

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

**In-vitro-Untersuchung der
Differenzierungsinhibition von porkinen
adipogenen multipotenten mesenchymalen
Stromazellen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Thomas Krakau
2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. C. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. C. Mahotka

Das Staunen ist eine Sehnsucht nach Wissen.

Thomas von Aquin (1225 - 1274)

Zusammenfassung

Im Rahmen der Behandlung von kritischen Knochendefekten liegt ein vielversprechender therapeutischer Ansatz in der Implantation autologer multipotenter mesenchymaler Stromazellen. Im Schweinmodell konnte gezeigt werden, dass die osteogene Differenzierung porkiner adipogener multipotenter Stromazellen (pASC) inhibiert ist und diese Inhibition unter Zusatz von *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) aufgehoben werden kann. In dieser Arbeit sollen die molekularbiologischen Ursachen dieser Inhibition der osteogenen Differenzierung von pASC weiter aufgeklärt werden. Insbesondere stellt sich die Frage, inwiefern eine Zugabe von BMP-2 die für die osteogene Differenzierung wichtigen Signalwege (TGF- β -, MAPK-, Wnt- und den FGF-Signalweg) modulieren kann. Für die Studie wurden multipotente mesenchymale Stromazellen aus dem Unterhautfettgewebe von verschiedenen porkinen Donoren isoliert (pASC) und anschließend mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Als osteogenes Differenzierungsmedium (OM) wurde DMEM (4,5 g Glucose/l) unter Zugabe von 10 % FBS, 1 % Penicillin/ Streptomycin, 100 nmol Dexamethason, 100 μ mol Ascorbin-2-Phosphat und 10 mM β -Glycerophosphat verwendet. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurde die osteogene Differenzierung unter fakultativer Zugabe von 450 ng / ml BMP-2 durch die Evaluation der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix mittels Alizarinrot-S-Färbung visualisiert und anschließend durch Rücklösung in Cetylpyridiniumchloridlösung quantifiziert. Weiterhin erfolgte mittels Western-Blot-Analyse die Untersuchung der Schlüsselproteine der für die osteogene Differenzierung wichtigen Signalkaskaden. Zudem wurde die Expression der charakteristischen Rezeptoren für den BMP-Signalweg (ALK2 und ALK6) und den TGF- β -Signalweg (ALK4, ALK5, ALK7) mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die osteogene Differenzierung von pASC von BMP-2 essentiell abhängig ist. Weiter wurde demonstriert, dass die zusätzliche Applikation von BMP-2 zu einer Induktion des p38-MAPK-Signalweges innerhalb der ersten sieben Tagen führte. Dagegen war über den gesamten Untersuchungszeitraum kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Wnt-Signalweg zu evaluieren. Ferner zeigte sich, dass ab Tag 19 der TGF- β -Signalweg bei tendenzieller Induktion des BMP-spezifischen Rezeptors ALK6 effektiv inhibiert wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aufhebung der Inhibition der osteogenen Differenzierung der pASC mit einer frühen Induktion des p38-MAPK-Signalweges assoziiert ist, der Wnt-Signalweg ebenso wie der FGF-Signalweg jedoch keinen Einfluss auf die Inhibition zu haben scheint.

Abstract

The implantation of autolog multipotent mesenchymal stromal cells is a promising approach in therapy of bone defects of critical size. The osteogenic differentiation of porcine adipogen multipotent stromal cells (pASC) in standardized osteogenic differentiation medium (OM) is inhibited. This inhibition can be overcome by addition of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). The molecular reasons of this inhibition will be investigated in this work. The modulation of the four for the osteogenetic differentiation important pathways (TGF- β -, MAPK-, Wnt- and FGF-pathway) through BMP-2 will be evaluated in particular.

After isolation of pASC from porcine subcutaneous fat tissue the surface markers were characterized by flow cytometry. DMEM (4,5 g glucose/l) with 10 % FBS, 1 % penicillin/ streptomycin, 100 nmol dexamethasone, 100 μ mol ascorbic-2-phosphate and 10 mM β -glycerophosphate was used as OM. Over a period of 28 days the osteogenic differentiation with optional addition of 450 ng / ml BMP-2 was evaluated by the calcification of the extracellular matrix through alizarinred-s-staining and quantified by the solution in cetylpyrimidiumchloride. Furthermore, the expression of the key proteins of the pathways was measured using western blot analysis. The expression of the characteristic receptors for the BMP pathway (ALK2 and ALK6) and TGF- β pathway (ALK4, ALK5, ALK7) was analyzed by flow cytometry.

In this study it could be shown that the osteogenic differentiation of pASC is essentially dependent on BMP-2. The application of BMP-2 led to the induction of p38-MAPK-pathway within seven days. Over the entire study period of 28 days there was no significant difference in relation to Wnt-pathway. From day 19 the TGF- β -pathway was inhibited, although the BMP-specific receptor ALK6 was upregulated at this time. In summary, these results suggest, that the reversal of the inhibition of osteogenic differentiation is associated with an early induction of the p38-MAPK-pathway. The Wnt- and the FGF-pathways don't appear to have an influence on the reversal of this inhibition.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Stammzellen	1
1.2 Osteogenese	3
1.3 Differenzierung von Stromazellen	6
1.3.1 BMP-Signalweg	6
1.3.2 Wnt-Signalweg	8
1.3.3 MAPK-Signalweg	10
1.3.4 FGF-Signalweg	10
1.4 <i>Critical size defect</i> und <i>Tissue Engineering</i>	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Zellen	14
2.1.2 Chemikalien, Medien und Puffer	14
2.1.3 Zellkulturmedien	16
2.1.4 Puffer und Gele für Western Blot	17
2.1.5 Western-Blot-Antikörper	18
2.1.6 FACS-Antikörper	18
2.1.7 Laborgeräte	20
2.1.8 Verbrauchsmaterial	21
2.1.9 Kits	22
2.1.10 Verwendete Software	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellisolation aus Unterhautfettgewebe	22
2.2.2 Auftauen Porkiner ASC	23
2.2.3 Kultivierung und Passagierung	23
2.2.4 Kryokonservierung von Zellen	24
2.2.5 Aussaat und osteogene Differenzierung der porkinen ASC	24
2.2.6 BCA Protein Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.2.7 Analyse der Proteinexpression durch das Western-Blot-Verfahren	25

2.2.8	Alizarinrot-S-Färbung	28
2.2.9	Rezeptorbestimmung mittels Durchflusszytometrie	29
2.3	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Charakterisierung der Oberflächenantigene der Zellen	30
3.2	Evaluation der osteogenen Differenzierung anhand der Alizarinrot-S-Färbung	31
3.3	Untersuchung der Rezeptorexpression im Verlauf der osteogenen Differen- zierung	32
3.4	Etablierung des smad4-Antikörpers für das Western-Blot-Verfahren	37
3.5	Expression von spezifischen Schlüsselproteinen der essentiellen Signalwege der osteogenen Differenzierung	37
4	Diskussion	41
4.1	Stammzellcharakter	42
4.2	Osteogene Differenzierung	43
4.3	Beeinflussung der Signalwege	44
4.4	Schlussfolgerungen	47
4.5	Kritische Betrachtung	48
4.6	Ausblick	49

Akronyme

°C	Grad Celsius (= K - 273, 15). 16, 23–25, 27–30
µg	Mikrogramm (= 1×10^{-9} kg). 22, 27
µl	Mikroliter (= 1×10^{-6} l). 17, 18, 21, 25, 27, 28, 30
µm	Mikrometer (= 1×10^{-6} m). 23, 33
µmol	Mikromol (= 1×10^{-6} mol). 17, I, II
AK	Antikörper. 18, 39
ALK	Activin-Like-Kinase. 6, 32, 34–38, 46, 47, 49, I, II, VIII
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i> (engl.). 8
APS	Ammoniumpersulfat. 17
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i> (lat.). 14–18, 27–29
ASC	<i>Adipose derived mesenchymal stromal cell</i> (engl.). 2, 12, 23, 24, 43–45, 50, III
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (engl.). 22, 25, III
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> (engl.). 5–11, 13, 15, 24, 27, 32–51, I–III
BMPR	<i>Bone morphogenetic protein receptor</i> (engl.). 6, 34, 37, 38, 46, 49, VIII
BMSC	<i>Bone marrow derived stromal cell</i> (engl.). 2, 12, 43
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (engl.). 15, 27, 39
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (engl.). 2, 32, 44
cm	Zentimeter (= 1×10^{-2} m). 11, 21, 22
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (engl.). 15, 17, I, II
DMSO	Dimethylsulfoxid. 15, 23
EDTA	Ethylendiamintetraacetat. 16, 23, 24
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> (engl.). 10, 49
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i> (engl.). 15, 19, 20, 30, III, VIII
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (engl.). 15, 17, I, II
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (engl.). 5, 7, 10, 11, 13, 17, 27, 42, 43, 47, 49, 50, I–III

FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i> (engl.). 11, 39, 42, 49, VI, IX
FRS	<i>FGFR substrate</i> (engl.). 11
g	Erdbeschleunigung ($= 9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$). 23, 24, 30
g	Gramm ($= 1 \times 10^{-3} \text{ kg}$). 14–16, 18, 23, 24, I, II
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. 27, 29, 39
GRB	<i>Growth factor receptor-bound</i> (engl.). 11
GSK	Glykogen Synthase Kinase. 8, 9
h	Stunde (engl. <i>hour</i> . $h = 3,6 \times 10^3 \text{ s}$). 23, 24, 28, 29
HLADR	<i>Human leukocyte antigen-antigen D related surface molecule</i> (engl.). 2, 32, 44
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i> (engl.). 2, 32, 44
JNK	<i>c-june n-terminal kinases</i> (engl.). 10, 11, 49
kDa	Kilodalton ($= 1,66053906660(50) \times 10^{-24} \text{ kg}$). 27, 39
kg	Kilogramm (SI-Einheit). 14
l	Liter ($= 1 \times 10^{-3} \text{ m}^3$). 23, 24, I, II
LEF	<i>Lymphocyte enhancer factor</i> (engl.). 8, 9, 48
LRP	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein</i> (engl.). 8
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (engl.). 6–11, 13, 27, 39, 40, 43, 47–49, 51, I–III
mg	Milligramm ($= 1 \times 10^{-6} \text{ kg}$). 15, 22
MH2	<i>Mad-homology 2</i> (engl.). 6
min	Minute ($= 60 \text{ s}$). 23–25, 27–30
MKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> (engl.). 10
ml	Milliliter ($= 1 \times 10^{-3} \text{ l}$). 14–18, 21–25, 27, 29, 30, 45, I, II
mM	Millimolar ($= 1 \times 10^{-3} \text{ Molar}$). 16, 17, I, II
mm	Millimeter ($= 1 \times 10^{-3} \text{ m}$). 21, 27
MP	Milchpulver. 27, 39

MSC	<i>Mesenchymal stromal cell</i> (engl.). 1, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 43–45, 50, 51
ng	Nanogramm (= 1×10^{-12} kg). 24, 45, I, II
nm	Nanometer (= 1×10^{-9} m). 25, 29
nmol	Nanomol (= 1×10^{-9} mol). 17, I, II
OM	Osteogenes Differenzierungsmedium. 33, 36, 37, 40, 45–47, I, II
OSX	Osterix. 7
pASC	<i>Porcine adipose derived mesenchymal stromal cells</i> (engl.). 13, 14, 23–26, 30, 32, 33, 39, 42, 45, 47–51, I, II
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (engl.). 14–16, 22, 24, 25, 29
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> (engl.). 5
PFA	Paraformaldehyd. 15, 29
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (lat.). 16–18
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i> (engl.). 16, 25
R-Smad	<i>Receptor-activated Smad</i> . 6, 7
RT	Raumtemperatur. 25, 28, 29
Runx	<i>Runt-related transcription factor</i> (engl.). 4, 7, 10, 47, 48
s	Sekunde (SI-Einheit). 25
SARA	<i>Smad anchor for receptor activation</i> (engl.). 6
SBE	<i>Smad-Binding element</i> (engl.). 6, 47
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>). 31, 32, 34–38, 40–42
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>). 16–18, 28
sFRP	<i>secreted frizzled-related protein</i> (engl.). 8, 9
TAK	<i>TGF-β activation kinase</i> (engl.). 10
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (engl.). 16
TBS-T	<i>Tris buffered saline with tween</i> (engl.). 16, 28, 29
TCF	<i>T-cell transcription factor</i> (engl.). 8, 9, 48
TEMED	Tetramethylethylendiamin. 16–18
TGF	<i>Transforming growth factor</i> (engl.). 4–8, 10, 34, 46, 47, 49, I, II, VII

- Tris Trishydroxymethylaminomethan. 16–18
- Wnt Amalgamation aus *Wingless* und Int-1. 5, 7–9, 11, 13, 27, 39, 42, 43, 47–49, 51, I–III
- ZETT Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben. 14

Tabellenverzeichnis

1	Herkunft der verwendeten Spendertiere	14
2	Verwendete Medien und Puffer	16
3	Verwendete Zellkulturmedien	17
4	Verwendete Puffer und Gele für Western Blot	18
5	Verwendete Western-Blot-Antikörper	18
6	Verwendete FACS-Antikörper	19
7	Verwendete Laborgeräte	21
8	Verwendetes Verbrauchsmaterial	21
9	Verwendete Kits	22
10	Verwendete Software	22
11	Schlüsselproteine der Signalwege	26

Abbildungsverzeichnis

1	Charakterisierung der Oberflächenantigene	30
2	Mikroskopische Visualisierung der Alizarinrot-S-Färbung	31
3	Darstellung der photometrischen Quantifizierung der Rücklösung der Alizarinrot-S-Färbung	32
4	Darstellung der relativen ALK2-Rezeptorexpression	33
5	Darstellung der relativen ALK6-Rezeptorexpression	33
6	Darstellung der relativen ALK4-Rezeptorexpression	34
7	Darstellung der relativen ALK5-Rezeptorexpression	35
8	Darstellung der relativen ALK7-Rezeptorexpression	36
9	Darstellung der relativen BMPR-II-Rezeptorexpression	36
10	Etablierung der Antikörperfärbung für smad4	37
11	Relative smad4-Proteinexpression	38
12	Relative pp38-Proteinexpression	39
13	Relative β -catenin-Proteinexpression	39
14	Relative FGFR2-Proteinexpression	40

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

Erstmals 1868 erwähnt, zeichnen sich Stammzellen durch die Möglichkeit der asymmetrischen Zellteilung aus (Haeckel 1879, Maximow 1909, Morrison et al. 1997). Hierbei gehen aus einer Zelle zwei Tochterzellen hervor, die sich jeweils in ihren Zelleigenschaften unterscheiden: Während die eine Zelle weiterhin die Fähigkeit der asymmetrischen Zellteilung beibehält und damit den Fortbestand der Stammzellen sichert, verliert die andere Tochterzelle diese Eigenschaft und differenziert sich somit (Morrison et al. 1997, Lanza et al. 2004, S. xxv).

Je nach ihrer Herkunft und damit verbunden je ihrer Potenz werden Stammzellen in embryonale und adulte Stammzellen eingeteilt. Embryonale Stammzellen werden aus der Blastozyste gewonnen und sind für den Aufbau des Körpergewebes von zentraler Bedeutung (Thomson James et al. 1998). Alle nachfolgenden postnatalen und zur Regeneration dienenden Stammzellen werden hingegen als adult bezeichnet (Ramalho-Santos et al. 2007).

In Bezug auf die Differenzierbarkeit der Zellen werden weiter verschiedene Ebenen der Stammzellpotenz unterschieden: Während totipotente Stammzellen sowohl in embryonales als auch extraembryonales Gewebe differenzieren können und somit den Grundstein bis zur plazentaren Einnistung legen, können die hieraus abgeleiteten pluripotenten Stammzellen alle drei Gewebe des Keimblattes ausbilden. Multipotente Stammzellen wiederum bilden die Zellen aus verwandten Gewebegruppen. Insbesondere zu erwähnen sei hier die mesenchymale Zellreihe (Friedenstein et al. 1968), aber ebenso auch die hämatopoetische Zellreihe (Maximow 1909, Kfoury et al. 2015). Die Differenzierung in einen spezifischen histologischen Zelltypus wird durch Signalmoleküle induziert (Knoblich 2001).

Mesenchymale Stammzellen wurden erstmals 1968 von Friedenstein et al. 1968 beschrieben und bilden als multipotente Stammzellen insbesondere die Zellen der Gewebe des Stützapparates. Als solche konnten sie bereits in zahlreichen Organen und Geweben nachgewiesen werden (Caplan 2007, A. Keating 2012). Nachdem die Isolation von MSC aus dem Fettgewebe beschrieben wurde (Zuk et al. 2001), konnte eine Isolation der MSC aus dem Unterhautfettgewebe von Großtieren wie Schweinen und eine entsprechende Differenzierung zu Osteoblasten etabliert werden (Qu et al. 2007). Aufgrund der Heterogenität dieser unterschiedlichen Zellpopulationen wird anstelle des Stammzellbegriffs zunehmend die Bezeichnung der mesenchymalen Stromazelle verwendet (Horwitz et al. 2005, Lindner et al. 2010, Caplan 2017). Insbesondere das Knochenmark und das Unter-

hautfettgewebe sind als potente Quellen von Bedeutung (Zuk et al. 2001). Hinsichtlich ihrer Verfügbarkeit und Anzahl unterscheiden sich die Zellen nach ihrem Gewebsursprung: Bei Stromazellen aus dem Knochenmark zeichnen sich nur 0,002 % als *bone marrow derived stromal cells* (BMSC) aus und nehmen im Alter zahlenmäßig weiter ab (Mazini et al. 2019, Caplan 2007, Strem et al. 2005). Im Unterschied dazu weisen *adipose derived stromal cells* (ASC) mit 2 % - 30 % eine deutlich höhere Dichte im Fettgewebe auf (Strem et al. 2005, Mazini et al. 2019). Nicht zuletzt sind ASC interventionell z. B. durch Liposuktion oder durch minimalinvasive Entnahme des abdominalen Unterhautfettgewebes komplikationsarm zu gewinnen (Si et al. 2019). Daher sind ASC im Rahmen des *tissue engineerings* eine vielversprechende Stromazellquelle (Zuk et al. 2001, Vallée et al. 2009).

Von der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) wurden folgende drei Kriterien als Minimalanforderung für humane MSC gestellt (Dominici et al. 2006):

1. Adhäsion an Plastikoberflächen
2. Expression von CD73, CD90 und CD105, keine Expression für Marker der Hämatopoese (CD14, CD34, CD45, CD79, HLADR)
3. Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sich in Bezug auf die Expression von Oberflächenantigenen porcine MSC vergleichbar zu humanen MSC verhalten (Noort et al. 2012). Allerdings wurde auch gezeigt, dass die Expression von Oberflächenantigenen nicht allein vom Stammzellcharakter der Zellen abhängt, sondern vielmehr weiteren Einflüssen wie z. B. der Zellpassage unterliegt (Mitchell et al. 2006). Eine Unterscheidung von ASC und den BMSC kann über die Oberflächenantigene CD10, CD36 und CD106 erfolgen. Weitere spezifische Marker werden diskutiert (Mazini et al. 2019).

MSC weisen in Zellkulturen einige Eigenheiten auf, die in der Untersuchung der Signalwege von besonderer Bedeutung sind. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass bei höherer Anzahl von Passagierungen durch zelluläre Seneszenz die Viabilität und die Differenzierungsfähigkeit der Zellen eingeschränkt wird. Zum anderen löst bereits der Zell-Zell-Kontakt eine Differenzierung aus, sodass eine Konfluenz der Zellkultur zu vermeiden ist. Darüber hinaus bestehen Hinweise darauf, dass ein kontinuierlich enger Zellkontakt zu epigenetischen Veränderungen und zu einer reduzierten Differenzierungskapazität und einer stärkeren Proliferationsneigung führen kann (Nguyen et al. 2012, Elkhenany et al. 2016). Es konnte nachgewiesen werden, dass der Ursprung des Gewebes und das Alter der Donoren die Expression und die zugrundeliegenden Signalwege beein-

flussen (Elkhenany et al. 2016). Auch konnte gezeigt werden, dass das Differenzierungspotenzial in die drei histologischen Zelltypen (adipogenes, chondrogenes und osteogenes Gewebe) durch die Anzahl der Passagierungen beeinflusst wird (Muraglia et al. 2000).

1.2 Osteogenese

Im Gegensatz zur Defektheilung im Weichteilgewebe unterscheiden sich die embryonale Osteogenese nicht wesentlich von der Frakturheilung, sodass das Ergebnis mikroskopisch nicht voneinander zu unterscheiden ist (Deschaseaux et al. 2009). Daher soll im Folgenden zunächst die embryonale Osteogenese als Archetyp dargestellt werden. Histologisch wird die desmale von der chondralen Ossifikation unterschieden (G. Chen et al. 2012, Welsch et al. 2018). Bei der desmalen Ossifikation, auch direkte Osteogenese genannt, differenzieren die Osteoblasten direkt aus mesenchymalen Stromazellen (Welsch et al. 2018). Zunächst an gefäßreichen Ossifikationspunkten lokalisiert, verbinden sie sich in Folge zu zusammenhängenden Flächen. Die Osteoblasten sezernieren zu Beginn eine als Osteoid beschriebene Knochensubstanz aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Kollagen Typ I. Erst sekundär kalzifiziert diese zunächst unverkalkte extrazelluläre Matrix durch Ausfällung von Kalziumphosphat. Da ein randständiger Osteoidsaum erhalten bleibt, entsteht hierdurch die Trabekelstruktur entlang der Gefäßnetze. Insbesondere platte Knochen wie die flachen Schädelknochen, aber auch Teile der Clavicula werden durch die desmale Ossifikation gebildet (Welsch et al. 2018, Ornitz und Marie 2015, Komori 2019).

