurden aus dem Fettgewebe isoliert, das den Tieren nach der Schlachtung entnommen wurde.

Knochenmark und Fettgewebe, aus denen pBMSCs und pASCs gewonnen wurden, wurde aus Versuchstieren nach der Euthanasie entnommen, die im Rahmen des Tierversuchs „Tierexperimentelle Untersuchung zum Einheilungsverfahren eines Calciumphosphatzementes in Kombination mit porcinen oder humanen MSCs (mesenchymale Stamm-/Stromazellen) und PRP (Plättchenreiches Plasma)“ (Aktenzeichen 84-02.04.2013.A459 des LANUV NRW) finalisiert wurden.

Herkunft	Anzahl Spender	Gewonnenes Gewebe	Isolierte Zellen	Art und Rasse	Alter
Viersen	15	Haut mit subkutanem Fettgewebe	pASCs	Hausschwein (Dänische Sau, Piètrain Eber)	6 Monate +/- 2 Wochen
Düsseldorf	6	Haut mit subkutanem Fettgewebe, Knochenmark	pASCs, pBMSCs	Göttingen Minipig	3 Jahre

Tabelle 5: Informationen zum biologischen Material

2.6 Isolation porciner MSCs

2.6.1 Isolation porciner ASCs

Unter keimarmen Bedingungen wurde an der dorsalen Oberkeule des Schweins eine Hautprobe mit subkutanem Fettgewebe von etwa 20 g exzidiert. Bis zur Isolation wurde die Probe gekühlt in PBS²⁻ mit 2 % Penicillin (200 U/ml), Streptomycin (0,2 mg/ml) und Amphotericin B (2,5 µg/ml) aufbewahrt und transportiert. Von der Probe wurde das subkutane Fettgewebe freipräpariert und mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke zerschnitten. Diese wurden in einem Volumen von 20 ml in ein steriles 50 ml Falcon überführt und mit 20 ml sterilfiltrierter Kollagenaselösung (0,2 % Kollagenase Typ 1, 1,5 % BSA) inkubiert. Der enzymatische Verdau wurde für 45 min im Schüttelbad bei einer Temperatur von 37 °C in schräger Position durchgeführt. Das angedaute Fettgewebe wurde durch ein Zellsieb aus Nylon mit 250 µm Porengröße in ein 50 ml Falcon filtriert und unter Spülung mit PBS²⁻ wurden die Gewebestücke mit einer sterilen Pipette komprimiert, um weitere Zellen durch das Zellsieb zu filtrieren. Die so gewonnene Zellsuspension wurde für 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Die obere Phase aus Fettgewebe wurde daraufhin mit einer 25-ml-Pipette abgenommen und die darunter befindliche flüssige Phase wurde bis zum Zellpellet abgesaugt und ebenfalls verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml PBS²⁻ resuspendiert und in einem neuen Falcon für weitere 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit Proliferationsmedium mit 2 % Penicillin (200 U/ml), Streptomycin (0,2 mg/ml) und Amphotericin B (2,5 µg/ml) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine T75-Zellkulturflasche gegeben, die bei 37°C und 5 %

CO₂ im Brutschrank kultiviert wurde. Nach 24 und 48 h wurde das Proliferationsmedium gewechselt.

Zusätze in Aqua dest.	Konzentration
CaCl ₂	0,01 M
Glucose	0,05 M
HEPES	0,1 M
NaCl	0,12 M
KCl	0,05 M
BSA	1,5 %
Kollagenase Typ 1	0,2 %

Tabelle 6: Kollagenaselösung

2.6.2 Isolation porciner BMSCs

Als histologischer Ursprung für die porcinen BMSCs diente Knochenmark, das durch eine Punktion des Beckenkamms unter aseptischen Bedingungen gewonnen wurde. Das Knochenmarkspirat wurde unmittelbar im Verhältnis 1 zu 1 mit Heparin versetzt, um eine Koagulation zu verhindern. Die BMSCs wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 840 g für 20 min ohne Bremse isoliert, da sich die verschiedenen Zellpopulationen in ihrer Dichte unterscheiden. Die Auftrennung erfolgte in 15 ml Falcons, die mit 5 ml Percoll und 3 ml 0,9 % NaCl-Lösung versetzt wurden, wodurch ein Dichtegradient entstand, auf den behutsam das Knochenmarkspirat gegeben wurde. Durch die Dichtegradientenzentrifugation trennte sich die Zellsuspension in vier Phasen mit absteigender Dichte auf: Plasma, mononukleäre Zellphase, Percoll und ein Zellpellet aus Erythrozyten und Granulozyten. Die gesuchten BMSCs befanden sich innerhalb der mononukleären Zellphase, die vorsichtig abgenommen und in ein neues steriles 15 ml Falcon überführt wurde. Daraufhin wurde die Zellfraktion mit PBS²⁻ gewaschen und für 5 min bei 270 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Zellkulturmedium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Analog zu den ASCs erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. 24 und 48 h nach der Zellisolation wurde ein Mediumwechsel mit regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle durchgeführt.

2.7 Methoden der Zellkultur

2.7.1 Kultivierung und Passagierung

Die porcinen MSCs wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Zellkulturmedium wurden die Zellen in einer T75-Zellkulturflasche inkubiert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt und die Vitalität und Adhärenz der Zellen, sowie die Sterilität der Zellkultur regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft. Sobald die Zellen zu 80 % konfluent waren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für ca. 5 min bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂ mit einer 0,05 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Durch das Trypsin wurden enzymatisch Oberflächenmoleküle abgebaut und der Adhärenzverlust wurde nach der Inkubation lichtmikroskopisch überprüft. Verbleibende adhärenente Zellen wurden mittels Shake-off-Verfahren durch leichte mechanische Stöße gegen die Zellkulturflasche abgelöst. Sollte auch danach Zellmaterial adhärenent bleiben, wurde ein Zellschaber zur Ablösung genutzt. Daraufhin wurde rasch durch Zugabe von 6 ml DMEM mit 10 % FBS das Trypsin abgesättigt, um einen weiteren Verdau der Zellproteine zu unterbinden. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette aufgenommen und in ein Falcon überführt. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 min wurde das Zellpellet in Proliferationsmedium resuspendiert und in eine neue T75-Zellkulturflasche mit darin vorgelegtem Medium überführt. Anschließend wurden die MSCs in der Regel auf drei T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen regelmäßig lichtmikroskopisch untersucht.

Zellkulturmedium	Konzentration
DMEM 4,5 g/l Glucose	
FBS	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml
L-Glutamin	1 %
FGF-2	2 ng/ml

Tabelle 7: Zellkulturmedium

2.7.2 Kryokonservierung porciner MSCs

Die Kryokonservierung ermöglicht eine langfristige Lagerung von Zellen unter Nutzung des organischen Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO). Das Zellkulturmedium

wurde dazu aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen wurden wie unter 2.7.1 trypsinisiert und anschließend zentrifugiert. Je nach Zellzahl wurde das Zellpellet mit einem bis mehreren Millilitern Einfriermedium (10 % DMSO in FBS) resuspendiert. Anschließend wurde mit einer Pipette jeweils 10^6 der Zellen in ein vorgekühltes Kryokonservierungsröhrchen überführt. Das Vorgehen nach Zugabe des Einfriermediums auf die Zellen hatte eilig und auf Eis zu erfolgen, da DMSO über 0 °C zytotoxisch wirkt (Da Violante et al. 2002). Die befüllten Kryokonservierungsröhrchen wurden schließlich in einem Kryo-Einfriergerät mit Isopropanol, das einen zellschonenden Abkühlvorgang von 1 °C/min bewirkt, bei -80 °C kurzzeitig eingefroren und 24 h in diesem belassen. Danach konnten die Kryokonservierungsröhrchen in Stickstoff gelagert werden.

2.7.3 Auftauen kryokonservierter MSCs

Die im Kryokonservierungsröhrchen bei -80 °C gelagerten Zellen wurden so lange in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert, bis etwa die Hälfte der Zellsuspension aufgetaut war. Der bereits flüssige Teil wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein 15 ml Falcon, in das 10 ml Zellkulturmedium vorgelegt waren, vorsichtig überführt. Mit 0,5 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium wurde der restliche, noch gefrorene Teil der Zellsuspension resuspendiert, der dadurch schnell auftaute. Daraufhin wurde die restliche Zellsuspension in das Falcon überführt, das dann bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert wurde. Nach der Zentrifugation wurde die flüssige Phase abgesaugt und das Zellpellet im Zellkulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine T75-Zellkulturflasche, in die Medium vorgelegt war, überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.7.4 Bestimmung der Zellviabilität mittels CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Das CellTiter-Blue®-Zellviabilitätsassay nutzt die Reduktion des blauen Farbstoffs Resazurin in den violetten, fluoreszierenden Farbstoff Resorufin durch stoffwechselaktive Zellen. Nicht stoffwechselaktiven Zellen fehlt die Eigenschaft zur Reduktion des Resazurin und somit ein Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Bei dieser Methode wurden die zu untersuchenden Zellen je Well einer 24-Well-Zellkulturplatte mit 0,5 ml Medium mit 5 % CellTiter-Blue® für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Menge des Resorufin, das in Abhängigkeit der Stoffwechselaktivität der Zellen

entsteht, wurde daraufhin fluorometrisch bei 590 nm quantifiziert. Abschließend wurde der Leerwert (Blank) für nicht mit Zellen inkubiertes CellTiter-Blue®-Medium von jedem Messwert der osteogenen Differenzierung subtrahiert. Laut Herstellerangaben soll dieses Fluoreszenzsignal mit der Zellzahl korrelieren.

2.7.5 Vitalitätstest und Lebendzellzahlbestimmung

Mit Hilfe des Hämozytometers, der Neubauer-Zählkammer, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Das gründlich gereinigte Hämozytometer wurde durch Anhauchen angefeuchtet und mit einem Deckgläschen versehen, das an die Zählkammer angedrückt wurde, bis Newtonsche Interferenzringe den korrekten Abstand signalisierten. Daraufhin wurde die mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 versetzte Zellsuspension an den Rand des Deckgläschens pipettiert. Durch Kapillarkräfte wurde diese Suspension in die Zählkammer gesogen, in der nun lichtmikroskopisch die Quantifizierung der Zahl vitaler Zellen erfolgte. Prinzip dieser Methode ist, dass nur vitale Zellen fähig sind den sauren Azofarbstoff Trypanblau aus dem Zytoplasma heraus zu transportieren und somit transparent zu erscheinen, wohingegen sich avitale Zellen blau färben. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch Auszählen vitaler Zellen in den vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer unter Zuhilfenahme folgender Formel:

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{ml}} = n * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

n = Mittelwert der Großquadrate der Neubauer Zählkammer

10^4 = Verdünnungsfaktor der Kammer

2.8 Charakterisierung porciner MSCs mittels Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung der MSCs wurden diese mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der spezifischen Oberflächenantigene CD45, HLA-DR, CD29, CD79alpha, CD14, CD31, CD105, CD26, CD73, CD90, CD34 und CD44 untersucht und der Phänotyp zwischen ASCs und BMSCs miteinander verglichen. Dazu wurden die MSCs wie zur Passagierung geerntet und zunächst für 15 min in Eiswasser inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, mit Cellwash + 3 % FBS gewaschen und für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand

verworfen und das Zellpellet mit je 100 μ l Cellwash + 3 % FBS je FACS-Röhrchen, in die darauf folgend die spezifischen Antikörper gegeben wurden, resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 30 min lichtgeschützt im Eisbad zur Bindung der Antikörper an die Oberflächenantigene. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml Cellwash je FACS-Röhrchen gewaschen und erneut bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 μ l Cellwash resuspendiert. Letztlich erfolgte die Analyse der Expression der Oberflächenantigene am Durchflusszytometer und die Auswertung mit BD CellQuest™.

2.9 Osteogene Differenzierung porciner MSCs

Zur Osteogenese wurden die MSCs mit DMEM (4,5 g/l Glucose) inkubiert, das mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin versetzt wurde. Es wurden 100 nM Dexamethason, 100 μ M α -Ascorbin-2-Phosphat und 10 mM β -Glycerophosphat zur Induktion der Differenzierung in osteoblastoide Zellen zugesetzt (Osteo). Zusätzlich wurden fakultativ Versuchsansätze mit 450 ng/ml BMP-2 koinkubiert (BMP-2), um die Auswirkungen dieses Zytokins für die Induktion und Progression der Osteogenese zu untersuchen. Darüber hinaus sind porcine ASCs auf BMP-2 angewiesen, um osteogen zu differenzieren (Bayraktar et al. 2018). Um die Bedeutung der FGF-, BMP- und TGF- β -Signalwege in den verschiedenen MSCs zu untersuchen, wurden diese mit spezifischen Inhibitoren behandelt, die die Signaltransduktion der entsprechenden Signalwege unterbinden. So soll eine tiefergehende Analyse erfolgen, über welche Signalwege die osteogene Differenzierung der untersuchten MSCs induziert wird. Die dafür verwendeten Konzentrationen der Signalwegsinhibitoren wurden durch Titrationen bestimmt, bei der eine möglichst hohe, aber nicht zytotoxische Konzentration angestrebt wurde. Als Inhibitor der FGF-R 1-3 wurde BGJ398 in einer Konzentration von 0,5 μ M verwendet. Dorsomorphin wurde in einer Konzentration von 0,5 μ M in Versuchsansätzen supplementiert, um die Auswirkungen der durch BMP initiierten Signalwege zu inhibieren. Der TGF- β -Signalweg wurde durch Koinkubation mit 1 μ M SB431542 gehemmt, um die Bedeutung dieser Signaltransduktion für den Differenzierungsprozess zu evaluieren. Die osteogene Differenzierung der MSCs wurde begonnen, sobald die Zellen auf den Zellkulturplatten zu 100 % konfluent waren. Während der Differenzierung erfolgte der Wechsel des Differenzierungsmediums zweimal wöchentlich.

Osteogenes Differenzierungsmedium	Konzentration
DMEM 4,5 g/l Glucose	
FBS	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0,1 mg/ml
L-Glutamin	1 %
Dexamethason	100 nM
α -Ascorbin-2-Phosphat	50 μ M
β -Glycerophosphat	10 mM

Tabelle 8: Osteogenes Differenzierungsmedium

Zusätze zum Differenzierungsmedium	Konzentration
BMP-2	450 ng/ml
SB431542	1 μ M
Dorsomorphin	0,5 μ M
BGJ398	0,5 μ M

Tabelle 9: Fakultativ koinkubierte Zusätze zum osteogenen Differenzierungsmedium

2.10 Differenzierungsnachweis mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und Quantifizierung mit Cetylpyridiniumchlorid

Durch die Färbung mit Alizarin-Rot-S wird die Deposition von Calcium in die extrazelluläre Matrix nachgewiesen, indem der Farbstoff Alizarin-Rot-S an Calciumablagerungen der extrazellulären Matrix bindet, die während der Osteogenese von differenzierenden Zellen produziert werden.

Zunächst wurde das Proliferationsmedium abgesaugt und die Zellen wurden kurz mit PBS²⁻ gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde anschließend abgenommen und die Zellen wurden einmalig mit Aqua dest. gewaschen. Nach Absaugen des Aqua dest. wurde frisch zubereitete 0,5 %-ige Alizarin-Rot-S-Färbelösung zugegeben und die Zellen für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen so lange mit Aqua dest. gewaschen, bis der Überstand farblos blieb, um nicht gebundenen Alizarin-Rot-S-Farbstoff zu entfernen. Schließlich wurde auch dieser Überstand abgenommen und die Zellen wurden mit

PBS²⁻ überschichtet, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. In diesem Zustand wurde das Ergebnis der Färbung lichtmikroskopisch dokumentiert.

Nach der qualitativen lichtmikroskopischen Analyse der Färbung wurde das PBS²⁻ abgenommen und die Zellen wurden für 90 min bei Raumtemperatur mit Cetylpyridiniumchloridlösung (10 % Cetylpyridiniumchlorid in Aqua dest.) inkubiert. Daraufhin wurde diese Lösung mit rückgelöstem Alizarin-Rot-Farbstoff abgenommen und die optische Dichte bei 600 nm gegen 10 %-ige Cetylpyridiniumchloridlösung als Nullwertabgleich gemessen. Bei einer Absorption größer als 1 wurde die Probe mit Cetylpyridiniumchloridlösung verdünnt und erneut gemessen. Insgesamt wurde so indirekt durch das Alizarin-Rot-S-Assay photometrisch der Anteil des in die extrazelluläre Matrix deponierten Calciums quantifiziert.

2.11 Statistische Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die statistische Auswertung mit der Software GraphPad Prism® in der Version 5.01. Die Daten wurden arithmetisch gemittelt und durch einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der MSCs

Zur Charakterisierung des Stammzellcharakters wurden die porcinen MSCs aus dem Fettgewebe und Knochenmark immunphänotypisch auf die Expression bestimmter Oberflächenantigene, sogenannter *Cluster of Differentiation*, mittels Durchflusszytometrie untersucht. Diese Expressionsmuster wurden nach konfluentem Wachstum unter Zellkulturmedium in Passage 3 ermittelt. Entsprechende Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Insgesamt zeigten pASCs und pBMSCs ein ähnliches Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenantigene. Für CD14, CD26, CD31, CD34, CD45, CD73, CD79, CD105 und HLA-DR lag die Expressionsrate für alle untersuchten MSCs bei durchschnittlich unterhalb 5 %. Für CD29 waren durchschnittlich etwa 42 % der adipogenen und etwa 48 % der osteomedullären MSCs positiv. CD44 wurde von durchschnittlich etwa 60 % der porcinen ASCs und etwa 50 % der BMSCs exprimiert. Letztlich konnte CD90 bei durchschnittlich etwa 53 % der ASCs und bei etwa 51 % der BMSCs nachgewiesen werden. Zwischen den MSCs unterschiedlichen histologischen Ursprungs konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression der untersuchten Oberflächenantigene gefunden werden.

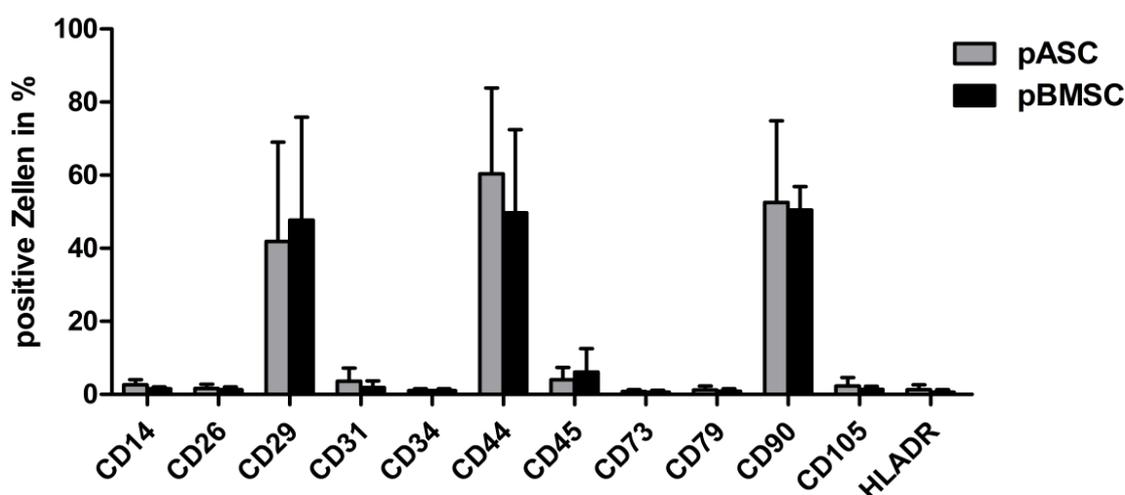


Abb. 3: Expression der Oberflächenantigene in Passage 3

pASCs und pBMSCs wurden in Passage 3 mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Oberflächenantigene CD14, CD26, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD79, CD90, CD105 und HLA-DR untersucht. Positive Zellen in % bezieht sich auf den prozentualen Anteil der durchflusszytometrisch erfassten pMSCs, die das Oberflächenantigen exprimierten. pASCs: n = 6, pBMSCs: n = 3

3.2 Osteogene Differenzierung der MSCs

3.2.1 Titration des Inhibitors SB431542

Vor der osteogenen Differenzierung wurden die MSCs adipogener Herkunft mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Zur Inhibition des TGF- β -Signalweges wurde der Inhibitor SB431542 verwendet, für den zunächst eine geeignete Konzentration bestimmt wurde. Dazu wurden pASCs bis zu 7 Tage mit verschiedenen Konzentrationen SB431542 inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue®-Zellviabilitätsassay überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass zu keinem Messzeitpunkt die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erniedrigt war. Nach 2, und insbesondere nach 5 Tagen, waren mit aufsteigender Konzentration von SB431542 die Zellviabilität sogar tendenziell erhöht. Nach 7 Tagen war für alle Behandlungsgruppen, ebenso für die Kontrolle, die Zellviabilität im Vergleich zu den vorherigen Messzeitpunkten deutlich erniedrigt. Für die Versuche der osteogenen Differenzierung wurde für SB431542 eine Konzentration von 1 μ M ausgewählt.

