

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Maus

***In vitro* Untersuchung des Einflusses von Myokinen
auf die osteogene Differenzierung humaner
Knochenmarkstromazellen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Kenan Alispahić

2025

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. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Gewidmet meinen Eltern und meiner einzigen Tante

Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Erkrankungen des Knochens, insbesondere Osteoporose, stellen mit zunehmender Alterung der Bevölkerung eine wachsende medizinische Herausforderung dar. Dabei spielen nicht nur hormonelle und mechanische Faktoren eine Rolle, sondern zunehmend auch immunologische Prozesse. Im Fokus aktueller Forschung stehen sogenannte Myokine - Botenstoffe, die von Skelettmuskeln freigesetzt werden. Diese Moleküle vermitteln den Muskel-Knochen-Crosstalk und haben das Potenzial, sowohl entzündliche als auch regenerative Prozesse im Knochenstoffwechsel zu beeinflussen.

Ziel dieser In-vitro-Studie war es, den Einfluss ausgewählter Myokine und proinflammatorischer Zytokine auf die osteogene Differenzierung humaner Knochenmarkstromazellen (hBMSCs) zu untersuchen. Im Mittelpunkt standen die Faktoren FGF-2, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ sowie das muskelassoziierte Zytokin Myostatin. Die hBMSCs wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert, teils unter gleichzeitiger Gabe der genannten Faktoren, teils nach einer zehntägigen Vorstimulation mit FGF-2 oder IL-6, um eine akute Entzündung zu simulieren. Die Wirkung dieser Vorstimulationen wurde mit einer anschließenden Nachbehandlung kombiniert, um die Effekte einer chronischen Entzündung zu analysieren. Die Versuchsgruppen wurden hinsichtlich Zellzahl, extrazellulärer Matrixmineralisierung und ALP-Aktivität untersucht. Die Zellzahl wurde mittels CellTiterBlue-Assay, die Matrixmineralisierung über Alizarin-Rot-Färbung und die ALP-Aktivität enzymatisch quantifiziert. Zur Standardisierung wurden alle Ergebnisse auf die Zellzahl normiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass FGF-2 einen stark proliferationsfördernden Effekt hatte. Die Zellzahl war in allen Gruppen mit FGF-2 signifikant erhöht, insbesondere bei kombinierter Vor- und Nachbehandlung. IL-6 hatte allein keine signifikante Wirkung, verstärkte jedoch die Wirkung von FGF-2, wenn IL-6 nach der Vorstimulation verabreicht wurde. IL-1 β und TNF- α führten unabhängig von der Vorstimulation zu einer signifikanten Steigerung der Mineralisierung. IFN- γ reduzierte die Zellzahl signifikant, erhöhte jedoch gleichzeitig die normierten Differenzierungsmarker, was auf eine selektive Förderung der Differenzierung trotz Zellverlust hindeutet. Myostatin zeigte keine signifikanten Effekte auf die Zellzahl oder die Differenzierungsmarker.

Hinsichtlich der ALP-Aktivität wurde festgestellt, dass FGF-2 bei Vor- und Nachbehandlung, zu einem Rückgang der ALP-Aktivität führte. IL-1 β steigerte die ALP-Aktivität signifikant nach FGF-2-Vorbehandlung. IL-6, TNF- α und Myostatin zeigten keine relevanten Effekte auf die ALP-Aktivität. Besonders auffällig war die starke Reduktion der normierten Differenzierungsmarker unter FGF-2, was auf den starken Einfluss dieses Faktors auf die Zellzahl, aber nicht auf die Differenzierung hindeutet.

Die normierte Auswertung ergab, dass FGF-2 zwar die Zellzahl deutlich steigert, aber aufgrund fehlender Wirkung auf Differenzierungsprozesse zu niedrigen normierten Differenzierungswerten führt. Diese Diskrepanz zeigt, wie wichtig eine getrennte Analyse von Zellvermehrung und Differenzierung ist. IFN- γ wirkte trotz zelltoxischer Wirkung förderlich auf die Differenzierung, was therapeutisch relevant sein könnte. Die Kombination aus FGF-2-Vorstimulation und IL-1 β -Nachbehandlung zeigte die stärkste ALP-Aktivierung, was auf synergistische Effekte hinweist.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Myokine eine differenzielle Wirkung auf Zellproliferation und Differenzierung haben. Dies eröffnet neue Ansätze für das Tissue Engineering und die regenerative Medizin. Die gezielte Modulation durch Kombination verschiedener Myokine könnte genutzt werden, um Knochendefekte gezielt zu therapieren. Weitere Studien sollten sich der zeitlichen Dynamik, der Dosisabhängigkeit und der zelltypspezifischen Wirkung dieser Moleküle widmen, um ihr volles therapeutisches Potenzial zu erschließen.

Summary

Chronic inflammatory bone diseases, particularly osteoporosis, represent a growing medical challenge as the population continues to age. In this context, not only hormonal and mechanical factors play a role, but increasingly also immunological processes. Current research is focusing on so-called myokines – signaling molecules released by skeletal muscles. These molecules mediate muscle-bone crosstalk and have the potential to influence both inflammatory and regenerative processes in bone metabolism.

The aim of this in vitro study was to investigate the influence of selected myokines and proinflammatory cytokines on the osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells (hBMSCs). The focus was on the factors FGF-2, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , as well as the muscle-associated cytokine myostatin. The hBMSCs were cultured in osteogenic differentiation medium over a period of 14 days, either with simultaneous administration of the aforementioned factors or following a ten-day pre-stimulation with FGF-2 or IL-6 to simulate acute inflammation. The effects of these pre-stimulations were then combined with subsequent treatments to analyze the impact of chronic inflammation. The experimental groups were analyzed with respect to cell count, extracellular matrix mineralization, and ALP activity. Cell count was measured using the CellTiterBlue assay, matrix mineralization was assessed through Alizarin Red staining, and ALP activity was enzymatically quantified. For standardization, all results were normalized to the cell count.

The results showed that FGF-2 had a strong proliferation-promoting effect. Cell count was significantly increased in all FGF-2 groups, particularly with combined pre- and post-treatment. IL-6 alone had no significant effect but enhanced the effect of FGF-2 when administered after pre-stimulation. IL-1 β and TNF- α led to a significant increase in mineralization regardless of pre-stimulation. IFN- γ significantly reduced cell count, but at the same time increased the normalized differentiation markers, indicating a selective promotion of differentiation despite cell loss. Myostatin showed no significant effects on either cell count or differentiation markers.

With regard to ALP activity, it was observed that FGF-2, in both pre- and post-treatment, led to a decrease in ALP activity. IL-1 β significantly increased ALP activity after FGF-2 pre-treatment. IL-6, TNF- α , and myostatin showed no relevant effects on ALP activity. Particularly striking was the strong reduction of normalized differentiation markers under FGF-2, indicating a strong influence of this factor on cell number, but not on differentiation. The normalized analysis revealed that although FGF-2 significantly increases cell count, it leads to low normalized differentiation values due to its lack of effect on differentiation processes. This discrepancy highlights the importance of separately analyzing cell proliferation and differentiation. IFN- γ , despite its cytotoxic effect, promoted differentiation, which could be therapeutically relevant. The combination of FGF-2 pre-stimulation and IL-1 β post-treatment showed the strongest ALP activation, suggesting synergistic effects.

Overall, the results demonstrate that myokines have differential effects on cell proliferation and differentiation. This opens up new approaches for tissue engineering and regenerative medicine. Targeted modulation through the combination of different myokines could be used to specifically treat bone defects. Further studies should focus on the temporal dynamics, dose dependence, and cell type-specific effects of these molecules to fully realize their therapeutic potential.

Abkürzungen

DXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
BMD	bone mass density
%	Prozent
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
NF-κB	Nuclear factor-κB
IL-6	Interleukin-6
IL-1β	Interleukin-1β
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
T-Zelle	T für Thymus; „Thymus-Zelle“
TH1-Zell	T-Helferzelle Subgruppe 1
IFN-γ	Interferon-γ
IL-4	Interleukin-4
BMU	Basic Multicellular Unit
mm	Milimeter
BMP	Bone-morphogenic-protein
PDGF	Platelet-derived growth factor
FGF	Fibroblast-Growth Factor
IGF	Insulin-Like Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
3D	Dreidimensional
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
hBMSC	Human Bone Marrow Stromal Cells
GDF-8	Growth-Differentiation Factor-8
TGF-β	Tissue Growth Factor-β
FGF-2	Fibroblast-Growth Factor-2
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
BMI	Body-Mass-Index
ASA-Score	American Society of Anesthesiologists-Score
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MCH	Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt

MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration
RDW	Red cell distribution width (Erythrozytenverteilungsbreite)
INR	International Normalized Ratio
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
CFU	Colony Forming Unit
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
g	Gramm
FCS/FBS	Fetales Kälberserum bzw. Fetales bovines Serum
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] -ethansulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
PBS	phosphate-buffered saline
ml	Milliliter
rpm	revolutions per minute
l	Liter
DMSO	Dimethylsulfoxid
U	Unit
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
CTB	CellTiter-Blue®
OIM	Osteogenes Induktionsmedium
µM	Mikromol
nM	Nanomol
OD	Optische Dichte
ALP	Alkalische Phosphatase
PFA	Paraformaldehyd
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
TAZ	transcriptional coactivator with PDZ- binding motif
KO	Knock-Out
ADS	adipose tissue-derived stromal cells
(p38-) MAP-Kinase	(p38-) Mitogen-activated Protein Kinase
JAK/STAT	Januskinase/Signal transducers and activator of transcription
SHP-2	SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2

MEK2 (MAP2K2)	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2
TLR	Toll-like Rezeptor
sIL6-R	Löslicher IL-6 Rezeptor
Mstn-mAB	Myostatin neutralisierender Antikörper
ActRIIB	Activin-Receptor 2B
IL-17	Interleukin-17
mRNA	Messenger ribonucleic acid

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Definition der Osteoporose	1
1.3 Risikofaktoren der Osteoporose	2
1.4 Zusammenhang zwischen Osteoporose und Knochenstoffwechsel	2
1.5 Knochengewebe und dessen Umbau	3
1.5.1 Aufbau des Knochens	3
1.5.2 Geflechtknochen.....	4
1.5.3 Lamellenknochen.....	4
1.5.4 Knochengefäße	5
1.5.5 Knochenumbau.....	5
1.6 Knochendefektheilung	6
1.6.1 Allgemeine Frakturheilung.....	6
1.6.2 Autologe Knochentransplantation.....	6
1.6.3 Voraussetzung des idealen Knochenersatzes	7
1.6.4 Allogener Knochenersatz	8
1.6.5 Synthetischer Knochenersatz	9
1.6.6 Zukünftige Visionen des Knochenersatzes mit Tissue Engineering	9
1.7 Stammzellen, Myokine und der Einfluss auf osteogene Differenzierung	10
1.7.1 Grundlagen der Stammzellen	10
1.7.2 direkte Ossifikation	11
1.7.3 indirekte Ossifikation	12
1.8 Myokine und der „Crosstalk“ zwischen Muskel und Knochen.....	13
1.9 Entdeckung der Myokine	14
1.10 Fragestellung und Zielsetzung	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Substanzen und Lösungen	22
2.1.4 Myokine	23
2.1.5 Software.....	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Zellkultur	24
2.2.2 Zellkulturmedium	24
2.2.3 Zellkultivierung	25
2.2.4 Kryokonservierung.....	25

2.2.5 Auftauen der Zellen	26
2.2.6 Vorstimulation	26
2.2.7 Zellzahlbestimmung.....	26
2.2.8 Wachstumsversuch.....	27
2.2.9 Osteogene Differenzierung mit Zytokinen.....	27
2.2.10 Differenzierungsversuch über 28 Tage	28
2.2.11 Alizarin-Rot Färbung, Mikroskopie und Rückfärbung mit CPC.....	28
2.2.12 ALP-Assay.....	30
2.2.13 CTB-Assay als Zellviabilität.....	31
2.2.14 Statistik	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Wachstumsversuch mit Zytokinen	32
3.2 Differenzierungsversuch in OIM über 28 Tage (ohne Zytokinzugabe)	34
3.3 Osteogene Differenzierung mit Zytokinen	47
3.3.1 Zellzahl	47
3.3.2 Mineralisierung.....	57
3.3.3 ALP-Aktivität	65
3.3.4 Quotient aus Mineralisierung und Zellzahl.....	73
3.3.5 Quotient aus ALP-Aktivität und Zellzahl	82
4 Diskussion und Schlussfolgerung.....	92
4.1 Myokine und deren Einfluss auf die osteogene Differenzierung.....	92
4.2 Die Wirkung des FGF-2 auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung.....	92
4.3 IL-6 und dessen Wirkung auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung.....	94
4.4 Die Wirkung des IL-1 β auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung	95
4.5 Die Wirkung des TNF α auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung.....	96
4.6 Die Wirkung des Myostatins auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung	97
4.7 Die Wirkung des IFN- γ auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung.....	98
5 Limitationen	100
6 Ausblick	101
7 Abbildungsverzeichnis	102
8 Tabellenverzeichnis	102
9 Literaturverzeichnis	103
Danksagung	110

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Chronisch entzündliche Prozesse, die unter anderem im Zusammenhang mit Osteoporose stehen, beeinträchtigen den Knochenstoffwechsel und wirken sich negativ auf die Knochenstabilität aus. Das Robert-Koch-Institut berichtet, dass laut internationalen Schätzungen „40% bis 50% der Frauen und 12% bis 22% der Männer mit diagnostizierter Osteoporose mindestens einen osteoporosebedingten Knochenbruch erleiden“ [1, 2]. Das Lebenszeitrisko für beispielsweise Hüftfrakturen liegt bei Frauen über 50 Jahren bei 17.1% in Deutschland (Stand 2020) [3]. Im Vergleich aller europäischen Länder ergibt die SCOPE-Studie für Deutschland eine Gesamtprävalenz der Osteoporose von 6,1 % (22,6 % bei Frauen über 50 Jahren und 6,6 % bei Männern über 50 Jahren, Stand 2019) [4].

Krankheiten des Muskel- und Skelettsystems stellen eine große Herausforderung dar. Sie führen zu einer Belastung der Betroffenen und deren Angehörigen, schränken die Teilhabe im Alltag ein und verursachen erhebliche direkte und indirekte Krankheitskosten in Deutschland [1]. Dabei hat die Osteoporose weitreichende sozioökonomische Auswirkungen und belastet das Gesundheitssystem; Laut SCOPE-Studie verursachte 2019 die Osteoporose in Deutschland Kosten in Höhe von 13,83006 Milliarden Euro [4].

1.2 Definition der Osteoporose

Der Dachverband der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e. V. nutzt die Definition des Konsenses der Development Conference aus 1994 [5-7] mit „Osteoporose als eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist [...] Sind bereits Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten, so liegt per definitionem eine manifeste Osteoporose vor [7]“. Die Knochendichte (BMD) korreliert mit dem Frakturrisiko, so dass mit Ausnahme von Gesichtsfrakturen mit geringer BMD, die mit der Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) gemessen werden, das Frakturrisiko umso höher ist, je geringer die Knochendichte ist [7]. Messtechnisch wird eine Osteoporose nach der WHO [6-9] dann manifest, „wenn der Knochenmineralgehalt in einer DXA-Knochendichtemessung an der Lendenwirbelsäule und/oder am proximalen Femur (Gesamtareal oder Schenkelhals) um mehr als 2,5 Standardabweichungen ($T \leq -2,5$) vom Mittelwert einer 20- bis 29-jährigen Frau abweicht [8]. Die in Standardabweichung angegebene Abweichung der Knochendichte von der einer 20- bis 29-jährigen Frau wird als T-

Score bezeichnet. Diese operationale Definition kann auf Männer ab dem 50. Lebensjahr übertragen werden“ [8].

1.3 Risikofaktoren der Osteoporose

Die Risikofaktoren der Osteoporose sind vielfältig. So spielt, wie auch schon vorher erwähnt, die Knochendichte eine wichtige Rolle und erhöhtes Lebensalter ist ein Risikofaktor für erniedrigte Knochendichte und folglich für ein erhöhtes Frakturrisiko [10, 11]. Zusätzlich ist auch weibliches Geschlecht ein wichtiger Faktor, da es zu einem erhöhten Knochenumbau bei postmenopausalen Frauen kommt, welches mit einer erniedrigten Knochenmasse in Korrelation steht [11, 12].

Die zweitgrößte Ursache der Osteoporose, nach der weiblichen Menopause, ist die Glucocorticoid-induzierte Osteoporose [13]. Es kommt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Frakturen unter oraler Glucocorticoideinnahme [14, 15], dabei kann es zur Anfang der Therapie unter Glucocorticoiden zu einer erhöhten Frakturinzidenz kommen und diese kann über längere Einnahme der Glucocorticoide abnehmen [14].

Ein weiterer Risikofaktor, welcher zu einem erhöhten Risiko für osteoporosebedingten Frakturen bei postmenopausalen Frauen führt, ist das Zigaretten-Rauchen [11, 16]. Dabei kann es postmenopausal zu einem erhöhten Knochenabbau und einem erhöhten Risiko für Hüftfrakturen kommen [16].

Ebenfalls zu beachten ist Vitamin-D-Mangel. So kann Vitamin-D-Mangel zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus führen, gefolgt von einem erhöhten Knochenumbau und somit Knochensubstanzverlust, was wiederum zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für osteoporosebedingte Frakturen führt [11, 17]. Vitamin-D und Calcium Supplementierung zeigt sich als effektive Maßnahme zur Reduktion von Frakturrisiken [18].

Auch die genetische Komponente kann eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Osteoporose spielen, indem diese einen Einfluss auf die Regulation der Knochendichte haben kann und mehrere verschiedene genetische Abschnitte dabei eine Rolle spielen könnten [19]. Dabei gibt es eine hereditäre Komponente bei der Vererbung der Knochendichte, die bei Arbeiten an Zwillingen und Familien von einer Vererblichkeit der Knochendichte von 50 % bis 80 % impliziert [19-25].

1.4 Zusammenhang zwischen Osteoporose und Knochenstoffwechsel

Östrogen dient im physiologischen Prozess des Knochenstoffwechsels zur Erhöhung der osteogenen Differenzierung humaner Knochenmarksstammzellen, der Förderung der Osteoblastenreifung, der Hemmung der Apoptose der Osteoblasten, und Senkung der Osteoklastogenese [26-30]. Folglich führt ein Wegfall dieser Effekte durch einen Mangel an Östrogen, wie dies postmenopausal der Fall sein kann, zu den charakteristischen Pathologien des Knochengewebes (siehe Abschnitt 1.3). Bei einer Arbeit an Östrogen-Rezeptor-Knock-Out Mäusen kam zu einer Reduzierung der Knochendichte von 20% bis 25% im Vergleich zu

Wildtyp-Mäusen und dies deutet auf die wichtige Rolle des Östrogens im Erhalt der Knochendichte hin [31].

Mehrere Arbeiten deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen einem erhöhten Level an inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-1 β , TNF α und der Menopause hin [26, 32-35]. Der Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und der Osteoporose führte zu der Etablierung des Begriffes „Immunoporosis“ durch Srivastava *et al.* [36]. So zeigen verschiedene Subtypen der angeborenen und erworbenen Immunzellen durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine einen Einfluss auf den Knochenumbau (näheres zum Einfluss von Zytokinen auf den Knochenumbau siehe Abschnitt 4) [37]. Bedeutende Gruppen sind die verschiedenen Subtypen der T-Zellen und deren Ausschüttung verschiedener Zytokine, so kann die gesteigerte Ausschüttung von TNF α durch aktivierte T-Zellen bei Östrogenmangel oder der gesteigerten Expression von RANK-L Knochenabbau fördern [36, 38, 39]. Ein weiteres Beispiel sind TH1-Zellen, welche die Fähigkeit besitzen IFN γ auszuschütten und dadurch einen entgegengesetzten Effekt auf den Knochenumbau haben können, indem sie über die Ausschüttung von IFN- γ sowohl die Osteoklastogenese fördern als auch hemmen [36, 40]. Eine erniedrigte IFN- γ -Konzentration im Serum ließ sich in der Arbeit von Zhang *et al.* [41] bei Patientinnen mit manifester postmenopausaler Osteoporose messen. Darin wurde eine positive Korrelation zwischen IFN- γ bzw. IL-4 Konzentration im Serum und Knochendichte festgestellt und dabei auf einen osteoprotektiven Effekt dieser Zytokine hingewiesen [36, 41].

1.5 Knochengewebe und dessen Umbau

1.5.1 Aufbau des Knochens

Generell besteht der Knochen aus dem Periost als äußerster Schicht [42]. Diese besteht aus einer inneren Kambiumschicht, dem Stratum osteogenicum und einem äußeren Stratum fibrosum [42]. Die Kambiumschicht enthält viele Zellen, unter anderem mesenchymale Knochenmarkstammzellen, als auch Osteoblastenvorläuferzellen [43]. Im Vergleich zu heranwachsenden Menschen ist die Kambiumschicht ärmer an Zellen und das Periost im Allgemein dünner [43]. Das Stratum fibrosum enthält straffes Bindegewebe und elastische Fasern, Teile dieser Kollagenfasern strahlen in die Kortikalis ein und erzeugen so eine feste Verbindung zwischen Periost und Knochen, die als Sharpey-Fasern bezeichnet werden [43, 44].

Als äußerste Schicht ist die Adventitia vorhanden, die viele Gefäße enthält, die das Knochengewebe versorgen und ist dabei locker aufgebaut [43]. Das Periost hat eine starke Durchblutung, Innervierung und ist schmerzempfindlich [42].

Darauf folgend ist das Endost und begrenzt die Markhöhle vom Periost ab [42]. Es kleidet die Binnenräume der Spongiosa und die Havers-Kanäle aus [43, 44]. Das Endost besteht aus einer dünnen Schicht an nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen und zwei oder drei Schichten an flachen Knochendeckzellen [43, 44]. Diese Knochendeckzellen werden als endostale Saumzellen bezeichnet und diese sind ruhende Osteoblasten [43]. Zusätzlich sind auch Osteoklastenvorläuferzellen.

mesenchymale Stammzellen und Osteoblastenvorläuferzellen vorhanden [43]. Kommt es zu einer Stimulierung von Osteozyten, so werden Umbaumaßnahmen bzw. Reparaturprozesse über aktive Osteoblasten und Osteoklasten eingeleitet [43, 44]. Beim ausgewachsenen Menschen sind Osteoklasten und Osteoblasten hauptsächlich nur im *Bone-Remodelling* (siehe Abschnitt 1.5.3) im aktiven Zustand [44]. Je nach Literatur sind es zwischen 5% und 10% der Oberfläche des Endosts, welches aktive Osteoklasten und Osteoblasten enthält, der Rest ist im Ruhezustand [43, 44].

Im Inneren unterscheidet man die außen liegende Kortikalis (in der Diaphyse auch Kompakta genannt) von der innen liegenden Spongiosa, die das Knochenmark enthält [42]. Die Spongiosa besteht aus einem Netzwerk von Platten und Trabekeln [42].

1.5.2 Geflechtknochen

Geflechtknochen wird als unreifes Knochengewebe bezeichnet und stellt sich als zufällige Kollagenstruktur mit hohem Zellvolumen und geringer Gewebedichte dar [45]. Aufgrund des höheren Wassergehalts und der geringeren Mineralisierung bietet es Biege- und Zugfestigkeit [42].

Es bildet sich schnell und unstrukturiert und ist von Geburt an das primäre Knochenmaterial, das aus mesenchymalem Bindegewebe entsteht, bis es sich im Laufe der Entwicklung durch körperliche Belastung und Knochenwachstum über desmale Ossifikation aus dem Periost in festeres Knochenmaterial, den Lamellenknochen, umwandelt [42, 45].

Außerdem entsteht Geflechtknochen nach traumatischen Knochenverletzungen oder Überbelastung als Übergangsstruktur, bis er durch den stabileren Lamellenknochen ersetzt wird [45].

1.5.3 Lamellenknochen

Aus dem Geflechtknochen entsteht der strukturierte Lamellenknochen [42, 43]. Dieser besteht aus Knochenlamellen, die miteinander verbunden sind [43]. Die Knochenlamellen bestehen aus einer Kalkmatrix und enthalten Osteozyten in den Lamellen und in den Zwischenräumen, die Lakunen genannt werden [42, 43]. Die Osteozyten sind miteinander über *Gap-junctions* verbunden [42].

Die meisten Lamellen bilden zylindrische Bauelemente aus, die als Osteone oder Harvers-Systeme bezeichnet werden [43]. Im Zentrum dieser Havers-Systeme sind Havers-Kanäle, die Blutgefäße und Nervenfasern enthalten [42, 43]. Sind die Havers-Kanäle konzentrisch von ca. 4 bis 20 Lamellen umgeben, werden sie als Speziallamellen bezeichnet [42]. Kollagenfibrillen des Typs I sind dabei spiralförmig in den Osteonen enthalten [42].

Zwischen den Osteonen befinden sich Reste alter und abgebauter Speziallamellen vorheriger Osteone, die als Schaltlamellen bezeichnet werden und spielen eine wichtige Rolle beim ständigen Knochenumbau, dem „*bone remodelling*“ [43]. Sie grenzen sich von den aktiven Osteonen durch Zementlinien bzw. Kittlinien ab [43].

Dieses charakteristisches Wechsellmuster zwischen den Osteonen mit Speziallamellen und den Schaltlamellen wird als Brekzienbau bezeichnet, da es dem Brekziengestein mit seiner trümmerartigen Struktur ähnelt [42, 43].

Generallamellen sind an der Außen- und Innenfläche der Kompakta vorhanden [42, 43]. Die Inneren Generallamellen sind oft nicht vollständig in Lamellen angeordnet, sondern gehen in die Spongiosa über [42, 43].

1.5.4 Knochengefäße

Im stark vaskularisierten Lamellenknochen verlaufen die Arteriae und Venae nutriticiae ohne Verzweigung durch die Kompakta und versorgen das Knochenmark und die Spongiosa [43]. Zurück vom Markraum verzweigen sich die Gefäße zur Kortikalis hin und verlaufen als Havers-Gefäße im Zentrum der Osteone nach vertikal [42, 43]. Abzweigungen dieser Gefäße sind die Volkmann-Gefäße, die im rechten Winkel zu den Havers-Gefäßen verlaufen und in den sogenannten Volkmann-Kanälen (*Canales perforantes*) verlaufen [42, 43]. Es ist zu bemerken, dass im Geflechtknochen die strukturierte Anordnung der Blutgefäße fehlt [42, 43].

1.5.5 Knochenumbau

Knochen wird ständig umgebaut bedingt durch die wechselnde Belastung (biologische Plastizität), was als „*Bone Remodeling*“ bezeichnet wird [42, 43]. Dabei vernehmen die Osteozyten die wechselnde Belastung bzw. Schädigung und führen zu einem kontrollierten Auf- und Abbau an Knochengewebe [43, 44].

Der Knochenumbau erfolgt durch die „*Basic Multicellular unit*“ (BMU), eine Gruppe aus Osteoblasten und Osteoklasten, so folgt zuerst die Resorptionsphase [43, 44]. In der Kompakta bohren die Osteoklasten Tunnel in das Knochengewebe, die Spongiosa wird dabei von den Osteoklasten nicht durchbohrt [43].

Osteoklasten durchbohren auch die Osteone in der Kompakta [43, 44]. In der Neubildungsphase wachsen neue Gefäße, Bindegewebe und marklose Nervenfasern in den Kanal hinein [43, 44]. Die neue freigelegte Fläche wird durch Osteoblasten besetzt, damit die neuen Lamellen schichtweise aneinander aufbauen, während die vorherige mineralisiert wird [43, 44].

Die Osteoblasten werden zu Osteozyten und schrittweise werden so bis ca. 20 Knochenlamellen gebaut [44]. Die innerste Osteoblastenschicht mineralisiert nicht, es wird Platz für den Havers-Kanal gelassen [44]. Einige der innersten und somit jüngsten Osteoblasten und unreife Vorläuferzellen werden zu endostalen Saumzellen [44].

In der Spongiosa verläuft das „*Bone Remodeling*“ teilweise anders. Endostale Saumzellen bilden einen Schutzraum durch Bau eines Zeltdaches (englisch *canopy*) [44]. Dieser geschützte Raum wird als „*Bone Remodeling Compartment*“ bezeichnet und dient als Schutz vor externen Einflüssen, vor allem des Knochenmarks [44]. Auch hier agieren die BMUs, wie auch in der Kompakta, indem zuerst Osteoklasten der BMU in einer Resorptionsphase die Knochenmatrix abbauen und daraus eine Grube entsteht [44]. Diese Grube wird als Howship-

Lakune bezeichnet [43]. Nach der Resorptionsphase folgt die Umkehr-Phase, die auch beim „*Remodeling*“ in der Kompakta vorhanden ist [44]. Dabei werden durch einkernige Zellen, wie wahrscheinlich Makrophagen, organisch-chemische Reste der zuvor aktiven Osteoklasten entfernt [44].

In der Neubildungsphase werden Knochenlamellen durch aktive kubische Osteoblasten gebildet, die Osteoid sezernieren, und diese füllen die Howship-Lakunen aus [44]. Nach der Mineralisierung des Osteoids lagern sich die Osteoblasten flach an die Trabekel der Spongiosa an und werden zu endostalen Saumzellen [43, 44].

1.6 Knochendefektheilung

1.6.1 Allgemeine Frakturheilung

Frakturheilung kann grob in primäre und sekundäre Frakturheilung unterteilt werden. Bei der primären Frakturheilung entsteht kein Kallus (temporäres Ersatzgewebe), da der Frakturspalt kleiner als 1 mm ist [46]. Hier wird in Kontaktheilung unterschieden, bei der sich die Knochenfragmente berühren und Osteone zwischen den Fragmenten agieren können [46]. Bei einer Spaltheilung ist der Frakturspalt kleiner als 1 mm, hierbei bildet sich über Granulationsgewebe lamelläres Knochengewebe, welches später durch Osteone ersetzt wird [46].

Bei einer sekundären Frakturheilung beträgt der Frakturspalt über mehrere Millimeter [46]. Die Fraktur heilt über Kallusbildung ab, welche in verschiedenen Phasen abläuft [46]. Zunächst bildet sich ein Frakturhämatom, welches über Nekrosebildung den Frakturspalt verbreitert, wodurch eine akute Entzündung hervorgerufen wird [46]. In der nächsten Phase entsteht ein bindegewebiger Kallus, bei dem Granulationsgewebe in das Frakturhämatom einwächst und mit Mesenchym ausfüllt [46]. In der letzten Phase erfolgt die Umwandlung des Kallus in knöchernen Faserknochen [46]. Dieser Prozess wird durch die Aktivität von faserbildenden Fibroblasten initiiert, welche die Bildung von Kollagenfasern anregen [46]. Im weiteren Verlauf erfolgt die Umgestaltung des Kallus durch „*Bone Remodeling*“, wodurch lamelläres Knochengewebe entsteht [46].

1.6.2 Autologe Knochentransplantation

Zur Behandlung von Knochendefekten, die so weitreichend sind, dass Knochenersatz nötig ist, wurden verschiedene Methoden entwickelt, vor allem die autologe Knochentransplantation wird bis heute als Goldstandard bezeichnet [47]. Bei autologen Knochentransplantationen sind Spender und Empfänger identisch. Als gängiger Spenderbereich kann der Beckenkamm genannt werden, jedoch existieren verschiedene andere Entnahmestellen [47]. Für die Entnahme spongiösen Knochens bieten sich beispielsweise die *Spina iliaca posterior superior*, das distale Femur, die proximale und distale Tibia, der distale Radius und das Olecranon an [47]. Ein Meilenstein war dabei die Arbeiten der Chirurgen Dallas

Burton Phemister und Erich Lexer, welche kortikospongiöses Knochenmaterial als Transplant verwendeten, welches bis heute angewendet wird [47, 48].

1.6.3 Voraussetzung des idealen Knochenersatzes

Um die relevanten Faktoren für eine optimale Frakturheilung und optimalen Knochenersatz darzustellen, wurde das „*Diamond-Concept*“ durch Giannoudis *et al.* entworfen [49]. Der ideale Knochenersatz deckt die Aspekte der Osteogenese, Osteokonduktion, Osteoinduktion, als auch strukturelle Unterstützung bzw. Mechanische Stabilität ab [49-51].

Der Begriff Osteokonduktion bezeichnet die Fähigkeit eines Knochentransplantats, ein Gerüst vorzugeben, in welches die im Empfängerbereich vorhandenen mesenchymalen Stammzellen, Kapillaren und Gewebe einwachsen können [50]. Auf diese Weise kann sich neuer Knochen an dem Gerüst entlang bilden [50].

Das Konzept der Osteoinduktion wurde bei der Entdeckung des BMP (*Bone-morphogenic-protein*) von Marshall R. Urist beschrieben [51]. In seiner Forschungsarbeit demonstrierte der Wissenschaftler, dass die Implantation dekalzifizierter Knochenmatrix in Muskeltaschen verschiedener Versuchstiere zur Bildung neuen Knochengewebes führt [52]. Dieses Gewebe enthält neue Osteoblasten, die nicht aus dem Spendergewebe (hier der Knochenmatrix) stammen, sondern sich aus den im Empfängerbereich vorhandenen Zellen bilden [52]. Mesenchymalen Stammzellen, die sich im Empfängerbereich befinden, differenzieren in Osteoblasten und Chondroblasten, was durch verschiedenen Zytokine, wie den BMP-Proteinen, moduliert wird [50]. Einige andere wichtige Zytokine, die hierbei beteiligt sind, sind *Platelet-derived growth factor* (PDGF), Interleukine, *Fibroblast-Growth Factors* (FGF), *Insulin-Like Growth Factors* (IGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [50].

Osteogenese beschreibt die Synthese von neuem Knochen durch Zellen des Spender- oder Empfängerbereiches [50].

Die Strukturelle Unterstützung bzw. Stabilität ist wichtig an Stellen, an denen ein Knochentransplantat schon früh stärkere Belastung ausgesetzt ist, sodass hierbei die Auswahl des Knochentransplantates eine größere Rolle spielt [47, 51]. So bieten Knochentransplantate, die aus kortikalem Knochen bestehen und eine gute Vaskularisierung haben, eine bessere strukturelle Unterstützung und Belastbarkeit [47, 51].

Generell bieten spongiöse autologe Transplantate den Vorteil, dass sie eine gute Struktur zur schnelleren Verknöcherung bieten, was somit eine hohe Osteokonduktion gewährleistet, initial aber noch instabil bei Belastung sein können [47]. Zusätzlich sind viele Osteozyten, Stammzellen und Zytokine erhalten, die eine Osteoinduktion gewährleisten [47]. Kortikaler Knochen ist hauptsächlich osteokonduktiv, da es von der Struktur dichter ist und durch weniger Porosität, als auch weniger Oberfläche, länger zur Revaskularisierung benötigt, aber früh schon stabil ist [47]. Die dichte Struktur bedingt zudem eine geringere Versorgung mit knochenbildenden Zellen, wie Osteoblasten, Stammzellen und anderen Vorläuferzellen. [50, 53].

Voraussetzung des idealen Knochenersatzes

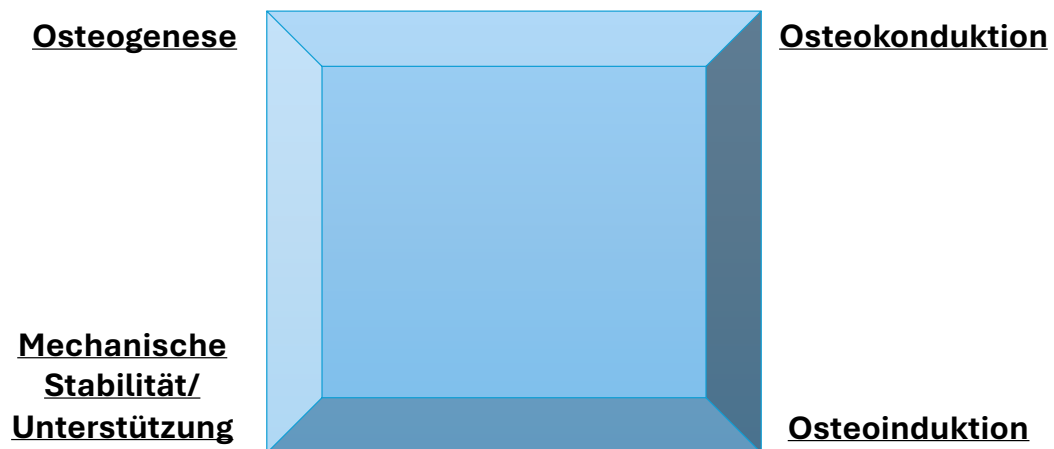


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Voraussetzungen des idealen Knochenersatzes nach den Arbeiten von Giannoudis et al. [49] und Khan et al. [50]

1.6.4 Allogener Knochenersatz

Allogene Knochentransplantate stammen aus menschlichen fremden Spendern und können grob in allogene spongiöse Transplantate, kortikale Transplantate und demineralisierte Knochenmatrix eingeteilt werden [53].

Allogene Knochentransplantate besitzen die Fähigkeit zur Osteokonduktivität, manchmal auch zur Osteoinduktion [53]. Sie enthalten in der Regel keine lebendigen Zellen und können somit nicht osteogen sein [53].

Die Quantität an verschiedenen Zytokinen, die einen möglichen osteoinduktiven Effekt haben, ist abhängig von der Methode der Sterilisierung und kann somit sehr variabel sein [54]. So deutet Brink [55], dass frisches und möglichst unverarbeitetes allogenes Material den höchsten osteoinduktiven Effekt hätte.

Spongiöses allogenes Knochenmaterial hat wie auch autologe Spongiosa zunächst wenig mechanische Belastbarkeit, aber die Immunantwort im Zusammenhang mit einem osteoinduktiven Effekt ist im Vergleich gering [53].

Kortikales allogenes Knochenmaterial dient wie auch autologer kortikaler Knochen dem Auffüllen größerer Knochendefekte, auch hier kann im Vergleich von einer generell geringeren Osteoinduktivität gesprochen werden [50, 53].

Die spezielle Aufbereitung des Spenderknochens, wie schon von Urist [52, 55] beschrieben über mehrere Schritte, bei der kortikaler Knochen pulverisiert, dekalzifiziert wird in Säure, die mineralen Bestandteile entfernt werden, wird als Resultat demineralisierte Knochenmatrix bezeichnet.

Demineralisierte Knochenmatrix hat sowohl einen osteokonduktiven, als auch einen osteoinduktiven Effekt, der größer sei als bei anderem allogenen Material, da beim Aufbereitungsverfahren Kollagene, BMP und andere Wachstumsfaktoren und nicht kollagene-Proteine erhalten bleiben [53]. Diese können die Differenzierung der

mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten anregen, der Effekt der Osteoinduktivität ist abhängig vom Aufbereitungsverfahren abhängig [50, 53].

Die Haltung, Verarbeitung, Sterilisierung und Spendereigenschaften sind entscheidende Faktoren, die die Osteoinduktivität beeinflussen können [56]. So kann im Tierversuch die Sterilisierung mit Ethylenoxid die Osteoinduktivität negativ beeinflussen und sogar vollständig zu Nichte machen [56, 57].

Demineralisierte Knochenmatrix bietet keine strukturelle Unterstützung an, weshalb es in der Regel zum Auffüllen von Knochendefekten genutzt wird [56]. So zeigten Upton et al. [58] die erfolgreiche Anwendung von demineralisierter Knochenmatrix beim Auffüllen von Knochendefekten, die unter anderem nach Resektion von Enchondromen an der Hand entstanden sind.

1.6.5 Synthetischer Knochenersatz

Das dritte Gebiet an Knochenersatz ist synthetisches Material, wie beispielsweise Calciumsulfat, bioaktives Glas und Calciumphosphat [59, 60]. Synthetisches Material wirkt lediglich osteokonduktiv, kann osteointegrativ wirken und kann in verschiedenen Variationen vorkommen wie Pellets, Implantate, Injektionen und 3D-gedruckter Knochenersatz mit ihren jeweiligen Vor- und Nachteilen [59, 60].

1.6.6 Zukünftige Visionen des Knochenersatzes mit Tissue Engineering

Eine zukünftige Vision im Bereich des Knochenersatzes ist, dass dieser individuell angepasst werden kann und synthetisches Material alle Aspekte eines idealen Knochenersatzes erfüllt [59]. Ein Beispiel für Innovationen in diesem Bereich sind Hydrogele, die Osteogenese anregen und somit die Knochenheilung verbessern [59, 61]. Einen weiteren Ansatz bieten Implantate, die die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Antibiotika modulieren [59].

Eine weitere Vision wird unter dem Begriff *Tissue Engineering* (englisch für Gewebekonstruktion) zusammengefasst. Es existieren verschiedene Ansätze, die alle das Thema Tissue Engineering aus einer anderen Perspektive angehen.

Ein Ansatz beschäftigt sich mit zellulärer Behandlung von Knochendefekten und der Konditionierung dieser Zellen mit Wachstumsfaktoren, den man grob als biologischen Ansatz bezeichnen kann (der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Knochenbildung wird im *Kapitel 1.7* behandelt) [62].

Ein anderer Ansatz behandelt das große Feld an Biomaterialien. So wird an verschiedenen Materialien geforscht, die mehr als nur einen osteokonduktiven Effekt haben [62, 63]. Ein Beispiel hierfür ist bioaktive Keramik, die durch verschiedene bioaktive Ionen wie Strontium, Magnesium und Zink versehen werden kann, um die Zellproliferation und Osteogenese zu erhöhen [63, 64].

Dabei können die Materialien so konstruiert werden, dass sie sich dem Knochen ähnlich verhalten, was als Biomimetik bezeichnet wird [62]. Hierfür ist das Design von nanokonstruierten Materialien zu nennen, die der Architektur bzw. Funktion der Extrazellulären Matrix ähneln [62, 65]. So deutet die *in vitro* Studie von Webster et al. [66], dass die Osteoblastenadhäsion durch Nanomaterialien verbessert werden

kann. Dalby *et al.* [67] zeigten *in vitro*, dass nanotopographische Platten die osteogene Differenzierung humaner Knochenmarksstammzellen verstärken können.

Sehr wichtig ist die Balance zwischen Osteogenese und Vaskularisierung, was ein Ziel der Forschung im *Tissue Engineering* ist, um eine Nekrose beim Einwachsen eines Implantats zu verhindern, da Knochengewebe ein sehr starkes Gefäßnetzwerk hat [63]. Eine Idee ist es hierbei spezielle biologisch aktive Stoffe anzuwenden, die die Freisetzung von angiogenen Wachstumsfaktoren fördern, was aber sehr langsam stattfindet und dieser zeitliche Faktor limitierend für eine mögliche klinische Anwendung ist [63, 68].

Einen weiteren Ansatz bieten 3D-gedruckte Implantate, die vorher schon ein Gerüst an Gefäßen im Druckprozess eingebaut haben und somit ein Gefäßnetzwerk nachahmen [63, 69]. Das Problem ist hierbei, dass viele der 3D-gedruckten Modelle der Komplexität des natürlichen Gefäßnetzwerkes nicht gerechtfertigt werden und lediglich eine simple Struktur bieten [63]. Eine Strategie zur Behebung des Problems haben Deng *et al.* [70] entworfen, so haben sie zusätzlich das 3D-gedruckte Modell mit Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) und humaner Knochenmarkstromazellen (hBMSC) versehen, mit welchem sie die Angiogenese und Osteogenese gefördert haben, Osteoinduktion erzielt haben, als auch ein feines Mikrokapillarnetz entstanden ist [63, 70].

Eine andere Möglichkeit sind 3D-Zellaggregate bzw. Zellsphäroide, die aus mesenchymalen Stammzellen oder der Kombination aus mesenchymalen Stromazellen und Nabelschnur-Endothelzellen gezüchtet werden und sich in verschiedene Richtungen differenzieren können [63, 71]. Roux *et al.* [71] haben Zellsphäroide aus hBMSCs und HUVECs gezüchtet und sie dann in ein Fibringerüst eingekapselt. *In vitro* sind dabei intensive Gefäßnetzwerke entstanden. Danach wurden diese Konstrukte *in vivo* in Ratten, die vorher mit kranialen Knochendefekten versehen wurden, eingepflanzt. Das vorgefertigte Konstrukt anastomosierte mit dem Gefäßnetzwerk der Ratten, die Vaskularisierung wurde gesteigert und ebenso erfolgte Knochenbildung [63, 71].

1.7 Stammzellen, Myokine und der Einfluss auf osteogene Differenzierung

1.7.1 Grundlagen der Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die undifferenziert bzw. niedrig differenziert sind, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen und sich langsam teilen durch ihren langsamen Zellzyklus [43, 44]. Stammzellen bilden zwei Tochterzellen, von denen eine als Stammzelle verbleibt im Stammzell-Vorrat und die andere Tochterzelle zur Progenitorzelle (Vorläuferzelle) wird (siehe *Abbildung 2*) [43, 44]. Aus der Progenitorzelle bildet sich eine Population, welche sich zeitweilig stark vermehrt als transitorisch amplifizierende Zelle [43, 44]. Sie verliert ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung nach vielen Teilungszyklen und differenziert sich [44].

Die verschiedenen Binde- und Stützgewebeformen entwickeln sich aus dem Mesenchym, was auch als embryonales Bindegewebe bezeichnet wird [43, 44]. Es

ist morphologisch kaum differenziert und hat mesodermalen Ursprung, als auch Anteile aus der Neuralleiste [43]. Es besteht aus mesenchymalen Stammzellen, die multipotent sind, Fibroblasten ähneln und sie besitzen viele dünne Fortsätze, mit welchen sie ein dichtes oder weniger dichtes dreidimensionales Netz bilden und über *Gap junctions* miteinander kommunizieren [43, 44]. Die Extrazellulärsubstanz ist reich an Hyaluronan, viskös und hat kleine Mengen an Kollagenfasern [43, 44]. Aus den Mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich unter anderem Fibroblasten (wie des lymphatischen Gewebes), Chondrozyten, Osteoblasten, Knochenmarkstromazellen, Fettzellen, glatte Muskulatur, Skelettmuskulatur und Herzmuskelzellen [43, 72].

Mesenchymale Stammzellen können aus verschiedensten Geweben isoliert werden, aber die gängigsten Entnahmestellen sind Knochenmark und Fettgewebe, während die mesenchymalen Stammzellen verschiedenster Gewebe Unterschiede haben können, wie in ihrer Proliferationsrate oder der Genexpression [73, 74].

Neben Knochenmark und Fettgewebe sind sie auch in anderen Geweben wie Amniongewebe, der Wharton Sulze der Nabelschnur, Nabelschnurblut, Menstruationsblut, Endometrium, Skelettmuskel, Synovia und der Zahnpulpa vorhanden und können als Extraktionsquelle dienen [73, 75]. Dabei muss sinnvoll evaluiert werden, welche Quelle eine einfache Extraktion bietet, ethisch vertretbar, eine adäquate Menge an Stammzellen hat und den Spender bei der Entnahme am wenigsten schädigt [73].

1867 stellte der deutsche Pathologe Cohnheim die Hypothese über mesenchymale Stammzellen auf, die sich im Knochenmark befinden und zur Geweberegeneration dienen, was später unter anderem durch andere Forscher wie Alexander Friedenstein untersucht und bewiesen wurde [76, 77].

1.7.2 direkte Ossifikation

Bei der direkten bzw. desmalen Ossifikation differenziert sich Knochengewebe direkt aus Mesenchymzellen [43, 78]. Ein Beispiel hierfür sind die Knochen des Schädeldachs, des Gesichtsschädels, sowie des Schlüsselbeins [44]. Das Mesenchym bildet dabei gefäßreiche Ossifikationszentren mit einem dichten Kapillarnetz, in dem sich Mesenchymzellen konzentriert anordnen und dort dann zu Osteoblasten differenzieren [43, 44]. Die Osteoblasten sind dabei durch *Gap junctions* miteinander verbunden [44]. Die Osteoblasten sezernieren Osteoid, was im ersten Schritt eine unverkalkte Matrix ist, welche Proteoglykane, Glykoproteine und Kollagen Typ I enthält [43]. Sie verkalken dann im nächsten Schritt, indem Kalziumphosphat in Form von Hydroxylapatit ausfällt [43]. In den Kalk mauern sich die Osteoblasten ein und differenzieren so zu Osteozyten (siehe *Abbildung 2*) [78]. Peripher an diese Ossifikationszentren lagern sich Osteoblasten an, die weiter zu Knochengewebe differenzieren, dieser Prozess wird als appositionelles Wachstum bezeichnet [44].

Mehrere sich entwickelnde Knochenstücke fusionieren zur primären Spongiosa und später auch Kompakta mit einem Kapillarnetz [44]. Parallel wird der Knochen während dieser Vorgänge durch die Aktivität der Osteoklasten umgebaut [44].

1.7.3 indirekte Ossifikation

Bei der indirekten bzw. chondralen Ossifikation wird aus dem primär knorpelig angelegten Skelett durch einen Umbauprozess Knochengewebe, was die meisten Knochen betrifft, wie die der Extremitäten oder Wirbel [43].

Man unterscheidet hierbei zwischen der perichondralen und endochondralen Ossifikation [43, 44]. Es bildet sich in den Extremitätenknospen in der 5. - 6. Embryonalwoche eine Verdichtung des Mesenchyms, welches sich zu Chondroblasten differenziert [44].

Bei der perichondralen Ossifikation wird die spätere knöcherne Diaphyse gebildet, indem um die Mitte des Knorpelmodells eine Knochenmanschette moduliert wird [44]. Dabei differenzieren sich dort Osteoblasten am Perichondrium direkt über desmale Ossifikation zu Knochengewebe, welches dann nach proximal und distal in die Länge um den Knorpel wächst [43, 44]. Aus dem Perichondrium entsteht im Verlauf das Periost und die Knochenmanschette wächst weiter in die Dicke [44].

Im Inneren des Knorpelmodells wird die endochondrale Ossifikation eingeleitet, indem sich dort die Chondroblasten zu hypertrophen Chondrozyten differenzieren [44]. Dies wird als Blasenknorpel bezeichnet und führt zu einer Verkalkung der Knorpelmatrix [43, 44]. Osteoklasten aus dem Periost bohren sich in die Knorpelmatrix, wodurch Blutgefäße einwachsen, die ein Einwachsen des Mesenchyms mit unter anderem Osteoprogenitor-Zellen ermöglichen [43, 44]. Diese Osteoprogenitor-Zellen werden später über Zwischenschritte (siehe *Abbildung 2*) zu Osteoblasten [44].

Gleichzeitig wandern auch Zellen in die Knorpelmatrix ein, die zu Chondroklasten fusionieren, welche die Knorpelmatrix abbauen und dadurch die primäre Markhöhle schaffen [43, 44]. Teile der Knorpelmatrix werden nicht abgebaut, sondern dienen in Form von Trabekeln als Ablagefläche für Osteoblasten, die dort dann Osteoid ablagern, was verkalkt [43, 44]. Folglich entsteht eine Knochenmatrix, die sich zur primären Spongiosa entwickelt und dieser Prozess der endochondralen Ossifikation läuft in beide Richtungen der Schaftmitte ab [43, 44].