Im Gegensatz zur direkten Osteogenese wird bei der chondralen Ossifikation der Knochen zunächst durch Knorpelgewebe geformt. Daher wird die chondrale Ossifikation auch indirekte Osteogenese genannt. In einem mehrstufigen Prozess wird dieser chondrale Vorläufer zunächst abgebaut und sequentiell durch Knochengewebe ersetzt. Dieser Vorgang läuft in zwei Schritten ab: Zunächst erfolgt die perichondrale Ossifikation, worauf sich die enchondrale Ossifikation anschließt. Bei der perichondralen Osteogenese steht die Bildung eines Knochengerstes im Vordergrund. Um den Knorpelkern bildet sich eine Knochenmanschette, sodass aufgrund der extrachondralen Lage hier auch von einer desmalen Osteogenese gesprochen werden kann. Die nun von der Osteoblastenmanschette umgebenen Chondrozyten werden hypertroph (Blasenknorpel) und induzieren in Folge die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix. Abschließend gehen die Chondrozyten in Apoptose (Welsch et al. 2018).

Mit der Neovaskulisation der Diaphyse werden auch Chondroklasten und Vorläuferosteoblasten (Osteoprogenitorzellen) in den Blasenknorpel eingeschleust. Hierdurch wird der Beginn der zweiten Stufe, die enchondrale Ossifikation, gekennzeichnet. Durch Se-

zernierung des Osteoids in die entstehenden Knorpelhöhlen wird analog zur direkten Ossifikation Geflechtknochen gebildet. Die Knochen-Knorpel-Grenze wächst nun fortlaufend von der Mitte des Schafts bis zu dessen Enden, wobei auch hier verschiedene Zonen zu unterscheiden sind. Von außen nach innen mit zunehmendem Ossifikationsgrad seien genannt (Welsch et al. 2018):

1. Reservezone: Diese besteht aus fetalem Knorpel und bildet die Epiphyse
2. Proliferationszone: Säulenförmige Bildung von Knorpelzellen in längs gerichteter Anordnung, umgeben von Transversalsepten. In der Frakturheilung ist diese Zone etwa ab dem 9. Tag nach dem Bruchereignis nachweisbar (Einhorn 1998).
3. Blasenknorpelzone: Beginnende Verkalkung der extrazellulären Matrix und Sezernierung von Kollagen Typ X. Diese Zone ist etwa zwei Wochen nach Frakturereignis nachweisbar (Einhorn 1998).
4. Eröffnungszone: Abbau der Chondrozyten durch Chondroklasten und Ersatz durch Osteoblasten
5. Trabekelzone: Beginnender Umbau durch Besiedlung mit Osteoblasten und Osteoklasten

Durch die chondrale Ossifikation werden die meisten Knochen, insbesondere die der Extremitäten, gebildet.

Eine *In-vitro*-Differenzierung von Osteoblasten von Hühnern konnte 1987 durch Gerstenfeld et al. gezeigt werden. Demnach beeinflusst β -Glycerolphosphat zwar nicht die Proliferationseigenschaften, es hat jedoch nachweislich einen positiven Effekt auf die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix (Gerstenfeld et al. 1987). Die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen zu Osteoblasten und Chondroblasten wird maßgeblich durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Runx2 beeinflusst. Dieser reguliert u. a. die Expression von Kollagen Typ I, Osteocalcin und TGF- β (Marie 2008, Ornitz und Marie 2015).

Im Rahmen der sekundären Knochenheilung kann eine Distanz bis zur Hälfte des Durchmessers des Knochens überbrückt werden (Einhorn 1998). Bei der sekundären Knochendefektheilung bildet sich im Gegensatz zur primären Knochenheilung ein Kallus. Hierbei können die Markzone und die interkortikalen Bereiche als weicher Kallus von der subperiostealen und das Weichteilgewebszone als harter Kallus unterschieden werden. Während der weiche Kallus der chondrale Ossifikation entspringt, entsteht der harte Kallus aus der desmalen Ossifikation (Phillips 2005). Hierbei reagieren die Osteoblasten

unterschiedlich auf den Einfluss von BMP-2, sodass nur die periostalen Osteoblasten auch Knorpelgewebe ausbilden können (Einhorn und Gerstenfeld 2015). Die Knochenheilung selbst wird in fünf Phasen unterteilt: Hämatomphase, Entzündungsphase, Angiogenese, knorpelige Vorformung mit anschließender Kalzifikation und anschließendem Knochenumbau (Phillips 2005). Der zeitliche Ablauf kann am Rattenmodell gezeigt werden, deren Knochenheilung in etwa doppelt so schnell verläuft wie die des Menschen (Phillips 2005): In den ersten Stunden nach dem Frakturereignis werden durch die Hämatombildung und Thrombozytendegranulation TGF- β und PDGF freigesetzt, welche neben der Zellproliferation und Zelldifferenzierung verschiedene weitere Prozesse wie die Chemotaxis und Angiogenese induzieren (Phillips 2005, Einhorn 1998). Innerhalb des ersten Tages kann von dem MSC sezerniertes BMP nachgewiesen werden. Durch die Vorläuferosteoblasten unter dem Periost wird unter Einfluss von BMP die desmale Knochenheilung durch Differenzierung zu Osteoblasten induziert. Hierbei zeigte sich insbesondere die Expression von BMP-2, BMP-6 und BMP-9 für die Differenzierung von MSC zu Vorläuferosteoblasten von Bedeutung, während BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMP-9 für die weitere Differenzierung zu Osteoblasten relevant ist (Hollinger et al. 1996, Phillips 2005). Bis Tag fünf bildet sich durch desmale Ossifikation in der subperiostalen Zone der harte Kallus (primäre Knochenheilung). Zwischen Tag vier und Tag sieben kann Osteonectin nachgewiesen werden. Zwischen den Knochenenden erfolgt die Bildung des weichen Kallus, sodass bereits ab dem dritten Tag eine Proliferation der undifferenzierten MSC zu erkennen ist. Ab dem fünften Tag kann mit einem Peak um den neunten Tag die Expression von Kollagen II als Zeichen für die Chondrogenese nachgewiesen werden. Zwischen dem sechsten und zehnten Tag wird Osteocalcin im harten Kallus und, sowohl im harten als auch im weichen Kallus, Osteopontin exprimiert. Während die Aktivität im harten Kallus ab Tag elf abnimmt, kalzifiziert das chondrogene Gerüst des weichen Kallus zunehmend. Mit dem 25. Tag ist die eigentliche Knochenbildung abgeschlossen, während die Umbauprozesse zu Lamellenknochen noch weiter andauern (Phillips 2005, Einhorn 1998).

Die Herkunft der beteiligten MSCs wird u. a. durch den Frakturmechanismus bestimmt. So entsteht der Kallus nach einer offenen Fraktur zu fast 50 % aus MSC aus dem umliegenden Muskelgewebe, während bei geschlossenen Frakturen weitestgehend MSC aus dem Periost involviert sind (Einhorn und Gerstenfeld 2015).

1.3 Differenzierung von Stromazellen

Bei der Differenzierung von Stromazellen zu Osteoblasten sind Wnt, *bone morphogenetic protein* (BMP), *fibroblast growth factor* (FGF) und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) von besonderer Bedeutung (Deschaseaux et al. 2009, Ornitz und Marie 2015). Die zugehörigen und in dieser Arbeit untersuchten Signalwege sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.3.1 BMP-Signalweg

Die Gruppe der *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) gehört zur TGF- β -Superfamilie. Bestehend aus über 20 Molekülen hat die BMP-Familie Einfluss auf die Knochen-, Knorpel-, Herz- und neuronale Entwicklung. Insbesondere BMP-2 wirkt hierbei auf die prä- und postnatale Osteogenese (D. Chen et al. 2004) und fördert insbesondere die Differenzierung von Vorläuferosteoblasten zu reifen Osteoblasten (Lai et al. 2002). Dabei bindet BMP extrazellulär an spezifische membranständige Serin-Threonin-Kinase Rezeptoren, welche sich in zwei Subtypen unterteilen lassen: Zum BMP-Rezeptor I (BMPRI) gehören die *Activin-Like-Kinasen* (ALK) 2, 3 und 6. Zum Typ-II-Rezeptor gehören hingegen der BMPRII und die Aktivin-Rezeptoren ActRII und ActRIIB (D. Chen et al. 2004). Zu den TGF- β -Typ-I-Rezeptoren gehören u. a. ALK 4, 5 und 7. Nach Bindung an den Rezeptor bildet sich aus beiden Subtypen ein heterotetramerer Rezeptorkomplex aus je einem Paar beider Subtypen, wonach der Typ-I-Rezeptor durch den stetig aktiven Typ-II-Rezeptor am N-terminalen Ende phosphoryliert und damit aktiviert wird (G. Chen et al. 2012, Moustakas und Heldin 2002, Macias et al. 2015, Wrana et al. 1994). Intrazellulär wird nun der kanonische, auch smad-abhängig genannte, Signalweg induziert. Hierbei werden grundsätzlich *Receptor-activated Smads* (R-Smad) (für den TGF- β -Signalweg smad2 und smad3; für den BMP-Signalweg smad1, smad5 und smad8), inhibitorische i-Smads (smad6, smad7) und co-smads (smad4) unterschieden. Die R-Smads binden nach Komplexbildung mit *Smad anchor for receptor activation* (SARA) mit ihrer C-terminalen Domäne *Mad-homology 2* (MH2) an die GS-Domäne und an die L45-Schleife des Rezeptors (Moustakas 2002, Moustakas und Heldin 2002, Macias et al. 2015). Dies führt zu einer Konformitätsänderung und einer konsekutiven Trennung vom Rezeptor und SARA (Moustakas 2002). Durch weitere Phosphorylierung der C-Terminalen Domäne lagern sich zunächst smad2 und smad3 zusammen und bilden anschließend mit dem Co-Smad smad4 ein Heterotrimer, welcher in den Nukleus transferiert werden kann (Moustakas 2002). Smad4 ist dabei der charakteristische Mediator für den TGF- β -Signalweg (Moustakas und Heldin 2002). Darüber hinaus wird smad4 ei-

ne Mediatorrolle zwischen Knochenaufbau und -resorption zugeschrieben (G. Chen et al. 2012). Im Nukleus bindet smad3 und smad4 über den Transkriptionsfaktor JunB an die *Smad-binding elements* (SBE) der DNA und beeinflusst somit die Gentranskription (Lee et al. 2002, Moustakas 2002). Sowohl der TGF- β - als auch der BMP-Signalweg zielen auf den Transkriptionsfaktor Runx2 (Lee et al. 2002). Aber auch andere Faktoren, wie zum Beispiel Osterix (OSX) werden als Zielstruktur beschrieben (Franceschi et al. 2017). T. Liu et al. 2007 konnte zeigen, dass BMP-2 neben Runx2 auf weitere Transkriptionsfaktoren wirkt, ohne Runx2 eine osteogene Differenzierung jedoch nicht möglich ist.

Der Transkriptionsfaktor *runt-related transcription factor 2* (Runx2) gehört zur Runx-Familie und ist insbesondere als jeweils gemeinsames *target* des TGF- β -, des BMP- und des p38-MAPK-Signalwegs für die Osteogenese von großer Bedeutung (Lee et al. 2002). Die Aktivierung von Runx2 hat einen großen Einfluss auf die Differenzierung von Vorläuferosteoblasten zu Osteoblasten. Während Runx2 in undifferenzierten MSC wenig exprimiert wird, steigt die Expression in Vorläuferosteoblasten bis zu einem Maximum und wird in reifen Osteoblasten wieder heruntergeregelt. Hierbei reguliert Runx2 u. a. auch direkt die Gene der Signalmoleküle des FGF-Signalwegs und des Wnt-Signalwegs (Komori 2019).

Osterix (OSX) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher im Gegensatz zu Runx2 nur für die Osteoblastendifferenzierung und weniger für das Knorpelwachstum notwendig ist (C. Zhang 2010, Franceschi et al. 2017). OSX wird durch BMP-2 induziert und durch den p38-MAPK-Signalweg durch Phosphorylierung aktiviert (Franceschi et al. 2017). Eine Inaktivierung von Runx2 führt selbst unter Zugabe von BMP-2 zu einer chondrogenen Differenzierung (Kobayashi et al. 2000, Day et al. 2005). Dahingegen führt ein Knockout des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 zu einer osteogenen Differenzierung (Mori-Akiyama et al. 2003, Day et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Runx2, Osterix und Sox9 nicht nur die Transkription der Gene des jeweiligen Zelltyps verstärken, sondern auch die Transkription der Gene der anderen histologischen Zelltypen inhibieren (Day et al. 2005). Zur Regulation des TGF- β - und des BMP-Signalwegs sind verschiedene inhibitorische Mechanismen beschrieben worden. So kann innerhalb des Nukleus das inhibitorische smad7 an den Smurf-Komplex binden und wieder in das Cytoplasma ausgeschleust werden. Durch Interaktion mit dem Typ-I-Rezeptor wird die weitere Phosphorylierung der R-Smad inhibiert. Diese negative Rückkopplung kann durch das Protein STRAP-1, welches sowohl an den Rezeptor als auch an smad7 bindet, verstärkt werden (Moustakas 2002). Durch lysosomale Proteolyse werden die Signalmoleküle abgebaut und damit deren Wirkung beendet (Moustakas 2002). Eine einfache Dephosphorylierung wird hingegen nicht beobachtet (Massagué 2000).

TGF- β selbst, in Struktur und Wirkweise vergleichbar zu BMP-2, wirkt vornehmlich positiv auf die Proliferation und Knochenmatrixbildung durch Steigerung der Expression der alkalischen Phosphatase, Osteocalcin und Osteopontin (Lecanda et al. 1997, Lai et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 *in vivo* nur in Knochennähe eine Kalzifizierung der extrazellulären Matrix induzieren kann, während BMP-2 auch ektop zur Induktion der Osteogenese führt (Wozney et al. 1988, Lee et al. 2002). Durch Beeinflussung der Chemotaxis der Osteoblasten wirken sowohl TGF- β als auch BMP-2 auf die Knochenformation (Lai et al. 2002). Die vergleichende Studie von Lai et al. 2002 zeigte, dass sowohl BMP-2 als auch TGF- β Einfluss auf nichtkanonische Signalwege wie den MAPK-Signalweg haben. BMP-2 aktiviert im Vergleich zu TGF- β aber länger und stärker den MAPK-Signalweg und stimuliert weitere Transkriptionsfaktoren (z. B. ATF-2).

In vivo wird TGF- β von Thrombozyten und der extrazellulären Matrix des Knochens und des Knorpels sezerniert. BMP hingegen wird von den Vorläuferosteoblasten, Osteoblasten und der extrazellulären Knochenmatrix produziert (Phillips 2005). Im Rahmen der Frakturheilung wurde beobachtet, dass BMP-2 insbesondere in der frühen Phase ausgeschüttet wird (Hollinger et al. 1996).

1.3.2 Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist ein bedeutender Regulator der Zellproliferation und Differenzierung und ist somit auch für die Osteogenese von zentraler Bedeutung (Moon et al. 2002, Guo et al. 2009, Duan et al. 2016). Insbesondere konnte durch Aktivierung des Signalwegs eine beschleunigte Knochenheilung nachgewiesen werden (Duan et al. 2016). Der Wnt-Signalweg wurde nach den beiden Genen *wingless* (*wg*) der *Drosophila* und *integration 1* (*int 1*) in Mäusen benannt (Clevers 2006, Duan et al. 2016). Die Signalkaskade wird in den kanonischen β -catenin-abhängigen und die nicht kanonischen, also β -catenin-unabhängigen, Wnt/ Ca^{2+} - und PCP-Signalwege unterteilt (Glass et al. 2006, Duan et al. 2016). Im Folgenden soll insbesondere der kanonische Wnt-Signalweg beleuchtet werden, da hierbei insbesondere Wechselwirkungen durch BMP-2 beschrieben wurden (R. Zhang et al. 2013, Duan et al. 2016).

Im inaktiven Zustand ist das phosphorylierte β -catenin an den Degradationskomplex gebunden. Dieser besteht aus APC, Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) und Axin. Nach der Bindung wird das an den Degradationskomplex gebundene β -catenin durch Proteasomen abgebaut (Duan et al. 2016). Erst nach Aktivierung durch den transmembranen Wnt-Rezeptor *Frizzled* und die Co-Rezeptoren *low density lipoprotein receptor related proteins* (LRP) 4, 5 oder 6 sowie nach Rekrutierung von Axin löst sich β -catenin aus diesem Komplex und kann in den Nucleus gelangen. Dort bindet β -catenin an den

Transkriptionsfaktor LEF / TCF und beeinflusst hierüber die Gentranskription. Antagonisiert wird der Wnt-Signalweg durch direkte Bindung von Inhibitoren wie *secreted frizzled-related protein 1* (sFRP 1) an Wnt-Moleküle oder durch Behinderung der Rezeptor-Co-Rezeptor-Interaktion (z. B. durch Sclerostin oder Dickkopf 1-3). In Bezug auf die Osteogenese konnte dem Wnt-Signalweg sowohl ein Einfluss auf die Osteoblasten als auch indirekt auf die Osteoklasten nachgewiesen werden (Glass et al. 2006, Duan et al. 2016). Während der genaue Einfluss auf die Osteoklasten noch nicht zweifelsfrei geklärt wurde, konnte β -catenin für die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten als zwingend erforderlich angesehen werden (Day et al. 2005, Duan et al. 2016). G. Liu et al. 2012 zeigte, dass durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges dosisabhängig die osteogene und adipogene Differenzierung von humanen MSC inhibiert wurden. Auch Visweswaran, Schiefer et al. 2015 konnte zeigen, dass durch Aktivierung des Wnt-Signalweges die Differenzierung von humanen MSC zu Adipozyten effektiv inhibiert werden konnte. Dies unterstreicht die Bedeutung des Wnt-Signalweges in der Homöostase des Knochenstoffwechsels (Visweswaran, Pohl et al. 2015).

Zwischen dem Wnt-Signalweg und dem BMP-Signalweg bestehen enge Wechselwirkungen, auch wenn beide Signalkaskaden evolutionär voneinander getrennt zu betrachten sind (R. Zhang et al. 2013). Hierbei führt die Aktivierung des Wnt-Signalweges zu einer Differenzierung der MSCs zu Vorläuferzellen der Osteoblasten, während der BMP-Signalweg die weitere Differenzierung zu reifen Osteoblasten fördert. Beide Signalwege sind für die Ossifikation der extrazellulären Matrix mitverantwortlich. Die Wechselwirkungen der beiden Signalwege kommen dabei im Wesentlichen durch folgende drei Mechanismen zustande (R. Zhang et al. 2013):

1. Intrazelluläre Komplexbildung der Smads mit Signalmolekülen aus dem Wnt-Signalweg (z. B. Axin, GSK3 und β -catenin) führen durch Phosphorylierung zur Aktivierung sowohl der Smads als auch von β -catenin
2. Wechselwirkungen der Antagonisten beider Signalwege (z. B. Sclerostin und sFRP) bedingen eine gemeinsame Regulation
3. Wirkung der Signalkaskaden auf die gleichen Zielgene und damit verbundene Interaktionen der spezifischen Transkriptionsfaktoren (z. B. Transkriptionskomplex aus Smad1, β -catenin und LEF / TCF) verstärken die Genexpression (R. Zhang et al. 2013, Sakai et al. 2005)

1.3.3 MAPK-Signalweg

Die Gruppe der *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) sind Serin-/ Threoninkinasen. Der MAPK-Signalweg ist für die Regulation der Zellproliferation und -differenzierung verschiedener Gewebe einschließlich Knochengewebe von Bedeutung. Die Signalkaskade unterteilt sich in die drei Klassen ERK, p38-Kinasen und JNK (Greenblatt, Shim und Glimcher 2013, Franceschi et al. 2017). Für die Skelettentwicklung ist der p38- und der ERK-Signalweg von besonderer Relevanz (Franceschi et al. 2017), während der JNK-Signalweg erst in der späten Phase der Zelldifferenzierung eine Rolle zu spielen scheint (Greenblatt, Shim, Zou et al. 2010). Der Einfluss des JNK-Signalwegs auf die osteogene Differenzierung ist bis heute bei unzureichender Studienlage nicht geklärt (Franceschi et al. 2017). Für die ERK-Signalkaskade konnte nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung über Runx2 sowohl zu einer gesteigerten Differenzierung zu Osteoblasten als auch zu einer geringeren Differenzierung zu Chondrozyten führt (Byun et al. 2014, Franceschi et al. 2017). Zudem vermittelt ERK die Hochregulation von Fibronectin und Osteopontin. Die Kinase p38 ist für die BMP-2 verstärkte Expression von Fibronectin, Kollagen Typ-I, Osteopontin und Alkalischer Phosphatase von Bedeutung. Die Regulation beider Kinasen p38 und ERK durch TGF- β inhibiert insbesondere die Expression von Osteocalcin (Lai et al. 2002).

