

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen

Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**Einfluss monozytärer Zellen auf die diabetische
Frakturheilung**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Biermann, Sara

2020

Dekan (komm.): Professor Dr. D. Wallwiener

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Ullrich

Tag der Disputation: 08.05.2020

Für meine Familie und meine Freunde

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	5
1.1 Knochen.....	6
1.1.1 Makroskopischer Aufbau des Knochens.....	6
1.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens.....	7
1.1.3 Knochenzellen	7
1.1.4 Differenzierung von Knochenzellen	8
1.1.5 Knochenmatrix.....	9
1.1.6 Knochenstoffwechsel.....	9
1.2 Fraktur.....	11
1.2.1 Inflammation	12
1.2.2 Reparatur und Kallusbildung	14
1.2.3 Remodeling	14
1.3 Diabetes.....	15
1.4 Diabetes und Knochen	17
1.4.1 Diabetische Frakturheilung	18
1.5 Monozytäre Zellen.....	20
1.5.1 Veränderungen bei Diabetes	21
1.6 Vorarbeiten.....	22
2 Zielsetzung	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Zellkultur primärer humaner Osteoblasten, PBMCs und THP-1-Zellen.....	26
3.1.1 Isolation primärer humaner Osteoblasten.....	26
3.1.2 Kultivierung von THP-1-Zellen.....	27

3.1.3	Isolation von PBMCs	27
3.1.4	Kultivierung und Subkultivierung der humanen Zellen und Zelllinien 28	
3.1.5	Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Substanzen.....	28
3.2	Messung des Resazurinumsatzes von humanen Osteoblasten.....	29
3.3	Messung der AP-Aktivität von humanen Osteoblasten	30
3.4	Färbung von Osteoblasten mit Alizarin-Rot.....	30
3.5	Färbung von Osteoblasten mit der von Kossa-Methode	31
3.6	„Scratch Assay“	31
3.7	Fraktionierung des THP-1-Überstandes.....	32
3.7.1	Silberfärbung zur Kontrolle der Fraktionierung	32
3.8	Westernblot	33
3.8.1	Gewinnung von Proteinlysaten	33
3.8.2	Messung der Proteinkonzentration nach Lowry	33
3.8.3	Probenvorbereitung	34
3.8.4	Gelelektrophorese	34
3.8.5	Tank Blot	35
3.8.6	Färbung mit Ponceau	36
3.8.7	Antikörperinkubation.....	36
3.8.1	Detektion des gebundenen Antikörperkomplexes mittels ECL	37
3.9	Intracellular Signaling Array	37
3.10	IL-6-ELISA	38
3.11	Zytokinarray	38
3.12	Statistische Auswertung.....	39
4	Ergebnisse.....	40

4.1	Der Überstand von THP-1-Zellen hat einen positiven Effekt auf die Funktion und Migration von phOB.....	40
4.1.1	Der Überstand von THP-1-Zellen verbessert die osteogene Differenzierung von phOB.....	40
4.1.2	Der Überstand monozytärer Zellen fördert die Migration von phOB 41	
4.1.3	Kein Proliferationsnachweis bei Stimulation der phOB mit THP-1-Überstand	44
4.1.4	Zusammenfassung 1: Einfluss monozytärer Zellen auf die Frakturheilung.....	45
4.2	Rolle von Hyperglykämie beim Einfluss monozytärer Zellen auf den Knochen.....	46
4.2.1	Hyperglykämie verringert den positiven Einfluss von THP-1-Zellen auf die AP-Aktivität phOB nicht.....	46
4.2.2	Hyperglykämie verändert den positiven Einfluss des THP-1-Überstandes auf die Migrationsfähigkeit phOB nicht	48
4.2.3	Zusammenfassung 2: Hyperglykämie verändert den Einfluss von monozytären Zellen auf die Frakturheilung nicht	49
4.3	Identifikation möglicher intrazellulärer Regulations-mechanismen für die Wirkung von THP-1-Überstand auf phOB.....	50
4.3.1	Identifikation der aktivierten MAP-Kinasen und Optimierung der Stimulationszeit.....	50
4.3.2	Inhibition der MAP-Kinasen im „Scratch Assay“	51
4.3.3	Identifikation von MAP-Kinasen und STAT Signalwegen bei Stimulation von phOB mit THP-1-Überstand mithilfe des PathScan® „Intracellular Signaling Array“.....	53
4.3.4	Verminderte Aktivierung von Erk1/2 in phOB nach Stimulation hyperglykämisch kultivierter THP-1-Zellen.....	57

4.3.5	Zusammenfassung 3: Identifikation von MAP-Kinasen und STAT-Signalwegen als mögliche regulatorische Mechanismen des Einflusses monozytärer Zellen auf den Knochen	59
4.4	Identifikation der durch PBMCs und THP-1-Zellen exprimierten Zytokine	59
4.4.1	Migration von phOB ist bei Stimulation mit unterschiedlichen Fraktionen des THP-1-Überstandes nicht verbessert	59
4.4.2	Kein Einfluss von IL-6 auf die Funktion von phOB.....	61
4.4.3	Vermehrte Expression von IL-6 aus PBMCs	63
4.4.4	Verändertes Zytokinprofil bei T2DM und hyperglykämisch kultivierten THP-1-Zellen	64
4.4.5	Zusammenfassung 4: T2DM und Hyperglykämie verändert das Zytokinprofil von TGF- β_1 , OSM, OPG und TNF- α	72
5	Diskussion	73
5.1	Diskussion der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	73
5.1.1	Überstand von monozytären Zellen hat einen positiven Effekt auf phOB	73
5.1.1	Positiver Einfluss monozytärer Zellen auf die Frakturheilung ist unter Hyperglykämie nicht verändert	75
5.1.2	Erk1/2-Aktivierung spielt bei der verbesserten Frakturheilung durch monozytäre Zellen eine Rolle	77
5.1.3	Einfluss, der von monozytären Zellen exprimierten Zytokine.....	81
5.1.1	Veränderter Einfluss von monozytären Zellen bei der diabetischen Frakturheilung durch ein verändertes Zytokinprofil	88
5.2	Diskussion weiterer Hypothesen	96
5.2.1	Sind bei T2DM weniger monozytäre Zellen im Frakturspalt anwesend?	96
5.3	Limitierung der Arbeit	97