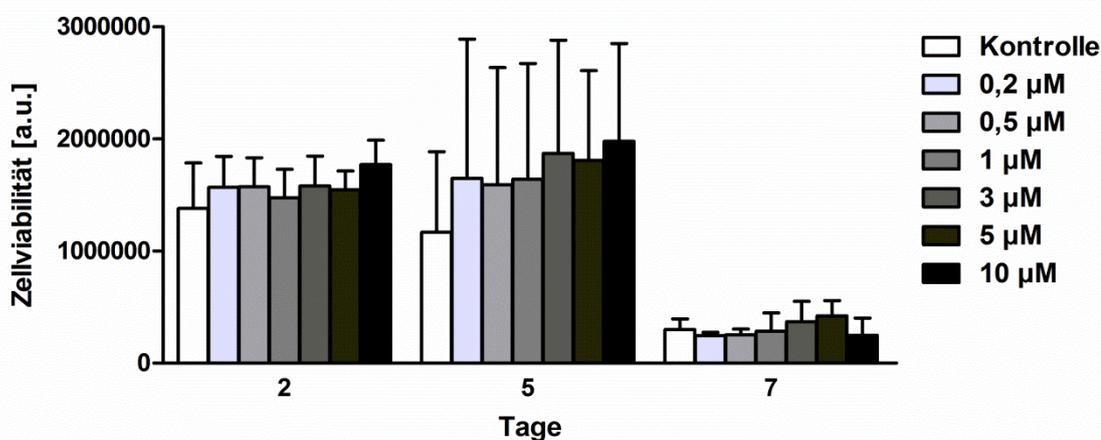


Abb. 4: Titration des Inhibitors SB431542

pASCs wurden für 2, 5 und 7 Tage mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors SB431542 inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue®-Zellviabilitätsassay bestimmt. (a. u. = *arbitrary unit*); n = 3

3.2.2 Titration des Inhibitors Dorsomorphin

Dorsomorphin, das den BMP-Signalweg inhibiert, wurde in verschiedenen Konzentrationen im Zellkulturmedium gelöst und für 24 h mit pASC inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde die Zellviabilität der mesenchymalen Stromazellen mittels CellTiter-Blue®-Zellviabilitätsassay überprüft. Die Ergebnisse der Titration für

Dorsomorphin sind in Abbildung 5 dargestellt. Es zeigte sich, dass ab einer Konzentration von mehr als 1 μM Dorsomorphin die Zellviabilität im Vergleich zu nicht mit dem Inhibitor inkubierten Zellen signifikant erniedrigt war und diese dosisabhängig stark abfiel. Bei niedrigen Inhibitor Dosen wies eine Konzentration von 0,2 μM ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle, die nicht mit Dorsomorphin inkubiert wurde, eine signifikant erniedrigte Zellviabilität auf. Lediglich die mit 0,5 μM Dorsomorphin inkubierten pASCs wiesen keine signifikant erniedrigte Zellviabilität auf. Daher wurde diese Konzentration für die osteogene Differenzierung der pMSCs verwendet.

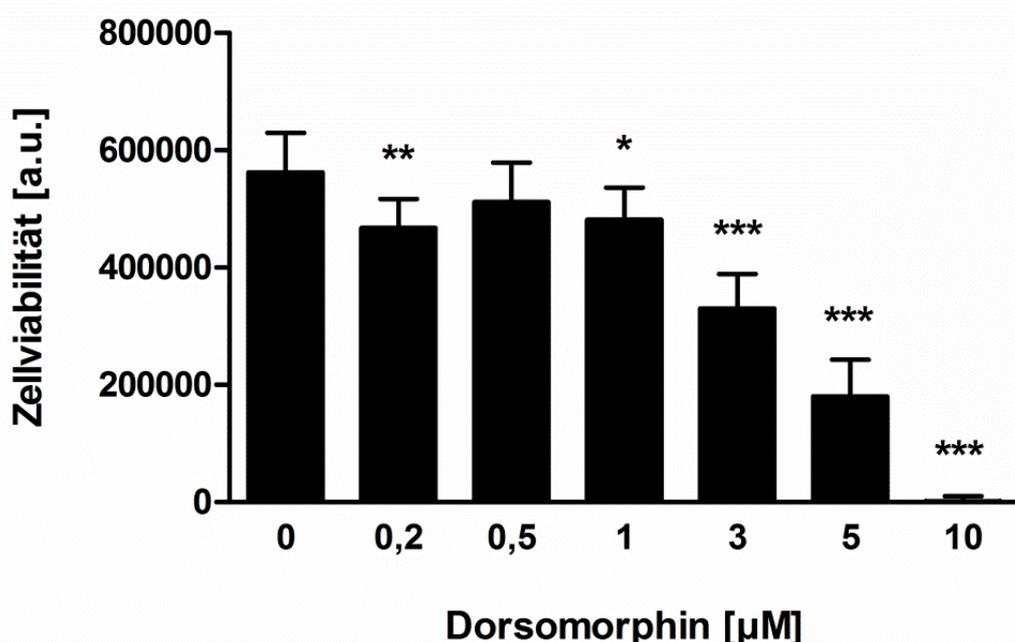


Abb. 5: Titration des Inhibitors Dorsomorphin

pASCs wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Dorsomorphin inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue®-Zellviabilitätsassay bestimmt. Signifikante Ergebnisse beziehen sich auf die Kontrolle (0 μM Dorsomorphin). (a. u. = *arbitrary unit*); n = 3

3.2.3 Titration des Inhibitors BGJ398

Ebenfalls wurde eine geeignete Konzentration für BGJ398, das den FGF-Signalweg inhibiert, evaluiert. Dazu wurde der Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen dem Zellkulturmedium supplementiert. Die Zellviabilität wurde nach 2, 5 und 7 Tagen mittels CellTiter-Blue®-Zellviabilitätsassay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach 2 Tagen keine verminderte Zellviabilität der mit BGJ398 inkubierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festzustellen war. Mit 500 nM BGJ398 inkubierte pASCs wiesen sogar eine tendenziell erhöhte Zellviabilität auf. Auch nach 5 und 7 Tagen zeigten die mit dem

Inhibitor supplementierten Zellkulturen keine signifikant reduzierte Zellviabilität, wobei jedoch die Zellviabilität insgesamt, auch bei der unbehandelten Kontrollgruppe, abnahm. Im Rahmen der osteogenen Differenzierung wurde für BGJ398 eine Konzentration von 500 nM gewählt.

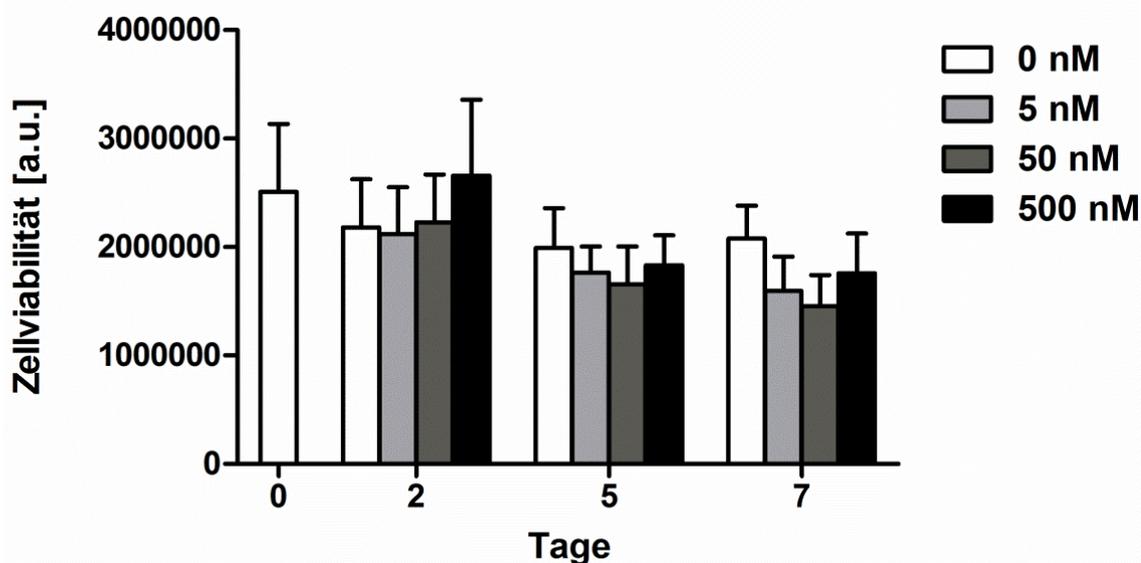


Abb. 6: Titration des Inhibitors BGJ398

pASCs wurden für 2, 5 und 7 Tage mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors BGJ398 inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue®-Zellviabilitätsassay bestimmt. (a. u. = *arbitrary unit*); n = 3

3.2.2 Osteogene Differenzierung unter fakultativer BMP-2-Supplementation

Als Nachweis einer erfolgten Osteogenese wurde die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix durch Färbung mit Alizarin-Rot-S zunächst lichtmikroskopisch dokumentiert. Anschließend erfolgte die Rücklösung des gebundenen Farbstoffes durch Cetylpyridiniumchlorid inklusive photometrischer Quantifizierung bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die pMSCs wurden in Passage 3 bis zu 28 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) behandelt, das fakultativ mit 450 ng/ml BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2). Zu Versuchsbeginn (Tag 0) wurde eine nicht osteogen differenzierte Kontrolle gefärbt und rückgelöst. Nach 1, 3, 7, 14, 21 und 28 Tagen wurde die Progression der Osteogenese bestimmt. Als Maß für die Deposition von Calcium in die EZM sind die Ergebnisse der photometrischen Quantifizierung des rückgelösten Alizarin-Rot-S-Farbstoffs für porcine ASCs in Abbildung 7 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Rücklösung in den ersten 14 Tagen der osteogenen Differenzierung sowohl für die alleinig mit osteogenem Differenzierungsmedium, als

auch für die mit BMP-2 supplementierten Proben kaum anstiegen und sich durchschnittlich unter 0,5 befanden. An Tag 21 stieg die optische Dichte des rückgelösten Alizarin-Rot-S für die mit BMP-2 behandelten Zellen als Parameter für eine erfolgte Osteogenese signifikant auf etwa durchschnittlich 2 ($p \leq 0,001$) im Vergleich zu den alleinig mit osteogenem Differenzierungsmedium inkubierten ASCs, deren OD bei durchschnittlich etwa 0,3 verblieben ist, an. Im weiteren Verlauf konnte an Tag 28 ein weiterer Anstieg der Calciumdeposition bei den zusätzlich mit BMP-2 inkubierten ASCs festgestellt werden. Die Photometrie zeigte hier bei einer Streuung der Ergebnisse eine im Vergleich zu alleinig mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelten Zellen eine signifikant erhöhte optische Dichte von durchschnittlich 3,8 an ($p \leq 0,001$). Insgesamt zeigten mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelte pASCs auch nach 28 Tagen keine deutlich erhöhten Rücklösung im Sinne einer erfolgten Osteogenese. Diese konnte nur für zusätzlich mit BMP-2 behandelte Zellen nachgewiesen werden und war ab Tag 21 im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht.

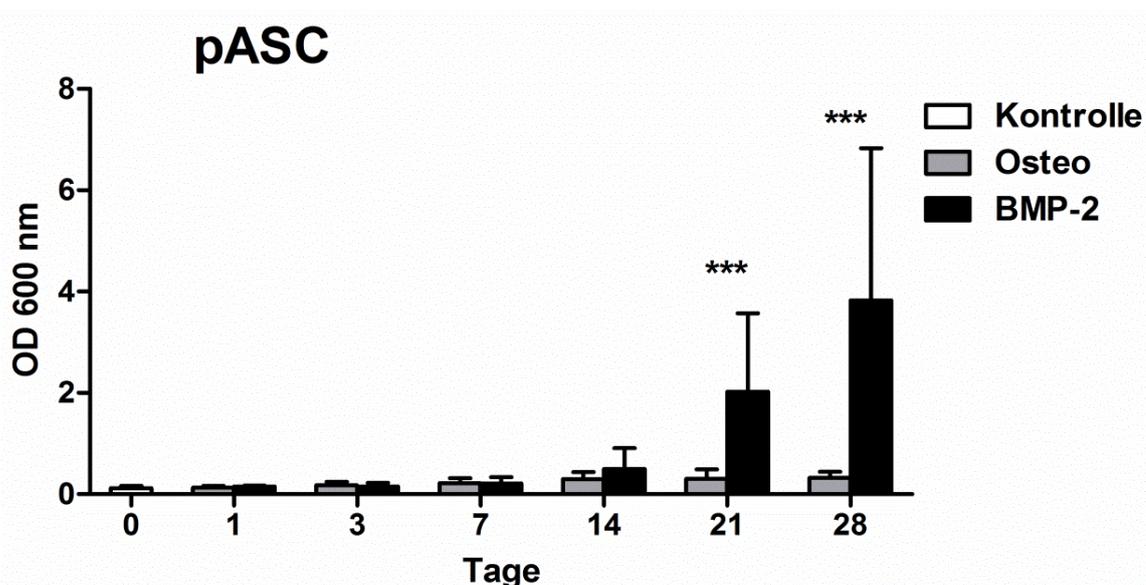


Abb. 7: Quantifizierung der osteogenen Differenzierung der pASCs

Photometrisch wurde der rückgelöste Alizarin-Rot-S-Farbstoff quantifiziert. Die porcinen ASCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) bis zu 28 Tage kultiviert, das fakultativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Hoch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen sind mit *** gekennzeichnet ($p \leq 0,001$). (OD = optische Dichte); n = 6

Abbildung 8 zeigt die mikroskopische Analyse, die die Kalzifizierung der EZM visualisiert, die bei pASCs nach 28 Tagen osteogener Differenzierung unter Supplementation von BMP-2 in einer Konzentration von 450 ng/ml auftrat. Alleinig mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelte Zellen zeigten keine visuell nachweisbare Calciumdeposition in die EZM, wohingegen bei mit BMP-2

koinkubierten pASCs eine deutliche osteogene Differenzierung, hier durch die Färbung mit Alizarin-Rot-S gezeigt, nachgewiesen werden konnte.

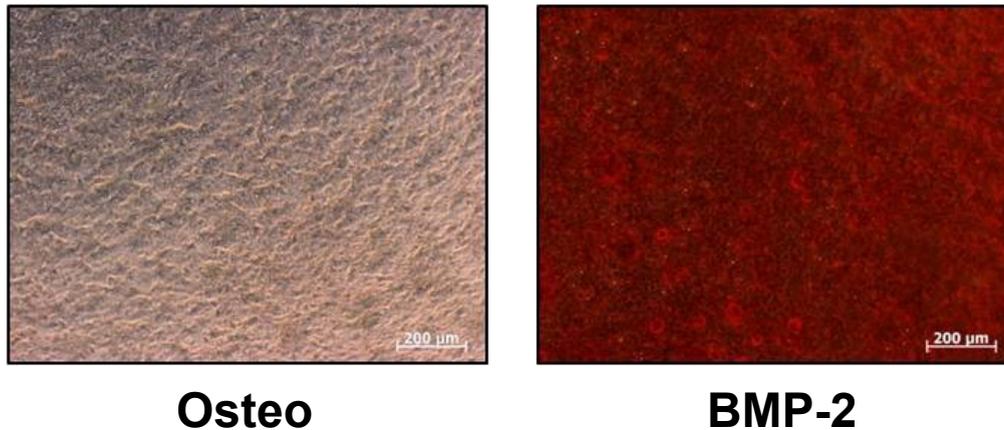


Abb. 8: Lichtmikroskopische Dokumentation der osteogenen Differenzierung der pASCs

Exemplarisch dargestellt ist der lichtmikroskopische Nachweis der Alizarin-Rot-S-Färbung als Parameter einer erfolgten Osteogenese bei pASCs nach 28 Tagen Differenzierung mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) und osteogenem Differenzierungsmedium, das mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Der Maßstabsbalken ist 200 µm lang.

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der photometrischen Quantifizierung der mittels Cetylpyridiniumchlorid rückgelösten Alizarin-Rot-S-Färbung von pBMSCs nach bis zu 28 Tagen osteogener Differenzierung. Die Ergebnisse zeigen, dass in den ersten 14 Tagen der Differenzierung die Osteogenese im Sinne einer erfolgten Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix nicht deutlich zunahm. Nach 21 Tagen lag die optische Dichte des rückgelösten Farbstoffs für mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelte pBMSCs bei durchschnittlich etwa 2, bei den zusätzlich mit BMP-2 inkubierten Zellen bei durchschnittlich etwa 4. Im weiteren Verlauf stieg die osteogene Differenzierung an Tag 28 auf durchschnittlich etwa 4,5 (Osteo) bzw. 8,5 (BMP-2) weiter an. Zu diesem Zeitpunkt war die Osteogenese, die durch die Supplementation von BMP-2 bei pBMSCs erzielt werden konnte, signifikant erhöht im Vergleich zu alleinig mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelten Zellen ($p \leq 0,05$).

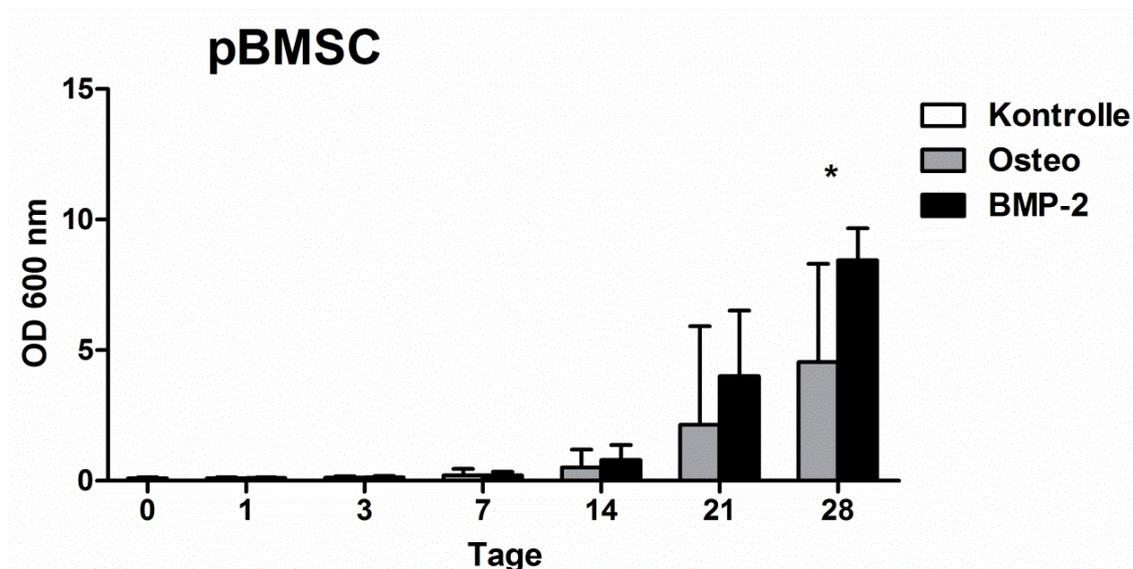


Abb. 9: Quantifizierung der osteogenen Differenzierung der pBMSCs

Photometrisch wurde der rückgelöste Alizarin-Rot-S-Farbstoff quantifiziert. Die pBMSCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) bis zu 28 Tage kultiviert, das fakultativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p \leq 0,05$). (OD = optische Dichte) $n = 4$

Abbildung 10 präsentiert die lichtmikroskopische Dokumentation der Alizarin-Rot-S-Färbung der pBMSCs nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit und ohne BMP-2. Bei beiden Behandlungsgruppen konnte eine Differenzierung festgestellt werden, die jedoch bei mit BMP-2 behandelten Zellen qualitativ verbessert war.

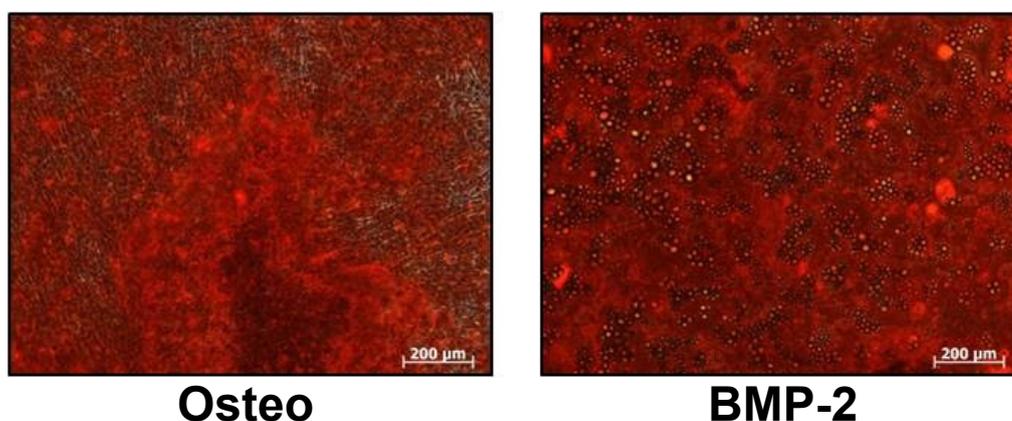


Abb. 10: Lichtmikroskopische Dokumentation der osteogenen Differenzierung der pBMSCs

Exemplarisch dargestellt ist der lichtmikroskopische Nachweis der Alizarin-Rot-S-Färbung als Parameter einer erfolgten Osteogenese bei pBMSCs nach 28 Tagen Differenzierung mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo), das fakultativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Der Maßstabsbalken ist 200 μm lang.

3.2.3 Osteogene Differenzierung unter spezifischer Inhibition des TGF- β -, BMP- und FGF-Signalweges

Neben der Untersuchung des Einflusses von BMP-2 auf die osteogene Differenzierung sollte im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung der spezifischen Inhibition von für die Osteogenese wichtigen Signalwegen eruiert werden. Dazu wurden die pMSCs über 28 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium mit und ohne 450 ng/ml BMP-2 differenziert und zusätzlich partiell mit den spezifischen Inhibitoren SB431542, Dorsomorphin und BGI398 behandelt.