Der p38-MAPK-Signalweg gehört zum nicht-kanonischen TGF- β -Signalweg und ist für die Osteoblastendifferenzierung notwendig (G. Chen et al. 2012, Franceschi et al. 2017). Die Bindung von TGF- β oder BMP-2 an die transmembranen TGF- β -Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der *TGF- β activation kinase 1* (TAK1) und MAPK-Kinase 3 (MKK3). Dies induziert die p38 α -MAPK bzw. über die MKK6 die p38 β -MAPK (Zarubin et al. 2005, Lee et al. 2002, G. Chen et al. 2012). Diese phosphorylieren und aktivieren damit den Transkriptionsfaktor Runx2. Lee et al. 2002 konnten zeigen, dass durch selektive Inhibition oder Aktivierung von p38 eine verminderte bzw. verstärkte Expression von Runx2 erreicht werden kann.

1.3.4 FGF-Signalweg

Der FGF-Signalweg spielt in der Chondrogenese, Osteogenese und in der Homöostase zwischen Osteoblasten und Osteoklasten eine große Rolle (Ornitz und Marie 2015). Darüber hinaus ist der FGF-Signalweg nicht nur für die Osteogenese, sondern auch in der Embryogenese und in der späteren Defektheilung von essentieller Bedeutung (Ornitz und Itoh 2015). Die FGF-Familie besteht aus 18 extrazellulären Signalmolekülen, vier Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und weiteren intrazellulären Nicht-Signalmolekülen (*in-*

tracellular FGF: FGF 11, 12, 13). Die extrazellulären Signalmoleküle werden weiter in parakrine kanonische FGF (FGF 1-10, 16, 17, 18, 20, 22) und endokrine nicht-kanonische FGF (FGF 15, 19, 21, 23) unterschieden. Die parakrinen Signalmoleküle nehmen hierbei insbesondere Einfluss auf Proliferation, Migration, Differenzierung, Stoffwechsel und Apoptose der Zellen (Ornitz und Itoh 2015). Reguliert werden die kanonischen Signalmoleküle wiederum u. a. über eine diffusionshemmende Bindung an extrazelluläre Heparin/Heparan-Sulfat-Proteoglykane.

Osteoblasten sezernieren vornehmlich FGFR2 (Fei et al. 2013, Ornitz und Marie 2015). Auch wenn in den letzten Jahren einige Moleküle der intrazellulären Signalübertragung von FGF identifiziert werden konnten, so bleibt die genaue Signaltransduktion noch unklar (Ornitz und Itoh 2015). Nach Bindung des FGF-Signalmoleküls an den Rezeptor lagern sich diese zu einem Dimer zusammen und aktivieren durch Phosphorylierung *FGFR substrate 2a* (FRS2 α) (Fei et al. 2013, Ornitz und Marie 2015). Über die Phosphorylierung von FRS2 α werden weitere Signalwege wie z. B. der Ras-MAPK-Signalweg aktiviert (Ornitz und Itoh 2015). Hierüber werden die MAPK ERK1, ERK2, JNK und p38 aktiviert (Ornitz und Itoh 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass aktiviertes FRS2 α am membranständigen Adapterprotein *growth factor receptor-bound 2* (GRB2) bindet und hierdurch zusätzlich den Ras-MAPK-Signalweg aktiviert. Nicht nur über die intrazelluläre Signalkaskade, auch direkt im Nucleus können sowohl FGF als auch die FGFR wirken (Ornitz und Itoh 2015). Buchtova et al. 2015 konnten zeigen, dass FGF durch eine Aktivierung der Wnt- und MAPK-Signalwege eine chondrogene Differenzierung unterdrücken kann. Multiple Interaktionen zwischen FGF und dem BMP-Signalweg sind beschrieben (Jin et al. 2012).

Nicht nur bei der Osteogenese ist der FGF-Signalweg von Bedeutung. Auch bei der Frakturheilung konnte eine verstärkte Induktion des Signalwegs und eine deutliche Interaktion mit dem Wnt-Signalweg und dem PTH-Signalweg beobachtet werden. Durch Rekrutierung der zur Verfügung stehenden Vorläuferosteoblasten und Aktivierung der Angiogenese kann mittels FGF2 die Heilung beschleunigt werden. Hieraus resultiert der klinische Einsatz von FGF2 zur Beschleunigung der Restitution (Ornitz und Marie 2015, Fei et al. 2013).

1.4 Critical size defect und Tissue Engineering

Knochendefekte kritischer Größe (engl. *critical size defect*) sind als Kontinuitätsstörung der Knochenmatrix definiert, die aufgrund ihrer Größe trotz chirurgischer Stabilisierung nicht spontan heilen. Daher stellen *critical size defects* eine besondere Herausforderung in der Orthopädie und Unfallchirurgie dar. Über das notwendige Ausmaß der Größe

existieren verschiedene Angaben, in einer vergleichenden Studie konnte tibial 2,5 cm als kritische Größe angesehen werden (Nauth et al. 2018, Schemitsch 2017). J. F. Keating et al. 2005 beschreibt Knochendefekte von mehr als 2 cm oder mehr als 50 % des Knochenumfangs als kritische Größe.

Überschreitet der Knochendefekt diese kritische Größe, so kann therapeutisch durch Einsatz von Implantaten eine Heilung herbeigeführt werden. Für das Material eines solchen Implantats sind die Osteokonduktion, die Osteopromotion und die Osteoinduktion von großer Bedeutung (Busch et al. 2021). Ein ideales Material unterstützt also multipotente Stromazellen bei der Besiedlung des Implantats und die Differenzierung dieser Stromazellen zu Osteoblasten. Hierbei stellt die autologe Spongiosaplastik den Goldstandard dar (Busch et al. 2021). Alternativ stehen alloplastische Implantate aus Keramik, synthetischen Polymeren oder Metall sowie allogenes Gewebe zur Verfügung. Problematisch ist hierbei eine geringere Stabilität und Verankerungsfestigkeit zum umliegenden Gewebe aufgrund der fehlenden Regenerationsfähigkeiten des künstlichen Materials oder immunologische Reaktionen bei allogenen Gewebe (Sittinger et al. 1996, Hammer et al. 1992). Diese Komplikationen können durch Verwendung von autologem Material vermieden werden. Insbesondere der Einsatz autologer Stromazellen im Rahmen des *Tissue Engineering* gewinnt hierbei an Bedeutung (Sittinger et al. 1996, Caplan 1990). *Tissue Engineering* ist definiert als die Wiederherstellung von biologischem Material durch Einsatz von Zellen, Biomolekülen und Trägermaterialien (European Commission 2001). Hierfür wird ein poröses dreidimensionales Trägermaterial (engl. *scaffold*) mit autologen Stromazellen besiedelt und unter *In-vitro*-Bedingungen kultiviert. Nach erfolgter Zelldifferenzierung wird die Trägermatrix implantiert (Gelinsky et al. 2011).

MSCs sind aufgrund ihrer Multipotenz, ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften und der Sekretion von parakrinen Faktoren für die Verwendung im Rahmen des *Tissue engineering* sehr gut geeignet (Arthur et al. 2009). Hierdurch wird die Regeneration des Gewebes, die Revaskularisation durch Förderung der Angiogenese und die Integration in das umliegende Gewebe gewährleistet. Für das *Tissue engineering* sind BMSC schon gut erforscht. Neben den grundsätzlichen Schwierigkeiten der Gewinnung dieser BMSC konnte jedoch gezeigt werden, dass trotz guter *In-vitro*-Ergebnisse die Einsatzmöglichkeiten *in vivo* limitiert sind (Mazini et al. 2019). ASC zeigten bei Implantation sowohl in Kombination im *scaffold* als auch ohne *scaffold* sehr gute Ergebnisse. Darüber hinaus sind die ASC aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung für die Behandlung von rheumatoider Arthritis, Sehnenverletzungen und Bandscheibenschäden interessant (Mazini et al. 2019). Im Rahmen eines kritischen Defekts am Schädelknochen konnten bereits 2004 einem 7-jährigen Mädchen erfolgreich autologe ASCs transplantiert wer-

den (Lendeckel et al. 2004). Trotz dieses klinischen Erfolgs bleiben die Regulation und die Interaktion der Signalwege der induzierten Differenzierung weiter ungewiss. Durch Evaluierung dieser Signalketten kann die Effizienz der Differenzierung und damit das Outcome dieser Therapie gesteigert werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Behandlung von kritischen Knochendefekten liegt ein vielversprechender therapeutischer Ansatz in der Implantation autologer multipotenter mesenchymaler Stromazellen. Zur Evaluation der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stromazellen ist ein entsprechendes *Minpig*-Tiermodell etabliert (Jungbluth et al. 2010). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass im standardisierten osteogenen Differenzierungsmedium die osteogene Differenzierung porkiner adipogener multipotenter mesenchymaler Stromazellen (pASC) im Gegensatz zu humanen adipogenen multipotenten mesenchymalen Stromazellen inhibiert ist. Unter Zusatz von BMP-2 konnte diese Inhibition aufgehoben werden (Bayraktar et al. 2018).

In dieser Arbeit sollen die molekularbiologischen Ursachen der Inhibition der osteogenen Differenzierung von pASC weiter aufgeklärt werden. Hierbei wird *in vitro* die erfolgreiche osteogene Differenzierung mit der durch Fehlen von BMP-2 inhibierten Differenzierung über einen Zeitraum von 28 Tagen verglichen. Insbesondere soll der Einfluss der für die osteogene Differenzierung relevanten Signalwege (BMP-, MAPK-, Wnt und den FGF-Signalweg *in vitro*) durch Quantifizierung der jeweiligen Schlüsselproteine untersucht werden. Ebenso soll die Modulation der spezifischen Rezeptoren im Verlauf der osteogenen Differenzierung durch BMP-2 evaluiert werden.

Durch das bessere Verständnis der Wirkung von BMP-2 auf die erfolgreiche osteogene Differenzierung können künftig bestehende Therapien optimiert oder neue Therapieansätze *in vitro* entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Für diese Arbeit wurden Primärzellen aus dem Unterhautfettgewebe von Schweinen (*porcine adipose derived mesenchymal stromal cells* [pASC]) gewonnen und kultiviert. Die Zellen wurden zu Versuchsbeginn als MSC charakterisiert.

Da für die Versuche Gewebestücke von bereits euthanasierten Tieren verwendet wurden, ist keine Tierversuchsgenehmigung notwendig (§ 7 Abs. 2 S. 3 TierSchG). Die Tierversuchreferenznummer der ebenfalls an der Klinik für Unfall- und Handchirurgie am Universitätsklinikum Düsseldorf angeschlossenen Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Jungbluth, aus der die Göttinger Minipigs des ZETT stammen, lautet G 459/13, 2013. Die Schweine waren 18 bis 30 Monate alt und etwa 25 bis 35 kg schwer.

Betrieb	Adresse	Rasse
Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT)	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40204 Düsseldorf	Göttinger Minipig
Willy Siemes und Sohn GmbH & Co. KG	Gerberstraße 29-32, 41748 Viersen	Hausschwein

Tabelle 1: Herkunft der verwendeten Spendertiere

2.1.2 Chemikalien, Medien und Puffer

Medium	Hersteller und Zusammensetzung
Alizarinrot-S <i>aqua dest.</i>	Merck KGaA TMS-008-C Ampuwa [®] Spüllösung 1 000 ml Plastipur [®] LOT: 13LAP061
β -Glycerophosphat	3,6 g β -Glycerophosphat 10 ml PBS Steril filtrieren.

BMP-2	PeproTech® Recombinant Human BMP-2 CatalogNr. 120-02
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth® Albumin Fraktion V Art.No. 8076.4
Dexamethason	Sigma Dexamethasone D1756
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich® Dimethylsulfoxide D2650
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	gibco® REF 41965-039 LOT 1924339 (+ 4,5 g/l D-Glucose, + L-Glutamine, -Pyruvate)
Einfriermedium	10 % DMSO 90 % FBS
FACS Cellwash	BD Biosciences Cat.No. 349524
FACS Clean	BD FACS™ No. 340345
FACS-Puffer	20 ml FACS Cellwash 1 ml FBS
FACS Rinse	BD FACS™ No. 340346
<i>Fetal bovine serum</i> (FBS)	PAN™ Biotech Sera Plus FBS Cat.No P30-3702
Kollagenase	Biochrom AG Collagenase Typ I
Kollagenaselösung	0,01 M CaCl ₂ 0,05 M Glucose 0,1 M HEPES 0,12 M Natriumchlorid 0,05 M Kaliumchlorid 1,5 % BSA 0,2 % Kollagenase ad 20 ml <i>aqua dest.</i>
L-Ascorbin-2-Phosphat-Lösung	79,5 mg L-Ascorbin-2-Phosphat ad 10 ml PBS Steril filtrieren.
Milchpulver	Roth® Art.Nr. T145.2
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Chemicals Artikelnummer 104005

<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) ohne Ca^{2+} , Cl^{2-} , Mg^{2+}	SIGMA Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (RNBF8144)
Penicillin-Streptomycin	PAN TM BioTech Penicillin-Streptomycin Cat.No. P06-07100
Ponceau S	Serva Electrophoresis GmbH, Darmstadt
<i>Radioimmunoprecipitation Assay-</i> Puffer nach Abcam (RIPA)	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % Natriumdeoxycholat 0,1 % SDS
RIPA-Complete	Eine Tablette RIPA Complete Mini in 10 ml RIPA lösen. Aliquots á 1 ml bei -20 °C lagern.
<i>Tris buffered saline</i> (TBS, 10-fach)	12,1 g Tris (pH = 7,5) 87,7 g Natriumchlorid ad 1 000 ml <i>aqua dest.</i>
<i>Tris buffered saline with tween</i> (TBS-T)	100 ml TBS (10fach) 1 ml Tween ad 1 000 ml <i>aqua dest.</i>
Tetramethylethylendiamin (TE-MED)	Roth [®] ArtNr. 2367.3
Trypsin-EDTA	biowest [®] Trypsin-EDTA 10x Cat.No. X0930-100
Tween	Sigma Tween [®] Lot. SLBP6514V

Tabelle 2: Verwendete Medien und Puffer mit Angabe ihrer Zusammensetzung.

2.1.3 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Proliferationsmedium	500 ml DMEM 50 ml FBS 5 ml Penicillin-Streptomycin 1 ml FGF

Osteogenes Differenzierungsmedium	500 ml	DMEM
	50 ml	FBS
	5 ml	Penicillin-Streptomycin
	100 nmol	Dexamethason
	50 µmol	L-Ascorbin-2-Phosphat
	10 mM	β-Glycerophosphat

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien mit Angabe ihrer Zusammensetzung.

2.1.4 Puffer und Gele für Western Blot

Puffer	Zusammensetzung	
Laemmli-Puffer	250 mM	Tris-HCl (pH = 6,8-8,8)
	40 %	Glycerol
	8 %	SDS
	0,1 %	Bromphenolblau
	20 %	Mercaptoethanol
	ad 10 ml	<i>aqua dest.</i>
Laufpuffer (10-fach)	25 mM	Tris (pH = 8,3-8,8)
	192 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
	ad 100 ml	<i>aqua dest.</i>
Sammelgel	6 ml	<i>aqua dest.</i>
	1,3 ml	Acrylamid (30 %)
	2,5 ml	Sammelgelpuffer (4-fach)
	20 µl	TEMED
	50 µl	APS
Sammelgelpuffer	30,25 g	Tris (pH = 6,8)
	2 g	SDS
	ad 500 ml	<i>aqua dest.</i>
Transferpuffer	36,4 g	Tris
	180 g	Glycin
	ad 1000 ml	<i>aqua dest.</i>

Trenngel	9,375	ml	<i>aqua dest.</i>
	5	ml	Acrylamid (30 %)
	3,75	ml	Trenngelpuffer (4-fach)
	20	μ l	TEMED
	50	μ l	APS
Trenngelpuffer	91	g	Tris (pH = 8,8)
	2	g	SDS
	ad 500	ml	<i>aqua dest.</i>

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Gele für das Western-Blot-Verfahren. Zusätzlich wurde ihre Zusammensetzung angegeben.

2.1.5 Western-Blot-Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
pp38	1:1 000	Cell Signaling Technology [®] Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) AK Cat.No. 9211
β -catenin	1:3 000	abcam [®] Cat.No. 16051
smad4	1:1 000	GeneTex Inc. Cat.No. GTX112980
fgfr2	1:1 000	ThermoScientific Cat.No. PA5-14651
GAPDH	1:5 000	Novus Biologicals [®] Cat.No. NBP2-27103

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für das Western-Blot-Verfahren mit Konzentrations- und Herstellerangabe.

2.1.6 FACS-Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
ALK-3 PE	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: AF436
ALK-5 APC	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: FAB5871A
ALK-6 APC	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: FAB5051A

TGF- β 2-RII PE	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: FAB532P
ALK-7 APC	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: FAB77491A
Anti-Goat	1:100	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Cat.-No.: 705-136-147
ALK-2	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: AF637
ALK-4	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: MAB2221
BMP-RII	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: AF811
Anti-Mouse	1:100	BD Pharmingen Cat.No.: 555335
CD14 FITC	1:1 000	Bio-Rad Cat.-No.: MCA1568GA
CD26 APC	1:1 000	Novus Biologicals Cat.-No.: NB600-552APC
CD29 Alexa Fluor	1:1 000	BD Pharmingen Cat.No.: 561496
CD31 APC	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: AF3387
CD34 FITC	1:1 000	abcam Cat.-No.: 81289
CD44 PE-CY	1:1 000	BD Pharmingen Cat.No.: 553135
CD45 FITC	1:1 000	Bio-Rad Cat.-No.: MCA1222F
CD73 PE	1:1 000	R&D Systems Cat.-No.: AF4488
CD79 PE	1:1 000	Bio-Rad Cat.-No.: MCA2538GA
CD90 APC	1:1 000	BD Pharmingen Cat.No.: 559869
CD105 APC	1:1 000	Novus Biologicals Cat.-No.: NB110- 58718APC
HLADR FITC	1:1 000	Bio-Rad Cat.-No.: MCA2314F

Tabelle 6: Verwendete FACS-Antikörper mit verwendeter Konzentration und Herstellerangabe

2.1.7 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Abzug mc6 [®]	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Blotter <i>Western Blot</i>	Bio-Rad Trans-Blot [®] Turbo [™]
Brutschrank	Thermo scientific Heracell [®] 150i
Entwickler <i>Western Blot</i>	Bio-Rad ChemiDoc [™] MP Imaging System
Durchflusszytometer FACS	FACSCalibur BD Bioscience, Heidelberg
Eisschrank Revco Ultima	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Heizbad	B.Braun Thermomix [®] BU
Heizblock	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Kryo-Einfriergerät	Thermo Scientific Nalgene [®] Mr. Frosty [®]
Mikroskop	Zeiss Axiovert A1
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200
Pipettierhelfer	Brand accu-jet [®] pro
Photometer	Eppendorf BioPhotometer plus
Rührfisch	VWRe [®] Stirrer
Sonifiziergerät UP50H mit Sonotrode MS1	Hielscher Ultrasonics GmbH, Berlin
Sterilbank	Thermo Hera safe
Taumel-Rollenmischer	Fröbel Labortechnik RM5-V 1750
Vakuumpumpe KNF Laboport [®] N86 KTP	KNF Neuberger, Inc.
Victor [™] 3	Perkin Elmer 1420 Multilabel Counter
Vortexer	VWR [®] , Darmstadt
Waage	Kern & Sohn GmbH ABJ 220-4M
Waage	Ohaus [®] Adventure [™] Pro

Western	Bio-Rad Mini-Protean [®] Tetra System
Zentrifuge	Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16R
Zentrifuge	Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Microcentrifuge

Tabelle 7: Verwendete Laborgeräte mit Herstellerangabe

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Gerät	Hersteller
6-Wellplatte	Greiner 6-Well Cellstar [®]
24-Wellplatte	Greiner 24-Well Cellstar [®]
96-Wellplatte	Greiner 96-Well Cellstar [®]
Absaugpipette (Glas)	Brand GmbH Pasteurpipetten ISO 7712
Falcon (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one (Artikelnummer 188171 & 227261)
Filterpapier <i>Western Blot</i>	Invitrogen, Artikelnummer LC2010
Pasteurpipetten aus Glas	Brand (Cat. No. 747720)
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner bio-one Cryo.s [™]
Mikroreaktionsgefäß 0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf Safe-Lock Tubes
Pasteurpipetten	Ratiolab-GmbH Artikelnummer 2600111
Petrischale (100 x 20 mm)	Greiner Zellkultur Schale Artikelnummer 664160
Pipettenspitzen	TipOne [®] (10 µl, 200 µl, 1 000 µl)
Stripetten	Corning costar [®] Stripette [®] (5 ml, 10 ml, 25 ml)
Zellkulturflaschen T25, T75	Greiner Cellstar [®] 25 cm ² , 75 cm ²
Zellschaber	Greiner Bio-One Cell Scraper

Tabelle 8: Verwendetes Verbrauchsmaterial mit Herstellerangabe

2.1.9 Kits

Kit	Hersteller
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific Prod.No 23225 Lot-No SA244529

Tabelle 9: Verwendete Kits mit Angabe des Herstellers

2.1.10 Verwendete Software

Software	Hersteller
CellQuestPro	BD CellQuest Pro TM
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc.
Image Lab 6.0	Bio-Rad Laboratories, Inc.
JabRef 4.3.1 (Literaturverwaltung)	Oliver Kopp u. a., http://www.jabref.org/
L ^A T _E X 2 _ε (Textverarbeitung)	Leslie Lamport, LaTeX Project Team
Quantity One 4.6.5	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Workout 2.0 (Viktor)	dazdaq solutions Ltd.