5.3.1	„Scratch Assay“ als <i>in vitro</i> Frakturmodell	97
5.3.2	Fraktionierung.....	99
5.3.3	Darstellung von Diabetes im Modell	100
6	Ausblick	102
7	Zusammenfassung	104
8	Literaturverzeichnis.....	106
9	Abbildungsverzeichnis	118
10	Tabellenverzeichnis.....	121
11	Erklärung zum Eigenanteil.....	122
12	Veröffentlichungen.....	123
13	Danksagung	124
14	Anhang.....	125
14.1	Material und Geräte	125
14.1.1	Geräteliste	125
14.1.2	Materialienliste	126
14.1.3	Chemikalienliste	127
14.1.4	Antikörper und Kits	130
14.1.5	Softwareliste.....	131
14.2	Lizenzen für Abbildungen.....	131
14.2.1	Lizenz für Abbildung 1:.....	131
14.2.2	Lizenz für Abbildung 2:.....	131
14.2.3	Lizenz für Abbildung 3:.....	133
14.2.4	Lizenz für Abbildung 4:.....	133
14.2.5	Lizenz für Abbildung 5:.....	133
14.3	Bildanhang.....	134

14.3.1	Bildanhang: Beispielhafte Standardkurve zur Berechnung der AP-Aktivität	134
14.3.2	Bildanhang: Beispielhafte Standardkurve für die Proteinmessung nach Lowry	134
14.3.3	Bildanhang: Der Überstand monozytärer Zellen fördert die Migration von phOB	135
14.3.4	Bildanhang: Einfluss von PBMC-Überstand auf phOB	136
14.3.5	Bildanhang: Mannitol zeigt keinen Einfluss auf die Funktion humaner Osteoblasten.....	136
14.3.6	Bildanhang: Regelmäßige Panceau-Färbung bei Westernblots 137	
14.3.7	Bildanhang: Aktivierung von Bad, p38 und Erk1/2 durch SB 203580 und U0126	138
14.3.8	Bildanhang: Spendervariabilität bei Stimulation der phOB mit Fraktionen des THP-1-Überstandes	139
14.3.9	Bildanhang: Trennung in vorgegebene Proteinfractionen konnte durch Gelelektrophorese und Silberfärbung nicht gezeigt werden.....	140
14.3.10	Bildanhang: Expression der Zytokine aus monozytären Zellen ist unabhängig von Kultivierungszeitpunkt und Zellzahl	141

Abkürzungsverzeichnis

+I	+Insulin
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADA	American Diabetes Assosiation
AGEs	Advanced Glycation End Products
AMPK α	AMP-aktivierte Proteinkinase
AP	Alkalische Phosphatase
Bad	Bcl-2-Antagonist-of-Cell-Death
BDNF	Brain-Derived Neutrotropic Factor
BMD	Bone Mineral Density
BMP	Bone Morphogenic Protein
ca.	Circa
Cbfa1	Core-binding factor alpha 1
Ck	Kreatinkinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ENA-78	Epithelial-Derived Neutrophil-Activating Protein 78
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	Extracellular Signal-Regulated Kinases
EZM	Extrazellularmatrix
FCS	Fetales Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

FGF	Fibroblast Growth Factor
FOXO	Forkhead-Box Protein O
G	Gramm/ Zentrifugalkraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCP-2	Gamma-Tubulin Complex Protein 2
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GDNF	Glia Cell line-Derived Neurotrophic Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GRO	Growth-regulated oncogen
GSK-3	Glykogensynthetase-Kinase 3
H ₂ O	Wasser
HG	Hyperglykämie
Hsp 27	Heat Shock Protein 27
IFN	Interferon
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding-Protein
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-gamma induced Protein 10 kD
KHK	koronare Herzkrankheiten
KM	Knochenmark
KO	knock out
L	Liter
LIF	Leukämiehemmender Faktor
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MDC	Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein
Mg	Miligramm
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MIG	Monokine Induced by Gamma-Interferon
Min	Minute
Mio	Milionen

Abkürzungsverzeichnis

MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MI	Milliliter
mmol/mM	Millimol
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
mTOR	Mechanic Target of Rapamycin
N	Biologische Replikat
N	Technische Replikat
NFκB	Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NG	Normoglykämie
NT	Neutropin
OB	Osteoblasten
OC	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OSM	Oncostatin M
OSX	Osterix
OZ	Osteozyten
PARP	Poly (ADP-ricose)-Polymerase
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
phOB	Primäre humane Osteoblasten
PLGF	Placenta-like Growth Factor
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMNs	Polymorphe Nukleäre Neutrophile
PPARγ2	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ2
PTH	Parathormon
RANKL	Receptor Activator of NFκB Ligand
RANTES	Regulated And Normal T-cell Expressed and Secreted

Abkürzungsverzeichnis

Rh	recombinant human
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt-related Transcription Factor 2
SAPK/JNK	Stress-Activated Phospho-Kinases/ c-Jun N-terminale Kinasen
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SOCS	Suppressor of Cytokine Signalling
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thyreoperoxidase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	Unter anderem
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

Diabetes mellitus (DM) ist eine der häufigsten Stoffwechselkrankheiten in den heutigen Industriestaaten [1, 2].