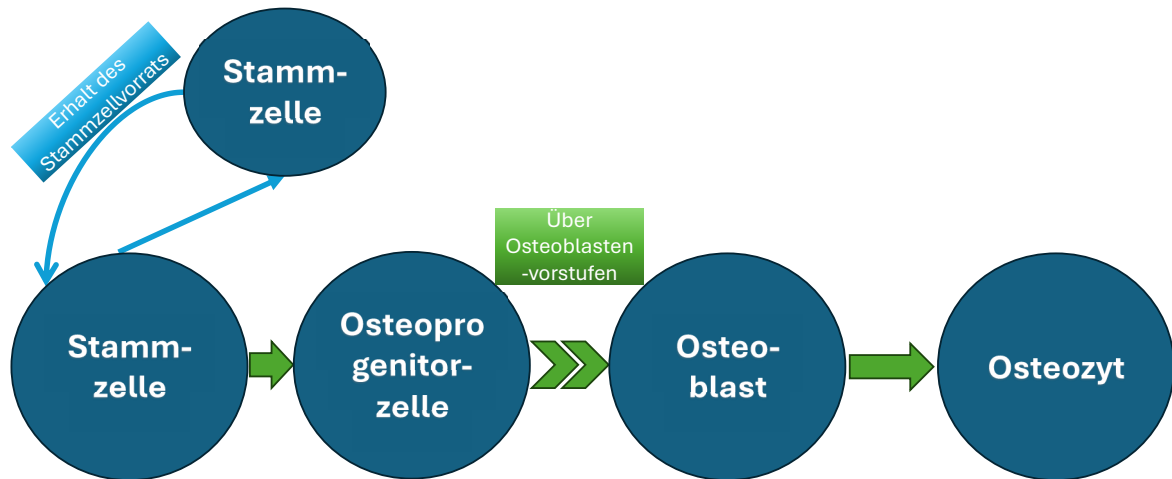


Abbildung 2: vereinfachte Darstellung der osteogenen Differenzierung aus Stammzellen

1.8 Myokine und der „Crosstalk“ zwischen Muskel und Knochen

Die osteogene Differenzierung unterliegt einer komplexen Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Hormonen [78]. Eine bedeutende Schnittstelle ist die Interaktion zwischen Muskel und Knochen. Die Wichtigkeit dieser Interaktion wurde unter anderem durch die Arbeiten von Pedersen *et al.* betont [79-81], mit der Skelettmuskulatur als endokrines Organ zur Regulation des Knochenmetabolismus. Diese Interaktion wird in der Literatur auch als „*Muskel-Knochen-Crosstalk*“ bezeichnet [82]. Pedersen *et al.* [79, 80] etablierten weitreichend dabei 2010 den Begriff Myokin, welches die von der Muskelgewebe ausgeschütteten Zytokine und andere Peptide (können autokrin, parakrin oder endokrin wirken) bezeichnet, die verschiedene Gewebe und Organe beeinflussen [82]. Schon vorher wurden diese Faktoren von Pedersen *et al.* als *Exercise Factor* (deutsch Trainingsfaktor) bezeichnet, von anderen Wissenschaftlern als *Work Factor* (deutsch Arbeitsfaktor), und 2003 wurde der Begriff Myokin erstmalig von Pedersen *et al.* eingeführt [82, 83].

Das Muskelgewebe beansprucht dabei 40% - 50% des ganzen Körpergewichts und ist somit das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers [84, 85]. Diese Tatsache lässt schlussfolgern, dass so ein großes Organ einen weitreichenden physiologischen Einfluss auf verschiedene Prozesse im Körper haben kann [84, 86, 87].

Goldstein [88, 89] stellte schon 1961 die Hypothese auf, dass ein humoraler Faktor aus Skelettmuskelzellen sezerniert wird, der neben Insulin Auswirkungen auf den Glucose Transport hat. Dieser wird durch körperliche Anstrengung getriggert und dient als Antwort für den gesteigerten Glucosebedarf [88, 89]. Dies unterstützten auch Arbeiten im Versuch an gesunden Probanden mit Epiduralanästhesie, als auch an Patienten mit Rückenmarkschäden (und somit Unterbrechung der

afferenten und efferenten Nervenimpulse), die durch elektrische Stimulation ähnliche physiologische Reaktionen wie die Gesunde erzielten [82, 90, 91]. So zeigten Kjaer *et al.* [90] eine Ausschüttung verschiedener Hormone und Metabolite in Abhängigkeit von humoralen Mechanismen bei Belastung trotz Ausschaltung der neuralen Komponente.

Die Analyse der aus der Skelettmuskulatur ausgeschütteten Metabolite, das sogenannte Muskel-Sekretom, wies auf eine Zahl von mehreren hundert verschiedenen sezernierten Proteinen hin [82, 92, 93]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit des Forschungsfeldes mit der Skelettmuskulatur als Organ zur Kommunikation mit anderen Geweben und Organen [94].

1.9 Entdeckung der Myokine

Das erste nachgewiesene Myokin, welches aus dem Skelettmuskel sezerniert wird und in den Blutstrom gelangt, war Myostatin, auch *Growth-Differentiation Factor-8* (GDF-8) genannt [89, 95]. McPherron *et al.* wiesen dabei Myostatin als Mitglied der TGF- β Superfamilie nach, welches sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch bei ausgewachsenen Mäusen aus dem Muskelgewebe sezerniert wird [95].

Zusätzlich haben McPherron *et al.* [95] das Myostatin-Gen bei Mäusen ausgeschaltet und zeigten hierbei, dass die Myostatin-null Mäuse (haben kein endogenes Myostatin) signifikant größer als die Wildtyp-Mäuse waren und einen größeren Skelettmuskelanteil besitzen durch Muskelzellhyperplasie und Hypertrophie. Dies deutete somit auf die Funktion des Myostatins hin als negativer Regulator des Skelettmuskelwachstums [95]. Es wurde angedeutet, dass die Zunahme an Größe und Gewicht der Myostatin-null Mäuse auch zusätzlich durch eine erhöhte Knochenmasse bedingt sein könnte [95].

Das erste nachgewiesene Myokin, welches nach Skelettmuskelkontraktion in den Blutstrom ausgeschüttet wird, war hingegen Interleukin-6 (IL-6) [81, 89, 96]. Steensberg *et al.* [96] gingen dabei der Frage nach, ob die in vorherigen Arbeiten gezeigten starken Anstiege der IL-6 Konzentration im Blut nach körperlicher Anstrengung durch Skelettmuskelkontraktion erklärbar sein könnten. Sie zeigten in ihrer Arbeit an 6 gesunden männlichen Probanden, dass nach körperlicher Belastung durch Muskelkontraktion eines Beines es im Verhältnis zum nicht belasteten Bein es zu einer starken IL-6 Erhöhung kommt [96]. Dabei überwiegt die durch die Muskelkontraktion ausgeschüttete IL-6-Konzentration deutlich die im ganzen Körper akkumulierte IL-6 Konzentration um das 17-fache [96]. So wurde gedeutet, dass IL-6 unter anderem eine wichtige Rolle bei der Glucose Homöostase bei längerer körperlicher Anstrengung spielt [96]. Die Rolle des IL-6 ist dabei komplex, sodass sowohl proinflammatorische bzw. pathogene Eigenschaften als auch anti-inflammatorische bzw. protektive Eigenschaften diskutiert werden [81, 97].

Fibroblast-Growth-Factor-2 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2, FGF-2) wurde zunächst durch die anabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel gekennzeichnet [98]. Später wiesen die Arbeiten von Hamrick *et al.* [99, 100] auf die Ausschüttung des Myokins durch Muskelfasern im Muskel-Knochen-Crosstalk hin. So zeigten

Hamrick *et al.* [99], dass in vitro Myotubuli sowohl IGF-1, als auch FGF-2 sezernieren. So sind die dazugehörigen Rezeptoren reichlich im Periost und im Skelettmuskel vorhanden [99, 100].

1.10 Fragestellung und Zielsetzung

In dieser Arbeit geht es darum, mögliche Zusammenhänge zwischen Immunreaktionen und der osteogenen Differenzierung zu betrachten. Wie schon in Abschnitt 1.8 beschrieben, bietet dieses Feld viel Potential, über den Crosstalk zwischen Muskel und Knochen (siehe *Abbildung 3*) Einflüsse zu erforschen, die sich sowohl positiv als auch negativ auf die Knochenbildung auswirken können. Die Vorstimulation und die osteogene Differenzierung der hBMSCs unter ausgewählten Myokinen dient der Simulation einer akuten Entzündung (z.B. nach muskulärer Belastung) und einer chronischen Entzündung (wie es bei einem pathologischen Vorgang, z.B. der Osteoporose sein kann). Dabei können die Myokine und das zugehörige Entzündungsmilieu eine Schlüsselrolle haben, um verschiedene physiologische und pathologische Prozesse im Knochenstoffwechsel nachzuvollziehen, als auch eine Schnittstelle zur Therapie und weiteren Forschung zu bieten. Diesbezüglich wurde in dieser Arbeit der Einfluss proinflammatorischer Myokine bzw. entzündlicher Mediatoren auf hBMSCs untersucht im Modell einer akuten Entzündung und in einem weiteren Schritt im Modell einer chronischen Entzündung untersucht. Im Modell der akuten Entzündung wurden die hBMSCs unter dem Einfluss der Myokine IL-6 und FGF-2 untersucht. Im Modell der chronischen Entzündung wurden unter Induktion einer osteogenen Differenzierung der Einfluss der Myokine bzw. entzündlichen Mediatoren FGF-2, IL-6, IL-1 β , TNF α und IFN- γ untersucht. Im separaten Versuch wurde die osteogene Differenzierung unter der Gabe des Myokins Myostatin untersucht.

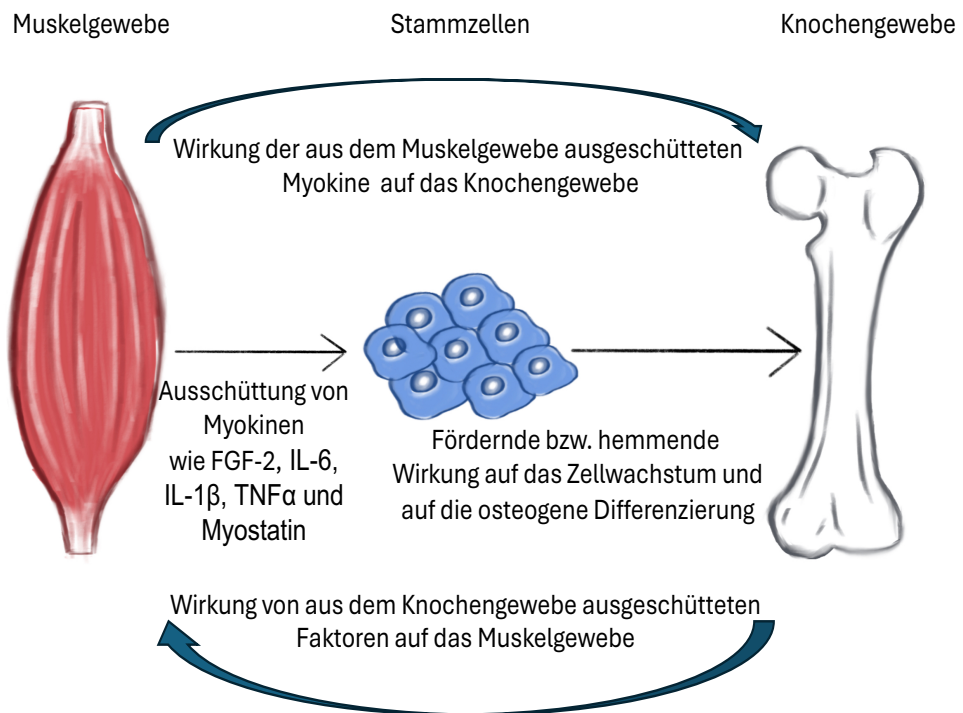


Abbildung 3: Schematische Darstellung des „Muskel-Knochen-Crosstalks“. Die Interaktion zwischen Muskelgewebe, den ausgeschütteten Myokinen, der Einfluss auf die osteogene Differenzierung der Stammzellen und die Wirkung auf das Knochengewebe wird hier abgebildet. Ebenfalls ist eine Wirkung des Knochengewebes auf das Muskelgewebe in die andere Richtung angedeutet, welche hier nicht weiter vertieft wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte

Aluminiumständer zur kühlen Probenlagerung (Rotilabo- Alu.Rack 1,5)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Autoklav (Systec DX-90)	Systec GmbH; Linden; Deutschland
Biophotometer	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Brutschrank (37 °C, 5 % CO ₂) (HERACELL 150 i CO ₂ -Inkubator)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Eismaschine (RF 0244 A)	Manitowoc Ice; Manitowoc; USA
Eiswanne zur kühlen Probenlagerung (neoLab Eisbad klein aus PS)	neoLab Migge GmbH; Heidelberg; Deutschland
Gefrierschrank -20 °C (GUw 1213)	Liebherr-International Deutschland GmbH; Biberach an der Riß, Deutschland
Gefrierschrank – 86°C (Hera Freeze)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, BRD
Heizbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Heizblock (dry bath)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland
Kühlschrank 4 °C (KUw1740)	Liebherr-International Deutschland GmbH; Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank 4 °C mit Glastür (QCR2304U14)	Queue Systems Inc.; Asheville; USA
Mehrfachdispenser (Multipipette plus)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland

Mikroskop (Axiovert 40 C)	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Photometer (multilabel plate reader Victor 3)	Perkin Elmer Inc.; Waltham; USA
Photometer PC (Optiplex GX620)	Dell Inc.; Round Rock; USA
Pipetten (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf research/research plus/reference)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Pipettierhilfe (accu-jet pro)	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Pipettierhilfe (pipetus)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG; Eberstadt; Deutschland
Pipettierhilfe (Omega Pipettor)	Argos Technologies Inc.; Vernon Hills; USA
Pumpe (LABOPORT)	KNF Neuberger GmbH; Freiburg; Deutschland
Rüttelplatte (Kleinschüttler KM-2)	Edmund Bühler GmbH; Bodelshausen; Deutschland
Schwarze Tonne (Kontaminationsabfall)	MAUSER Corporate GmbH; Brühl; Deutschland
Sicherheitswerkbank mit Abzug (TA 1500 x 900 – 900) (Laborsystem mc6)	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG; Wangen; Deutschland
Sterile Werkbank (Herasafe KS 18)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland

Sterile Werkbank (Euroflow EFA5)	Clean Air Techniek bv; Woerden; NL
Taumelrollenmischer (RM5; RM 10 W)	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH; Ballrechten- Dottingen; Deutschland
Thermostat für Wasserbad (Thermomix BU)	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland
Vortexer (IKA MS3 basic) (3000 U/min)	IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Vortexer (Vortex mixer)	vwr International GmbH; Darmstadt; Deutschland
Vortexer (Reax top)	(Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach; Deutschland
Vortexer (L46 Power Mixer)	Labinco BV; Breda; NL
Waage (d = 0,1 mg) (ABJ 220-4M)	Kern & Sohn GmbH; Balingen- Frommern; Deutschland
Waage (d = 10 mg) (Adventurer Pro AV412)	Ohaus Corporation, Pine Brook; USA
Wärme-Bad 37 °C (Aqualine AL 12)	LAUDA DR. R. WOBSE GmbH & Co. KG; Lauda- Königshöfen; Deutschland
Zählkammer/Hämocytometer (Neubauer, Tiefe 0,1 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG; Lauda-Königshöfen, Deutschland
Zentrifuge (Heraeus Fresco 17)	Thermo Fisher Scientific GmbH; Schwerte; Deutschland Thermo Elextron Heraeus Megafuge 16 R

	Thermo Elextron Heraeus Pico 17 Microcentrifuge
--	--

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

0,5 ml/ 1 ml/1,5 ml/2 ml Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes™ 0,5 ml/1 ml/1,5 ml/2 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
15 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich, Art.-Nr.: 188171
50 ml Falcons	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich, Art.-Nr.: 227261
48 well plate (48-well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Austria
96-well-Platte (GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Einweg-Wägeschalen (diamond weighting boats, white, antistatic)	Vwr International GmbH; Darmstadt; Deutschland
Fusselarme Papiertücher (KIMTECH SCIENCE* Präzisionstücher weiß/klein)	Kimberly-Clark Global Sales Inc.; Rosewell; USA
Handschuhe (Micro-Touch® Nitra-Tex® Nitrile Powder-Free Examination Gloves)	Ansell GmbH; München; Deutschland
Kryogefäße (Cryo.s™ 2 ml)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Multipipetten- Spitzen (0,5 ml/5 ml/ 10ml) Combitips Plus Neubauer improved	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Objektträger 76x26mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH; Deutschland
Papiertücher (tapiraplust Kosmetiktücher)	GVS Großverbraucherspezialisten eG; Heidenheim; Deutschland

Pasteurpipetten aus Glas (ISO 7712)	BRAND GmbH + CO KG; Wertheim; Deutschland
Pipettenspitze 10 µl/100 µl/1000 µl	STARLAB GmbH, Hamburg; Deutschland
Sterilfilter (Millex®-GS 0,22 µm)	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Stripetten (5 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Münschen; Deutschland
Stripetten (10 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Münschen; Deutschland
Stripetten (25 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Münschen; Deutschland
Stripetten (50 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Münschen; Deutschland
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
T75er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap
T175er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap
Verschlussfolie (Parafilm „M“)	Bemis Company Inc., Neenah; USA
Zellschaber (28 cm)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Abwurfbeutel 200 x 300 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE

2.1.3 Substanzen und Lösungen

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Substanzen und Lösungen

4 % Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Alizarin Rot S	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Aqua destillata (Demi-Wasser)	Otto Fischar GmbH & Co KG; Saarbrücken, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
Cetylpyridiniumchlorid (CPC)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Dexamethason	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
DMSO Dimethylsulfoxid D2650	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (D-MEM)(1X), liquid (High Glucose))	Life Technologies Ltd.; Paisley; UK
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline modified, without calcium chloride and magnesium chloride, liquid, sterile- filtered, suitable for cell culture)	Sigma-Aldrich Co.; St. Louis; USA
Ethanol (70 %) zur Desinfektion (Technisolv Ethanol 70 (V/V) denaturated Eurodenaturant	Vwr Internation S.A.S.; Fontenay- sous-Bois; Frankreich
FCS (Sera Plus special processed FBS; sterile filtered)	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
HEPES (HEPES solution, 1 M, pH 7,0- 7,6, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture)	Sigma-Aldrich Co.; St. Louis; USA

L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
p-Nitrophenyl Phosphat Lösung	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Germany
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Trypsin (Trypsin-EDTA 10 X, sterile filtered)	Biowest; Nuaille; Frankreich
Zellviabilitäts Assay CellTiter-Blue®	Promega Corporation; Madison; USA

2.1.4 Myokine

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Myokine

Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2)	PeproTech; Hamburg; Deutschland
Interleukin-1 β (IL-1 β)	PeproTech; Hamburg; Deutschland
Interleukin-6 (IL-6)	PeproTech; Hamburg; Deutschland
Interferon- γ (IFN- γ)	PeproTech; Hamburg; Deutschland
Myostatin	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; Rockford, Illinois; USA
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	PeproTech; Hamburg; Deutschland

2.1.5 Software

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Software

EndNote 21	Clarivate Analytics; Philadelphia Pennsylvania; USA
GraphPad Prism 9.5.1	GraphPad Software; Boston; USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation; Redmond, Washington; USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation; Redmond, Washington; USA
Workout 2.0	DAZDAQ LTD., Brighton, UK

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden hBMSCs aus der unfallchirurgischen Abteilung der medizinischen Hochschule Hannover (kommerziell) erworben und unterliegen einer Zulassung per Ethikvotum (Nummer 3634). Die hBMSCs wurden intraoperativ den Patienten/Patientinnen nach traumatischer Verletzung entnommen mit Einwilligung dieser oder der Einwilligung berechtigter Personen. Für diese Arbeit wurden die hBMSCs von 11 verschiedenen Spendern/Spenderinnen verwendet. Bei Ankunft im Labor befanden sich die Zellen in der ersten Passage und wurden kryokonserviert geliefert. Die initiale Zellzahl, Identifikationsnummer und Isolationsdatum wurden angegeben. Zusätzlich gab es spezifische Informationen über den Spender/Spenderin und den hBMSCs, die in diesem Analysezertifikat angegeben wurden. Grobe, den Patienten/Patientin beschreibende, Informationen wie Alter, Geschlecht, BMI, ASA-Score, Grund für Krankenhausaufenthalt, Komorbiditäten, HIV-Testung, HBV-Testung und HCV-Testung wurden angegeben. Ebenfalls wurden Alkohol und Nikotinkonsumverhalten angegeben, wie auch Allergien, Ernährung und sportliche Betätigungen. Weitere angegebenen Informationen waren verschiedene Laborparameter des Spenderblutes, wie Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, RDW, Thrombozyten, Thrombozytenvolumen, Quicktest, INR, APTT und die Pässe der CFU. Zusätzlich wurden die Differenzierungspotentiale der hBMSCs in die adipogene, osteogene und chondrogene Linie angegeben und die hBMSCs wurden auf verschiedene Oberflächenantikörper getestet.

2.2.2 Zellkulturmedium

Die hBMSCs wurden im Wachstumsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Wachstumsmedium enthielt Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin), 10 % Fetales Kälberserum (FCS/FBS), 2 % Penicillin/Streptomycin und 1 % HEPES Puffer. Ein Mediumwechsel erfolgte in der Regel zwei- bis dreimal in der Woche, indem das alte Medium steril abgesaugt wurde und mit frischem, auf 37 °C vorgewärmten, Medium ersetzt wurde. Für das schnellere Erreichen einer Konfluenz und durch die benötigte hohe Zellzahl für die verschiedenen Versuchsabschnitte wurde das Wachstumsmedium zusätzlich Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 versehen (FGF-2, 2 ng/ml). Es erfolgte bei ausreichender Konfluenz eine FGF-2 Karenz von mindestens 10 Tagen, bevor die eigentliche Vorstimulation gestartet wurde. Die Zellen werden auch anfänglich in Hannover mit FGF-2 kultiviert, ehe sie per Kryokonservierung an Abnehmer weitergereicht werden.

2.2.3 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in verschiedenen Passagen für die Versuche aufgetaut und kultiviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für optimale Wachstumsbedingungen und das schnellere Erreichen einer hohen Konfluenz in T-75-Kulturflaschen oder Petrischalen kultiviert und dann passagiert. Bei einer ausreichenden Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen passagiert und in späteren Passagen in T-75- oder T-175-Kulturflaschen weitergezüchtet und so lange passagiert, bis eine ausreichende Zellzahl für die Versuchsabschnitte vorhanden war. Das enzymatische Passagieren erfolgte mit Trypsin-EDTA. Dabei wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen, damit mögliche Reste des Mediums auch entfernt werden und folglich wurde auch dieser Rest abgesaugt. Parallel wurde Trypsin-EDTA 1 zu 10 mit PBS verdünnt und auf 37 °C vorgewärmt, damit die Zellen nicht durch eine zu niedrige Temperatur geschädigt werden. Die Trypsin-EDTA- und PBS-Mischung wurde darauf in die Kulturflaschen bzw. Petrischalen gegeben. Bei den Petrischalen waren 3 – 4 ml, bei T-75-Kulturflaschen 5 – 7 ml und bei T-175-Kulturflaschen 10 ml der Mischung nötig. Nach Gabe dieser Mischung wurden die Zellen für ca. 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch diese Bedingung konnte die Serinprotease Trypsin optimal arbeiten und die Zellen von dem jeweiligen Behälter ablösen. Damit die Zellen weitgehend wie möglich abgelöst wurden, wurde zusätzlich nach den ca. 5 Minuten das jeweilige Behältnis leicht beklopft. Danach konnte mikroskopisch begutachtet werden, ob die Zellen vollständig abgelöst waren und gegebenenfalls mit einem Zellschaber die restlichen Zellen manuell ablösen. Darauf wird die gleiche, wie in der Trypsin-EDTA und PBS-Mischung, Menge Medium gegeben, um die proteolytische Aktivität des Trypsins zu stoppen. Die Zellsuspension wurde dann in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g (G-Zahl) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml Medium, je nach Pelletgröße auch mehr, resuspendiert. Dann wurde die Zellzahl bestimmt bzw. die Zellen in weitere Zellkulturflaschen oder Wachstumsplatten überführt.

2.2.4 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte nach dem oben erwähnten Schritt im Abschnitt 2.2.3 der Zentrifugierung und Resuspension. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.7 erwähnt, gezählt und bei einer maximalen Zellzahl von 2×10^6 je 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfriermedium ist eine Mischung aus FCS und 10 % DMSO, welches bei 4 °C gelagert wird. Die Kryoröhrchen wurden sofort in einen vorgekühlten Cryo-Container bei -80 °C für 24 Stunden überführt. Dies musste umgehend geschehen, da DMSO sonst bei Raumtemperatur seine zytotoxische Wirkung entfaltet. Frühestens nach 24 Stunden mussten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagert werden.

2.2.5 Auftauen der Zellen

Das Wachstumsmedium wurde auf 37 °C vorgewärmt und die kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C langsam angetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Medium überführt und dort resuspendiert. Danach wurde es, wie auch in Abschnitt 2.2.3 erwähnt, zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde dann mit 1 ml Medium resuspendiert, gegebenenfalls die Zellzahl bestimmt und die Zellen wurden dann in die jeweiligen Kulturflaschen bzw. Petrischalen mit Medium überführt. Danach wurden sie, wie aus Abschnitt 2.2.3 bekannt, im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.6 Vorstimulation

Für den Hauptversuch zur Simulation einer akuten Entzündung wurden die Zellen eines Spenders in der gleichen Passage über 10 Tage mit den Myokinen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2, 2 ng/ml) bzw. Interleukin-6 (IL-6, 6 U/ml) im Vergleich zur Kontrolle stimuliert. Diese Myokine wurden jeweils dem Wachstumsmedium ergänzt und es erfolgte ein Mediumwechsel regelrecht zwei- bis dreimal die Woche. Die Zellen wurden (siehe Abschnitt 2.2.3) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Ab dem Start der Vorstimulation wurden die Zellen nicht mehr passagiert, bis sie später zum Start der osteogenen Differenzierung ausplattiert wurden. Dies war nötig, um den Effekt der Vorstimulation auf die Zellen nicht durch das Passagieren potenziell zu verfälschen. Es war eine richtige Balance nötig, ausreichend Zellen zum Start der Vorstimulation in den Kulturflaschen zu bebrüten, damit die Zellen nach 10 Tagen eine hohe Konfluenz erreichen. Zu beachten war, dass die Zellen ebenfalls nicht früh eine zu hohe Konfluenz erreichen durften, da dies das Wachstumsverhalten der Zellen potenziell negativ beeinflussen konnte.

2.2.7 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dafür wurde ein dünnes Glas auf die Neubauerzählkammer befestigt. Nachdem das Zellpellet mit Medium resuspendiert wurde (siehe Abschnitt 2.2.3), wurden 10 µl dieser Zellsuspension mittels Pipette mit 10 µl Trypanblaulösung gemischt. Es wurden 10 µl dieses Gemisches wurden dann zwischen der Neubauerzählkammer und dem Glas pipettiert. Die Trypanblaulösung diente der Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen. Es färben sich vitale Zellen nicht an, hingegen färben sich tote Zellen blau an, da sich durch Membranläsionen die Proteine der Zellen anfärben. Unter dem Mikroskop wurden dann in den vier äußeren Großquadranten der Neubauerzählkammer meanderförmig die Zellen gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Dieser Wert multipliziert mit 20.000 entsprach der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension. Die Zellzahlbestimmung erfolgte vor dem Einfrieren und vor der Aussaat.

2.2.8 Wachstumsversuch

Als ersten Überblick und zur Bestimmung des Einflusses aller verwendeter Myokine (Konzentrationen wie im Differenzierungsversuch, siehe Abschnitt 2.2.9) auf das Zellwachstum wurden 2000 Zellen pro Well auf eine 96-Well Platte ausgesät. Die Zellviabilität (Zellzahl) wurde nach 3 und 7 Tagen mittels CellTiter-Blue® (CTB) Viabilität Assay gemessen. Die Zellen erhielten Wachstumsmedium, welches mit den jeweiligen Zytokinen versehen war und es erfolgte zwei- bis dreimal die Woche ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden (siehe Abschnitt 2.2.3) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2.2.9 Osteogene Differenzierung mit Zytokinen

Für die Simulation einer chronischen Entzündung und Analyse der Wirkung der Myokine auf die osteogene Differenzierung wurden die Zellen in diesem „Hauptversuch“ nach der Phase der Vorstimulation (siehe Abschnitt 2.2.6) mit 20.000 Zellen pro Well auf eine 48-Well Platte ausgesät, damit die hBMSCs durch eine ausreichende Konfluenz optimiert osteogen differenzieren können. Die Zellen wurden zunächst mit 500 µl Wachstumsmedium pro Well ausgesät und am Folgetag erst der Differenzierungsversuch gestartet, damit die Zellen Zeit haben, sich am Boden abzusetzen. Die Zellen wurden dann über 14 Tage mit Differenzierungsmedium (OIM) differenziert. Das Differenzierungsmedium enthielt Wachstumsmedium (siehe Abschnitt 2.2.2, lediglich ohne HEPES), welches zusätzlich versehen war mit Dexamethason (500 nM), L-Ascorbin-2- Phosphat (50 µM) und β-Glycerolphosphat (10 mMol). Während der Differenzierungszeit wurden die hBMSCs mit den Myokinen FGF-2 (2 ng/ml), IL-6 (6 U/ml), Interleukin-1β (IL-1β, 100 U/ml), Tumornekrosefaktor-α (TNFα, 100 U/ml) und Interferon-γ (IFN-γ, 31,25 U/ml, bei zwei Versuchen zusätzlich mit 3,125 U/ml) behandelt (siehe *Abbildung 4*). Im separaten Versuch gleicher Ausführung (ohne Vorstimulation) wird die Differenzierung unter Gabe von Myostatin (50 ng/ml) untersucht. Es erfolgte zwei- bis dreimal die Woche ein Mediumwechsel mit 250 µl Differenzierungsmedium pro Well. Die Zellen wurden (siehe Abschnitt 2.2.3) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 14 Tagen wurde die Zellviabilität bzw. Zellzahl mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts Assay, die Mineralisierung mittels Alizarinrot-S-Färbung (OD 600) und als ein weiterer Differenzierungsmarker wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) bestimmt (OD 405). Alle Messungen erfolgten photometrisch.

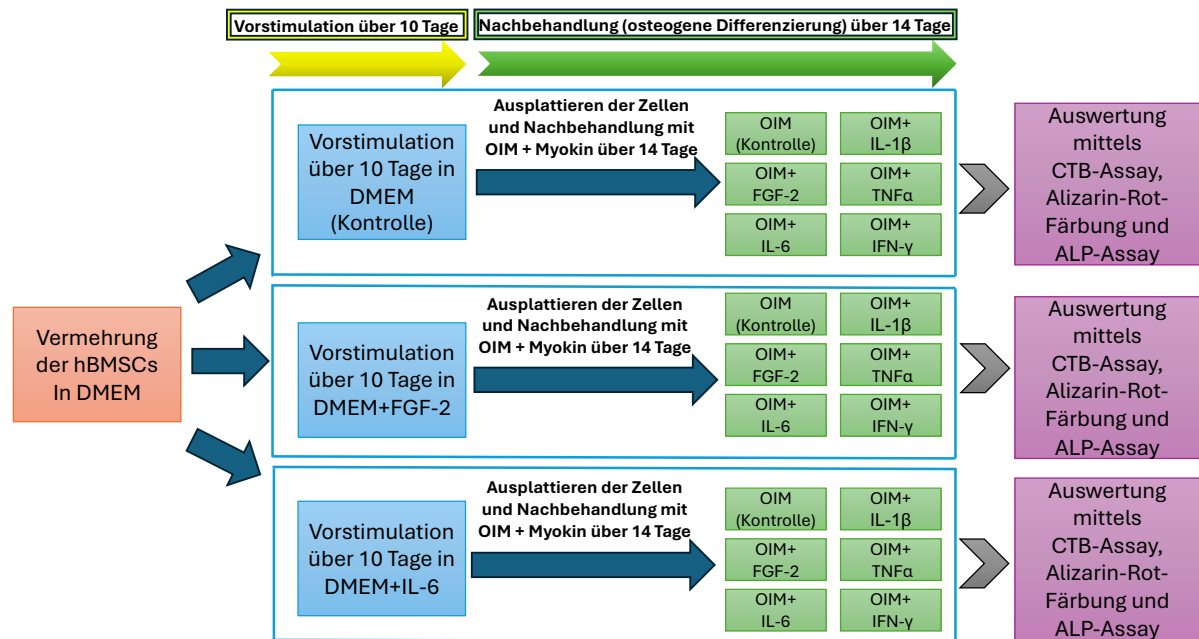


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchaufbaus des Hauptversuches der osteogenen Differenzierung

2.2.10 Differenzierungsversuch über 28 Tage

Um die osteogene Differenzierung unter zeitlichem Einfluss zu untersuchen, wurde diese bei verschiedenen Spendern ohne zusätzliche Myokingabe untersucht. Die Zellen wurden nach dem gleichen Schema (siehe Abschnitt 2.2.9) mit 20.000 Zellen pro Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Es erfolgte auch hier zwei- bis dreimal die Woche ein Mediumwechsel mit 250 µl Differenzierungsmedium pro Well. Es wurde an Tag 0 vor der Gabe von Differenzierungsmedium und an den Tagen 7, 14, 21 und 28 nach der Gabe von Differenzierungsmedium erneut die gleichen Parameter (siehe Abschnitt 2.2.9) Zellviabilität bzw. Zellzahl, Mineralisierung und Differenzierung gemessen.

2.2.11 Alizarin-Rot Färbung, Mikroskopie und Rückfärbung mit CPC

Die Alizarin-Rot Färbung dient dem Nachweis der Mineralisierung der entstandenen Knochenmatrix und somit als indirekter Nachweis der osteogenen Differenzierung. Da durch die Einlagerung von Calciumphosphat (siehe Abschnitt 1.5.3 und 1.5.5) die osteogene Differenzierung gekennzeichnet ist, wird dieser Mechanismus ausgenutzt, indem Calciumverbindungen durch die Alizarin-Rot Färbung angefärbt werden.

Das Alizarin-Rot Lösung wird hergestellt, indem 0,5 % des Alizarin Rot S mono Pulver in destilliertem Wasser gelöst wird. Die zu untersuchenden Zellen wurden vorbereitet, indem das Medium abgesaugt wurde und die Zellen mit ca. 1 ml PBS pro Well gewaschen wurden. Das PBS wurde darauf abgesaugt und auf die Zellen wurde dann 4 %-iges Paraformaldehyd (PFA) gegeben. Hier war wichtig, dass der

Boden der Wells durch das PFA benetzt ist, damit eine Fixierung erfolgt. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit PFA fixiert. Danach wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und 200 µl der Alizarin-Rot pro Well Lösung wurde auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen wurden sanft mit destilliertem Wasser gewaschen, bis der Überstand farblos war (siehe *Abbildung 4*). Die Zellen wurden mit PBS überschichtet und der Grad der Kalzifizierung der Zellen wurde photographisch festgehalten. Die Zellen wurden mikroskopisch (Zeiss Axiovert 40) Well für Well begutachtet und mit einer Mikroskop-Kamera bei 10-facher Vergrößerung fotografiert (siehe *Abbildung 6*). Danach erfolgte die Rücklösung der Alizarin-Rot Färbung. Zur Vorbereitung des Lösungsmittels wurde Cetylpyridiniumchlorid (CPC) abgewogen und in destilliertem Wasser gelöst, sodass eine 10 %-ige Cetylpyridiniumchlorid-Lösung hergestellt wurde. Hier war es nötig, die entstandene Lösung vor Anwendung mindestens eine bis zwei Stunden auf den Taumelrollenmischer anzulegen, da sich das Cetylpyridiniumchlorid dann vollständig gelöst hat.

Das auf die Zellen gegebene PBS wurde abgesaugt und die 10 %-ige Cetylpyridiniumchlorid-Lösung wurde gegeben, 500 µl der Lösung pro Well. Die Zellen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sie vollständig entfärbt sind und sich der Überstand dunkel gefärbt hat. Das Photometer wurde mit der 10 %-igen Cetylpyridiniumchlorid-Lösung als Blank kalibriert. Der in den Wells befindliche Überstand wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen, bei Werten über 1, wurde der Überstand des jeweiligen Well verdünnt. Der Grad der Färbung diente als Korrelat zu dem Grad der Kalzifizierung.

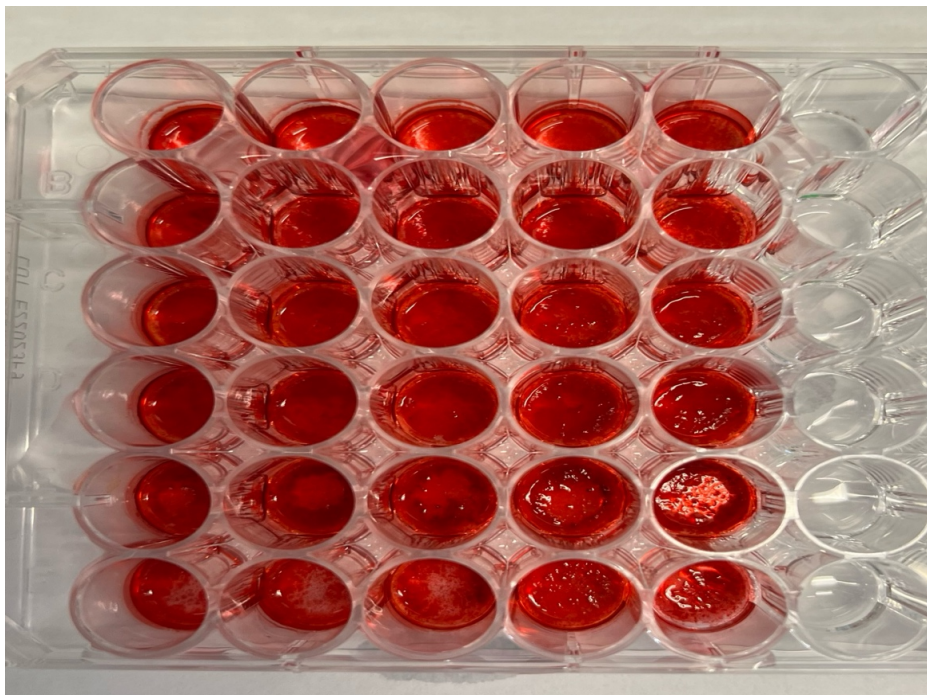


Abbildung 5: eigene fotografische Aufnahme der Alizarin-Rot Färbung einer 48-Well Platte eines Hauptversuches nach 14-tägiger osteogenen Differenzierungsphase der hBMSCs.

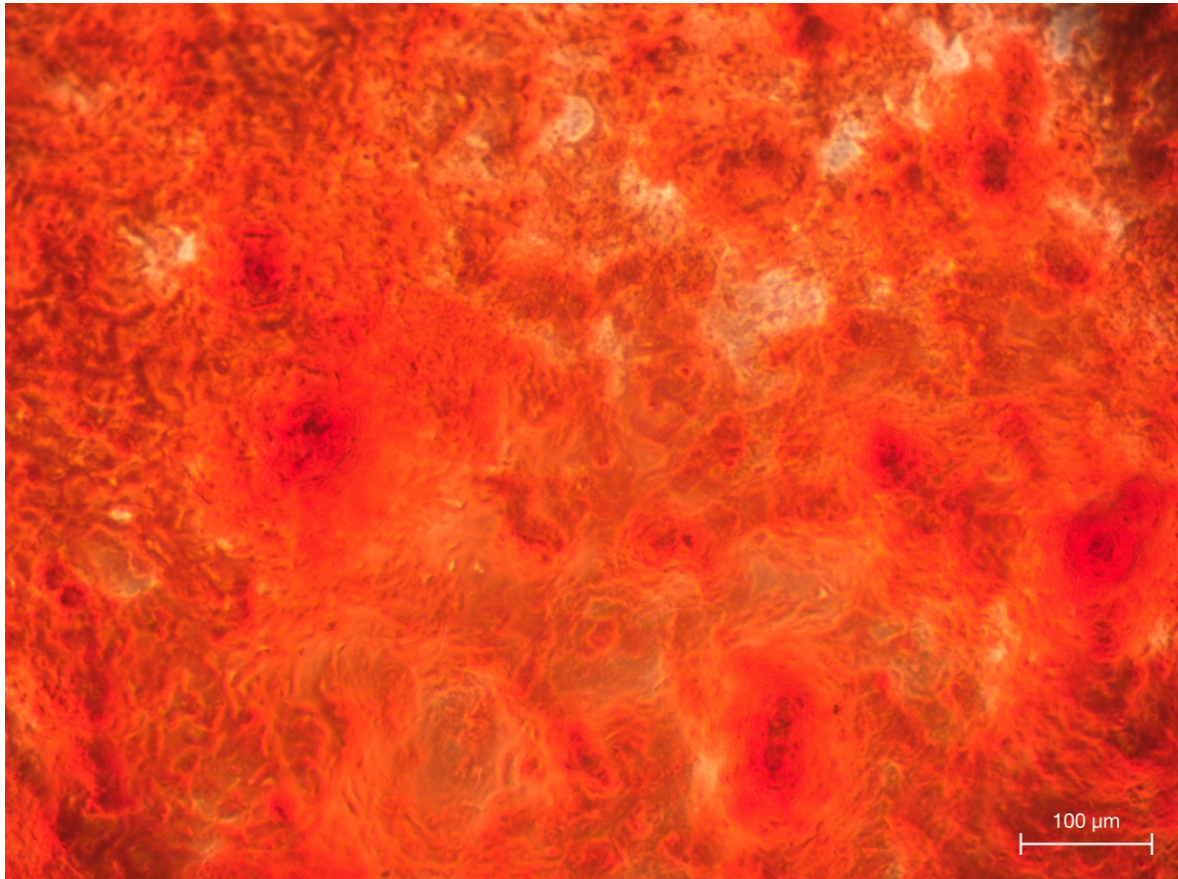


Abbildung 6: eigene Mikroskopische Aufnahme eines Wells unter Alizarin-Rot Färbung im Hauptversuch nach osteogener Differenzierungszeit der hBMSCs von 14 Tagen.

2.2.12 ALP-Assay

Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, welches verschiedene Isoformen besitzt und allgemein Phosphorsäureester zu Phosphat und Alkoholen spaltet. Die alkalische Phosphatase spielt eine wichtige Rolle bei Stoffwechselvorgängen im Knochen und Leber und kann daher als Methode zur Messung der osteogenen Differenzierung verwendet werden. Die erstmalig von Engvall *et al.* [101] beschriebene Methode zur Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase erfolgt über das Substrat p-Nitrophenylphosphat, welches von der alkalischen Phosphatase gespalten wird. Diese Reaktion geht mit einer Gelbfärbung einher und die Stärke der Gelbfärbung korreliert mit der Aktivität der alkalischen Phosphatase, welche wiederum mit dem Grad der osteogenen Differenzierung korreliert. Hierbei wurde bei den zu untersuchenden Zellen der 48-Well Platten das Medium abgesaugt und die Wells mit 500 µl PBS gewaschen und das PBS wurde ebenfalls abgesaugt. Sowohl Mediumreste, als auch Reste des PBS können zu einer Gelbfärbung führen und somit Ergebnisse verfälschen, weswegen ein gründliches Absaugen nötig ist. Danach wurde 250 µl der p-Nitrophenylphosphat Lösung in jedes Well gegeben und für 10 Minuten im Dunkeln bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Zusätzlich wurde ein Blank der p-Nitrophenylphosphat Lösung überführt. Eine Verzögerung der Auswertung erhöht die Gelbfärbung und verfälscht somit das

Ergebnis. Nach 10 Minuten wurden 100 µl des Überstandes in eine 96-Well Platte überführt mit Doppelbestimmung für jedes Well, die gemessenen Werte wurden später rechnerisch gemittelt. Danach wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm die optische Dichte des Überstandes gemessen und bei Werten über 1,5 war eine Verdünnung mit destilliertem Wasser nötig, da es bei zu hohen Werten zu Messungenauigkeiten kommt.

2.2.13 CTB-Assay als Zellviabilität

Der CellTiter-Blue®-Assay dient der Messung der Zellviabilität bzw. im übertragenen Sinne der Anzahl lebender Zellen. Dabei setzen lediglich lebende Zellen durch Reduktion den (blauen) Farbstoff Resazurin in den (violetten) Farbstoff Resorufin um. Das Fluoreszenzmaximum von Resorufin liegt bei 590 nm. Wachstumsmedium wurde im Verhältnis 1:20 mit CellTiter-Blue® versetzt und anschließend auf die Zellen mit 200 µl pro Well gegeben. Danach wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank für eine Stunde inkubiert. Mitgeführt wurde ein Blank, also nur Wachstumsmedium versetzt mit CellTiter-Blue®, dies wurde über den gleichen Zeitraum im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das mit CellTiter-Blue® versetzte Medium in eine 96-Well Platte mit 100 µl pro Well in Doppelbestimmung überführt und das Fluoreszenzsignal wurde photometrisch bei 590 nm gemessen.

2.2.14 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 9. Es wurden Mittelwerte der jeweiligen Gruppen berechnet und diese dann miteinander verglichen. Beim Wachstumsversuch mit Myokinen wurden die Serien der Spender gemittelt, dann die Ergebnisse von Tag 4 und 7 statistisch verglichen. Die Kontrollgruppe waren die mit Wachstumsmedium (ohne Myokine) behandelten Zellen an Tag 4. Im Differenzierungsversuch über 28 Tage wurden die Serien der einzelnen Spender am jeweiligen Tag der Messung untersucht und die Ergebnisse gemittelt. Hierbei erfolgte kein statistischer Vergleich, da es sich um die Darstellung der Differenzierung bzw. Zellviabilität der einzelnen Spender im Vergleich untereinander an den jeweiligen Zeitpunkten der Messung gehandelt hat. Bei der Zusammenführung aller Spender in diesem Versuch erfolgte eine statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Test (siehe unten). Die Kontrolle bzw. die Gruppe zum statistischen Vergleich war hierbei Tag 0.

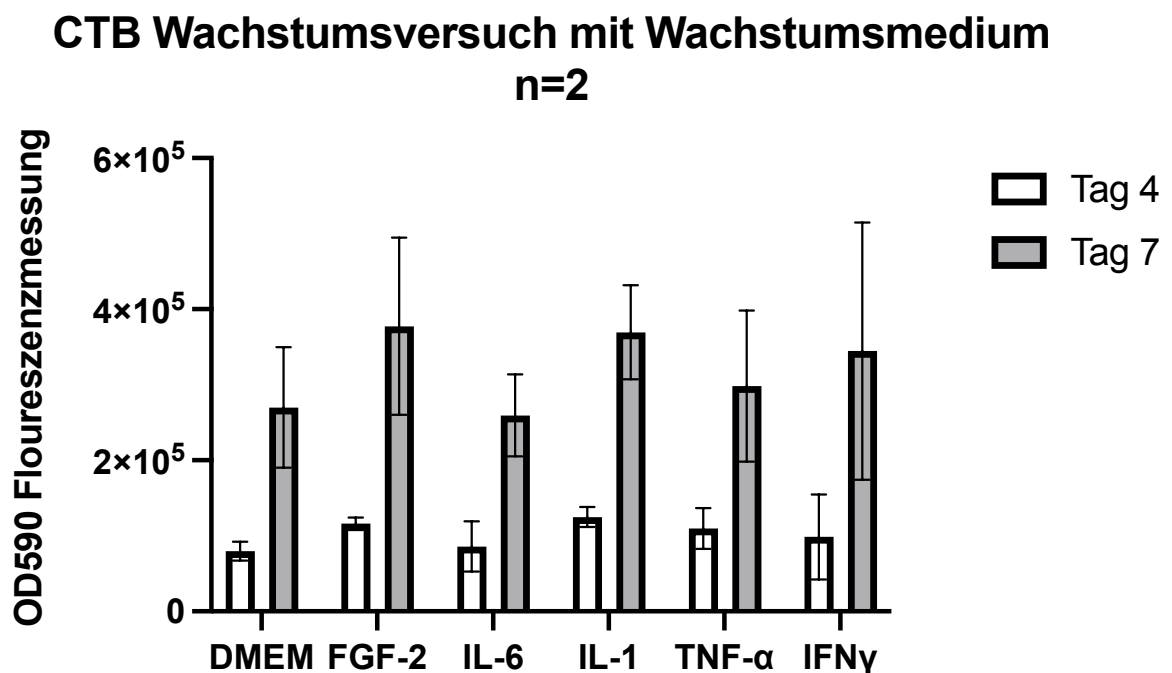
Es wurden bei den Differenzierungsversuchen mit Myokinen Mittelwerte im einzelnen Versuchsdurchlauf für die jeweiligen Serien (je nach Durchlauf und Aussaat Duplikate, Triplikate, Quadruplikate, Quintuplikate) berechnet und es erfolgte dann die statistische Analyse aller Versuchsdurchläufe miteinander. Die Kontrollgruppe entsprach den Zellen, die lediglich mit Differenzierungsmedium (ohne Myokine) behandelt wurden. Dabei wurden die gepaarten Daten mit dem Wilcoxon-Test statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsversuch mit Zytokinen

Der gemessene Wert der Zellzahl (Zellviabilität) im Wachstumsversuch mit Wachstumsmedium nach 4 und 7 Tagen kam zu einem nicht signifikanten Ergebnis. Der Wert der Zellzahl ist in allen Vergleichsgruppen am 7. Tag im Vergleich zum 4. Tag gestiegen. Im Vergleich zur Kontrolle am 7. Tag ist der Wert der Zellzahl bei jeglicher Myokingabe am 7. Tag höher, mit Ausnahme der hBMSCs, die IL-6 erhalten haben. Das größte Wachstum haben dabei die Zellen erreicht, die FGF-2, IL-1 β und IFN- γ erhalten haben.