Tabelle 10: Verwendete Software mit Angabe des Entwicklers

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation aus Unterhautfettgewebe

Das Unterhautfettgewebe wurde vom jeweiligen Betrieb (vgl. Tabelle 1) abgeholt und dabei auf eine möglichst keimarme Gewinnung geachtet. Hierzu wurden die Gewebestücke bis zur direkten weiteren Verarbeitung im Labor gekühlt in PBS unter Zusatz von 2% Penicillin (200 U/ml), 0,2 mg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B aufbewahrt. Im Labor wurden unter der Sterilbank die Fettläppchen von Bindegewebe und Blutgefäßen freipräpariert und danach auf eine Größe von jeweils unter 0,5 cm³ zerkleinert. Anschließend wurde das geschnittene Fettgewebe in ein 50 ml-Falcon überführt und steril filtrierte Kollagenaselösung (vgl. Tabelle 2) im Verhältnis 1:2 hinzugegeben.

Durch die Kollagenase-Lösung wurde das Kollagen gespalten und hierdurch die Zellverbindungen aufgelöst. Nach Inkubation über 45 min im auf 37 °C vorgewärmten Schüttelbad wurde das durch die Kollagenase angedaute Fettgewebe mit einem Teflonsieb (100 µm) filtriert und das Filtrat anschließend bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Nach Abnehmen der oberen festen und unteren flüssigen Phase wurde das verbleibende Zellpellet in ca. 30 ml isotonischer Kochsalzlösung (0,9 %) resuspendiert und erneut für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Vorlage von 8 ml Proliferationsmedium (vgl. Tabelle 3) in T75-Zellkulturflaschen wurde das abzentrifugierte Zellpellet abhängig von der Zellzahl nach Absaugen des Überstandes mit weiteren 10 ml Proliferationsmedium aufgenommen und in die T75-Flaschen überführt. Anschließend wurden die pASC im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.2 Auftauen Porkiner ASC

Zunächst wurde 10 ml raumtemperiertes Proliferationsmedium (vgl. Tabelle 3) in jeweils ein entsprechendes Kulturgefäß pro Spender vorgelegt. Dann wurden die Zellen in den Kryoröhrchen zu etwa 50 % aufgetaut und der bereits flüssige Anteil zügig auf die Petrischalen überführt. Das verbleibende gefrorene Zellmaterial wurde mit 1 ml Medium gelöst und ebenfalls entsprechend pipettiert. Aus der Erfahrung vorausgegangener Experimente wurde auf ein Abzentrifugieren des zytotoxischen DMSO verzichtet, da hierdurch das Outcome nicht verbessert werden konnte. Durch gleichgerichtetes Schwenken der Schalen in orthogonal zueinander stehenden Achsen wurden die Zellen in der Schale gleichmäßig verteilt. Anschließend konnten die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.3 Kultivierung und Passagierung

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zweimal pro Woche wurde das Proliferationsmedium gewechselt. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurde das neue Proliferationsmedium (vgl. Tabelle 3) im Wärmebad auf Raumtemperatur erwärmt. Das alte Medium wurde vorsichtig abgesaugt und anschließend durch neues Nährmedium ersetzt. Eine Passagierung wurde durchgeführt, sobald die pASC zu etwa 80 % konfluent waren. Zur Passagierung der Zellen wurden diese zunächst mit 3 ml Trypsin-EDTA (0,5 g/l) für 3 min im Brutschrank inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber vom Kulturflaschenboden gelöst. Durch die Inkubation in der Trypsinlösung wurden die Adhäsionsmoleküle abgebaut und die Plastikadhärenz aufgelöst (Tarone et al. 1982). Nach Neutralisation der Trypsin-EDTA-Lösung mit 5 ml Nährmedium wurde die Zellsuspension abzentrifugiert

und der Überstand abgesaugt. Das verbleibende Zellpellet wurde zunächst in einem Milliliter Proliferationsmedium gelöst. Anschließend wurde es in einem Verhältnis von 1:3 gesplittet und in eine beschriftete neue Zellkulturflasche überführt. Durch Schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen sicher gestellt. Die erneute Adhärenzbildung nach Ablösung der Zellen erhöht die Passagezahl um eins.

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Durch Kryokonservierung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in flüssigem Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) können Zellen für längere Zeit gelagert werden. Hierzu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche der einzufrierenden Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0,5 g/l) für 3 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst. Nach Abstoppen der enzymatischen Trypsin-Reaktion durch Hinzugabe von Nährmedium im Verhältnis 1:2 und Überführung in ein Falcon wurde die Zellsuspension für 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde mit frisch angesetztem und eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert und zügig jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein beschriftetes Kryoröhrchen überführt und weiter auf Eis gelagert. In Kryoboxen, welche durch hundertprozentiges Isopropanol ein gleichmäßiges und langsames Herunterkühlen um $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen zunächst für 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ herabgekühlt. Anschließend konnten die Zellen in den Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelagert werden.

2.2.5 Aussaat und osteogene Differenzierung der porkinen ASC

Für die Experimente wurden die Zellen der zweiten Passage zunächst in 6- bzw. 24-Well-Platten ausgesät, sodass die Analysen jeweils in Passage 3 stattfanden. Für die Alizarinrot-S-Färbung wurde je Datenpunkt eine 24-Well-Platte mit jeweils 6 Messpunkten je Versuchsgruppe verwendet. Für die Proteinbestimmung und die Rezeptoranalyse wurden die Zellen in 6-Well-Platten mit jeweils 2 Messpunkten je Versuchsgruppe ausgesät. Sobald die pASC zu 100 % konfluent waren, konnte die Differenzierung begonnen werden (Tag 0). Hierzu wurde der Mediumwechsel nicht mit Proliferationsmedium, sondern mit entsprechendem osteogenem Differenzierungsmedium durchgeführt (vgl. Tabelle 3, Pittenger et al. 1999). Die Zellen, welche für die BMP-2-Versuchsgruppe bestimmt waren, wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium unter Zusatz von 450 ng/ml BMP-2 behandelt. Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden die Zellen nun in dem jeweiligen Differenzierungsmedium inkubiert. Das osteogene Differenzierungsmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

2.2.6 BCA Protein Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Für einen quantifizierenden Vergleich der Proteinexpression wurde im Western Blot eine definierte Proteinmenge verwendet. Zur Bestimmung der dazu notwendigen Proteinkonzentration wurde das BCA-Protein Assay verwendet. Durch die proteinvermittelte Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ in alkalischer Umgebung (Biuret-Reaktion) wird photometrisch in Bezug zu einem definierten Standard die absolute Proteinkonzentration gemessen.

Zunächst wurden die pASC geerntet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml kaltes PBS appliziert und die Zellen mit einem Zellschaber von dem Wellboden gelöst. Die Zellsuspensionen wurden in ein vorher vorbereitetes Mikroreaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für 1 min bei 12000 g bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet je nach Größe mit 30 μl bis 80 μl RIPA-2 resuspendiert. Danach konnten die Zellen bis zur Proteinbestimmung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen lysiert, um die Zellmembran aufzuschließen. Hierzu werden die Proben mit dem Vortexer gemischt und anschließend mit 10 Impulsen (*Cycle* 0,5 s, Amplitude 80 %) homogenisiert.

Für das *BCA protein assay* wurde zunächst der BCA-Standard nach Herstellerprotokoll angesetzt. Ebenso wurde das *Working Reagent* aus Bicinonsäure und 4 % Kupfersulfat gemäß der Angabe aus dem Kit im Verhältnis 50:1 hergestellt. Zudem wurden die mit RIPA-2 versetzten Proben im Verhältnis 1:6 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden jeweils 10 μl des Standards bzw. der Proben als Doppelbestimmung auf eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurde je Well 200 μl des *Working Reagent* hinzugegeben und nach Vermengung der Proben auf einem Schüttler für 30 s die Platte über 30 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Wärmeschrank inkubiert. Die Platte wurde vorher zur Vermeidung einer Verdunstung mit einer Folie abgeklebt. Nachdem die Platte wieder auf RT abgekühlt war, wurde im Victor3TM die Absorption der Proben bei $\lambda = 562\text{ nm}$ gemessen und in ein Verhältnis zum Standard gesetzt. Hieraus wurde die absolute Proteinkonzentration berechnet.

2.2.7 Analyse der Proteinexpression durch das Western-Blot-Verfahren

Die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte mit der Western-Blot-Methode. Hierbei werden mittels Gelelektrophorese (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) nach Größe aufgetrennte Proteine zunächst auf eine Membran geblottet und anschließend durch Bin-

dung an spezifische Antikörper nachgewiesen.

Über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgte im wöchentlichen Intervall die quantifizierende Bestimmung der Proteinexpression der Schlüsselproteine der vier zu untersuchenden Signalwege (vgl. Tabelle 11). Die Verwendung des smad4-Antikörper bei pASC wurde hierbei etabliert.

Signalweg	Schlüsselprotein	Molekulargröße (kDa)	Konzentration	Blockingpuffer
BMP-Signalweg	smad4	60	1:1 000	MP (5 %)
FGF-Signalweg	fgfr2	110	1:1 000	BSA (5 %)
MAPK-Signalweg	pp38	43	1:1 000	BSA (5 %)
Wnt-Signalweg	β -catenin	94	1:3 000	BSA (5 %)
Kontrolle	GAPDH	36	1:5 000	BSA (3 %)

Tabelle 11: Schlüsselproteine zu den Signalwegen von BMP, FGF, MAPK und Wnt.

Zunächst erfolgte eine Proteinbestimmung wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Für das Gießen der Gele wurden zunächst zwei Glasplatten, davon eine mit einem Spacer von je 1 mm Dicke, gereinigt und in die Gießvorrichtung eingespannt. Anschließend wurde das 10 %-ige Trenngel (Zusammensetzung vgl. Tabelle 4) frisch angesetzt und zwischen die Glasplatten gegossen. Zum Schutz vor Luftblasen und zum Begradigen des Gelspiegels wurde das Trenngel mit 70 %-igem Alkohol überschichtet. Nach 20 min Polymerisationszeit wurde das Ethanol entfernt und durch das frisch angesetzte Sammelgel (Zusammensetzung vgl. Tabelle 4) ersetzt. Direkt im Anschluss wurde ein Kamm mit 15 Probenkammern eingesetzt. Nach weiteren 20 min polymerisierte auch das Sammelgel, sodass das Gel einsatzbereit war. Zur Verwendung am nächsten Tag konnte es nun, in feuchtes Papier eingewickelt und in einer wasserfesten Tüte verpackt, bei 4 °C für maximal drei Tage gelagert werden.

Als nächstes wurden die Proben vorbereitet. Der 4-fach Laemmli-Puffer wurde als Erstes mit Mercaptoethanol im Verhältnis 4:1 versetzt. Die Kammern des Gels fassen jeweils 20 μ l. Die zunächst in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäßen vorgelegte Menge an *aqua dest.* wurde so berechnet, dass nach Zugabe von 10 μ g Protein und 5 μ l der Laemmli-

Mercaptoethanollösung ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand. Anschließend wurde dieses Probengemisch auf dem Vortexer vermengt und für 5 min auf 95 °C erhitzt und die Proteine in Folge denaturiert.

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Nach Prüfung der Dichtigkeit der Einzelkammern wurde die Box bis zur entsprechenden Markierung mit Laufpuffer gefüllt und der Kamm für die Probenkammern gezogen.

Die Gele können nun mit 8 µl des Proteinmarkers und den vorbereiteten Proben geladen werden. Für die Auftrennung der Proteine wurde das Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Hierbei binden die Proteine an das SDS der Gele und bilden hierdurch negativ geladene SDS-Protein-Komplexe, welche sich hydrodynamisch nach ihrer Größe unterscheiden lassen. Eine Protein-Protein-Interaktion wird durch das SDS und dem Laemmli-Puffer hinzugefügte Mercaptoethanol unterbunden (Rehm 2006, S. 10). Durch Anlegen eines Stroms von 60 Volt für 30 min wurden die Proben zunächst im Sammelgel in Richtung Pluspol verdichtet und anschließend bei 130 Volt über 60 min im Trenngel nach ihrer Proteingröße aufgetrennt. Der Lauf wurde beendet, wenn das Bromphenolblau des Laemmli-Puffers aus dem Gel gelaufen ist.

Nachdem die Proteine im Gel nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, konnten die Proteine über das Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran zur weiteren Analyse übertragen werden. Hierzu wird eine Spannung angelegt, die dieses Mal orthograd zur Laufebene der Gelelektrophorese steht. Zur Durchführung dieses Verfahrens wurde das Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ verwendet (vgl. Tabelle 7). Zunächst wurde auf einem mit Transferpuffer durchtränkten Filterpapier die ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtete Membran platziert und darüber das Elektrophoresegel positioniert. Abgeschlossen wurde dieser Stapel durch ein weiteres feuchtes Filterpapier. Dieser Komplex wurde in das Gerät überführt und für 30 min bei 25 Volt und 2,5 Ampere geblottet. Durch die angelegte Spannung wandern die Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf die Membran.

Nach Abschluss des Blottings wurde der erfolgreiche Proteintransfer mittels Ponceau-S-Färbung kontrolliert. Ponceau-S bindet reversibel und unspezifisch an positive Aminogruppen und färbt diese dadurch rot an. Nach dreiminütiger Inkubation der Membran in Ponceaurot-S wurde die Membran mit *aqua dest.* soweit gewaschen, dass sich die Banden klar abzeichneten. Nach Zuschnitt und Markierung der Proben konnte die Membran durch Waschen mit *aqua dest.* entfärbt werden. Die Membran wurde nun für 1 h im jeweiligen Blockierungspuffer (vgl. Tabelle 11) inkubiert und hierdurch die unspezifischen Bindungsstellen belegt. Anschließend wurde der Primärantikörper (vgl. Tabelle 11), wel-

cher im angegebenen Blockingpuffer verdünnt wurde, über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper entfernt und die Membran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der jeweils spezifische anti-Rabbit-Zweitantikörper, verdünnt in TBS-T im Verhältnis 1:1 000, zusammen mit dem Anti-Proteinmarker (1:4 000) für 1 h bei RT auf dem Traumel-Rollenmischer inkubiert. Der Zweitantikörper bindet spezifisch an den Erstantikörper und macht diesen für spezifische Messverfahren quantifizierbar. Nach erneutem dreimaligen Waschen für je 5 min mit TBS-T konnte die Membran entwickelt werden. Hierzu wurde zunächst die Entwicklerlösung im Verhältnis 1:1 angemischt und 1 ml gleichmäßig auf die Membran pipettiert. Im Entwickler konnte nun die Chemilumineszenz der Antikörper-Protein-Komplexe erfasst und anschließend in Image Lab 6.0 quantifiziert werden. Zur Kontrolle der tatsächlichen Proteinmenge und zum Ausgleich eines möglichen Pipettierfehlers wurde anschließend Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (vgl. Tabelle 11) auf der Membran visualisiert. GAPDH wurde als *housekeeping protein* als Referenz der Proteinmenge verwendet. Da es sich bei diesem Antikörper um einen bereits konjugierten Antikörper handelt, kann auf die Inkubation in einem Zweitantikörper verzichtet werden. Die aus der ersten Entwicklung gewonnenen Ergebnisse wurden anschließend in Relation zur gemessenen GAPDH-Menge gesetzt.

2.2.8 Alizarinrot-S-Färbung

Die Alizarinrot-S-Färbung dient dem Nachweis einer Kalzifizierung innerhalb der Zellmatrix, indem das Alizarinrot-S an Calciumionen und weiteren Kationen bindet (Puchler et al. 1969). Anhand der Alizarinrot-S-Färbung kann eine osteogene Differenzierung qualifiziert und quantifiziert werden (Stanford et al. 1995).

Zunächst wurde aus den Wells das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml *Phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach 15 min wurde das PFA wieder entfernt und die Zellen mit *aqua dest.* gewaschen. Nach der Fixierung wurde die vorbereitete 0,5 %ige Alizarinrot-S-Lösung ($pH = 4,2$) hinzugegeben und über 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung wieder entfernt und die Zellen mit *aqua dest.* gewaschen bis der Überstand farblos geworden war. Die Zellen konnten nun mit PBS überschichtet und mikroskopiert werden.

Für die Rücklösung wurde zunächst die 10 %ige Cetylpyridiniumchloridlösung vorbereitet (Gregory et al. 2004). Nach dem Entfernen des PBS wurde 1 ml dieser Lösung unter dem Abzug auf die Zellen pipettiert. Nach 2 h Inkubation bei RT konnte photometrisch die Absorption des Überstandes bei $\lambda = 600$ nm gemessen werden. Die Messungen wurde auf Cetylpyridiniumchlorid normiert.

2.2.9 Rezeptorbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Die Expression der Oberflächenantigene und spezifischer Rezeptoren wurde mit dem *Fluorescence Activated Cell Scanning* (FACS) untersucht. Beim FACS werden die Zellen der Probe automatisiert separiert und einzeln analysiert. Hierbei durchwandern die Zellen einen Laserstrahl, welcher nach Ablenkung durch die Zelle von zwei verschiedenen Photosensoren detektiert werden kann. Durch den *forward scatter* wird die Zellgröße bestimmt, durch den *side scatter* die Zellgranularität (Loken et al. 1975). Durch Immunfluoreszenzmarkierung von spezifischen Proteinen können diese ebenfalls durch Messung der Fluoreszenz detektiert werden.

Zunächst wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet. Sobald die pASC konfluent waren, wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 1,5 ml FACS-Puffer je Well ersetzt. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und anschließend in ein 15 ml-Falcon überführt. Pro Datenpunkt wurden in Summe zwei Wells verwendet. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit 300 g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden auf Eis statt. Der entstehende Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 100 µl je FACS-Röhrchen resuspendiert.

Diese Zellsuspension wurde auf die FACS-Röhrchen aufgeteilt und anschließend der jeweils spezifische Antikörper (vgl. Tabelle 6) hinzugefügt. Nach Mischen und Inkubation über 30 min im abgedunkelten Eisbad wurden die Zellen wieder mit 4 ml Cellwash gewaschen und wie beschrieben zentrifugiert. Bei unkonjugierten Antikörpern wurde das Pelett wieder mit 100 µl Cellwash aufgenommen und nach Hinzugabe des zweiten Antikörpers (Verdünnung 1:100 in FACS-Puffer) wieder über 30 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit 4 ml Cellwash gewaschen und danach abzentrifugiert.

Das Pelett wurde anschließend mit 200 ml FACS-Puffer aufgenommen und analysiert. Nach Auswahl der Zellpopulation (*gate*: 98 %) konnte die Expression der Proteine relativ zur gemessenen Zellzahl (10 000) in Cellquest ProTM quantifiziert werden.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch die Software Graphpad Prism 5.0. Durch die Verwendung unterschiedlicher Spendertiere ist die Annahme einer Unabhängigkeit der Stichproben gerechtfertigt. Die Annahme einer Normalverteilung wurde zunächst durch eine Histogrammdarstellung überprüft und die Annahme einer homogenen Varianz mithilfe von *Boxplots* getestet. Anschließend wurde als statistischer Test der Student-t-Test verwendet. Die Ermittlung des *Mean* und der Standardabweichung (SD) erfolgte durch die *Row statistic* der integrierten Testverfahren.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Oberflächenantigene der Zellen

Zu Beginn wurden die isolierten Zellen auf ihre Expression von Oberflächenantigenen (englisch *Cluster of Differentiation*) gemäß der Stammzelldefinition der ISCT untersucht. Diese Charakterisierung wurde in Passage 3 durchgeführt. Dabei exprimierten die pASC die Oberflächenmarker CD29, CD73, CD90 und CD105 (Expression > 75 %). Die Marker CD14, CD26, CD31, CD34, CD45, CD79 und HLADR wurden von den pASC nicht exprimiert (Expression < 5 %, vgl. Abbildung 1).