DM „ist eine Gruppe heterogener Erkrankungen mit dem gemeinsamen Merkmal der chronischen Hyperglykämie“ (Definition aus Herold, Innere Medizin) [3]. Dabei liegt die Ursache in einer Störung der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder einer Kombination aus beidem [3].

Die Zahl der betroffenen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) in Deutschland wird von der Deutschen Diabetes Gesellschaft auf ca. 6,5 Millionen (Stand 2011) geschätzt.

Neben den häufigen Diabetesfolgeerkrankungen, wie diabetische Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie, diabetisches Fußsyndrom, hypoglykämischer Schock, Coma diabeticum, KHK, ischämischer Apoplex und pAVK, gibt es großes Interesse an den T2DM-abhängigen Knochenveränderungen und der damit verbundenen Behandlung von Frakturen. Diverse Studien weisen auf ein erhöhtes Frakturrisiko und eine Verschlechterung der Frakturheilung von Patienten mit DM hin [4-6].

In der Abteilung für Unfallchirurgie der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen leidet fast jeder 10. hospitalisierte Patient an Diabetes und die Liegedauer dieser Patienten ist nach einer Fraktur oft verlängert [5].

Zur Verbesserung der Knochenqualität von Diabetikern und zur Reduzierung des Frakturrisikos sowie zur Verbesserung der postoperativen Versorgung der Frakturen in diesem Patientenkollektiv, bedarf es in erster Linie jedoch einem grundlegenden Verständnis der Unterschiede zwischen der Frakturheilung bei DM-Patienten und gesunden Patienten [5, 7-9].

Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess, in dem besonders in der frühen Phase inflammatorische Zytokine, Granulozyten und Monozyten einen wichtigen Teil zur Initiierung des Knochenwiederaufbaus leisten [10, 11]. Die Rolle von monozytären Zellen ist dabei unumstritten aber nicht hinreichend erklärt [12].

Eigene Voruntersuchungen weisen darauf hin, dass monozytäre Zellen ein wichtiges Bindeglied darstellen, um die verschlechterte Frakturheilung bei Typ 2

Diabetikern zu erklären (Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades von Larissa Meyer, 2018, Universität Tübingen [13]).

1.1 Knochen

Knochengewebe ist ein hochspezialisierter Komplex und besteht aus mehreren gewebespezifischen Zelltypen (Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten) sowie mineralisierter Extrazellulärmatrix (EZM). Der Knochen ist in der Lage, sich kontinuierlich zu regenerieren und sich an äußere Einflüsse, wie mechanische Beanspruchung, anzupassen. Aufgrund der Festigkeit bieten die 213 Knochen des menschlichen Körpers ein stabiles und stützendes Gerüst, um Muskeln und Sehnen zu verankern und Organe, wie zum Beispiel Herz und Lunge, zu schützen. Durch die anorganischen Bestandteile der Extrazellulärmatrix ist der Knochen ein wichtiger Speicher für den Mineralstoff- und Säure-Basen-Haushalt [14, 15].

1.1.1 Makroskopischer Aufbau des Knochens

Ein Röhrenknochen, wie beispielsweise die Tibia, wird eingeteilt in die Diaphyse, Metaphyse und die am Knochenende liegenden Epiphysen [15, 16]. Zwischen Epiphyse und Diaphyse liegt die knorpelige Wachstumsfuge. Im Bereich der Diaphyse liegt das Gewebe als fester kortikaler Knochen und im epiphysären Teil in trabekulärer Form vor [15, 17].

Der Knochen ist im Inneren mit knochenmarkenthaltender Spongiosa gefüllt. Im Knochenmark werden hämatopoetische Stammzellen gebildet [14].

Das Endost bedeckt die innere Knochenoberfläche und ist eine dünne Schicht von nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen und mesenchymalen Stammzellen, sowie Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Diese Zellen können bei Bedarf aktiviert werden und für das „Remodeling“ des Knochens genutzt werden [15, 18].

Das Periost bedeckt die äußere Knochenoberfläche und ist eine straffe, bindegewebige Schicht. Sie beinhaltet ebenfalls mesenchymale Stammzellen und knochenspezifische Zellen. Das Periost ist reich vaskularisiert, innerviert und sehr schmerzempfindlich [15, 17, 19].

1.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens

Die kleinste funktionelle Einheit des Knochens ist das Osteon. Es besteht aus dem mittig gelegenen Havers-Kanal, der von konzentrischen Knochenlamellen umgeben ist. Innerhalb des Knochenkanals liegt ein Blutgefäß [15, 17].

Es werden zwei Typen der Gewebeformation des Knochens anhand ihres Aufbaus unterschieden. Im unorganisierten Geflechtknochen sind die Kollagenfibrillen in Bündeln angeordnet und geflechtartig verbunden [15, 18, 20]. Dieser wird in der Regel, aufgrund der unzureichenden Organisation und der daraus resultierenden verminderten Biege-, Druck und Zugfestigkeit, in hochorganisierten Lamellenknochen umgewandelt [20]. Um sich an die mechanische Belastung anzupassen befindet sich das Knochengewebe im kontinuierlichen Umbauprozess [15, 20, 21].