Abbildung 11 A zeigt die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung der pASCs nach 14, 21 und 28 Tagen unter Inhibition des TGF- β -Signalweges unter fakultativer BMP-2-Supplementation. Nach 14 Tagen lag die osteogene Differenzierung für alle Behandlungsgruppen im arithmetischen Mittel unter 0,5. An Tag 21 ergab die mittels Cetylpyridiniumchlorid quantifizierte osteogene Differenzierung für pASCs bei Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium, und auch bei Inhibition des TGF- β -Signalweges weiterhin Messwerte unterhalb 0,5. Mit BMP-2 koinkubierte Zellen zeigten sowohl mit als auch ohne Inhibition des TGF- β -Signalweges eine signifikant gesteigerte Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix. Hierbei lag die osteogene Differenzierung der mit BMP-2 differenzierten pASCs bei durchschnittlich etwa 1,9, bei zusätzlicher SB431542-Inkubation bei etwa 1,7. Nach 28 Tagen war für nicht mit BMP-2 koinkubierte Zellen weiterhin eine osteogene Differenzierung unterhalb 0,5 festzustellen, unabhängig von der Inhibition des TGF- β -Signalweges. Im Vergleich dazu lag die osteogene Differenzierung bei mit BMP-2 koinkubierten pASCs nach 28 Tagen bei durchschnittlich etwa 3,8, bei Supplementation von BMP-2 und zusätzlicher Inhibition des TGF- β -Signalweges bei durchschnittlich etwa 3,2 und somit signifikant höher als die jeweilige Behandlungsgruppe ohne BMP-2 ($p \leq 0,001$). Die osteogene Differenzierung der pASCs wurde durch die Supplementation von SB431542 tendenziell nicht beeinflusst (Abbildung 11 A). So zeigte sich sowohl unter osteogenem Differenzierungsmedium, als auch bei Supplementation von BMP-2, dass die osteogene Differenzierung sich ebenfalls nur durch BMP-2-Einfluss signifikant steigern lies. Zwischen den Behandlungsgruppen waren zwischen den mit und ohne TGF- β -Signalweg inhibierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufgetreten.

In Abbildung 11 B ist die osteogene Differenzierung, gemessen an der Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix, für pASCs dargestellt, deren BMP-Signalweg inhibiert wurde. 21 Tage nach Versuchsbeginn lag die osteogene Differenzierung der Rücklösung für mit osteogenem Differenzierungsmedium und Dorsomorphin behandelte pASCs bei durchschnittlich etwa 0,1, bei zusätzlicher BMP-Supplementation bei etwa 0,55 signifikant höher ($p \leq 0,05$). Im Vergleich bewirkte die Inhibition des BMP-Signalweges nach 21 Tagen eine signifikant erniedrigte Osteogenese bei den mit BMP-2 differenzierten pASCs ($p \leq 0,05$). Nach 28 Tagen lag die osteogene Differenzierung für ohne BMP-2, aber unter BMP-Signalweg-Inhibition differenzierte Zellen bei weiterhin durchschnittlich etwa 0,1, bei Koinkubation von BMP-2 bei etwa 0,87 signifikant höher ($p \leq 0,001$). Sowohl an Tag 21 als auch an Tag 28 war die osteogene Differenzierung für pASCs, die mit BMP-2 und unter Inhibition des BMP-Signalweges behandelt wurden, signifikant reduziert im Vergleich zu entsprechenden pASCs, die nur mit BMP-2, jedoch nicht mit dem Inhibitor differenziert wurden ($p \leq 0,05$). Bei Koinkubation von Dorsomorphin zeigte sich, dass bereits an Tag 21 die Calciumdeposition der pASCs in die extrazelluläre Matrix geringer war, als bei entsprechenden Behandlungsgruppen ohne Inhibitoreinsatz. Im weiteren Verlauf zeigten die pASCs unter Inhibition des BMP-Signalweges keine osteogene Differenzierung gemessen an der Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix.

Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung von pASCs, die bis zu 28 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium unter Inhibition des FGF-Signalweges mit fakultativer Supplementation von BMP-2 differenziert wurden, sind in Abbildung 11 C dargestellt. An Tag 21 lag die osteogene Differenzierung für die Behandlungsgruppe ohne BMP-2-Supplementation, aber unter Inhibition des FGF-Signalweges bei durchschnittlich etwa 0,2, bei zusätzlichem BMP-2-Einsatz jedoch bei etwa 1,2. Nach 28 Tagen lagen die entsprechenden Messwerte bei durchschnittlich etwa 0,2 bei osteogenem Differenzierungsmedium unter Koinkubation von BGI398. Die Inhibition des FGF-Signalweges und zusätzliche BMP-2-Koinkubation erzielte nach 28 Tagen eine signifikant erhöhte osteogene Differenzierung um durchschnittlich etwa 3,5 ($p \leq 0,001$).

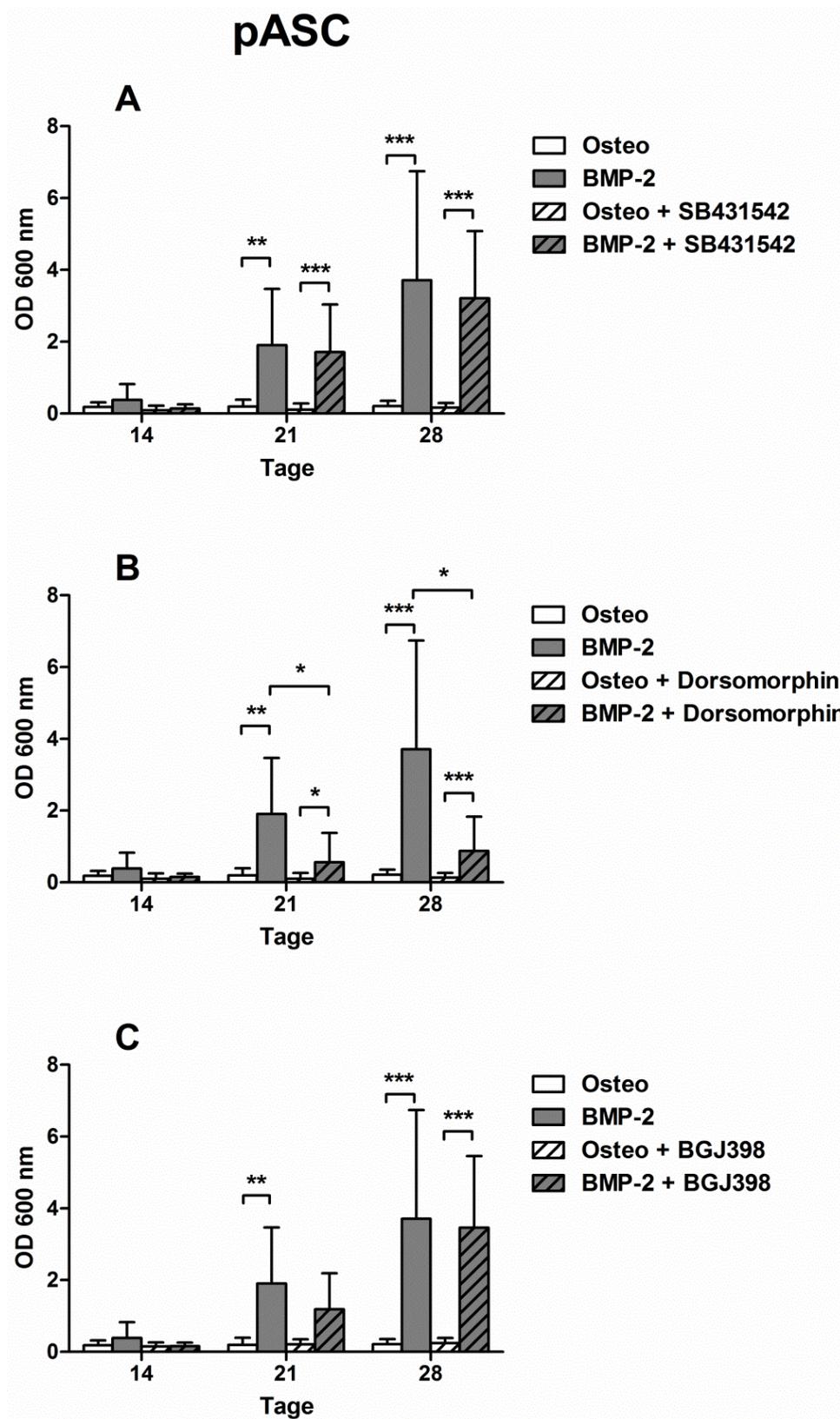


Abb. 11 A – C: Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mit Alizarin-Rot-S-Rücklösung bei pASCs nach fakultativer BMP-2-Supplementierung und unter Einfluss spezifischer Inhibitoren
 Photometrisch wurde der rückgelöste Alizarin-Rot-S-Farbstoff quantifiziert. Die pASCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) bis zu 28 Tage kultiviert, das fakultatativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Zusätzlich wurden die Inhibitoren SB431542 [1 μ M], Dorsomorphin [0,5 μ M] und BGJ398 [0,5 μ M] koinkubiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) oder *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. (OD = optische Dichte); n = 6

Exemplarisch zeigt Abbildung 12 den lichtmikroskopischen Nachweis der mit Alizarin-Rot-S gefärbten pASCs nach 28 Tagen osteogener Differenzierung. Wie die quantifizierte Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix bereits zeigte, untermauerte die lichtmikroskopische Beurteilung, dass eine Calciumeinlagerung der extrazellulären Matrix als Parameter einer erfolgten Osteogenese ohne Inhibitoreinsatz nur bei Supplementation von BMP-2 gelang. Die Koinkubation sowohl mit SB431542, Dorsomorphin, als auch BGJ398 ergab keine qualitativ sichtbare Färbung der Zellen im Sinne einer erfolgten Osteogenese. Bei der Behandlung mit SB431542 und osteogenem Differenzierungsmedium, dem zusätzlich BMP-2 hinzugefügt wurde, war eine Färbung der extrazellulären Matrix, die von den differenzierenden porcinen ASCs gebildet wurde, erkennbar. Mit Dorsomorphin und BMP-2 behandelte Zellen zeigten qualitativ keine Färbung der extrazellulären Matrix, so dass von einer ausgebliebenen Differenzierung ausgegangen werden kann.

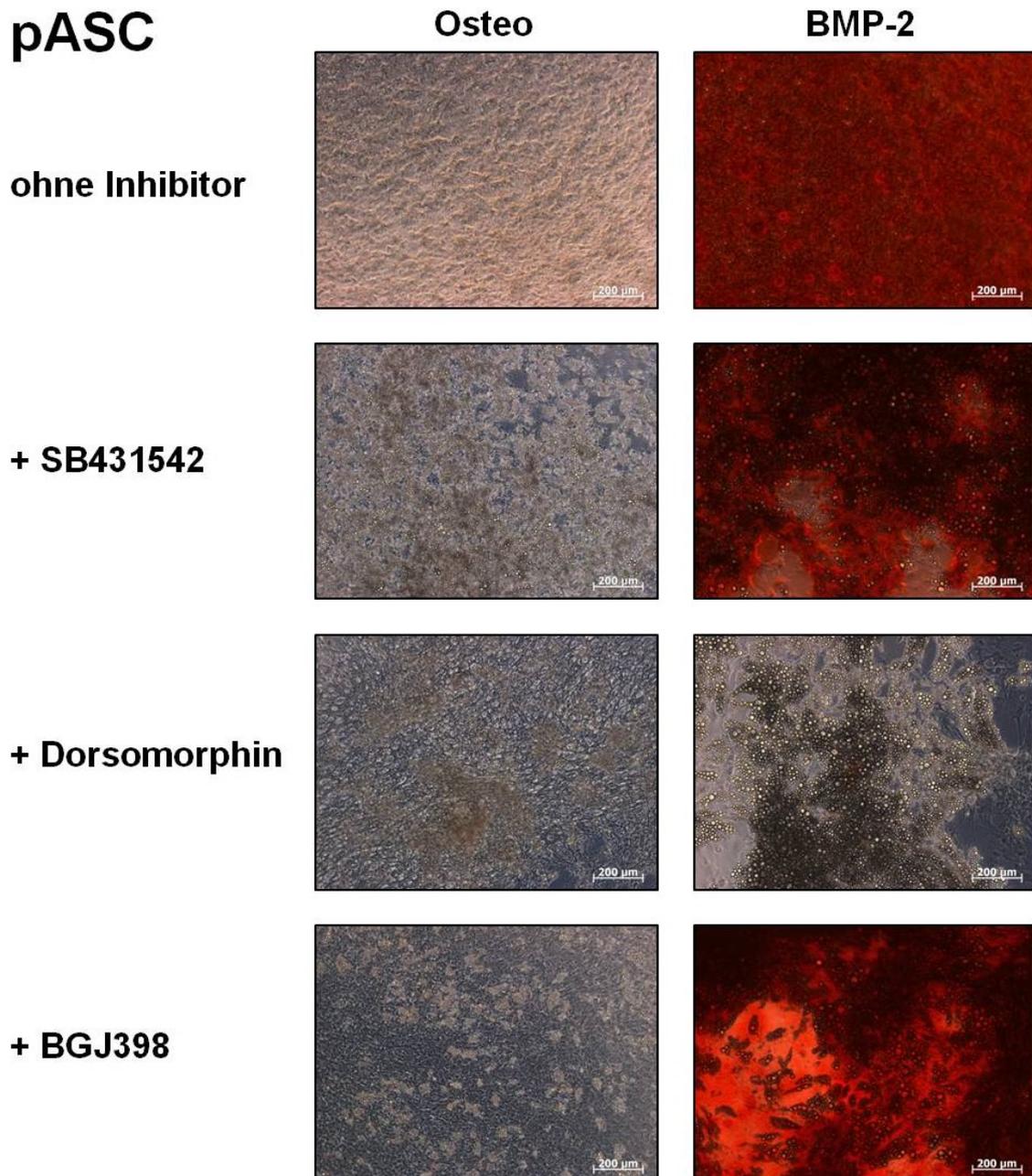


Abb. 12: Lichtmikroskopische Dokumentation der osteogenen Differenzierung mit Alizarin-Rot-S-Färbung bei pASCs nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit Supplementation von SB431542, Dorsomorphin und BGJ398

Dargestellt ist der lichtmikroskopische Nachweis der Alizarin-Rot-S-Färbung als Parameter einer erfolgten Osteogenese bei pASCs nach 28 Tagen Differenzierung mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo), das fakultativ BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Zusätzlich wurden die Inhibitoren SB431542 in einer Konzentration von 1 μM , Dorsomorphin in einer Konzentration von 0,5 μM und BGJ398 in einer Konzentration von 0,5 μM koinkubiert. Je Behandlungsgruppe ist exemplarisch ein Spender abgebildet. Der Maßstabsbalken ist 200 μm lang.

pBMSCs wurden nach identischer Versuchsanordnung über maximal 28 Tage mit SB431542, Dorsomorphin oder BGJ398 unter fakultativer BMP-2 Koinkubation mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Als Parameter einer erfolgten Osteogenese wurde die Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix durch

Rücklösung von Alizarin-Rot-S photometrisch quantifiziert. Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 13 A-C dargestellt.

Abbildung 13 A zeigt, dass die osteogene Differenzierung für pBMSCs nach 14 Tagen für mit osteogenem Differenzierungsmedium bei durchschnittlich etwa 0,4 lag. Durch zusätzliche BMP-2-Koinkubation ließ sich eine osteogene Differenzierung um etwa 0,7 erzielen. Bei pBMSCs, die mit osteogenem Differenzierungsmedium unter TGF- β -Signalweginhibition kultiviert wurden, war eine osteogene Differenzierung um etwa 0,65 messbar, bei zusätzlicher Supplementation von BMP-2 um etwa 1. Nach 21 Tagen lag ohne Inhibition die osteogene Differenzierung bei mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelten pBMSCs bei durchschnittlich etwa 2, bei zusätzlicher BMP-2-Koinkubation bei etwa 3,9, so dass die Osteogenese schon hier deutlich verbessert wurde. Die osteogene Differenzierung unter Inhibition des TGF- β -Signalweges lag an Tag 21 für mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelte pBMSCs um 2,2; die BMP-2 Supplementation verdoppelte diese beinahe auf durchschnittlich etwa 4. An Tag 28 konnte ein weiterer Anstieg der osteogenen Differenzierung für alle Behandlungsgruppen verzeichnet werden. Bei mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelten pBMSCs konnte durchschnittlich eine osteogene Differenzierung um etwa 4,5 erzielt werden, die unter zusätzlicher BMP-2-Supplementation sogar auf etwa 8,4 nahezu verdoppelt werden konnte. Unter Inhibition des TGF- β -Signalweges konnte die osteogene Differenzierung weiter auf durchschnittlich etwa 5,2, bei zusätzlichem Einsatz von BMP-2 sogar auf etwa 9,95 signifikant gesteigert werden ($p \leq 0,001$).

Die osteogene Differenzierung der pBMSCs unter Inhibition des BMP-Signalweges an den Messtagen 14, 21 und 28 ist in Abbildung 13 B dargestellt. Tendenziell war an Tag 21 festzustellen, dass die Inhibition des BMP-Signalweges die osteogene Differenzierung bei mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelten pBMSCs auf durchschnittlich etwa 1,15 und bei zusätzlicher BMP-2-Supplementation auf etwa 1,4 reduzierte. Dieser Effekt konnte auch an Tag 28 nachgewiesen werden. Hier war die osteogene Differenzierung für mit osteogenem Differenzierungsmedium und Dorsomorphin behandelte pBMSCs auf etwa 2,3 und bei fakultativer Koinkubation von BMP-2 auf durchschnittlich etwa 3,5 erniedrigt. Im Vergleich bewirkte der Einsatz von Dorsomorphin bei mit BMP-2 differenzierten pBMSCs eine signifikant reduzierte Osteogenese ($p \leq 0,01$).

Abbildung 13 C stellt die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung der pBMSCs dar, bei denen bis zu 28 Tage unter fakultativer BMP-2-Supplementation der FGF-Signalweg inhibiert wurde. An Tag 14 war kein signifikanter Unterschied detektierbar. Mit BGJ398 koinkubierte Zellen erzielten nach 14 Tagen eine osteogene Differenzierung um durchschnittlich etwa 0,55, bei zusätzlichem BMP-2-Einsatz um etwa 0,85. Die osteogene Differenzierung war auch an Tag 21 mit denen der nicht inhibierten Zellen vergleichbar. Mit osteogenem Differenzierungsmedium und BGJ398 koinkubierte pBMSCs erzielten eine osteogene Differenzierung um durchschnittlich etwa 1,6. BMP-2- und BGJ398-Supplementation führte nach 21 Tagen zu einer osteogenen Differenzierung um durchschnittlich etwa 4,05. Bis Tag 28 stiegen die Werte der Rücklösung für alle Behandlungsgruppen weiter an. Die osteogene Differenzierung lag nach 28 Tagen Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium und BGJ398 bei etwa 5,3, durch zusätzliche BMP-2-Koinkubation signifikant höher bei etwa 11,5 ($p \leq 0,001$).

Aus den Ergebnissen, die in Abbildung 13 A-C dargestellt sind, ist zu entnehmen, dass in allen Behandlungsgruppen die Differenzierung von Tag 14 über Tag 21 bis Tag 28 zugenommen hatte. Die Inhibition des TGF- β - und FGF-Signalweges bewirkte an Tag 14 und Tag 21, sowohl mit als auch ohne BMP-2-Supplementation, tendenziell keinen Unterschied auf die osteogene Differenzierung der pBMSCs. An Tag 28 wiesen die mit diesen Inhibitoren differenzierten Zellen jedoch eine signifikant höhere osteogene Differenzierung auf. Wurden pBMSCs mit Dorsomorphin osteogen differenziert, so waren diese an allen Messtagen tendenziell zu Zellen, die ohne Inhibitor differenziert wurden, erniedrigt. An Tag 28 bewirkte die Inhibition des BMP-Signalweges bei mit BMP-2 behandelten pBMSCs eine signifikant verminderte Osteogenese.