A



B

**CTB Wachstumsversuch mit Wachstumsmedium (Norm: -Kontrolle)
n=2**

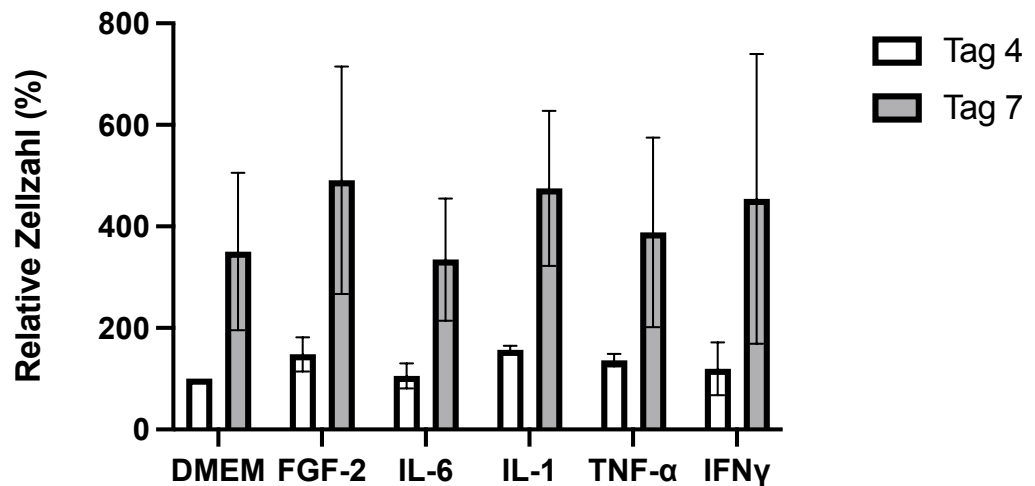
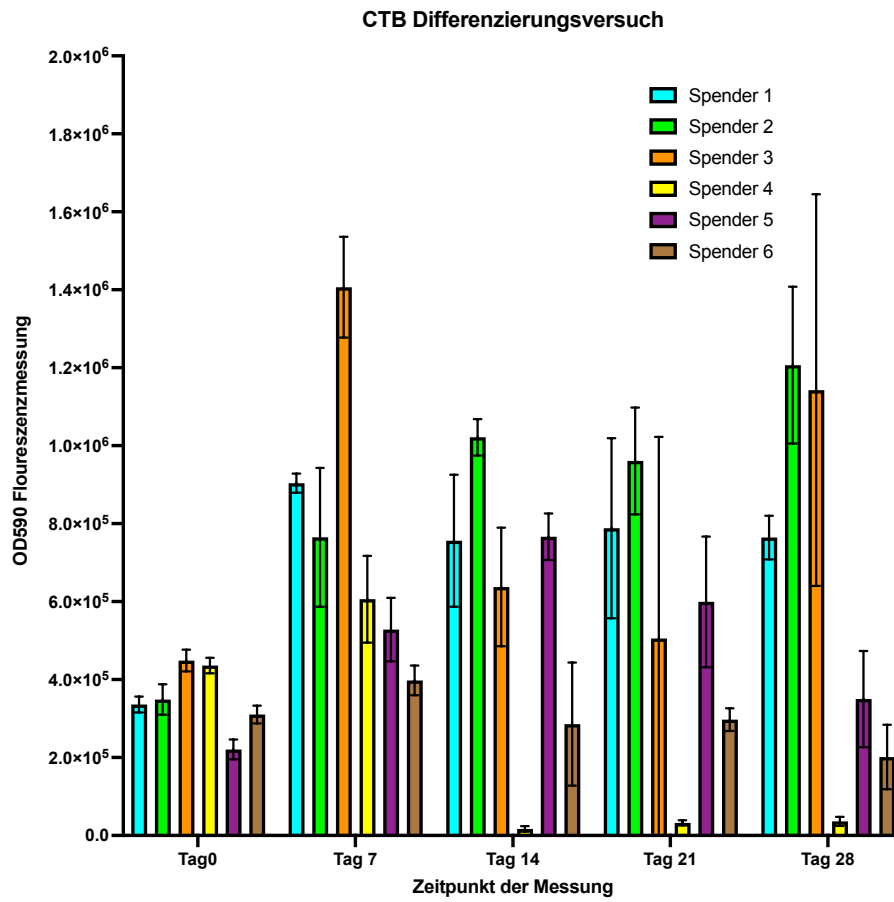


Abbildung 7: photometrische Messung der Zellzahl nach 4 und 7 Tagen bei 2 Spendern. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 590 nm mit CellTiter-Blue®-Assay gemessen. Die Zellen wurden alle mit Wachstumsmedium behandelt und wurden mit dem zu untersuchenden Myokin versehen. Die weißen Balken entsprechen der Messung am 4. Tag, die grauen Balken der Messung am 7. Tag. A: Rohdaten der Messung B: Die Rohdaten wurden normiert auf die Kontrolle (DMEM) des 4. Tages, um somit die relative Zellzahl in Prozent darzustellen.

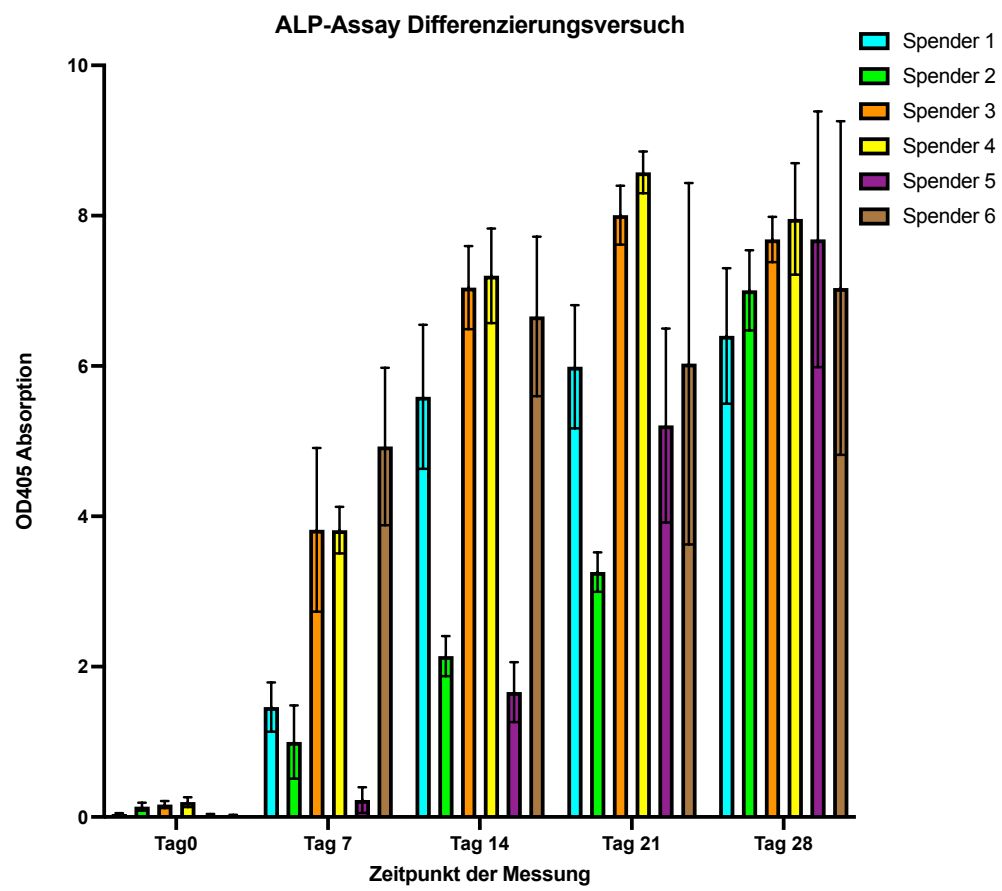
3.2 Differenzierungsversuch in OIM über 28 Tage (ohne Zytokinzugabe)

Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse des Differenzierungsversuches über 28 Tage der 6 verschiedenen Spender/Spenderinnen. Hierbei wurden wie auch schon erwähnt keine Myokine zusätzlich zum Differenzierungsversuch gegeben. Diese Darstellung in *Abbildung 8* dient zur Verdeutlichung des unterschiedlichen Verhaltens der Spender/Spenderinnen bei den jeweiligen Untersuchungen. Der Wert der Zellzahl der Spender/Spenderinnen bekam einen Anstieg an Tag 7 im Vergleich zu Tag 0, bei Spender 3 an Tag 7 sah man auch das unterschiedliche Verhalten unter den Spendern, so proliferieren manche Spender/Spenderinnen stärker als andere (A). Mit der Zeit kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen, so bleiben einige Spender/Spenderinnen auf einem ähnlichen Niveau des Wertes der Zellzahl über 28 Tage, wie Spender 1 und 2, während bei anderen Spendern/Spenderinnen, wie Spender 4, ihr Zellzahlwert nach 14 Tagen fällt (A). Diese Unterschiede im Wachstumsverhalten trugen sich dadurch weiter in der Darstellung des Quotienten aus der photometrischen Messung der Mineralisierung/osteogenen Differenzierung über Alizarin-Rot Färbung bzw. der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der CTB-Messung der Zellzahl (Zellviabilität) (D-E). Die photometrische Messung bei dem ALP-Assay und der Rücklösung der Alizarin-Rot Färbung mittels CPC zur Quantifizierung der osteogenen Differenzierung bzw. Mineralisierung zeigt hier unter Berücksichtigung des individuellen Spenderverhaltens, dass es ab Tag 14 zu einem starken Anstieg des Wertes der Mineralisierung (C) bzw. der osteogenen Differenzierung (B) kommt. Danach steigen diese Parameter auch weiter mit der Zeit, bei einigen Spendern ist das Maximum an Tag 21 erreicht, danach fallen die Werte (B-C), bleiben aber auf einem hohen Niveau. Bei anderen Spendern stiegen sie weiter und erreichten ihr Maximum an Tag 28 (B-C). Generell ist der Sprung von Tag 7 zu Tag 14 (B-C) sehr wichtig für die späteren Ergebnisse der Differenzierungsversuches mit Zytokinen (siehe Abschnitt 3.3), sodass die Nachbehandlung im Differenzierungsmedium auf 14 Tage angesetzt wurde.

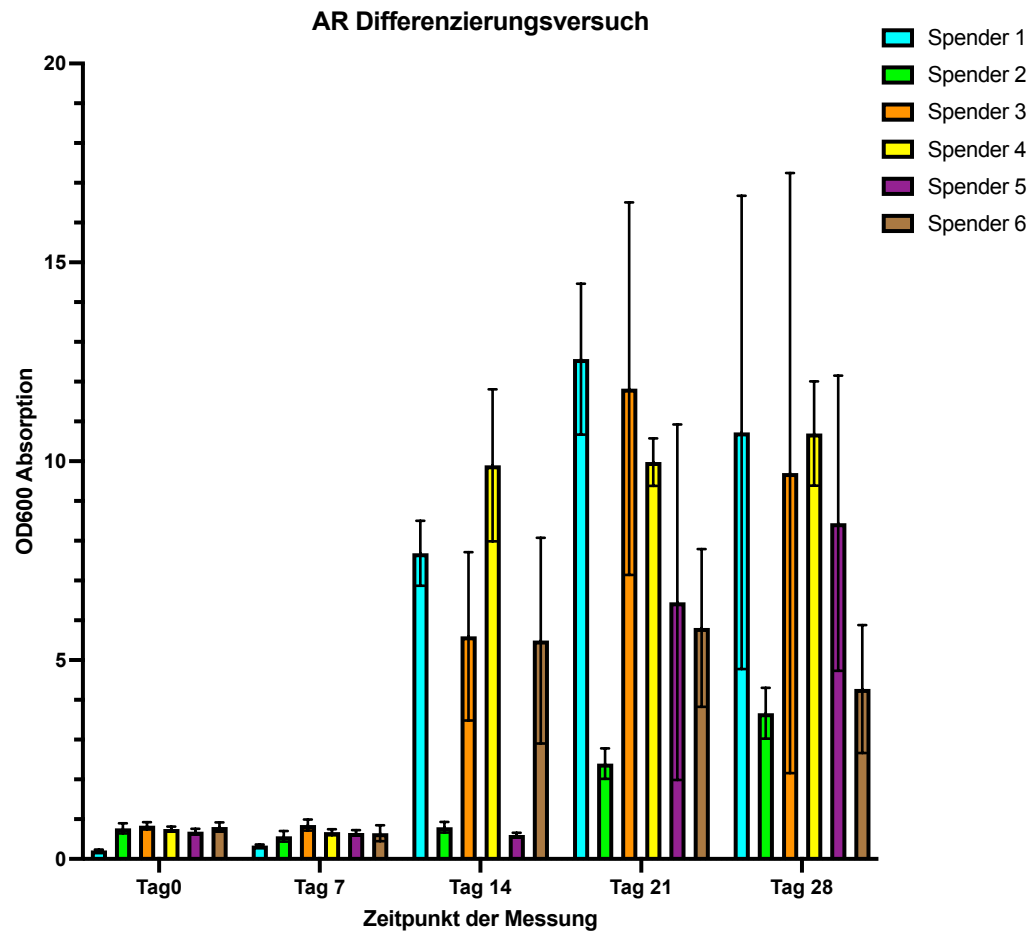
A



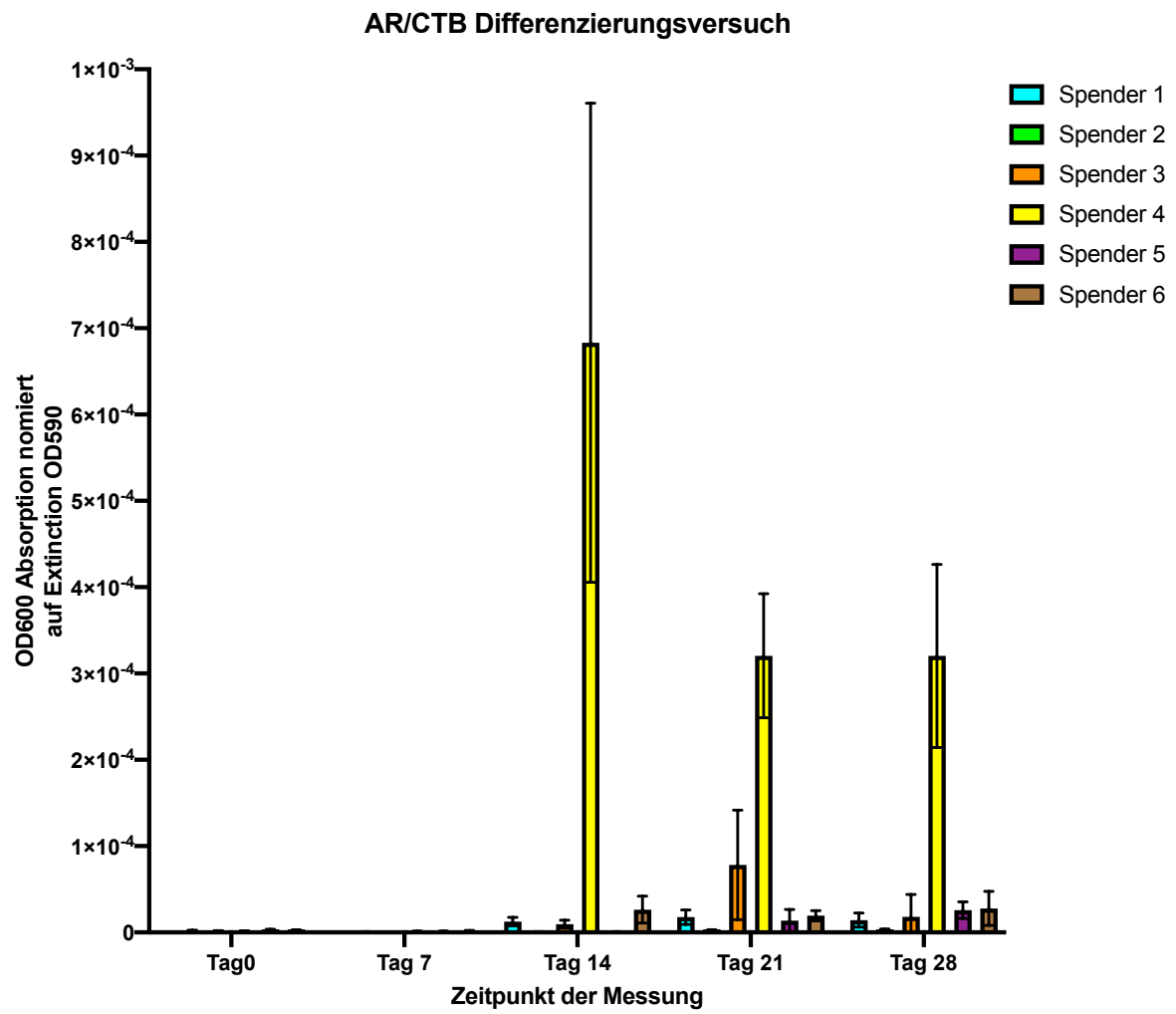
B



C



D



E

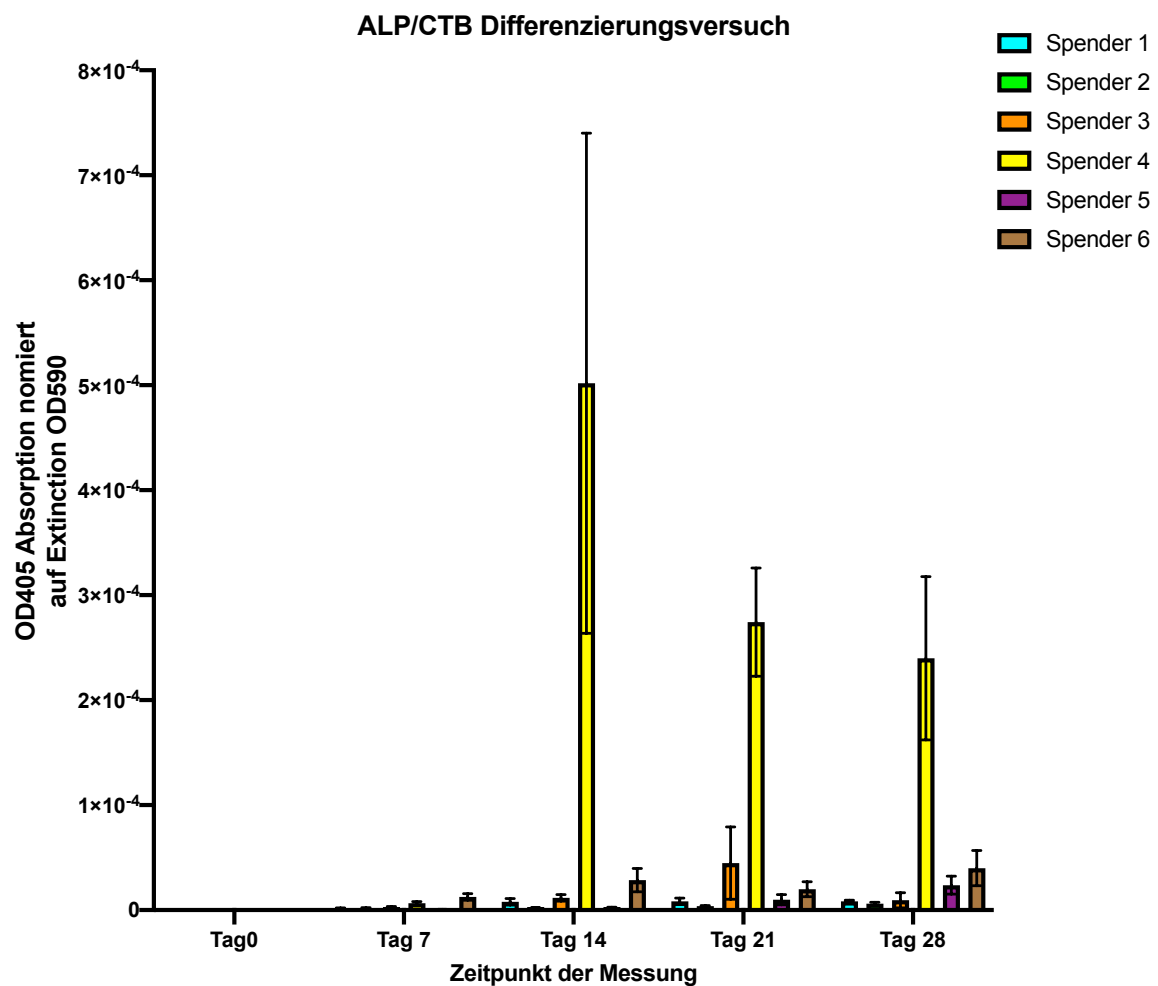


Abbildung 8: Darstellung des individuellen Verhaltens der verschiedenen Spender/Spenderinnen im Differenzierungsversuch über 28 Tage (ohne Zytokingabe). Es erfolgte eine photometrische Messung mit CTB-Assay bei einer Wellenlänge von 590 nm (A), ALP-Assay bei 405 nm (B) und Rücklösung der der Alizarin-Rot Färbung mit CPC und Messung dessen bei 600nm (C). Es wurde darauf ein Quotient gebildet, indem die Ergebnisse aus (B) und (C) jeweils mit den Ergebnissen aus (A) dividiert wurden. Es wurden die Marker der osteogenen Differenzierung bzw. Mineralisierung mit der Zellzahl dividiert, sodass genauere Aussagen zur osteogenen Differenzierung gemacht werden können (D-E). Mit diesem Quotienten kann eine mögliche Verfälschung der osteogenen Differenzierung durch eine erhöhte Zellzahl rausgerechnet werden.

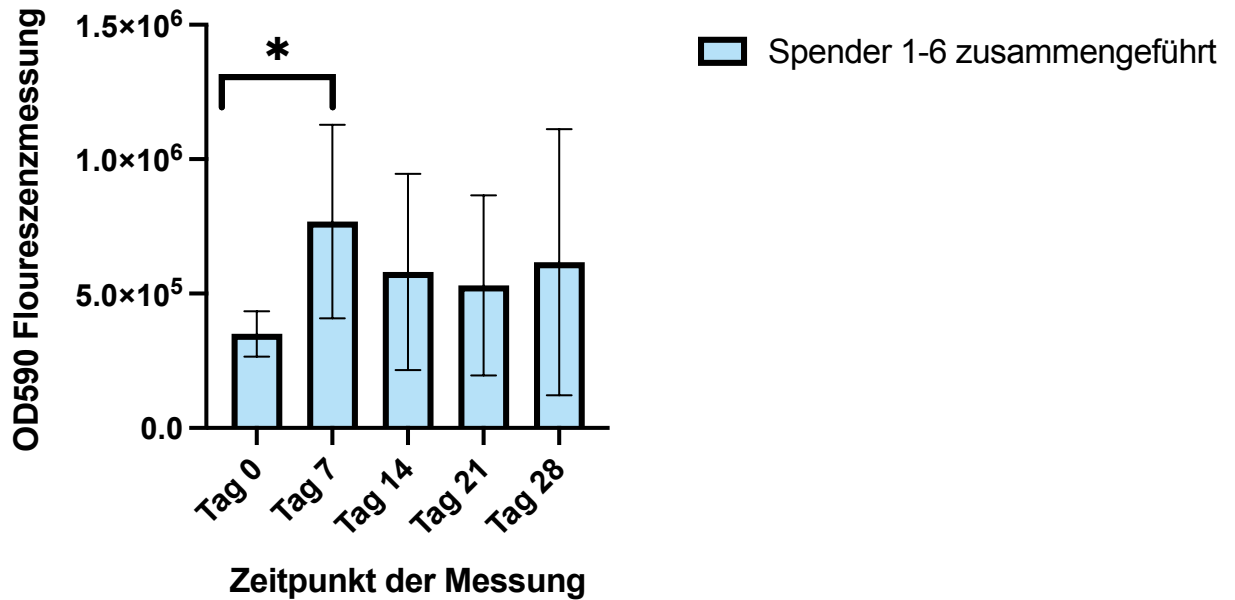
Die zusammengeführte Darstellung der Ergebnisse der verschiedenen Spender/Spenderinnen ist in *Abbildung 9* dargestellt. Der Wert der relativen Zellzahl (A-B) erreichte einen signifikanten Anstieg zwischen Tag 0 und Tag 7 von über 100 %. Zu erkennen war ebenfalls, dass die Zellzahl danach schwankte, aber kleiner war als an Tag 7. Sie blieb die ganze Zeit über dem Level von Tag 0. Die Ergebnisse der relativen ALP-Aktivität (C-D) und somit der osteogenen Differenzierung zeigten einen signifikanten Anstieg zwischen Tag 0 und allen restlichen Tagen (Tag 7, 14, 21, 28). Ebenso ist auch die Messung am 7. Tag in Relation zum 14. Tag signifikant. Am 7. Tag wurde ein Anstieg des Wertes der ALP-Aktivität von über 2000 % erzielt in Relation zu Tag 0 und ist bei jeder folgenden Messung konstant gestiegen, bis ein Wert der relativen ALP-Aktivität von über 7000 % an Tag 28 erreicht wurde.

Ähnliches wurde auch mit der Messung der relativen Mineralisierung (E-F) gezeigt. Es kam zu einer signifikanten Zunahme des Wertes der Mineralisierung zwischen Tag 0 und Tag 21 bzw. Tag 28. Ebenso war der Unterschied in der Mineralisierung zwischen Tag 14 und 21 signifikant. Der Unterschied im Verhältnis zur ALP-Aktivität ist an Tag 7 zu erkennen, so zeigte der Wert der relativen ALP-Aktivität dort schon einen starken Anstieg, während es an Tag 7 es zu keinem gesteigerten Mineralisierungswert im Vergleich zu Tag 0 kam, sondern dies erst an Tag 14 einsetzte. Ab dann kam es ebenfalls zu einem konstanten Anstieg des Wertes der Mineralisierung bis Tag 21, die Werte waren an Tag 21 geringfügig höher als an Tag 28.

Der Quotient aus Mineralisierung bzw. ALP-Aktivität und der Zellzahl (G-J) und somit die auf die Zellzahl normierte osteogene Differenzierung wurde ebenfalls betrachtet. Es zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Tag 0 und 7, 21 bzw. 28 bei dem Quotienten aus Mineralisierung und Zellzahl. Bei dem Quotienten aus ALP-Aktivität und Zellzahl kommt es ebenfalls zu einem signifikanten Unterschied zwischen Tag 0 und 7, 21 bzw. 28, zusätzlich ist der Unterschied zwischen Tag 14 und 21 signifikant. Beide Quotienten zeigen in eine gleiche Richtung, es erfolgte erneut ein starker Anstieg des Wertes der „bereinigten Differenzierung“ von Tag 7 zu Tag 14 und der generelle Höchstwert der „bereinigten Differenzierung“ erfolgte an Tag 14. Danach sanken die Werte am Tag 21 und Tag 28 im Vergleich zu Tag 14, blieben dennoch auf einem hohen Niveau.

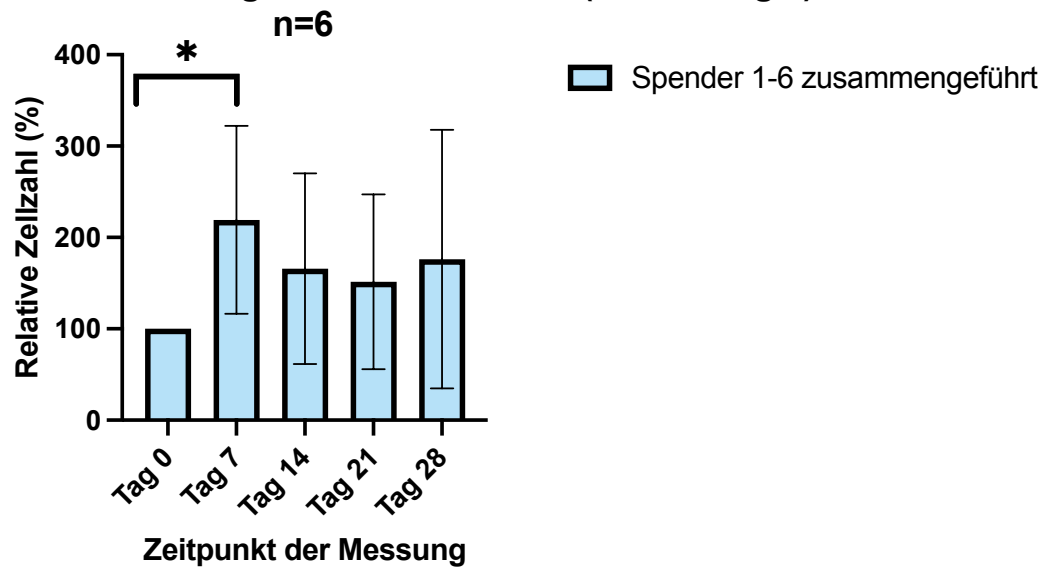
A

CTB 28 Tage Differenzierungsversuch Rohdaten
n=6



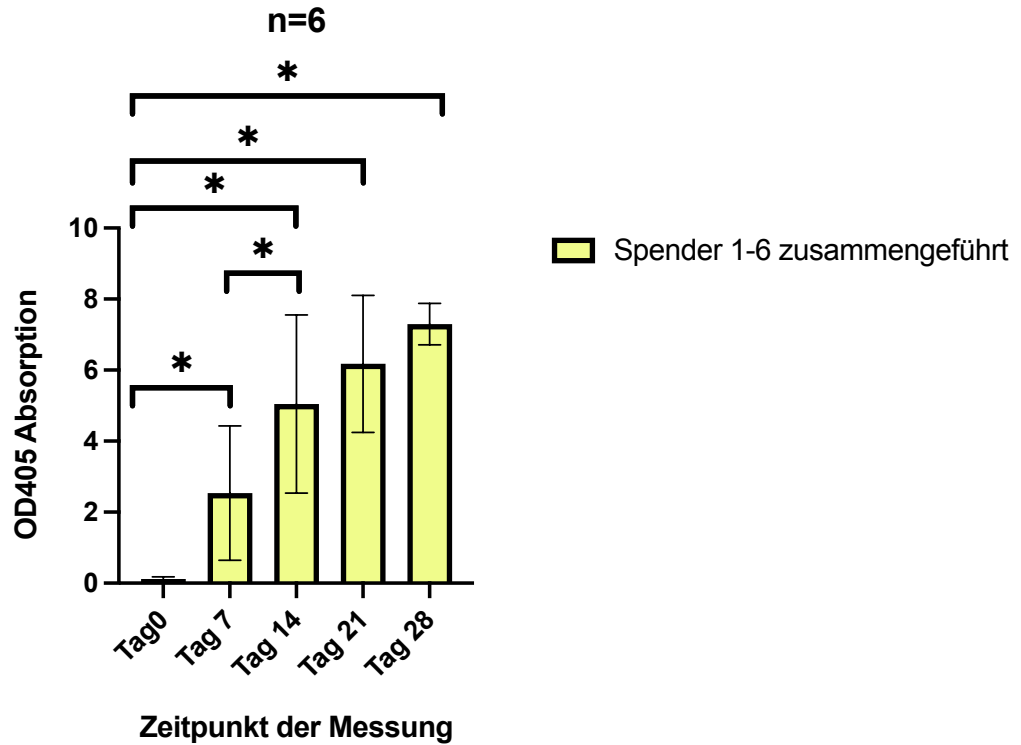
B

CTB 28 Tage Differenzierungsversuch normiert (Norm: -Tag 0)



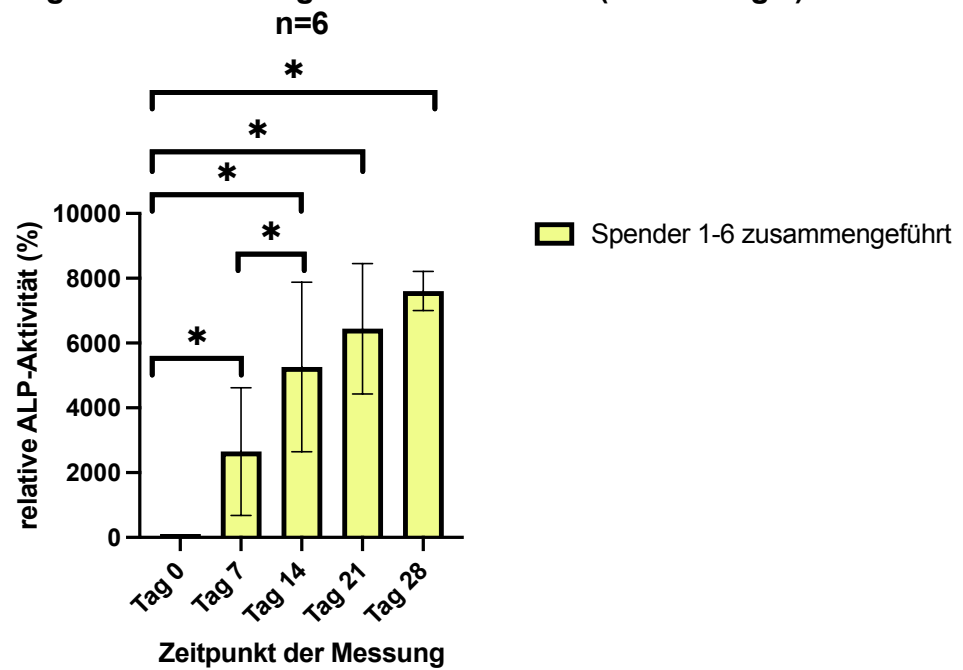
C

ALP-Assay 28 Tage Differenzierungsversuch Rohdaten



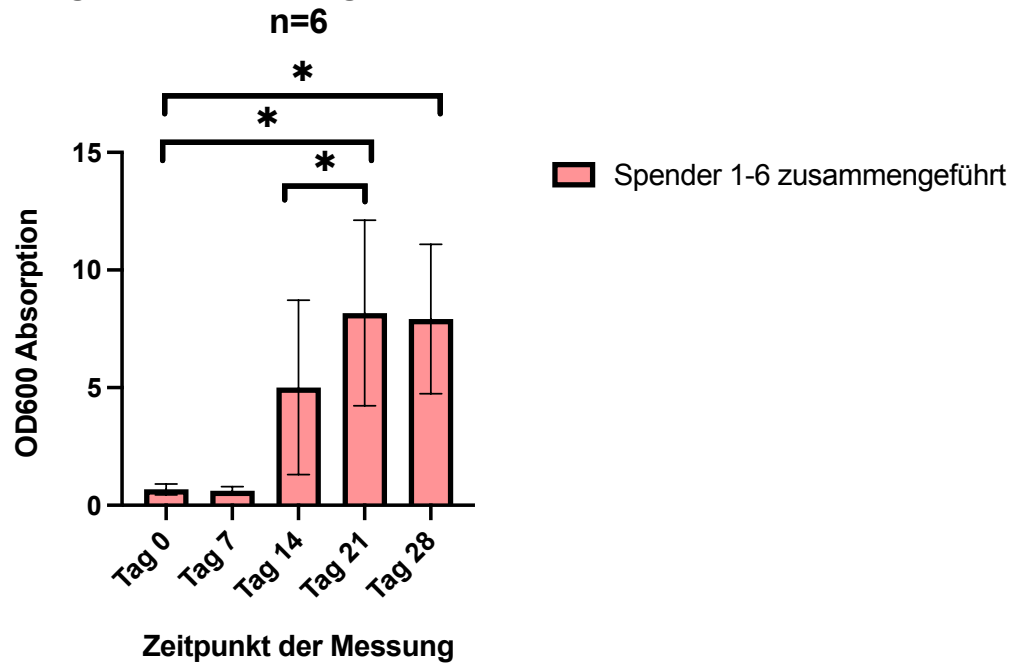
D

ALP-Assay 28 Tage Differenzierungsversuch normiert (Norm: -Tag 0)



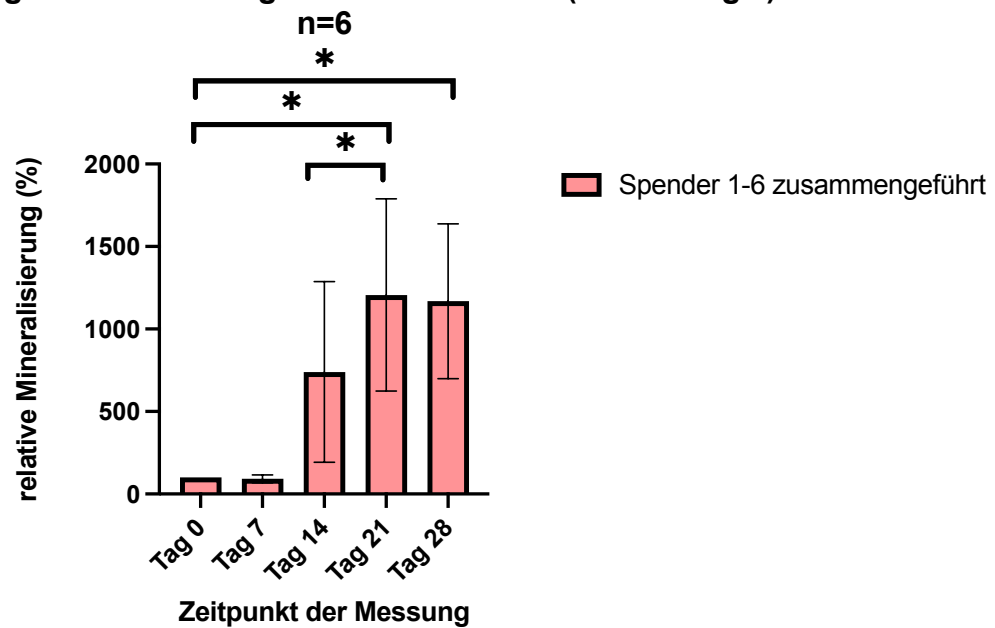
E

AR 28 Tage Differenzierungsversuch Rohdaten



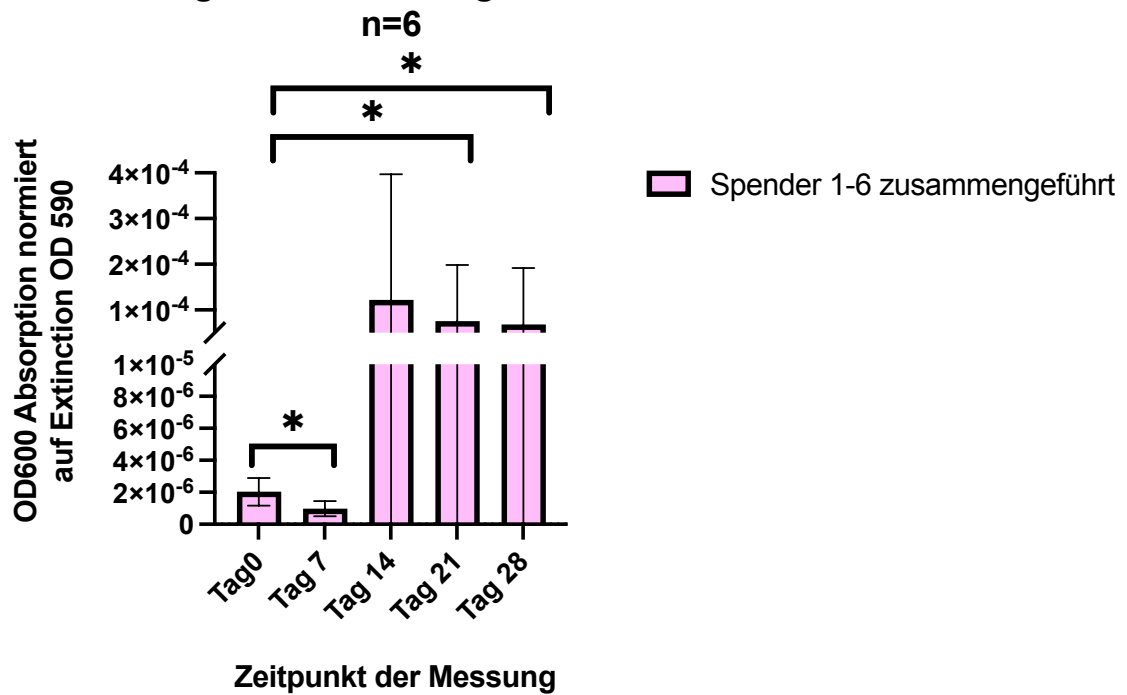
F

AR 28 Tage Differenzierungsversuch normiert (Norm: -Tag 0)



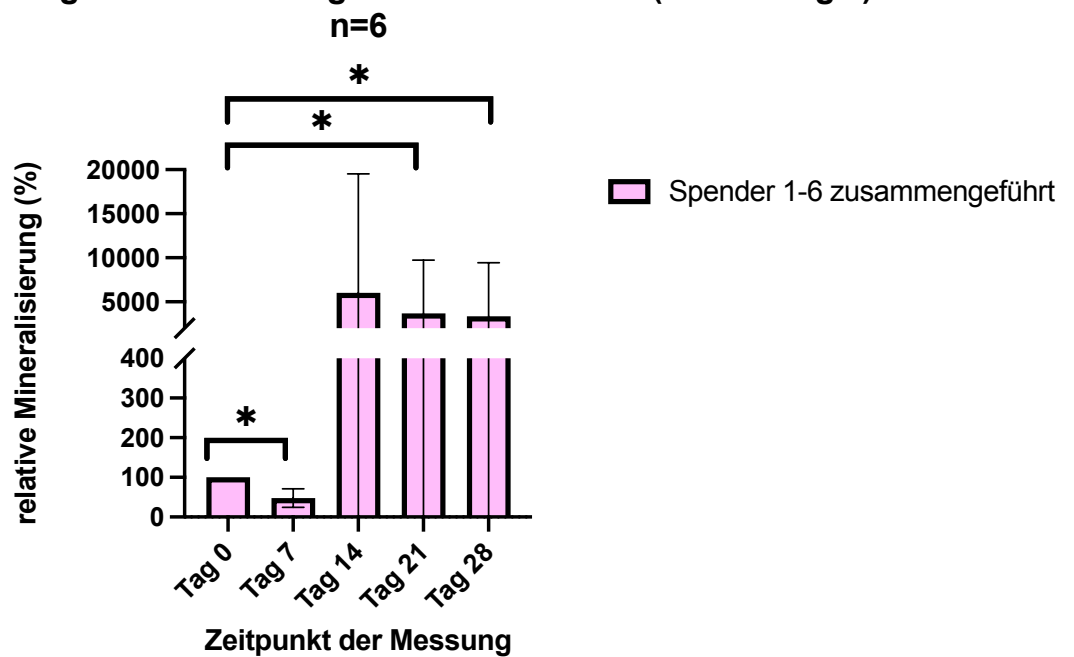
G

AR/CTB 28 Tage Differenzierungsversuch Rohdaten

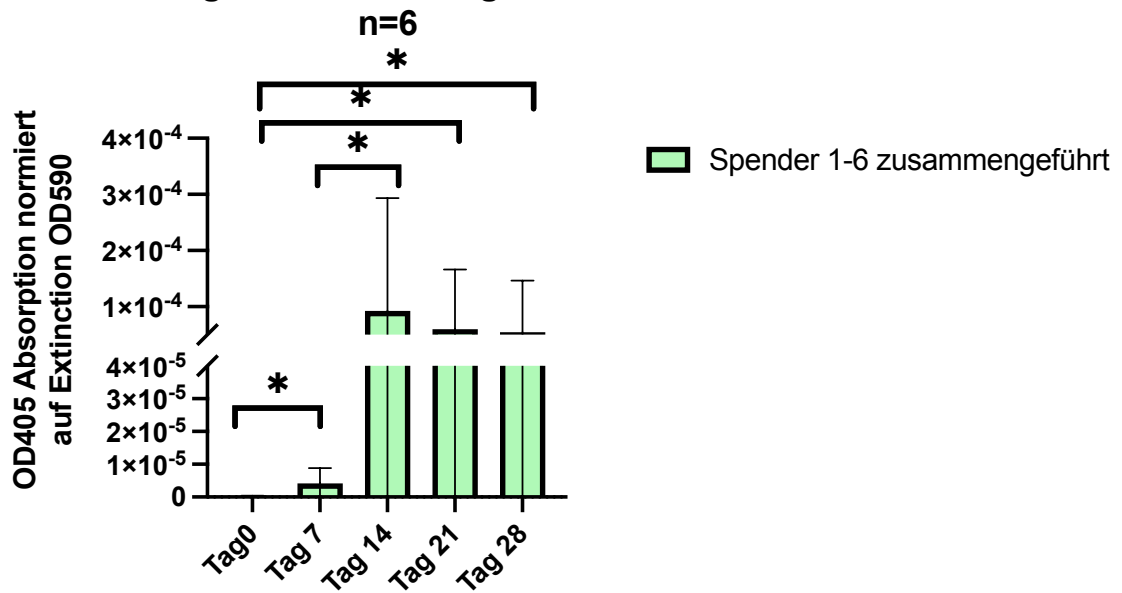


H

AR/CTB 28 Tage Differenzierungsversuch normiert (Norm: -Tag 0)



ALP/CTB 28 Tage Differenzierungsversuch Rohdaten



J

ALP/CTB 28 Tage Differenzierungsversuch normiert (Norm: -Tag 0)

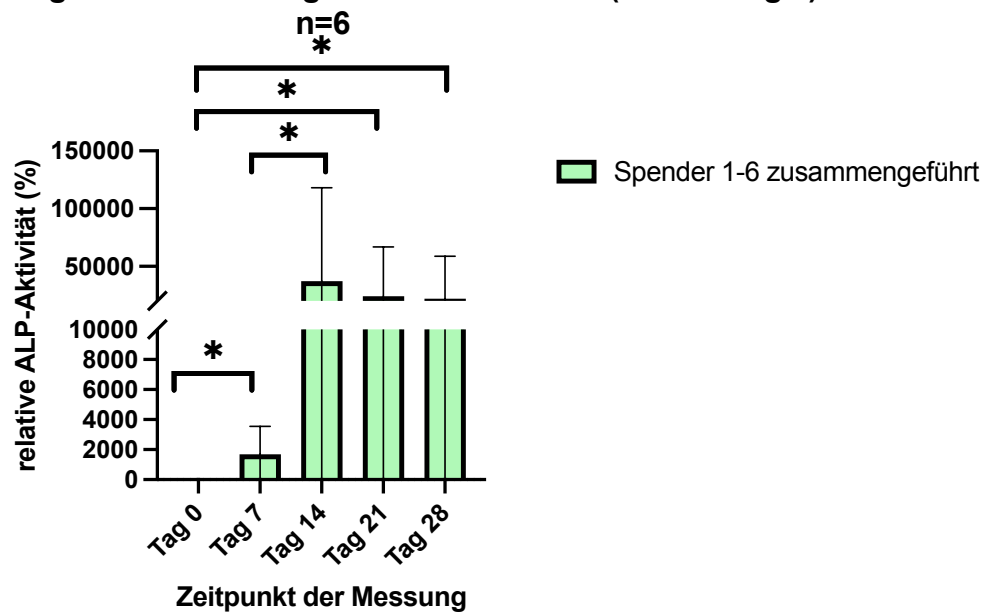


Abbildung 9: Darstellung verschiedener untersuchter Parameter von 6 Spendern zusammengeführt unter Einfluss von osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Hierbei erfolgte die Darstellung des jeweiligen gemessenen Parameters über die Rohdaten und

normiert auf Tag 0 in prozentualer Darstellung. (*= Signifikanz [$p < 0,05$; $n=6$]). A-B: Darstellung der Zellzahl bzw. Zellviabilität über das CTB-Assay mittels photometrischer Messung als Rohdaten (A) und normiert auf Tag 0 (B). C-D: Darstellung der Mineralisierung mittels photometrischer Messung als Rohdaten (C) und normiert auf Tag 0 (D). E-F: Darstellung der ALP-Aktivität (indirekt der osteogenen Differenzierung) über das ALP-Assay mittels photometrischer Messung als Rohdaten (E) und normiert auf Tag 0 (F). G-H: Darstellung des Quotienten aus den absoluten Werten der Mineralisierung (E) dividiert durch die absoluten Werte der Zellzahl (A) abgebildet als Rohdaten (G) und normiert auf Tag 0 (H). I-J: Darstellung des Quotienten aus den absoluten Werten der ALP-Aktivität (C) dividiert durch die absoluten Werte der Zellzahl (A) abgebildet als Rohdaten (I) und normiert auf Tag 0 (J).

3.3 Osteogene Differenzierung mit Zytokinen

3.3.1 Zellzahl

Es kam unter dem Einfluss von FGF-2 über 14 Tage der osteogenen Differenzierung zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe in der Versuchsgruppe ohne Vorbehandlung (A-B). Ebenfalls stieg bei der Gruppe, die mit FGF-2 über 10 Tage vorstimuliert wurde und über 14 Tage während der osteogenen Differenzierung mit FGF-2 nachbehandelt wurde, der Wert der Zellzahl signifikant an (A-B). Zusätzlich zeigte sich ein ähnlicher Effekt, wenn die Zellen vorher mit FGF-2 vorstimuliert wurden und kein FGF-2 während der 14-tägigen Differenzierungsphase erhielten, indem hierbei auch der Wert der Zellzahl signifikant anstieg. Die Vorbehandlung mit FGF-2 führte im Vergleich zur Vorbehandlung mit IL-6 zu einem ca. 45% signifikant erhöhten Wert der Zellzahl, ohne weiterer Nachbehandlung während der osteogenen Differenzierung. Der stärkste Effekt mit einem ca. 90 % Anstieg des Wertes der Zellzahl war bei den Zellen zu sehen, die sowohl 10 Tage mit FGF-2 vorbehandelt wurden als auch über die Differenzierungsperiode FGF-2 erhielten.

Wurden die Zellen mit IL-6 über 14 Tage nachbehandelt und mit FGF-2 vorstimuliert, kam es zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der Zellzahl von ca. 60 % im Vergleich zur Gruppe, die mit IL-6 vorstimuliert und nachbehandelt wurde (C-D). FGF-2 Vorstimulation mit IL-6 Nachbehandlung führte zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der Zellzahl, um ca. 56 % im Vergleich zur IL-6 Nachbehandlung ohne Vorbehandlung (C-D).

Bei einer 14-tägigen Nachbehandlung mit IL-1 β kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg des Wertes der Zellzahl in der Versuchsgruppe ohne Vorbehandlung. Wurde mit IL-6 über 10 Tage vorstimuliert und danach über 14 Tage mit IL-1 β nachbehandelt, so kam es zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der Zellzahl von ca. 50 % im Vergleich zur Gruppe mit IL-6 Vorstimulation ohne Nachbehandlung (E-F). Der signifikante Anstieg des Zellzahlwertes über 45 % erfolgte in der Kombination von 10-tägiger Vorbehandlung mit FGF-2 und der folgenden Nachbehandlung mit IL-1 β während der osteogenen Differenzierung in Relation zur FGF-2 Vorstimulation ohne Nachbehandlung (E-F).

Bei der Versuchsgruppe ohne Vorbehandlung kam es bei einer 14-tägigen Nachbehandlung mit TNF- α zu einem nicht signifikanten Anstieg des Wertes der Zellzahl von über 20 % (G-H). Wurde mit FGF-2 über 10 Tage vorstimuliert, so führte eine Nachbehandlung mit TNF- α zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der Zellzahl von ca. 50 % im Vergleich zur Gruppe mit IL-6 Vorstimulation und TNF- α Nachbehandlung (G-H).

Der Zellzahlwert ist bei der Nachbehandlung über 14 Tage mit IFN- γ (31,25 U/ml) über 47 % signifikant gesunken unter der Gruppe, die keine Vorstimulation erhielt (I-J). Ebenfalls signifikant war die Abnahme des Wertes der Zellzahl bei Vorstimulation mit IL-6 und Nachbehandlung mit IFN- γ (31,25 U), hierbei ist dieser

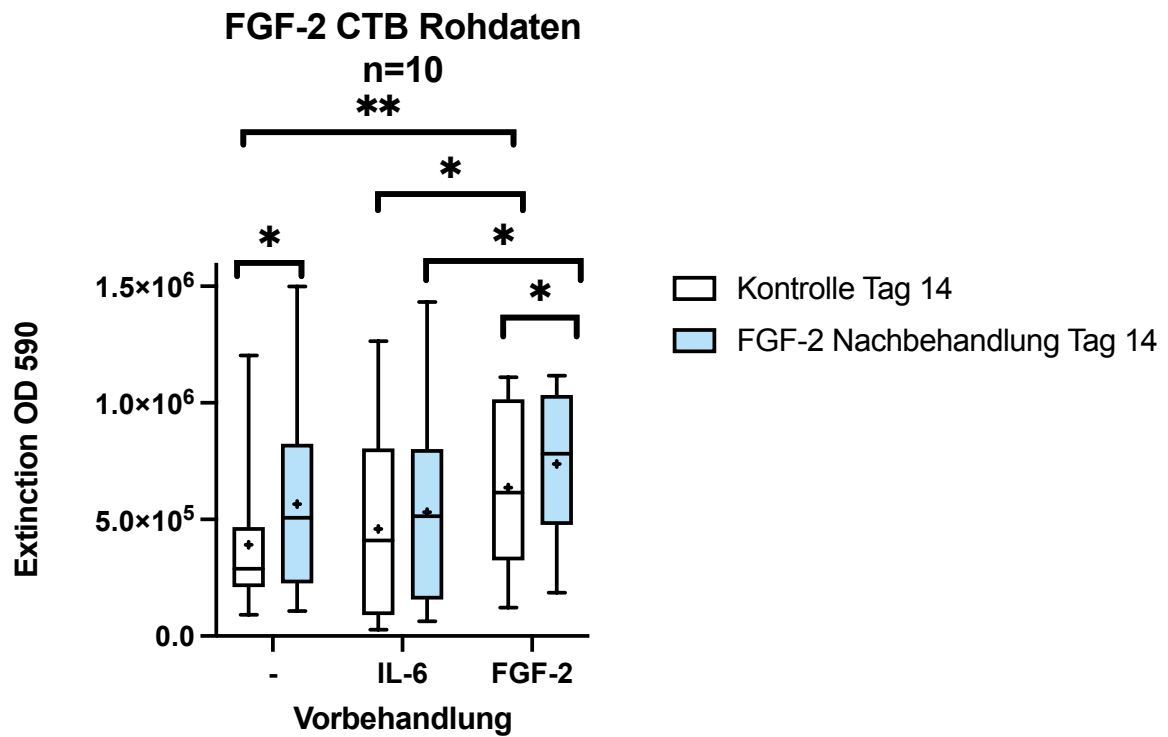
ebenfalls um über 55 % gegenüber der Gruppe mit IL-6 Vorstimulation ohne Nachbehandlung signifikant gesunken. In der Gruppe der Vorstimulation mit FGF-2 und Nachbehandlung mit IFN- γ (31,25 U/ml) sank der Wert der Zellzahl signifikant um über 100 % gegenüber der Gruppe mit FGF-2 Vorstimulation ohne Nachbehandlung (I-J).