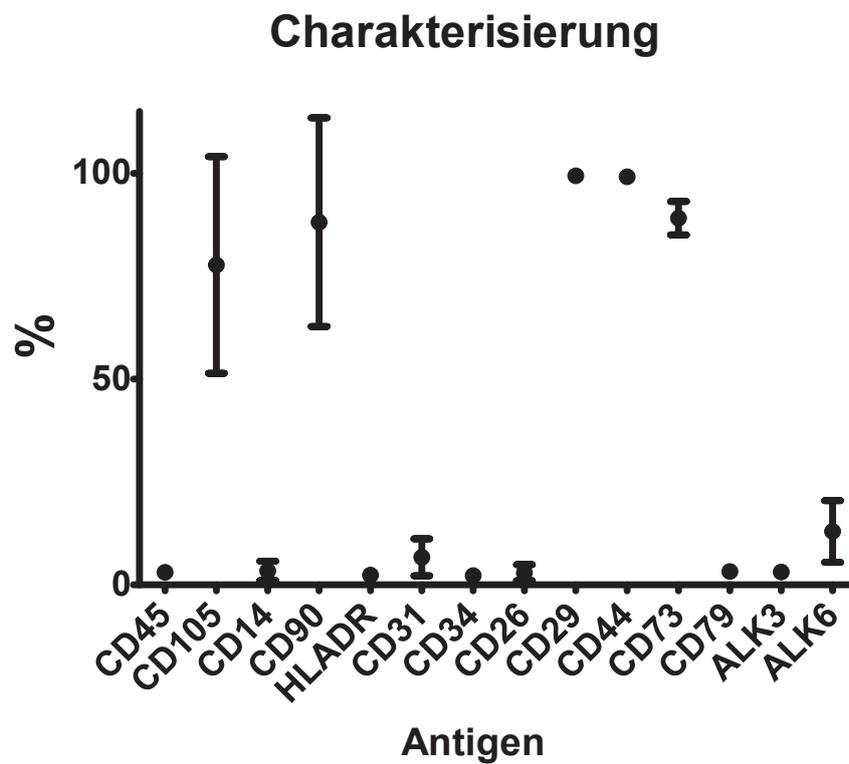


Abbildung 1: Relative Expression der Oberflächenantigene sowie der BMP-2-Rezeptoren ALK3 und ALK6. Dargestellt ist der Mean mit SD (n = 6).

3.2 Evaluation der osteogenen Differenzierung anhand der Alizarinrot-S-Färbung

Während der Inkubation der pASC im osteogenen Differenzierungsmedium unter fakultativer Zugabe von BMP-2 über 28 Tage wurde an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 die kalzifizierte extrazelluläre Matrix mit Alizarinrot-S angefärbt und analysiert. Innerhalb der ersten 14 Tage konnte kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden: Im mikroskopischen Bild zeigte sich keine relevante Anfärbung der Matrix (vgl. Abbildung 2). Auch die Rücklösungswerte des Cetylpyridiniumchlorids lagen jeweils unter 0,5 (vgl. Abbildung 3), was für eine nur geringgradige Differenzierung spricht. Erst ab Tag 21 wird eine relevante Anfärbung der extrazellulären Matrix bei den unter Zusatz von BMP-2 behandelten Zellen sichtbar. Bei den pASC, welche nur in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) inkubiert wurden, war keine wesentliche Anfärbung nachweisbar (vgl. Abbildung 2). Dieser Unterschied wurde auch in der entsprechenden Rücklösung des Cetylpyridiniumchlorids deutlich: Während die OD 600 in der Gruppe ohne Zusatz von BMP-2 weiterhin bei durchschnittlich 0,245 an Tag 21 bzw. 0,221 an Tag 28 lag, betrug die OD 600 in der Gruppe mit Zusatz von BMP-2 durchschnittlich 3,297 an Tag 21 bzw. 6,796 an Tag 28. Die beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich somit ab Tag 21 signifikant voneinander mit $p < 0,001$.

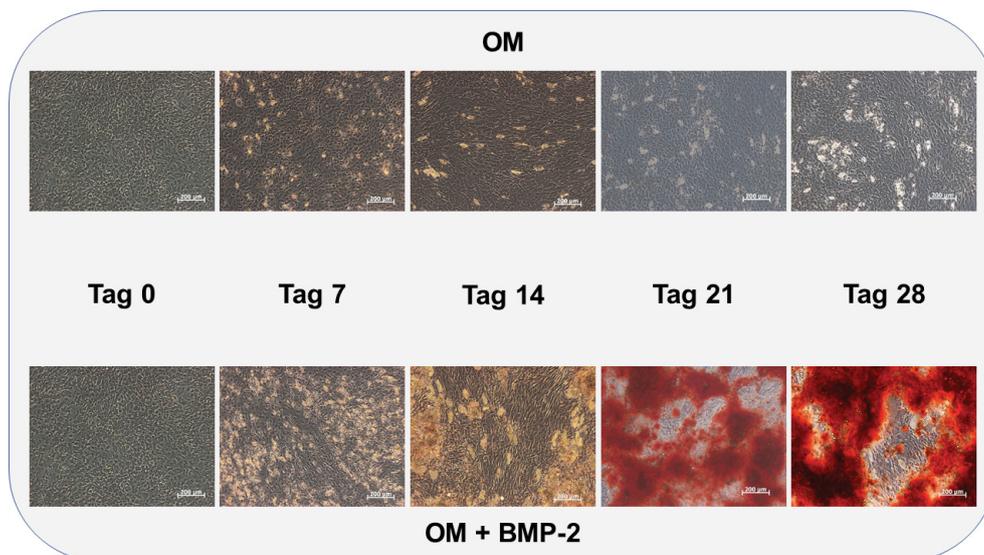


Abbildung 2: Exemplarische mikroskopische Visualisierung der pASC nach Alizarinrot-S-Färbung als Maß für die osteogene Differenzierung. Der Maßstabsbalken ist jeweils 200 µm lang.

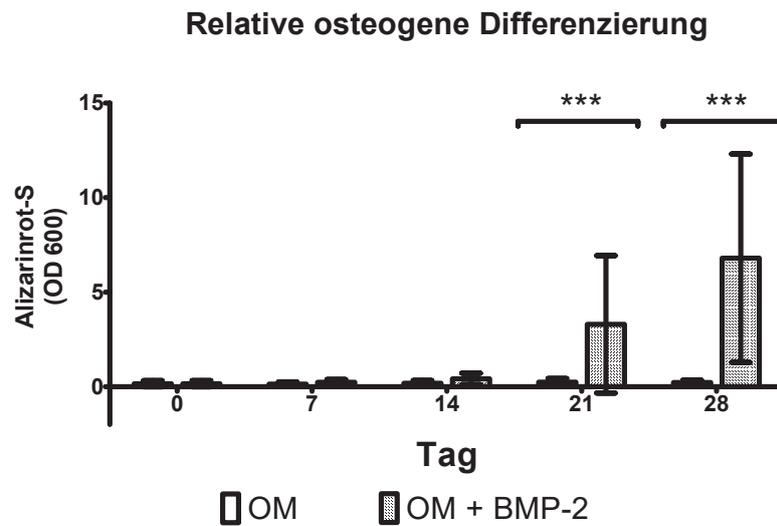


Abbildung 3: Darstellung der osteogenen Differenzierung im Verlauf von 28 Tagen. Angegeben ist der *Mean* mit SD. ***: $p < 0,001$ ($n = 12$).

3.3 Untersuchung der Rezeptorexpression im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Zunächst stellte sich die Frage, inwiefern die Inkubation der Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium unter fakultativer Zugabe von BMP-2 die Expression der Oberflächenrezeptoren im zeitlichen Verlauf verändert und hierdurch die osteogene Differenzierung beeinflusst. Insbesondere die Rezeptoren, welche mit dem BMP-Signalweg (ALK2, ALK3, ALK6) und dem TGF- β -Signalweg (ALK4, ALK5 und ALK7) assoziiert sind, waren von besonderem Interesse. Es zeigte sich in einem Vorversuch für ALK3 mit einer Expression von unter 5 % kein relevantes Vorkommen, sodass dieser im weiteren Verlauf nicht näher untersucht wurde. Die anderen Rezeptoren wurden zusammen mit dem BMP-Rezeptor-II (BMPRII) jeden zweiten Tag analysiert. In der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die osteogene Differenzierung von Stromazellen ein gradueller Prozess ist, welcher unterschiedlich schnell abläuft. Daher wurden die Ergebnisse in eine frühe, mittlere und späte Differenzierungsphase zusammengefasst.

Die Expression des Rezeptors ALK2 zeigte in den ersten 7 Tagen keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Erst ab Tag 9 konnte ein tendenziell stärkere Expression von ALK2 unter Einfluss von additivem BMP-2 dokumentiert werden (vgl. Abbildung 4).

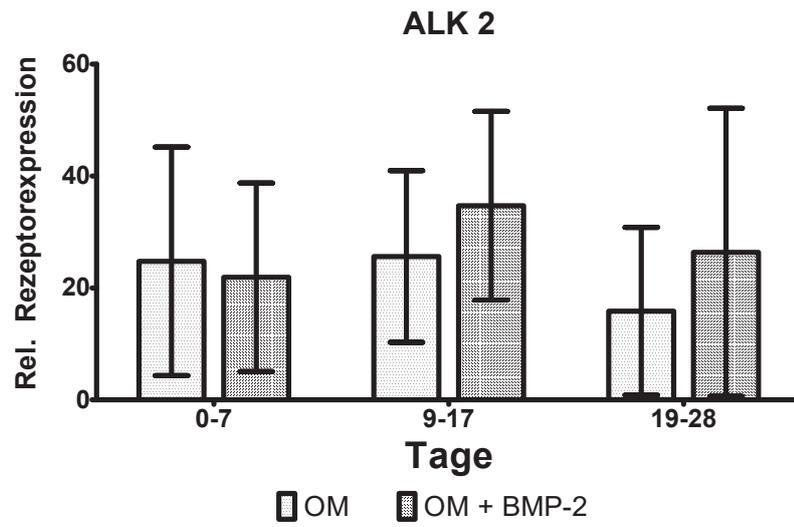


Abbildung 4: ALK2-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung (\pm BMP-2). Angegeben ist der *Mean* mit SD. $n = 3$.

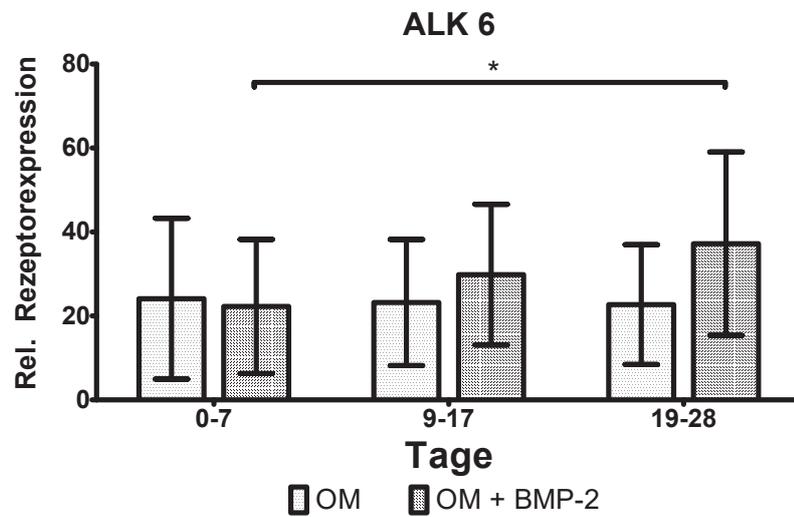


Abbildung 5: ALK6-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung (\pm BMP-2). Signifikante Induktion von ALK6 unter Zusatz von BMP-2 (*: $p \leq 0,05$). Angegeben ist der *Mean* mit SD. $n = 3$.

Auch die Expression von ALK6 zeigte in den ersten 7 Tagen für beide Versuchsgruppen ähnliche Werte (vgl. Abbildung 5). Unter Zugabe von BMP-2 steigerte sich die Expression von ALK6 von 22,25 % in den ersten sieben Tagen signifikant auf durchschnittlich 37,21 % in den Tagen 19 bis 28 ($p \leq 0,05$). Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zur ALK6-Expression der Zellen in OM nachgewiesen werden.

In den ersten sieben Tagen unter OM-Inkubation lag die relative Expression des ALK4-Rezeptors bei 77,29 %. Unter zusätzlicher Inkubation mit BMP-2 wurde der ALK4-Rezeptor vergleichbar mit 66,59 % exprimiert. In beiden Gruppen konnte über die 28 Tage hinweg eine signifikante Inhibition innerhalb der Versuchsgruppen unabhängig der Addition von BMP-2 beobachtet werden ($p \leq 0,001$). Die relative Rezeptorexpression von ALK4 in OM sank auf durchschnittlich 21,98 % an den Tagen 19 bis 28, unter Hinzugabe von BMP-2 zeigte sich die Expression regredient auf 22,78 %. Zwischen den beiden Versuchsgruppen bestand über den gesamten Untersuchungszeitraum kein signifikanter Unterschied in der relativen Rezeptorexpression (vgl. Abbildung 6).

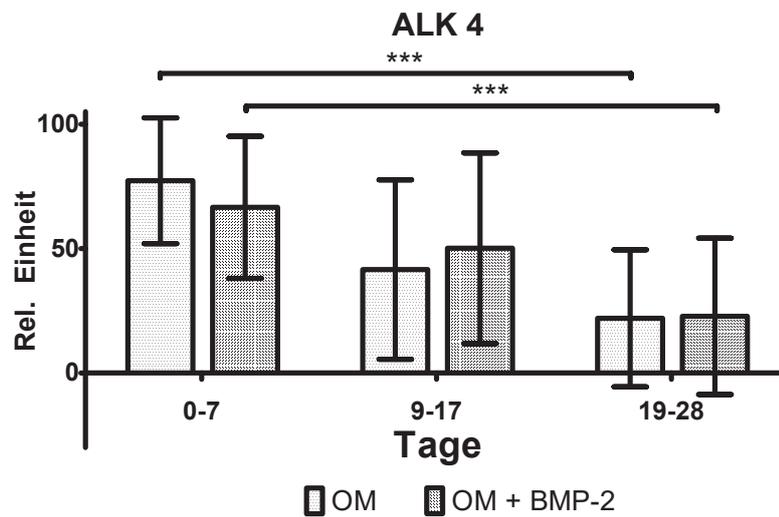


Abbildung 6: ALK4-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung (\pm BMP-2). Signifikante Inhibition der Expression unabhängig von der Addition von BMP-2 ($p \leq 0,001$). Angegeben ist der *Mean* mit SD. $n = 3$.

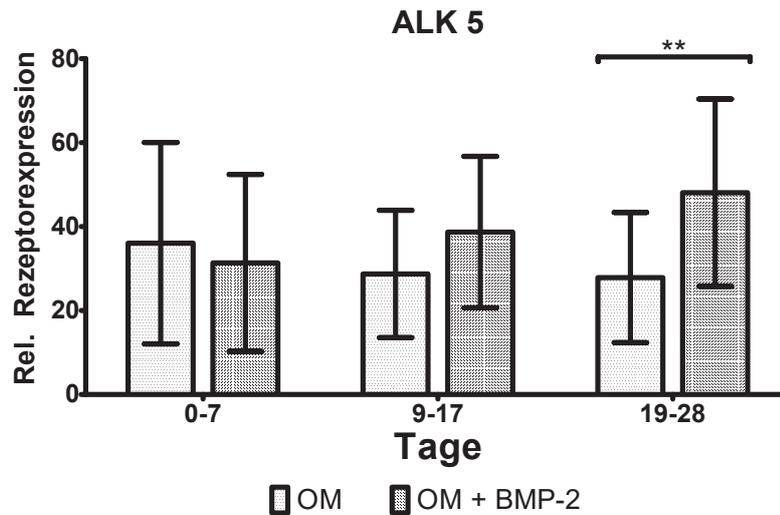


Abbildung 7: ALK5-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung (\pm BMP-2). Ab Tag 19 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (**: $p \leq 0,01$). Angegeben ist der *Mean* mit SD. $n = 3$.

Die relative Rezeptorexpression von ALK5 blieb in den ersten 17 Tagen in beiden Versuchsgruppen vergleichbar und zeigte keinen relevanten Unterschied (vgl. Abbildung 7). Über den gesamten Untersuchungszeitraum konnte unter Addition von BMP-2 eine tendenzielle Induktion von ALK5 dokumentiert werden, sodass ab Tag 19 ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen bestand ($p \leq 0,01$).

Die Expression von ALK7 veränderte sich im Verlauf der osteogenen Differenzierung kaum und stellte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen dar (vgl. Abbildung 8).

Die relative Expression des BMPR-II war in beiden Versuchsgruppen in den ersten 17 Tagen vergleichbar (s. Abbildung 9). Nach 19 bis 28 Tagen konnte bei den Zellen der OM-Gruppe eine relative BMPR-II-Expression von 15,84 % beobachtet werden, während die BMP-2-Gruppe weiterhin eine durchschnittliche relative Rezeptorexpression von 26,36 % aufwies. Hier besteht zwar ein tendenzieller Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen, ein Signifikanzniveau konnte jedoch nicht erreicht werden.

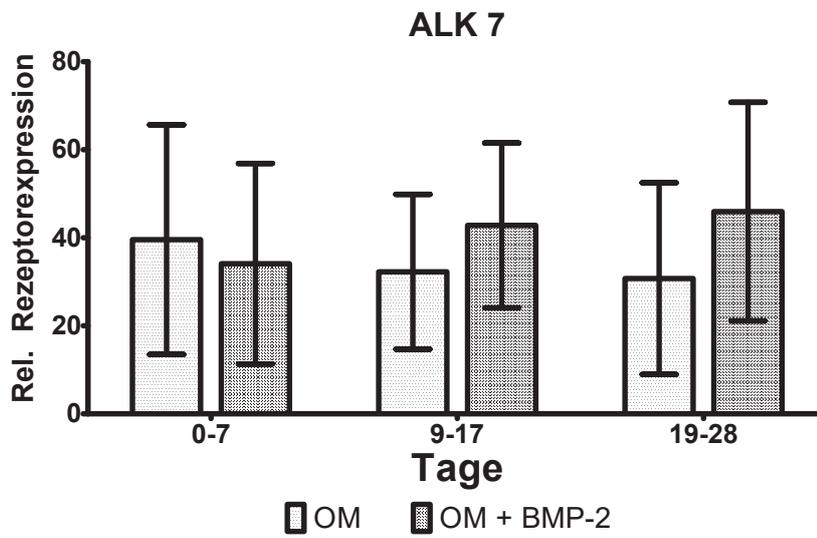


Abbildung 8: ALK7-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung (\pm BMP-2). Angegeben ist der *Mean* mit SD. $n = 3$.

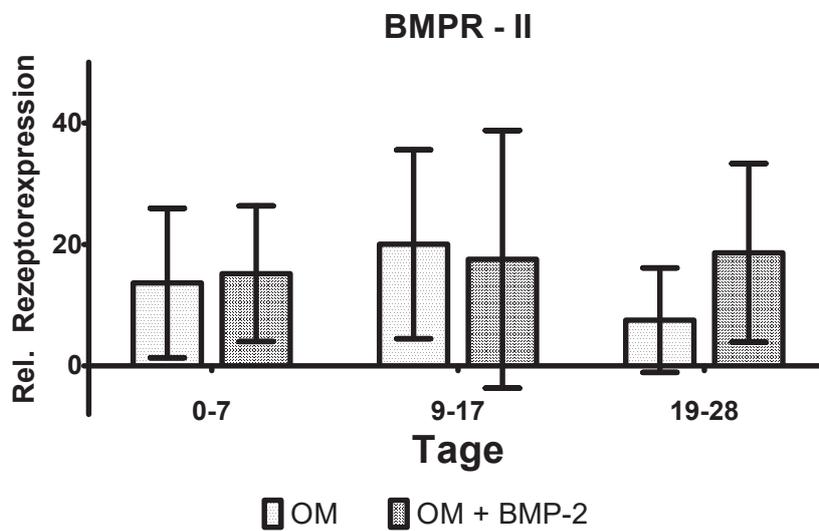


Abbildung 9: BMPR-II-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung (\pm BMP-2). Angegeben ist der *Mean* mit SD. $n = 3$.

3.4 Etablierung des smad4-Antikörpers für das Western-Blot-Verfahren

Da der smad4-Antikörper erstmalig bei pASC verwendet wurde, musste zunächst die ideale Antikörperkonzentration und der optimale Blockierungspuffer evaluiert werden. Dafür wurde exemplarisch eine Reihe verschiedener Konzentrationen und Blockierungspuffer verwendet, um für die pASC den richtigen Puffer zu finden. Dabei wurde die Antikörperfärbung exemplarisch an einem Spender in 10 %-igem BSA mit einer Antikörperkonzentration von 1:700 und 1:1 500 sowie bei gleichbleibender Antikörperkonzentration von 1:1 000 eine Milchpulverkonzentration von 5 % und 10 % durchgeführt. Es konnte dokumentiert werden, dass sich die für smad4 spezifische Bande bei 60 kDa bei einer Antikörperkonzentration von 1:1 000 in 5 %-iger Milchpulverlösung am deutlichsten darstellt (vgl. Abbildung 10A). Bei einer Milchpulverkonzentration von 10 % zeigte sich der Blot sehr schwach (Abbildung 10B). Bei Verwendung von BSA als Pufferlösung stellten sich die gewünschten Banden nicht spezifisch dar (Abbildungen 10C und D).