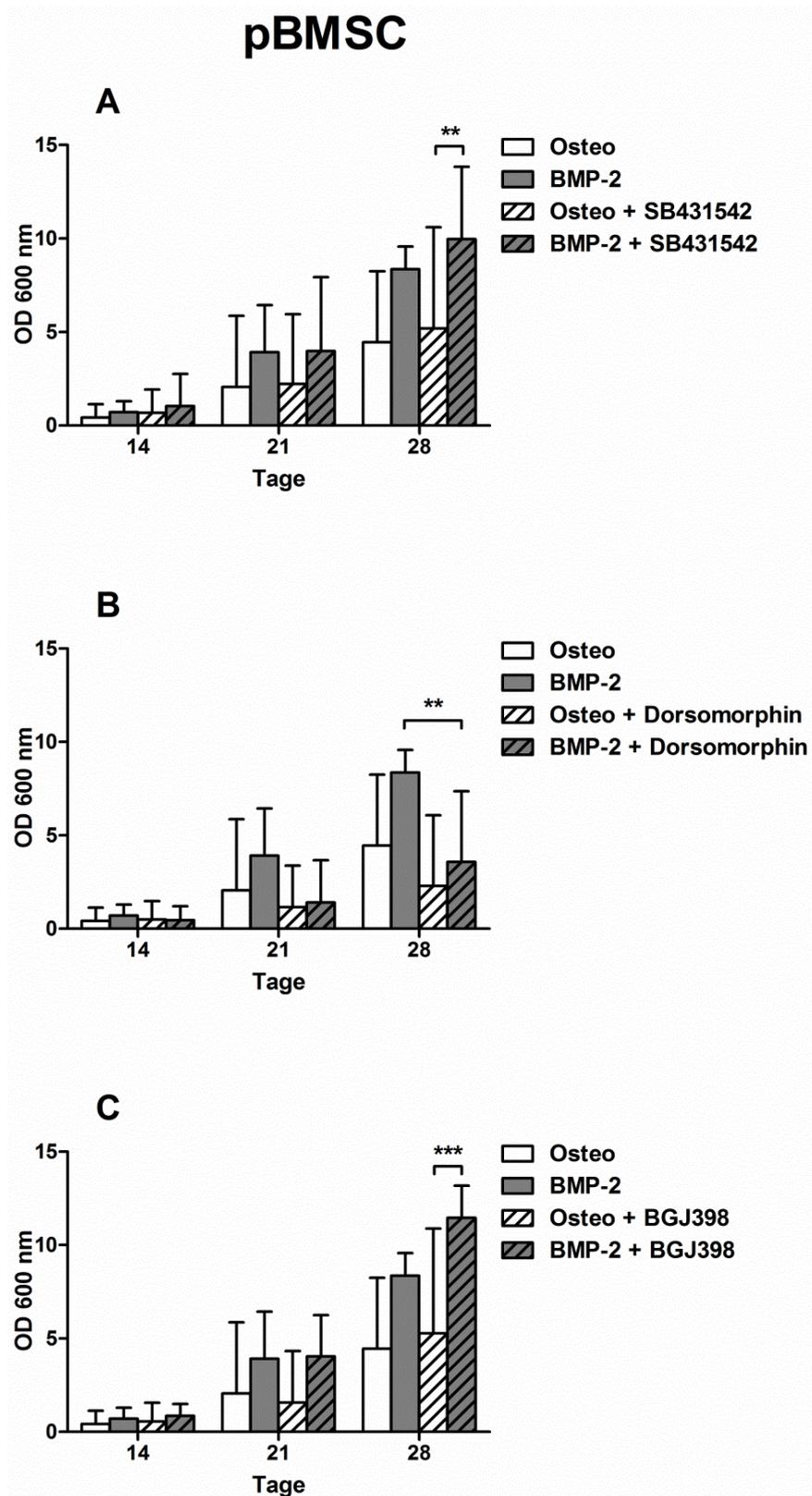


Abb. 13 A – C: Quantifizierung der Alizarin-Rot-S-Rücklösung bei pBMSCs nach osteogener Differenzierung mit fakultativer BMP-2-Supplementation und unter Einfluss spezifischer Inhibitoren

Photometrisch wurde der rückgelöste Alizarin-Rot-S-Farbstoff quantifiziert. Die pBMSCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) bis zu 28 Tage kultiviert, das fakultatativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Zusätzlich wurden die Inhibitoren SB431542 in einer Konzentration von 1 μ M, Dorsomorphin in einer Konzentration von 0,5 μ M und BGJ398 in einer

Konzentration von 0,5 μ M koinkubiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) oder *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. (OD = optische Dichte); n = 4

Die lichtmikroskopische Dokumentation der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix durch Färbung mit Alizarin-Rot-S der pBMSCs ist in Abbildung 14 gezeigt. Kongruent zu den pBMSCs zeigte sich, dass mit osteogenem Differenzierungsmedium, ohne Einsatz von BMP-2 oder eines Inhibitors, bereits eine deutliche Osteogenese imponiert. Auch unter BMP-2-Supplementation, aber ohne Inhibitoreinsatz, konnte eine deutliche Färbung der kalzifizierten extrazellulären Matrix visualisiert werden. Bei Supplementation von SB431542 war ebenfalls sowohl unter osteogenem Differenzierungsmedium, als auch bei zusätzlicher BMP-2-Koinkubation eine deutliche Färbung durch Alizarin-Rot-S erkennbar, wohingegen die Differenzierung durch Dorsomorphin inhibiert wurde.

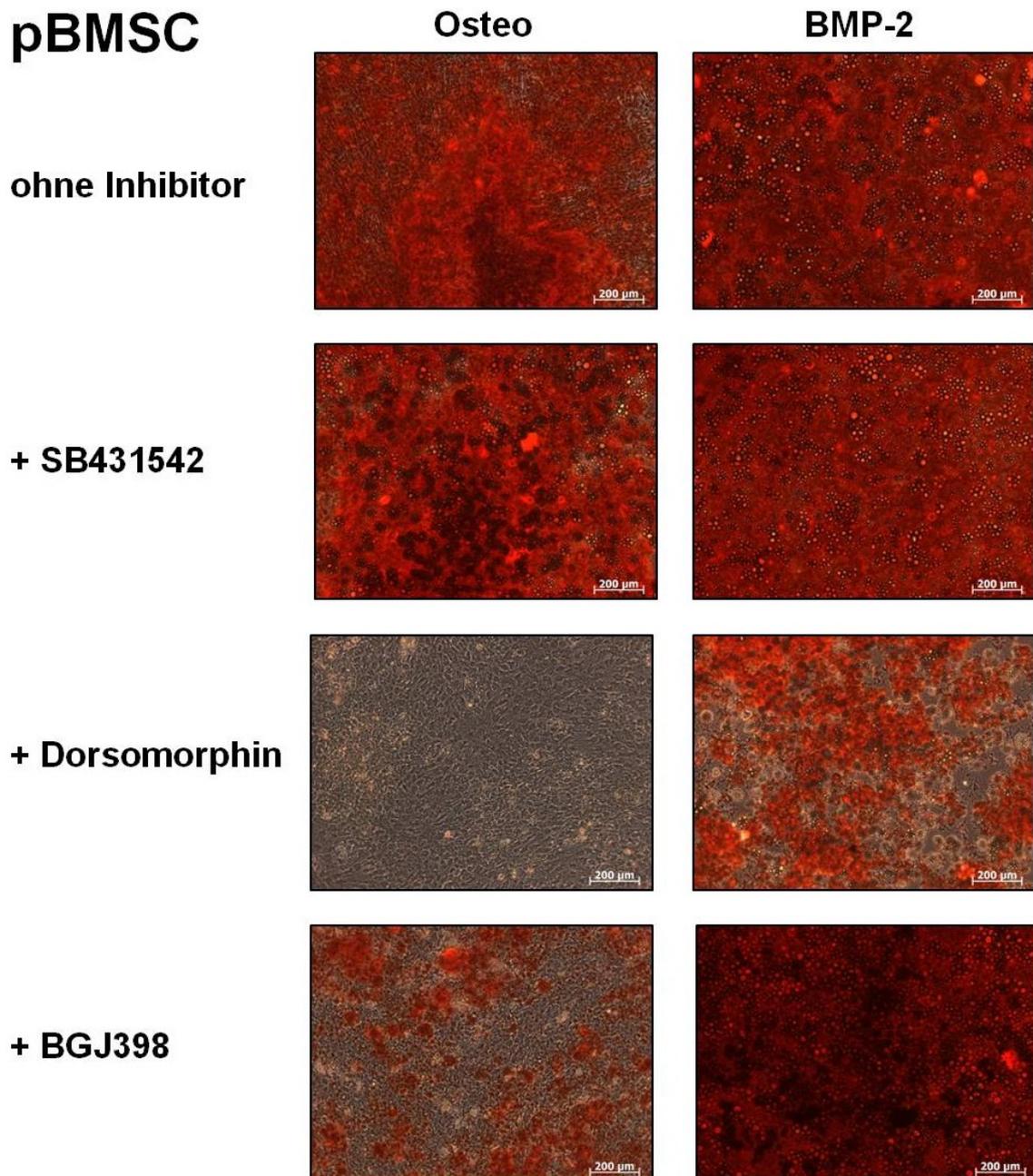


Abb. 14: Lichtmikroskopische Dokumentation der osteogenen Differenzierung mit Alizarin-Rot-S-Färbung bei pBMSCs nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit Supplementation von SB431542, Dorsomorphin und BGJ398

Dargestellt ist der lichtmikroskopische Nachweis der Alizarin-Rot-S-Färbung als Parameter einer erfolgten Osteogenese bei pBMSCs nach 28 Tagen Differenzierung mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo), das fakultativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Zusätzlich wurden die Inhibitoren SB431542 in einer Konzentration von 1 μ M, Dorsomorphin in einer Konzentration von 0,5 μ M und BGJ398 in einer Konzentration von 0,5 μ M koinkubiert. Exemplarisch ist ein Spender abgebildet. Der Maßstabsbalken ist 200 μ m lang.

Um die Wirkung der spezifischen Inhibitoren SB431542, Dorsomorphin und BGJ398 in Kombination zu untersuchen, wurden pBMSCs und pASCs unter gleicher Versuchsanordnung bis zu 28 Tage mit fakultativer BMP-2-Supplementation osteogen differenziert. Zusätzlich wurden jeweils zwei der drei untersuchten Inhibitoren in

identischer Konzentration wie unter alleiniger Supplementation der Inhibitoren koinkubiert. Die Ergebnisse der mittels Cetylpyridiniumchlorid quantifizierten Alizarin-Rot-S-Rücklösung als Parameter einer erfolgten Osteogenese sind in Abbildung 15 A-C gezeigt.

Abbildung 15 A präsentiert die osteogene Differenzierung bei pASCs, deren TGF- β - und BMP-Signalwege inhibiert wurden. Zum Abschluss des Versuchs, am Tag 28, war die höchste osteogene Differenzierung zu detektieren. Alleinig mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelte pASCs erzielten eine durchschnittlich osteogene Differenzierung unter 1. Wurden diese Zellen darüber hinaus mit BMP-2 differenziert, lag die osteogene Differenzierung um durchschnittlich etwa 2,4. Bei Inhibition der TGF- β - und BMP-Signalwege lag die osteogene Differenzierung ohne BMP-2-Einsatz durchschnittlich ebenfalls unter 1, bei zusätzlichem BMP-2-Einsatz um etwa 2,3. In Kombination bewirkten SB431542 und Dorsomorphin somit tendenziell keinen Unterschied auf die osteogene Differenzierung der pASCs.

Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung bei pASCs, deren der TGF- β - und FGF-Signalwege inhibiert wurde, ist in Abbildung 15 B dargestellt. Die höchste Differenzierung bei kombiniertem Inhibitoreinsatz waren nach 28 Tagen messbar: ohne BMP-2-Koinkubation lag die osteogene Differenzierung bei Inhibition der TGF- β - und FGF-Signalwege in Kombination um durchschnittlich etwa 1,1. Bei BMP-2-Einsatz war im Vergleich dazu die osteogene Differenzierung signifikant erhöht ($p \leq 0,05$). Im Vergleich zu den pASCs, die ohne SB431542 und BGJ398 differenziert wurden, ist die osteogene Differenzierung tendenziell aber nur geringfügig verbessert.

In Abbildung 15 C sind die Ergebnisse der quantifizierten Alizarin-Rot-S-Rücklösung der mit Dorsomorphin und BGJ398 in Kombination differenzierten pASCs gezeigt. Nach 28 Tagen waren für die mit den beiden Inhibitoren Dorsomorphin und BGJ398 die höchsten Ergebnisse bei der Quantifizierung der Alizarin-Rot-S-Rücklösung feststellbar. Ohne BMP-2-Einsatz, aber bei Supplementation der Inhibitoren, lag die osteogene Differenzierung bei etwa 1,1; unter BMP-2-Einsatz bei etwa 2,1. Durch den Einsatz von Dorsomorphin und BGJ398 konnte die osteogene Differenzierung der pASCs nicht verbessert werden.

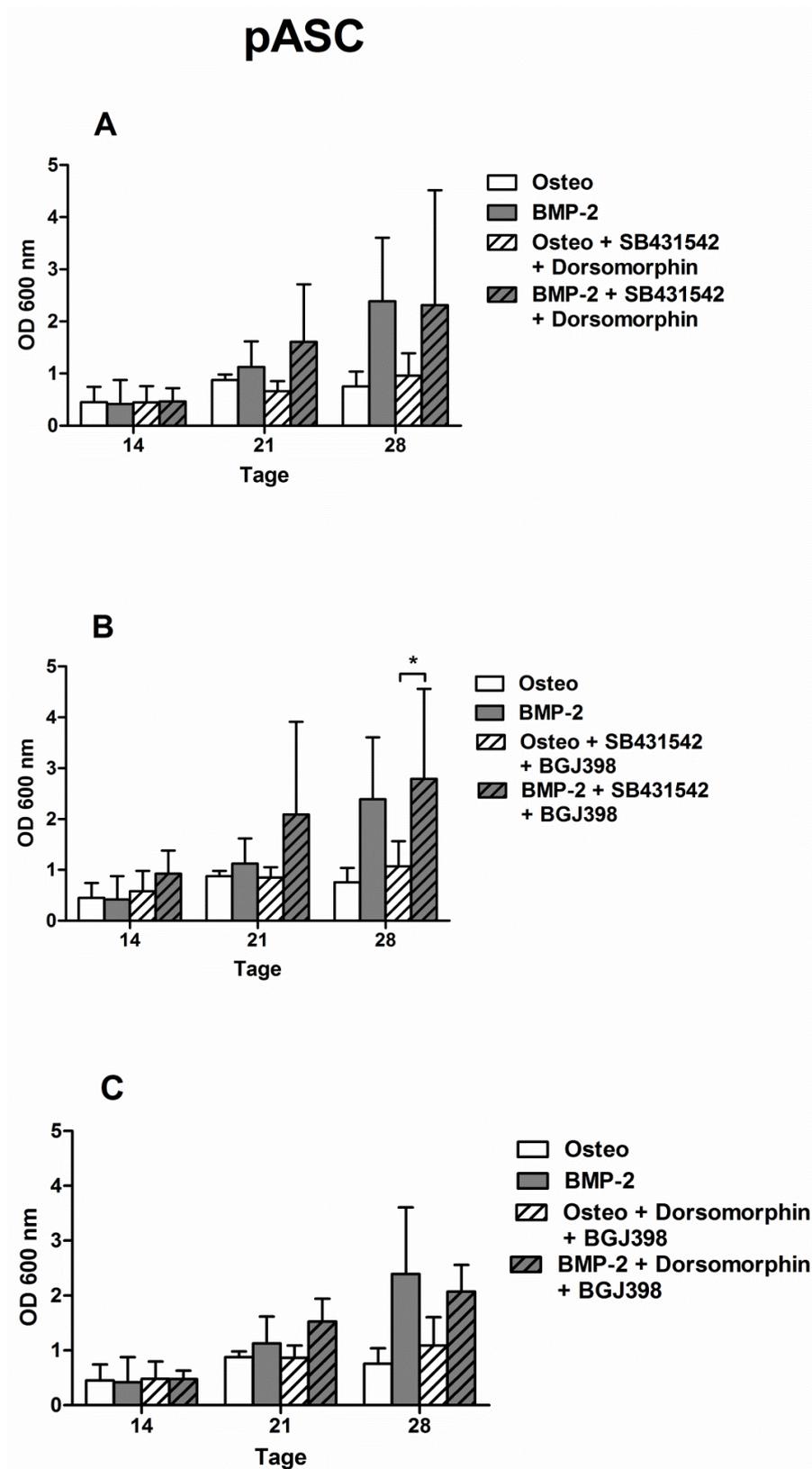


Abb. 15 A – C: Quantifizierung der Alizarin-Rot-S-Rücklösung bei pASCs nach osteogener Differenzierung mit fakultativer BMP-2-Supplementation und unter Einfluss von Kombinationen spezifischer Inhibitoren

Photometrisch wurde der rückgelöste Alizarin-Rot-S-Farbstoff quantifiziert. Die pASCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) bis zu 28 Tage kultiviert, das fakultatativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Zusätzlich wurden die Inhibitoren SB431542 in einer

Konzentration von 1 μM , Dorsomorphin in einer Konzentration von 0,5 μM und BGJ398 in einer Konzentration von 0,5 μM in Kombination koinkubiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) oder *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. (OD = optische Dichte); n = 3

Nach identischer Versuchsanordnung wurden bis zu 28 Tage pBMSCs mit Kombinationen von zwei der drei untersuchten Inhibitoren unter fakultativer BMP-2-Supplementation osteogen differenziert. Die Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix als Parameter der osteogenen Differenzierung ist in Abbildung 16 A-C dargestellt.

Abbildung 16 A zeigt die Ergebnisse der mit SB431542 und Dorsomorphin in Kombination unter fakultativem BMP-2-Einsatz differenzierten pBMSCs. Nach 14 Tagen lag die osteogene Differenzierung für Zellen, die mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne weitere Zusätze behandelt wurden, um durchschnittlich 1,6. Bei zusätzlicher BMP-2-Supplementation war eine osteogene Differenzierung um etwa 2,3 feststellbar. Die Inhibition des TGF- β - und BMP-Signalweges bewirkte nach 14 Tagen bei pBMSCs eine osteogene Differenzierung um durchschnittlich etwa 1,9, bei Koinkubation mit BMP-2 um etwa 4,3. Ohne Inhibition war an Tag 21 eine osteogene Differenzierung der pBMSCs um durchschnittlich 3,9 messbar, bei Supplementation von BMP-2 um etwa 4,8. Mit Einsatz von SB431542 und Dorsomorphin war ohne BMP-2-Zugabe eine osteogene Differenzierung um durchschnittlich 3,6, bei Zugabe von BMP-2 um etwa 7, detektierbar. Die Differenzierung ohne Inhibition erzielte an Tag 28 die höchste osteogene Differenzierung um durchschnittlich ca. 4,4, bei BMP-2-Supplementation um ca. 7,7. Bei Koinkubation mit SB431542 und Dorsomorphin ergab die osteogene Differenzierung ohne BMP-2 etwa 4,4, bei zusätzlichem BMP-2-Einsatz lag die osteogene Differenzierung um etwa 9,8 und damit signifikant höher ($p \leq 0,05$). Die osteogene Differenzierung der pBMSCs wurde durch den Einsatz von SB431542 und Dorsomorphin bei BMP-2-Koinkubation weiter verbessert.

Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung der mit SB431542 und BGJ398 in Kombination differenzierten pBMSCs sind in Abbildung 16 B dargestellt. An Tag 14 waren bei Einsatz der Inhibitoren für mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelte Zellen eine osteogene Differenzierung um etwa 2,8, bei zusätzlicher BMP-2-Koinkubation um ca. 6,4 feststellbar. Nach 21 Tagen war die osteogene Differenzierung weiter angestiegen und lag bei durchschnittlich etwa 4,2 unter osteogenem Differenzierungsmedium, bei BMP-2-Einsatz signifikant höher um etwa 12,1

($p \leq 0,001$). Im Vergleich zwischen den ohne Inhibitoreinsatz differenzierten pBMSCs, bei denen die osteogene Differenzierung an Tag 21 um etwa 4,8 lag, war bei Inhibition der TGF- β - und FGF-Signalwege die osteogene Differenzierung signifikant erhöht ($p \leq 0,001$). An Tag 28 war die höchste osteogene Differenzierung dokumentierbar. Ohne BMP-2, aber unter Inhibition der TGF- β - und FGF-Signalwege, lag die osteogene Differenzierung bei den behandelten Zellen um etwa 5,1, bei Zugabe von BMP-2 signifikant höher um durchschnittlich etwa 15,1 ($p \leq 0,001$). Auch nach 28 Tagen führte der Einsatz der Inhibitoren SB431542 und BGJ398 in Kombination mit BMP-2-Supplementation zu einer signifikant erhöhten osteogenen Differenzierung im Vergleich zu mit BMP-2, jedoch ohne Inhibitoren differenzierten pBMSCs ($p \leq 0,001$). Im Vergleich zu pBMSCs, die ohne die Kombination von SB431542 und BGJ398 differenziert wurden, wurde die Osteogenese durch den Einsatz der Inhibitoren bei pBMSCs demnach deutlich verbessert.

Die osteogene Differenzierung von porcinen BMSCs mit kombinierter Behandlung von Dorsomorphin und BGJ398 nach 14, 21 und 28 Tagen ist in Abbildung 16 C dargestellt. Nach 14 Tagen war bei Differenzierung mit der Kombination der beiden Inhibitoren und osteogenem Differenzierungsmedium eine osteogene Differenzierung um durchschnittlich ca. 1,9, bei zusätzlichem BMP-2-Einsatz um etwa 2,6 feststellbar. An Tag 21 lag die osteogene Differenzierung der mit Inhibitoren differenzierten pBMSCs um etwa 3,6, bei zusätzlicher BMP-2-Koinkubation lagen die Werte durchschnittlich höher, etwa bei 8. Nach 28 Tagen wurde auch bei diesen Behandlungsgruppen durchschnittlich die bessere Differenzierung erzielt. Ohne BMP-2-Einsatz lag die osteogene Differenzierung unter kombiniertem Inhibitoreinsatz bei ca. 3,9, bei BMP-2-Supplementation mit osteogener Differenzierung bei durchschnittlich etwa 9,3 und somit signifikant höher ($p \leq 0,05$).

Wie in Abbildung 16 A-C erkennbar, lagen die Messergebnisse für alle Inhibitor kombinationen an allen Messtagen tendenziell mindestens auf gleicher Höhe wie ohne Inhibitoreinsatz. Bei allen Behandlungsgruppen führte BMP-2 zu einer tendenziell erhöhten osteogenen Differenzierung. Bei allen Inhibitor kombinationen war durch den Einsatz von BMP-2 die osteogene Differenzierung an Tag 28 signifikant erhöht, bei Kombination von SB431542 und BGJ398 darüber hinaus auch an Tag 21. Im Vergleich zwischen pBMSCs, die unter BMP-2-Koinkubation osteogen differenziert wurden, erzielten tendenziell die mit den Inhibitor kombinationen behandelten Zellen

eine höhere osteogene Differenzierung bei der Rücklösung des in der extrazellulären Matrix gebundenen Calciums im Sinne einer erfolgten Osteogenese. Bei Kombination von SB431542 und BGJ398 war die osteogene Differenzierung im Vergleich zu ohne Inhibitorkombination differenzierten pBMSCs an den Tagen 21 und 28 signifikant erhöht ($p \leq 0,001$). Ohne BMP-2-Supplementation lag die osteogene Differenzierung zwischen mit und ohne Inhibitorkombinationen differenzierten pBMSCs tendenziell auf ähnlichem Niveau.