Die zwei Versuchsdurchläufe mit der niedrigeren Konzentration an IFN- γ (3,125 U/ml) zeigten eine nicht signifikante Zunahme des Wertes der Zellzahl von über 160 % bei der Gruppe, die mit FGF-2 vorstimuliert wurde und darauf mit keinem Myokin behandelt wurde während der Differenzierung (K-L). Wurde mit FGF-2 vorstimuliert und mit IFN- γ (3,125 U/ml) nachbehandelt, so stieg der Zellzahlwert über 110 % Prozent an.

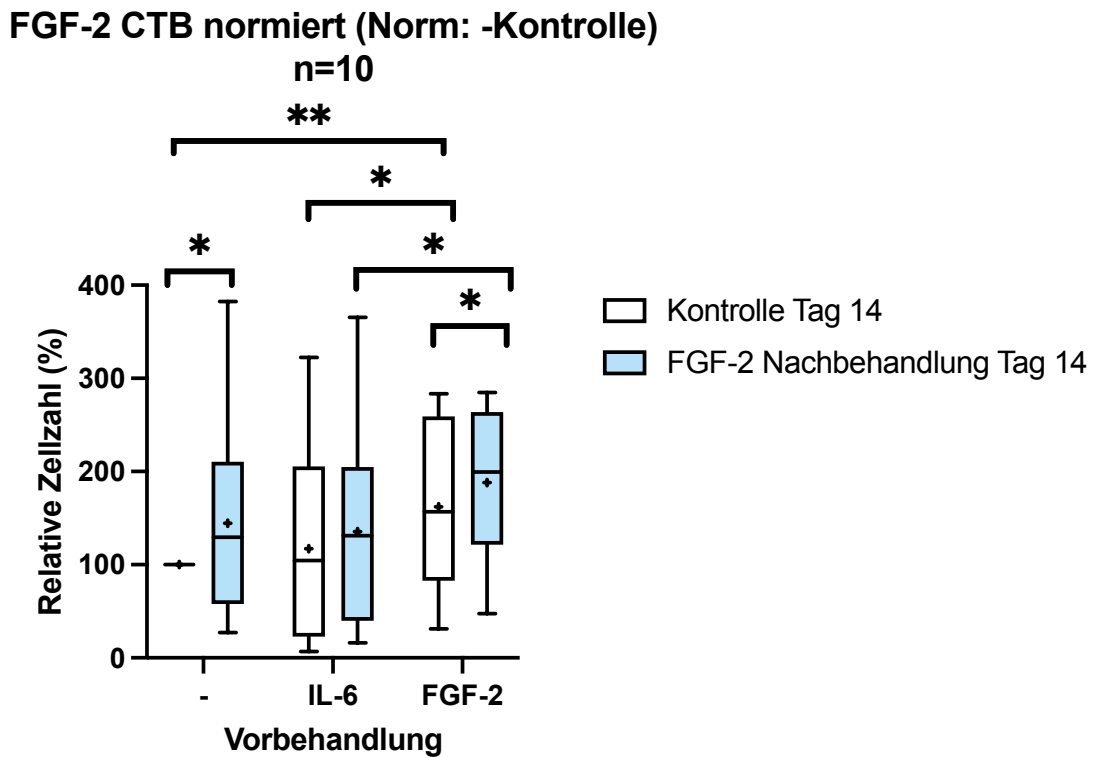
Der Durchlauf mit Myostatin (M-N) erfolgte ohne Vorstimulation und es wurde eine Gruppe, die daraufhin als Kontrolle kein Myostatin erhalten hat mit der Gruppe, die Myostatin während der osteogenen Differenzierung erhalten hat, verglichen.

Es kam dabei zu einem nicht signifikanten Anstieg des Wertes der Zellzahl bei der Gruppe, die Myostatin erhielt, von ca. 8 % gegenüber der Kontrolle.

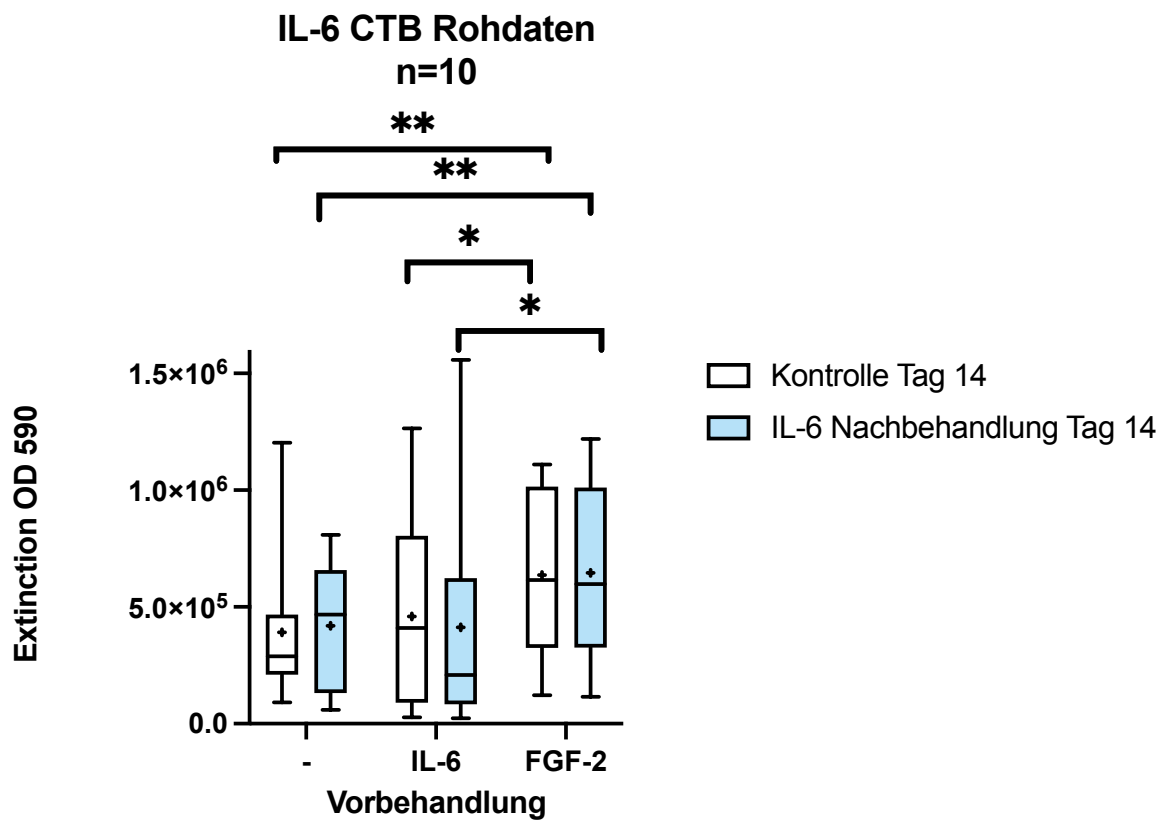
A



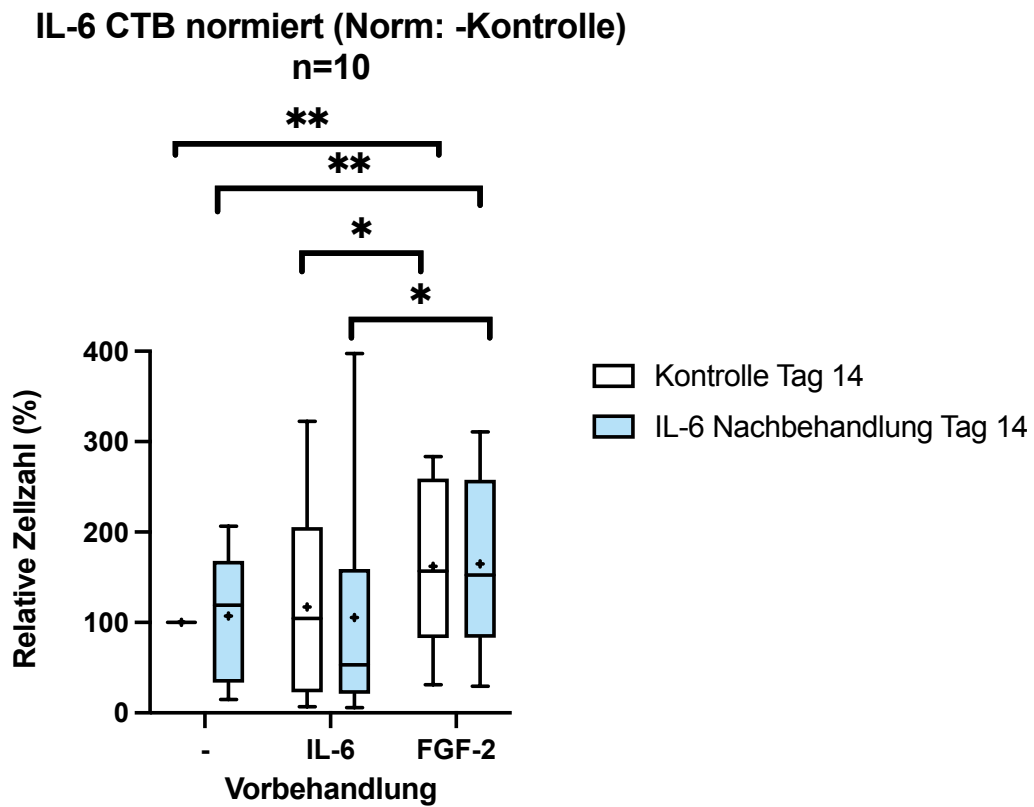
B



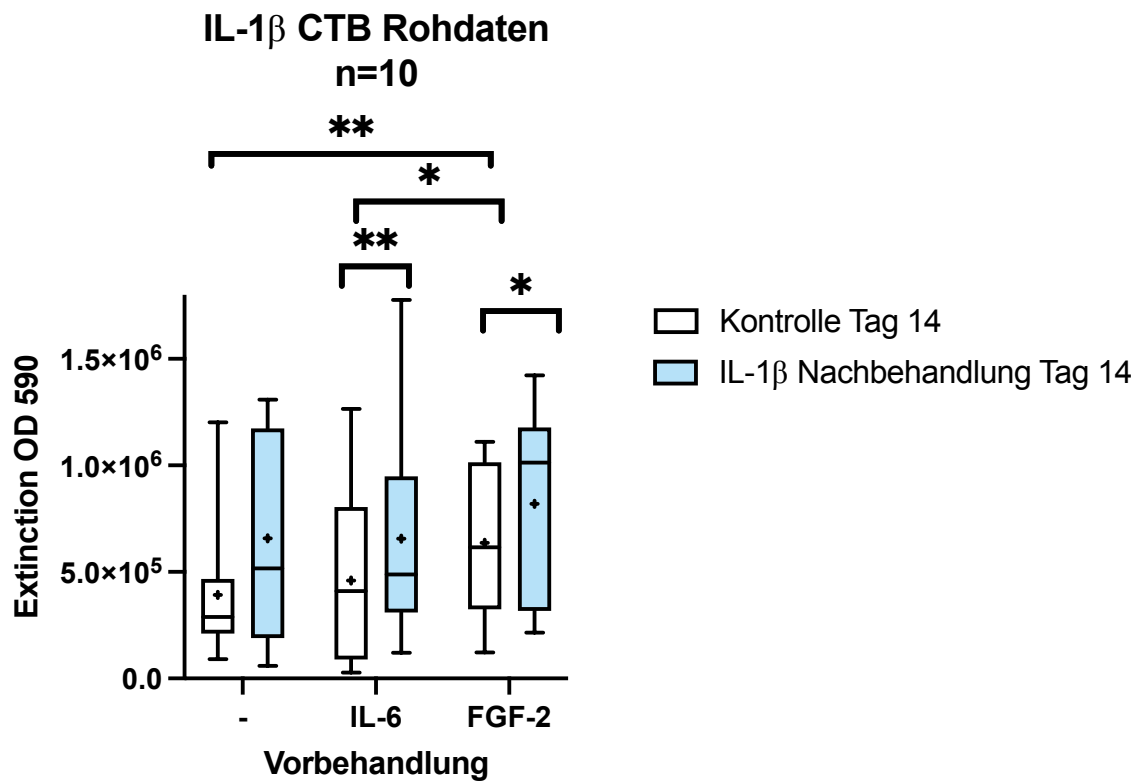
C



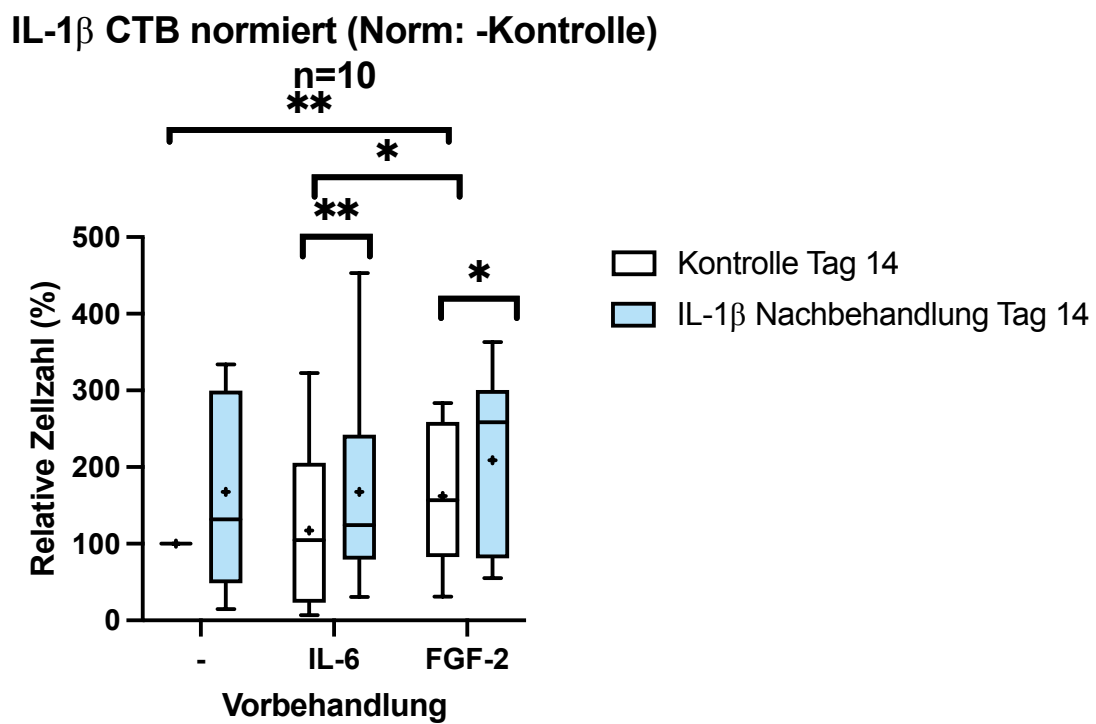
D



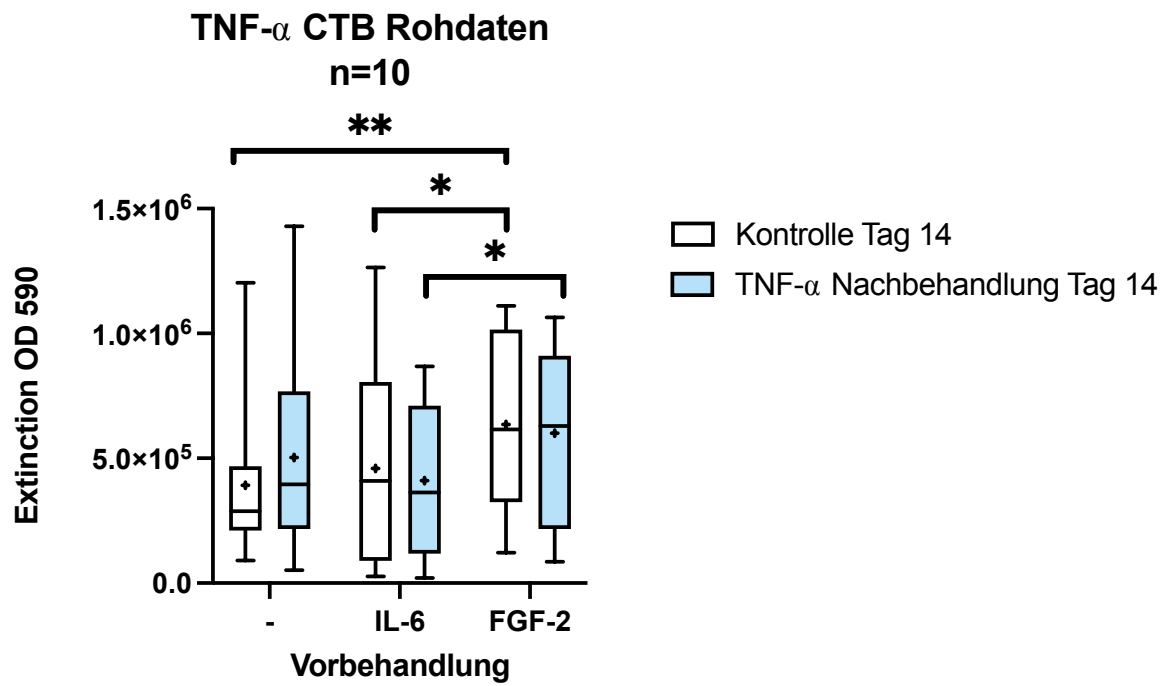
E



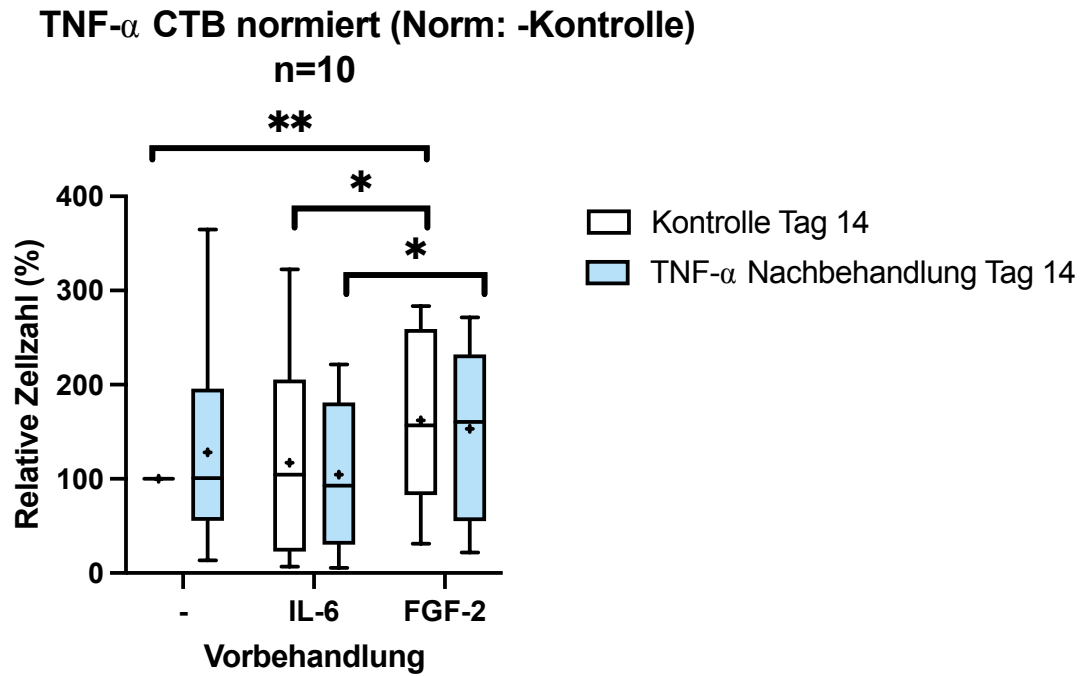
F



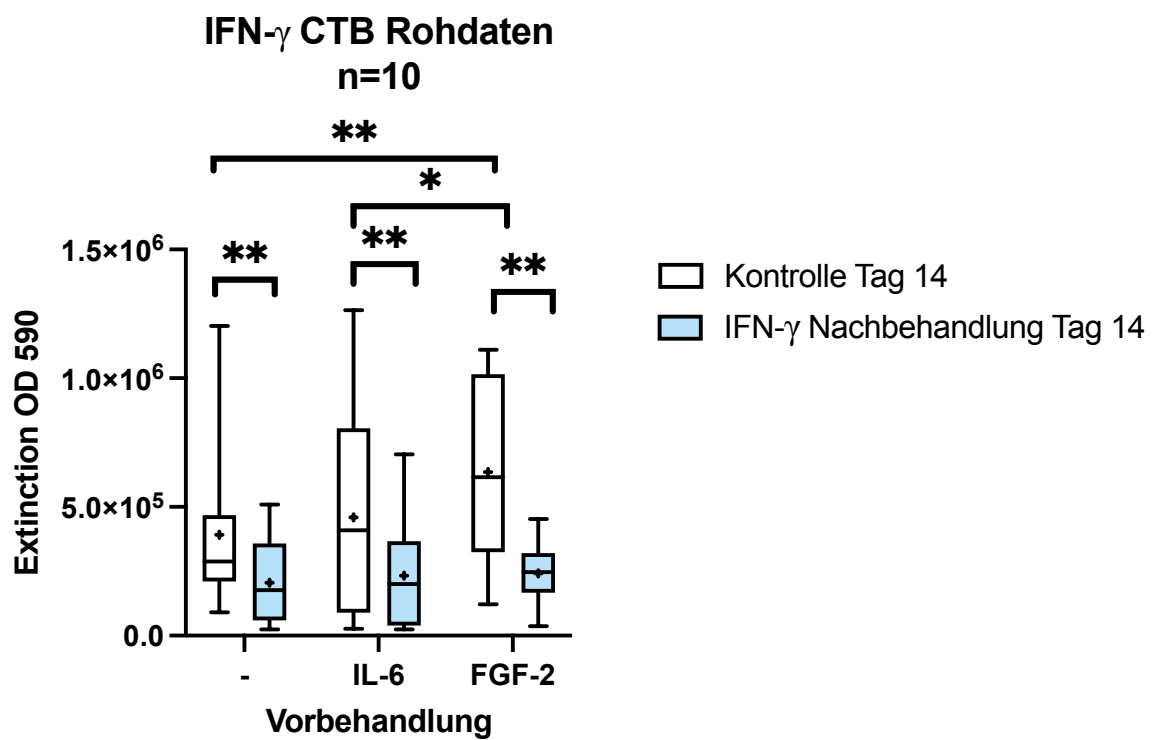
G



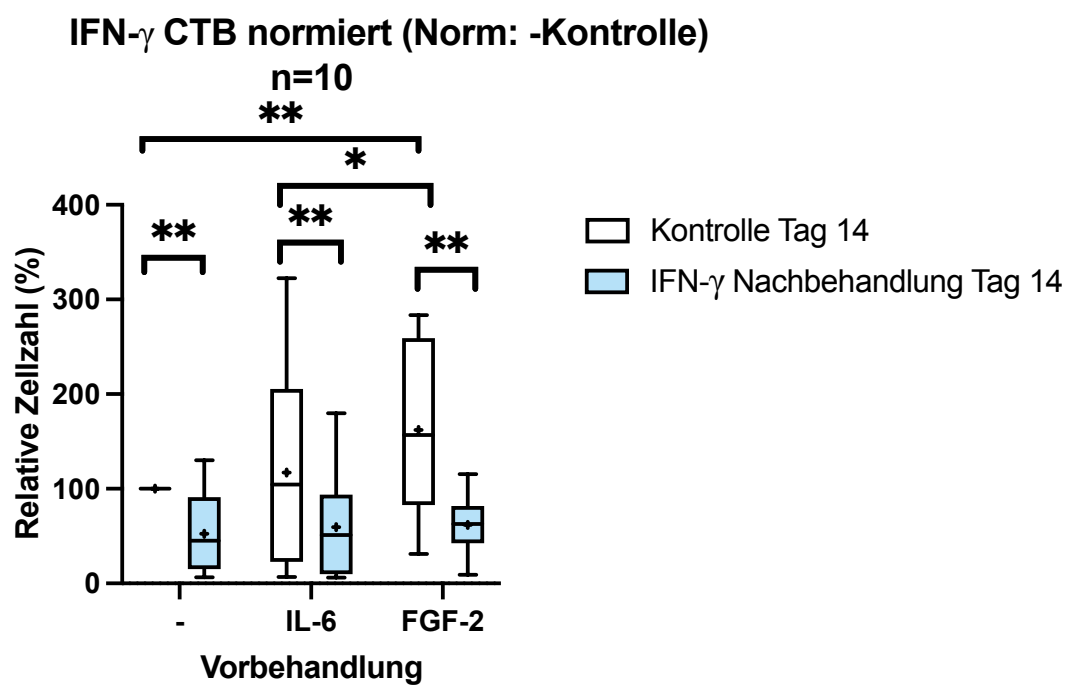
H



I

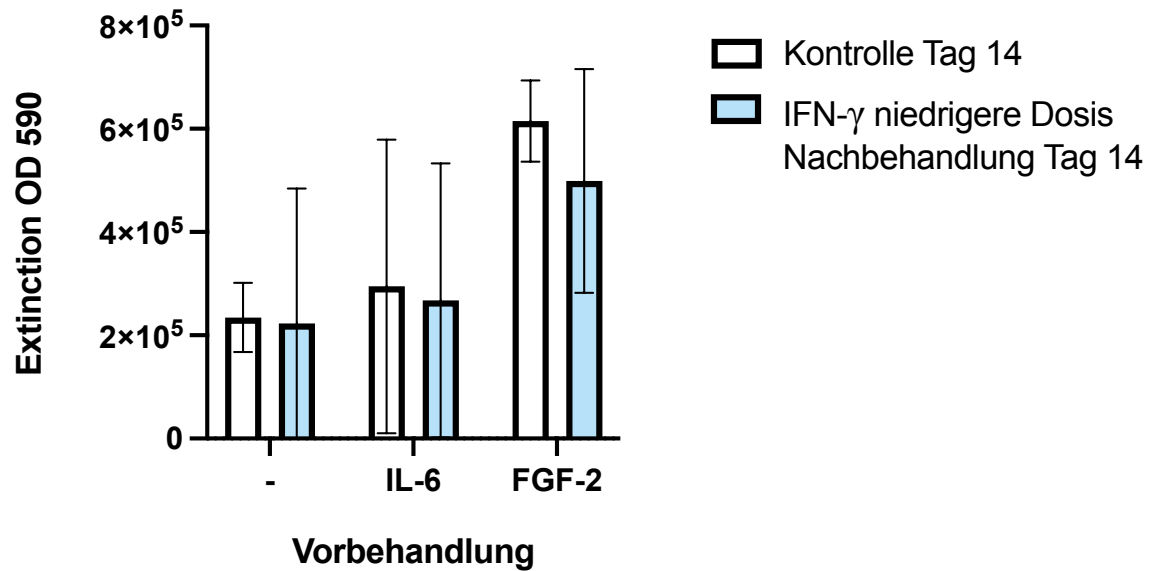


J



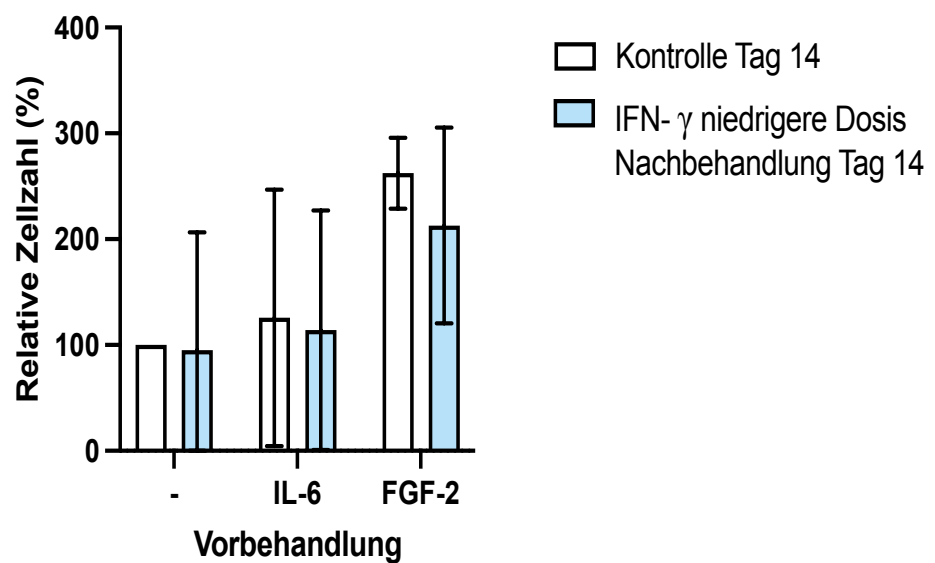
K

IFN- γ niedrigere Dosis CTB Rohdaten n=2

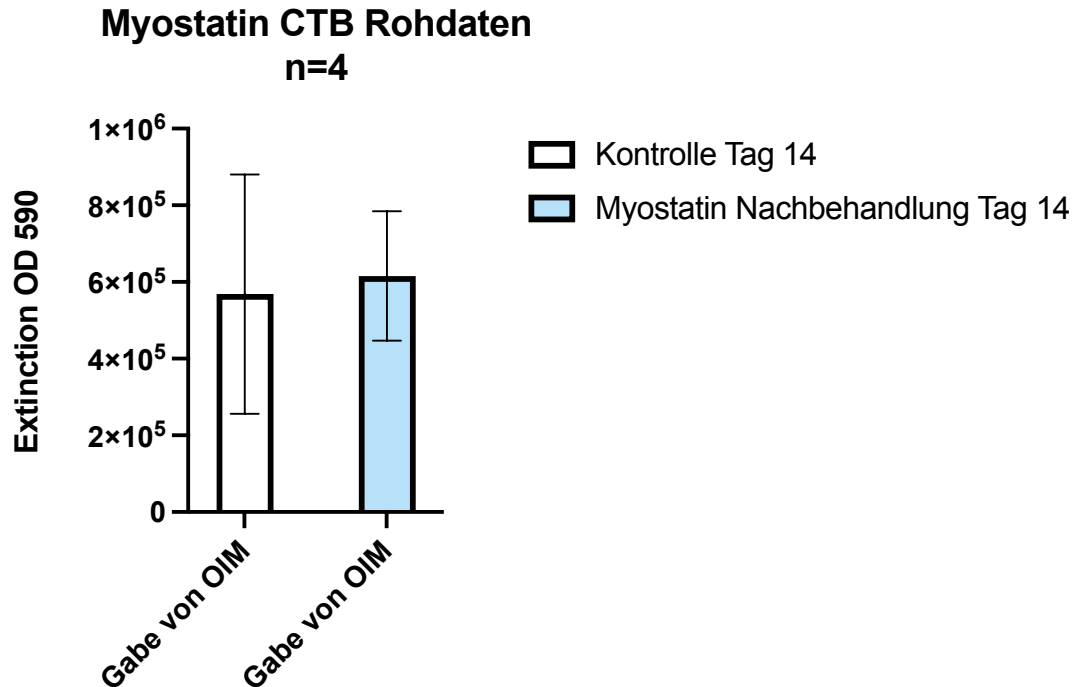


L

IFN- γ niedrigere Dosis CTB normiert (Norm: -Kontrolle) n=2



M



N

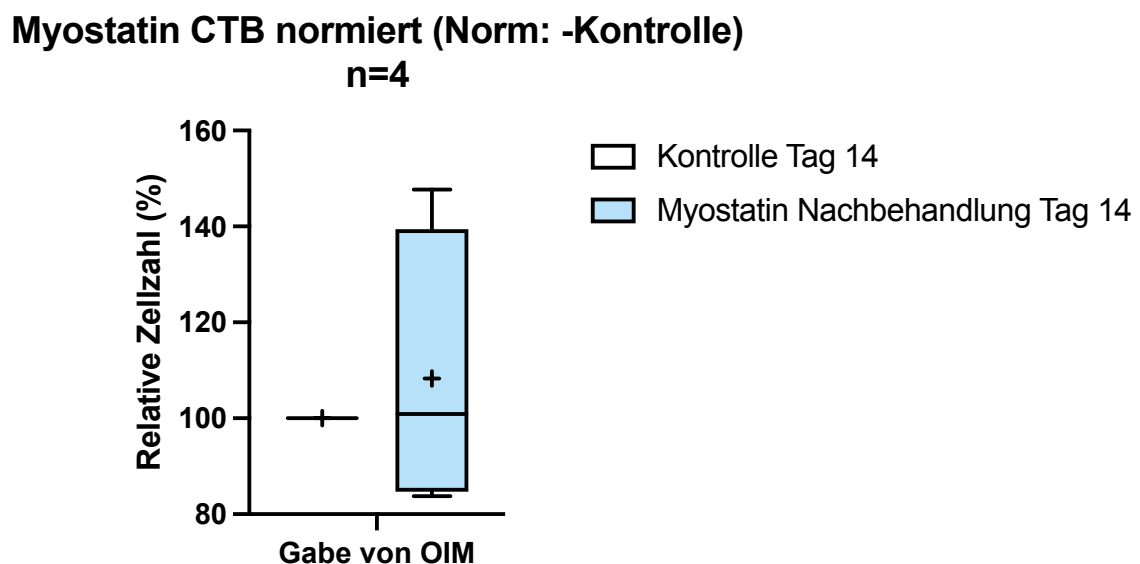


Abbildung 10: Darstellung der Zellzahl bzw. Zellviabilität über das CTB-Assay mittels photometrischer Messung. Dargestellt als Rohdaten und normiert auf die Kontrolle in Prozent. Die Kontrolle wurde 10 Tage ohne Myokingabe in DMEM behandelt und danach 14 Tage mit OIM ebenfalls ohne Myokingabe nachbehandelt (A-J) (*= Signifikanz [$p < 0,05$], **= Signifikanz [$p < 0,01$]; $n=10$). Nach dem gleichen Schema wurden die zwei Spender/Spenderinnen in der

separaten Darstellung behandelt (K-L). Die drei auf der X-Achse beschrifteten Gruppen der Grafiken (A-L) beziehen sich auf die Vorstimulation, (-) bezieht sich auf die Gruppe ohne Myokin-Vorstimulation, (FGF-2) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit FGF-2 und (IL-6) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit IL-6. Die weißen Balken in den jeweiligen Grafiken haben während der osteogenen Differenzierungsphase von 14 Tagen keine Nachbehandlung mit Myokinen bekommen. Die gefärbten Balken wurden während der osteogenen Differenzierung mit dem jeweiligen Myokin nachbehandelt. Nachbehandlung mit FGF-2 (2 ng/ml) als Rohdaten und normiert (A-B), Nachbehandlung mit Interleukin-6 (IL-6, 6 U/ml) als Rohdaten und normiert (C-D), Nachbehandlung mit Interleukin-1 β (IL-1 β , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (E-F), Nachbehandlung mit Tumornekrosefaktor- α (TNF α , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (G-H) und Interferon- γ (IFN- γ , 31,25 U/ml) als Rohdaten und normiert (I-J). Die Darstellung erfolgte zur besseren Visualisierung im Boxplot Diagramm (A-J) und für die separate Darstellung der zwei Spender/Spenderinnen mit IFN- γ (3,125 U/ml) Nachbehandlung klassisch als Säulendiagramm (K-L). Im separaten Versuch mit Myostatin (M-N) gab es keine Vorstimulationsgruppen, die Spender/Spenderinnen (n=4) wurden über 14 Tage im OIM mit Myostatin (50 ng/ml) bzw. als Kontrolle nur mit OIM behandelt. Es erfolgte eine Darstellung als Rohdaten (M) und normiert auf die Kontrolle in Prozent (N).

3.3.2 Mineralisierung

Eine alleinige Vorbehandlung mit IL-6 oder FGF-2 führte in beiden Fällen zur nicht signifikanten Abnahme des Wertes um ca. 17 % bzw. 14 % der Mineralisierung im Vergleich zur Kontrolle.

Betrachtet man die relative Mineralisierung in diesem Versuchsaufbau, so sah man einen nicht signifikanten Anstieg des Wertes in der Gruppe ohne Vorstimulation, wenn über 14 Tage mit FGF-2 nachbehandelt wurde (A-B). Das Gleiche gilt für die Gruppe, die mit IL-6 vorbehandelt wurde und FGF-2 erhielt im Vergleich zur Gruppe die nur mit IL-6 vorbehandelt wurde (A-B). Auch kam es zu einem nicht signifikanten Anstieg des Wertes, wenn mit FGF-2 vorbehandelt und nachbehandelt wurde im Vergleich zur Gruppe, die nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde.

Eine IL-6 Nachbehandlung ohne Vorstimulation erhöhte den Wert der relativen Mineralisierung nicht signifikant um ca. 30 % (C-D). Stimulierte man mit IL-6 vor und behandelte mit IL-6 nach, so kam es zu einem Anstieg des Wertes Mineralisierung von ca. 20 % im Vergleich zur Gruppe, die nur mit IL-6 vorstimuliert wurde (C-D). Auch eine Vorbehandlung mit FGF-2 und eine darauffolgende Nachbehandlung mit IL-6 führte zum nicht signifikanten Anstieg des Wertes der Mineralisierung um ca. 22 % im Vergleich zur Gruppe, die nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde.

Eine Nachbehandlung mit IL-1 β ohne Vorstimulation steigerte den relativen Mineralisierungswert signifikant um über 70 % (E-F). Ähnliches galt auch bei einer Vorstimulation mit IL-6, so stieg bei einer Nachbehandlung mit IL-1 β der relative Mineralisierungswert signifikant über 70 % in Relation zur Kontrolle, die nur mit IL-6 vorstimuliert wurde. Ebenfalls führte nach einer Vorstimulation mit FGF-2 die Nachbehandlung mit IL-1 β zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der der Mineralisierung um ca. 88 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorstimuliert wurde.

Ähnliche Einflüsse waren bei einer Nachbehandlung mit TNF α ersichtlich. Es kam zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der Mineralisierung in der Gruppe ohne Vorstimulation mit TNF α Nachbehandlung um ca. 89 % (G-H). Wurde mit IL-6 vorstimuliert und mit TNF α nachbehandelt, so stieg der Wert der Mineralisierung signifikant um ca. 63 % an im Vergleich zur Gruppe die nur mit IL-6 vorbehandelt wurde. Auch eine FGF-2 Vorstimulation mit TNF α Nachbehandlung hatte einen signifikanten Effekt auf die Mineralisierung. So stieg der Wert hierbei um ca. 85 % im Vergleich zur Gruppe, die nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde.

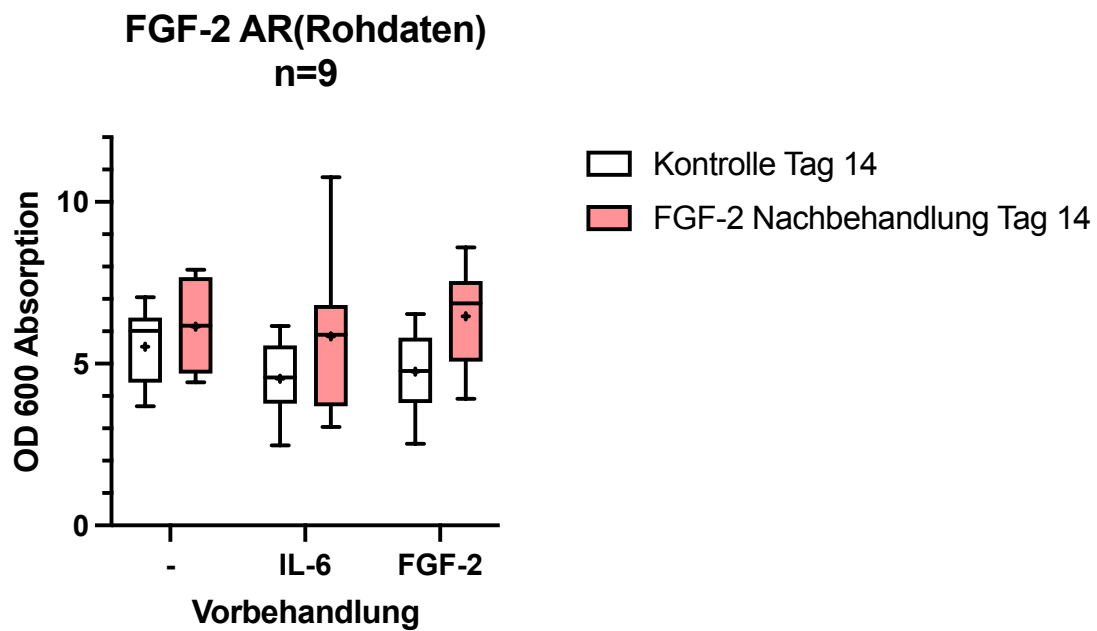
IFN- γ (31,25 U/ml) erhöhte den Wert der relativen Mineralisierung ohne Vorstimulation signifikant um ca. 40 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (I-J). Behandelte man mit IL-6 vor und mit IFN- γ (31,25 U/ml) nach, so kam es zu einer nicht signifikanten Erhöhung des Wertes der Mineralisierung um ca. 33 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit IL-6 vorbehandelt wurde. Eine FGF-2 Vorstimulation und IFN- γ (31,25 U/ml) Nachbehandlung erhöhte den Wert der relativen Mineralisierung signifikant um ca. 56 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde.

IFN- γ (3,125 U/ml) in der niedrigeren Dosis ohne Vorstimulation führte in den zwei durchgeführten Versuchsdurchläufen zu einer geringen nicht signifikanten

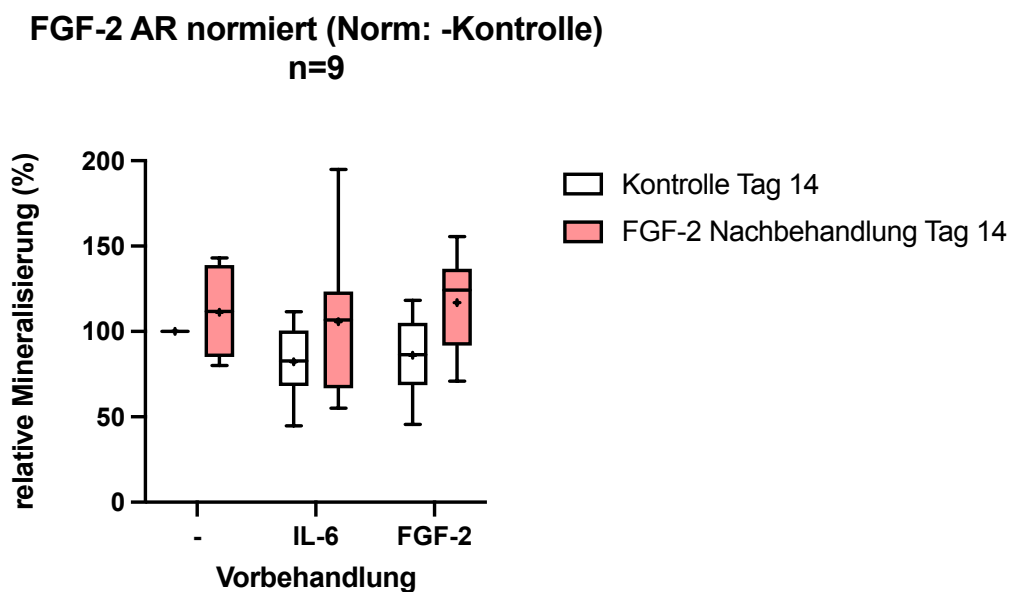
Erhöhung des Mineralisierungswertes um ca. 9 % (K-L). Ebenfalls kam es in diesen zwei Durchläufen zu einem Abfall der Mineralisierung nach IL-6 Vorstimulation ohne IFN- γ (3,125 U/ml) von 40 %. Bei Nachbehandlung mit IFN- γ (3,125 U/ml) sank der Wert der Mineralisierung um ca. 50 %.

Eine Myostatingabe zum Differenzierungsmedium führte in dem separaten Versuchsaufbau zu einem geringeren Wert der Mineralisierung um ca. 13 % im Vergleich zur Kontrolle (M-N).