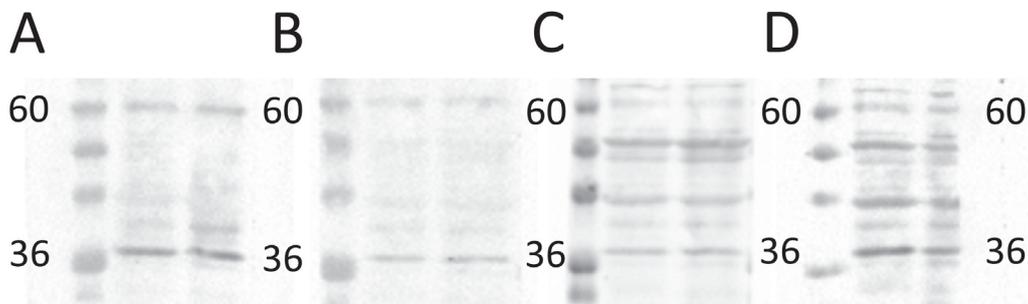


Abbildung 10: Darstellung der spezifischen Proteinbanden von smad4 (60 kDa) und GAPDH (36 kDa) nach Antikörperfärbung in A: 1:1 000 AK-Konzentration in 5 % MP, B: 1:1 000 AK-Konzentration in 10 % MP, C: 1:700 AK-Konzentration in 10 % BSA, D: 1:1 500 AK-Konzentration in 10 % BSA an jeweils zwei Spendern

3.5 Expression von spezifischen Schlüsselproteinen der essentiellen Signalwege der osteogenen Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der pASC ist in osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zusatz von BMP-2 inhibiert. Zur Evaluation des Einflusses von BMP-2 auf die osteogene Differenzierung wurde die Expression der spezifischen Schlüsselproteine des BMP-, Wnt-, MAPK und des FGFR-Signalwegs über einen Zeitraum von 28 Tagen an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 mittels Western Blot quantifiziert (vgl. Tabelle 11). In der Arbeitsgruppe

konnte gezeigt werden, dass die osteogene Differenzierung von Stromazellen ein gradueller Prozess ist, welcher unterschiedlich schnell abläuft. Daher wurden die Ergebnisse entsprechend der Kalzifizierung der extramedullären Matrix (vgl. Abbildung 3) in eine frühe und eine späte Phase gruppiert.

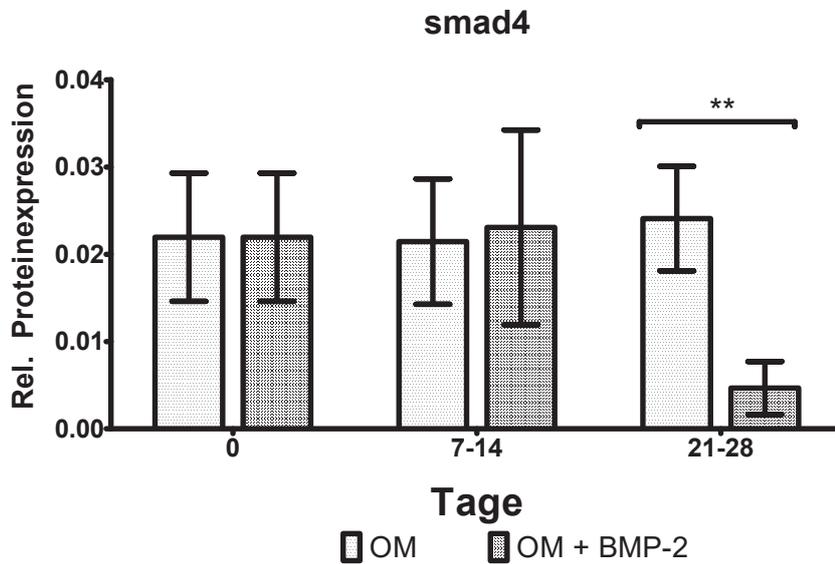


Abbildung 11: Gruppierte Darstellung der relativen Proteinexpression von smad4 (\pm BMP-2). Angegeben ist der *Mean* mit SD. **: $p \leq 0,01$; $n = 2$.

Zur Evaluation des BMP-Signalwegs wurde das Schlüsselprotein smad4 untersucht. Hierbei zeigte sich zunächst eine durchschnittliche smad4-Expression von 0,021 bei den Zellen der OM-Gruppe und von 0,023 bei den Zellen der BMP-2-Gruppe (s. Abbildung 11). An den Tagen 21 und 28 sank die durchschnittliche relative smad4-Expression in der BMP-2-Gruppe auf 0,005, während in der OM-Gruppe die smad4-Expression im Mittel nahezu konstant bei 0,024 blieb. Smad4 wurde zum Ende der erfolgreichen osteogenen Differenzierung unter BMP-2-Einfluss signifikant inhibiert ($p \leq 0,01$).

In Abbildung 12 ist die relative Proteinexpression des Schlüsselproteins des MAPK-Signalwegs, pp38, dargestellt. Unter Zusatz von BMP-2 konnte eine signifikant erhöhte relative pp38-Expression innerhalb der ersten 14 Tage der osteogenen Differenzierung gemessen werden ($p \leq 0,05$).

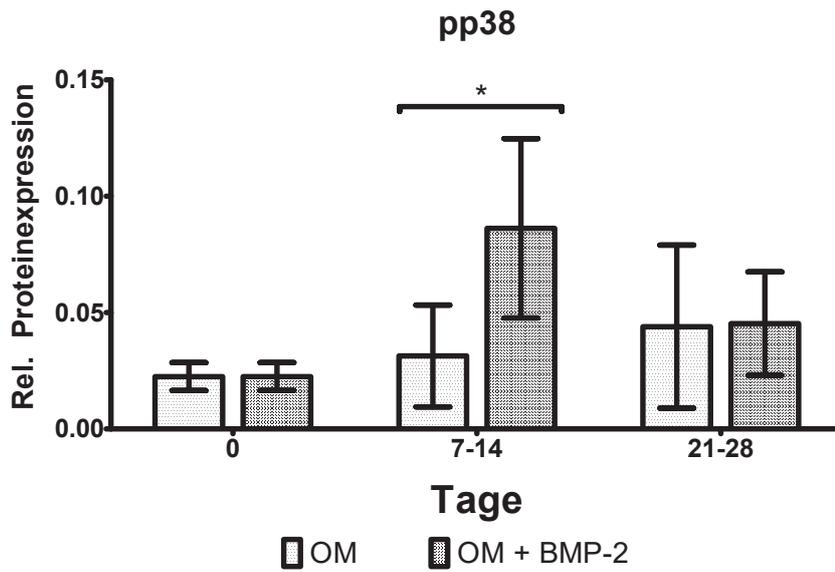


Abbildung 12: Gruppierte Darstellung der relativen Proteinexpression von pp38 (\pm BMP-2). Angegeben ist der *Mean* mit SD. *: $p \leq 0,05$. $n = 2$.

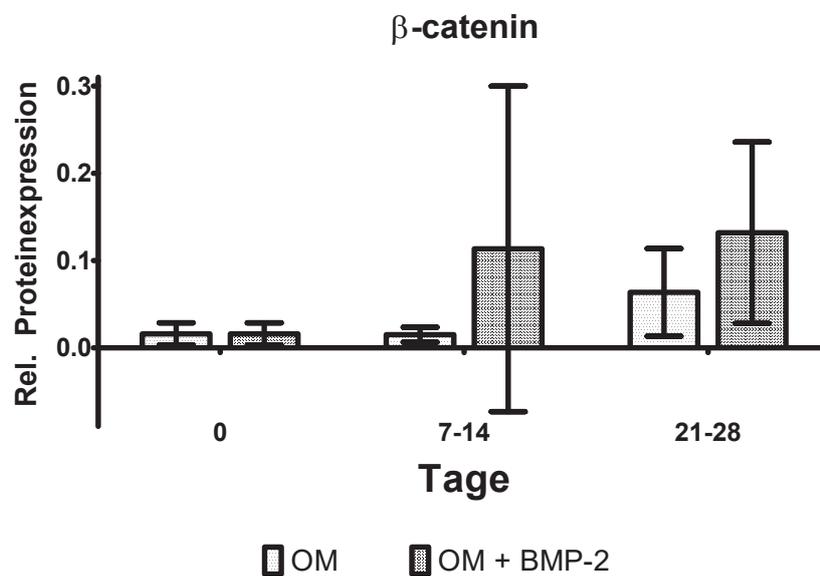


Abbildung 13: Gruppierte Darstellung der relativen Proteinexpression von β -catenin (\pm BMP-2). Angegeben ist der *Mean* mit SD. $n = 2$.

Abbildung 13 stellt die relative Proteinexpression von β -catenin als Schlüsselproteins des Wnt-Signalwegs dar. Über den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte sich die relative Proteinexpression von β -catenin nicht signifikant different. Allerdings konnte eine tendenziell erhöhte Expression von β -catenin in den mit additivem BMP-2 behandelten pASC dokumentiert werden.

Abbildung 14 verdeutlicht die relative Expression von FGFR2 als Schlüsselprotein des FGF-Signalwegs. Es zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

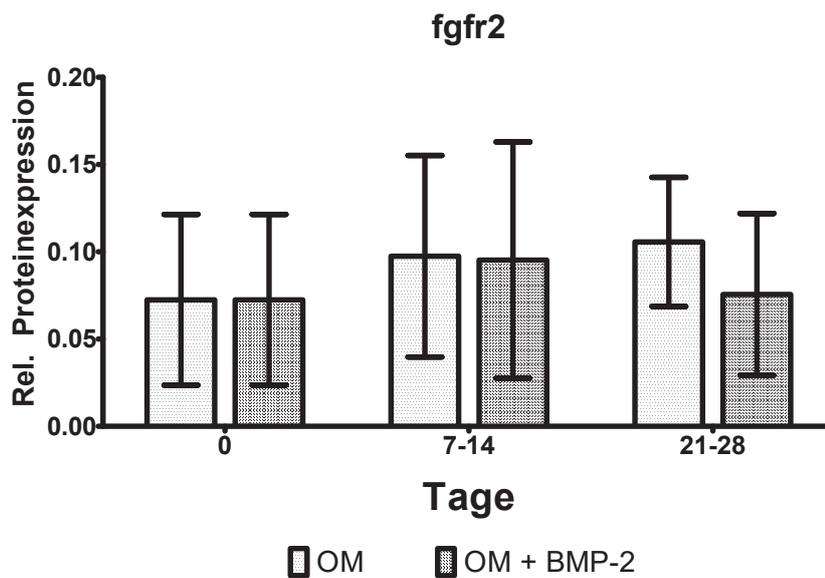


Abbildung 14: Gruppierete Darstellung der relativen Proteinexpression von FGFR2 (\pm BMP-2). Angegeben ist der *Mean* mit SD. n = 2.

4 Diskussion

Die regenerative Medizin eröffnete in den letzten Jahrzehnten durch das *Tissue engineering* ein weites Feld an neuen therapeutischen Möglichkeiten in der Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe. Insbesondere die Verwendung von *in vitro* kultivierten autologen MSC bilden die Grundlage für die erfolgsversprechende Perspektive des *Tissue engineering*s. Durch den Einsatz von autologen MSC können einerseits mechanische und immunologische Risiken überwunden werden. Andererseits können durch die Nutzung von MSC ethische Bedenken im Umgang embryonaler Stammzellen erfolgreich vermieden werden. MSC sind daher zum Gegenstand intensiver Forschung geworden. Bereits im Jahr 2000 konnte am Schafmodell gezeigt werden, dass durch Besiedlung von Hydroxylapatitscaffolds mit BMSC die Regeneration bei *critical size defects* deutlich beschleunigt werden kann (Kon et al. 2000). Weitere Meilensteine folgten. Schon bald zeigte sich jedoch, dass die Gewinnung und der Einsatz von BMSC limitiert ist (Mazini et al. 2019). Insbesondere die geringe Ausbeute und dadurch die Notwendigkeit häufiger oftmals schmerzhafter Knochenmarkaspirationen machte die Suche nach weiteren Quellen mesenchymaler Stromazellen notwendig. Nach Entdeckung und Isolation von Stromazellen aus dem Fettgewebe im Jahr 2001 konnten bereits drei Jahre später ASC erfolgreich zur Behandlung von Knochendefekten an einem siebenjährigen Mädchen eingesetzt werden (Zuk et al. 2001, Lendeckel et al. 2004). Trotz dieses klinischen Erfolgs sind die genauen zugrundeliegenden Mechanismen der Zelldifferenzierung noch nicht geklärt und der klinische Einsatz bisher limitiert. Nur durch Kenntnis der exakten Stoffwechselwege kann die Therapie optimiert und spezifiziert werden. Denn trotz der vielen Vorteile einer MSC-basierten Therapie sind auch Risiken wie das onkogene Potential von Stromazellen zu beachten (Wong 2011). Durch Optimierung der Zelldifferenzierung kann das Outcome verbessert und das Risiko von *adverse effects* vermieden werden. Zur weiteren Untersuchung der beteiligten Signalwege bei der osteogenen Differenzierung von ASC wurde ein Schweinmodell etabliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu humanen ASC die osteogene Differenzierung von porkinen ASC ohne Zusatz von BMP-2 inhibiert ist (Bayraktar et al. 2018). Durch Hinzugabe von BMP-2 zum osteogenen Differenzierungsmedium konnte diese Inhibition aufgehoben werden.

In dieser Arbeit wurde der spezifische Einfluss von BMP-2 auf die erfolgreiche osteogene Differenzierung porkiner ASC evaluiert. Insbesondere wurden der BMP-, MAPK-, Wnt- und der FGF-Signalweg untersucht. Ebenso wurde die Regulation beteiligter Rezeptoren betrachtet. Hierdurch sollte die Aufhebung der Inhibition der osteogenen Differenzierung von ASC im Schweinmodell weiter aufgeklärt und Erkenntnisse über den

Einfluss von BMP-2 auf die erfolgreiche osteogene Differenzierung gewonnen werden. Auf Grundlage dieser Kenntnis der beteiligten Signalwege können zukünftig Therapien zur pathologischen Knochenregeneration entwickelt werden.

4.1 Stammzellcharakter

Gemäß der Definition der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) werden humane MSC auf Grundlage ihrer Plastikadhärenz, der Expression eines spezifischen Oberflächenantigenmusters und durch ihre *In-vitro*-Multipotenz definiert (Dominici et al. 2006). Die Adhäsion an Plastikoberflächen konnte im Verlauf der Proliferationsphase an dem Boden der Zellkulturflaschen beobachtet werden. Ebenso konnte im Verlauf der Differenzierung ein zunehmender Verlust dieser Plastikadhärenz festgestellt werden. In der durchgeführten Durchflusszytometrie in Passage 3 zeigten sich die Zellen aller Spender mit einer Expression von mehr als 75 % positiv für die Oberflächenmarker CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105. Die Oberflächenantigene CD14, CD26, CD31, CD34, CD45, CD79 und HLADR zeigten mit einer Expression von jeweils weniger als 5 % negativ (vgl. Abbildung 1).

Damit präsentierten die Zellen nicht nur die von der ISCT geforderten Oberflächenantigene, es konnten darüber hinaus mit CD29 und CD44 auch weitere, bei Chamberlain et al. 2007 beschriebene für MSC charakteristische Oberflächenmarker nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten in dieser Arbeit die Zellen durch das Fehlen von CD26 von Fibroblasten und durch das Fehlen von CD31 von endothelialen Zellen abgegrenzt werden (Kundrotas 2012, L. Liu et al. 2012). Eine wie in Dominici et al. 2006 für humane MSC beschriebene Trennschärfe von mehr als 95 % und weniger als 2 % konnte nicht erreicht werden. Dies ist einerseits durch die erhöhte Inhomogenität von ASC zu erklären, wie sie bereits Zuk et al. 2001 beschrieb. Zu beachten ist auch, dass die auf dem Markt erhältlichen Antikörper nicht alle speziell für die porcine Spezies entwickelt wurden, eine Kreuzreaktivität von den Herstellern aber beschrieben wurde. Angaben zur tatsächlichen speziesspezifischen Bindungsspezifität der Antikörper stehen aber aus. Hierdurch ist ebenfalls eine tendenziell geringere Trennschärfe zu erklären (Noort et al. 2012).

Die grundsätzliche Möglichkeit der Differenzierung zu Chondroblasten und Adipozyten wurde bereits in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe untersucht (Bayraktar et al. 2018). Auf eine erneute Evaluation wurde daher in dieser Arbeit verzichtet. Somit kann, gemäß der Definition der ISCT, von porcinen Stromazellen gesprochen werden (Horwitz et al. 2005).

4.2 Osteogene Differenzierung

Im Schweinemodell ist die Differenzierung in osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zusatz von BMP-2 inhibiert. In dieser Arbeit soll der Einfluss von additivem BMP-2 auf die Signaltransduktion der erfolgreichen osteogenen Differenzierung von porkinen ASC untersucht werden. Zur Induktion der osteogenen Differenzierung wurden die pASC nach entsprechender Proliferation in Passage 3 mit standardisiertem osteogenem Differenzierungsmedium behandelt (Pittenger et al. 1999). Wenngleich dieses Medium für humane MSC etabliert wurde, konnte in anderen Studien ebenfalls eine erfolgreiche osteogene Differenzierung bei porkinen MSC dokumentiert werden (Noort et al. 2012). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass verschiedene osteogene Differenzierungsmedien in Abhängigkeit der Spezies Einfluss auf die Expression spezifischer Proteine wie Osteopontin oder Osteocalcin haben (Noort et al. 2012). Zur Vergleichbarkeit der Daten wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte osteogene Differenzierungsmedium nach Pittenger et al. 1999 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass porkine ASC im Gegensatz zu humanen ASC zur osteogenen Differenzierung auf BMP-2 angewiesen sind (Bayraktar et al. 2018). In einer Titrationsstudie konnte eine Dosis von 450 ng/ml BMP-2 als Optimum für eine osteogene Differenzierung festgestellt werden (Luong et al. 2012).

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der osteogenen Differenzierung der pASC im standardisierten osteogenen Differenzierungsmedium wurde die Alizarinrot-S-Färbung verwendet (nach Stanford et al. 1995). Durch Bindung des Alizarinrot-S an Calciumionen kann indirekt die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (Puchtler et al. 1969). Hierzu wurden in dieser Arbeit wöchentlich jeweils separat ausgesäte Zellen parallel zu den Versuchsansätzen über einen Zeitraum von 28 Tagen mit Alizarinrot-S angefärbt und anschließend durch photometrische Analyse der Rücklösung in Cetylpyrimidiumchlorid quantifiziert (Gregory et al. 2004).

In den ersten 14 Tagen der Inkubation in den jeweiligen Medien konnte kein Unterschied zwischen der Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und in OM unter Zusatz von BMP-2 gesehen werden. Ab Tag 21 zeigte sich sowohl mikroskopisch als auch photometrisch ein signifikanter positiver Einfluss von BMP-2 auf die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 3). Hingegen zeigten die Zellen unter Inkubation in OM ohne Zusatz von BMP-2 keine Tendenz zur osteogenen Differenzierung. Die osteogene Differenzierung der pASC ist also direkt BMP-2-abhängig. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Bayraktar et al. 2018. Es zeigt sich jedoch auch, dass es im Vergleich zur Arbeit von Bayraktar et al. 2018 in Bezug auf die Geschwindigkeit der osteogenen Differenzierung Unterschiede gibt. Gründe für die beobachtete unterschiedliche Differenzierungsgeschwindigkeit liegen zum einen

im graduellen interindividuellen Differenzierungsprozess, aber auch im Spenderalter, der Passage oder im Zellstress (Nguyen et al. 2012, Elkhenany et al. 2016). Aus diesem Grund wurden im Folgenden die Ergebnisse entsprechend der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix nach Tagen gruppiert.

4.3 Beeinflussung der Signalwege

Zunächst wurde die Expression der BMP- und TGF-Rezeptoren evaluiert. Insbesondere von Interesse sind die BMPR-I ALK2 und ALK6, welche zusammen mit BMPR-II die intrazelluläre Signalantwort von BMP vermitteln (Zhao, Harris et al. 2002, W. Singhatanadgit et al. 2008). Erwartungsgemäß konnte in der vorliegenden Arbeit die Expression des BMPR-I ALK6 durch Zugabe von BMP-2 sukzessiv über den Untersuchungszeitraum hinweg signifikant gesteigert werden, ein signifikanter Unterschied zur OM-Gruppe ergab sich dabei jedoch nicht (vgl. Abbildung 5). Für ALK2 ist wie für ALK6 in der späten Phase der osteogenen Differenzierung unter BMP-2-Einfluss lediglich eine tendenzielle Expressionssteigerung gegenüber der OM-Gruppe zu erkennen (vgl. Abbildung 4). Auch wenn ALK6 bei der BMP-2-induzierten Osteogenese grundsätzlich von essentieller Bedeutung zu sein scheint (Zhao, Harris et al. 2002, W. Singhatanadgit et al. 2008), so konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss auf die frühe Induktion der osteogenen Differenzierung dokumentiert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die charakteristischen TGF- β -Rezeptoren ALK4 und ALK7 im Gegensatz zu den BMP-spezifischen Rezeptoren ALK2 und ALK6 nicht relevant durch BMP-2 beeinflusst werden (vgl. Abbildung 6 und 8). Bei ALK4 konnte eine sukzessive BMP-2-unabhängige Inhibition über 28 Tage hinweg dokumentiert werden. Eine möglicherweise durch die Inhaltsstoffe von OM vermittelte Regulation von ALK4 wurde bisher nicht beschrieben. Zur Klärung dieser Beobachtung sind weitere Untersuchungen notwendig.