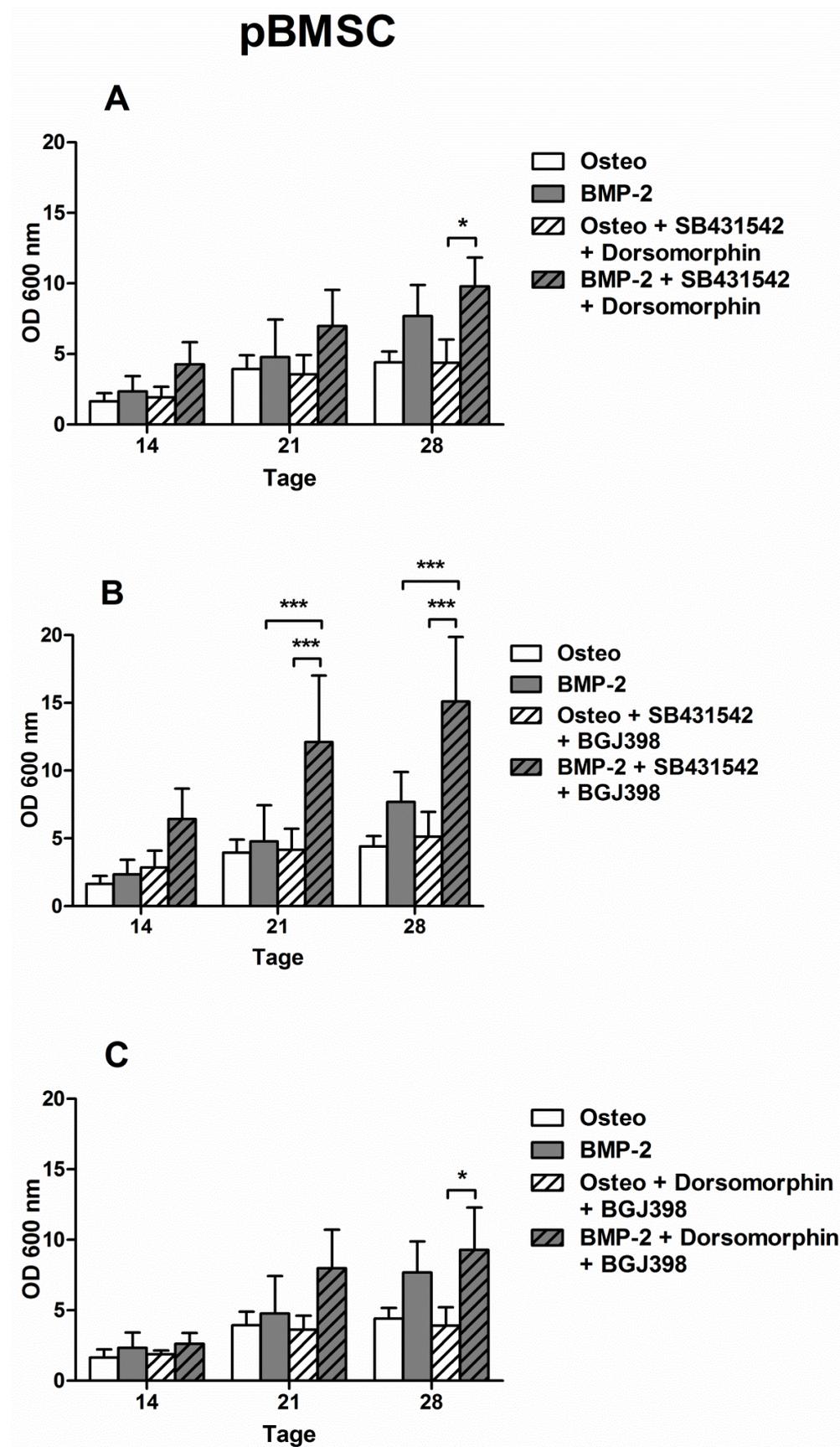


Abb. 16 A – C: Quantifizierung der Alizarin-Rot-S-Rücklösung bei pBMSCs nach osteogener Differenzierung mit fakultativer BMP-2-Supplementation und unter Einfluss von Kombinationen spezifischer Inhibitoren

Photometrisch wurde der rückgelöste Alizarin-Rot-S-Farbstoff quantifiziert. Die porcinen BMSCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) bis zu 28 Tage kultiviert, das fakultativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Zusätzlich wurden die Inhibitoren SB431542 in einer Konzentration von 1 μ M, Dorsomorphin in einer Konzentration von 0,5 μ M und BGJ398 in einer Konzentration von 0,5 μ M in Kombination koinkubiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) oder *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. (OD = optische Dichte); n = 4

Der Vergleich der quantifizierten Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix als Parameter einer erfolgten Osteogenese bei pASCs und pBMSCs nach 28 Tagen osteogener Differenzierung ist in Abbildung 17 dargestellt. Unter Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium, auch bei Einsatz von SB431542, Dorsomorphin oder BGJ398, lag die osteogene Differenzierung für pASCs im Durchschnitt stets unter 0,5. pBMSCs zeigten unter identischen Kulturbedingungen eine deutlich stärkere Kalzifizierung der extrazellulären Matrix. Ohne Inhibitoreinsatz lag die osteogene Differenzierung durchschnittlich bei etwa 4,5. Bei Einsatz von SB431542 war eine signifikant höhere osteogene Differenzierung für pBMSCs im Vergleich zu pASCs erzielbar ($p \leq 0,05$). Die niedrigste durchschnittliche osteogene Differenzierung nach 28 Tagen um etwa 2,4 für pBMSCs war unter Einsatz von Dorsomorphin feststellbar. Unter Supplementation von BGJ398 lag die osteogene Differenzierung der pBMSCs bei durchschnittlich etwa 5,4 und somit wie unter Einsatz von SB431542, wo die osteogene Differenzierung bei etwa 5,3 lag, tendenziell höher als ohne Einsatz eines Inhibitors. Bei Koinkubation von BMP-2 waren in allen Behandlungsgruppen und sowohl für pASCs als auch pBMSCs höhere Ergebnisse bei der Quantifizierung der Alizarin-Rot-S-Rücklösung dokumentierbar. Ohne Einsatz eines Inhibitors lag die osteogene Differenzierung für pASCs bei etwa 3,8, bei pBMSCs um 8,4. Bei Supplementation des Inhibitors SB431542 war für pASCs eine osteogene Differenzierung um etwa 3,3 feststellbar. Bei pBMSCs lag die osteogene Differenzierung bei durchschnittlich 10,1 und somit signifikant höher ($p \leq 0,01$). Der Einsatz von Dorsomorphin bewirkte sowohl bei pASCs und pBMSCs, die mit osteogenem Differenzierungsmedium und BMP-2 behandelt wurden, die niedrigsten Ergebnisse bei der quantifizierten Alizarin-Rot-S-Rücklösung. Sowohl mit als auch ohne Einsatz von BMP-2 waren für pASCs und pBMSCs unter Supplementation von Dorsomorphin die niedrigste osteogene Differenzierung, im Sinne einer verminderten Kalzifizierung der extrazellulären Matrix, aufgetreten. Unter Verwendung von BGJ398 lag die osteogene Differenzierung bei pASCs bei durchschnittlich etwa 3,6 und somit wie auch unter Einsatz von SB431542 tendenziell auf Niveau der Differenzierung ohne Inhibitoreinsatz. pBMSCs erzielten unter Supplementation von BGJ398 bei identischen Kulturbedingungen und

Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium und BMP-2 eine signifikant höhere osteogene Differenzierung als pASCs ($p \leq 0,001$).

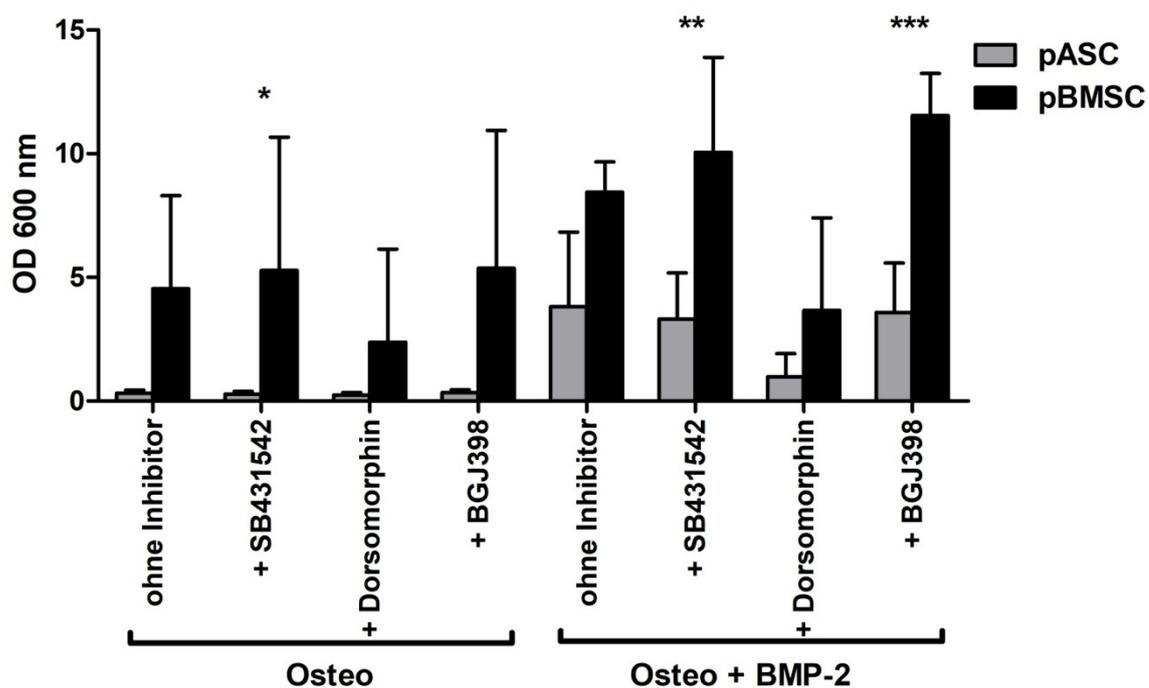


Abb. 17: Vergleich der osteogenen Differenzierung porciner MSCs mit fakultativer BMP-2- und Inhibitorsupplementation

Photometrisch wurde der rückgelöste Alizarin-Rot-S-Farbstoff quantifiziert. Die pASCs und pBMSCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (Osteo) 28 Tage kultiviert, das fakultatativ mit BMP-2 supplementiert wurde (BMP-2, 450 ng/ml). Zusätzlich wurden die Inhibitoren SB431542 in einer Konzentration von 1 μ M, Dorsomorphin in einer Konzentration von 0,5 μ M und BGJ398 in einer Konzentration von 0,5 μ M koinkubiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) oder *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. (OD = optische Dichte); pASCs: n = 6; pBMSCs: n = 4

4 Diskussion

MSCs sind in zahlreichen medizinischen Fachdisziplinen Gegenstand intensiver Forschung und Hoffnungsträger in der Regeneration von Gewebedefekten im Rahmen des *Tissue Engineerings*. Die Nutzung von *in vitro* kultivierten Zellverbänden aus autologen Zellen ist eine vielversprechende Therapieoption in verschiedenen klinischen Fragestellungen, die zugleich das Risiko von Abstoßungsreaktionen und mangelnder Biokompatibilität aufgrund ihrer autologen Herkunft minimiert. So wird der Einsatz des *Bone Tissue Engineerings* auch bei der Behandlung von Critical-Size-Defekten erforscht. Dabei handelt es sich um Knochendefekte, die aufgrund z. B. eines Traumas oder Tumors eine kritische Größe überschritten haben und daher unbehandelt nicht vollständig heilen können. Solche Knochendefekte stellen klinisch eine Herausforderung dar und werden aktuell mittels Einsatz verschiedener biokompatibler Knochenersatzmaterialien und unter Verwendung von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen therapiert (Park et al. 2003). Goldstandard in der Therapie der Critical-Size-Defekt stellt die autologe Spongiosaplastik dar, die jedoch nur begrenzt und nicht ungeachtet patientenbezogener Komorbiditäten durchgeführt werden kann (Fillingham und Jacobs 2016). 2001 gelang so bereits die zellbasierte Therapie von Critical-Size-Defekten beim Schaf und Hund durch Transplantation autologer BMSCs (Quarto et al. 2001). Bevor eine sichere und validierte Anwendung von MSCs in standardisierten klinischen Therapien gewährleistet werden kann, müssen die molekularen Mechanismen, die diesen Differenzierungspotentialen zu Grunde liegen, in präklinischen Experimenten evaluiert werden. Da MSCs verschiedenen histologischen Ursprungs, wie z. B. aus dem Fettgewebe oder Knochenmark, isoliert und osteogen differenziert werden können, muss ferner aufgeklärt werden, welche Bedeutung der histologische Ursprung für das Differenzierungspotential besitzt und welche Zellen für die MSC-basierte Therapie von Knochendefekten besonders geeignet sind.

Im Rahmen der präsentierten Arbeit wurde der osteogene Differenzierungsprozess porciner MSCs osteomedullärer und adipogener Herkunft über 28 Tage analysiert, um die Bedeutung des histologischen Ursprungs der autologen Zellen und spezifischer Signalwege für die Osteogenese zu untersuchen. Die generierten Daten sollen wichtige Erkenntnisse für eine Transplantation autologer MSCs im Schweinmodell liefern.

4.1 Durchflusszytometrische Analyse porciner MSCs

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSCs aus dem Fettgewebe und Knochenmark wurden nach ihrer Isolation und Kultivierung entsprechend ihrer Plastikadhärenz selektiert und in Passage 3 durchflusszytometrisch analysiert.

Zur Verifizierung, dass es sich um MSCs handelt, soll laut *International Society for Cellular Therapy* nach der Isolation in der Zellkultur Plastikadhärenz und ein osteogenes, chondrogenes und adipogenes Differenzierungspotential nachweisbar sein (Bourin et al. 2013; Dominici et al. 2009). Die Plastikadhärenz wurde durch die Auswahl des methodischen Vorgehens mit Kultivierung der verwendeten Zellen in Plastikzellkulturflaschen und regelmäßiger mikroskopischer Prüfung auf Adhärenz sowie Mediumwechsel mit Entfernung nicht-adhärenter Zellen sichergestellt. Die immunphänotypische Ausprägung bestimmter Oberflächenantigene soll für die Expression von CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 positiv sein (Wong 2011), wohingegen die Expression von CD14, CD34 und CD45 negativ ausfallen soll (Dominici et al. 2006). Die untersuchten MSCs, sowohl adipogener als auch osteomedullärer Herkunft, waren definitionsgemäß negativ für die Expression von CD14, CD34 und CD45. Durchschnittlich die Hälfte der untersuchten MSCs war für die Oberflächenantigene CD29, CD44 und CD90 positiv, wobei die Expression zwischen etwa 40 und 60 % schwankte. Die Expression von CD73 und CD105 fiel entgegen der Definition der *International Society for Cellular Therapy* sowohl für porcine ASCs als auch BMSCs negativ aus (Abb.3). Allerdings wurde das Expressionsprofil anhand humaner MSCs entwickelt und verschiedene Veränderungen des Immunphänotyps während der Kultivierung und auch interindividuell wurden beschrieben (Katz et al. 2005). Für das porcine System ist ein Expressionsprofil nicht definiert, wodurch die Homogenität und der Anteil differenzierbarer Zellen variieren kann (Stockmann et al. 2012). CD26, das zur Unterscheidung von Fibroblasten und mesenchymalen Stromazellen dient (Kundrotas 2012), wurde nicht exprimiert, so dass davon auszugehen ist, dass unter den untersuchten Zellen kaum Fibroblasten vorhanden waren. Auch für CD31, das vorwiegend von Endothelzellen exprimiert wird (Liu und Shi 2012), lag die Expressionsrate bei unter 5 %. Es konnten Zellpopulationen gewonnen werden, die ein gleichmäßiges Expressionsprofil der untersuchten Oberflächenantigene, auch ohne bedeutsame Spenderabhängigkeit, aufwiesen. Die Expression der Oberflächenantigene ist weitestgehend kongruent mit Ergebnissen anderer

Arbeitsgruppen, die porcine MSCs auf ihren Stammzellcharakter untersucht haben (Ock et al. 2010; Vacanti et al. 2005). Das Expressionsprofil der Oberflächenantigene kann je nach histologischem Ursprung der MSCs oder auch je nach Spezies variieren (Keating 2012). Im Gegensatz zu Zuk et al. zeigte sich keine größere Inhomogenität der Zellpopulationen bei den porcinen ASCs im Vergleich zu BMSCs (Zuk et al. 2002), die durch die Isolation aus der stromavaskulären Fraktion zu erklären wäre (Barba et al. 2013).

4.2 Vergleich der osteogenen Differenzierung porciner MSCs unter fakultativer BMP-2-Supplementation

Für eine sichere klinische Applikation der MSC-basierten Therapie und eine erfolgreiche Transplantation autologer MSCs im Schweinmodell sind Kenntnisse über das Differenzierungspotential *in vitro* und die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Signalwegsinhibitoren im Differenzierungsmedium für die MSCs verschiedenen histologischen Ursprungs von übergeordneter Relevanz. Zur osteogenen Differenzierung wurden diese mit dem etablierten Differenzierungsmedium nach Zuk und Pittenger behandelt (Pittenger et al. 1999; Zuk et al. 2001). Ein speziell zur osteogenen Differenzierung porciner MSCs etabliertes Medium ist in der Literatur bis dato nicht beschrieben. Die osteogene Differenzierung wurde durch Färbung mit Alizarin-Rot-S, das eine für Osteoblasten typische Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix visualisiert, nachgewiesen (Rawadi et al. 2003; Stanford et al. 1995). Zu den Wachstumsfaktoren, die eine Reifung mesenchymaler Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten bewirken können, zählen BMPs (Phimphilai et al. 2006). Insbesondere das in der vorliegenden Arbeit verwendete BMP-2 ist für die Differenzierung mesenchymaler Stromazellen zu Osteoblasten von großer Bedeutung (Rahman et al. 2015). So konnte bereits in vorklinischen Experimenten und klinischen Studien das osteoinduktive Potential von BMP-2 nachgewiesen werden (Chen et al. 2004). Im porcinen System sind ASCs für eine osteogene Differenzierung essentiell auf BMP-2 angewiesen (Bayraktar et al. 2018). Eine Konzentration von 450 ng/ml BMP-2 wurde gewählt, weil diese osteogene Differenzierung der MSCs bestmöglich induziert (Luong et al. 2012).

Die Quantifizierung des rückgelösten Alizarin-Rot-S zeigte für porcine ASCs und BMSCs, dass im Verlauf über alle Messtage die osteogene Differenzierung verbessert

wurde, wenn sie additiv mit BMP-2 behandelt wurden. Eine lichtmikroskopische Dokumentation von gebundenem Alizarin-Rot-S als Parameter einer erfolgten Osteogenese war jeweils in sehr geringem Maße an Tag 14 möglich. Eine sehr deutliche Calciumdeposition im Sinne einer erfolgten Osteogenese war an Tag 21 und 28 festzustellen (Abb. 7, Abb. 9). Dabei war festzustellen, dass porcine ASCs, die mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne additives BMP-2 kultiviert wurden, weder die Messwerte der Rücklösung noch die lichtmikroskopische Dokumentation einen Hinweis lieferten, der auf eine erfolgte Osteogenese hindeutete (Abb. 7). Unter Einsatz von BMP-2 (450 ng/ml) zeigte sich an Tag 21 und 28 eine signifikant gesteigerte Rücklösung des Alizarin-Rot-S als Parameter einer Calciumdeposition durch Osteoblasten in die extrazelluläre Matrix. pASCs ließen sich folglich nur osteogen differenzieren, wenn das Differenzierungsmedium mit BMP-2 supplementiert wurde. Für porcine ASCs ist somit eine Supplementation von BMP-2 für die Osteogenese essentiell. Im Gegensatz dazu konnte bei porcinen BMSCs auch unter Verwendung des osteogenen Differenzierungsmediums ohne supplementiertes BMP-2 eine Osteogenese nachgewiesen werden (Abb. 9). Jedoch bewirkte der Einsatz von BMP-2 auch bei den BMSCs eine vermehrte osteogene Differenzierung im Sinne einer verbesserten Osteogenese, die an Tag 28 signifikant gesteigert war. Für porcine BMSCs ist demnach eine Supplementation von BMP-2 für die Osteogenese nicht essentiell, verbessert aber die osteogene Differenzierung. Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass porcine ASCs und BMSCs zur osteogenen Differenzierung geeignet sind. pASCs sind dabei auf eine Supplementation von BMP-2 zum etablierten Differenzierungsmedium nach Zuk und Pittenger angewiesen, um eine Osteogenese zu erzielen (Bayraktar et al. 2018). Die osteogene Differenzierung ist von besonderer Bedeutung, da die Zellen im Hinblick auf eine autologe Transplantation in einen Critical-Size-Defekt verglichen werden sollen. Es ist somit nicht gegeben, dass die untersuchten MSCs verschiedenen histologischen Ursprungs ein vergleichbares osteogenes Differenzierungspotential besitzen. Für eine klinische Anwendung am Menschen bleibt zu bedenken, dass BMSCs im Unterschied zu ASCs eine deutlichere Reduktion des osteogenen Differenzierungspotentials mit steigendem Alter erfahren (Shi et al. 2005). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass pBMSCs im Gegensatz zu pASCs sich einerseits ohne BMP-2-Zusatz und andererseits auch quantitativ besser osteogen differenzieren lassen. Im humanen System verbessert BMP-2 das osteogene Differenzierungspotential in ASCs mehr als in BMSCs (Bougioukli et al. 2018). pASCs

hingegen differenzieren osteogen nur mit BMP-2. In pBMSCs wird durch BMP-2 die Osteogenese verbessert. Im Gegensatz zum humanen System ist also, auch unter BMP-2, das osteogene Differenzierungspotential der pASCs geringer als das der pBMSCs. Andererseits konnten Stockmann, Park et al. zeigen, dass zwischen pASCs und pBMSCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine vergleichbare osteogene Differenzierung erreicht wird und der histologische Ursprung demnach zu vernachlässigen sei (Stockmann et al. 2012). Bei der In-vivo-Applikation der MSC-basierten Therapie am Schwein wurde gezeigt, dass BMP-2 die Knochenregeneration signifikant beschleunigt (Park et al. 2007).