1.1.3 Knochenzellen

Die multizelluläre Einheit im Knochen ist komplex reguliert und durch die Interaktion der einzelnen zellulären Komponenten am ständigen Auf- und Abbau des Gewebes beteiligt. Osteoklasten sind die einzigen Zellen, die in der Lage sind, den Knochen zu resorbieren und damit seinen Umbau zu gewährleisten. Damit kann dem Körper u.a. benötigtes Kalzium und Phosphat zur Verfügung gestellt werden. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die sich aus mononukleären Vorläuferzellen entwickeln [22].

Osteoid produzierende Osteoblasten (OB) hingegen sind die anabolen Gegenspieler der Osteoklasten. OB entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark. Sie sind in der Lage, Knochenmatrix zu bilden und können damit dem Knochengewebe eine Struktur geben. In der aktiven Form sind sie kubisch und haben einen großen Anteil an rauem Endoplasmatischem Retikulum [18]. Aktive und funktionsfähige OB zeichnen sich unter anderem durch die Expression von Alkalischer Phosphatase (AP) aus [15]. Die Zellen haben eine festgelegte Polarität, wobei die AP auf der apikalen, synthetisierenden Seite der Zelle zu finden ist [18].

Osteozyten stellen die letzte Differenzierungsstufe von OB dar. Sie liegen in Lakunen, zwischen mineralisierter Matrix eingemauert, vor. Sie stehen über

Zellausläufer miteinander im Zellkontakt und sind besonders für die Mechanosensitivität des Knochens von Bedeutung [21, 23, 24].

1.1.4 Differenzierung von Knochenzellen

Die Differenzierung von Osteoblasten verläuft zunächst im Knochenmark. Mesenchymale Stammzellen (MSCs) entwickeln sich unter dem Einfluss von „Runx-related Transcription Factor 2“ (RUNX2) und Osterix (OSX) zu Präosteoblasten. Durch anhaltenden Einfluss von RUNX2 differenzieren die Zellen zu kompetenten Osteoblasten aus [25]. Andere wichtige Transkriptionsfaktoren sind Cbfa1 und ATFe [26]. Während der Differenzierung induziert RUNX2 die Expression von Kollagen Typ 1 (COL1), Osteopontin (OPN), Bone Sialoprotein (BSP) und AP sowie Osteocalcin (OC) [25, 26] (s. Abbildung 1).

Ein wichtiger Regulationsmechanismus für die osteogene Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten ist die Aktivierung von MAP-Kinasen. Besonders die Aktivierung von p38 führt zu einer erhöhten AP-Aktivität. Die Aktivierung von Erk1/2 verbessert ebenfalls die Funktion von Osteoblasten [27] und begünstigt zusätzlich die Proliferation [28]. Auch eine Aktivierung des Wnt- und Hedgehog-Signalweges sind für die Differenzierung förderlich [21]. Neben anderen Wachstumsfaktoren sind bspw. die zur TGF- β ₁-Familie gehörenden BMPs wichtige Einflussfaktoren der osteogenen Differenzierung [9, 26, 27, 29, 30].

Für die Ausdifferenzierung vom Osteoblasten zum Osteozyten ist dann die Herunterregulierung von RUNX2 und folgende Heraufregulierung von OSX essentiell [25].

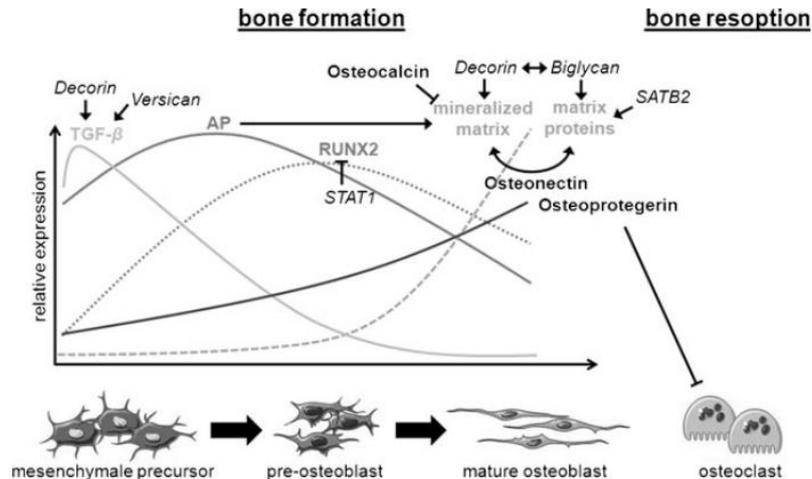


Abbildung 1: Schematischer Überblick der Veränderungen während der Knochenreifung
 aus „Hyperinsulinemia reduces osteoblast activity in vitro via upregulation of TGF-beta“ [9] (Lizenz S. 14.2.1)

1.1.5 Knochenmatrix

Das Knochengewebe besteht zu 20-40% aus organischen Kollagenfibrillen. Dazu gehört zu einem Großteil Kollagen Typ I sowie Typ II und Typ V. Ebenso werden Matrix-organisierende Proteine wie Osteocalcin (OC) und Osteopontin (OPN) synthetisiert [18].

Mit 50-70% hat die anorganische mineralisierte Matrix den größten Anteil am Knochengewebe. Zum Großteil besteht die anorganische Matrix aus Hydroxylapatit-Kristallen. Zusätzlich werden Carbonate, Magnesium und Phosphat in die Matrix eingebaut [15].