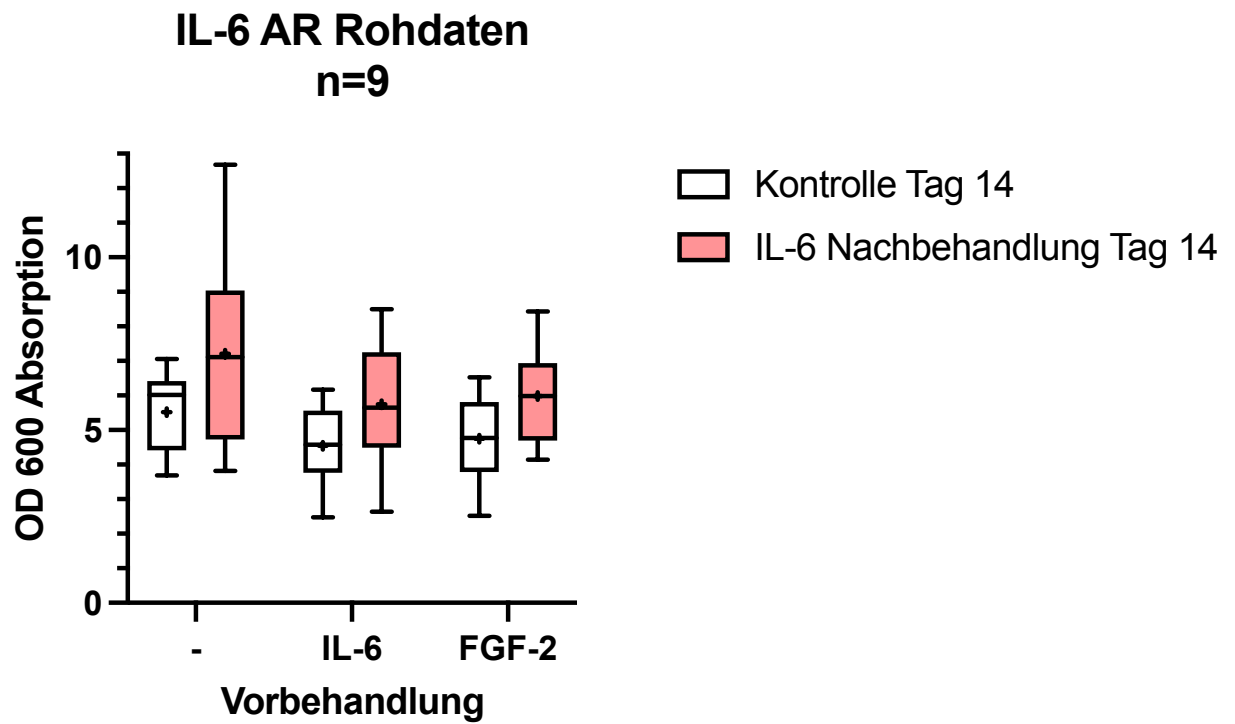
A



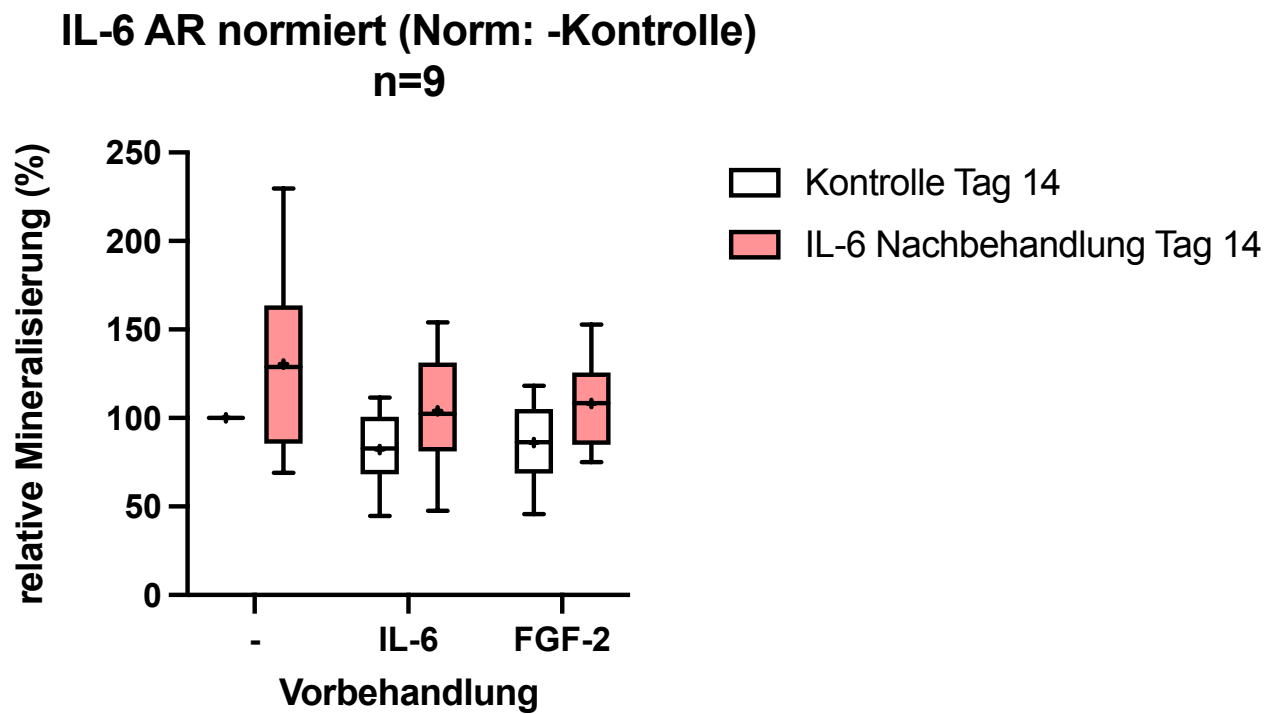
B



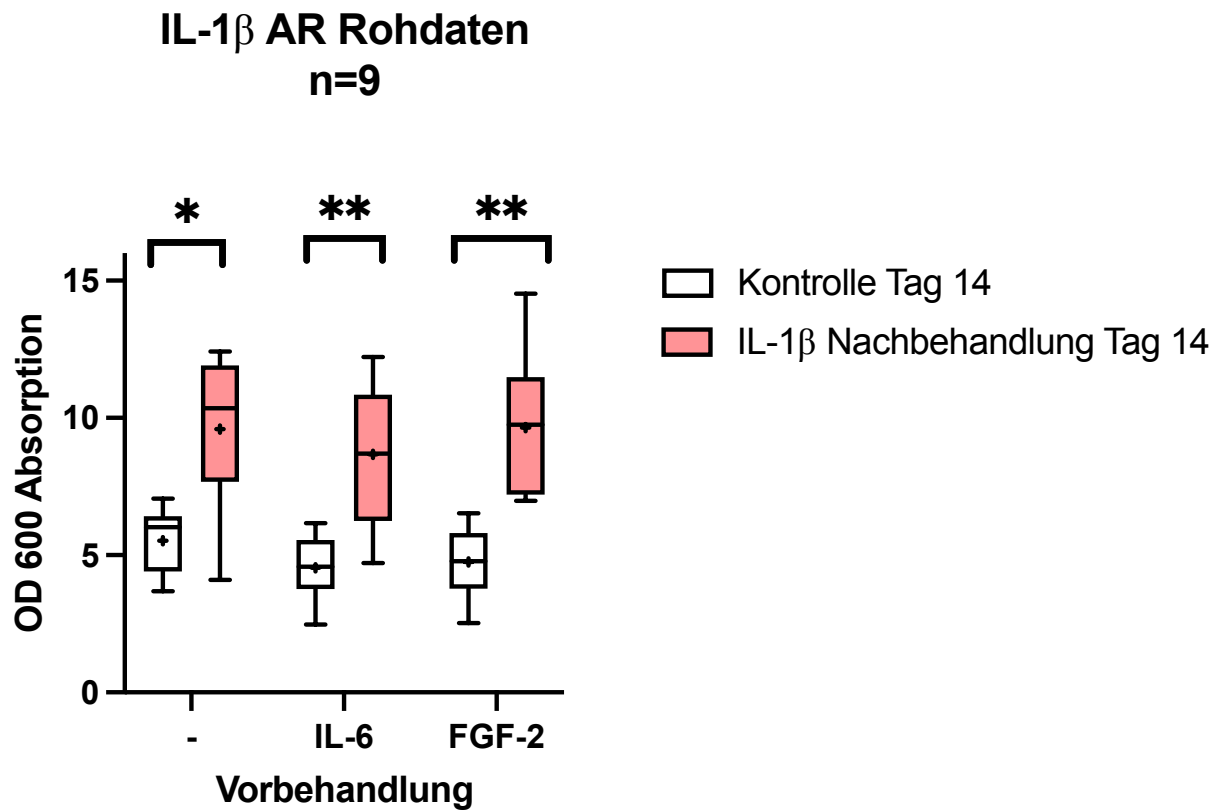
C



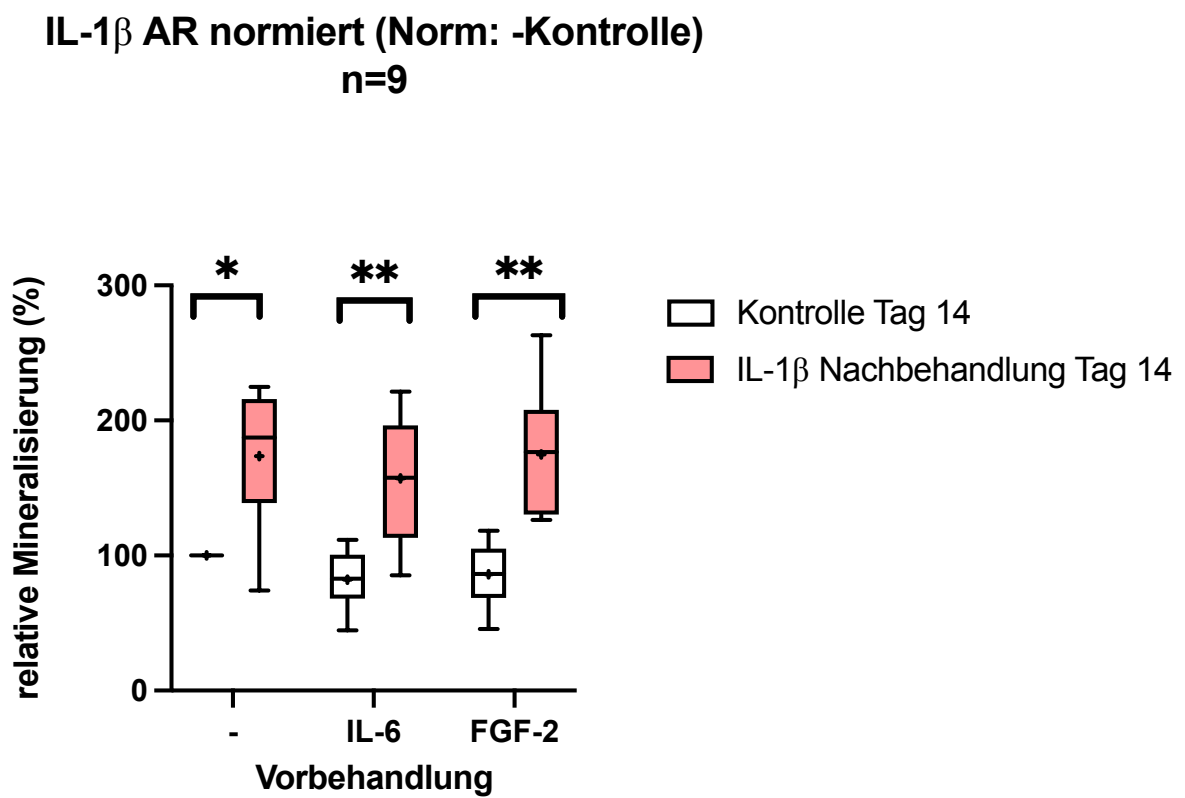
D



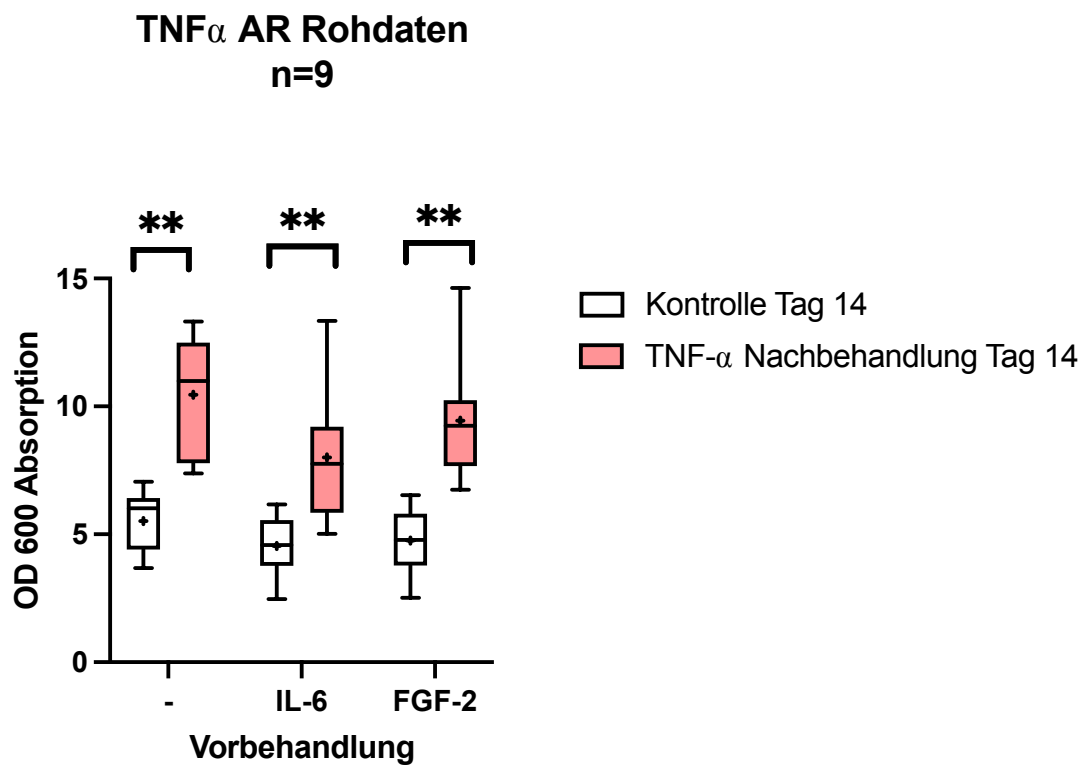
E



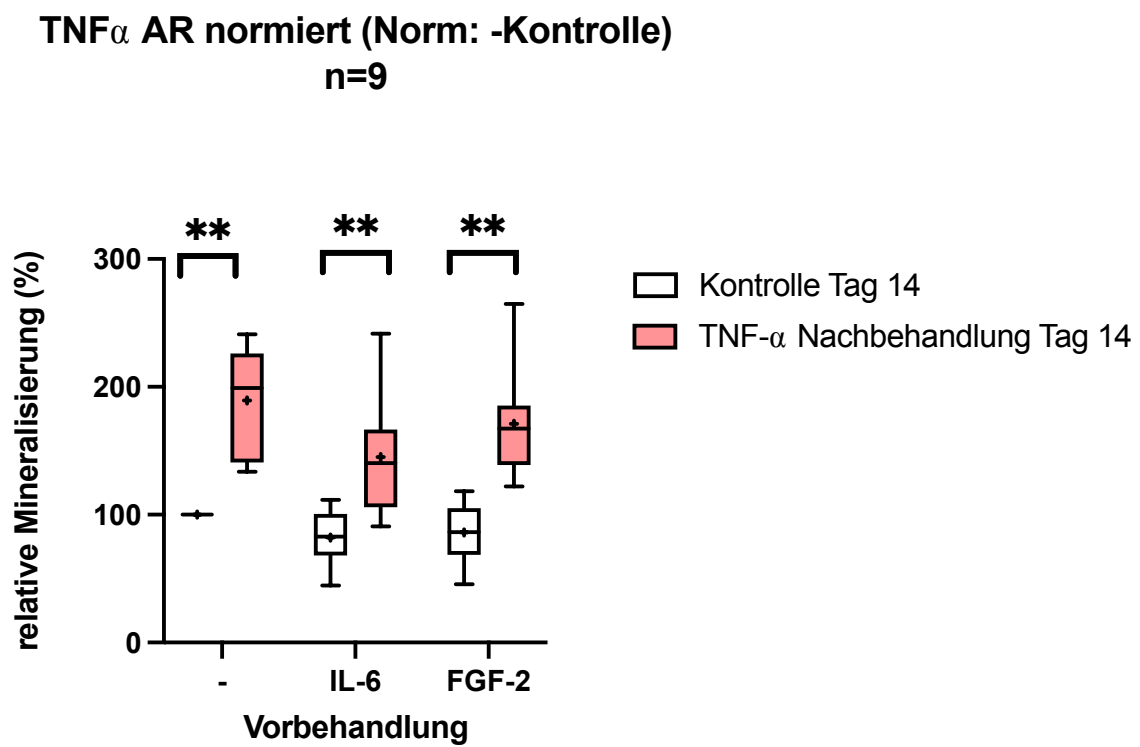
F



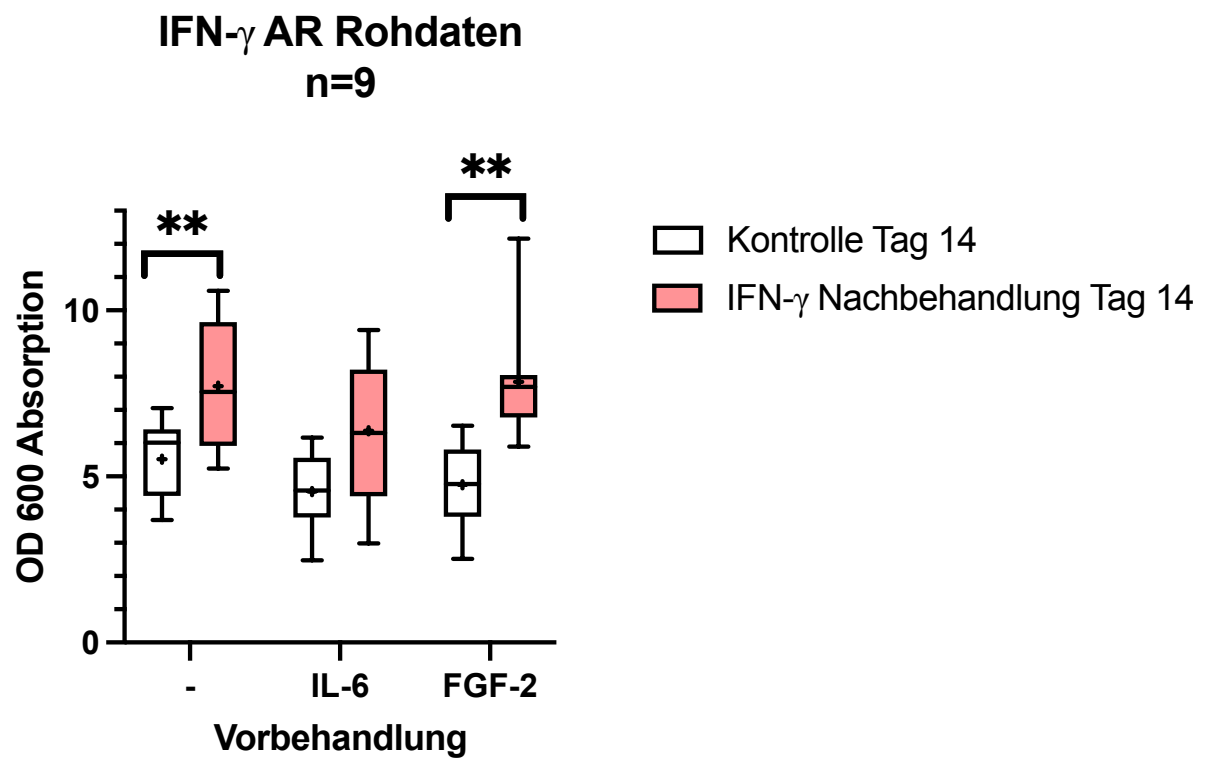
G



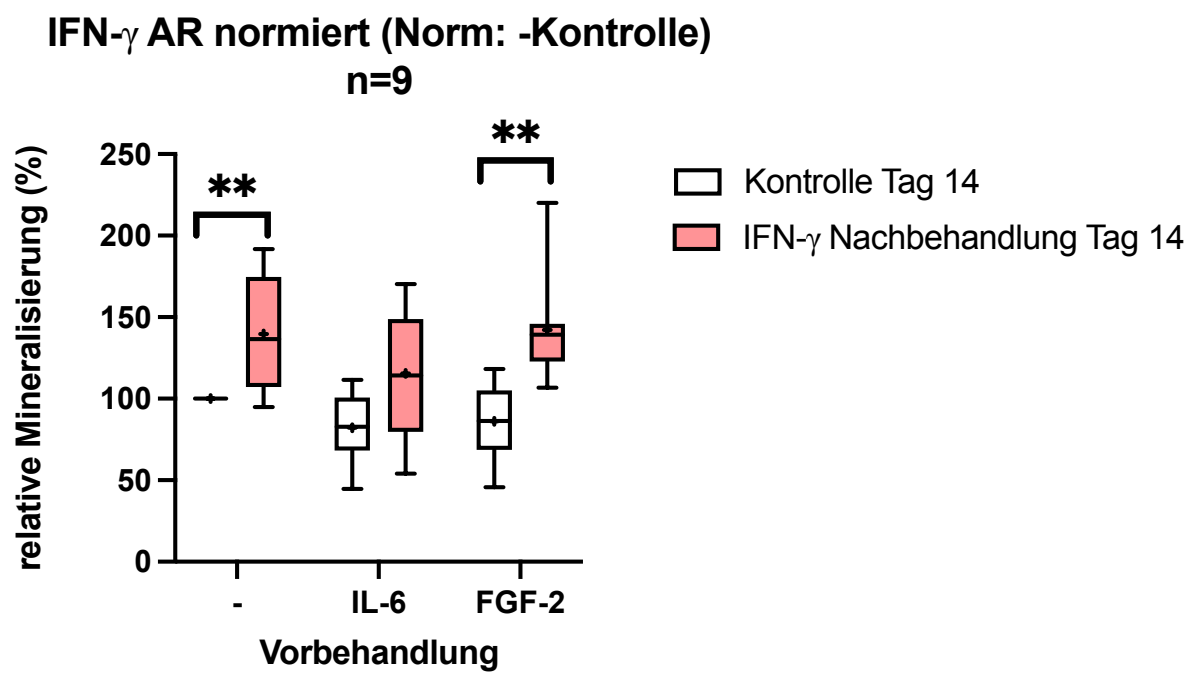
H



I

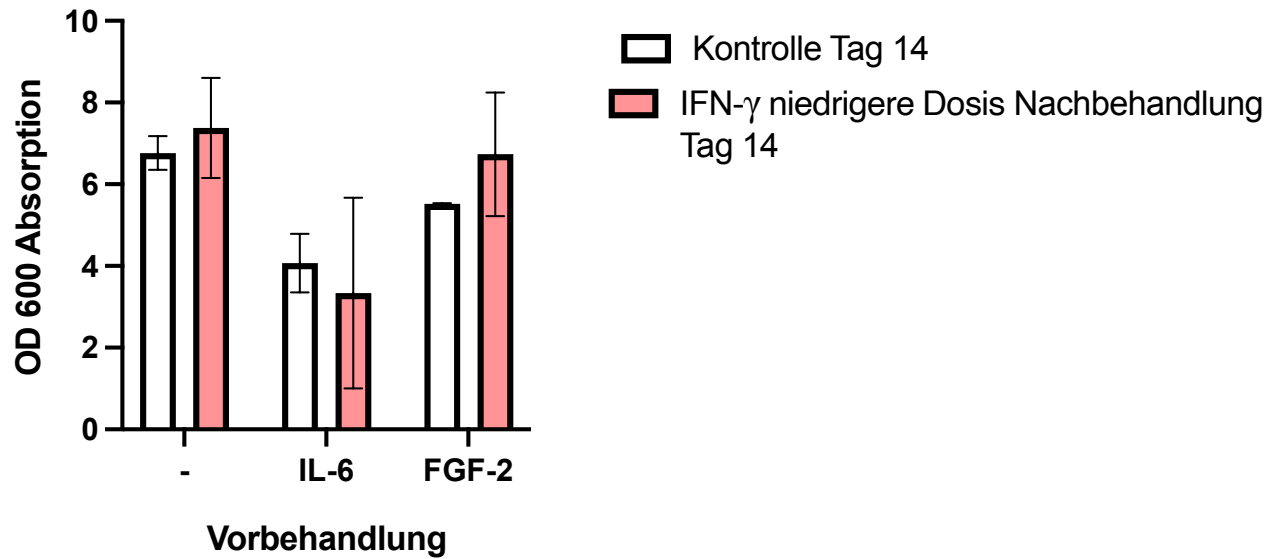


J



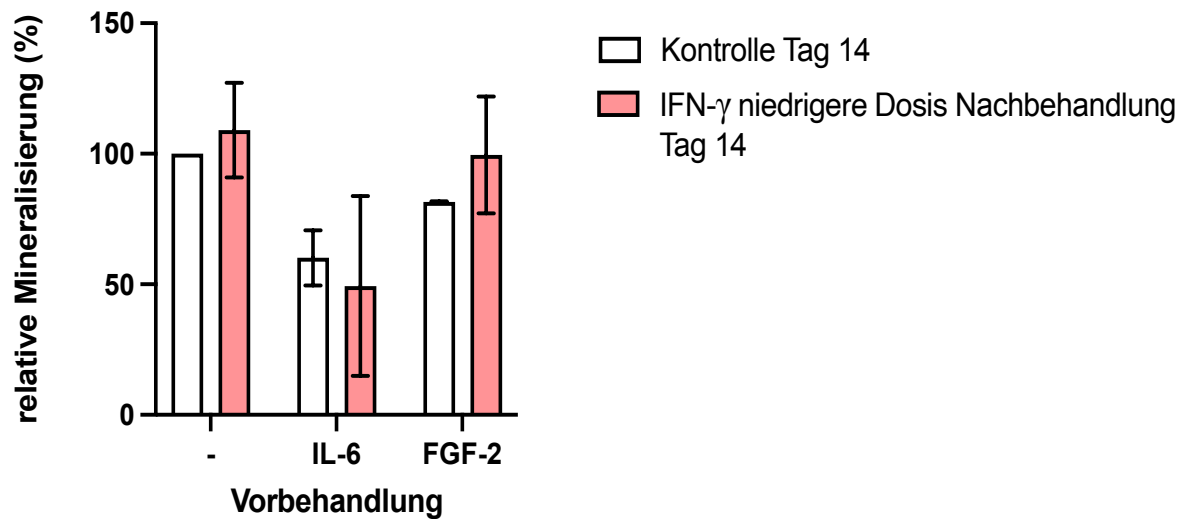
K

IFN- γ niedrigere Dosis AR Rohdaten n=2



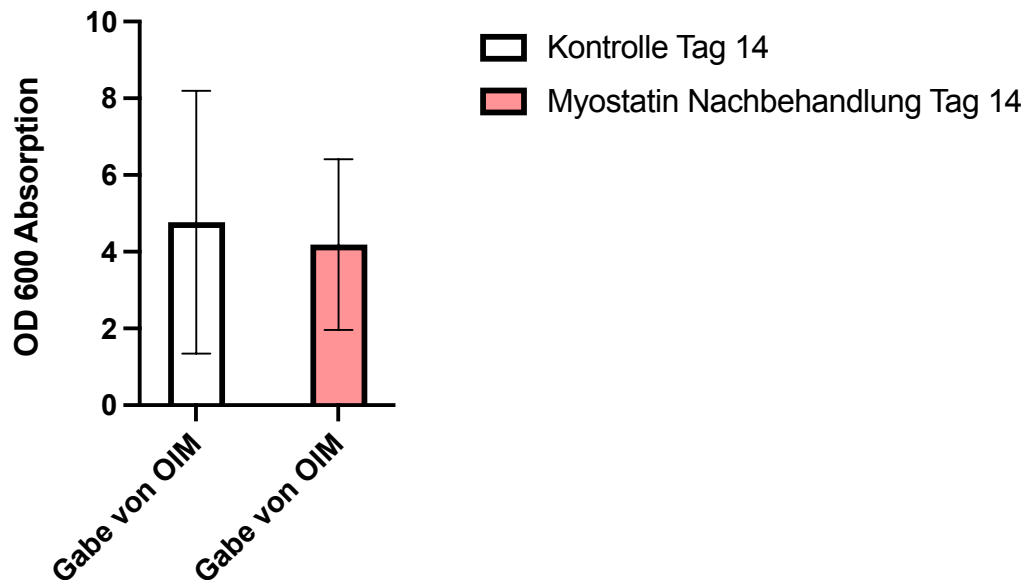
L

IFN- γ niedrigere Dosis AR normiert (Norm: -Kontrolle) n=2



M

Myostatin AR Rohdaten n=4



N

Myostatin AR normiert (Norm: -Kontrolle) n=4

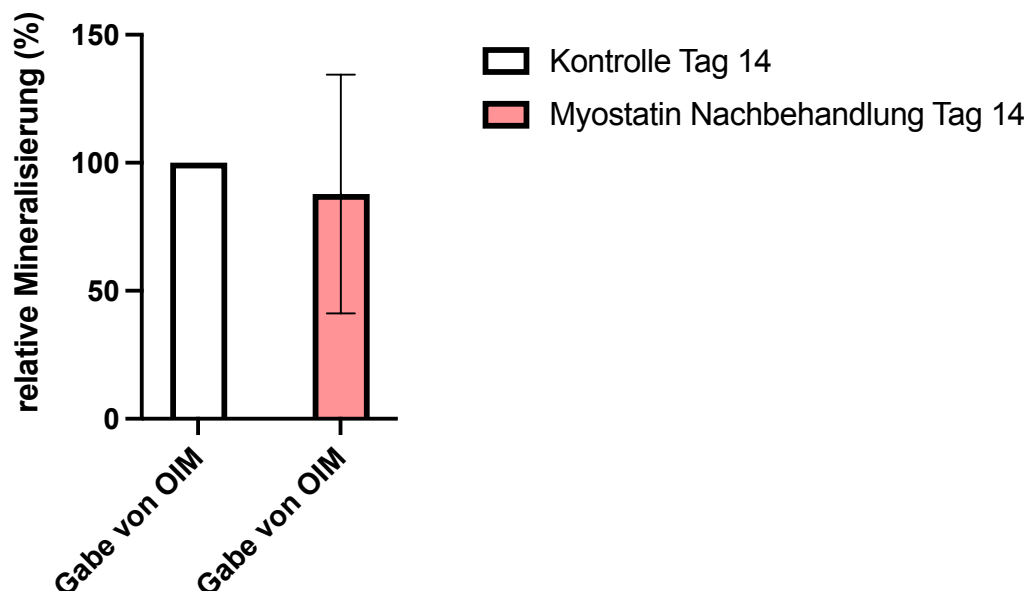


Abbildung 11: Darstellung der Mineralisierung mittels photometrischer Messung. Dargestellt als Rohdaten und normiert auf die Kontrolle in Prozent. Die Kontrolle wurde 10 Tage ohne Myokingabe in DMEM behandelt und danach 14 Tage mit OIM ebenfalls ohne Myokingabe nachbehandelt (A-J) (*= Signifikanz [$p < 0,05$], **= Signifikanz [$p < 0,01$]; $n=10$). Nach dem gleichen Schema wurden die zwei Spender/Spenderinnen in der separaten Darstellung behandelt (K-L). Die drei auf der X-Achse beschrifteten Gruppen der Grafiken (A-L) beziehen sich auf die Vorstimulation, (-) bezieht sich auf die Gruppe ohne Myokin-Vorstimulation, (FGF-2) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit FGF-2 und (IL-6) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit IL-6. Die weißen Balken in

den jeweiligen Grafiken haben während der osteogenen Differenzierungsphase von 14 Tagen keine Nachbehandlung mit Myokinen bekommen. Die gefärbten Balken wurden während der osteogenen Differenzierung mit dem jeweiligen Myokin nachbehandelt. Nachbehandlung mit FGF-2 (2 ng/ml) als Rohdaten und normiert (A-B), Nachbehandlung mit Interleukin-6 (IL-6, 6 U/ml) als Rohdaten und normiert (C-D), Nachbehandlung mit Interleukin-1 β (IL-1 β , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (E-F), Nachbehandlung mit Tumornekrosefaktor- α (TNF α , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (G-H) und Interferon- γ (IFN- γ , 31,25 U/ml) als Rohdaten und normiert (I-J). Die Darstellung erfolgte zur besseren Visualisierung im Boxplot Diagramm (A-J) und für die separate Darstellung der zwei Spender/Spenderinnen mit IFN- γ (3,125 U/ml) Nachbehandlung klassisch als Säulendiagramm (K-L). Im separaten Versuch mit Myostatin (M-N) gab es keine Vorstimulationsgruppen, die Spender/Spenderinnen (n=4) wurden über 14 Tage im OIM mit Myostatin (50 ng/ml) bzw. als Kontrolle nur mit OIM behandelt. Es erfolgte eine Darstellung als Rohdaten (M) und normiert auf die Kontrolle in Prozent (N).

3.3.3 ALP-Aktivität

Die relative ALP-Aktivität wurde ohne Vorstimulation bei FGF-2 Nachbehandlung kaum beeinflusst, es kam zu einem Anstieg des Wertes von 6 % (A-B). Eine IL-6 Vorstimulation ohne Nachbehandlung zeigte auch einen geringen Effekt, hierbei kam es zu einem geringeren Wert der relativen ALP-Aktivität um ca. 8 % im Vergleich zur Kontrolle. Ebenfalls nicht signifikant ist der Einfluss einer Vorstimulation mit FGF-2 gewesen, dabei verringerte sich der Wert der ALP-Aktivität um ca. 11 % im Vergleich zur Kontrolle. Wenn mit mit FGF-2 vorbehandelt und nachbehandelt wurde, kam es zu einem signifikant geringeren Wert der relativen ALP-Aktivität um ca. 20 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 nachbehandelt wurde (A-B).

Eine IL-6 Nachbehandlung ohne Vorstimulation zeigte kaum Einfluss auf die ALP-Aktivität (C-D). Das Gleiche galt auch für eine IL-6 Vorbehandlung mit IL-6 Nachbehandlung, dort kam es zu einem etwas erhöhten Wert der relativen ALP-Aktivität um ca. 4 % im Vergleich zur Gruppe, die nur mit IL-6 vorbehandelt wurde. Kaum wurde auch der Wert der ALP-Aktivität bei FGF-2 Vorstimulation und IL-6 Nachbehandlung beeinflusst, dabei kam es zu einem geringeren Wert von ca. 5 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorstimuliert wurde (C-D).

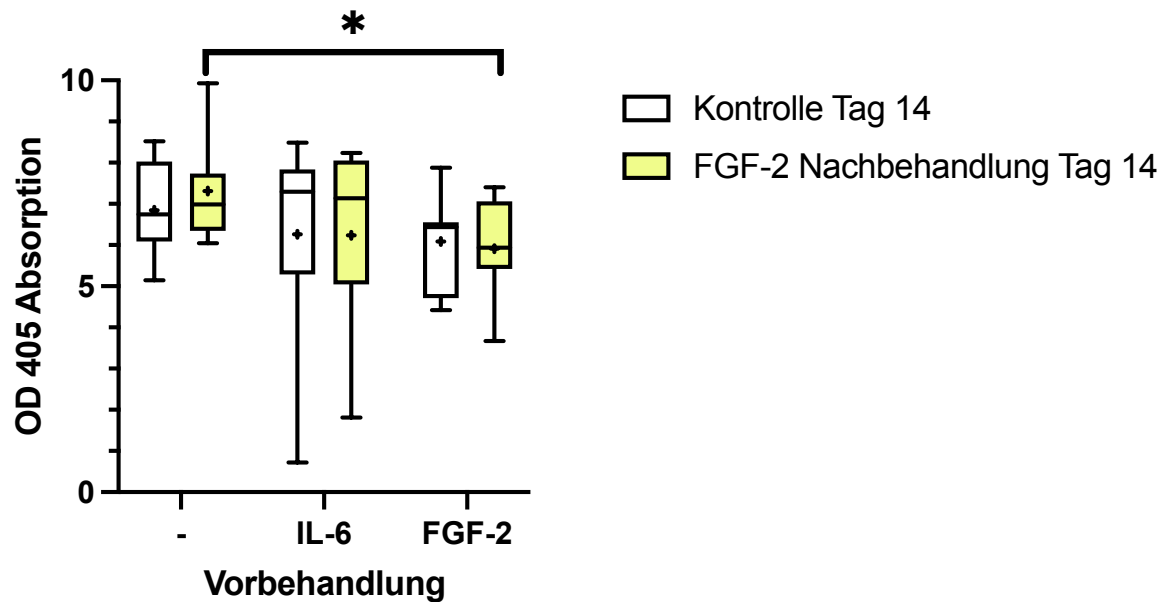
Ähnliches galt für Nachbehandlung mit IL-1 β (E-F), TNF α (G-H), IFN- γ (31,25 U/ml) (I-J). Hierbei kam es kaum zu Veränderungen der Werte der ALP-Aktivität, unabhängig ob und womit vorstimuliert wurde. Lediglich beim IL-1 β (E-F) kam es zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der ALP-Aktivität, wenn mit FGF-2 vorbehandelt und mit IL-1 β nachbehandelt wurde, um ca. 16 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorstimuliert wurde.

Beim separaten Versuch mit IFN- γ in niedrigerer Dosis (3,125 U/ml) gab es ohne Vorstimulation einen Anstieg des Wertes der relativen ALP-Aktivität um ca. 20 % (K-L). Hierbei gab es ebenfalls geringere Werte der ALP-Aktivität bei IL-6 Vorstimulation mit und ohne IFN- γ (3,125 U/ml) Nachbehandlung von ca. 35 %. Die Vorstimulation mit FGF-2 ohne Nachbehandlung hatte hierbei ebenfalls kaum einen Effekt. Eine Vorstimulation mit FGF-2 in Kombination mit IFN- γ (3,125 U/ml) Nachbehandlung steigerte den Wert der ALP-Aktivität nicht signifikant um ca. 26 %.

Der Wert der relativen ALP-Aktivität war unter Myostatingabe nicht signifikant um ca. 11 % geringer als die Kontrolle.

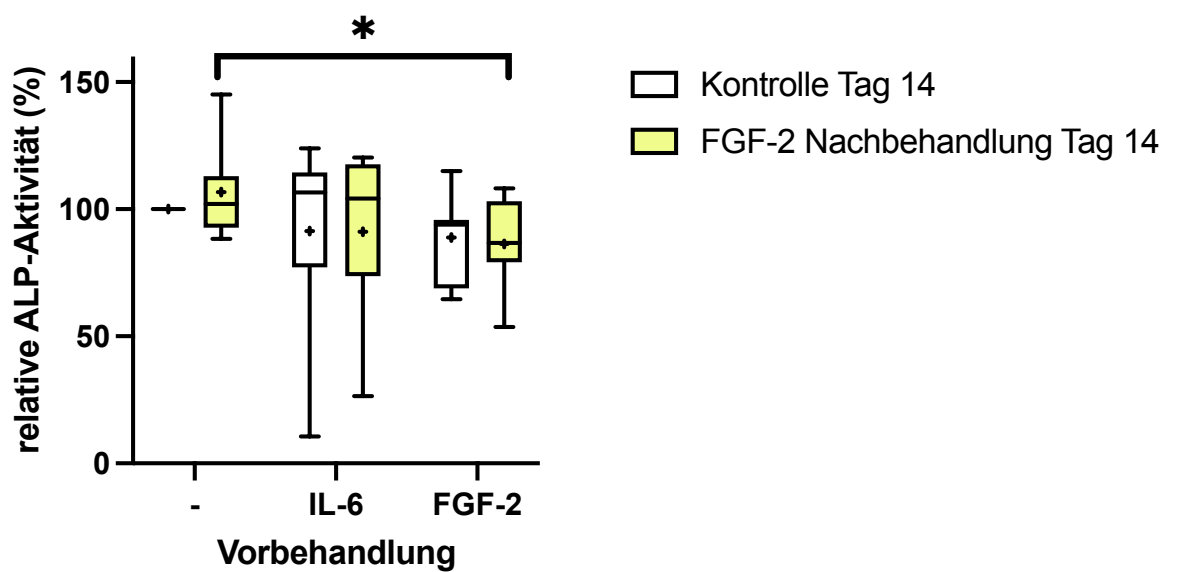
A

FGF-2 ALP-Assay Rohdaten n=7



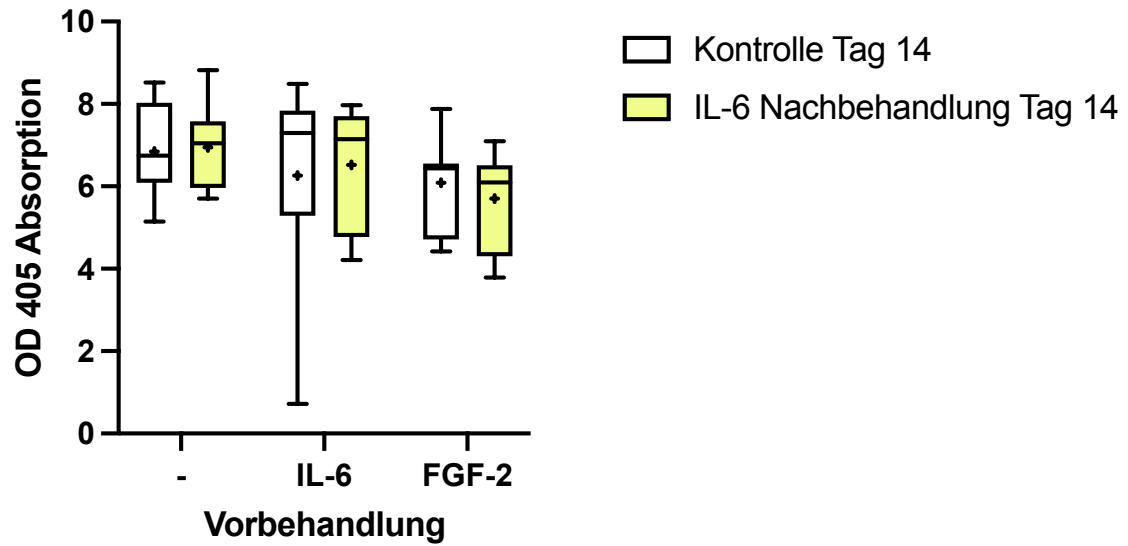
B

FGF-2 ALP Assay normiert (Norm: -Kontrolle) n=7



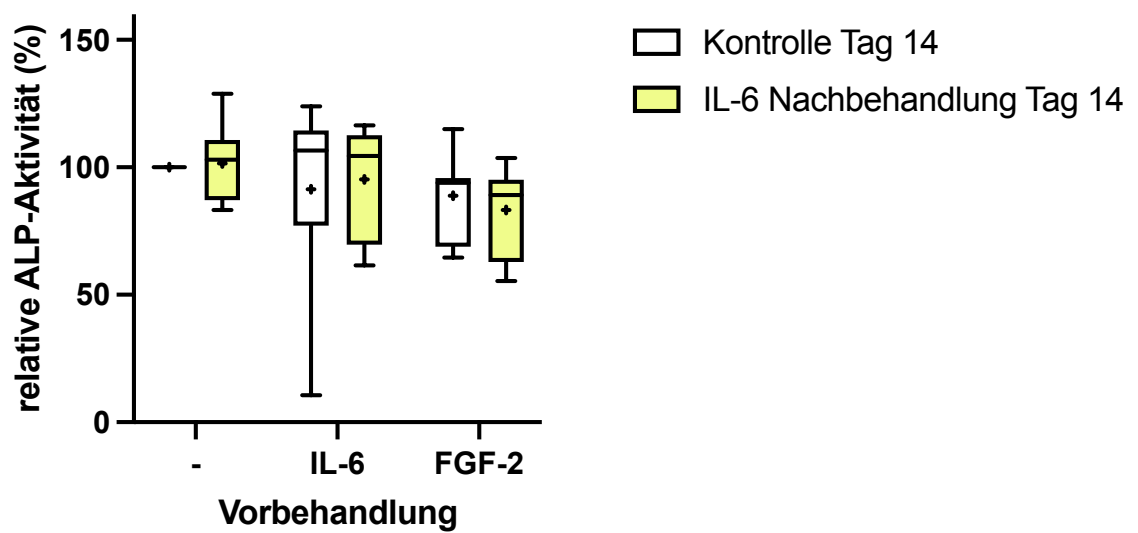
C

IL-6 ALP-Assay Rohdaten n=7

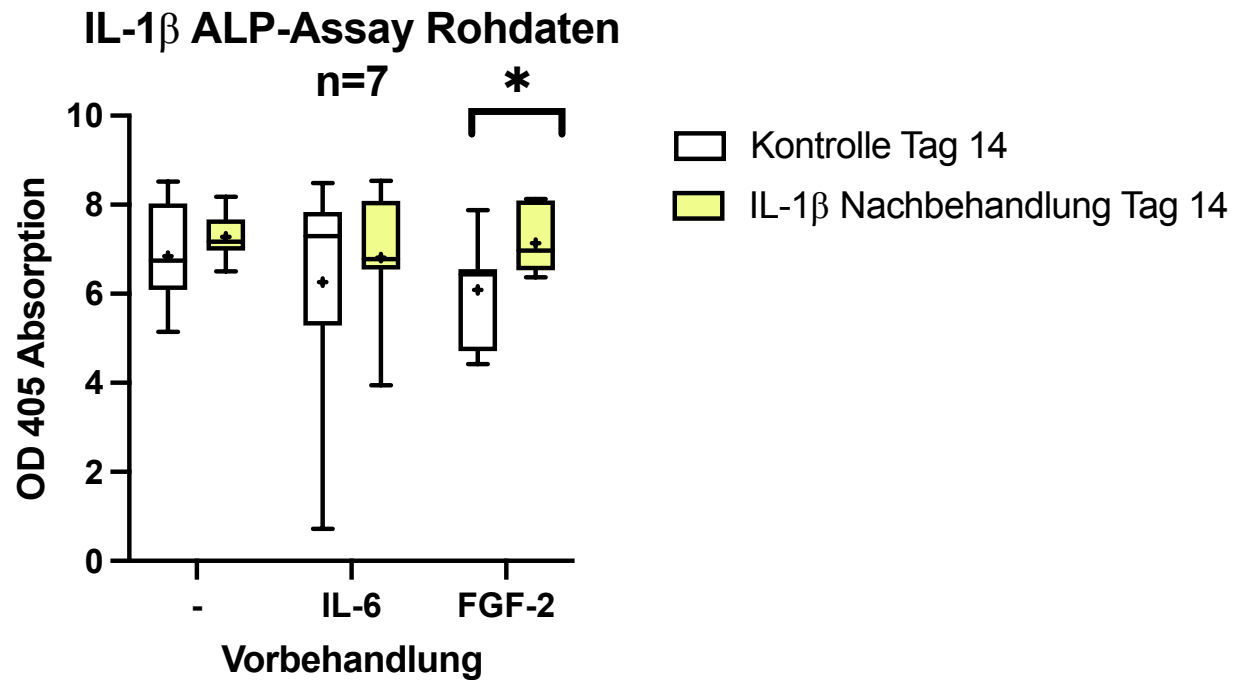


D

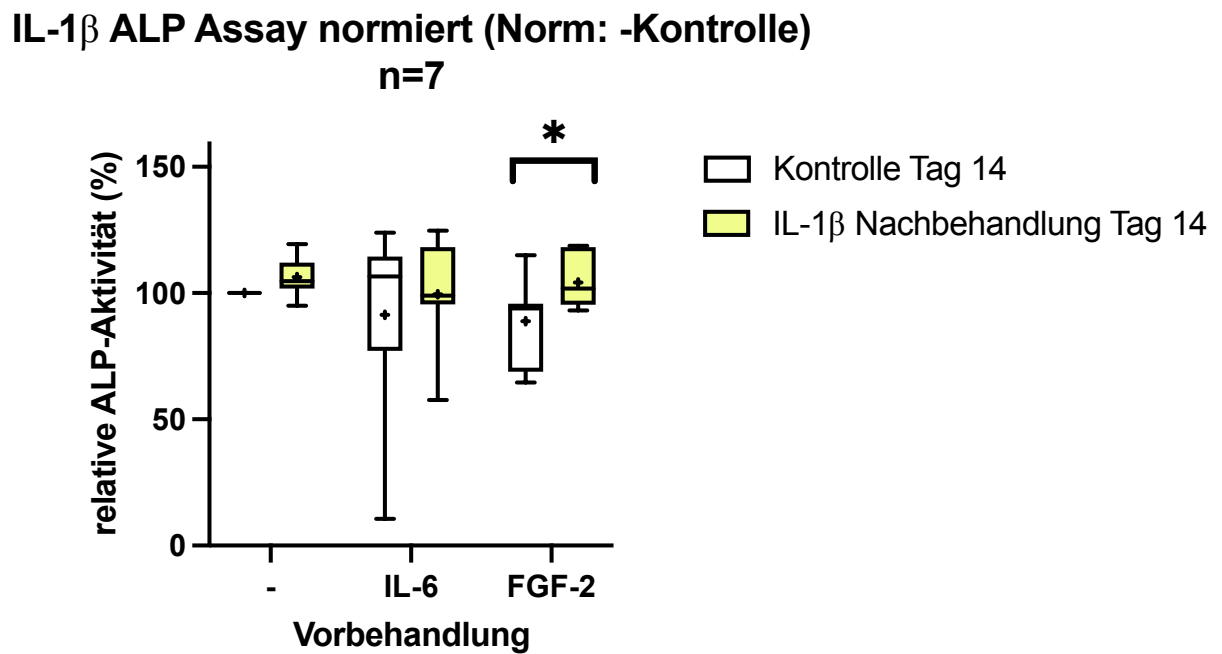
IL-6 ALP Assay normiert (Norm: -Kontrolle) n=7



E

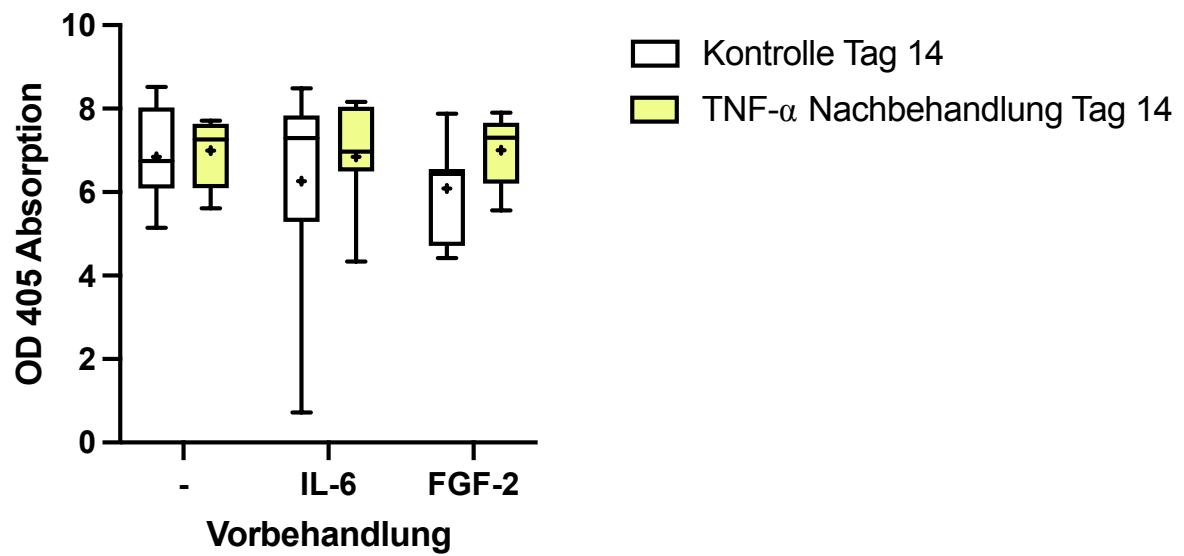


F



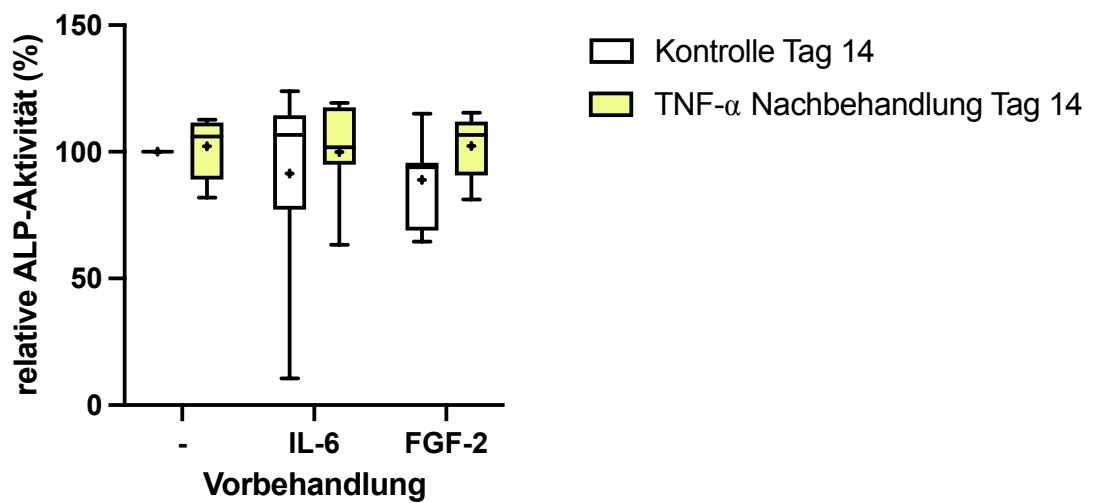
G

TNF α ALP-Assay Rohdaten
n=7



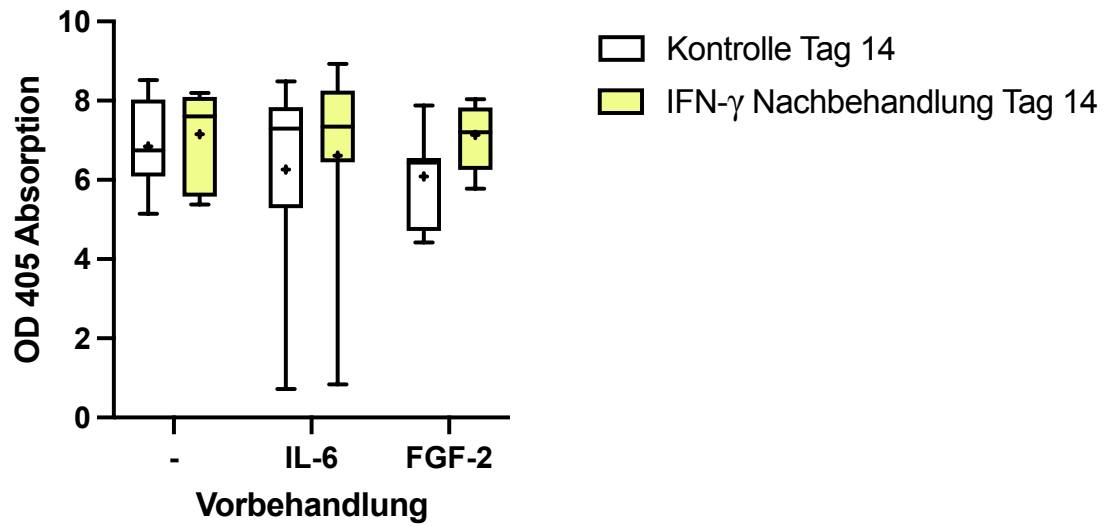
H

TNF α ALP Assay normiert (Norm: -Kontrolle)
n=7



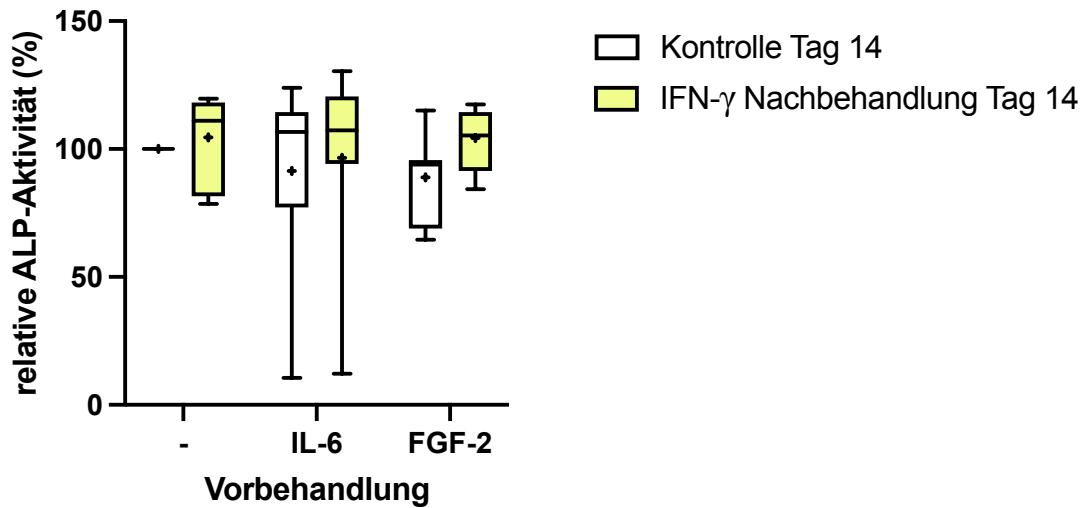
I

IFN- γ ALP-Assay Rohdaten n=7



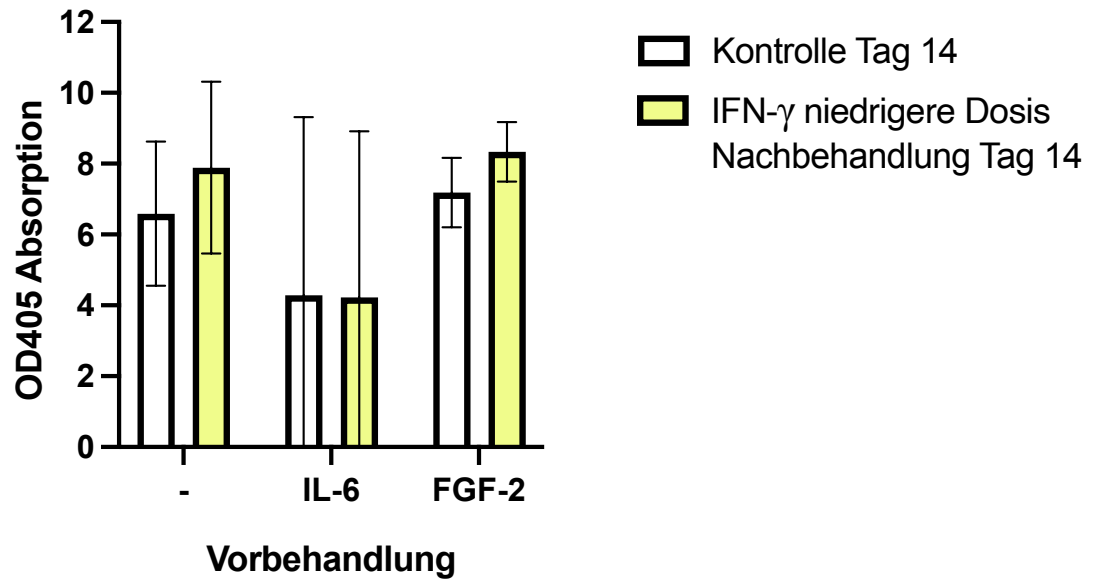
J

IFN- γ ALP Assay normiert (Norm: -Kontrolle) n=7



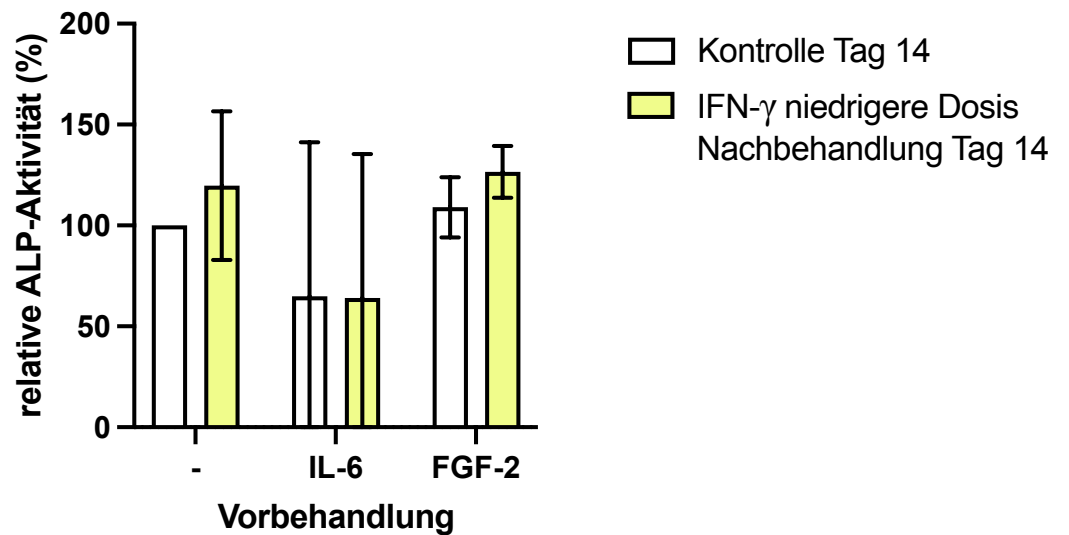
K

IFN- γ niedrigere Dosis ALP-Assay Rohdaten n=2



L

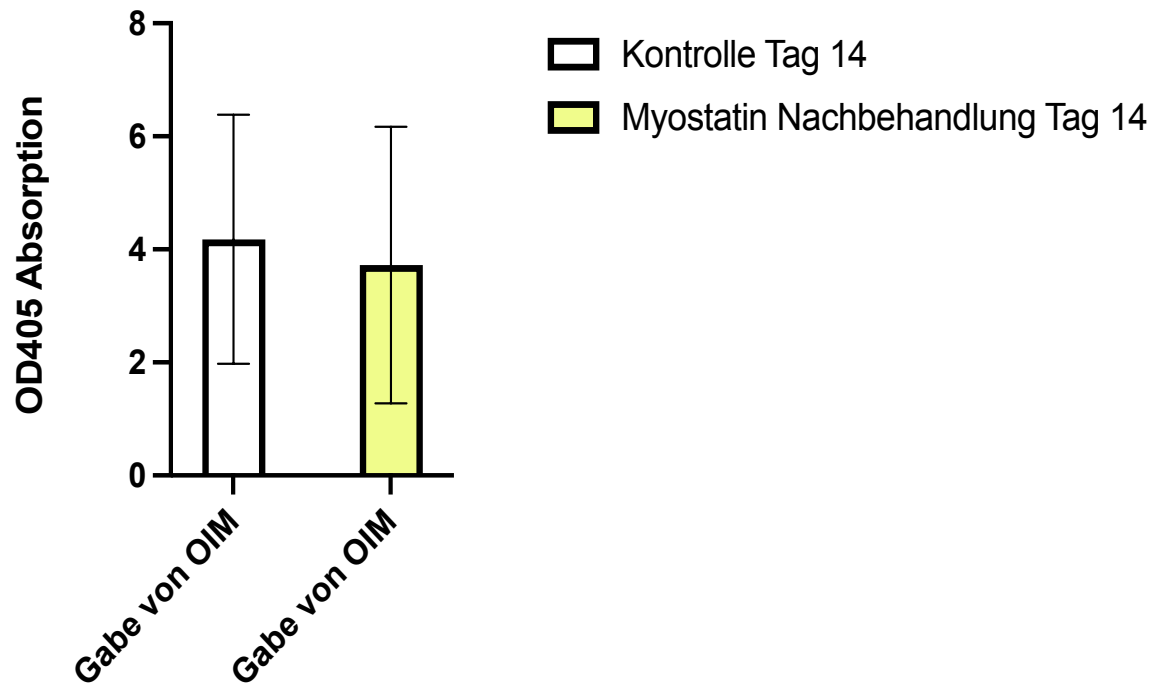
IFN- γ niedrigere Dosis ALP Assay normiert (Norm: -Kontrolle) n=2