4.3 Vergleich der osteogenen Differenzierung unter spezifischer Inhibition des TGF- β -, BMP- und FGF-Signalweges

Um die Osteogenese der MSCs zu optimieren und klinisch zu nutzen, ist die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge, die dieser Differenzierung zu Grunde liegen, von übergeordneter Relevanz. Die Bedeutung der TGF- β -, BMP- und FGF-Signalwege wurde durch die Inkubation mit spezifischen Inhibitoren untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden porcine ASCs und BMSCs in Passage 3 mit dem etablierten Differenzierungsmedium nach Zuk und Pittenger, das mit BMP-2 supplementiert wurde, osteogen differenziert. Während der Differenzierung wurden die MSCs darüber hinaus mit den genannten Inhibitoren, einzeln und in Kombination, behandelt.

pASCs und pBMSCs wurden in Passage 3 einerseits fakultativ mit BMP-2 und zusätzlich unter Inhibition eines Signalweges bis zu 28 Tage osteogen differenziert. Zur Evaluation der Bedeutung des TGF- β -Signalweges für die Osteogenese wurde SB431542 genutzt, das reversibel den TGF- β -Signalweg inhibiert (Ho und Whitman 2008). Dabei agiert es als Inhibitor der TGF- β - und Aktivin-induzierten Phosphorylierung von Smad2, die durch ALK4 und ALK5 vermittelt wird. Signalwege, die durch Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie induziert werden, sind für die Differenzierung der MSCs von großer Bedeutung (Derynck und Akhurst 2007). In pASCs scheint die Phosphorylierung von Smad2 im TGF- β -Signalweg die osteogene Differenzierung nicht entscheidend zu stören, da es ohne BMP-2 auch bei Inhibition des TGF- β -Signalweges zu keiner Osteogenese kam. Die BMP-induzierte Phosphorylierung von Smad1, Smad5 und Smad8, die durch ALK2, ALK3 und ALK6 vermittelt wird, wird bei der Inhibition des TGF- β -Signalweges mittels SB341542 jedoch nicht

beeinflusst (Inman et al. 2002). Unter BMP-2-Einsatz bewirkte die Inhibition bei pASCs keine wesentliche Veränderung der Osteogenese bis zum Tag 28 (Abb. 11 A). Im Gegensatz dazu wurde bei pBMSCs die osteogene Differenzierung tendenziell durch Inhibition des TGF- β -Signalweges weiter verbessert, insbesondere unter BMP-2-Koinkubation (Abb. 13 B). TGF- β sorgt *in vivo* im Knochendefekt für eine Rekrutierung weiterer MSCs und verbessert durch die Induktion der Osteoblastendifferenzierung die Knochenheilung (Tang et al. 2009; Wan et al. 2012). Abhängig vom Zelltyp beeinflusst TGF- β die Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Oshimori und Fuchs 2012). Trotz der positiven Effekte auf die Rekrutierung weiterer MSCs bei der Knochenheilung induziert TGF- β jedoch nicht direkt die Osteoblastendifferenzierung (Alliston et al. 2001). Passend dazu führte die Inhibition des TGF- β -Signalweges nicht zu einer Reduktion der Osteogenese. TGF- β wirkt jedoch nicht nur über eine ALK4- und ALK-5-vermittelte Phosphorylierung von Smad2, sondern auch über die p38 *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) auf die Proliferation und Differenzierung der Osteoprogenitorzellen (Matsunobu et al. 2009). Beide Signalwege wirken letztlich auf die Expression von RUNX2 und damit auf die Differenzierung der MSCs (Lee et al. 2002).

Die Liganden-induzierte Phosphorylierung von Smad1, Smad5 und Smad8 kann durch verschiedene BMPs induziert werden. Dorsomorphin inhibiert diese Phosphorylierung ohne jedoch die durch TGF- β 1- oder Aktivin-induzierte Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 zu beeinflussen. Zusätzlich beruht die Wirkung von Dorsomorphin auf der Inhibition der konstitutiv-aktivierten BMP-Typ-1-Rezeptoren ALK1, ALK2, ALK3 und ALK6 (Hong und Yu 2009). Dass pASCs auf BMP-2 für eine osteogene Differenzierung essentiell angewiesen sind, wurde durch die Beobachtung untermauert, dass bei Einsatz von BMP-2 und Dorsomorphin, das wesentlich die Signaltransduktion des BMP-2 verhindert, die Differenzierung signifikant reduziert wurde (Abb. 11 B). Im Verlauf zeigten die pASCs eine Stagnation und Retardierung der Osteogenese. Auch die lichtmikroskopische Beurteilung bestätigte, dass keine qualitativ erkennbare Kalzifizierung der extrazellulären Matrix stattgefunden hatte (Abb. 12). Im Vergleich wurde auch bei pBMSCs durch die Inhibition des BMP-Signalweges die Osteogenese signifikant reduziert (Abb. 13 B). Lichtmikroskopisch waren hier qualitativ noch Areale mit einer Kalzifizierung der EZM auszumachen, qualitativ und quantitativ war diese aber im Vergleich zu pBMSCs, deren BMP-Signalweg nicht inhibiert wurde, deutlich

vermindert. Die Hemmung des BMP-Signalweges reduziert das Differenzierungspotential in pASCs und pBMSCs. BMP-2 verstärkt die osteogene Aktivität der MSCs *in vitro* und ist wichtig für die Differenzierung der Osteoblasten (Lou et al. 1999). Es führt im porcinen System *in vivo* zu einer deutlichen Akzeleration der Osteogenese (Park et al. 2007).

FGF-2 beeinflusst die Expression von Wachstumsfaktoren in verschiedenen Zelltypen, wird durch TGF- β induziert und verbessert die Differenzierung von Osteoblasten und somit die Osteogenese (Beck und D'Amore 1997; Sobue et al. 2002). Montero et al. konnten zeigen, dass FGF-2 für die Knochenbildung und auch Osteogenese der MSCs von Bedeutung ist (Montero et al. 2000). Um die Bedeutung des FGF-Signalweges für die osteogene Differenzierung der porcinen MSCs zu evaluieren, wurde dieser mittels BGJ398 inhibiert. BGJ398 ist ein Inhibitor der Liganden-induzierten Autophosphorylierung der FGF-Rezeptortyrosinkinasen 1, 2 und 3 (Konecny et al. 2013), so dass weitere intrazelluläre Phosphorylierungsschritte, die letztlich Proliferations- und Differenzierungsprozesse regulieren, unterbunden werden (Lee et al. 1989). In Osteoblasten sind insbesondere die FGF-Rezeptortyrosinkinasen 1 und 2 exprimiert (Rice et al. 2000). Wird FGF-2 zu Beginn der osteogenen Differenzierung appliziert, wird die Osteogenese beschleunigt (Kuhn et al. 2013). FGF-2 erhöht dabei die Expression von TGF- β und BMP-2 und reguliert in Osteoblasten die BMP-2-Expression (Fakhry et al. 2005). pASCs zeigten unter Inhibition des FGF-Signalweges keine wesentliche Veränderung der Osteogenese und auch im Verlauf wurde die osteogene Differenzierung nicht retardiert (Abb. 11 C). Im Vergleich zeigten pBMSCs an Tag 28 eine tendenziell verbesserte Osteogenese unter Inhibition des FGF-Signalweges während der Differenzierung (Abb. 13 C). Die FGF-Rezeptortyrosinkinasen 1, 2 und 3 und die dadurch induzierten intrazellulären Phosphorylierungsschritte haben somit keine essentielle Bedeutung für die osteogene Differenzierung der porcinen MSCs, da eine Inhibition dieses Signalweges das osteogene Differenzierungspotential nicht reduziert. Jedoch scheint ein Einfluss auf die Osteogenese zu bestehen, da in pBMSCs die Differenzierung durch die Inhibition des FGF-Signalweges zu einer verbesserten Osteogenese führt. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen bewirkt der FGF-Signalweg in humanen ASCs jedoch eine deutliche Akzeleration der Proliferation (Iwashima et al. 2009), weshalb im Rahmen dieser Arbeit FGF-2 zur Proliferation der pMSCs vor der osteogenen Differenzierung verwendet

wurde. Ferner bleibt das multipotente Differenzierungspotential der MSCs durch FGF-2 erhalten (Tsutsumi et al. 2001). FGF-2 verbessert darüber hinaus auch das chondrogene Differenzierungspotential humaner ASCs (Chiou et al. 2006). Im porcinen System beeinflusst der FGF-Signalweg die osteogene Differenzierung, wie durch die gesteigerte Osteogenese der pBMSCs gezeigt werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des FGF-Signalweges die osteogene Differenzierung im porcinen System nicht unterbindet. Eine kontinuierliche Behandlung mit FGF-2 bewirkte *in vitro* eine Reduktion der osteogenen Differenzierungsmarker (Canalis et al. 1988; Rodan et al. 1989). Eine intermittierende Behandlung scheint jedoch die osteogene Differenzierung sowohl *in vitro* (Canalis et al. 1988) als auch *in vivo* (Mayahara et al. 1993) zu verbessern. Auch Fakhry et al. konnten demonstrieren, dass eine kontinuierliche Behandlung mit FGF-2 die osteogene Differenzierung hemmt, wohingegen eine sequentielle Behandlung mit FGF-2 gefolgt von BMP-2 die osteogene Differenzierung tendenziell verbesserte (Fakhry et al. 2005). Neben den Ergebnissen einer kontinuierlichen FGF-Signalwegsinhibition wäre demnach auch eine sequentielle Inhibition des FGF-Signalweges ein aufschlussreicher Ansatz. Weitere Bedeutung für die Osteogenese hat der FGF-Signalweg, weil die Expression von BMP-2 und TGF- β durch eine kurzfristige Zugabe von FGF-2 zu Beginn der osteogenen Differenzierung erhöht wird (Fakhry et al. 2005). Eine kontinuierliche Inhibition des FGF-Signalweges, wie im Rahmen dieser Arbeit demonstriert, unterbindet jedoch nicht die osteogene Differenzierung. Die positive Wirkung des FGF-Signalweges auf die Osteogenese ist auf die verstärkte Proliferation der Osteoprogenitorzellen zurückzuführen (Martin et al. 1997). Demnach würde die Inhibition des FGF-Signalweges sich vorrangig zu Beginn der osteogenen Differenzierung nachteilig auf die Osteogenese auswirken, was in weiteren Versuchsansätzen zu untersuchen wäre. Denn FGF-2 scheint vorrangig zu Beginn der Knochenheilung für die Proliferation der Osteoblasten von großer Bedeutung zu sein, wohingegen BMP-2 später die Mineralisierung der extrazellulären Matrix unterstützt (Hughes-Fulford und Li 2011). Trotz der positiven Wirkung des FGF-Signalweges auf die Proliferation der Osteoblasten, scheinen höhere Dosen von FGF-2 die osteogene Differenzierung *in vivo* zu hemmen (Zellin und Linde 2000). Ein synergistischer Effekt auf die osteogene Differenzierung durch den FGF- und BMP-Signalweg scheint nur bei niedrigen Dosen von FGF-2 zu bestehen, wohingegen höhere Dosen die Osteogenese inhibieren (Fujimura et al. 2002).

Um die Auswirkungen der Inhibition des TGF- β -, BMP- und FGF-Signalwege und deren Wechselwirkungen auf die Osteogenese zu untersuchen, wurden die pMSCs unter kombinierter Inhibition von zwei der untersuchten Signalwege differenziert. pASCs konnten bei gleichzeitiger Inhibition des TGF- β - und BMP-Signalweges nicht osteogen differenzieren. Sowohl der TGF- β - als auch BMP-Signalweg wirken auf Smad4, dessen Deletion zu einer Reduktion von Knochenvolumen, Mineralisierung und Osteoblastenaktivität führt (Tan et al. 2007). Allerdings führte die osteogene Differenzierung mit BMP-2 und gleichzeitiger Inhibition des TGF- β - und BMP-Signalweges zu einer osteogenen Differenzierung, die vergleichbar mit den pASCs war, die nur mit BMP-2 behandelt wurden (Abb. 15 A). Dies ist insofern beachtlich, weil die Behandlung mit BMP-2 in pASCs überhaupt erst eine osteogene Differenzierung ermöglichte (Abb. 7). Inhibiert man bei pASCs jedoch zeitgleich den TGF- β - und BMP-Signalweg unter BMP-2-Einsatz fällt die Osteogenese wie unter osteogenem Differenzierungsmedium aus. Ebenso entsprach bei pBMSCs die osteogene Differenzierung unter kombinierter Inhibition des TGF- β - und BMP-Signalweges der Osteogenese ohne Signalwegsinhibition. BMP-2 verbesserte unter kombinierter Inhibition des TGF- β - und BMP-Signalweges die osteogene Differenzierung weiter (Abb. 16 A). Die osteoinduktive Wirkung von BMP-2 kann *in vivo* durch TGF- β deutlich gesteigert werden (Tachi et al. 2011). Bei pBMSCs scheint jedoch unter kombinierter Inhibition des TGF- β - und BMP-Signalweges nicht nur wie auch bei pASCs die einschränkende Wirkung der BMP-Signalwegsinhibition auszubleiben, sondern insgesamt sogar eine Verbesserung der Osteogenese zu resultieren. Die BMP-2-Expression wird bei der Frakturheilung im murinen System sehr früh induziert, die TGF- β -Expression steigt hingegen erst nach einigen Tagen (Cho et al. 2002), was nahelegt, dass eine kontinuierliche Zugabe dieser Wachstumsfaktoren nicht die Osteogenese optimal unterstützt (Luong et al. 2012). Demnach könnte durch eine sequentielle Signalwegsinhibition die Evaluation der Bedeutung der untersuchten Signalwege für die osteogene Differenzierung der MSCs weiter präzisiert werden. Wurde bei pASCs zeitgleich der TGF- β - und FGF-Signalweg gehemmt, konnte mit BMP-2 die osteogene Differenzierung leicht verbessert werden. Ohne das für pASCs essentielle BMP-2 konnte auch durch diese kombinierte Signalwegsinhibition in pASCs keine ausreichend osteoinduktive Wirkung erzielt werden (Abb. 15 B). Bei pBMSCs bewirkte die osteogene Differenzierung ohne BMP-2 mit zeitgleicher Inhibition des TGF- β - und FGF-Signalweges keine Beeinflussung der zeitlichen und quantitativen

Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix. Wurde jedoch BMP-2 dem osteogenen Differenzierungsmedium zugegeben, so gelang durch Inhibition des TGF- β - und FGF-Signalweges eine hochsignifikante Verbesserung der Osteogenese (Abb. 16 B). Wo bei pASCs unter diesen Bedingungen keine Veränderung erzielt wurde, zeigten pBMSCs eine deutlich gesteigerte osteogene Differenzierung. Sowohl TGF- β als auch FGF-2 bewirken eine Proliferation von Osteoblasten, reduzieren jedoch *in vitro* die Expression der Alkalischen Phosphatase und somit die Mineralisierung (Bosetti et al. 2007). Dies erklärt die verbesserte Osteogenese der pBMSCs unter kombinierter Inhibition des TGF- β - und FGF-Signalweges. Sasaki et al. konnten zeigen, dass der TGF- β -Signalweg letztlich auf den FGF-Signalweg wirkt und diesem vorgeschaltet ist (Sasaki et al. 2006). Andererseits wurde 2006 gezeigt, dass TGF- β und FGF-2 *in vitro* die osteoinduktive Wirkung von BMP-2 durch vermehrte Expression von ALK6 und eine dadurch vermittelt erhöhte Phosphorylierung von Smad1, 5 und 8 verstärken (Singhatanadgit et al. 2006).

Zur Vervollständigung der Übersicht wurden die pMSCs auch unter Inhibition des BMP- und FGF-Signalweges bis zu 28 Tage osteogen differenziert. Die kombinierte Zugabe von FGF-2 und BMP-2 bewirkt im murinen System eine stärkere osteogene Differenzierung als die Zugabe einer dieser Wachstumsfaktoren alleine (Hanada et al. 1997). Im Gegensatz dazu bewirkte eine kombinierte Zugabe im caninen System *in vivo* eine verminderte osteogene Differenzierung, ebenso jedoch auch eine alleinige Zugabe von BMP-2 (Vonau et al. 2001). Unter BMP-2 bewirkte die Inhibition des BMP- und FGF-Signalweges keine Veränderung der bei pASCs im Vergleich zu pBMSCs gering ausfallenden Osteogenese (Abb. 15 C). Beachtlich ist, dass auch hier bei pASCs im Vergleich zu ohne Signalwegsinhibition keine veränderte osteogene Differenzierung festgestellt werden konnte. Die Inhibition des BMP-induzierten Signalweges, die sonst die Osteogenese in pASCs vollständig verhinderte, hat unter zeitgleicher Inhibition des FGF-Signalweges scheinbar keinen Einfluss auf die osteogene Differenzierung. Bei pBMSCs konnte ohne BMP-2 kein wesentlicher Unterschied in der Osteogenese festgestellt werden. Bei Einsatz von BMP-2 und Inhibition der BMP- und FGF-Signalwege konnte eine tendenzielle Verbesserung der Osteogenese beobachtet werden. Insbesondere an Tag 21 war die Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix unter Einsatz der Inhibitor Kombination deutlich gesteigert, fiel aber bis Tag 28 auf eine nur noch tendenziell geringfügig verbesserte Osteogenese (Abb. 16 C). Abschließend lässt

sich aber auch hier herausstellen, dass die kombinierte Inhibition des BMP- und FGF-Signalweges nicht wie unter alleiniger Inhibition des BMP-Signalweges zu einer deutlichen Einschränkung der Osteogenese führt. Luong et al. konnten zeigen, dass im murinen System eine sequentielle Zugabe mit zunächst FGF-2, gefolgt von BMP-2 zu einer bestmöglichen osteogenen Differenzierung mit diesen Wachstumsfaktoren führt (Luong et al. 2012). Die kombinierte Zugabe osteoinduktiver Wachstumsfaktoren bewirkt nicht unbedingt eine verstärkte Osteogenese durch die induzierten Signalwege (Ripamonti et al. 2001). Stattdessen muss bedacht werden, dass eine sequentielle Zugabe distinkter osteoinduktiver Wachstumsfaktoren eine stärkere osteogene Differenzierung bewirken kann als die kombinierte Zugabe zu einem Zeitpunkt (Raiche und Puleo 2004). Die sequentielle Signalwegsinhibition wäre hier ein interessanter Ansatz, die Bedeutung der Signalwege für die osteogene Differenzierung im zeitlichen Verlauf zu evaluieren. Im Verlauf der osteogenen Differenzierung können Regulationsmechanismen der untersuchten Signalwege für die Osteogenese entscheidend sein, die durch eine kontinuierliche Signalwegsinhibition nicht erfasst werden können.

4.4 Schlussfolgerungen

4.4.1 Auswirkungen der BMP-2-Supplementation

Im Vergleich konnte, wie von Bayraktar et al. demonstriert wurde, bestätigt werden, dass für pASCs BMP-2 für eine osteogene Differenzierung essentiell ist, wohingegen pBMSCs auch mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne BMP-2 osteogen differenzierten (Bayraktar et al. 2018). Jedoch wurde auch bei pBMSCs durch den BMP-2-Zusatz die Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix verstärkt und somit die Osteogenese verbessert. Insbesondere das im Rahmen dieser Arbeit verwendete BMP-2 ist im Stande, die osteogene Differenzierung *in vitro* zu verbessern (Cheng et al. 2003; Luu et al. 2007). pASCs sind für eine osteogene Differenzierung sogar essentiell auf BMP-2 angewiesen (Bayraktar et al. 2018). Im Vergleich differenzierten pBMSCs im Gegensatz zu pASCs besser osteogen und zeigten einerseits ohne BMP-2 und andererseits auch quantitativ stets eine stärkere Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix als Maß für die stattgefundenene Osteogenese.

4.4.2 Auswirkungen der Inhibition des TGF- β -, BMP- und FGF-Signalweges

Die Inhibition des TGF- β -Signalweges fördert tendenziell die Osteogenese porciner MSCs, insbesondere der pBMSCs (Abb. 13 A). Die Hemmung des BMP-Signalweges unterbindet das Differenzierungspotential in pASCs und reduziert es in pBMSCs deutlich. In pASCs wurde die durch BMP-2 erst ermöglichte Osteogenese durch Inhibition des BMP-Signalweges vollständig unterbunden und in pBMSCs deutlich eingeschränkt (Abb. 11 B, Abb. 13 B). Durch Inhibition des FGF-Signalweges wird das osteogene Differenzierungspotential der pMSCs nicht reduziert, sondern scheint sogar in pBMSCs dieses tendenziell zu verbessern (Abb. 13 C). Bei kombinierter Inhibition einerseits des BMP- und andererseits sowohl des TGF- β - als auch des FGF-Signalweges lässt sich die deutliche Einschränkung der durch die BMP-Signalweg-Inhibition vermittelten Osteogenese aufheben.. Inhibiert man neben dem BMP-Signalweg zeitgleich auch den TGF- β - oder FGF-Signalweg, fällt die deutlich hemmende Wirkung auf die Osteogenese durch die BMP-Signalwegs-inhibition weg (Abb. 15 A/C, Abb. 16 A/C). Allerdings konnte in pASCs auch durch keine Inhibitorkombination eine ausreichende osteoinduktive Wirkung erzielt werden, sofern kein BMP-2 supplementiert wurde (Abb. 15 A – C). Durch zeitgleiche Inhibition des TGF- β - und FGF-Signalweges lässt sich unter BMP-2 die Osteogenese von pBMSCs deutlich verbessern (Abb. 16 B). Auf diese Weise behandelte Zellen erzielten die größtmögliche Calciumdeposition in die extrazelluläre Matrix im Sinne einer erfolgreichen osteogenen Differenzierung.