1.1.6 Knochenstoffwechsel

Das hochaktive Knochengewebe unterliegt kontinuierlichen Umbauprozessen und wird durch eine Vielzahl von Zytokinen und Hormonen beeinflusst [26, 31]. Das sogenannte Remodeling verhindert Materialermüdung, dient der Reparatur von Mikroschäden und trägt zur Anpassung der Materialmenge sowie der Spongiosa-Architektur an die mechanische Beanspruchung, bei [15, 18, 31].

Da der Knochen als wichtigster Speicher für Calcium dient, kann durch das Remodeling das Elektrolyt wieder für den peripheren Bedarf bereitgestellt werden [31].

Durch einen initialen Reiz, wie beispielsweise mechanische Beanspruchung, beginnen aktivierte Osteoblasten und MSCs, Zytokine, wie M-CSF und RANK-L

zu sezernieren. Daraufhin werden Osteoklasten aktiviert und die Progenitorzellen beginnen zu proliferieren [32].

RANK ist ein membranständiges Protein der Monozyten und Osteoklasten. Die Bindung von RANKL an RANK führt zur Fusion der mononukleären Zellen und zur Osteoklastendifferenzierung. Zusätzlich verhindert die RANK-RANK-L-Interaktion die Apoptose der Osteoklasten [15, 22, 33].

Um die Interaktion zwischen RANK und RANK-L zu blockieren und damit die Osteoklastogenese zu drosseln, sezernieren Osteoblasten das mit RANK-L interagierende Osteoprotegerin (OPG) (s. Abbildung 2) [33].

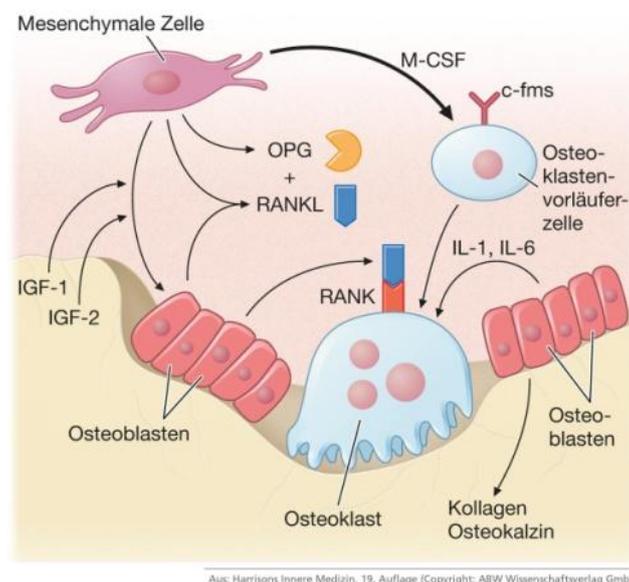


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Knochenstoffwechsels

aus Scharla S. 426-e Paget-Krankheit und andere Knochendysplasien. In: Suttrop N, Möckel M, Siegmund B *et al.*, Hrsg. Harrisons Innere Medizin. 19. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag; 2016.4 (Lizenz s. 14.2.2.)

Der Knochenumbau (Remodeling) ist ein Prozess, bei dem alter Knochen von Osteoklasten entfernt wird und durch neue Knochensubstanz ersetzt wird [15]. Der Knochenabbau und -umbau wird von den Osteoklasten eingeleitet. Diese resorbieren das Knochenmaterial durch die Bildung von H^+ -Ionen und anderen Proteinen wie Matrix Metalloproteinase 9, Cathepsin K und Gelatinase [15]. In den Bohrkanal migrieren Monozyten, freigesetzte Osteozyten und Präosteoblasten [15]. Osteoblasten bilden am äußeren Rand des Bohrkanals die erste Osteoid-Lamelle und beginnen somit ein konzentrisch aufgebautes Osteon nach innen zu vervollständigen. Dabei mauern sich die Zellen in das

selbst produzierte Osteoid ein und werden zu Osteozyten. Im Inneren bleibt der von Endost ausgekleidete Havers-Kanal zurück [15, 17, 20, 34].

Der Knochenstoffwechsel wird durch eine Vielzahl von Regulationsmechanismen kontrolliert. Dazu gehören vor allem Hormone und Wachstumshormone [31].

Glucokortikoide haben z.B. einen katabolen Effekt auf den Knochen. Sie hemmen die Aktivität von Osteoblasten und wirken gleichzeitig antiapoptotisch auf Osteoklasten [35]. Hormone im Mineralstoffhaushalt wie das Parathormon (PTH) schützen die Osteoblasten vor Apoptose [36]. PTH ist aber besonders für die Bereitstellung von Kalzium und dem damit zusammenhängenden Knochenabbau verantwortlich. Das Hormon wird in der Nebenschilddrüse gebildet und bei Hypokalziämie ausgeschüttet. Dieser Reiz führt zum Abbau des Knochens durch die Osteoklasten. Androgene und Calcitriol hemmen Osteoklasten und fördern, durch die Aktivierung von Osteoblasten, den Knochenaufbau [3, 31, 37].

1.2 Fraktur

Bei einer Überschreitung der Knochenstabilität in Längs- oder Querrichtung, kommt es unter Bildung einer oder mehrerer Knochenfragmente, zu einer Fraktur. Knochengewebe ist jedoch in der Lage, sich zu regenerieren und im Rahmen der Frakturheilung die Kontinuität des Knochens wiederherzustellen [37-39].