M

Myostatin ALP-Assay Rohdaten

n=4



N

Myostatin ALP-Assay normiert (Norm: -Kontrolle)

n=4

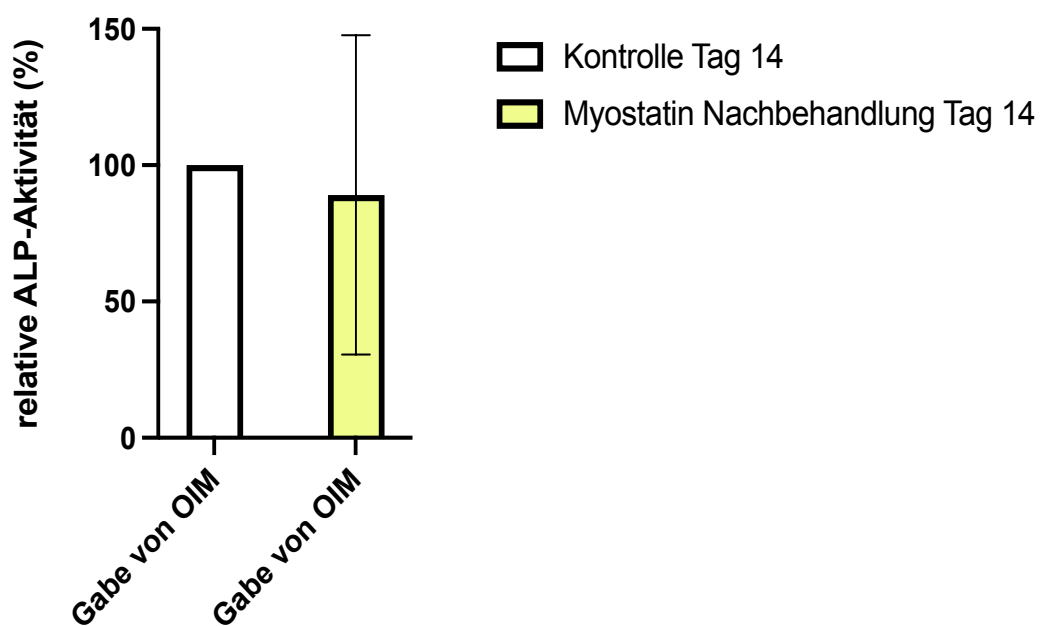


Abbildung 12: Darstellung der ALP-Aktivität über das ALP-Assay mittels photometrischer Messung. Dargestellt als Rohdaten und normiert auf die Kontrolle in Prozent. Die Kontrolle

wurde 10 Tage ohne Myokingabe in DMEM behandelt und danach 14 Tage mit OIM ebenfalls ohne Myokingabe nachbehandelt (A-J) (*= Signifikanz [$p < 0,05$], **= Signifikanz [$p < 0,01$]; $n=10$). Nach dem gleichen Schema wurden die zwei Spender/Spenderinnen in der separaten Darstellung behandelt (K-L). Die drei auf der X-Achse beschrifteten Gruppen der Grafiken (A-L) beziehen sich auf die Vorstimulation, (-) bezieht sich auf die Gruppe ohne Myokin-Vorstimulation, (FGF-2) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit FGF-2 und (IL-6) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit IL-6. Die weißen Balken in den jeweiligen Grafiken haben während der osteogenen Differenzierungsphase von 14 Tagen keine Nachbehandlung mit Myokinen bekommen. Die gefärbten Balken wurden während der osteogenen Differenzierung mit dem jeweiligen Myokin nachbehandelt. Nachbehandlung mit FGF-2 (2 ng/ml) als Rohdaten und normiert (A-B), Nachbehandlung mit Interleukin-6 (IL-6, 6 U/ml) als Rohdaten und normiert (C-D), Nachbehandlung mit Interleukin-1 β (IL-1 β , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (E-F), Nachbehandlung mit Tumornekrosefaktor- α (TNF α , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (G-H) und Interferon- γ (IFN- γ , 31,25 U/ml) als Rohdaten und normiert (I-J). Die Darstellung erfolgte zur besseren Visualisierung im Boxplot Diagramm (A-J) und für die separate Darstellung der zwei Spender/Spenderinnen mit IFN- γ (3,125 U/ml) Nachbehandlung klassisch als Säulendiagramm (K-L). Im separaten Versuch mit Myostatin (M-N) gab es keine Vorstimulationsgruppen, die Spender/Spenderinnen ($n=4$) wurden über 14 Tage im OIM mit Myostatin (50 ng/ml) bzw. als Kontrolle nur mit OIM behandelt. Es erfolgte eine Darstellung als Rohdaten (M) und normiert auf die Kontrolle in Prozent (N).

3.3.4 Quotient aus Mineralisierung und Zellzahl

Der Quotient aus den Werten der Mineralisierung und der Zellzahl bei dem osteogenem Differenzierungsversuch mit Myokinen wird in der folgenden *Abbildung 13* betrachtet.

Die Mineralisierung normiert auf die Zellzahl führte unter FGF-2 Nachbehandlung ohne vorheriger Vorstimulation zu einem geringeren Wert der auf die Zellzahl normierten Mineralisierung um ca. 14 % im Vergleich zur Kontrolle (A-B). Bei einer IL-6 Vorstimulation ohne darauffolgende Nachbehandlung kam es zu einem hohen Werten der normierten Mineralisierung, um ca. 400 % größer als die Kontrolle. Wurde mit IL-6 vorstimuliert und danach mit FGF-2 über 14 Tage nachbehandelt, so war hier der Wert der Mineralisierung um ca. 410 % kleiner als die Gruppe, welche nur mit IL-6 vorstimuliert wurde (A-B). Eine FGF-2 Vorstimulation ohne weitere Nachbehandlung führte zu einem signifikanten kleineren Wert der normierten Mineralisierung um 52 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die FGF-2 Vorstimulation mit weiterer FGF-2 Nachbehandlung zu einem nicht signifikanten kleineren Wert um ca. 3 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorstimuliert wurde (A-B). Dies zeigte den Effekt der Betrachtung des Quotienten, so kam es in *Abbildung 11* zu einem Anstieg der Mineralisierung unter FGF-2 Nachbehandlung, welches die Zellzahl erhöht und dadurch zu einer erhöhten Mineralisierung führt.

Die IL-6 Nachbehandlung über 14 Tage führte ohne Vorstimulation zu einem gesteigerten Wert der normierten Mineralisierung um ca. 77 % (C-D). Ebenso war der Wert einer IL-6 Nachbehandlung ohne Vorstimulation signifikant um über 115 % höher als des Wertes der Mineralisierung bei der Gruppe mit FGF-2 Vorstimulation und IL-6 Nachbehandlung (C-D). Bei FGF-2 Vorstimulation und folgender IL-6 Nachbehandlung zeigte sich erneut der auf die normierte

Mineralisierung wirkende Effekt des FGF-2, indem der Wert der Mineralisierung signifikant um ca. 140 % kleiner ist im Vergleich zur Gruppe, welche mit IL-6 vorbehandelt und nachbehandelt wurde (C-D). Dabei kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der normierten Mineralisierung um ca. 13 % bei FGF-2 Vorbehandlung mit IL-6 Nachbehandlung im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde.

Eine IL-1 β Nachbehandlung ohne Vorstimulation führte zu einer nicht signifikanten Erhöhung des Wertes der normierten Mineralisierung um ca. 45 % (E-F). Eine IL-6 Vorstimulation mit folgender IL-1 β Nachbehandlung führt zu nahezu keiner Veränderung im Mineralisierungsverhalten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (E-F). Der Wert ist im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit IL-6 vorstimuliert wurde, um 400 % kleiner (E-F). Wurde mit FGF-2 vorstimuliert und danach mit IL-1 β nachbehandelt, so kam es erneut zu einem geringeren erhöhten Wert der Mineralisierung, hier nicht signifikant um ca. 16 % größer als die Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde. (E-F).

Eine TNF α Nachbehandlung ohne Vorstimulation führte zu einer Erhöhung des Wertes der normierten Mineralisierung um ca. 188 % (G-H). Auch die TNF α Nachbehandlung mit IL-6 Vorstimulation führte zu einem nicht signifikanten höheren Wert der Mineralisierung um ca. 211 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (G-H). Es kam aber zu einem um ca. 190 % kleineren Wert unter IL-6 Vorstimulation und TNF α Nachbehandlung im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit IL-6 vorstimuliert wurde. Wenn vorher mit FGF-2 vorstimuliert wurde und mit TNF α nachbehandelt wurde, so kam es zu einem signifikant erhöhten Wert der Mineralisierung um ca. 90 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde (G-H).

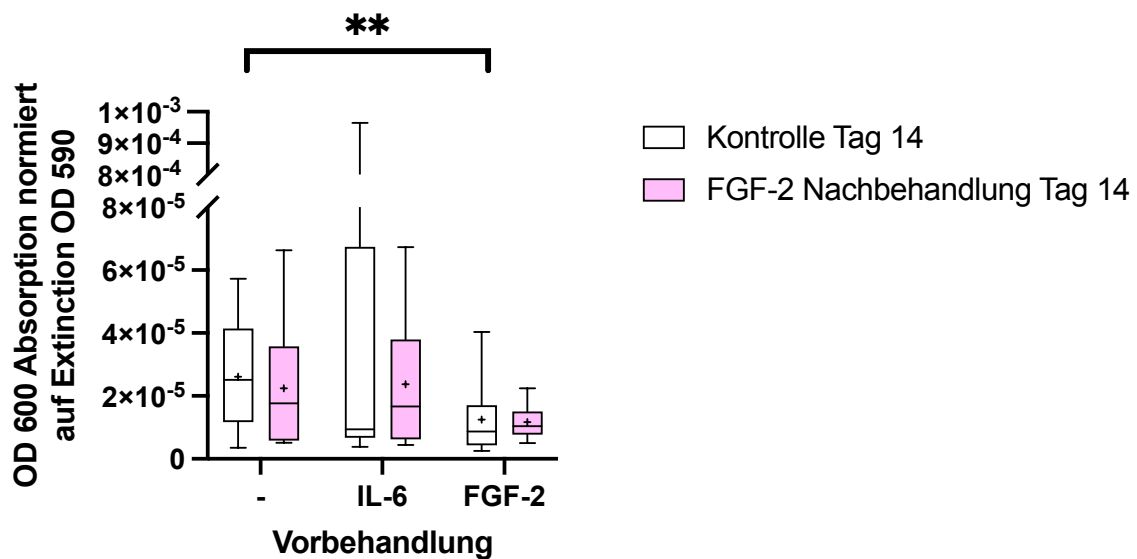
Unter einer IFN- γ Nachbehandlung ohne Vorstimulation kam es zu massiven signifikanten hohen Werten der normierten Mineralisierung, um ca. 461 % höher als die unbehandelte Kontrolle (I-J). Eine IL-6 Vorstimulation mit IFN- γ Nachbehandlung führte zu kleineren Werten der Mineralisierung, um ca. 100 % kleiner als die Gruppe, welche nur mit IL-6 behandelt wurde. Es kam bei FGF-2 Vorstimulation und IFN- γ Nachbehandlung zu einer signifikanten Erhöhung des Wertes der Mineralisierung um ca. 198 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorstimuliert wurde. Hier war zu erkennen, dass es erneut in Kombination mit FGF-2 zu dem geringsten Wert der normierten Mineralisierung kam (im Vergleich zwischen den Gruppen der Vorstimulation und Kontrolle). Diese Effekte durch die IFN- γ Nachbehandlung ließen sich dadurch herleiten, indem IFN- γ in dieser Dosis (31,125 U/ml) zu einer Abnahme der Zellzahl (siehe *Abbildung 10*) führte, aber die Mineralisierung auf einem hohen Niveau gehalten hat (siehe *Abbildung 11*).

Eine IFN- γ Nachbehandlung in geringerer Dosis (3,125 U/ml) führte zu einem erhöhten Werten der normierten Mineralisierung ohne Vorstimulation, um fast das Dreifache der Kontrolle (K-L). IL-6 Vorstimulation und FGF-2 Vorstimulation ohne folgende Nachbehandlung führten hier beide zu geringeren Werten der normierten Mineralisierung im Vergleich zur Kontrolle. Die IFN- γ Nachbehandlung

in dieser geringeren Dosis führte unabhängig der Vorstimulation zu einer geringeren Werten der normierten Mineralisierung, um ca. 62 % kleiner als die Kontrolle (K-L). Eine Myostatin Behandlung führte zu einer geringeren Werten der normierten Mineralisierung, diese waren um ca. 44 % kleiner als die Kontrolle (M-N).

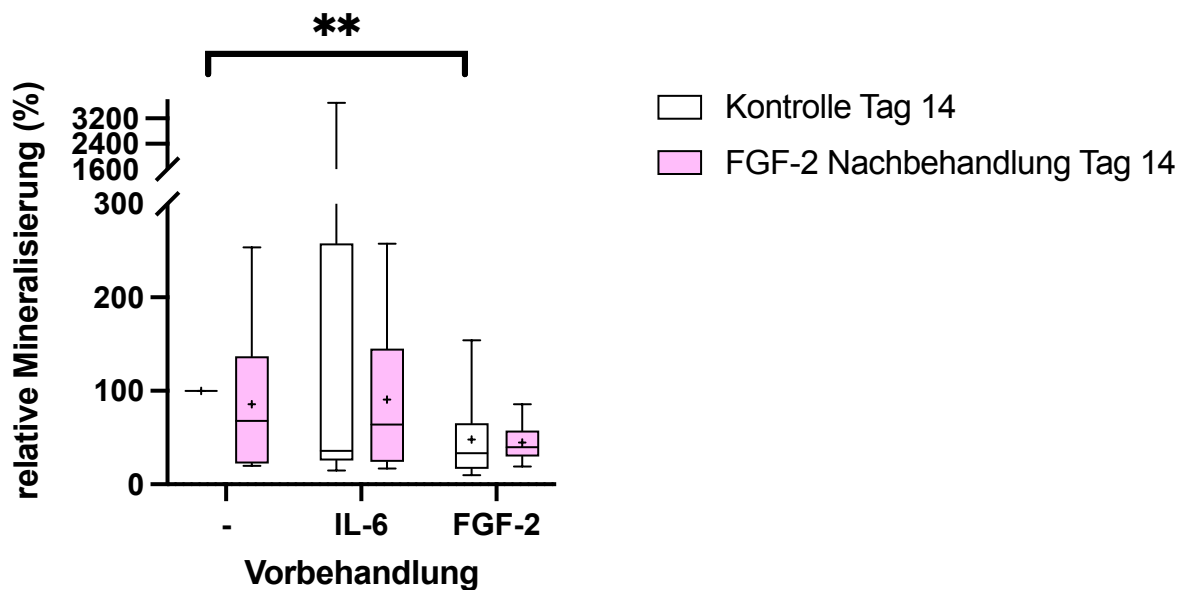
A

FGF-2 AR/CTB (Rohdaten)
n=9

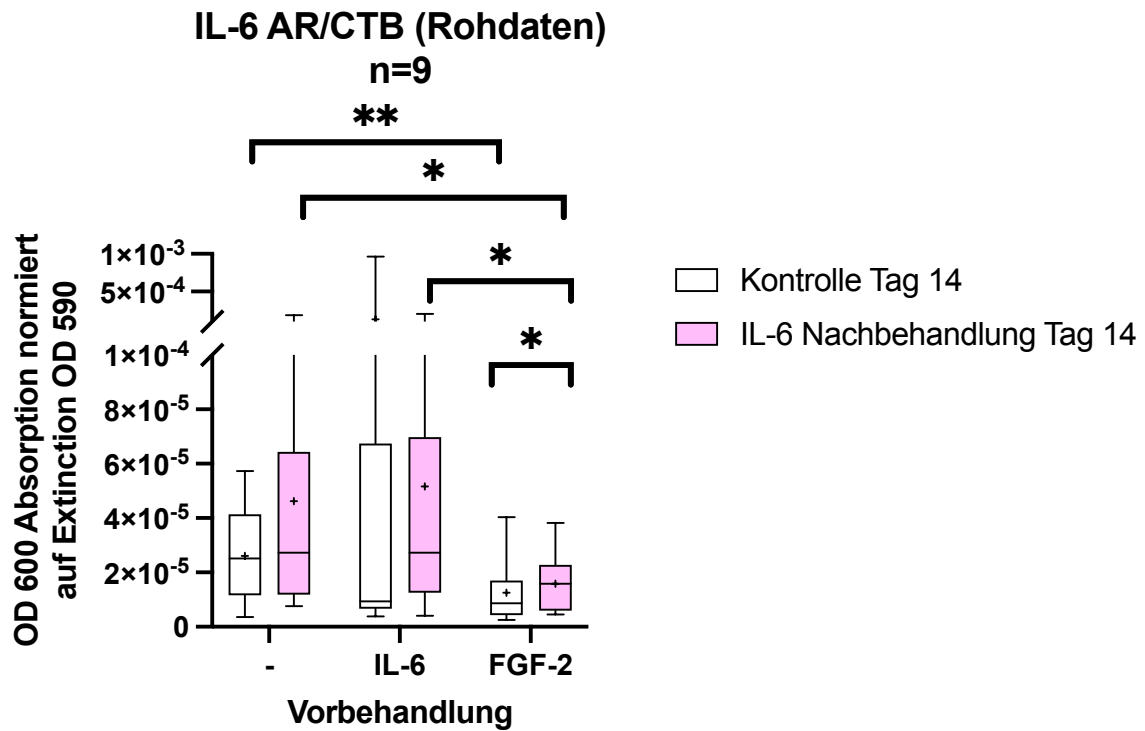


B

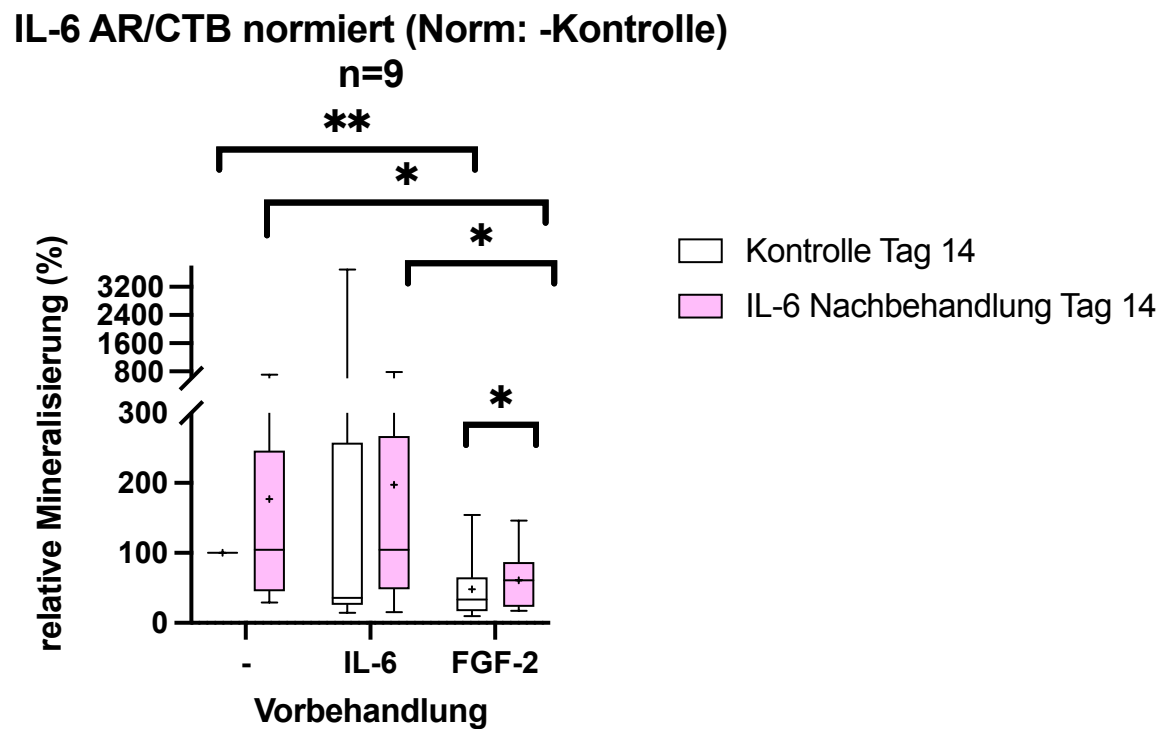
FGF-2 AR/CTB normiert (Norm: -Kontrolle)
n=9



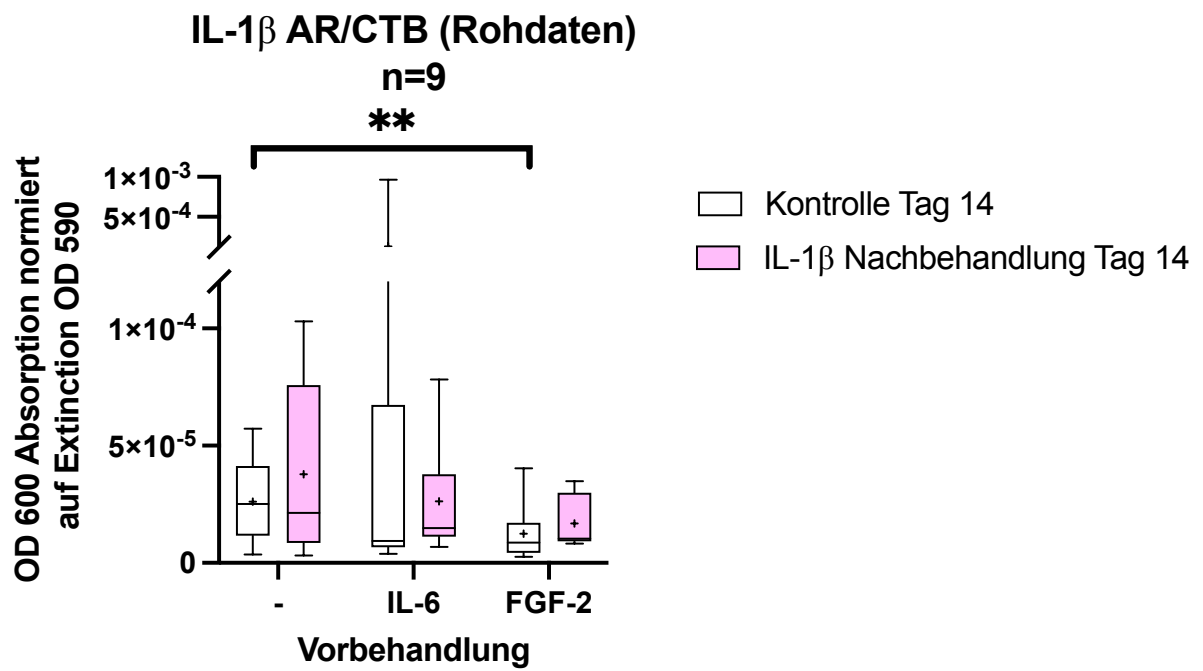
C



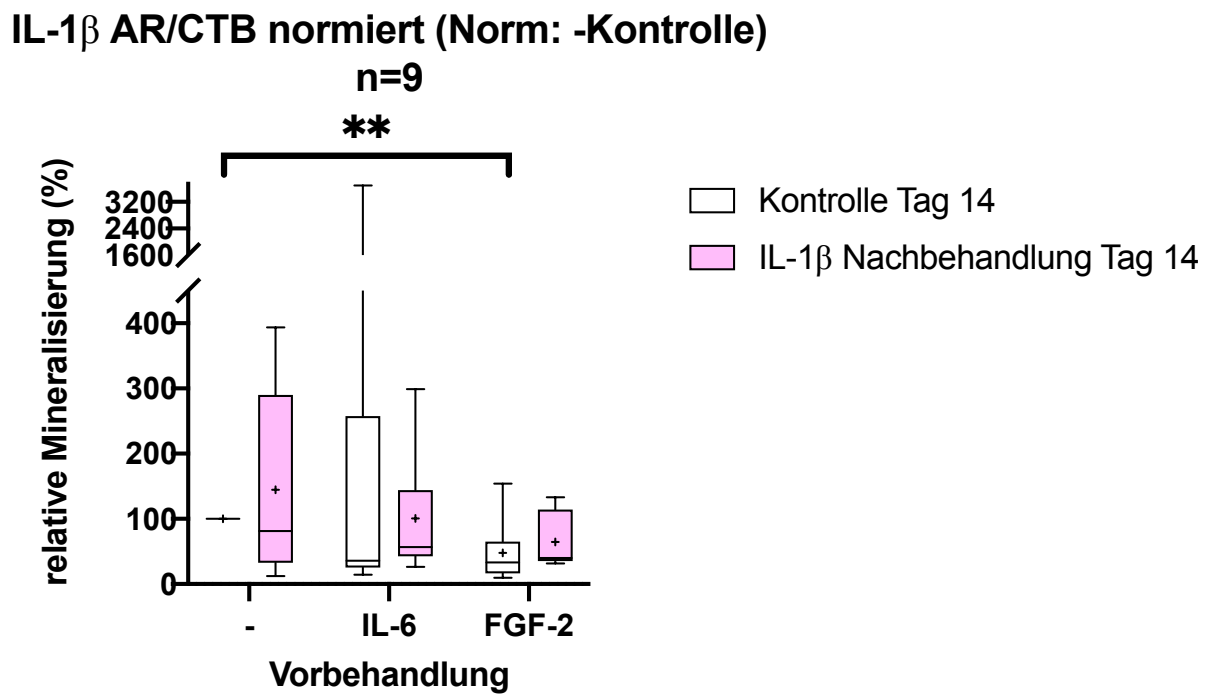
D



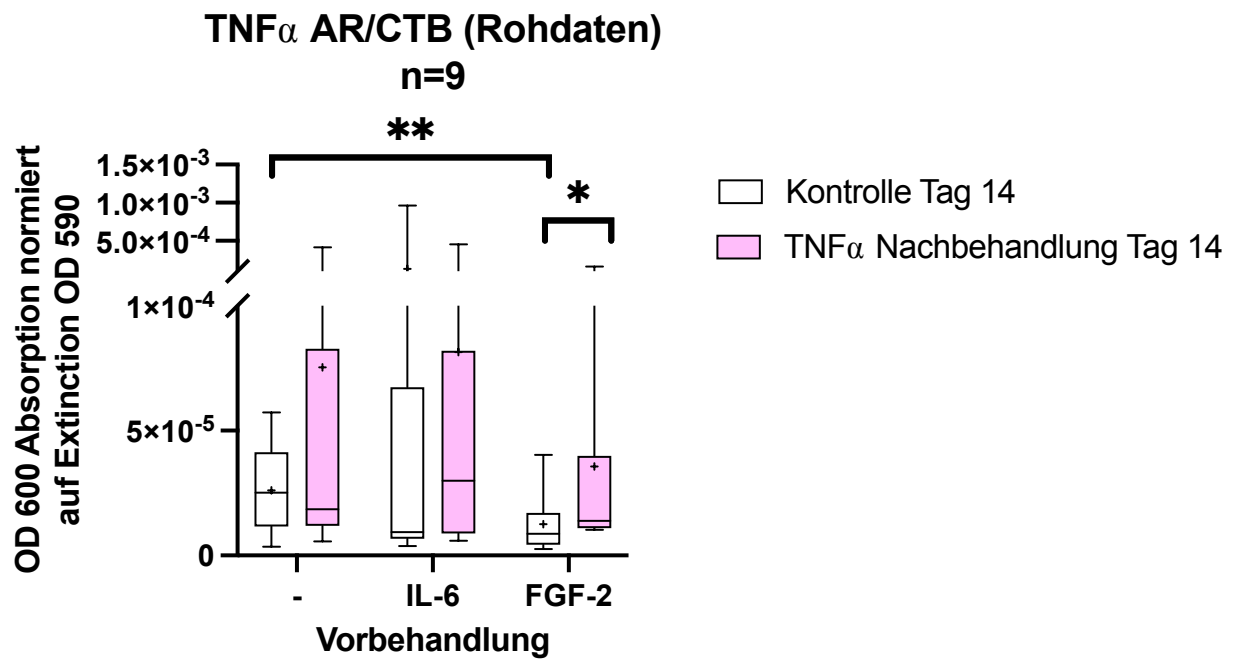
E



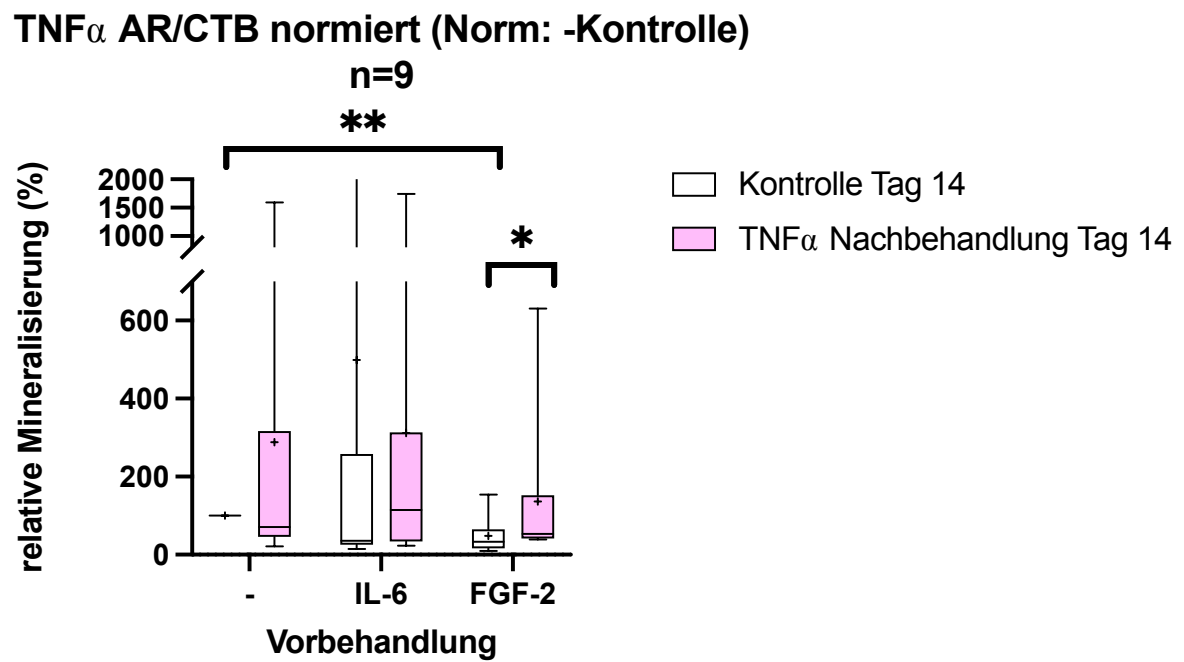
F



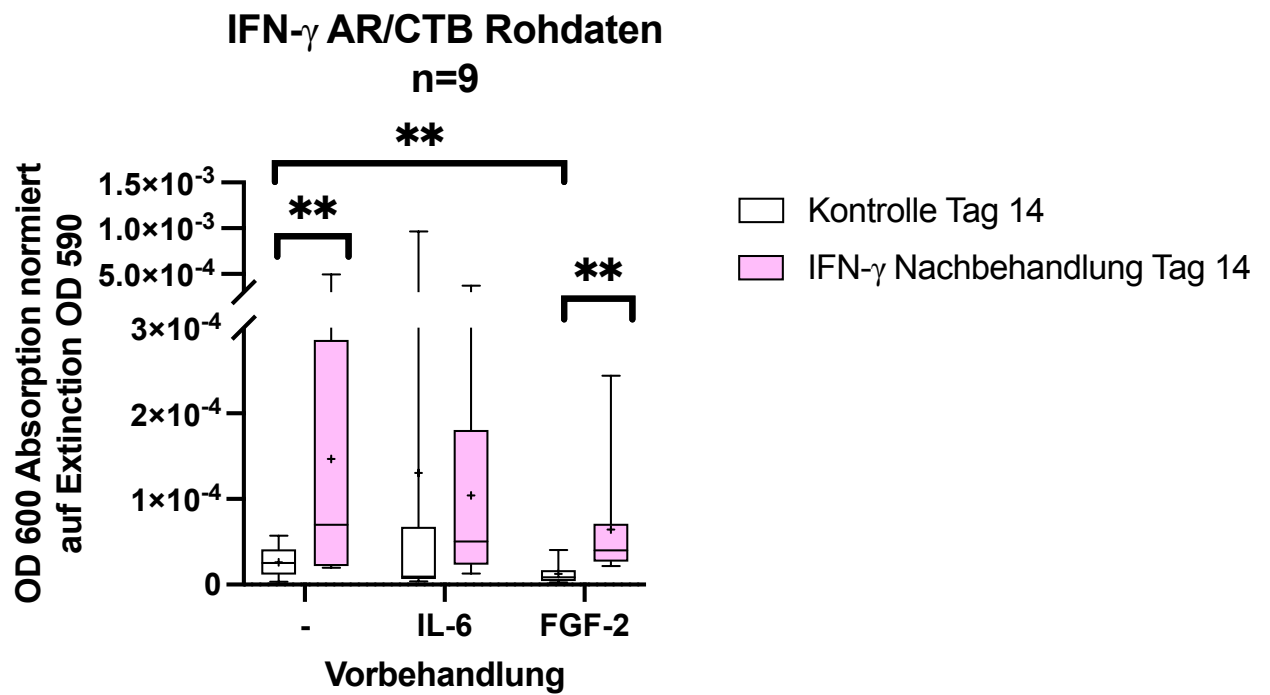
G



H

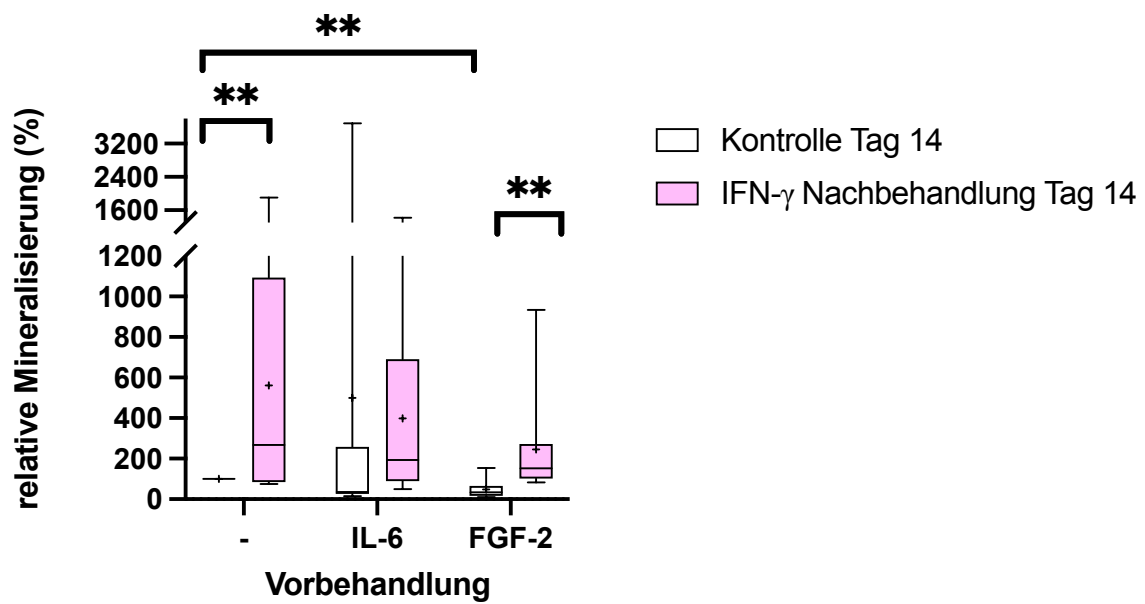


I



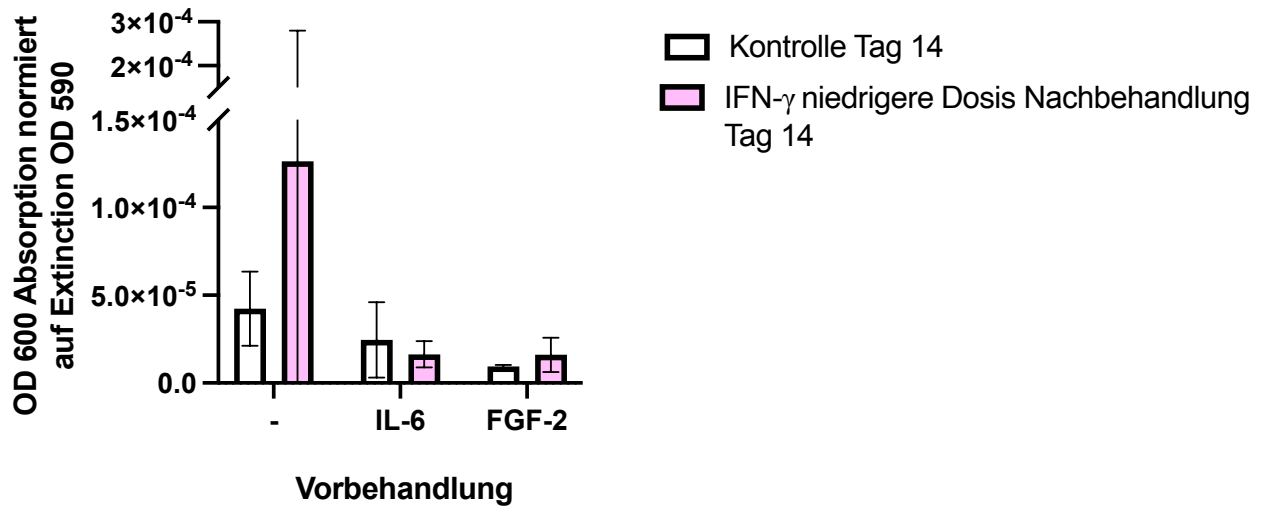
J

IFN- γ AR/CTB normiert (Norm: -Kontrolle)
n=9



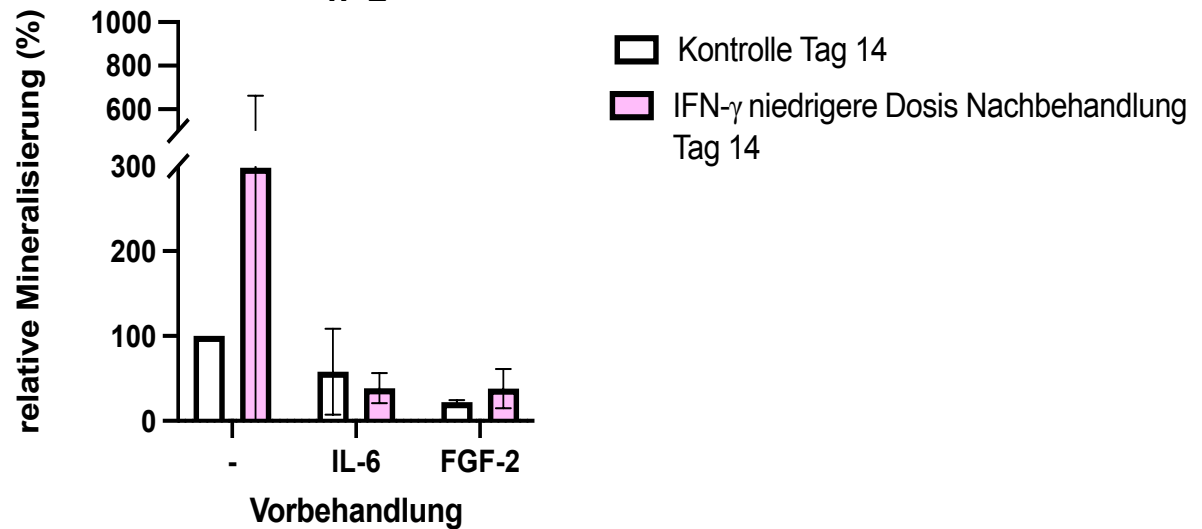
K

**IFN- γ niedrigere Dosis AR/CTB Rohdaten
n=2**

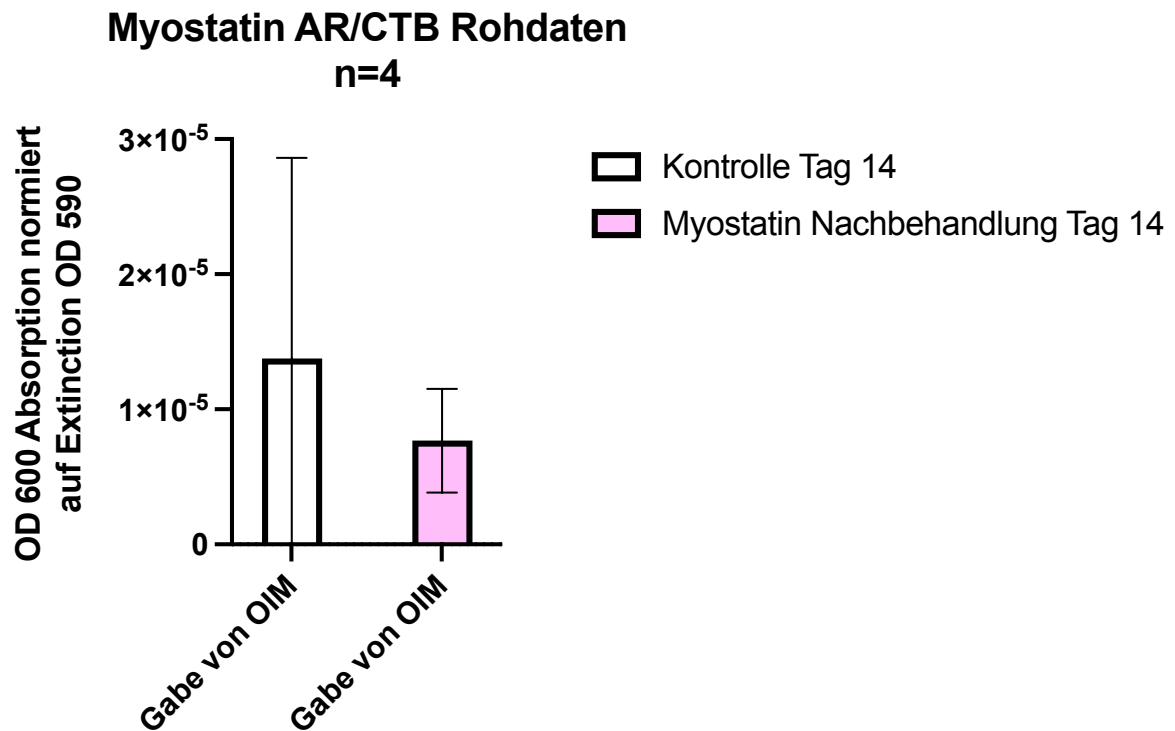


L

**IFN- γ AR/CTB niedrigere Dosis normiert (Norm: -Kontrolle)
n=2**



M



N

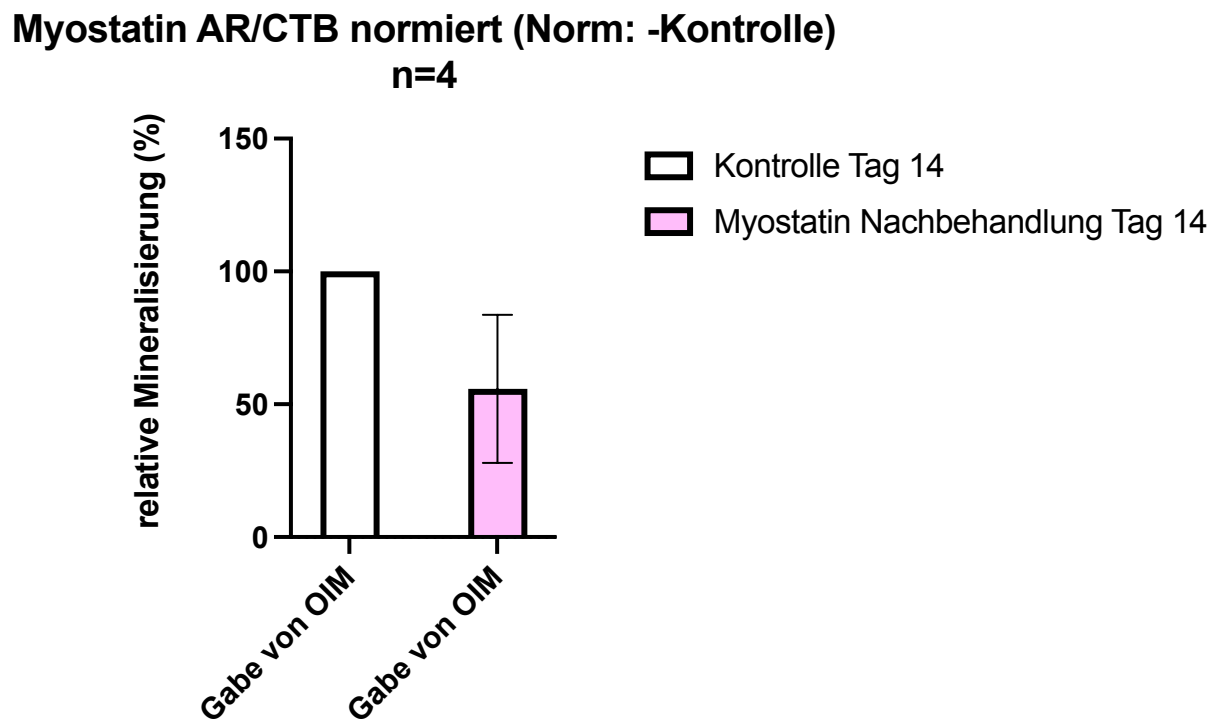


Abbildung 13: Darstellung des Quotienten aus den absoluten Werten der Mineralisierung dividiert durch die absoluten Werte der Zellzahl. Dargestellt als Rohdaten und normiert auf die Kontrolle in Prozent. Die Kontrolle wurde 10 Tage ohne Myokiningabe in DMEM behandelt und danach 14 Tage mit OIM ebenfalls ohne Myokiningabe nachbehandelt (A-J) (*= Signifikanz [$p < 0,05$], **= Signifikanz [$p < 0,01$]; $n = 10$). Nach dem gleichen Schema wurden die zwei Spender/Spenderinnen

in der separaten Darstellung behandelt (K-L). Die drei auf der X-Achse beschrifteten Gruppen der Grafiken (A-L) beziehen sich auf die Vorstimulation, (-) bezieht sich auf die Gruppe ohne Myokin-Vorstimulation, (FGF-2) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit FGF-2 und (IL-6) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit IL-6. Die weißen Balken in den jeweiligen Grafiken haben während der osteogenen Differenzierungsphase von 14 Tagen keine Nachbehandlung mit Myokinen bekommen. Die gefärbten Balken wurden während der osteogenen Differenzierung mit dem jeweiligen Myokin nachbehandelt. Nachbehandlung mit FGF-2 (2 ng/ml) als Rohdaten und normiert (A-B), Nachbehandlung mit Interleukin-6 (IL-6, 6 U/ml) als Rohdaten und normiert (C-D), Nachbehandlung mit Interleukin-1 β (IL-1 β , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (E-F), Nachbehandlung mit Tumornekrosefaktor- α (TNF α , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (G-H) und Interferon- γ (IFN- γ , 31,25 U/ml) als Rohdaten und normiert (I-J). Die Darstellung erfolgte zur besseren Visualisierung im Boxplot Diagramm (A-J) und für die separate Darstellung der zwei Spender/Spenderinnen mit IFN- γ (3,125 U/ml) Nachbehandlung klassisch als Säulendiagramm (K-L). Im separaten Versuch mit Myostatin (M-N) gab es keine Vorstimulationsgruppen, die Spender/Spenderinnen (n=4) wurden über 14 Tage im OIM mit Myostatin (50 ng/ml) bzw. als Kontrolle nur mit OIM behandelt. Es erfolgte eine Darstellung als Rohdaten (M) und normiert auf die Kontrolle in Prozent (N).