Auf den ersten Blick verwunderlich erscheint die späte signifikante Induktion des TGF- β -Rezeptors ALK5 durch BMP-2 (vgl. Abbildung 7). Holtzhausen et al. 2014 konnte nachweisen, dass durch Bindung von BMP-2 an heteromeren Rezeptorkomplexen aus je einem BMP-Rezeptor-I und TGF- β -Rezeptor-I sowie zwei TGF- β -Rezeptor-II ein *crossstalk* zum TGF- β -Signalweg besteht. Hierbei konnten unter Einfluss von BMP-2 Komplexe u. a. aus BMPR-II und ALK5 sowie ALK3 und ALK5 beschrieben werden. Durch Bindung von BMP-2 an diese Rezeptorkomplexe konnte eine Phosphorylierung von smad2 und smad3 beobachtet und damit eine Interaktion mit dem TGF- β -Signalweg dokumentiert werden.

Es zeigt sich also, dass die Rezeptoren des BMP-Signalwegs unter Einfluss von BMP-2

erst spät tendenziell hochreguliert werden. Ein *crossstalk* zum TGF- β -Signalweg besteht über den Rezeptor ALK5.

Zur Evaluation der Beeinflussung der osteogenen Differenzierung von pASC durch BMP-2 wurden insbesondere der BMP-, der Wnt-, der MAPK- und der FGF-Signalweg untersucht. Hierzu wurde die Expression der spezifischen Signalmoleküle (vgl. Tabelle 11) in Abhängigkeit der BMP-2-Exposition gemessen. Anhand dieser Proteinexpressionen sind Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Signalwege möglich.

Zur Betrachtung des BMP- und des TGF- β -Signalwegs wurde die Expression des Schlüsselproteins smad4 untersucht. Dieses Molekül vermittelt den Transfer des Komplexes aus smad1, smad5 und smad8 bzw. smad2 und smad3 in den Nukleus der Zelle (Moustakas 2002, Karner et al. 2017). Im Nukleus reguliert der Komplex durch Bindung an das *smad binding element* (SBE) die Gentranskription via Dlx5 und Runx2 (Rahman et al. 2015). Bisher wurde kein Blockierungspuffer für den Antikörper gegen smad4 bei pASC beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Nachweis von smad4 in pASC auf Proteinexpressionsebene etabliert (vgl. Abbildung 10). Es konnte weiter gezeigt werden, dass durch Zugabe von BMP-2 zum Differenzierungsmedium (OM) die Expression von smad4 in pASC ab Tag 21 signifikant inhibiert wurde. Zuvor gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen in der Expression von smad4 (vgl. Abbildung 11). Die Addition von BMP-2 zum OM führte also nicht durch Expressionsänderung von smad4 zur Aufhebung der osteogenen Differenzierung von pASC. Gleichwohl ist smad4 für die Knochenbildung und Regulation derselben grundsätzlich von Bedeutung (Tan et al. 2007). Erst in der Spätphase der osteogenen Differenzierung war in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Inhibition von smad4 unter Einfluss von BMP-2 zu erkennen. Durch Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen könnte der TGF- β -Signalweg inhibiert werden (Zhao, Mishra et al. 2018). So wurde gezeigt, dass der p38-MAPK-Signalweg zu einer Phosphorylierung multipler Mediatoren einschließlich smad4 und schließlich zu einem konsekutiven Abbau von smad4 führt (Guo et al. 2009). Eine Inhibition von smad4 verstärkt die proliferative Wirkung des Wnt-Signalwegs auf mesenchymale Stromazellen (Salazar et al. 2013). Gleichzeitig induziert BMP-2 die Expression von β -catenin, ebenso wie eine Aktivierung des Wnt-Signalweges zu einer Expressionssteigerung von BMP-2 führt (Jesus Perez et al. 2009, R. Zhang et al. 2013). Passend hierzu ist eine tendenzielle Induktion von β -catenin über den gesamten Untersuchungszeitraum zu beobachten (vgl. Abbildung 13). Interessanterweise werden die Rezeptoren des TGF- β -Signalwegs in der späten Phasen tendenziell hoch- statt herunterreguliert. Dies lässt vermuten, dass der TGF- β -Signalweg smad-unabhängig weiterleitet, wie Yu et al. 2002 es bereits zeigen konnte. Zusammenfassend spielte smad4 bei der durch

BMP-2 induzierte Aufhebung der initialen Inhibition der osteogenen Differenzierung keine Rolle. Durch welche Signalwege die Inhibition von smad4 selbst in der späten Phase vermittelt wurde kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Für den kanonischen Wnt-Signalweg wurde die Expression des Proteins β -catenin gemessen. Dieses Schlüsselprotein bindet nach Aktivierung an den Transkriptionsfaktor LEF / TCF und reguliert hierüber die Transkription (Duan et al. 2016). Durch Aktivierung von Runx2, Dlx5 und Osterix induziert der Wnt-Signalweg die Osteogenese und inhibiert darüber hinaus die Transkription von adipogenen Transkriptionsfaktoren (Einhorn und Gerstenfeld 2015). Ebenso führt eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs zur verminderten Degradation von smad-Molekülen und somit zur Stabilisierung des BMP-Signalwegs (Fuentelba et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Addition von BMP-2 über den gesamten Untersuchungszeitraum β -catenin tendenziell hochreguliert wird (vgl. Abbildung 13). Für diesen Effekt konnte jedoch keine Signifikanz nachgewiesen werden. Durch Komplexbildung von R-Smads, β -catenin und LEF / TCF regulieren sowohl der BMP-Signalweg als auch der Wnt-Signalweg synergistisch die Transkriptionsfaktoren der gleichen Zielgene in Osteoblasten (R. Zhang et al. 2013). Für diese Wechselwirkung konnte eine deutlich gesteigerte Stimulation der Aktivität der alkalischen Phosphatase, der Expression von Osteocalcin und eine gesteigerte Mineralisation der extrazellulären Matrix beschrieben werden (Mbalaviele et al. 2005). Es bestehen also Hinweise darauf, dass durch Zugabe von BMP-2 zum osteogenen Differenzierungsmedium die Expression von β -catenin induziert und hierüber die osteogene Differenzierung der pASC verstärkt werden könnte.

Als Schlüsselprotein für den p38-MAPK-Signalweg wurde die Expression von pp38 untersucht. Der p38-MAPK-Signalweg ist über die Regulation der Transkriptionsfaktoren Runx2, Dlx5 und Osterix an der Induktion der Osteoblastendifferenzierung wesentlich beteiligt (Jaiswal et al. 2000, G. Chen et al. 2012, Rodríguez-Carballo et al. 2016). Der p38-MAPK-Signalweg verstärkt insbesondere die BMP-2-vermittelte Expression von Osteocalcin, alkalischer Phosphatase, Typ I-Kollagen, Fibronectin und Osteopontin (Guichoux et al. 2003, Lai et al. 2002). Eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs wurde bereits 2002 beschrieben (Nöth et al. 2003). Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Protein pp38 unter Einfluss von BMP-2 in der frühen Phase bis Tag 14 signifikant verstärkt exprimiert wird (vgl. Abbildung 12). Nach Einsetzen der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix ab Tag 21 besteht kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Versuchsgruppen. Dies bedeutet, dass der zugrundeliegende pp38-MAPK-Signalweg in der Frühphase der osteogenen Differenzierung aktiviert wird und durch BMP-2 induziert werden kann. Ein entsprechend positiver Einfluss von pp38 auf

die osteogene Differenzierung konnte bereits zuvor beobachtet werden (Elkhenany et al. 2016). Die Beeinflussung von ERK und JNK durch BMP-2 wird kontrovers diskutiert (Lai et al. 2002, Guicheux et al. 2003, Elkhenany et al. 2016).

Zur Evaluation des FGF-Signalwegs wurde die Expression des Rezeptors FGFR2 unter fakultativem Einfluss von BMP-2 untersucht. FGF2 induziert die Differenzierung von Osteoblasten und hat eine entscheidende Bedeutung im Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten (Ikpegbu et al. 2018, Ornitz und Marie 2015). Ohne den Einfluss von FGF2 bleibt das Knochenvolumen und die Mineralisierung der extrazellulären Matrix vermindert (Montero et al. 2000). Insbesondere konnte bereits gezeigt werden, dass FGF2 zusammen mit BMP-2 die Osteogenese induziert (Hanada et al. 1997, Kuhn et al. 2013). Hierbei führt FGF2 zur Expression von BMP-2 und TGF- β (Farhadi et al. 2005). Ebenso wird durch die FGF2-vermittelte Expressionssteigerung des BMP-Rezeptors BMPRII die Signalantwort von BMP-2 verstärkt (Weerachai Singhatanadgit et al. 2006, Gronowicz et al. 2014). Die Addition von BMP-2 hat über den gesamten Zeitraum keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des Rezeptors FGFR2 (vgl. Abbildung 14). Zwar ist FGF2 grundsätzlich für die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stromazellen von Bedeutung, dieser Signalweg scheint aber nicht an der Überwindung der Inhibition der osteogenen Differenzierung von pASC beteiligt zu sein.

4.4 Schlussfolgerungen

Es konnte gezeigt werden, dass die osteogene Differenzierung von pASC von BMP-2 essentiell abhängig ist (vgl. Abbildung 3). In dem osteogenem Differenzierungsmedium, wie von Pittenger et al. 1999 beschrieben, ist die osteogene Differenzierung der pASC inhibiert (Bayraktar et al. 2018). Nur unter Zusatz von BMP-2 konnte eine Kalzifizierung der extrazellulären Matrix und damit eine osteogene Differenzierung von pASC nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 2). Die kontinuierliche Zugabe von BMP-2 führt zu einer sukzessiven Hochregulation des BMP-spezifischen Rezeptors ALK6 (vgl. Abbildung 5). Über den Rezeptor ALK5 des TGF- β -Signalwegs ist ein *crossstalk* zu diesem Signalweg ab Tag 19 zu erkennen (vgl. Abbildung 7). Die erfolgreiche osteogene Differenzierung, welche durch Zugabe von BMP-2 zu dem osteogenem Differenzierungsmedium erreicht werden konnte, wird dagegen weniger durch den BMP-Signalweg direkt selbst vermittelt. Das zugehörige Schlüsselprotein smad4 wird während des Untersuchungszeitraums entgegen der Erwartung nicht hochreguliert, sondern inhibiert (vgl. Abbildung 11). Vielmehr scheint eine frühe BMP-2 vermittelte Induktion des p38-MAPK-Signalwegs für die osteogene Differenzierung von Bedeutung zu sein (vgl. Abbildung 12). Der Wnt-Signalweg scheint tendenziell unter BMP-2-Einfluss hochreguliert zu werden, eine solche Tendenz

ist jedoch nicht als signifikant zu werten (vgl. Abbildung 13). Diese Tendenz besteht über den gesamten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Die Zugabe von BMP-2 scheint den FGF-Signalweg nicht zu beeinflussen (vgl. Abbildung 14).

4.5 Kritische Betrachtung

In dieser Arbeit wurde die erfolgreiche osteogene Differenzierung mit der unter fehlendem BMP-2 inhibierten Differenzierung von pASC verglichen. Insbesondere wurde der Einfluss der für die osteogene Differenzierung relevanten Signalwege *in vitro* untersucht. Ferner wurde evaluiert, inwiefern die für die Signalwege spezifischen Rezeptoren durch BMP-2 im Verlauf der osteogenen Differenzierung moduliert werden. Nguyen et al. 2012 zeigte, dass MSC in einer *In-vitro*-Kultur einer Selektion nach Adaptationsfähigkeiten unterliegen und die Differenzierung derselben hierunter beeinträchtigt sein kann. Daher ist ein Vergleich zur *In-vivo*-Differenzierung notwendig. Dabei ist das hier zugrundeliegende Minipig-Modell bereits gut etabliert und eine osteogene Vergleichbarkeit von humanen und porkinen MSC *in vitro* beschrieben (Bayraktar et al. 2018, Noort et al. 2012). Es ist dabei aber immer zu beachten, dass die osteogene Differenzierung speziesspezifischen und altersspezifischen Besonderheiten unterliegt (Kuhn et al. 2013). Insbesondere bleibt weiterhin zu beachten, dass das Hinzufügen von BMP-2 nur bei porkinen ASC und nicht bei humanen ASC zur osteogenen Differenzierung essentiell ist. Dennoch ergibt sich auch im menschlichen Organismus eine therapeutische Relevanz von BMP-2. Insgesamt ist zur weiteren Untersuchung der Bedeutung der Signalwege eine höhere Anzahl an Spendertieren zu empfehlen, um individuelle und statistische Fehler zu minimieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben vielmehr Hinweise auf die der osteogenen Differenzierung zugrundeliegenden Mechanismen. Bei der Evaluation von Signalwegen ist eine weitere Untersuchung der Inhibition derselben notwendig, um die essentielle Notwendigkeit der beteiligten Signalwege zu spezifizieren. Durch entsprechende spezifische Inhibition der Schlüsselproteine der Signalwege wäre ein Rückschluss auf die Effekte einzelner Signaltransduktionen möglich. Ebenso würde eine weitere Untersuchung der Zielgene der Signalwege (bspw. durch spezifische Knock-Out-Versuche) einen genaueren Überblick über den Einfluss von BMP-2 auf die osteogene Differenzierung geben. Es ist hierbei zu beachten, dass in dieser Arbeit vier Signalwege untersucht wurden, bei denen eine enge Interaktion mit BMP-2 bereits beschrieben wurde. Es sind darüber hinaus Interaktionen mit weiteren Signalwegen bekannt, die ebenso Einfluss auf die osteogene Differenzierung haben (G. Chen et al. 2012). Es ist also zu empfehlen, auch diese weiteren Signalwege auf spezifische Einflüsse von BMP-2 hin zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der osteogenen Differenzierung BMP-2

in einer gleichen Dosis ergänzt. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass der Effekt von Zytokinen wie BMP-2 vom Zeitpunkt der Supplementation und der zeitabhängigen Dosierung abhängt (Hanada et al. 1997). Für einen spezifischen und nebenwirkungsarmen klinischen Einsatz ist es unabdingbar, die notwendige Behandlungsdauer mit BMP-2 weiter aufzuschlüsseln.

4.6 Ausblick

Zur Behandlung von *critical size defects* bleibt das *tissue engineering* ein vielversprechender therapeutischer Ansatz. Die osteogene *In-vitro*-Differenzierung von autologen MSC unterschiedlicher Gewebeherkunft ist dabei ein Themenfeld intensiver Forschung. Für den sicheren klinischen Einsatz ist die Aufschlüsselung der zugrundeliegenden Mechanismen der osteogenen Differenzierung von großer Bedeutung. Durch Optimierung der osteogenen Differenzierung *in vitro* kann die Anzahl der benötigten Zellen und die Menge von Substanzen zur Induktion der osteogenen Differenzierung reduziert und potenzielle Nebenwirkungen hierdurch möglichst vermindert werden (Arthur et al. 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit über mögliche Einflüsse von BMP-2 auf die vier relevantesten Signalwege bei der osteogenen Differenzierung von pASC zeigen eindrucksvoll die Interaktionen der an der Aufhebung der Inhibition der osteogenen Differenzierung von pASC im standardisierten osteogenen Differenzierungsmedium auf. Es konnte dargestellt werden, dass insbesondere die frühe Induktion des p38-MAPK-Signalwegs und eine tendenziell stetige Induktion des Wnt-Signalwegs bei der BMP-2-vermittelten Induktion der osteogenen Differenzierung eine große Bedeutung haben. Hierbei konnte insbesondere nicht nur ein qualitativer Nachweis der Interaktion gewonnen werden, sondern auch ein Überblick über die Zeitachse der Wechselwirkungen geschaffen werden. Diese Erkenntnisse sind von besonderer Bedeutung für die Übertragung *in vivo* im Schweinmodell und für die spätere klinische Anwendung. Insbesondere ist es durch Kenntnis der beteiligten Signalwege möglich, einen Schritt weiter in Richtung personalisierter Medizin zu gehen, und zukünftig Therapien individuell an die Patienten anzupassen (Mazini et al. 2019).

Literatur

- Arthur, Agnieszka, Andrew Zannettino und Stan Gronthos (2009). „The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair“. In: *Journal of Cellular Physiology* 218.2, S. 237–245. DOI: 10.1002/jcp.21592. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jcp.21592>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.21592>.
- Bayraktar, Samet et al. (Jan. 2018). „Molecular- and microarray-based analysis of diversity among resting and osteogenically induced porcine mesenchymal stromal cells of several tissue origin.“ eng. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 12 (1), S. 114–128.
- Buchtova, Marcela et al. (2015). „Fibroblast growth factor and canonical WNT/ -catenin signaling cooperate in suppression of chondrocyte differentiation in experimental models of FGFR signaling in cartilage“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852.5, S. 839–850. ISSN: 0925-4439. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.020>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443914004141>.
- Busch, André et al. (Juni 2021). „Bone Substitutes in Orthopaedic Surgery: Current Status and Future Perspectives.“ eng. In: *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 159 (3), S. 304–313.
- Byun, Mi Ran et al. (2014). „FGF2 stimulates osteogenic differentiation through ERK induced TAZ expression“. In: *Bone* 58, S. 72–80. ISSN: 8756-3282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.09.024>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328213003827>.
- Caplan, Arnold I. (1990). „Cell delivery and tissue regeneration“. In: *Journal of Controlled Release* 11.1, S. 157–165. ISSN: 0168-3659. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(90\)90129-H](https://doi.org/10.1016/0168-3659(90)90129-H). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016836599090129H>.
- (2007). „Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine“. In: *Journal of Cellular Physiology* 213.2, S. 341–347. DOI: 10.1002/jcp.21200. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jcp.21200>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.21200>.
- (Juni 2017). „Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!“ eng. In: *Stem cells translational medicine* 6 (6), S. 1445–1451.
- Chamberlain, Giselle et al. (2007). „Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Ho-

- ming“. In: *STEM CELLS* 25.11, S. 2739–2749. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0197. eprint: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1634/stemcells.2007-0197>. URL: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/stemcells.2007-0197>.
- Chen, Di, Ming Zhao und Gregory R. Mundy (2004). „Bone Morphogenetic Proteins“. In: *Growth Factors* 22.4, S. 233–241.
- Chen, Guiqian, Chuxia Deng und Yi-Ping Li (2012). „TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation.“ eng. In: *International journal of biological sciences* 8 (2), S. 272–88.
- Clevers, Hans (Nov. 2006). „Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.“ eng. In: *Cell* 127 (3), S. 469–80.
- Day, Timothy F. et al. (2005). „Wnt/ -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis“. In: *Developmental Cell* 8.5, S. 739–750. ISSN: 1534-5807. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.016>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580705001061>.
- Deschaseaux, Frederic, Luc Sensebe und Dominique Heymann (Sep. 2009). „Mechanisms of bone repair and regeneration.“ eng. In: *Trends in molecular medicine* 15 (9), S. 417–29.
- Dominici, M. et al. (2006). „Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.“ eng. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–7.
- Duan, Peipei und L. F. Bonewald (Aug. 2016). „The role of the wnt/ -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth.“ eng. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 77 (Pt A), S. 23–29.
- Einhorn, Thomas A. (1998). „The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing“. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355, S7–S21. URL: https://journals.lww.com/clinorthop/Fulltext/1998/10001/The_Cell_and_Molecular_Biology_of_Fracture_Healing.3.aspx.
- Einhorn, Thomas A. und Louis C. Gerstenfeld (Jan. 2015). „Fracture healing: mechanisms and interventions.“ eng. In: *Nature reviews. Rheumatology* 11 (1), S. 45–54.
- Elkhenany, Hoda et al. (2016). „Impact of the source and serial passaging of goat mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation potential: implications for bone tissue engineering.“ eng. In: *Journal of animal science and biotechnology* 7, S. 16.

- European Commission (Okt. 2001). „Opinion on the State of the Art Concerning Tissue Engineering“. In: *The Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices*, S. 2.
- Farhadi, Jian et al. (Okt. 2005). „Differentiation-dependent up-regulation of BMP-2, TGF-beta1, and VEGF expression by FGF-2 in human bone marrow stromal cells.“ eng. In: *Plastic and reconstructive surgery* 116 (5), S. 1379–86.
- Fei, Yurong, Gloria Gronowicz und Marja M. Hurley (Apr. 2013). „Fibroblast Growth Factor-2, Bone Homeostasis and Fracture Repair“. In: *Current Pharmaceutical Design* 19.19, S. 3354–3363. DOI: 10.2174/1381612811319190002.
- Franceschi, Renny T. und Chunxi Ge (Juni 2017). „Control of the Osteoblast Lineage by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling.“ eng. In: *Current molecular biology reports* 3 (2), S. 122–132.
- Friedenstein, A. J. et al. (März 1968). „Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.“ In: *Transplantation* 6 (2), S. 230–47.
- Fuentealba, Luis C. et al. (Nov. 2007). „Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal.“ eng. In: *Cell* 131 (5), S. 980–93.
- Gelinsky, Michael et al. (2011). „Stem cell Engineering for Regeneration of Bone Tissue“. In: *Stem Cell Engineering - Principles and Applications*. Hrsg. von Gerhard M. Artmann, Stephen Minger und Jürgen Hescheler. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 383–393.
- Gerstenfeld, Louis C. et al. (1987). „Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts“. In: *Developmental Biology* 122.1, S. 49–60. ISSN: 0012-1606. DOI: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90331-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90331-9). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160687903319>.
- Glass, Donald A. und Gerard Karsenty (2006). „Molecular Bases of the Regulation of Bone Remodeling by the Canonical Wnt Signaling Pathway“. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Bd. 73. Current Topics in Developmental Biology. Academic Press, S. 43–84. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)73002-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)73002-7). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215305730027>.
- Greenblatt, Matthew B., Jae-Hyuck Shim und Laurie H. Glimcher (2013). „Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts.“ eng. In: *Annual review of cell and developmental biology* 29, S. 63–79.
- Greenblatt, Matthew B., Jae-Hyuck Shim, Weiguo Zou et al. (Juli 2010). „The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice.“ eng. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (7), S. 2457–73.