Frakturheilung ist ein komplexer, hoch regulierter Prozess, der kurz aufeinanderfolgende und sich teilweise überlappende Phasen von Inflammation, Reparatur und Remodeling (s. Abbildung 3) beinhaltet [11].

Damit Frakturheilung gelingt muss die Durchblutung intakt, die Fragmente ruhiggestellt und der Kontakt der Fragmente gegeben sein. Man unterscheidet dabei zwischen primärer Frakturheilung, bei der durch osteosynthetische Stabilisierung eine Kallusbildung vermieden wird und sich das Gewebe direkt remodelliert, und der sekundären, indirekten Frakturheilung. Bei der sekundären Frakturheilung kommt es zunächst zur Ausbildung eines Frakturhämatoms. Später wird anhand der Vorlage eines, erst knorpeligen und später geflechtknöchernen Kallus, der Knochen wieder aufgebaut. Dieser kann

zu hochqualitativem Lamellenknochen umgebaut werden [11, 37-39]. Im Folgenden wird die sekundäre Frakturheilung und im Besonderen die ersten Phasen dieses Prozesses näher beleuchtet.

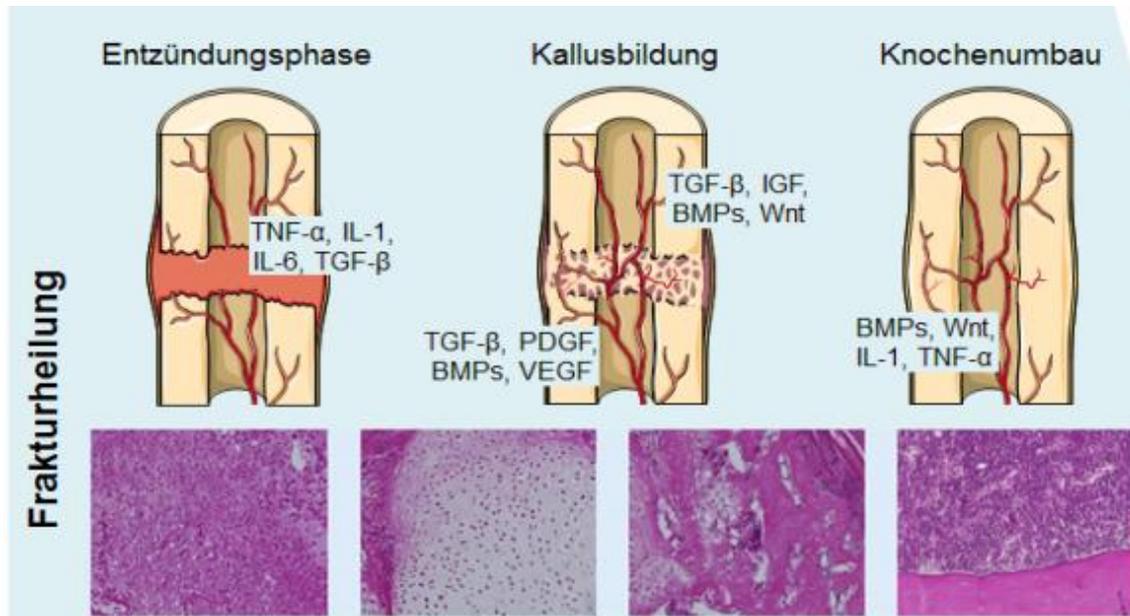


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Schritte in der sekundären Frakturheilung

Schematische Darstellung von Dr. S. Ehnert; Bildmaterial aus dem Siegfried-Weller-Institut der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen und Graphiken von https://smart.servier.com/smart_image/bone-fracture-13/ 07/2019 (frei verfügbar: Creative Commons Attribution 3.0)

1.2.1 Inflammation

Durch die Fraktur kommt es zur Ruptur von Blutgefäßen innerhalb des Knochens und im umliegenden Weichteilmantel. Dadurch strömt Blut in den Frakturspalt. Aufgrund des Gewebeüberzugs mit Fibrin, welches durch die entstandene Gewebelücke in Fibrinogen umgewandelt wird, kann sich im Frakturspalt das einströmende Blut zum Frakturhämatom organisieren [39, 40]. Die im Frakturspalt herrschenden Bedingungen von Hypoxie und Azidose leiten die Phase der Inflammation ein [11, 41, 42]. Das Immunsystem spielt eine große Rolle in der Regeneration von Gewebe, sowie in der Frakturheilung [43]. Angelockt von toten Zellen und Zelltrümmern, migrieren zunächst kurzlebige polymorphe nukleäre Neutrophile (PMNs) in den Frakturspalt (s. Abbildung 4) und sezernieren Chemokine und Zytokine [11, 12, 44, 45]. In der initialen, ca. dreitägigen inflammatorische Phase werden vor allem proinflammatorische

Zytokine wie TNF- α , IL-1, -6, -8, -11 und INF- γ sezerniert [11, 12, 39, 44, 46]. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die Konzentration von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1-Rez.-Antagonist und IL-10, und die Konzentration von anderen Chemokinen, wie MCP-1, MIP-1 α und VEGF, nach einer Fraktur erhöht sind [44]. Die Ausschüttung der Zytokine führt im Verlauf zur Migration von Monozyten und Makrophagen in den Frakturspalt (s. Abbildung 4) [47].