4.5 Kritische Betrachtung

Um für die In-vivo-Anwendung verlässliche Aussagen über das osteogene Differenzierungspotential der MSCs treffen zu können, ist eine Erhöhung der Fallzahl zu empfehlen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fallzahlen lassen einen orientierenden Überblick über die Osteogenese der porcinen MSCs verschiedenen histologischen Ursprungs zu und geben Hinweise, dass porcine BMSCs besser als ASCs osteogen differenzieren. Die Untersuchung der TGF- β - und FGF-Signalwege erlaubt erste Aussagen über deren Bedeutung für die Osteogenese. Um eine klinisch sichere und wirksame Applikation gewährleisten zu können, ist eine weitere detaillierte Untersuchung dieser Signalwege und deren Interaktion unverzichtbar. Ebenso scheinen

Regulationsmechanismen der Signalwege im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung von Bedeutung zu sein. Porcine ASCs und BMSCs wurden während der osteogenen Differenzierung mit den Inhibitoren SB431542, Dorsomorphin und BGI398 behandelt, die unterschiedliche TGF- β - und FGF-Rezeptoren inhibieren. Die Inhibition aller drei Signalwege hatte einen Einfluss auf die Osteogenese, so dass angenommen werden kann, dass jeder Signalweg für die osteogene Differenzierung von Bedeutung ist. Durch eine vertiefende Untersuchung dieser Signalwege, z. B. durch Western-Blot-Analyse entscheidender Mediatoren oder durch Knock-Out-Versuche entsprechender Gene, wären weitere Aussagen über die Interaktion der Signalwege und deren Interaktion für die Osteogenese möglich. Auch Versuche mit Überexpression Osteogenese relevanter Gene können das Wissen über die molekularen Mechanismen der osteogenen Differenzierung erweitern und wären so einer klinischen Applikation des *Bone Tissue Engineering* dienlich. Ein weiteres Problem stellte die nicht vermeidbare Ablösung konfluent gewachsener und über bis zu 28 Tage differenzierter pMSCs auf den Zellkulturschalen dar. Eine Modifikation oder Lösung hierfür würde einen Verlust von Untersuchungsmaterial während der Versuchsdurchführung reduzieren und somit die Anzahl der Versuchsdurchführungen und letztlich die Aussagekraft und Reliabilität der gewonnenen Daten erhöhen. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass das Schwein sich als Modellorganismus, insbesondere zur Untersuchung der Frakturheilung, besonders eignet. Morphologie und Regenerationsverhalten ähneln dem humanen System (Aerssens et al. 1998). Dennoch bleibt zu bedenken, dass bis zu einer sicheren klinischen Applikation der MSC-basierten Therapie am Menschen trotz der zahlreichen Analogien auch mögliche Unterschiede des Modellorganismus Schwein zum Menschen aufgeklärt werden müssen und die Erkenntnisse des porcinen nicht vollständig auf das humane System übertragen werden können. Denn im Gegensatz zu porcinen ASCs scheinen humane ASCs besser als humane BMSCs zu differenzieren (Fraser et al. 2006). Um eine MSC-basierte Therapie am Menschen optimal nutzen zu können, sollten möglichst viele Faktoren aufgeklärt sein, die das osteogene Differenzierungspotential beeinflussen, wie z. B. histologischer Ursprung, Alter des Spenders und die Nutzung von Wachstumsfaktoren (Volk et al. 2012; Kuhn et al. 2013; Hempel et al. 2016).

4.6 Ausblick

Bone Tissue Engineering ist ein intensiv erforschter therapeutischer Ansatz, bei dem fehlender oder defekter Knochen durch *in vitro* differenzierte Zellen oder hergestelltes Gewebe, zum Beispiel auf Grundlage kultivierter und osteogen differenzierter MSCs, regeneriert werden soll. Für eine therapeutisch wirksame klinische Applikation ist die interdisziplinäre Aufklärung und Optimierung zahlreicher Aspekte von übergeordneter Relevanz: (1) eine für den Patienten möglichst schonende Gewinnung geeigneter Zellen, wie beispielsweise MSCs verschiedener histologischer Herkunft, (2) die *In-vitro*-Proliferation und bestmögliches Osteogenesepotential der isolierten und kultivierten Zellen, (3) eine optimale Interaktion zwischen diesen Zellen und einer geeigneten biokompatiblen *Scaffold*, (4) die Implantation und eine optimale Integration dieses *Scaffolds* mit den osteogen differenzierten Zellen in den Knochendefekt und (5) eine regenerationsfördernde Interaktion der implantierten *in vitro* differenzierten Zellen mit den ortsständigen Zellen (Abb. 1, Abb. 2) (Khan et al. 2012). Der Einsatz autologer Zellen ist in der regenerativen Medizin von großer Bedeutung und die dafür geeigneten MSCs können mittlerweile aus verschiedenen Geweben isoliert werden (Gupta und Chang 2010). BMSCs stellen dabei den Goldstandard unter den erforschten MSCs dar und sind die am längsten erforschten MSCs (Friedenstein et al. 1976). Aber insbesondere ASCs scheinen aufgrund geringerer Entnahmemorbidität und größerem Patientenkomfort eine vielversprechende Alternative zu sein (Bredeson et al. 2004). Da sich MSCs gut expandieren lassen, würden auch größere Knochendefekte gut therapiert werden können (Caplan und Bruder 2001). Die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Differenzierungspotential porciner ASCs und BMSCs und dessen Optimierung durch Supplementation von BMP-2 und durch Inhibition spezifischer Signalwege sind von hoher Relevanz für eine bevorstehende autologe Transplantation osteogen differenzierter MSCs im Schweinmodell und ermöglichen so wichtige Erkenntnisse über das Regenerationspotential der MSCs *in vivo*. Die generierten Daten und daraus gezogenen Schlussfolgerungen ermöglichen einen validen Vergleich des Osteogenesepotentials verschiedener pMSCs und lassen so auch zukünftige Vergleiche zum humanen System zu, was für die *In-vivo*-Untersuchung des Regenerationspotentials und die mögliche Übertragbarkeit auf das humane System von fundamentaler Bedeutung ist. Durch diese Arbeit konnte demonstriert werden, dass einerseits die Berücksichtigung der Gewebeherkunft und andererseits die Optimierung

der In-vitro-Osteogenese durch BMP-2 und die unterschiedliche Bedeutung der Signalwege für ASCs und BMSCs für eine sichere und effektive Applikation dieses therapeutischen Ansatzes von übergeordneter Relevanz ist.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aerssens, J.; Boonen, S.; Lowet, G.; Dequeker, J. (1998): Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. In: *Endocrinology* 139 (2), S. 663–670. DOI: 10.1210/endo.139.2.5751.
- Ahdjoudj, S.; Lasmoules, F.; Oyajobi, B. O.; Lomri, A.; Delannoy, P.; Marie, P. J. (2001): Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. In: *Journal of cellular biochemistry* 81 (1), S. 23–38.
- Alliston, T.; Choy, L.; Ducey, P.; Karsenty, G.; Derynck, R. (2001): TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. In: *The EMBO journal* 20 (9), S. 2254–2272. DOI: 10.1093/emboj/20.9.2254.
- Arealis, Georgios; Nikolaou, Vasileios S. (2015): Bone printing: new frontiers in the treatment of bone defects. In: *Injury* 46 Suppl 8, S20-2. DOI: 10.1016/S0020-1383(15)30050-4.
- Atari, Maher; Gil-Recio, Carlos; Fabregat, Marc; García-Fernández, Dani; Barajas, Miguel; Carrasco, Miguel A. et al. (2012): Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 14), S. 3343–3356. DOI: 10.1242/jcs.096537.
- Baksh, Dolores; Yao, Raphael; Tuan, Rocky S. (2007): Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (6), S. 1384–1392. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0709.
- Barba, Marta; Cicione, Claudia; Bernardini, Camilla; Michetti, Fabrizio; Lattanzi, Wanda (2013): Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art. In: *BioMed research international* 2013, S. 416391. DOI: 10.1155/2013/416391.
- Bayraktar, Samet; Jungbluth, Pascal; Deenen, René; Grassmann, Jan; Schnependahl, Johannes; Eschbach, Daphne et al. (2018): Molecular- and microarray-based analysis of diversity among resting and osteogenically induced porcine mesenchymal stromal cells of several tissue origin. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 12 (1), S. 114–128. DOI: 10.1002/term.2375.
- Beck, L.; D'Amore, P. A. (1997): Vascular development: cellular and molecular regulation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (5), S. 365–373.

- Bellows, C. G.; Aubin, J. E.; Heersche, J. N. (1987): Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. In: *Endocrinology* 121 (6), S. 1985–1992. DOI: 10.1210/endo-121-6-1985.
- Beloti, Márcio Mateus; Rosa, Adalberto Luiz (2005): Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. In: *Braz. Dent. J.* 16 (2), S. 156–161. DOI: 10.1590/S0103-64402005000200013.
- Bennett, J. H.; Joyner, C. J.; Triffitt, J. T.; Owen, M. E. (1991): Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. In: *Journal of cell science* 99 (Pt 1), S. 131–139.
- Blake, Robert A.; Broome, Martin A.; Liu, Xiangdong; Wu, Jianming; Gishizky, Mikhail; Sun, Li; Courtneidge, Sara A. (2000): SU6656, a Selective Src Family Kinase Inhibitor, Used To Probe Growth Factor Signaling. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (23), S. 9018–9027.
- Blum, Barak; Benvenisty, Nissim (2008): The tumorigenicity of human embryonic stem cells. In: *Advances in cancer research* 100, S. 133–158. DOI: 10.1016/S0065-230X(08)00005-5.
- Bosetti, Michela; Boccafoschi, Francesca; Leigheb, Massimiliano; Cannas, Mario F. (2007): Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering. In: *Biomolecular engineering* 24 (6), S. 613–618. DOI: 10.1016/j.bioeng.2007.08.019.
- Bougioukli, Sofia; Sugiyama, Osamu; Pannell, William; Ortega, Brandon; Tan, Matthew H.; Tang, Amy H. et al. (2018): Gene Therapy for Bone Repair Using Human Cells: Superior Osteogenic Potential of Bone Morphogenetic Protein 2-Transduced Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue Compared to Bone Marrow. In: *Human gene therapy* 29 (4), S. 507–519. DOI: 10.1089/hum.2017.097.
- Bourin, Philippe; Bunnell, Bruce A.; Casteilla, Louis; Dominici, Massimo; Katz, Adam J.; March, Keith L. et al. (2013): Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). In: *Cytotherapy* 15 (6), S. 641–648. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006.
- Bray, George A. (2004): Medical consequences of obesity. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (6), S. 2583–2589. DOI: 10.1210/jc.2004-0535.
- Bredeson, Christopher; Leger, Chantal; Couban, Stephen; Simpson, David; Huebsch, Lothar; Walker, Irwin et al. (2004): An evaluation of the donor experience in the canadian multicenter randomized trial of bone marrow versus peripheral blood allografting. In: *Biology of blood and*

marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 10 (6), S. 405–414. DOI: 10.1016/j.bbmt.2004.02.003.

Bubnoff, A. von; Cho, K. W. (2001): Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? In: *Developmental biology* 239 (1), S. 1–14. DOI: 10.1006/dbio.2001.0388.

Buddecke, Eckhart (2002): Molekulare Medizin. Eine systematische Einführung. Landsberg/Lech: ecomed.

Canalis, E.; Centrella, M.; McCarthy, T. (1988): Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. In: *The Journal of clinical investigation* 81 (5), S. 1572–1577. DOI: 10.1172/JCII13490.

Canalis, Ernesto; Economides, Aris N.; Gaggero, Elisabetta (2003): Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. In: *Endocrine reviews* 24 (2), S. 218–235. DOI: 10.1210/er.2002-0023.

Caplan, A. I. (1991): Mesenchymal stem cells. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9 (5), S. 641–650. DOI: 10.1002/jor.1100090504.

Caplan, A. I.; Bruder, S. P. (2001): Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. In: *Trends in molecular medicine* 7 (6), S. 259–264.

Chen; Zhao, Ming; Mundy, Gregory R. (2004): Bone morphogenetic proteins. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22 (4), S. 233–241. DOI: 10.1080/08977190412331279890.

Chen, Hui-Ting; Lee, Mon-Juan; Chen, Chung-Hwan; Chuang, Shu-Chun; Chang, Li-Fu; Ho, Mei-Ling et al. (2012): Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 16 (3), S. 582–593. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01335.x.

Cheng, Hongwei; Jiang, Wei; Phillips, Frank M.; Haydon, Rex C.; Peng, Ying; Zhou, Lan et al. (2003): Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A (8), S. 1544–1552.

Cheng, S. L.; Yang, J. W.; Rifas, L.; Zhang, S. F.; Avioli, L. V. (1994): Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. In: *Endocrinology* 134 (1), S. 277–286. DOI: 10.1210/endo.134.1.8275945.

Cheng, Su-Li; Zhang, Shu-Fang; Avioli, Louis V. (1996): Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. In: *J. Cell.*

Biochem. 61 (2), S. 182–193. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(19960501)61:2<182::AID-JCB3>3.0.CO;2-Q.

Chiou, Michael; Xu, Yue; Longaker, Michael T. (2006): Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 343 (2), S. 644–652. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.02.171.

Cho, Tae-Joon; Gerstenfeld, Louis C.; Einhorn, Thomas A. (2002): Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17 (3), S. 513–520. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.3.513.

Choi, Yong-Soo; Noh, Sang-Eun; Lim, Sang-Min; Lee, Chang-Woo; Kim, Chul-Soo; Im, Moon-Whan et al. (2008): Multipotency and growth characteristic of periosteum-derived progenitor cells for chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. In: *Biotechnology letters* 30 (4), S. 593–601. DOI: 10.1007/s10529-007-9584-2.

Da Violante, Georges; Zerrouk, Naima; Richard, Isabelle; Provot, Gérard; Chaumeil, Jean Claude; Arnaud, Philippe (2002): Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 25 (12), S. 1600–1603.

Derynck, Rik; Akhurst, Rosemary J. (2007): Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. In: *Nature cell biology* 9 (9), S. 1000–1004. DOI: 10.1038/ncb434.

Deschaseaux, Frédéric; Sensébé, Luc; Heymann, Dominique (2009): Mechanisms of bone repair and regeneration. In: *Trends in molecular medicine* 15 (9), S. 417–429. DOI: 10.1016/j.molmed.2009.07.002.

Dimarino, Amy M.; Caplan, Arnold I.; Bonfield, Tracey L. (2013): Mesenchymal stem cells in tissue repair. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 201. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00201.

Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.

Dominici, Massimo; Paolucci, Paolo; Conte, Pierfranco; Horwitz, Edwin M. (2009): Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. In: *Transplantation* 87 (9 Suppl), S36-42. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181a283ee.

Ducy, P.; Schinke, T.; Karsenty, G. (2000): The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5484), S. 1501–1504.

- Erices, A.; Conget, P.; Minguell, J. J. (2000): Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. In: *British journal of haematology* 109 (1), S. 235–242.
- Fakhry, Ali; Ratisoontorn, Chootima; Vedhachalam, Charulatha; Salhab, Imad; Koyama, Eiki; Leboy, Phoeby et al. (2005): Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. In: *Bone* 36 (2), S. 254–266. DOI: 10.1016/j.bone.2004.10.003.
- Fillingham, Y.; Jacobs, J. (2016): Bone grafts and their substitutes. In: *The bone & joint journal* 98-B (1 Suppl A), S. 6–9. DOI: 10.1302/0301-620X.98B.36350.
- Franceschi, R. T.; Young, J. (1990): Regulation of alkaline phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and ascorbic acid in bone-derived cells. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 5 (11), S. 1157–1167. DOI: 10.1002/jbmr.5650051111.
- Fraser, John K.; Wulur, Isabella; Alfonso, Zeni; Hedrick, Marc H. (2006): Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. In: *Trends in biotechnology* 24 (4), S. 150–154. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.01.010.
- Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F.; Kulagina, N. N. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. In: *Experimental hematology* 4 (5), S. 267–274.
- Friedenstein, A. J.; Piatetzky-Shapiro, I. I.; Petrakova, K. V. (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. In: *Journal of embryology and experimental morphology* 16 (3), S. 381–390.
- Fujimura, Kazuma; Bessho, Kazuhisa; Okubo, Yasunori; Kusumoto, Kenji; Segami, Natsuki; Iizuka, Tadahiko (2002): The effect of fibroblast growth factor-2 on the osteoinductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat muscle. In: *Archives of Oral Biology* 47 (8), S. 577–584. DOI: 10.1016/S0003-9969(02)00046-8.
- Gilbert, Scott F.; Singer, Susan R.; Tyler, Mary S. (2006): *Developmental biology*. 8. ed., 2. print. Sunderland, Mass.: Sinauer.
- Gimble, Jeffrey M.; Katz, Adam J.; Bunnell, Bruce A. (2007): Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. In: *Circulation research* 100 (9), S. 1249–1260. DOI: 10.1161/01.RES.0000265074.83288.09.
- Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P. G.; Shi, S. (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (25), S. 13625–13630. DOI: 10.1073/pnas.240309797.

- Gupta, Gaurav; Chang, James (2010): Tissue engineering for the hand. Research advances and clinical applications. Singapore, London: World Scientific. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=374849>.
- Haas, Rainer; Kronenwett, Ralf (2005): Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle. Grundlagen, Indikationen, therapeutischer Nutzen ; mit 2 Tabellen. Köln: Deutscher Ärzte-Verl.
- Hanada, K.; Dennis, J. E.; Caplan, A. I. (1997): Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12 (10), S. 1606–1614. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.10.1606.
- Hanley, Patrick J.; Mei, Zhuyong; da Graca Cabreira-Hansen, Maria; Klis, Mariola; Li, Wei; Zhao, Yali et al. (2013): Manufacturing mesenchymal stromal cells for phase I clinical trials. In: *Cytotherapy* 15 (4), S. 416–422. DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.09.007.
- Hempel, Ute; Müller, Katrin; Preissler, Carolin; Noack, Carolin; Boxberger, Sabine; Dieter, Peter et al. (2016): Human Bone Marrow Stromal Cells: A Reliable, Challenging Tool for In Vitro Osteogenesis and Bone Tissue Engineering Approaches. In: *Stem cells international* 2016, S. 7842191. DOI: 10.1155/2016/7842191.
- Ho, Diana M.; Whitman, Malcolm (2008): TGF- β signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. In: *Developmental biology* 315 (1), S. 203–216. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.12.031.
- Hong, Charles C.; Yu, Paul B. (2009): Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease. In: *Cytokine & growth factor reviews* 20 (5-6), S. 409–418. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.021.
- Horwitz, E. M.; Dominici, M. (2008): How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? In: *Cytotherapy* 10 (8), S. 771–774. DOI: 10.1080/14653240802618085.
- Horwitz, E. M.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C. et al. (2005): Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 7 (5), S. 393–395. DOI: 10.1080/14653240500319234.
- Hughes-Fulford, Millie; Li, Chai-Fei (2011): The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization. In: *Journal of orthopaedic surgery and research* 6, S. 8. DOI: 10.1186/1749-799X-6-8.