- Gregory, Carl A. et al. (Juni 2004). „An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction.“ eng. In: *Analytical biochemistry* 329 (1), S. 77–84.
- Gronowicz, Gloria, Marja M. Hurley und Liisa T. Kuhn (2014). „Optimizing BMP-2-induced bone repair with FGF-2.“ In: *JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 22.10. ISSN: 1067-151X. URL: https://journals.lww.com/jaaos/Fulltext/2014/10000/Optimizing_BMP_2_induced_bone_repair_with_FGF_2.9.aspx.
- Guicheux, J. et al. (Nov. 2003). „Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation.“ eng. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18 (11), S. 2060–8.
- Guo, Xing und Xiao-Fan Wang (Jan. 2009). „Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways.“ eng. In: *Cell research* 19 (1), S. 71–88.
- Haeckel, Ernst (1879). *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. 7. Auflage. Berlin: Reimer. Kap. XVI: Stammbaum und Geschichte des Protistenreichs, S. 368.
- Hammer, C. und J. Bujía (1992). „Immunologie vitaler und konservierter Transplantate.“ In: *Teil I: Referate*. Hrsg. von Claus Herberhold. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 3–26. ISBN: 978-3-642-84669-4.
- Hanada, K., J. E. Dennis und A. I. Caplan (Okt. 1997). „Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells.“ eng. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12 (10), S. 1606–14.
- Hollinger, Jeffrey und Mark E.K. Wong (1996). „The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing.“ In: *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 82.6, S. 594–606. ISSN: 1079-2104. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(96\)80431-8](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(96)80431-8). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210496804318>.
- Holtzhausen, Alisha et al. (2014). „Novel bone morphogenetic protein signaling through Smad2 and Smad3 to regulate cancer progression and development.“ In: *The FASEB Journal* 28.3, S. 1248–1267. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.13-239178>. eprint: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1096/fj.13-239178>. URL: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.13-239178>.

- Horwitz, E.M. et al. (2005). „Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement“. In: *Cytotherapy* 7.5, S. 393–395. ISSN: 1465-3249. DOI: <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324905708276>.
- Ikpegbu, Ekele et al. (Juli 2018). „FGF-2 promotes osteocyte differentiation through increased E11-podoplanin expression“. eng. In: *Journal of cellular physiology* 233.29215722, S. 5334–5347. ISSN: 0021-9541. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5900964/>.
- Jaiswal, R. K. et al. (März 2000). „Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase.“ eng. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (13), S. 9645–52.
- Jesus Perez, Vinicio A. de et al. (Jan. 2009). „Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways.“ eng. In: *The Journal of cell biology* 184 (1), S. 83–99.
- Jin, Min, Xiaolan Du und Lin Chen (2012). „Cross-talk between FGF and other cytokine signalling pathways during endochondral bone development“. In: *Cell Biology International* 36.8, S. 691–696. DOI: 10.1042/CBI20110352. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1042/CBI20110352>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1042/CBI20110352>.
- Jungbluth, Pascal et al. (2010). „Platelet-rich plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs“. In: *Journal of Orthopaedic Research* 28.11, S. 1448–1455. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.21152>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jor.21152>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jor.21152>.
- Karner, Courtney M., Seung-Yon Lee und Fanxin Long (Feb. 2017). „Bmp Induces Osteoblast Differentiation through both Smad4 and mTORC1 Signaling“. eng. In: *Molecular and cellular biology* 37.27920253, e00253–16. ISSN: 0270-7306. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5288572/>.
- Keating, Armand (2012). „Mesenchymal Stromal Cells: New Directions“. In: *Cell Stem Cell* 10.6, S. 709–716. ISSN: 1934-5909. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590912002494>.
- Keating, J. F., A. H. R. W. Simpson und C. M. Robinson (2005). „The management of fractures with bone loss“. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* 87-B.2, S. 142–150. DOI: 10.1302/0301-620X.87B2.15874. eprint: <https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B2.15874>.

- org/10.1302/0301-620X.87B2.15874. URL: <https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B2.15874>.
- Kfoury, Youmna und David T. Scadden (2015). „Mesenchymal Cell Contributions to the Stem Cell Niche“. In: *Cell Stem Cell* 16.3, S. 239–253. ISSN: 1934-5909. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.019>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590915000752>.
- Knoblich, J. A. (Jan. 2001). „Asymmetric cell division during animal development.“ eng. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (1), S. 11–20.
- Kobayashi, Hirohiko et al. (2000). „Multilineage Differentiation of Cbfa1-Deficient Calvarial Cells in Vitro“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273.2, S. 630–636. ISSN: 0006-291X. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2981>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X00929814>.
- Komori, Toshihisa (Apr. 2019). „Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2.“ eng. In: *International journal of molecular sciences* 20 (7).
- Kon, E. et al. (März 2000). „Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones.“ eng. In: *Journal of biomedical materials research* 49 (3), S. 328–37.
- Kuhn, Liisa T. et al. (Okt. 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“. eng. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 68.23531867, S. 1170–1180. ISSN: 1079-5006. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826858/>.
- Kundrotas, Gabrielis (Juni 2012). „Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts“. In: *Acta medica Lituanica* 19, S. 75–79. DOI: 10.6001/actamedica.v19i2.2313.
- Lai, Chung-Fang und Su-Li Cheng (2002). „Signal Transductions Induced by Bone Morphogenetic Protein-2 and Transforming Growth Factor- in Normal Human Osteoblastic Cells“. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.18, S. 15514–15522. DOI: 10.1074/jbc.M200794200. eprint: <http://www.jbc.org/content/277/18/15514.full.pdf+html>. URL: <http://www.jbc.org/content/277/18/15514.abstract>.
- Lanza, Robert et al., Hrsg. (2004). *Handbook of stem cells*. Bd. 1. Elsevier Academic Press.
- Lecanda, Fernando, Louis V. Avioli und Su-Li Cheng (1997). „Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2“. In: *Journal of Cellular*

- Biochemistry* 67.3, S. 386–398. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(19971201)67:3<386::AID-JCB10>3.0.CO;2-B. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/%28SICI%291097-4644%2819971201%2967%3A3%3C386%3A%3AAID-JCB10%3E3.0.CO%3B2-B>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-4644%2819971201%2967%3A3%3C386%3A%3AAID-JCB10%3E3.0.CO%3B2-B>.
- Lee, Kyeong-Sook, Seung-Hyun Hong und Suk-Chul Bae (Okt. 2002). „Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor- and bone morphogenetic protein“. In: *Oncogene* 21.47, S. 7156–7163. ISSN: 1476-5594. URL: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205937>.
- Lendeckel, Stefan et al. (2004). „Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report“. In: *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 32.6, S. 370–373. ISSN: 1010-5182. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2004.06.002>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010518204001015>.
- Lindner, Ulrich et al. (Apr. 2010). „Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology?“ eng. In: *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhaematologie* 37 (2), S. 75–83.
- Liu, Guizhong et al. (Dez. 2012). „Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells“. In: *J Cell Biol* 185.1, S. 67–75. ISSN: 0021-9525. URL: <https://doi.org/10.1083/jcb.200810137>.
- Liu, Li und Guo-Ping Shi (Apr. 2012). „CD31: beyond a marker for endothelial cells.“ eng. In: *Cardiovascular research*. Bd. 94. England, S. 3–5.
- Liu, Tingjiao et al. (Juni 2007). „BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines.“ eng. In: *Journal of cellular physiology* 211 (3), S. 728–35.
- Loken, Michael R. und Leonard A. Herzenberg (1975). „ANALYSIS OF CELL POPULATIONS WITH A FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTER*“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 254.1, S. 163–171. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb29166.x. eprint: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1749-6632.1975.tb29166.x>. URL: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1975.tb29166.x>.
- Luong, Linh N., Janani Ramaswamy und David H. Kohn (Jan. 2012). „Effects of osteogenic growth factors on bone marrow stromal cell differentiation in a mineral-based delivery system.“ eng. In: *Biomaterials* 33 (1), S. 283–94.

- Macias, Maria J., Pau Martin-Malpartida und Joan Massagué (Juni 2015). „Structural determinants of Smad function in TGF- signaling.“ eng. In: *Trends in biochemical sciences* 40 (6), S. 296–308.
- Marie, Pierre J. (2008). „Transcription factors controlling osteoblastogenesis“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473.2. Highlight Issue: Bone Remodeling: Facts and Perspectives, S. 98–105. ISSN: 0003-9861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.030>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986108001045>.
- Massagué, Joan (Dez. 2000). „How cells read TGF- signals“. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1.3, S. 169–178. ISSN: 1471-0080. URL: <https://doi.org/10.1038/35043051>.
- Maximow, Alexander (1909). „Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere“. In: *Folia Haematologica* 8, S. 125–134.
- Mazini, Loubna et al. (2019). „Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs)“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20.10. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms20102523. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2523>.
- Mbalaviele, Gabriel et al. (Feb. 2005). „Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation“. eng. In: *Journal of cellular biochemistry* 94.15526274, S. 403–418. ISSN: 1097-4644. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647989/>.
- Mitchell, James B. et al. (2006). „Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers“. In: *STEM CELLS* 24.2, S. 376–385. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0234. eprint: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1634/stemcells.2005-0234>. URL: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1634/stemcells.2005-0234>.
- Montero, A. et al. (Apr. 2000). „Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation“. eng. In: *The Journal of clinical investigation* 105.10772653, S. 1085–1093. ISSN: 0021-9738. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC300831/>.
- Moon, Randall T. et al. (2002). „The Promise and Perils of Wnt Signaling Through - Catenin“. In: *Science* 296.5573, S. 1644–1646. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1071549. eprint: <https://science.sciencemag.org/content/296/5573/1644.full.pdf>. URL: <https://science.sciencemag.org/content/296/5573/1644>.

- Mori-Akiyama, Yuko et al. (Aug. 2003). „Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest.“ eng. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16), S. 9360–5.
- Morrison, Sean J., Nirao M. Shah und David J. Anderson (7. Feb. 1997). „Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology“. In: *Cell* 88, S. 287–298.
- Moustakas, Aristidis (2002). „Smad signalling network“. In: *Journal of Cell Science* 115.17, S. 3355–3356. ISSN: 0021-9533.
- Moustakas, Aristidis und Carl-Henrik Heldin (2002). „From mono- to oligo-Smads: The heart of the matter in TGF- signal transduction“. In: *Genes & Development* 16.15, S. 1867–1871.
- Muraglia, A., R. Cancedda und R. Quarto (2000). „Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model“. In: *Journal of Cell Science* 113.7, S. 1161–1166. ISSN: 0021-9533. eprint: <https://jcs.biologists.org/content/113/7/1161.full.pdf>. URL: <https://jcs.biologists.org/content/113/7/1161>.
- Nauth, Aaron et al. (2018). „Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment?“ In: *Journal of Orthopaedic Trauma* 32. ISSN: 0890-5339. URL: https://journals.lww.com/jorthotrauma/Fulltext/2018/03003/Critical_Size_Bone_Defects_Is_There_a_Consensus.2.aspx.
- Nguyen, H.T., M. Geens und C. Spits (Dez. 2012). „Genetic and epigenetic instability in human pluripotent stem cells“. In: *Human Reproduction Update* 19.2, S. 187–205. ISSN: 1355-4786. DOI: 10.1093/humupd/dms048. eprint: <http://oup.prod.sis.lan/humupd/article-pdf/19/2/187/1562700/dms048.pdf>. URL: <https://doi.org/10.1093/humupd/dms048>.
- Noort, W. A. et al. (Aug. 2012). „Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation.“ eng. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 16 (8), S. 1827–39.
- Nöth, Ulrich et al. (Nov. 2003). „Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts.“ eng. In: *Experimental cell research* 291 (1), S. 201–11.
- Ornitz, David M. und Nobuyuki Itoh (2015). „The Fibroblast Growth Factor signaling pathway“. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4.3, S. 215–266. DOI: 10.1002/wdev.176. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/wdev.176>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wdev.176>.

- Ornitz, David M. und Pierre J. Marie (Juli 2015). „Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease.“ eng. In: *Genes & development* 29 (14), S. 1463–86.
- Phillips, A.M. (2005). „Overview of the fracture healing cascade“. In: *Injury* 36.3, Supplement. Proceedings from the 1st European Clinical Symposium on Bone and Tissue Regeneration 27-28 November 2004, S5–S7. ISSN: 0020-1383. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.027>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020138305002846>.
- Pittenger, Mark F. et al. (1999). „Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells“. In: *Science* 284.5411, S. 143–147. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.284.5411.143. eprint: <https://science.sciencemag.org/content/284/5411/143.full.pdf>. URL: <https://science.sciencemag.org/content/284/5411/143>.
- Puchtler, Holde, Susan N. Meloan und Mary S. Terry (1969). „On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium“. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 17.2. PMID: 4179464, S. 110–124. DOI: 10.1177/17.2.110. eprint: <https://doi.org/10.1177/17.2.110>. URL: <https://doi.org/10.1177/17.2.110>.
- Qu, Chang-qing et al. (Feb. 2007). „Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells“. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 43.2, S. 95–100. ISSN: 1543-706X. DOI: 10.1007/s11626-006-9008-y. URL: <https://doi.org/10.1007/s11626-006-9008-y>.
- Rahman, Md Shaifur et al. (Apr. 2015). „TGF- /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation“. eng. In: *Bone research* 3.26273537, S. 15005–15005. ISSN: 2095-6231. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4472151/>.
- Ramalho-Santos, Miguel und Holger Willenbring (Juni 2007). „On the Origin of the Term ”Stem Cell““. In: *Cell Press* 1, S. 35–38.
- Rehm, Hubert (2006). *Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics*. Bd. 5. Auflage. Elsevier GmbH, München.
- Rodríguez-Carballo, Eddie, Beatriz Gámez und Francesc Ventura (Mai 2016). „p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation“. eng. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 4.27200351, S. 40–40. ISSN: 2296-634X. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4858538/>.
- Sakai, Daisuke et al. (2005). „Regulation of Slug transcription in embryonic ectoderm by -catenin-Lef/Tcf and BMP-Smad signaling“. In: *Development, Growth & Differentiation* 47.7, S. 471–482. DOI: 10.1111/j.1440-169X.2005.00821.x. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1440-169X.2005.00821.x>.

- URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1440-169X.2005.00821.x>.
- Salazar, Valerie S. et al. (Dez. 2013). „Postnatal ablation of osteoblast Smad4 enhances proliferative responses to canonical Wnt signaling through interactions with β -catenin.“ eng. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 24), S. 5598–609.
- Schemitsch, Emil H. (2017). „Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!“ In: *Journal of Orthopaedic Trauma* 31, S20–S22. DOI: 10.1097/BOT.0000000000000978. URL: https://journals.lww.com/jorthotrauma/Fulltext/2017/10005/Size_Matters__Defining_Critical_in_Bone_Defect.5.aspx.
- Si, Zizhen et al. (Juni 2019). „Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies.“ eng. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 114, S. 108765.
- Singhatanadgit, W., V. Salih und I. Olsen (Nov. 2008). „RNA interference of the BMPRII gene blocks BMP-2-induced osteogenic gene expression in human bone cells.“ eng. In: *Cell biology international* 32 (11), S. 1362–70.
- Singhatanadgit, Weerachai, Vehid Salih und Irwin Olsen (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: <https://doi.org/10.1002/jcp.20799>. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jcp.20799>. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.20799>.
- Sittinger, M. et al. (1996). „Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques.“ In: *Biomaterials* 17.3. Tissue Engineering II: Tissue Technologies and Soft Tissue Engineering, S. 237–242. ISSN: 0142-9612. DOI: [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85561-X](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85561-X). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296129685561X>.
- Stanford, Clark M. et al. (1995). „Rapidly Forming Apatitic Mineral in an Osteoblastic Cell Line (UMR 106—01 BSP) (*).“ In: *Journal of Biological Chemistry* 270.16, S. 9420–9428. ISSN: 0021-9258. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9420>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925817491526>.
- Strem, Brian M. und Marc H. Hedrick (Feb. 2005). „The growing importance of fat in regenerative medicine.“ In: *Trends in Biotechnology* 23.2, S. 64–66. ISSN: 0167-7799. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779904003312>.
- Tan, Xiaohong et al. (Juli 2007). „Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis.“ eng. In: *Journal of cell science* 120.17550966, S. 2162–

2170. ISSN: 1477-9137. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2692485/>.
- Tarone, G. et al. (Juli 1982). „Cell surface molecules and fibronectin-mediated cell adhesion: effect of proteolytic digestion of membrane proteins.“ eng. In: *The Journal of cell biology* 94 (1), S. 179–86.
- Thomson James, A. et al. (Nov. 1998). „Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts“. In: *Science* 282.5391, S. 1145–1147. DOI: [10.1126/science.282.5391.1145](https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145). URL: <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.
- Vallée, M., J.-F. Côté und J. Fradette (2009). „Adipose-tissue engineering: Taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells“. In: *Pathologie Biologie* 57.4. Médecine régénératrice : cellules souches et matrice extracellulaire, S. 309–317. ISSN: 0369-8114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.04.010>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811408001211>.
- Visweswaran, Malini, Sebastian Pohl et al. (2015). „Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells – To Wnt, or not Wnt“. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 68, S. 139–147. ISSN: 1357-2725. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.09.008>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272515300224>.
- Visweswaran, Malini, Luca Schiefer et al. (2015). „Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 4 upregulates adipogenic differentiation in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.“ eng. In: *PLoS one* 10 (2), e0118005.
- Welsch, Ulrich, Wolfgang Kummer und Thomas Deller (Aug. 2018). *Histologie. Das Lehrbuch*. 5. Auflage. Ulrich Welsch, Wolfgang Kummer.
- Wong, Rebecca S. Y. (2011). „Mesenchymal stem cells: angels or demons?“ eng. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, S. 459510.
- Wozney, J. M. et al. (Dez. 1988). „Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.“ eng. In: *Science (New York, N.Y.)* 242 (4885), S. 1528–34.
- Wrana, Jeffrey L. et al. (Aug. 1994). „Mechanism of activation of the TGF- receptor“. In: *Nature* 370.6488, S. 341–347. ISSN: 1476-4687. URL: <https://doi.org/10.1038/370341a0>.
- Yu, Li, Mindy C. Hébert und Ying E. Zhang (Juli 2002). „TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses.“ eng. In: *The EMBO journal* 21 (14), S. 3749–59.
- Zarubin, Tyler und Jiahuai Han (Jan. 2005). „Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway.“ eng. In: *Cell research* 15 (1), S. 11–8.

-
- Zhang, Chi (Juni 2010). „Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*.“ eng. In: *Journal of orthopaedic surgery and research* 5, S. 37.
- Zhang, Rongrong et al. (Jan. 2013). „Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts.“ eng. In: *Bone* 52 (1), S. 145–56.
- Zhao, Ming, Stephen E. Harris et al. (Juni 2002). „Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation.“ eng. In: *The Journal of cell biology* 157 (6), S. 1049–60.
- Zhao, Ming, Lopa Mishra und Chu-Xia Deng (Jan. 2018). „The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer“. eng. In: *International journal of biological sciences* 14.29483830, S. 111–123. ISSN: 1449-2288. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5821033/>.
- Zuk, P. A. et al. (Apr. 2001). „Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.“ eng. In: *Tissue engineering* 7 (2), S. 211–28.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit ist es mir ein besonderes Anliegen, all jenen wundervollen Menschen danke zu sagen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Windolf für die Ermöglichung dieser Dissertation im Forschungslabor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie bedanken. Herrn Prof. Christoph V. Suschek danke ich herzlichst für die fachliche Beratung, das stets offene Ohr sowie den ein oder anderen wiedergefundenen Baum mitten im Wald.

Ein großer Dank gilt Frau PD Dr. Vera Grotheer für ihre herausragende wissenschaftliche Betreuung, ihre zahlreichen Tipps und Hinweise sowie für das stete Auge für das Licht am Ende des Tunnels.

Die Methodik lernt sich nicht von allein: Für die stets kompetente Unterstützung und Ansprechbarkeit bedanke ich mich bei den technischen Assistentinnen Samira Seghrouchni, Jutta Schneider und Christa Wilkens-Roth. Ihr seid die gute Seele des Labors! Für die Einführung in das Programm Graphpad bedanke ich mich bei Frau Dr. Ceylan Windolf.

Mein besonderer Dank gilt Melinda Hagedorn für die uneingeschränkte Unterstützung, Motivation und die statistische Beratung.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Birgit und Bernd Krakau sowie meinen Brüdern Stefan, Michael und Andreas danken. Ohne die jahrelange Unterstützung, Förderung und das Einfach-Da-Sein wäre ich nicht in der Lage, heute an dieser Stelle dankende Worte zu schreiben.

Ihnen und Euch allen möchte ich von Herzen danken!