Diese spielen besonders in der frühen inflammatorischen Phase der Frakturheilung eine wichtige Rolle. Eine Hemmung der Migration der monozytären Zellen in den Frakturspalt oder eine Hemmung der Zellfunktion (KO-Mausmodell) generell führt zu einer deutlich verschlechterten Frakturheilung [12, 47, 48].

Early inflammatory pathway in fracture repair

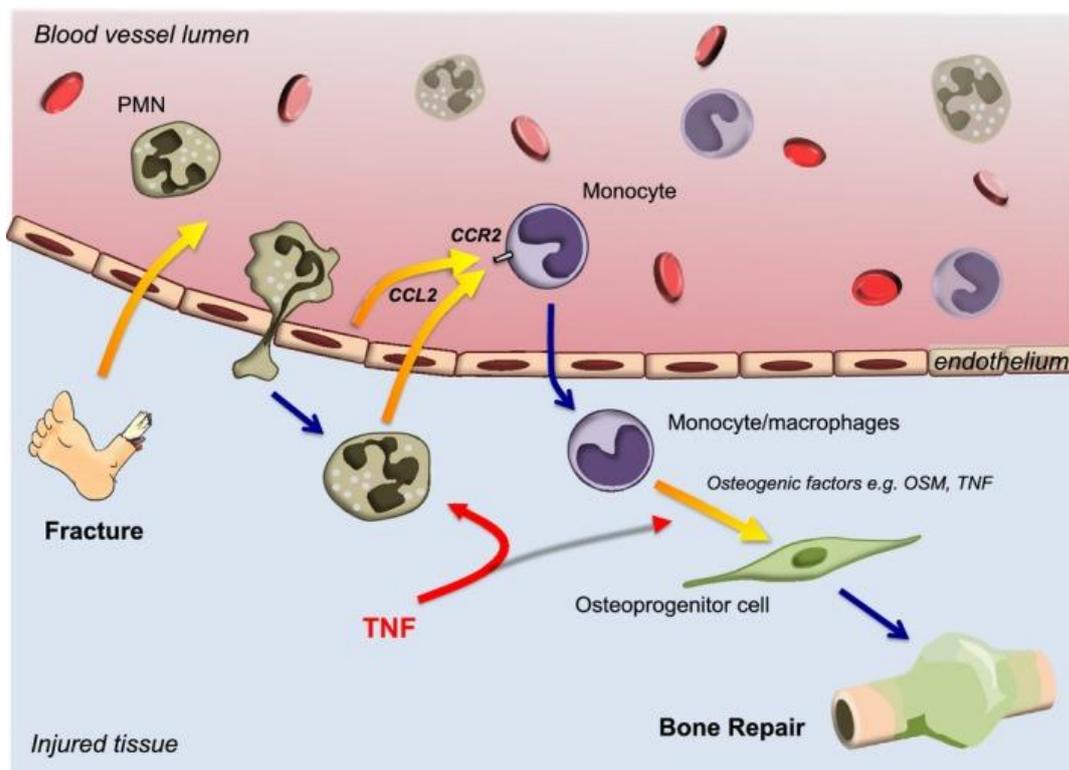


Abbildung 4: Modell der frühen Inflammatorischen Phase im Frakturspalt
 aus „Low-dose TNF augments fracture healing in normal and osteoporotic bone by up-regulating the innate immune response“ [12] (Graphik im Rahmen des Open Access frei verfügbar [http://embomolmed.embopress.org/content/7/5/547.long (20.03.2019)] (s. 14.2.4.)

Das komplexe Zusammenspiel zwischen zellulären und humoralen Bestandteilen während der inflammatorischen Phase ist in Abbildung 4 vereinfacht dargestellt.

Die Inflammation im Rahmen der Frakturheilung führt letzten Endes zur Rekrutierung von MSCs, die zu Kallus bildenden Chondrozyten differenzieren [49].

1.2.2 Reparatur und Kallusbildung

Wird ein Knochenbruch nicht operativ fixiert und bleibt ein Frakturspalt erhalten, ist das Gewebe in der Lage, diesen Spalt durch enchondrale und intermembranäre Knochenheilung wiederherzustellen [50]. Als Modell des zukünftigen Knochenkallus bildet sich zunächst ein knorpeliger Kallus durch MSCs aus dem Knochenmark und Blut. Diese differenzieren zu Chondroblasten und produzieren die Knorpel-Matrix [11, 37].

Makrophagen sind existenziell für die Initiation und das Voranschreiten der enchondralen Ossifikation im Rahmen der periostalen Kallusbildung während der Frakturheilung [48, 51]. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass bei Depletion der Makrophagen die Kallusbildung, je nach Zeitpunkt, komplett zum Erliegen kommt oder signifikant reduziert ist. Die Stimulation mit CSF-1, welche zur verstärkten Differenzierung von Makrophagen führt, erhöht hingegen signifikant die Kallusbildung und führt somit zu einer verbesserten Frakturheilung [51]. Für die Kallusbildung im Rahmen der enchondralen Ossifikation ist zudem die Angiogenese wichtig. Dabei konnte gezeigt werden, dass VEGF synergistisch mit BMP-2 und BMP-4 agiert [52].

1.2.3 Remodeling

Abgeschlossen wird die Frakturheilung mit der Phase des Knochenumbaus in ein vollständig funktionsfähiges und differenziertes Gewebe (s.1.1.6.) [15, 20, 37].