3.3.5 Quotient aus ALP-Aktivität und Zellzahl

Ähnliche Auswirkungen wie in *Abbildung 13* unter FGF-2 Nachbehandlung sind auch bei den Werten der auf die Zellzahl normierten ALP- Aktivität zu sehen (A-B). So kam es bei FGF-2 Nachbehandlung ohne Vorstimulation zu einer geringfügigen höheren Werten um ca. 8 % im Vergleich zur Kontrolle. Eine IL-6 Vorstimulation ohne Nachbehandlung führte zu einer Erhöhung um ca. 25 %. Es kam zu einer signifikanten geringeren Werten der normierten ALP-Aktivität unter FGF-2 Vorstimulation, ohne Nachbehandlung, um ca. 57 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Wurde mit FGF-2 vorstimuliert und zusätzlich auch mit FGF-2 nachbehandelt, so kam es zu einer Abnahme um ca. 6 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorstimuliert wurde (A-B). Die Werte der Gruppe, die nicht vorstimuliert und mit FGF-2 nachbehandelt wurden, waren signifikant um ca. 72 % größer als die Werte der Gruppe, welche mit FGF-2 vorstimuliert und nachbehandelt wurde. Ebenfalls waren die Werte unter IL-6 Vorstimulation und FGF-2 Nachbehandlung um ca. 50 % signifikant größer als die Werte unter FGF-2 Vorstimulation und Nachbehandlung.

Eine IL-6 Nachbehandlung ohne Vorstimulation führte zu einem erhöhten Werten der ALP-Aktivität, um ca. 75 % größer als die Kontrolle (C-D). Wurde mit IL-6 vorbehandelt und darauf mit IL-6 nachbehandelt, so kam es zu signifikanten um ca. 166 % erhöhten Werten der normierten ALP-Aktivität im Vergleich zur Gruppe, welche mit FGF-2 vorbehandelt wurde und mit IL-6 nachbehandelt wurde. FGF-2 Vorstimulation mit folgender IL-6 Nachbehandlung führte auch hier zu einem gleichen Effekt wie bei der normierten Mineralisierung, es kam ebenfalls zu geringeren Werten, hier um ca. 128 % signifikant kleiner als die Gruppe, welche nicht vorstimuliert und mit IL-6 nachbehandelt wurde.

Eine IL-1 β Nachbehandlung ohne Vorstimulation führte zu erhöhten Werten der ALP-Aktivität, um ca. 30 % nicht signifikant höher als die Kontrolle. (E-F). Wurde mit IL-6 vorstimuliert und danach mit IL-1 β nachbehandelt, so kam es zu um ca. 8 % kleineren Werten als bei der Gruppe, welche nur mit IL-6 vorstimuliert wurde. Unter

FGF-2 Vorstimulation und IL-1 β Nachbehandlung kam es zu gering erhöhten Werten der normierten ALP-Aktivität, um ca. 6 % größer als die Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorstimuliert wurde.

Eine TNF α Nachbehandlung ohne Vorstimulation führte zu erhöhten Werten der normierten ALP-Aktivität um ca. 163 % als die Kontrolle, unter IL-6 Vorstimulation um ca. 265 % größer als die Gruppe, welche nur mit IL-6 vorstimuliert wurde. Unter FGF-2 Vorstimulation und TNF α Nachbehandlung ist der Wert um ca. 60 % größer als unter der Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde (G-H).

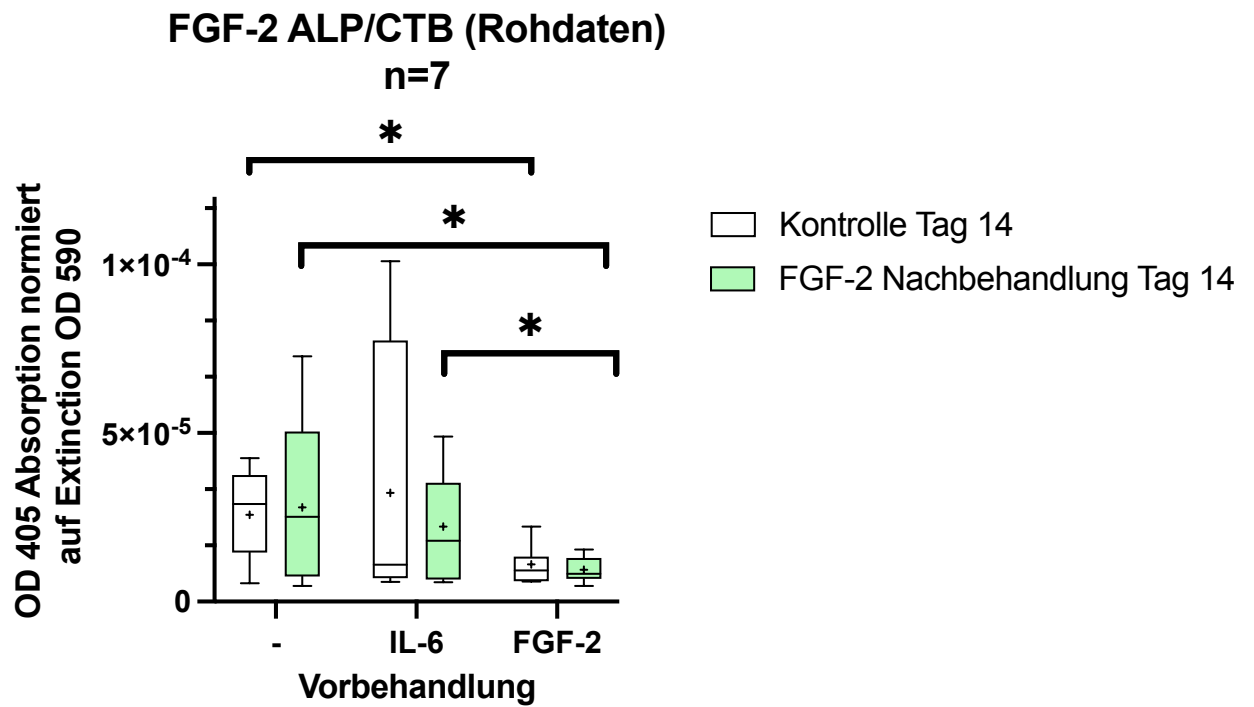
Eine IFN- γ Nachbehandlung ohne Vorstimulation führte zu einem stark erhöhten signifikanten Werten der normierten ALP-Aktivität um ca. 586 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Mit IL-6 Vorstimulation und IFN- γ Nachbehandlung kam es zu signifikant erhöhten Werten um ca. 170 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit IL-6 vorbehandelt wurde. Mit FGF-2 Vorstimulation und IFN- γ Nachbehandlung kam es zu signifikanten erhöhten Werten um ca. 193 % im Vergleich zur Gruppe, welche nur mit FGF-2 vorbehandelt wurde (I-J). Auch hier ließ sich dieser Effekt durch die verringerte Zellzahl bei Erhalt der hohen ALP-Aktivität begründen, wie auch schon bei der normierten Mineralisierung in Kapitel 3.3.4 erklärt.

Eine IFN- γ Nachbehandlung in geringerer Dosis führte ohne Vorstimulation zu einem höheren Werten der normierten ALP-Aktivität, um ca. 185% höher als die Kontrolle (K-L). Stimuliert man mit IL-6 vor und mit IFN- γ in der kleineren Dosis nach, so ist der Wert der normierten ALP-Aktivität um ca. 60 % geringer als die Kontrolle, bei FGF-2 Vorstimulation und IFN- γ Nachbehandlung ist sie um 53 % geringer.

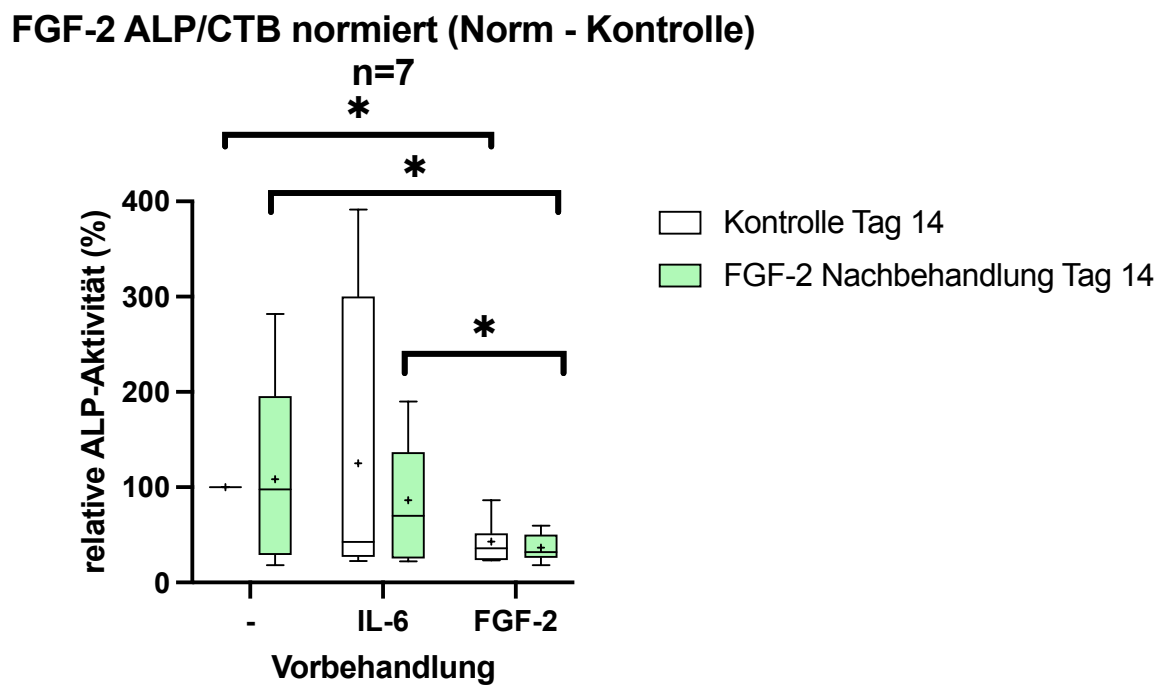
Eine Myostatin Behandlung führte zu einem geringeren Werten der normierten ALP-Aktivität, um ca. 32 % kleiner als die Kontrolle (M-N).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der normierten Mineralisierung und ALP-Aktivität in die gleiche Richtung als Differenzierungsmarker.

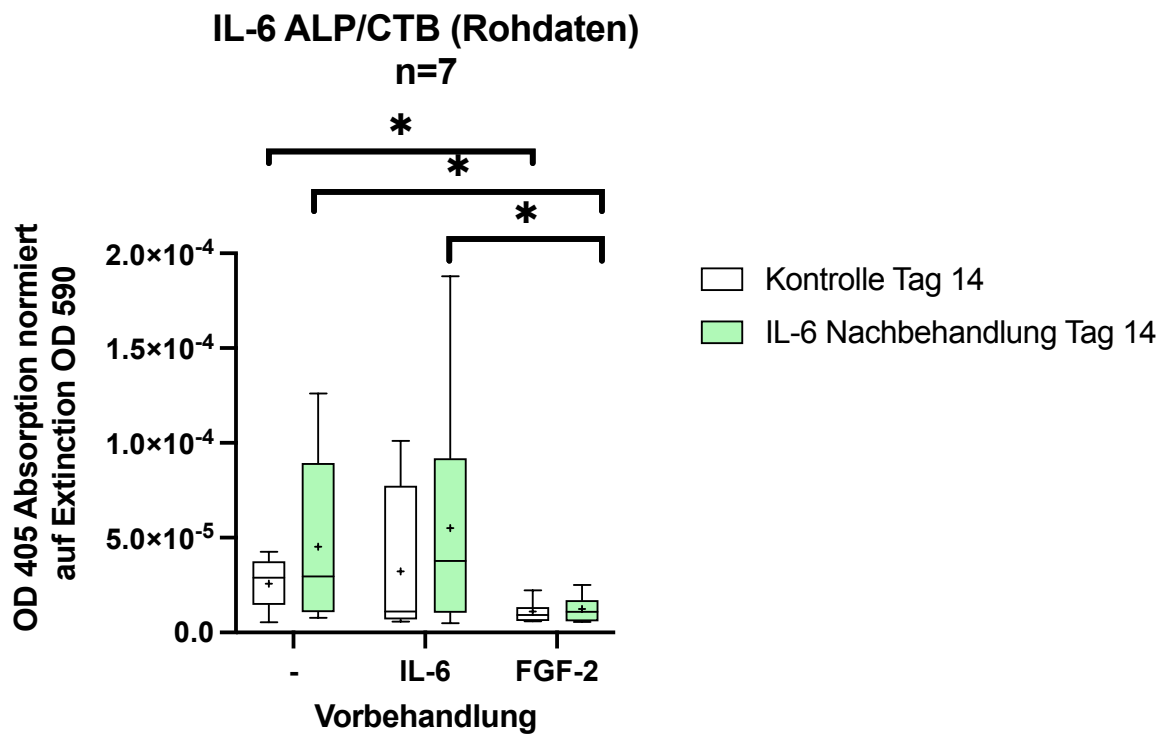
A



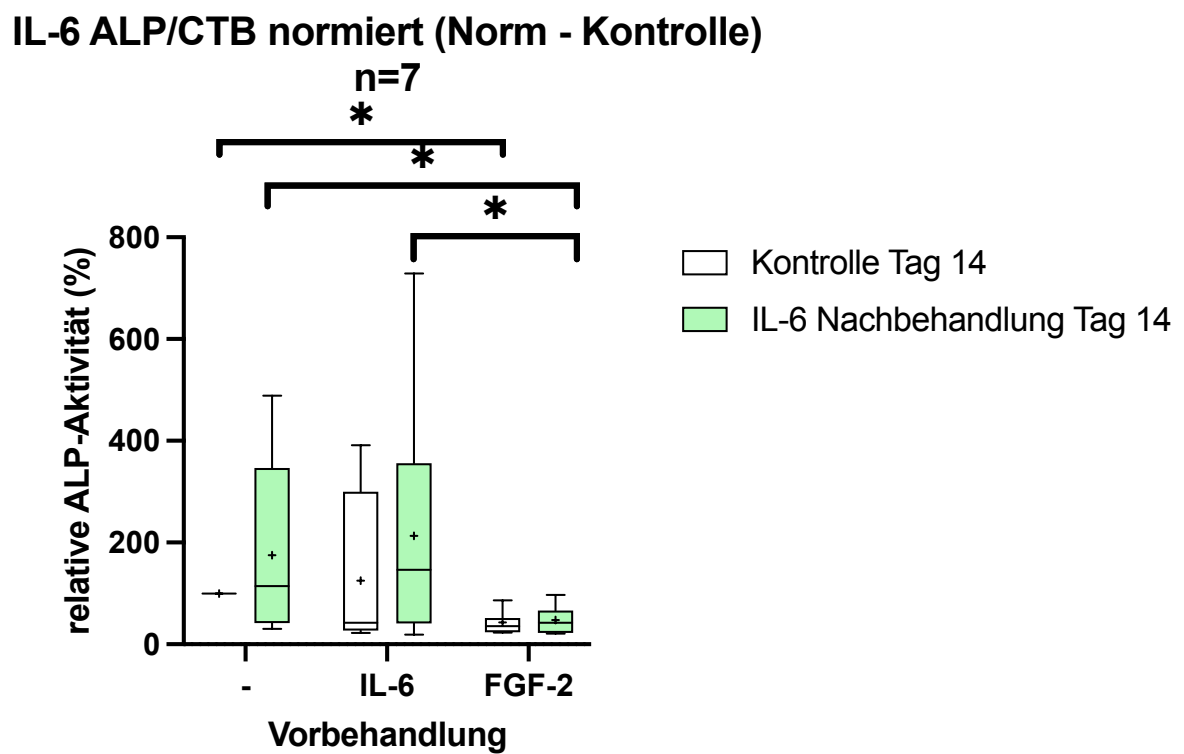
B



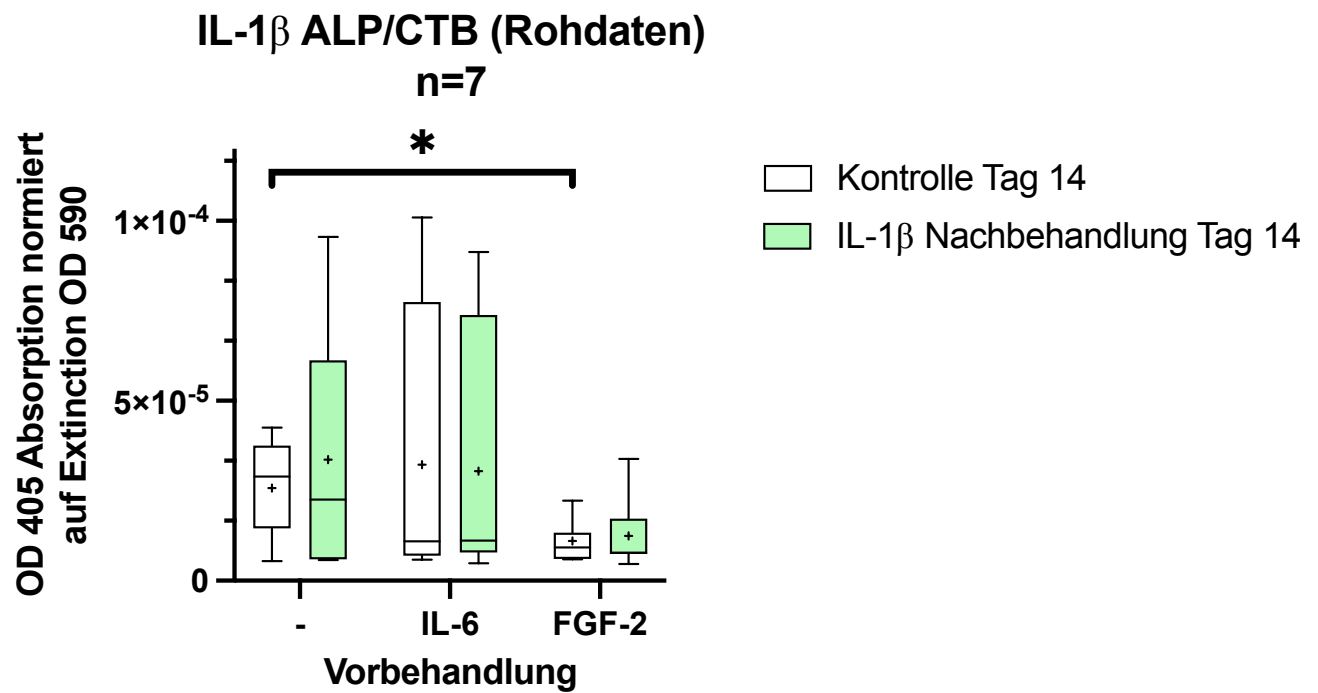
C



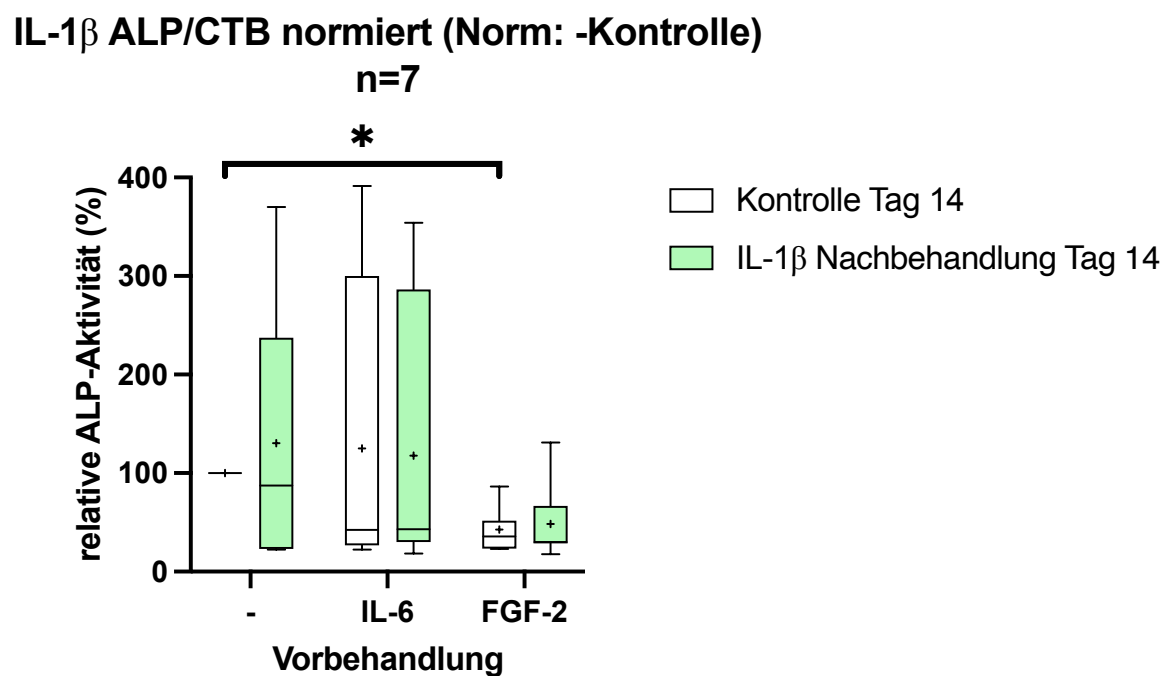
D



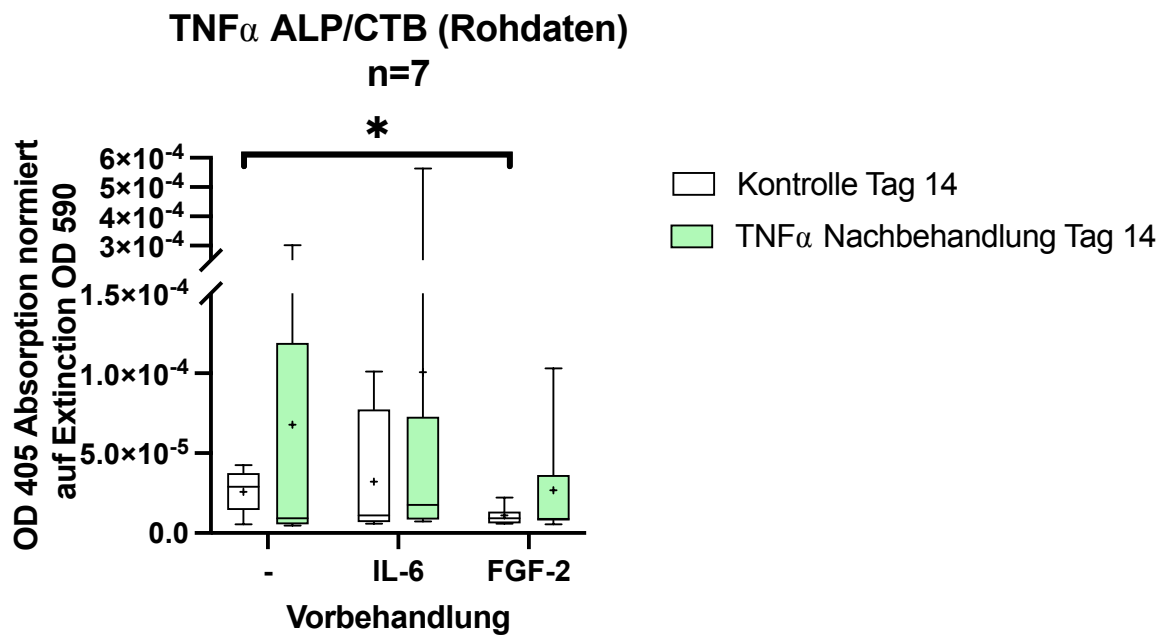
E



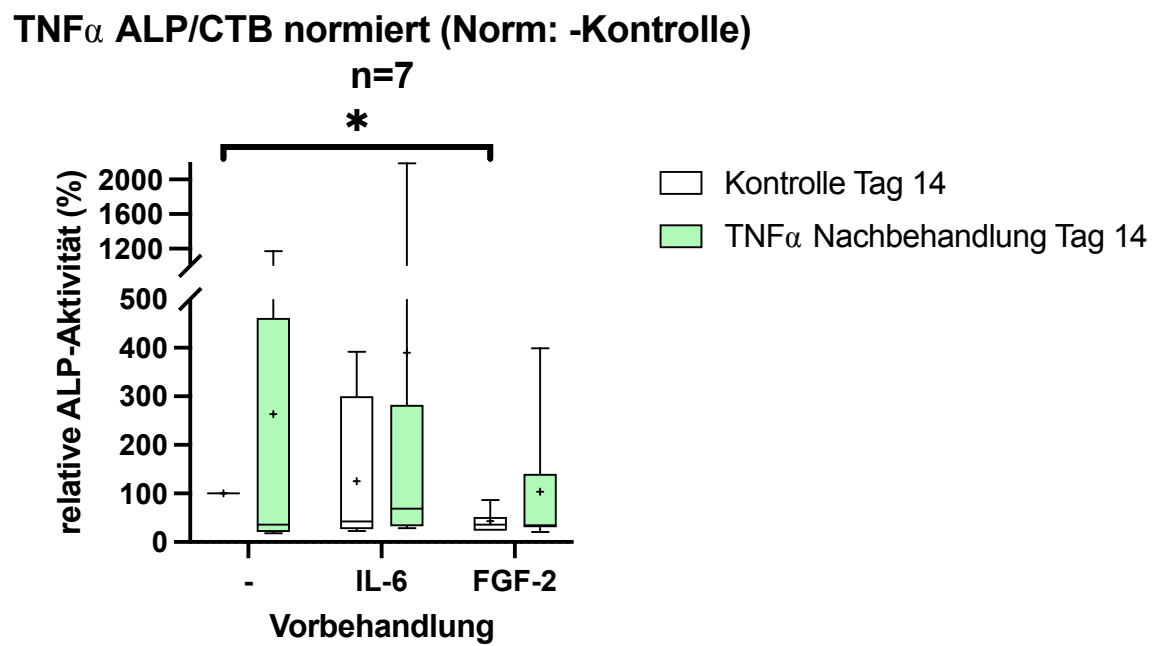
F



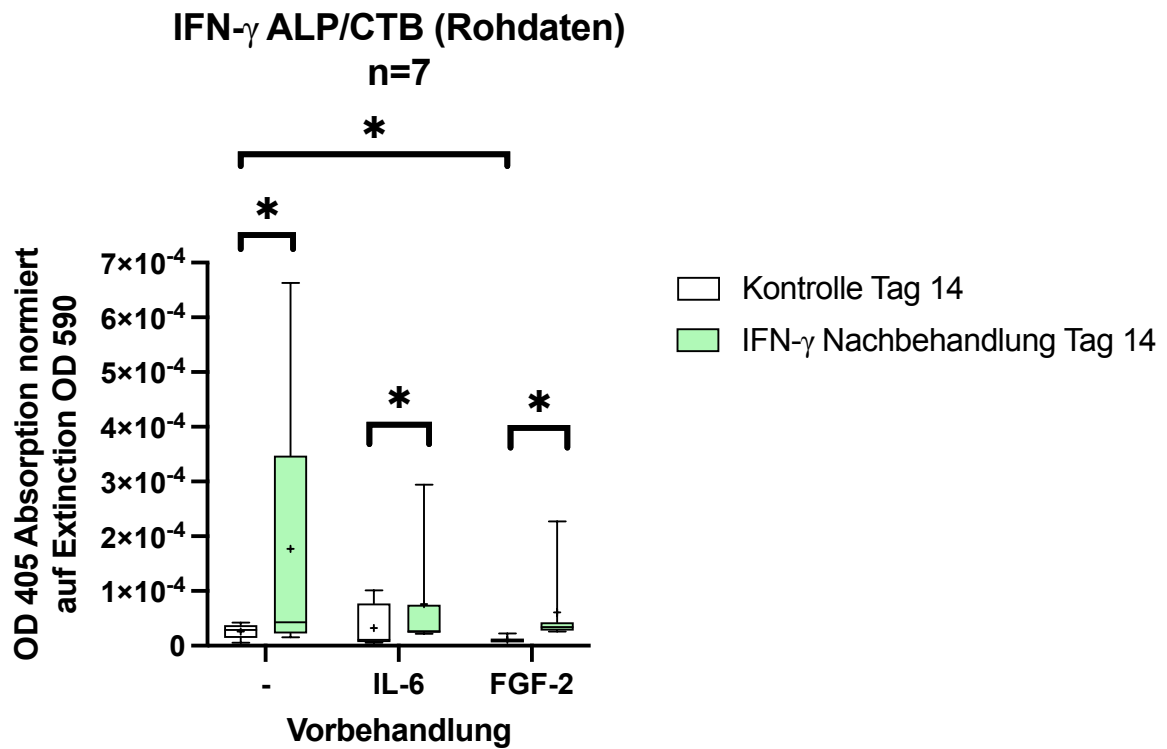
G



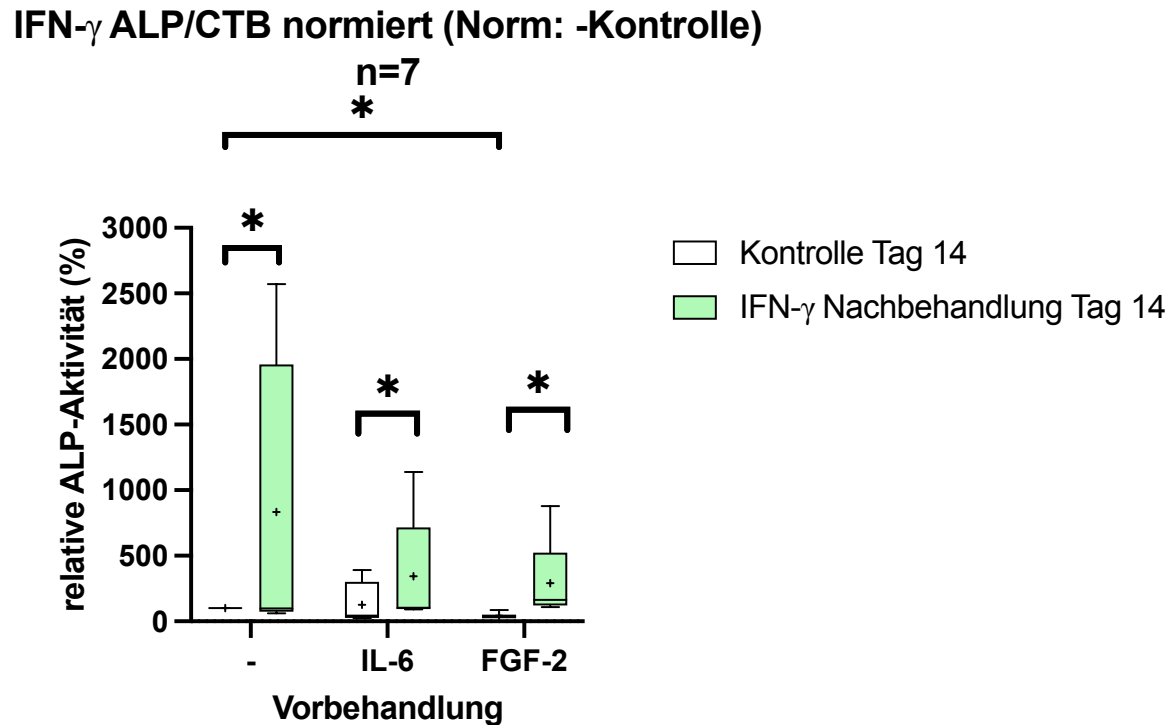
H



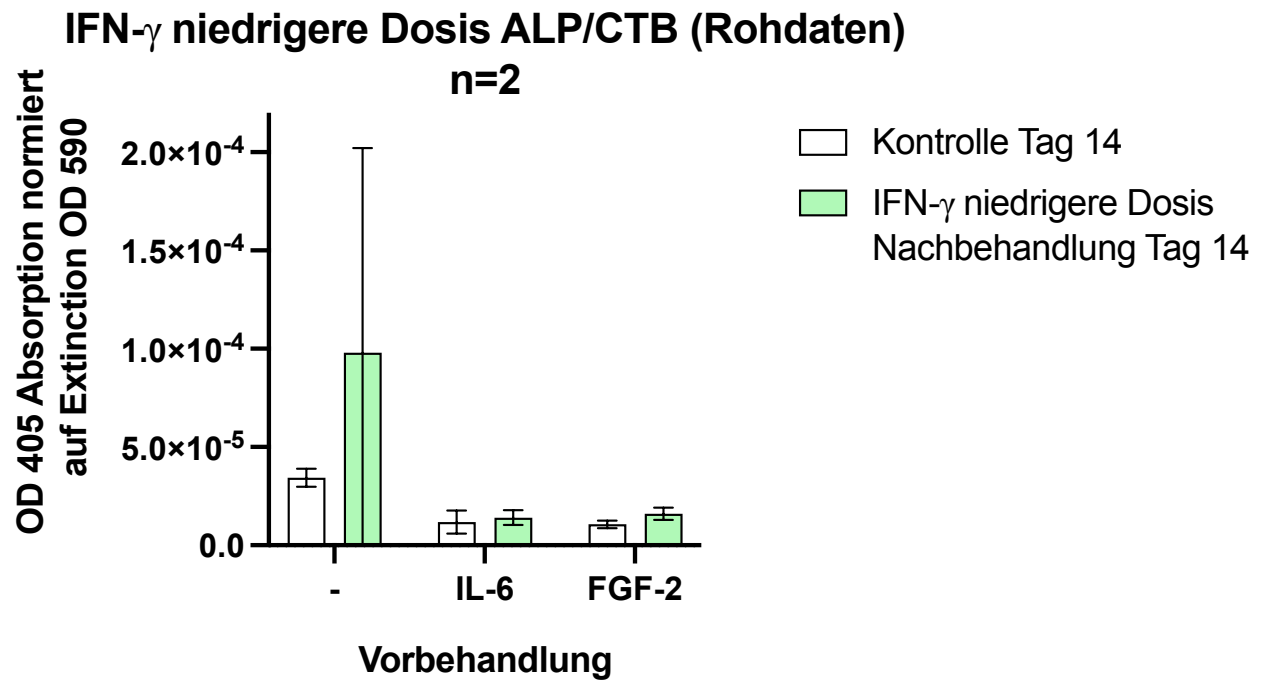
I



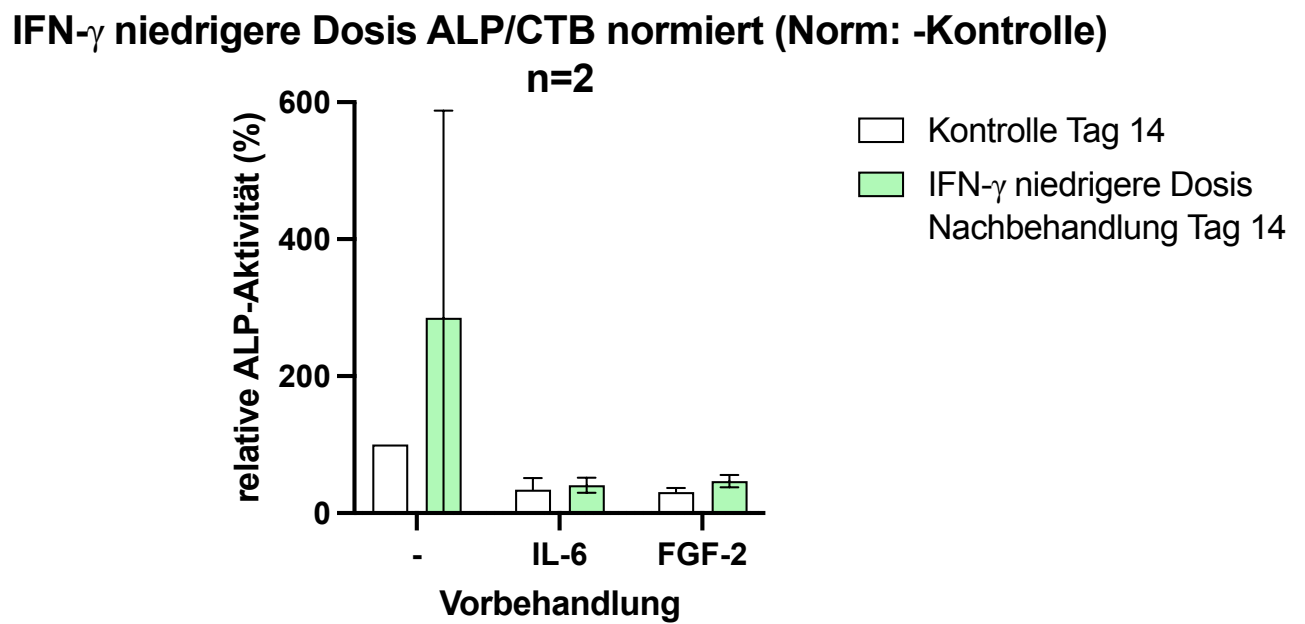
J



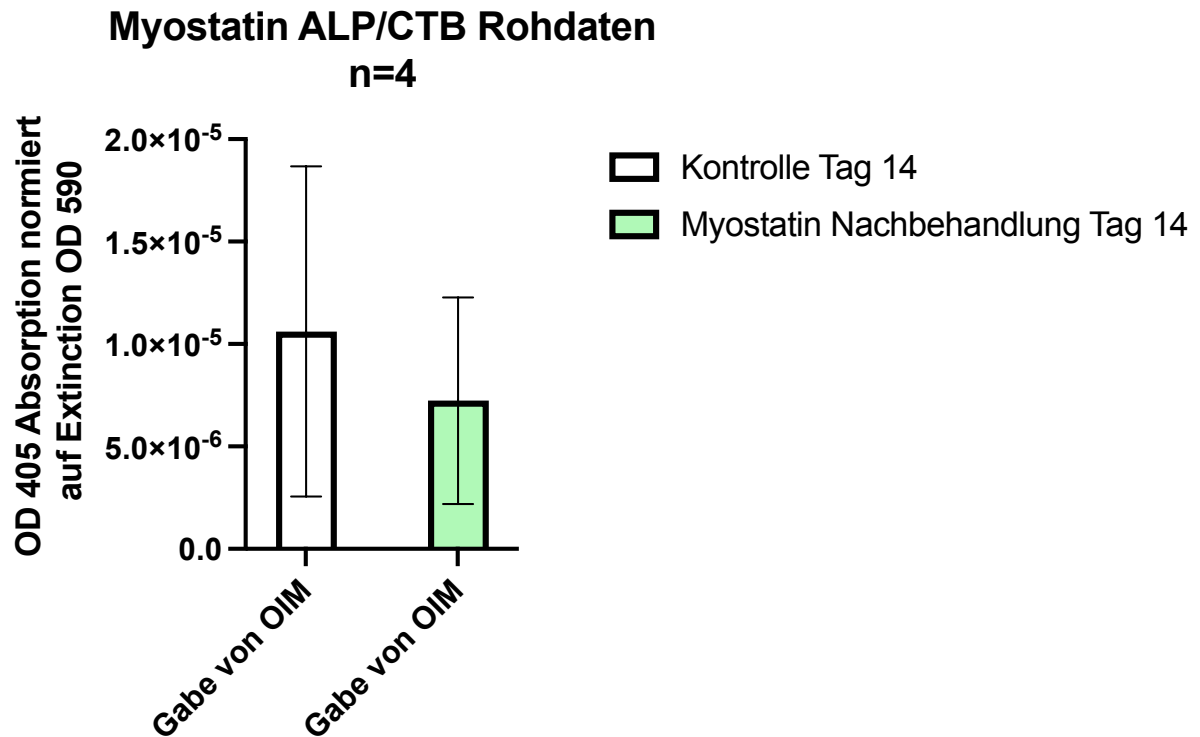
K



L



M



N

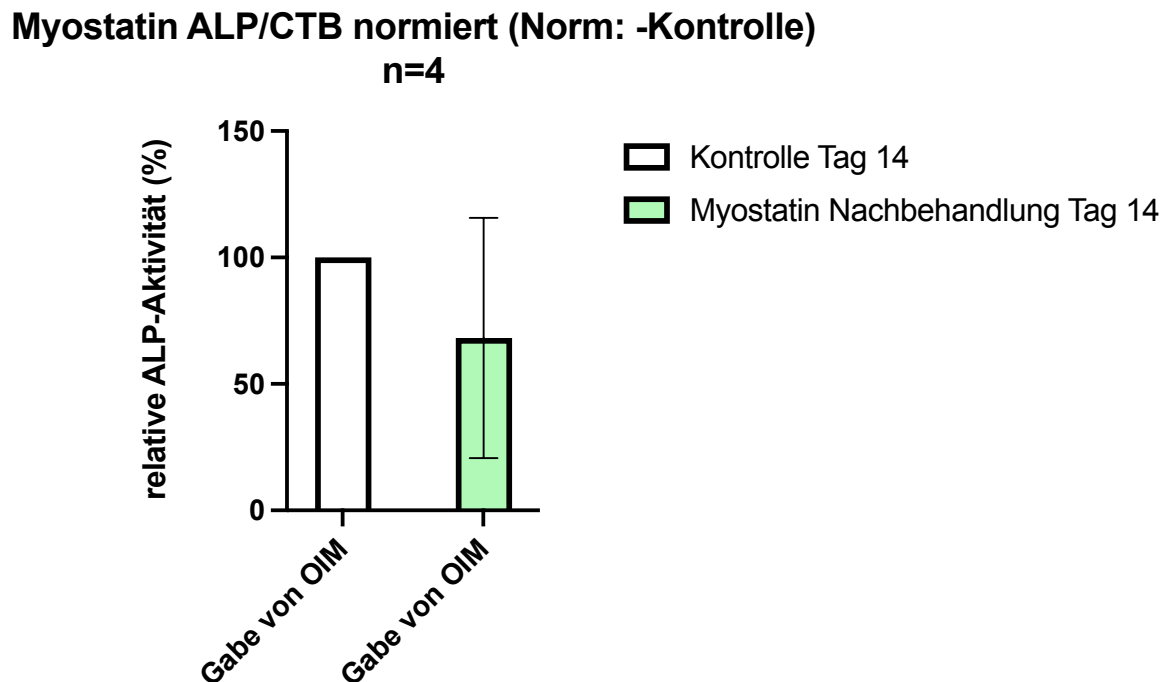


Abbildung 14: Darstellung des Quotienten aus den absoluten Werten der ALP-Aktivität dividiert durch die absoluten Werte der Zellzahl. Dargestellt als Rohdaten und normiert auf die Kontrolle in Prozent. Die Kontrolle wurde 10 Tage ohne Myokingabe in DMEM behandelt und danach 14 Tage mit OIM ebenfalls ohne Myokingabe nachbehandelt (A-J) (*= Signifikanz [$p < 0,05$], **= Signifikanz [$p < 0,01$]; $n=10$). Nach dem gleichen Schema wurden die zwei Spender/Spenderinnen in der separaten Darstellung behandelt (K-L). Die drei auf der X-Achse beschrifteten Gruppen der Grafiken (A-L) beziehen sich auf die Vorstimulation, (-) bezieht sich auf die Gruppe ohne Myokin-Vorstimulation, (FGF-2) auf eine 10-tägige Vorstimulation mit FGF-2 und (IL-6) Auf eine 10-tägige

Vorstimulation mit IL-6. Die weißen Balken in den jeweiligen Grafiken haben während der osteogenen Differenzierungsphase von 14 Tagen keine Nachbehandlung mit Myokinen bekommen. Die gefärbten Balken wurden während der osteogenen Differenzierung mit dem jeweiligen Myokin nachbehandelt. Nachbehandlung mit FGF-2 (2 ng/ml) als Rohdaten und normiert (A-B), Nachbehandlung mit Interleukin-6 (IL-6, 6 U/ml) als Rohdaten und normiert (C-D), Nachbehandlung mit Interleukin-1 β (IL-1 β , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (E-F), Nachbehandlung mit Tumornekrosefaktor- α (TNF α , 100 U/ml) als Rohdaten und normiert (G-H) und Interferon- γ (IFN γ , 31,25 U/ml) als Rohdaten und normiert (I-J). Die Darstellung erfolgte zur besseren Visualisierung im Boxplot Diagramm (A-J) und für die separate Darstellung der zwei Spender/Spenderinnen mit IFN- γ (3,125 U/ml) Nachbehandlung klassisch als Säulendiagramm (K-L). Im separaten Versuch mit Myostatin (M-N) gab es keine Vorstimulationsgruppen, die Spender/Spenderinnen (n=4) wurden über 14 Tage im OIM mit Myostatin (50 ng/ml) bzw. als Kontrolle nur mit OIM behandelt. Es erfolgte eine Darstellung als Rohdaten (M) und normiert auf die Kontrolle in Prozent (N).

4 Diskussion und Schlussfolgerung

4.1 Myokine und deren Einfluss auf die osteogene Differenzierung

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass Myokine einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von hBMSCs haben und dies konzentrationsabhängig sowohl steigern als auch reduzieren. Myokine können schon in einem akuten Entzündungsmilieu vor einer osteogenen Differenzierung die Zellen längerfristig konditionieren. Ebenfalls beeinflussen sie während der osteogenen Differenzierung die Zellen in Bezug auf Zellzahl und Differenzierungsverhalten, somit im übertragenen Sinne ebenfalls während einer chronischen Entzündung, wie es bei Osteoporose der Fall ist. Zusätzlich wurde dargestellt, dass in Bezug auf hBMSCs ein guter Zeitpunkt zur Messung der Differenzierungsparameter ALP-Aktivität und Mineralisierung ab dem 14 Tag nach Gabe von OIM ist. Eine weitere Erkenntnis bietet auch ein methodischer Aspekt, nämlich das Wachstumsverhalten von Zellen bei der Messung von Differenzierungsparametern mitzuberücksichtigen. Dies dient als Ansatz zur Unterscheidung, ob Veränderung bei der Messung von Differenzierungsparametern durch eine direkte Wirkung der Myokine auf die Differenzierung oder indirekt durch wachstumsfördernde bzw. hemmende Effekte hervorgerufen werden.

4.2 Die Wirkung des FGF-2 auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung

FGF-2 bewirkte in dieser Arbeit einen positiven Effekt auf den Wert der Zellzahl der hBMSCs in DMEM, welcher längerfristig auch in einer osteogenen Differenzierungsphase bestehen bleibt. Unter der Betrachtung der auf die Zellzahl normierten Differenzierung kam es zu geringeren Werten. Dies ist bedingt durch den positiven Effekt des FGF-2 auf den Wert der Zellzahl bei ausbleibender signifikanter Wirkung auf die (allein betrachtete) Differenzierung.

Wie schon in Kapitel 1.9 erwähnt, wurde über die anabole Wirkung des FGF-2 auf den Knochenstoffwechsel berichtet [98]. Die Arbeiten von Hamrick *et al.* [99, 100] betonten auch die Wichtigkeit der muskulären Komponente und die Bedeutung der Interaktion zwischen Muskel und Knochen.

Xiao *et al.* [102] untersuchten den Knochenstoffwechsel von FGF-2 KO-Mäusen und stellten fest, dass die Knochenbildung der Mäuse beeinträchtigt wurde und das Knochenmark einen erhöhten Fettanteil aufwies, was charakteristisch für gealterten Knochen sein kann. In Dieser Arbeit hatten die *in vitro* aus den FGF-2 KO-Mäusen gewonnene BMSCs erniedrigte Werte bei der Messung von Differenzierungsmarkern.

Andere Arbeiten berichten über einen positiven Effekt auf Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung des FGF-2 über den Wnt-

pathway [103] und über die Modulierung von TAZ (*transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*), welcher direkten Einfluss auf die Stammzelldifferenzierung besitze [104].

Ogura *et al.* [105] zeigten in ihrer Arbeit, dass mechanischer Stress zu einer erhöhten Ausschüttung von FGF-2 führte, welches die Zellproliferation von hBMSCs steigerte. Den gleichen Effekt hatte auch eine Gabe von FGF-2 während der Proliferationsphase. Dabei führte der proliferationsfördernde Effekt des FGF-2 in einer Vorstimulation später bei einer folgenden OIM-Gabe zu erhöhten Werten bei der Messung von Differenzierungsmarkern. Wurde FGF-2 während der osteogenen Differenzierungsphase gegeben oder sowohl in der Vorstimulation als auch in der OIM-Nachbehandlung, so kam es zu einer Hemmung der Differenzierung. Ogura *et al.* [105] sehen hierbei einen Regulationsmechanismus, indem Stammzellen durch mechanischen Stress nach z.B. akuten Frakturgeschehen erhöht FGF-2 produzieren [106-108], um eine ausreichende Zahl an Osteoprogenitorzellen zu gewährleisten. Es käme dann zu Knochenbildung mit Abnahme des mechanischen Stresses, was wiederum zu einer Abnahme der FGF-2 Konzentration führe, um einen Überschuss an Knochenbildung entgegenzuwirken.