- Inman, Gareth J.; Nicolás, Francisco J.; Callahan, James F.; Harling, John D.; Gaster, Laramie M.; Reith, Alastair D. et al. (2002): SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. In: *Molecular pharmacology* 62 (1), S. 65–74.
- Iwashima, Shigejiro; Ozaki, Takenori; Maruyama, Shoichi; Saka, Yousuke; Kobori, Masato; Omae, Kaoru et al. (2009): Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. In: *Stem cells and development* 18 (4), S. 533–543. DOI: 10.1089/scd.2008.0358.
- Janssens, Katrien; Dijke, Peter ten; Janssens, Sophie; van Hul, Wim (2005): Transforming growth factor-beta1 to the bone. In: *Endocrine reviews* 26 (6), S. 743–774. DOI: 10.1210/er.2004-0001.
- Javed, Amjad; Afzal, Faiza; Bae, Jong-Sup; Gutierrez, Soraya; Zaidi, Kaleem; Pratap, Jitesh et al. (2009): Specific residues of RUNX2 are obligatory for formation of BMP2-induced RUNX2-SMAD complex to promote osteoblast differentiation. In: *Cells, tissues, organs* 189 (1-4), S. 133–137. DOI: 10.1159/000151719.
- Jungbluth, Pascal; Wild, Michael; Grassmann, Jan-Peter; Ar, Ebru; Sager, Martin; Herten, Monika et al. (2010): Platelet-rich plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28 (11), S. 1448–1455. DOI: 10.1002/jor.21152.
- Katz, Adam J.; Tholpady, Ashok; Tholpady, Sunil S.; Shang, Hulan; Ogle, Roy C. (2005): Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23 (3), S. 412–423. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0021.
- Keating, Armand (2012): Mesenchymal stromal cells: new directions. In: *Cell stem cell* 10 (6), S. 709–716. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.015.
- Khan, Wasim S.; Rayan, Faizal; Dhinsa, Baljinder S.; Marsh, David (2012): An osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic tissue-engineered product for trauma and orthopaedic surgery: how far are we? In: *Stem cells international* 2012, S. 236231. DOI: 10.1155/2012/236231.
- Knoblich, J. A. (2001): Asymmetric cell division during animal development. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (1), S. 11–20. DOI: 10.1038/35048085.
- Konecny, Gottfried E.; Kolarova, Teodora; O'Brien, Neil A.; Winterhoff, Boris; Yang, Guorong; Qi, Jingwei et al. (2013): Activity of the fibroblast growth factor receptor inhibitors

- dovitinib (TKI258) and NVP-BGJ398 in human endometrial cancer cells. In: *Molecular cancer therapeutics* 12 (5), S. 632–642. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0999.
- Kuhn, Liisa T.; Ou, Guomin; Charles, Lyndon; Hurley, Marja M.; Rodner, Craig M.; Gronowicz, Gloria (2013): Fibroblast growth factor-2 and bone morphogenetic protein-2 have a synergistic stimulatory effect on bone formation in cell cultures from elderly mouse and human bone. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 68 (10), S. 1170–1180. DOI: 10.1093/gerona/glt018.
- Kühn, Markus C.; Willenberg, Holger S.; Schott, Matthias; Papewalis, Claudia; Stumpf, Ulla; Flohé, Sascha et al. (2012): Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG/RANKL ratio to influence osteoclast formation. In: *Molecular and cellular endocrinology* 349 (2), S. 180–188. DOI: 10.1016/j.mce.2011.10.018.
- Kundrotas, Gabrielis (2012): Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. In: *Acta medica Lituanica* 19 (2). DOI: 10.6001/actamedica.v19i2.2313.
- Kuznetsov, S. A.; Krebsbach, P. H.; Satomura, K.; Kerr, J.; Riminucci, M.; Benayahu, D.; Robey, P. G. (1997): Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12 (9), S. 1335–1347. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.9.1335.
- Laping, N. J.; Grygielko, E.; Mathur, A.; Butter, S.; Bomberger, J.; Tweed, C. et al. (2002): Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. In: *Molecular pharmacology* 62 (1), S. 58–64.
- Lee, James A.; Parrett, Brian M.; Conejero, J. Alejandro; Laser, Jordan; Chen, John; Kogon, Amy J. et al. (2003): Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. In: *Annals of plastic surgery* 50 (6), S. 610–617. DOI: 10.1097/01.SAP.0000069069.23266.35.
- Lee, Kyeong-Sook; Hong, Seung-Hyun; Bae, Suk-Chul (2002): Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. In: *Oncogene* 21 (47), S. 7156–7163. DOI: 10.1038/sj.onc.1205937.
- Lee, P. L.; Johnson, D. E.; Cousens, L. S.; Fried, V. A.; Williams, L. T. (1989): Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. In: *Science (New York, N.Y.)* 245 (4913), S. 57–60.
- Liu, Li; Shi, Guo-Ping (2012): CD31: beyond a marker for endothelial cells. In: *Cardiovascular research* 94 (1), S. 3–5. DOI: 10.1093/cvr/cvs108.

- Lou, J.; Xu, F.; Merkel, K.; Manske, P. (1999): Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 17 (1), S. 43–50. DOI: 10.1002/jor.1100170108.
- Luong, Linh N.; Ramaswamy, Janani; Kohn, David H. (2012): Effects of osteogenic growth factors on bone marrow stromal cell differentiation in a mineral-based delivery system. In: *Biomaterials* 33 (1), S. 283–294. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.052.
- Luu, Hue H.; Song, Wen-Xin; Luo, Xiaoji; Manning, David; Luo, Jinyong; Deng, Zhong-Liang et al. (2007): Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25 (5), S. 665–677. DOI: 10.1002/jor.20359.
- Martin, I.; Muraglia, A.; Campanile, G.; Cancedda, R.; Quarto, R. (1997): Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. In: *Endocrinology* 138 (10), S. 4456–4462. DOI: 10.1210/endo.138.10.5425.
- Massagué, J. (1998): TGF-beta signal transduction. In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 753–791. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.
- Matsunobu, Tomoya; Torigoe, Kiyoyuki; Ishikawa, Masaki; Vega, Susana de; Kulkarni, Ashok B.; Iwamoto, Yukihide; Yamada, Yoshihiko (2009): Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. In: *Developmental biology* 332 (2), S. 325–338. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.06.002.
- Mauney, Joshua R.; Nguyen, Trang; Gillen, Kelly; Kirker-Head, Carl; Gimble, Jeffrey M.; Kaplan, David L. (2007): Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. In: *Biomaterials* 28 (35), S. 5280–5290. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.017.
- Mayahara, H.; Ito, T.; Nagai, H.; Miyajima, H.; Tsukuda, R.; Taketomi, S. et al. (1993): In vivo stimulation of endosteal bone formation by basic fibroblast growth factor in rats. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 9 (1), S. 73–80.
- Mitchell, James B.; McIntosh, Kevin; Zvonic, Sanjin; Garrett, Sara; Floyd, Z. Elizabeth; Kloster, Amy et al. (2006): Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (2), S. 376–385. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0234.

- Montero, A.; Okada, Y.; Tomita, M.; Ito, M.; Tsurukami, H.; Nakamura, T. et al. (2000): Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. In: *The Journal of clinical investigation* 105 (8), S. 1085–1093. DOI: 10.1172/JCI8641.
- Monti, Manuela; Redi, Carlo A. (2011): The biopolitics of frozen embryos. In: *The International journal of developmental biology* 55 (3), S. 243–247. DOI: 10.1387/ijdb.103281mm.
- Murad, S.; Grove, D.; Lindberg, K. A.; Reynolds, G.; Sivarajah, A.; Pinnell, S. R. (1981): Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (5), S. 2879–2882.
- Nakagami, Hironori; Morishita, Ryuichi; Maeda, Kazuhisa; Kikuchi, Yasushi; Ogihara, Toshio; Kaneda, Yasufumi (2006): Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. In: *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 13 (2), S. 77–81.
- Ng, Felicia; Boucher, Shayne; Koh, Susie; Sastry, Konduru S. R.; Chase, Lucas; Lakshmiopathy, Uma et al. (2008): PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. In: *Blood* 112 (2), S. 295–307. DOI: 10.1182/blood-2007-07-103697.
- Niemeyer, Philipp; Fechner, Katharina; Milz, Stefan; Richter, Wiltrud; Suedkamp, Norbert P.; Mehlhorn, Alexander T. et al. (2010): Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. In: *Biomaterials* 31 (13), S. 3572–3579. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.085.
- Noort, W. A.; Oerlemans, M. I. F. J.; Rozemuller, H.; Feyen, D.; Jaksani, S.; Stecher, D. et al. (2012): Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 16 (8), S. 1827–1839. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01455.x.
- Ock, Sun-A; Jeon, Byeong-Gyun; Rho, Gyu-Jin (2010): Comparative characterization of porcine mesenchymal stem cells derived from bone marrow extract and skin tissues. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 16 (6), S. 1481–1491. DOI: 10.1089/ten.TEC.2010.0149.
- Oshimori, Naoki; Fuchs, Elaine (2012): The Harmonies Played by TGF- β in Stem Cell Biology. In: *Cell stem cell* 11 (6), S. 751–764. DOI: 10.1016/j.stem.2012.11.001.
- Otsu, Keishi; Das, Shonit; Houser, Sandra D.; Quadri, Sadiqa K.; Bhattacharya, Sunita; Bhattacharya, Jahar (2009): Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by

- mesenchymal stem cells. In: *Blood* 113 (18), S. 4197–4205. DOI: 10.1182/blood-2008-09-176198.
- Park, J.; Lutz, R.; Felszeghy, E.; Wiltfang, J.; Nkenke, E.; Neukam, F. W.; Schlegel, K. A. (2007): The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. In: *Biomaterials* 28 (17), S. 2772–2782. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.009.
- Park, J.; Ries, J.; Gelse, K.; Kloss, F.; Mark, K. von der; Wiltfang, J. et al. (2003): Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. In: *Gene therapy* 10 (13), S. 1089–1098. DOI: 10.1038/sj.gt.3301960.
- Pearce, A. I.; Richards, R. G.; Milz, S.; Schneider, E.; Pearce, S. G. (2007): Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. In: *European cells & materials* 13, S. 1–10.
- Phimphilai, Mattabhorn; Zhao, Zhouan; Boules, Heidi; Roca, Hernan; Franceschi, Renny T. (2006): BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21 (4), S. 637–646. DOI: 10.1359/jbmr.060109.
- Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411), S. 143–147.
- Pourrajab, Fatemeh; Forouzannia, Seyed Khalil; Tabatabaee, Seyed Ahmad (2013): Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. In: *International journal of cardiology* 163 (2), S. 125–131. DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.11.017.
- Qi, Huilin; Aguiar, Dean J.; Williams, Shelly M.; La Pean, Alison; Pan, Wei; Verfaillie, Catherine M. (2003): Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (6), S. 3305–3310. DOI: 10.1073/pnas.0532693100.
- Qu, Chang-qing; Zhang, Guo-hua; Zhang, Li-jie; Yang, Gong-she (2007): Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. In: *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 43 (2), S. 95–100. DOI: 10.1007/s11626-006-9008-y.
- Quarto, R.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Kutepov, S. M.; Mukhachev, V.; Lavroukov, A. et al. (2001): Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. In: *The New England journal of medicine* 344 (5), S. 385–386. DOI: 10.1056/NEJM200102013440516.

- Rahman, Md Shaifur; Akhtar, Naznin; Jamil, Hossen Mohammad; Banik, Rajat Suvra; Asaduzzaman, Sikder M. (2015): TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. In: *Bone research* 3, S. 15005. DOI: 10.1038/boneres.2015.5.
- Raiche, A. T.; Puleo, D. A. (2004): In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. In: *Biomaterials* 25 (4), S. 677–685.
- Rawadi, Georges; Vayssière, Béatrice; Dunn, Fred; Baron, Roland; Roman-Roman, Sergio (2003): BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18 (10), S. 1842–1853. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.10.1842.
- Rice, D. P.; Aberg, T.; Chan, Y.; Tang, Z.; Kettunen, P. J.; Pakarinen, L. et al. (2000): Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. In: *Development (Cambridge, England)* 127 (9), S. 1845–1855.
- Ripamonti, U.; Crooks, J.; Petit, J. C.; Rueger, D. C. (2001): Periodontal tissue regeneration by combined applications of recombinant human osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-2. A pilot study in Chacma baboons (*Papio ursinus*). In: *European journal of oral sciences* 109 (4), S. 241–248.
- Rodan, S. B.; Wesolowski, G.; Yoon, K.; Rodan, G. A. (1989): Opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and type I collagen mRNA levels in ROS 17/2.8 cells. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (33), S. 19934–19941.
- Sasaki, Tomoyo; Ito, Yoshihiro; Bringas, Pablo; Chou, Stanley; Urata, Mark M.; Slavkin, Harold; Chai, Yang (2006): TGF β -mediated FGF signaling is crucial for regulating cranial neural crest cell proliferation during frontal bone development. In: *Development (Cambridge, England)* 133 (2), S. 371–381. DOI: 10.1242/dev.02200.
- Schmitz, J. P.; Hollinger, J. O. (1986): The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. In: *Clinical orthopaedics and related research* (205), S. 299–308.
- Seong, Jeong Min; Kim, Byung-Chul; Park, Jae-Hong; Kwon, Il Keun; Mantalaris, Anathathios; Hwang, Yu-Shik (2010): Stem cells in bone tissue engineering. In: *Biomedical materials (Bristol, England)* 5 (6), S. 62001. DOI: 10.1088/1748-6041/5/6/062001.

- Shi, Yun-Ying; Nacamuli, Randall P.; Salim, Ali; Longaker, Michael T. (2005): The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. In: *Plastic and reconstructive surgery* 116 (6), S. 1686–1696.
- Shih, Chu-Chih; Forman, Stephen J.; Chu, Peiguo; Slovak, Marilyn (2007): Human embryonic stem cells are prone to generate primitive, undifferentiated tumors in engrafted human fetal tissues in severe combined immunodeficient mice. In: *Stem cells and development* 16 (6), S. 893–902. DOI: 10.1089/scd.2007.0070.
- Shui, Chaoxiang; Spelsberg, Thomas C.; Riggs, B. Lawrence; Khosla, Sundeep (2003): Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18 (2), S. 213–221. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.2.213.
- Siggelkow, H.; Schmidt, E.; Hennies, B.; Hüfner, M. (2004): Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal differentiation in human osteoblasts. In: *Bone* 35 (2), S. 570–576. DOI: 10.1016/j.bone.2004.03.033.
- Singhatanadgit, Weerachai; Salih, Vehid; Olsen, Irwin (2006): Up-regulation of bone morphogenetic protein receptor IB by growth factors enhances BMP-2-induced human bone cell functions. In: *Journal of cellular physiology* 209 (3), S. 912–922. DOI: 10.1002/jcp.20799.
- Sittinger, M.; Bujia, J.; Rotter, N.; Reitzel, D.; Minuth, W. W.; Burmester, G. R. (1996): Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. In: *Biomaterials* 17 (3), S. 237–242.
- Sobue, T.; Gravelly, T.; Hand, A.; Min, Y. K.; Pilbeam, C.; Raisz, L. G. et al. (2002): Regulation of fibroblast growth factor 2 and fibroblast growth factor receptors by transforming growth factor beta in human osteoblastic MG-63 cells. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17 (3), S. 502–512. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.3.502.
- Song, Lin; Tuan, Rocky S. (2004): Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (9), S. 980–982. DOI: 10.1096/fj.03-1100fje.
- Song, Lin; Webb, Nicole E.; Song, Yingjie; Tuan, Rocky S. (2006): Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (7), S. 1707–1718. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0604.

- Stanford, C. M.; Jacobson, P. A.; Eanes, E. D.; Lembke, L. A.; Midura, R. J. (1995): Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). In: *The Journal of biological chemistry* 270 (16), S. 9420–9428.
- Stockmann, Philipp; Park, Jung; Wilmowsky, Cornelius von; Nkenke, Emeka; Felszeghy, Endre; Dehner, Jan-Friedrich et al. (2012): Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells - a comparison of different tissue sources. In: *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 40 (4), S. 310–320. DOI: 10.1016/j.jcms.2011.05.004.
- Sun, Bo; Roh, Kyoung-Hwan; Park, Jeong-Ran; Lee, Sae-Rom; Park, Sang-Bum; Jung, Ji-Won et al. (2009): Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model. In: *Cytotherapy* 11 (3), 289-98, 1 p following 298. DOI: 10.1080/14653240902807026.
- Tachi, Keita; Takami, Masamichi; Sato, Hana; Mochizuki, Ayako; Zhao, Baohong; Miyamoto, Yoichi et al. (2011): Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- β 1. In: *Tissue engineering. Part A* 17 (5-6), S. 597–606. DOI: 10.1089/ten.TEA.2010.0094.
- Tada, Hiroyuki; Nemoto, Eiji; Foster, Brian L.; Somerman, Martha J.; Shimauchi, Hidetoshi (2011): Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. In: *Bone* 48 (6), S. 1409–1416. DOI: 10.1016/j.bone.2011.03.675.
- Takamizawa, Shinji; Maehata, Yojiro; Imai, Katsuyuki; Senoo, Haruki; Sato, Sadao; Hata, Ryu-Ichiro (2004): Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. In: *Cell biology international* 28 (4), S. 255–265. DOI: 10.1016/j.cellbi.2004.01.010.
- Tan, Li; Wang, Jun; Tanizaki, Junko; Huang, Zhifeng; Aref, Amir R.; Rusan, Maria et al. (2014): Development of covalent inhibitors that can overcome resistance to first-generation FGFR kinase inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (45), E4869-77. DOI: 10.1073/pnas.1403438111.
- Tan, Xiaohong; Weng, Tujun; Zhang, Jishuai; Wang, Jian; Li, Wenlong; Wan, Haifeng et al. (2007): Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis. In: *Journal of cell science* 120 (Pt 13), S. 2162–2170. DOI: 10.1242/jcs.03466.

- Tang, Yi; Wu, Xiangwei; Lei, Weiqi; Pang, Lijuan; Wan, Chao; Shi, Zhenqi et al. (2009): TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. In: *Nature medicine* 15 (7), S. 757–765. DOI: 10.1038/nm.1979.
- Tenenbaum, H. C.; Limeback, H.; McCulloch, C.A.G.; Mamujee, H.; Sukhu, B.; Torontali, M. (1992): Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by β -glycerophosphate in chick periosteal cultures. In: *Bone* 13 (2), S. 129–138. DOI: 10.1016/8756-3282(92)90002-E.
- Tissue engineering (2000). In: *Nature Biotechnology* 18, IT56 EP -. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/80103>.
- Tsutsumi, S.; Shimazu, A.; Miyazaki, K.; Pan, H.; Koike, C.; Yoshida, E. et al. (2001): Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. In: *Biochemical and biophysical research communications* 288 (2), S. 413–419. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5777.
- Vacanti, Victor; Kong, Elton; Suzuki, Gen; Sato, Kazuki; Canty, John M.; Lee, Techung (2005): Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. In: *Journal of cellular physiology* 205 (2), S. 194–201. DOI: 10.1002/jcp.20376.
- Vater, Corina; Kasten, Philip; Stiehler, Maik (2011): Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. In: *Acta biomaterialia* 7 (2), S. 463–477. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.07.037.
- Viereck, Volker; Siggelkow, Heide; Tauber, Simone; Raddatz, Dirk; Schutze, Norbert; Hüfner, Michael (2002): Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. In: *Journal of cellular biochemistry* 86 (2), S. 348–356. DOI: 10.1002/jcb.10220.
- Volk, Susan W.; Wang, Yanjian; Hankenson, Kurt D. (2012): Effects of Donor Characteristics and Ex Vivo Expansion on Canine Mesenchymal Stem Cell Properties: Implications for MSC-Based Therapies. In: *Cell transplantation* 21 (10). DOI: 10.3727/096368912X636821.
- Vonau, R. L.; Bostrom, M. P.; Aspenberg, P.; Sams, A. E. (2001): Combination of growth factors inhibits bone ingrowth in the bone harvest chamber. In: *Clinical orthopaedics and related research* (386), S. 243–251.
- Wan, Mei; Li, Changjun; Zhen, Gehua; Jiao, Kai; He, Wenying; Jia, Xiaofeng et al. (2012): Injury-activated transforming growth factor β controls mobilization of mesenchymal stem cells for tissue remodeling. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 30 (11), S. 2498–2511. DOI: 10.1002/stem.1208.

- Wang, Nan; Li, Qinggang; Zhang, Li; Lin, Hongli; Hu, Jie; Li, Diangeng et al. (2012): Mesenchymal stem cells attenuate peritoneal injury through secretion of TSG-6. In: *PloS one* 7 (8), e43768. DOI: 10.1371/journal.pone.0043768.
- Werbowski-Ogilvie, Tamra E.; Bossé, Marc; Stewart, Morag; Schnerch, Angélique; Ramos-Mejia, Veronica; Rouleau, Anne et al. (2009): Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. In: *Nature Biotechnology* 27 (1), S. 91–97. DOI: 10.1038/nbt.1516.
- Wong, Rebecca S. Y. (2011): Mesenchymal stem cells: angels or demons? In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, S. 459510. DOI: 10.1155/2011/459510.
- Xiao, Guozhi; Gopalakrishnan, Rajaram; Di Jiang; Reith, Elizabeth; Benson, M. Douglas; Franceschi, Renny T. (2002): Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17 (1), S. 101–110. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.1.101.
- Yin, Li; Li, Yue-bai; Wang, Yi-sheng (2006): Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis. In: *Chinese medical journal* 119 (7), S. 581–588.
- Zellin, G.; Linde, A. (2000): Effects of recombinant human fibroblast growth factor-2 on osteogenic cell populations during orthopic osteogenesis in vivo. In: *Bone* 26 (2), S. 161–168. DOI: 10.1016/S8756-3282(99)00252-5.
- Zhang, Chi (2010): Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. In: *Journal of orthopaedic surgery and research* 5, S. 37. DOI: 10.1186/1749-799X-5-37.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J. et al. (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. In: *Tissue engineering* 7 (2), S. 211–228. DOI: 10.1089/107632701300062859.
- Zuk, Patricia A.; Zhu, Min; Ashjian, Peter; Ugarte, Daniel A. de; Huang, Jerry I.; Mizuno, Hiroshi et al. (2002): Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. In: *Molecular biology of the cell* 13 (12), S. 4279–4295. DOI: 10.1091/mbc.e02-02-0105.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Joachim Windolf für die Möglichkeit, diese Dissertation im Forschungslabor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Christoph V. Suschek danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, seine freundliche Hilfe und wertvollen Ratschläge.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Vera Grotheer für die zuverlässige, ausdauernde und kompetente Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und die Expertise und den Weitblick während der gesamten Laborphase.

Besonders danken möchte ich den Technischen Assistentinnen Samira Seghrouchni, Jutta Schneider und Christa Wilkens, die mit ihrer herzlichen Unterstützung unerlässlich für die Arbeit im Labor waren und mit ihrem Einsatz eine exzellente Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Von den vielen netten Kollegen und Mitstudenten im Labor, die die Phase dort unvergesslich und kurzweilig gemacht haben, hat jemand meine Zeit besonders beeinflusst: Vanessa. Für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht, die kontinuierliche Triebkraft und das unermüdliche Verständnis bin ich sehr dankbar.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Familie, die mich fortwährend unterstützt hat. Insbesondere meinen Eltern danke ich für ihren mich beeindruckenden, ermutigenden Glauben an mich und für die Orientierung in den Punkten, die am wichtigsten sind. Meinem Bruder danke ich für den fabelhaften, gemeinsamen, unersätzlchen sportlichen Ausgleich und die motivierenden Worte zu jeder Zeit.