Quarto *et al.* [109] untersuchten die Auswirkung von FGF-2 an ADS (*adipose tissue-derived stromal cells*, Stammzellen aus Fett) aus Mäusen und deuten einen positiv regulierenden Effekt auf Osteoprogenitorzellen durch FGF-2. Dabei ist die proliferationsfördernde und osteogene Fähigkeit der ADS unter FGF-2 Gabe über mehrere Passagen erhalten geblieben. Ohne FGF-2 Gabe kam es nach mehreren Passagen hingegen zu Verlust bzw. Abnahme dieser Fähigkeit der Osteoprogenitorzellen. Zusätzlich kam es zu einer verringerten osteogenen Differenzierung unter FGF-2 Gabe in der Arbeit, dieser Effekt war dosisabhängig und reversibel. Quarto *et al.* [109] deuten, dass FGF-2 durch einen unbekannten Mechanismus die Osteogenese antagonisiere. Ebenfalls wird in dieser Arbeit der technische Vorteil der Kultivierung des ADS-Zellen unter FGF-2 Gabe erwähnt, um so effektiver eine große Menge an Osteoprogenitorzellen zu züchten. So könne man dies vorteilhaft für mesenchymale Gewebereparatur nutzen [109].

Huang *et al.* [110] arbeiteten an der Auswirkung verschiedener Zytokine, unter anderem des FGF-2, an MSCs von Mäusen während der Gabe von OIM. Dabei kam es ebenfalls zu einem Abfall der Differenzierungsmarker, hier Mineralisierung und ALP-2 Aktivität. So folgerten sie, dass die Osteoprogenitorzellen unter FGF-2 Gabe in einem proliferativen Stadium gehalten werden und dadurch die Differenzierung und Reifung verzögert wird.

Die proliferationsfördernde Wirkung des FGF-2 aus dieser Arbeit steht hierbei im Einklang mit verschiedenen hier genannten Arbeiten. Der Einfluss auf die osteogene Differenzierung ist komplex, so ist durch die verschiedenen genannten Arbeiten zu evaluieren, dass sehr viele Parameter in die Berücksichtigung der Ergebnisse einfließen. So unterstützen einige hier genannten Arbeiten den hier dargestellten differenzierungshemmenden Effekt des FGF-2. Aber beispielsweise stellt die Arbeit von Ogura *et al.* [105] einen wichtigen Aspekt dar, so kann der Zeitpunkt der Gabe des Myokins zu verschiedenen Ergebnissen führen. Dabei ist einerseits die Gewährleistung von ausreichend Osteoprogenitorzellen nach

Frakturen und andererseits die Hemmung der osteogenen Differenzierung zur Vermeidung von Knochenüberschuss eine Erklärung für die konträren Effekte [105].

4.3 IL-6 und dessen Wirkung auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung

Unter IL-6 Gabe kam es zu keinem messbaren Effekt auf den Wert der Zellzahl, lediglich eine Vorbehandlung mit FGF-2 und eine folgende IL-6 Nachbehandlung führte zu signifikant erhöhten Werten der Zellzahl in der Relation zu den anderen Vergleichsgruppen, die mit IL-6 nachbehandelt wurden. Dieser Effekt ist eher durch die Wirkung des FGF-2 bedingt. Es kam in der Auswertung der Differenzierungsparameter zu keiner signifikanten Wirkung des IL-6 auf den Wert der Mineralisierung und ALP-Aktivität. FGF-2 Vorbehandlung und folgende IL-6 Nachbehandlung führt zu einem signifikant geringeren Wert der normierten Differenzierung, wenn man es mit den Zellen vergleicht, die nicht vorstimuliert wurden bzw. mit IL-6 vorstimuliert wurden und danach mit IL-6 nachbehandelt wurden. Auch dies ist bedingt dadurch, dass die mit FGF-2 vorbehandelte Gruppe trotz IL-6 Nachbehandlung geringeren Werte der normierten Differenzierung erreicht, da FGF-2 zu erhöhten Werten der Zellzahl bei ausbleibender Wirkung auf die Differenzierung führt.

Das erste nachgewiesene Myokin, welches nach Skelettmuskelkontraktion in den Blutstrom ausgeschüttet wird, war wie schon in Kapitel 1.9 erwähnt, Interleukin-6 (IL-6) [81, 89, 96].

Generell ist IL-6 ein Zytokin, welches von verschiedenen Zelltypen sezerniert wird, wie den meisten Zellen des Immunsystems, Skelettmuskelzellen, glatten Muskelzellen, Hepatozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und vielen weiteren Zellen [80, 97]. Die Rolle des IL-6 ist dabei komplex, sodass sowohl proinflammatorische Eigenschaften als auch anti-inflammatorische Eigenschaften diskutiert werden [81]. So gibt es bezüglich der Wirkung des IL-6 auf die osteogene Differenzierung uneindeutige Ergebnisse. So berichten Kaneshiro *et al.* [111] von einer Hemmung der Osteoblastendifferenzierung über den SHP2/MEK2 und SHP2/Akt2 Signalweg *in vitro*, der JAK/STAT3 Signalweg wirke hingegen fördernd. Eine weitere Arbeit durch Peruzzi *et al.* [112] erklärt über die Tyrosinkinase c-Src und IL-6 eine Hemmung der Osteoblastendifferenzierung. Hierbei kam es über Zwischenschritte zu einer Verzögerung der Osteoblastendifferenzierung *in vitro* an Osteoblasten von Mäusen. Eine weitere Arbeit von Benedetti *et al.* [113] *in vivo* an genetisch modifizierten präpubertären Mäusen mit chronisch erhöhten IL-6 Spiegeln zeigte osteopore Knochenstrukturen und erniedrigte Osteoblastenanzahl, als auch Aktivität. Parallel kam es zu erhöhter Anzahl an Osteoklasten. Diese Arbeit sollte chronische Entzündungen und deren Einfluss auf die skelettale Entwicklung in Kindern simulieren, so kam es bei den Mäusen zu Defekten an den Wachstumsfugen und Ossifikationsstellen. Hier wurde auf eine chronische IL-6 Überexpression als eine mögliche Ursache für Skelettfehlbildungen wie juvenile idiopathische Arthritis geschlossen und dies könnte daher auch als Therapieziel dienen.

Gleichzeitig gibt es Arbeiten, die in eine andere Richtung zeigen. So untersuchten Xie *et al.* [114] die Auswirkung des IL-6/IL-6 Rezeptor Komplexes an hBMSCs. Es kam dabei zu einem positiven Effekt auf die osteogene Differenzierung, indem das Level an IL-6 und IL-6 Rezeptor während der osteogenen Differenzierung anstieg, aber auch eine exogene Gabe die osteogene Differenzierung förderte.

Bei einer ähnlichen Arbeit von Huh *et al.* [115], in welcher ASCs von Mäusen durch Toll-like Rezeptor Agonisten (TLRs-Agonisten) stimuliert wurden, kam es unter diesen zu einer erhöhten osteogenen Differenzierung und erhöhten IL-6 Ausschüttung. Eine exogene Gabe von IL-6 mit löslichem IL-6 Rezeptor (sIL6-R) führte ebenfalls zu einer erhöhten osteogenen Differenzierung über den STAT3 Signalweg. Durch die verschiedenen Eigenschaften des IL-6 und seine verschiedenen Funktionen, die sowohl als pro- als auch antiinflammatorisch dargestellt werden [81], ist auch die hier dargestellte Studienlage uneindeutig, sodass unter Berücksichtigung von methodischen Unterschieden zwischen den hier genannten Arbeiten konträre Effekte erklärt werden können.

4.4 Die Wirkung des IL-1 β auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung

Wurde mit IL-6 bzw. FGF-2 vorstimuliert, so kam es bei IL-1 β Nachbehandlung zu signifikant erhöhten Werten der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit FGF-2 bzw. IL-6 vorstimuliert wurde. IL-1 β Nachbehandlung führte zu einer signifikanten Erhöhung des Wertes der Mineralisierung, unabhängig davon womit vorstimuliert wurde. Wurde mit FGF-2 vorbehandelt und mit IL-1 β nachbehandelt, so kam es zu einem signifikanten Anstieg des Wertes der ALP-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit FGF-2 vorstimuliert wurde. IL-1 β Gabe führte zu keinem signifikanten Effekt auf den Wert der normierten Differenzierung.

IL-1 β als proinflammatorisches Zytokin zeigte in der Arbeit von Stashenko *et al.* [116] einen inhibitorischen Effekt auf die Osteogenese *in vitro* an fetalen Rattenosteoblasten. Dabei wirke IL-1 β inhibierend auf verschiedene Prozesse in den Osteoblasten, in höheren Dosen kann es vermehrt die Proliferation der Osteoblasten hemmen.

Gesteigerte IL-1 Konzentration stehen auch in Assoziation mit Knochendestruktion bei Rheumatoider Arthritis [117]. Lee *et al.* [118] untersuchten die Wirkung von IL-1 beim physiologischen Knochenumbau an genetisch modifizierten Mäusen mit Fehlen von IL-1 α und IL-1 β bzw. kombinierten Fehlen beider Zytokine gleichzeitig. Sie zeigten, dass IL-1 α und IL-1 β einen aktivierenden Einfluss auf die Osteoklastogenese haben und darüber den Knochenmetabolismus modulieren.

Rabadjija *et al.* [119] untersuchten die Auswirkungen des IL-1 β im Versuch an Mäusen verschiedenen Alters, indem Knochengewebe aus der Schädelkalotte damit versehen wurde. Die Knochenresorption wurde mittels Calciumfreisetzung gemessen. So kam es bei Knochengewebe aus älteren Tieren zur Hemmung der basalen Knochenresorption, während die Zahl der Osteoklasten auf einem gleichen Niveau geblieben ist. So wurde geschlussfolgert, dass je nach Alter des Knochengewebes eine andere Reaktion auf das Myokin stattfindet. So werde weniger das Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten von den Osteoklasten

verändert, sondern die Funktion der Zellen moduliert [119]. Diese Veränderung wirke sich laut Rabadjija *et al.* [119] möglicherweise dann in der Interaktion mit anderen Zellen im Knochengewebe aus, wie den Osteoblasten oder Stromazellen.

4.5 Die Wirkung des TNF α auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung

TNF α Nachbehandlung führte lediglich unter FGF-2 Vorbehandlung zu signifikant erhöhten Werten der Zellzahl im Vergleich zur mit IL-6 vorbehandelten Kontrolle. TNF α Nachbehandlung führte zu einer signifikanten Erhöhung des Wertes der Mineralisierung, unabhängig davon womit vorstimuliert wurde. TNF α hatte keinen signifikanten Effekt auf den Wert der ALP-Aktivität. TNF α Nachbehandlung nach FGF-2 Vorstimulation führte zu signifikant erhöhten Werten der normierten Mineralisierung im Vergleich zu der mit FGF-2 vorstimulierten Kontrolle. Dies ist bedingt durch die positive Wirkung des TNF α auf den Wert der Mineralisierung, was sich in Kombination mit FGF-2 Vorstimulation auch auf die normierte Mineralisierung überträgt, im Sinne eines synergistischen Effektes.

Die Wirkung des Tumornekrosefaktor- α (TNF α) auf Osteoblasten wird kontrovers diskutiert [120, 121], so kann es in einigen frühen Stadien der Differenzierung hemmend wirken, wie es Abbas *et al.* in ihrer Arbeit an Knochenmarkstammzellen aus Mäusen berichtet haben [122]. Zusätzlich kann TNF α die Osteoklastendifferenzierung und Aktivität *in vitro* fördern [120, 123]. Die Arbeit von Zhou *et al.* [124] im Versuch an geschädigten Wachstumsplatten bei Ratten zeigte, dass TNF α über die p38-MAP-Kinase einen Einfluss auf die Reparatur der Wachstumsplatte habe, indem eine Hemmung dieser Interaktion zur verminderten Migration mesenchymaler Stammzellen und deren Proliferation führte. In dieser Arbeit kam es unter TNF α -Inhibition zu einer Steigerung der osteogenen Differenzierung und Knochensynthese.

Ebenfalls gibt es Arbeiten, in welcher über eine Förderung der osteogenen Differenzierung berichtet wird, wie über den NF- κ B Signalweg [125].

Eine weitere Perspektive bietet die Arbeit von ZuFu *et al.* [126], in der humane Osteoblasten ko-kultiviert wurden mit ASCs und der Einfluss von TNF α untersucht wurde. Hierbei stellte sich die Wichtigkeit der Betrachtung der zeitlichen Gabe von Myokinen dar. So können je nach Dauer der Wirkung eines Myokins konträre Effekte erreicht werden laut ZuFu *et al.* [126], die zur besseren Kontrolle und Abstimmung einer Entzündungsreaktion bei Schäden am Knochen dienen könnten. Es kam in dieser Arbeit zu keinem Unterschied im Proliferationsverhalten der Osteoblasten unter TNF α Gabe. Eine Gabe von TNF α über 24h führte zur Abnahme der osteogenen Genexpression, hier von Osteocalcin. Bei Entzug des Myokins nach 24h Stunden, kam es zur verstärkten Induktion der osteogenen Genexpression nach 7-tägiger Kultivierung im Vergleich zur Kontrolle ohne Myokingabe, während bei kontinuierlicher TNF α Gabe über 7 Tage es zu einem Abfall der Genexpression kam. So wurden zur Untersuchung der Mikroumgebung Osteoblasten mit TNF α über 24h vorbehandelt und in einer Co-Kultur mit ASCs gezüchtet. Es kam zur gesteigerten osteogenen Genexpression und ALP-Aktivität in der Co-Kultur unter

TNF α Einfluss, als auch bei der Co-Kultur ohne TNF α Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe der allein gezüchteten ASCs. Die osteogene Genexpression und ALP-Aktivität war unter TNF α Einfluss in der Co-Kultur am höchsten. Ebenso erarbeiten ZuFu *et al.* [126] den Zusammenhang, dass die über 24h mit TNF α vorbehandelten Osteoblasten eine erhöhte BMP-2 Gen- und Proteinexpression erreichten als ohne Myokingabe an Tag 1 der Messung. Eine Hemmung des BMP-2 Signalweges hemmte die osteogene Differenzierung der ASCs. Dabei unterliege die BMP-2 Genexpression dem p38 MAPK-Signalweg [126]. Diese Arbeit habe so die stimulierende Wirkung einer kurzfristigen TNF α Gabe auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten dargestellt und eine daraus folgende Mikroumgebung, die die osteogene Differenzierung von ASCs fördere [126].

4.6 Die Wirkung des Myostatins auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung

Die Myostatin Gabe führte während der osteogenen Differenzierung zu einem nicht signifikanten, gering erhöhten Werten der Zellzahl. Es kam zur nicht signifikanten Wirkung auf die ALP-Aktivität und Mineralisierung. Myostatin Gabe führte zu nicht signifikant geringeren Werten der normierten Differenzierung, was durch die positive Wirkung auf den Wert der Zellzahl bei Ausbleiben einer signifikanten Wirkung auf die (allein betrachteten) Differenzierungsmarker bedingt ist.

Das erste nachgewiesene Myokin, welches aus dem Skelettmuskel sezerniert wird und in den Blutstrom gelangt, war Myostatin, auch Growth-Differentiation Factor-8 (GDF-8) genannt (siehe Abschnitt 1.9) [89, 95]. Dabei erklärten McPherron *et al.* [95] Myostatin als negativen Regulator des Skelettmuskelwachstums und deuten (wie in Abschnitt 1.9 erwähnt), dass die Zunahme an Größe und Gewicht bei Myostatin-null Mäusen auch zusätzlich durch eine erhöhte Knochenmasse bedingt sein könnte.

Myostatin wirkte sich in der Arbeit von Dankbar *et al.* [127] verstärkend auf die Osteoklastendifferenzierung *in vitro* aus und eine Hemmung von Myostatin zeigte im Tierversuch an genetisch modifizierten Mäusen (die als Modell für Rheumatoide Arthritis dienten) eine geringere Gelenkschädigung.

Hamrick *et al.* [128] untersuchten mesenchymale Stromazellen von Mäusen mit Myostatin-Defizienz und diese zeigten eine erhöhte osteogene Differenzierung im Vergleich zu Wild-Typ Mäusen. Eine Gabe von rekombinantem Myostatin bei den Myostatin-defizienten Mäusen konnte diesen Effekt nicht abschwächen [128]. *In vitro* führte mechanischer Belastung der Stammzellen der Mäuse zur erhöhten Expression und eine Myostatin Gabe zur verringerten Expression von den osteogenen Faktoren BMP-2 und IGF-1. Zusätzlich haben Hamrick *et al.* [128] einen Zusammenhang mit mechanischer Belastung dargestellt, indem eine Myostatin-Defizienz und Einschränkung von mechanischer Belastung zu erhöhten Adipozytenanteil und geringerem Osteoblastenanteil bei der Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen führte. Somit sei die osteogene Differenzierung bei

Myostatin-defizienten Mäusen abhängig von mechanischer Stimulation und Myostatin könnte Einfluss auf die Mechanosensitivität von BMSCs nehmen [128]. Bialek *et al.* [129] untersuchten verschiedene Myostatin Inhibitoren und deren Wirkungen auf die Muskel- und Knochenmasse an Mäusen. So führte die Gabe vom Myostatin neutralisierendem Antikörper (Mstn-mAB) zur Zunahme von Muskelmasse und hatte keinen Einfluss auf die Knochenmasse, eine Gabe vom löslichen Myostatin Decoy Rezeptor (ActRIIB-Fc) führte zur Erhöhung der Knochen- und Muskelmasse [129]. Die Hypothese wurde aufgestellt, dass die Erhöhung der Knochenmasse über diesen Rezeptor in Interaktion mit einem unbekannten Liganden und nicht ausschließlich über Myostatin passiere. BMP-3 wurde in dieser Arbeit untersucht und habe sich nicht als der gesuchte Ligand erwiesen [129]. Oestreich *et al.* [130] kreuzten Mäuse mit *Osteogenesis Imperfecta* (heterozygot) mit Mäusen, die eine Myostatin-Defizienz (heterozygot) hatten. So kam es bei Kreuzung der beiden Gruppen zu Nachkommen, die ein erhöhtes Körpergewicht mit erhöhter Muskelmasse hatten und eine erhöhte biomechanische Stärke besaßen im Vergleich zu Mäusen mit *Osteogenesis imperfecta* [130]. Ebenfalls kam es zur Verbesserung der Mikroarchitektur im Knochen. Somit könne Myostatin-Defizienz bei Mäusen teilweise die biomechanischen Defizite unter *Osteogenesis Imperfecta* kompensieren, was daher ein mögliches Therapie-Target für *Osteogenesis imperfecta* biete [130].

4.7 Die Wirkung des IFN- γ auf hBMSCs und die osteogene Differenzierung

In dieser Arbeit führte IFN- γ in höherer Dosis zu signifikant geringeren Werten der Zellzahl bzw. zum Zelltod während der osteogenen Differenzierung unabhängig von der Vorstimulation. In geringer Dosis kam es unter FGF-2 Vorstimulation und IFN- γ Nachbehandlung zur erhöhten Werten der Zellzahl.

Was es die osteogene Differenzierung unter höhere Dosis an IFN- γ angeht, so sind unter Berücksichtigung der Zellzahl trotz Zelltod die Werte der ALP-Aktivität erhalten geblieben und die Mineralisierung sogar signifikant erhöht im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Ausnahme IL-6 Vorbehandlung). Es kam somit unter Betrachtung der normierten Differenzierung zum signifikant stark erhöhten Werten der osteogenen Differenzierung unabhängig der Vorstimulation im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Bei Gabe des IFN- γ in geringerer Dosis kam es ohne Vorstimulation und IFN- γ Nachbehandlung zu erhöhten Werten der normierten Differenzierung, während FGF-2 und IL-6 Vorstimulation und anschließende IFN- γ Nachbehandlung zu einem geringeren Werten der osteogenen Differenzierung führte im Vergleich zur Kontrolle.

IFN- γ und dessen Wirkung auf den Knochenstoffwechsel ist ebenso nicht vollständig geklärt. Vor allem ist der Zusammenhang zwischen IFN- γ und der Osteoblastogenese in Bezug auf Signalwege nicht vollständig aufgeklärt [131]. Lai *et al.* [132] berichten von einer Stadien-abhängen Wirkung *in vitro*. Dabei sei laut ihren Ergebnissen eine negative Regulation der Osteoblastendifferenzierung und

Knochenbildung in frühen Stadien der Differenzierung möglich, in späteren Stadien der Differenzierung könne es zu einer positiven Regulierung kommen.

Wang *et al.* [133] arbeiteten an Osteoblasten aus dem Schädelknochen von Mäusen und untersuchten den Einfluss von IFN- γ und IL-17 auf die Osteogenese. Dabei kam es weder unter gemeinsamer Gabe noch unter getrennter Gabe der Zytokine zu einem signifikanten Effekt auf die Proliferation unter DMEM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in DMEM. Die ALP-Aktivität konnte aber im Vergleich zur Kontrolle im OIM bei Gabe von IL-17 oder der gemeinsamen Gabe von IFN- γ und IL-17 unter OIM gesteigert werden. Die kombinierte und separate Gabe beider Zytokine führte zu einem Abfall der Mineralisierung in der Arbeit in Verhältnis zur Kontrolle unter OIM-Gabe. Dabei kam es bei der mRNA-Analyse zu einem fördernden Effekt von IL-17 und IFN- γ in der frühen Differenzierung [133].

Die Arbeit von Duque *et al.* [134] zeigte einen positiven Effekt auf die Osteoblastogenese *in vivo und in vitro*. Dabei käme es während der osteogenen Differenzierung von hBMSCs zu einem starken Anstieg der endogenen IFN- γ Konzentration. Eine Hemmung der endogenen IFN- γ Produktion führte zu einer Hemmung der osteogenen Differenzierung. Exogene IFN- γ Gabe beschleunigte dosisabhängig die osteogene Differenzierung der hBMSCs. Eine Hemmung des IFN- γ Rezeptors bei Mäusen führte zur Reduktion der Knochendichte im Vergleich zum Wildtyp. Somit spiele die autokrine Sekretion des IFN- γ von hBMSCs eine wichtige Rolle zur positiven Regulierung der frühen Osteoblastogenese [134].

Ähnlich verhalten sich die Ergebnisse bezüglich der Osteoklastogenese, so gibt es Arbeiten, die über eine Hemmung der Osteoklastogenese berichten [131, 135, 136]. Diese These bestätigten Gao *et al.* [40] *in vitro* auch in ihrer Arbeit, aber *in vivo* zeigten sie, dass IFN- γ die Osteoklastogenese indirekt fördert über eine Erhöhung der Antigenpräsentation. Dies führte zur T-Zell Aktivierung und Proliferation, was über weitere Zytokinausschüttung (RANKL und TNF α) die Osteoklastogenese förderte. Dieser Effekt überwiege die hemmende direkte Wirkung auf die Osteoklastenvorläuferzellen *in vivo* [40].

5 Limitationen

In den hier erarbeiteten Versuchsdurchläufen sind Standardabweichungen und Zelltod über den längeren Messzeitraum als Ursache für Schwankungen in den verschiedenen Messungen der einzelnen Versuche zu berücksichtigen. So kann beim Wachstumsversuch in 3.1 beispielsweise bei der Gabe von IFN- γ durch die hohe Standardabweichung eine limitierte Aussage getätigt werden. Auch das individuelle Verhalten einzelner Spender muss bei Schlussfolgerungen betrachtet werden, da manche Spender ein stärkeres Proliferationsverhalten im Vergleich zu anderen hatten und es teilweise individuelle Unterschiede in der Wirkung verschiedener Myokine auf die hBMSCs gab. Ähnliches bezüglich der hohen Standardabweichung gilt auch für die Zellzahl (Abschnitt 3.3.1), die Mineralisierung (Abschnitt 3.3.2), ALP-Aktivität (Abschnitt 3.3.3) und die beiden Quotienten (Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5) im Differenzierungsversuch über 14 Tage.

Mögliche Messfehler sind zu berücksichtigen in den verschiedensten Zwischenschritten durch die Komplexität des Versuches (Myokinkonzentrationen, Verdünnungen, Zellzahlbestimmung, Proliferation etc.) und die daraus folgenden Berechnungen und deren einzelne eigene Zwischenschritte.

So ist in Abschnitt 3.2 im 28-tägigen Differenzierungsversuch ersichtlich, dass es beispielsweise bei Spender 4 in der Untersuchung der Zellzahl (Abschnitt 3.2 Abbildung 7 (A)) zur Abnahme kam und somit es zum Zelltod des Spenders über die Zeit kam, was auch ein limitierender Faktor für die Auswertung der Ergebnisse ist. Dies führte in dieser Darstellung des Versuches dann zu Verzerrungen in der Darstellung des Quotienten aus der photometrischen Messung der Mineralisierung/osteogenen Differenzierung über Alizarin-Rot Färbung bzw. der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der CTB-Messung der Zellzahl (Zellviabilität) (Abschnitt 3.2 Abbildung 7 (D-E)). Somit ist die Bildung des Quotienten anfällig für Ausreißer wie dem hier erwähnen Spender 4, hier durch seinen Abfall der Zellzahl.

Erhöhte Standardabweichung in der Zellzahl in Abschnitt 3.3.1 haben sich auch beim 14-tägigen Differenzierungsversuch auf die Bildung der Quotienten (Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5) und deren Standardabweichungen übertragen.

So führte die Gabe von IL-6 in der Vorstimulation bzw. Nachbehandlung in Abschnitt 3.3 zu erhöhten Standardabweichungen bei einigen Graphen. Hierbei ist eine mögliche Verzerrung beim IL-6 durch die unterschiedlichen Einzelergebnisse, die zusammengeführt wurden und der niedrigen Quantität an Versuchsdurchläufen gegeben.

Beim separaten Versuch mit IFN- γ in niedrigerer Dosis (3,125 U) kam es durch die limitierte Anzahl an Versuchsdurchläufern ($n=2$) in den verschiedenen Versuchskonstellationen in Abschnitt 3 zu hohen Standardabweichungen. Eine IL-6 Vorstimulation und eine FGF-2 Vorstimulation ohne Nachbehandlung führten beide in dieser separaten Darstellung der zwei Spender/Spenderinnen in Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5 (K-L) zu einem Abfall der normierten Mineralisierung und normierten ALP-Aktivität. Das Ergebnis in Bezug auf IL-6 muss auch hier weiter untersucht

werden, da es konträr zu den zusammengeführten Ergebnissen der 7 Spender/Spenderinnen steht.

Somit ist durch die begrenzte Anzahl an Versuchsdurchläufen einzelner Teilversuche eine generelle Aussage limitiert, da die Wirkung der verschiedenen Myokine in weiteren Versuchsdurchläufen untersucht werden muss, um zu eindeutigeren Schlussfolgerungen kommen zu können. Solche Faktoren sind ebenfalls begrenzt durch die limitierte Verfügbarkeit einzelner Ressourcen und vor allem der hBMSCs, wobei auch monetäre Faktoren eine limitierende Rolle spielen. Auch ein erwähnenswerter genereller Punkt ist, dass es sich hier um ein Modell bzw. Simulation handelt, welches Ansätze für die Forschung, z.B. beim Tissue Engineering bieten kann, aber eine direkte Übertragung auf die klinische Forschung nicht realisierbar ist.

6 Ausblick

Myokine haben, wie mehrfach in der Arbeit erwähnt und erarbeitet, entgegen Behauptungen einen nachweisbaren positiven Effekt auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von hBMSCs, wobei auch viele andere Faktoren wie z.B. Dauer der Myokingabe, Zeitpunkt der Messung, als auch spenderabhängige Faktoren eine Rolle spielen (Abschnitt 3 und 4). Diese Möglichkeit zur Modulierung der osteogenen Differenzierung bietet weitreichende Ansätze (Abschnitt 1.3) im Bereich des Tissue Engineering und der Kreierung eines „optimalen“ Knochenersatzes (Abschnitt 1.6.3). Auch ein allgemeines Verständnis der osteogenen Differenzierung und des Verhaltens von Stammzellen (unter anderem im Entzündungsmilieu) bietet viel Potential zur Forschung (Abschnitt 1.4 und 4). Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge könnte sowohl neue Einblicke als auch Therapiemöglichkeiten zu Knochenerkrankungen wie der Osteoporose bieten (Abschnitt 1.1 und 1.2). Muskuloskelettale Erkrankungen und die Therapie dieser spielen eine große sozioökonomische Rolle in der älter werdenden deutschen (und westlichen) Bevölkerung, sodass weitere Forschung in diesem Bereich von enormer Wichtigkeit ist (Abschnitt 1.1).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Voraussetzungen des idealen Knochenersatzes .	8
Abbildung 2: vereinfachte Darstellung der osteogenen Differenzierung aus Stammzellen.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung des „Muskel-Knochen-Crosstalks“.....	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Hauptversuches der osteogenen Differenzierung	28
Abbildung 5: eigene fotografische Aufnahme der Alizarin-Rot Färbung einer 48-Well Platte ..	29
Abbildung 6: eigene Mikroskopische Aufnahme eines Wells unter Alizarin-Rot Färbung.....	30
Abbildung 7: photometrische Messung der Zellzahl nach 4 und 7 Tagen bei 2 Spendern.	33
Abbildung 8: Darstellung des individuellen Verhaltens der verschiedenen Spender/Spenderinnen im Differenzierungsversuch über 28 Tage (ohne Zytokingabe).	39
Abbildung 9: Darstellung verschiedener untersuchter Parameter von 6 Spendern zusammengeführt unter Einfluss von osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage....	45
Abbildung 10: Darstellung der Zellzahl bzw. Zellviabilität über das CTB-Assay mittels photometrischer Messung.	55
Abbildung 11: Darstellung der Mineralisierung mittels photometrischer Messung.....	64
Abbildung 12: Darstellung der ALP-Aktivität über das ALP-Assay mittels photometrischer Messung.....	72
Abbildung 13: Darstellung des Quotienten aus den absoluten Werten der Mineralisierung dividiert durch die absoluten Werte der Zellzahl.	81
Abbildung 14: Darstellung des Quotienten aus den absoluten Werten der ALP-Aktivität dividiert durch die absoluten Werte der Zellzahl	90

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte.....	17
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Substanzen und Lösungen.....	22
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Myokine	23
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Software	23

9 Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, *Gesundheit in Deutschland - Einzelkapitel: 02 Wie steht es um unsere Gesundheit?* 2015: p. 71-76.
2. Johnell, O. and J. Kanis, *Epidemiology of osteoporotic fractures*. Osteoporosis International, 2005. **16**(2): p. S3-S7.
3. Borgström, F., et al., *Fragility fractures in Europe: burden, management and opportunities*. Archives of Osteoporosis, 2020. **15**(1): p. 59.
4. Kanis, J.A., et al., *SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe*. Archives of Osteoporosis, 2021. **16**(1): p. 82.
5. *Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis*. The American Journal of Medicine, 1993. **94**(6): p. 646-650.
6. Kanis, J.A. and J.A. Kanis, *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Synopsis of a WHO report*. Osteoporosis International, 1994. **4**(6): p. 368-381.
7. e.V., D.d.D.W.O.G., *Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der OSTEOPOROSE bei postmenopausalen Frauen und bei Männern ab dem 50.Lebensjahr*. DVO Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V., 2023: p. 16.
8. Kanis, J.A., *Assessment of Osteoporosis at the Primary Health Care Level. Technical Report*. 2007: World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, Sheffield.
9. Kanis, J.A., et al., *The diagnosis of osteoporosis*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(8): p. 1137-41.
10. Cooper, C. and L.J. Melton, *Epidemiology of osteoporosis*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 1992. **3**(6): p. 224-229.
11. Lane, N.E., *Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2006. **194**(2, Supplement): p. S3-S11.
12. Dr. Garnero, P., et al., *Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis*. Journal of Bone and Mineral Research, 1996. **11**(3): p. 337-349.
13. Saag, K.G., *Glucocorticoid-induced osteoporosis*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2003. **32**(1): p. 135-157.
14. Amiche, M.A., et al., *Fracture risk in oral glucocorticoid users: a Bayesian meta-regression leveraging control arms of osteoporosis clinical trials*. Osteoporosis International, 2016. **27**(5): p. 1709-1718.
15. Van Staa, T.P., et al., *Use of Oral Corticosteroids and Risk of Fractures*. Journal of Bone and Mineral Research, 2000. **15**(6): p. 993-1000.
16. Law, M.R. and A.K. Hackshaw, *A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect*. Bmj, 1997. **315**(7112): p. 841-6.
17. Lips, P., *Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications*. Endocr Rev, 2001. **22**(4): p. 477-501.
18. Weaver, C.M., et al., *Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation*. Osteoporos Int, 2016. **27**(1): p. 367-76.

19. Stewart, T.L. and S.H. Ralston, *Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis*. J Endocrinol, 2000. **166**(2): p. 235-45.
20. Guéguen, R., et al., *Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families*. Journal of Bone and Mineral Research, 1995. **10**(12): p. 2017-2022.
21. Smith, D.M., et al., *Genetic factors in determining bone mass*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2800-8.
22. Slemenda, C.W., et al., *The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density*. Osteoporos Int, 1996. **6**(2): p. 178-82.
23. Pocock, N.A., et al., *Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study*. J Clin Invest, 1987. **80**(3): p. 706-10.
24. Flicker, L., et al., *Determinants of hip axis length in women aged 10-89 years: a twin study*. Bone, 1996. **18**(1): p. 41-5.
25. Christian, J.C., et al., *Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins*. Am J Hum Genet, 1989. **44**(3): p. 429-33.
26. Fischer, V. and M. Haffner-Luntzer, *Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2022. **123**: p. 14-21.
27. Khosla, S., M.J. Oursler, and D.G. Monroe, *Estrogen and the skeleton*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(11): p. 576-81.
28. Kousteni, S., et al., *Nongenotropic, Sex-Nonspecific Signaling through the Estrogen or Androgen Receptors: Dissociation from Transcriptional Activity*. Cell, 2001. **104**(5): p. 719-730.
29. Nakamura, T., et al., *Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts*. Cell, 2007. **130**(5): p. 811-23.
30. Martin-Millan, M., et al., *The Estrogen Receptor- α in Osteoclasts Mediates the Protective Effects of Estrogens on Cancellous But Not Cortical Bone*. Molecular Endocrinology, 2010. **24**(2): p. 323-334.
31. Korach, K.S., *Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor*. Science, 1994. **266**(5190): p. 1524-7.
32. Cohen-Solal, M.E., et al., *Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: involvement of cytokines*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(6): p. 1648-53.
33. Zheng, S.X., et al., *Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis*. Maturitas, 1997. **26**(1): p. 63-71.
34. Abildgaard, J., et al., *Increased systemic inflammation and altered distribution of T-cell subsets in postmenopausal women*. PLoS One, 2020. **15**(6): p. e0235174.
35. Zupan, J., R. Komadina, and J. Marc, *The relationship between osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines differs in human osteoporotic and osteoarthritic bone tissues*. J Biomed Sci, 2012. **19**(1): p. 28.
36. Srivastava, R.K., H.Y. Dar, and P.K. Mishra, *Immunoporosis: Immunology of Osteoporosis-Role of T Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 657.
37. Srivastava, R.K. and L. Sapra, *The Rising Era of "Immunoporosis": Role of Immune System in the Pathophysiology of Osteoporosis*. J Inflamm Res, 2022. **15**: p. 1667-1698.
38. Kong, Y.Y., et al., *Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 304-9.

39. Cenci, S., et al., *Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha*. J Clin Invest, 2000. **106**(10): p. 1229-37.
40. Gao, Y., et al., *IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 122-32.
41. Zhang, J., et al., *Changes of serum cytokines-related Th1/Th2/Th17 concentration in patients with postmenopausal osteoporosis*. Gynecol Endocrinol, 2015. **31**(3): p. 183-90.
42. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie*. 2020.
43. Deller, T.K., Wolfgang; Welsch, Ulrich. 2018: Urban & Fischer in Elsevier.
44. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Zellenlehre*, in *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.
45. Hart, N.H., et al., *Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2020. **20**(3): p. 347-371.
46. Ursus-Nikolaus Riede, M.W., *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 2 ed. 10 January 2017: Springer Berlin, Heidelberg. 893.
47. Schmidt, A.H., *Autologous bone graft: Is it still the gold standard?* Injury, 2021. **52**: p. S18-S22.
48. Meeder, P.J. and C. Eggers, 1. *The history of autogenous bone grafting*. Injury, 1994. **25**: p. SA2-SA4.
49. Giannoudis, P.V., T.A. Einhorn, and D. Marsh, *Fracture healing: The diamond concept*. Injury, 2007. **38**: p. S3-S6.
50. Khan, S.N., et al., *The Biology of Bone Grafting*. JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2005. **13**(1): p. 77-86.
51. Fillingham, Y. and J. Jacobs, *Bone grafts and their substitutes*. The Bone & Joint Journal, 2016. **98-B**(1_Supple_A): p. 6-9.
52. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(3698): p. 893-9.
53. Roberts, T.T. and A.J. Rosenbaum, *Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing*. Organogenesis, 2012. **8**(4): p. 114-24.
54. Wildemann, B., et al., *Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods*. Cell Tissue Bank, 2007. **8**(2): p. 107-14.
55. Brink, O., *The choice between allograft or demineralized bone matrix is not unambiguous in trauma surgery*. Injury, 2021. **52**: p. S23-S28.
56. Finkemeier, C.G., *Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes*. JBJS, 2002. **84**(3).
57. Aspenberg, P., E. Johnsson, and K. Thorngren, *Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide*. The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume, 1990. **72-B**(6): p. 1036-1037.
58. Upton, J. and J. Glowacki, *Hand reconstruction with allograft demineralized bone: Twenty-six implants in twelve patients*. The Journal of Hand Surgery, 1992. **17**(4): p. 704-713.
59. Gillman, C.E. and A.C. Jayasuriya, *FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration*. Materials Science and Engineering: C, 2021. **130**: p. 112466.
60. Moore, W.R., S.E. Graves, and G.I. Bain, *Synthetic bone graft substitutes*. ANZ J Surg, 2001. **71**(6): p. 354-61.
61. Qiao, Y., et al., *Gelatin Templated Polypeptide Co-Cross-Linked Hydrogel for Bone Regeneration*. Advanced Healthcare Materials, 2020. **9**(1): p. 1901239.

62. Li, J.J., et al., *Current Approaches to Bone Tissue Engineering: The Interface between Biology and Engineering*. Advanced Healthcare Materials, 2018. **7**(6): p. 1701061.
63. Maia, F.R., et al., *Recent approaches towards bone tissue engineering*. Bone, 2022. **154**: p. 116256.
64. Pina, S., et al., *Biofunctional Ionic-Doped Calcium Phosphates: Silk Fibroin Composites for Bone Tissue Engineering Scaffolding*. Cells Tissues Organs, 2017. **204**(3-4): p. 150-163.
65. Fernandez-Yague, M.A., et al., *Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. **84**: p. 1-29.
66. Webster, T.J. and J.U. Ejiogor, *Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo*. Biomaterials, 2004. **25**(19): p. 4731-4739.
67. Dalby, M.J., et al., *The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder*. Nature Materials, 2007. **6**(12): p. 997-1003.
68. Akar, B., et al., *Biomaterials with persistent growth factor gradients in vivo accelerate vascularized tissue formation*. Biomaterials, 2015. **72**: p. 61-73.
69. Twohig, C., et al., *A dual-ink 3D printing strategy to engineer pre-vascularized bone scaffolds in-vitro*. Materials Science and Engineering: C, 2021. **123**: p. 111976.
70. Deng, Y., et al., *3D printed scaffolds of calcium silicate-doped β -TCP synergize with co-cultured endothelial and stromal cells to promote vascularization and bone formation*. Scientific Reports, 2017. **7**(1).
71. Brianna M. Roux, B.A., Wei Zhou, Katerina Stojkova, Beatriz Barrera, Jovan Brankov, and Eric M. Brey, *Preformed Vascular Networks Survive and Enhance Vascularization in Critical Sized Cranial Defects*. Tissue Engineering Part A, 2018. **24**(21-22): p. 1603-1615.
72. Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2396-2402.
73. Berebichez-Fridman, R. and P.R. Montero-Olvera, *Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2018. **18**(3): p. e264-e277.
74. Stanko, P., et al., *Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression*. Biomedical papers, 2014. **158**(3): p. 373-377.
75. Attia, N. and M. Mashal, *Mesenchymal Stem Cells: The Past Present and Future*, in *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 11: Stem Cell Therapy - Potential and Challenges*, K. Turksen, Editor. 2021, Springer International Publishing: Cham. p. 107-129.
76. Hernigou, P., *Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka*. International Orthopaedics, 2015. **39**(4): p. 807-817.
77. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. Cell Proliferation, 1987. **20**(3): p. 263-272.
78. Peter C. Heinrich, M.M., Lutz Graeve, Hans-Georg Koch, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 10 ed. 2022: Springer Berlin, Heidelberg.
79. Pedersen, B.K., *Muscles and their myokines*. Journal of Experimental Biology, 2011. **214**(2): p. 337-346.

80. Li, G., et al., *Muscle-bone crosstalk and potential therapies for sarco-osteoporosis*. J Cell Biochem, 2019. **120**(9): p. 14262-14273.
81. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6*. Physiological Reviews, 2008. **88**(4): p. 1379-1406.
82. Severinsen, M.C.K. and B.K. Pedersen, *Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines*. Endocrine Reviews, 2020. **41**(4): p. 594-609.
83. Pedersen, B.K., et al., *Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate?* J Muscle Res Cell Motil, 2003. **24**(2-3): p. 113-9.
84. Das, D.K., Z.A. Graham, and C.P. Cardozo, *Myokines in skeletal muscle physiology and metabolism: Recent advances and future perspectives*. Acta Physiol (Oxf), 2020. **228**(2): p. e13367.
85. Shao, M., et al., *Advances in the research on myokine-driven regulation of bone metabolism*. Heliyon, 2024. **10**(1): p. e22547.
86. Karstoft, K. and B.K. Pedersen, *Skeletal muscle as a gene regulatory endocrine organ*. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2016. **19**(4).
87. Cardozo, C.P. and Z.A. Graham, *Muscle-bone interactions: movement in the field of mechano-humoral coupling of muscle and bone*. Ann N Y Acad Sci, 2017. **1402**(1): p. 10-17.
88. Goldstein, M.S., *Humoral Nature of the Hypoglycemic Factor of Muscular Work*. Diabetes, 1961. **10**(3): p. 232-234.
89. Pedersen, B.K., *Muscle as a Secretory Organ*, in *Comprehensive Physiology*. 2013. p. 1337-1362.
90. Kjaer, M., et al., *Hormonal and metabolic responses to electrically induced cycling during epidural anesthesia in humans*. J Appl Physiol (1985), 1996. **80**(6): p. 2156-62.
91. Mohr, T., et al., *Long term adaptation to electrically induced cycle training in severe spinal cord injured individuals*. Spinal Cord, 1997. **35**(1): p. 1-16.
92. Bortoluzzi, S., et al., *Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome*. Proteins, 2006. **62**(3): p. 776-92.
93. Henningsen, J., et al., *Dynamics of the Skeletal Muscle Secretome during Myoblast Differentiation**. Molecular & Cellular Proteomics, 2010. **9**(11): p. 2482-2496.
94. Benatti, F.B. and B.K. Pedersen, *Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases-myokine regulation*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(2): p. 86-97.
95. McPherron, A.C., A.M. Lawler, and S.-J. Lee, *Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member*. Nature, 1997. **387**(6628): p. 83-90.
96. Steensberg, A., et al., *Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**(Pt 1): p. 237-42.
97. Kristiansen, O.P. and T. Mandrup-Poulsen, *Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?* Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S114-24.
98. Liang, H., S. Pun, and T.J. Wronski, *Bone Anabolic Effects of Basic Fibroblast Growth Factor in Ovariectomized Rats*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5780-5788.
99. Hamrick, M.W., P.L. McNeil, and S.L. Patterson, *Role of muscle-derived growth factors in bone formation*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2010. **10**(1): p. 64-70.
100. Hamrick, M.W., *A Role for Myokines in Muscle-Bone Interactions*. Exercise and Sport Sciences Reviews, 2011. **39**(1).
101. Engvall, E., *[28] Enzyme immunoassay ELISA and EMIT*, in *Methods in Enzymology*. 1980, Academic Press. p. 419-439.

102. Xiao, L., et al., *Disruption of the Fgf2 gene activates the adipogenic and suppresses the osteogenic program in mesenchymal marrow stromal stem cells*. Bone, 2010. **47**(2): p. 360-370.
103. Fei, Y., et al., *Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway*. J Biol Chem, 2011. **286**(47): p. 40575-83.
104. Byun, M.R., et al., *FGF2 stimulates osteogenic differentiation through ERK induced TAZ expression*. Bone, 2014. **58**: p. 72-80.
105. Ogura, H., et al., *Mechanical stress-induced FGF-2 promotes proliferation and consequently induces osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2023. **684**: p. 149145.
106. Kawaguchi, H., et al., *Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats*. Endocrinology, 1994. **135**(2): p. 774-781.
107. Pacicca, D.M., et al., *Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis*. Bone, 2003. **33**(6): p. 889-898.
108. Schmid, G.J., et al., *Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice*. Developmental Dynamics, 2009. **238**(3): p. 766-774.
109. Quarto, N. and M.T. Longaker, *FGF-2 Inhibits Osteogenesis in Mouse Adipose Tissue-Derived Stromal Cells and Sustains their Proliferative and Osteogenic Potential State*. Tissue Engineering, 2006. **12**(6): p. 1405-1418.
110. Huang, Z., et al., *Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability*. Cytokine, 2010. **51**(3): p. 305-310.
111. Kaneshiro, S., et al., *IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro*. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2014. **32**(4): p. 378-392.
112. Peruzzi, B., et al., *c-Src and IL-6 inhibit osteoblast differentiation and integrate IGFBP5 signalling*. Nature Communications, 2012. **3**(1): p. 630.
113. De Benedetti, F., et al., *Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(11): p. 3551-63.
114. Xie, Z., et al., *Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 13.
115. Huh, J.-E. and S.Y. Lee, *IL-6 is produced by adipose-derived stromal cells and promotes osteogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2013. **1833**(12): p. 2608-2616.
116. Dr. Stashenko, P., et al., *Interleukin-1 β is a potent inhibitor of bone formation in vitro*. Journal of Bone and Mineral Research, 1987. **2**(6): p. 559-565.
117. Iwakura, Y., *Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2002. **13**(4): p. 341-355.
118. Lee, Y.-M., et al., *IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions*. International Immunology, 2010. **22**(10): p. 805-816.
119. Rabadjija, L. and P. Goldhaber, *Age-dependent stimulation or inhibition of calcium release from bone cultures by interleukin-1 beta*. Mech Ageing Dev, 1995. **81**(2-3): p. 83-95.
120. Wang, T. and C. He, *TNF- α and IL-6: The Link between Immune and Bone System*. Curr Drug Targets, 2020. **21**(3): p. 213-227.

121. Mo, Q., et al., *Regulation of osteogenic differentiation by the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α : current conclusions and controversies*. Human Cell, 2022. **35**(4): p. 957-971.
122. Abbas, S., et al., *Tumor necrosis factor- α inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor*. Cytokine, 2003. **22**(1): p. 33-41.
123. Zhang, Y.-H., et al., *Tumor Necrosis Factor- α (TNF) Stimulates RANKL-induced Osteoclastogenesis via Coupling of TNF Type 1 Receptor and RANK Signaling Pathways**. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(1): p. 563-568.
124. Zhou, F.H., et al., *TNF- α Mediates p38 MAP Kinase Activation and Negatively Regulates Bone Formation at the Injured Growth Plate in Rats**. Journal of Bone and Mineral Research, 2009. **21**(7): p. 1075-1088.
125. Hess, K., et al., *TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- κ B signaling pathway*. Bone, 2009. **45**(2): p. 367-376.
126. Lu, Z., et al., *Short-Term Exposure to Tumor Necrosis Factor-Alpha Enables Human Osteoblasts to Direct Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic Differentiation*. Stem Cells and Development, 2012. **21**(13): p. 2420-2429.
127. Dankbar, B., et al., *Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice*. Nature Medicine, 2015. **21**(9): p. 1085-1090.
128. Hamrick, M.W., et al., *Loss of myostatin (GDF8) function increases osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells but the osteogenic effect is ablated with unloading*. Bone, 2007. **40**(6): p. 1544-1553.
129. Bialek, P., et al., *A myostatin and activin decoy receptor enhances bone formation in mice*. Bone, 2014. **60**: p. 162-171.
130. Oestreich, A.K., et al., *Myostatin deficiency partially rescues the bone phenotype of osteogenesis imperfecta model mice*. Osteoporosis International, 2016. **27**(1): p. 161-170.
131. Tang, M., et al., *Interferon-Gamma-Mediated Osteoimmunology*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1508.
132. Lai, J.H., et al., *Interferon-gamma regulates the levels of bone formation effectors in a stage-dependent manner*. Mol Biol Rep, 2022. **49**(12): p. 12007-12015.
133. Wang, Z., et al., *The positive effects of secreting cytokines IL-17 and IFN- γ on the early-stage differentiation and negative effects on the calcification of primary osteoblasts in vitro*. International Immunopharmacology, 2018. **57**: p. 1-10.
134. Duque, G., et al., *Autocrine Regulation of Interferon γ in Mesenchymal Stem Cells Plays a Role in Early Osteoblastogenesis*. Stem Cells, 2009. **27**(3): p. 550-558.
135. Yamaguchi, T., et al., *Proinflammatory M1 Macrophages Inhibit RANKL-Induced Osteoclastogenesis*. Infect Immun, 2016. **84**(10): p. 2802-12.
136. Choi, Y. and J.J. Kim, *B cells activated in the presence of Th1 cytokines inhibit osteoclastogenesis*. Experimental & Molecular Medicine, 2003. **35**(5): p. 385-392.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei dem lieben Gott bedanken, bei meinen besten Eltern auf der ganzen Welt und meiner einzigen und besten Tante, die immer bei mir sein wird und wie eine zweite Mutter für mich gewesen ist. Danke an meine Eltern, dass sie in guten und schlechten Zeiten immer für mich da waren und mich zu dem jetzigen Menschen geformt haben, der ich heute bin. Danke euch für eure endlose Mühe und Aufopferung, mit denen ich diesen Weg erst gehen konnte. Ohne euch wäre ich nicht an der Stelle, an der ich jetzt bin, und kann nur ansatzweise versuchen, euch etwas davon zurückzugeben.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek für die fantastische Betreuung während meiner Doktorarbeit. Ihm und dem ganzen Team des Labors der Orthopädie und Unfallchirurgie des Uniklinikums Düsseldorf danke ich für die wertvolle, lehrreiche und spaßige Zeit im Labor. Vielen Dank dabei an Juliana Bousch, Jutta Schneider, Samira Seghrouchni, Christa Wilkens und Matthis Schnitker. Danke für die Wertschätzung, die von euch vermittelte Menschlichkeit und Hilfsbereitschaft im Labor.

Ich danke meinen engsten Freunden Muris, Selim und Enes aus meinem Geburtsort Kamp-Lintfort, mit denen ich aufgewachsen bin und so vieles schon erlebt habe. Ein weiteres Dankeschön geht an meine engsten Freunde Amir, Husein, Emina und Lejla aus meiner neuen Heimat Düsseldorf, die für mich immer da gewesen sind und mich stets unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt auch meinen engsten Freunden Armin und Amar für alles, was ich mit euch in kurzer Zeit schon erlebt habe. Danke, dass ich euch alle als großartige und loyale Menschen kennenlernen durfte. So Gott will, bleiben wir alle gesund, werden zusammen alt und sammeln noch viele Erinnerungen miteinander.