1.3 Diabetes

Diabetes mellitus bezeichnet eine heterogene Gruppe von metabolischen Erkrankungen, die als Gemeinsamkeit eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels haben [2, 3]. Nach der WHO und ADA Klassifikation unterscheidet man Typ 1-Diabetes (T1DM), Typ 2-Diabetes (T2DM) und andere Diabetesformen, wie beispielsweise MODY, medikamentös induzierte oder infektionsbedingte Diabetesformen, sowie den Gestationsdiabetes.

Laut der Deutschen Diabetes Gesellschaft hat die Prävalenz der Erkrankung weltweit epidemische Ausmaße angenommen. Die Zahl der Diabetiker im Jahr 2000 wurde weltweit auf 171 Millionen geschätzt. Allerdings wird die Prävalenz im Jahr 2030 schätzungsweise bereits auf 366 Millionen steigen [53]. Im Alter von unter 50 Jahren ist die Lebenszeitprävalenz bei 2-3%, im Alter von über 60 Jahren bei 15% und bei über 70 Jahren sogar bei 22% [3]. 90% davon sind von T2DM betroffen und die Zahl der Patienten in einer Population steigt mit deren Ausmaß an Adipositas und Bewegungsmangel [3].

Der T1DM unterliegt pathophysiologisch einer autoimmunen Zerstörung der β -Zellen des Pankreas und in Folge dessen eines absoluten Insulinmangels. Im Unterschied dazu ist die Pathophysiologie des hier im Fokus stehenden T2DM multifaktoriell und wird durch eine gestörte Insulin- und Glukagonsekretion, Apoptose der β -Zellen und eine herabgesetzte Insulinwirkung bzw. periphere Insulinresistenz begünstigt [1, 2, 54, 55].

Risikofaktoren für T2DM sind ein erhöhtes Körpergewicht, körperliche Inaktivität, schlechte Ernährung und genetische Faktoren [55, 56]. Das metabolische Syndrom, bestehend aus Adipositas, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, gestörter Glukosetoleranz, Dyslipoproteinämie und Albuminurie sowie Hypertonie ist ebenfalls relevant für die Entstehung des T2DM [1, 2].

Durch die periphere Insulinresistenz steigt der Blutzucker an. Zunächst kommt es zu einer verstärkten Insulinsekretion aus den β -Zellen, die bei Fortschreiten der Genese durch Zerstörung und Apoptose der Pankreaszellen stagniert. Angenommen wird, dass ein Verlust von 50-65% β -Zellen zur Manifestation des T2DM führt. Durch den Insulinmangel werden Glykogenolyse und

Glukoneogenese in der Leber nicht mehr gehemmt und die Hyperglykämie des T2DM gefördert [2, 54, 57].

Die Diagnose T2DM wird primär über die Ermittlung des Blutzuckerspiegels gestellt. Dabei ist ein einmaliger Nüchtern-Blutzucker von $> 126\text{mg/dl}$ bereits pathologisch. Als weiteres diagnostisches Mittel kann der orale Glukose Toleranztest (oGTT) hinzu gezogen werden, bei dem ein Cut-off-Wert des Blutzuckers von $\geq 200\text{ mg/dl}$ die Diagnose DM beweist [2]. Folgeerscheinungen von T2DM resultieren häufig aus einer dauerhaften Erhöhung des Blutzuckerspiegels und der daraus entstehenden peripheren Glykosylierung von Proteinen. Durch die chronische Hyperglykämie und die daraus resultierende Mikro- und Makroangiopathie entstehen Langzeitschäden, Funktionsstörungen und Funktionseinschränkungen verschiedener Organe. Mikroangiopathische Komplikationen, wie diabetische Neuropathie, Nephropathie und Retinopathie, müssen kontrolliert und durch frühzeitige Therapie verhindert/vermindert werden [3, 54, 57].

Da bei T1DM meist ein vollständiger Insulinmangel herrscht, wird bei der juvenilen Diabetesform direkt mit der parenteralen Insulintherapie gestartet. Die Therapie des T2DM gestaltet sich oft schwieriger und ist durch ein komplexes Abwägen von oralen Antidiabetika sowie konventioneller Insulintherapie bestimmt. Leitliniengerecht wird grundsätzlich ein HbA1c zwischen 6,5 und 7,5% angestrebt [2]. Je nach Ergebnis des HbA1c, welcher als Langzeitmarker des Blutzuckerspiegels dient, kann und muss die Therapie weiter eskaliert werden. Ziel ist zunächst durch eine Basistherapie aus körperlicher Aktivität, einem verbesserten Lebensstil und Gewichtsreduktion, den Blutzuckerspiegel zu senken und die periphere Insulinempfindlichkeit zu erhöhen. Eskalierend kann man Metformin als orales Antidiabetikum der ersten Wahl hinzuziehen. Ist der HbA1c nach 3-6 Monaten weiterhin nicht im angemessenen Zielbereich, sollte eine orale Kombinationstherapie oder die Kombination mit Insulin in Betracht gezogen werden. Die letzte Eskalationsstufe ist eine intensivierete Insulintherapie [2, 54].

1.4 Diabetes und Knochen

Abgesehen von den Diabetesfolgeerkrankungen durch makro- und mikroangiopathischen Veränderungen z.B. in Niere, Auge und Nervenzellen, ist die Auswirkung auf den Knochen ein großes Problem für Diabetiker. Sowohl bei Patienten mit T1DM als auch T2DM ist die Anzahl an Knochenbrüchen erhöht [5, 58-60]

Die Gründe für das erhöhte Frakturrisiko sind die Multimorbidität der Patienten sowie das damit einhergehende erhöhte Sturzrisiko. Dazu gehören u.a. abnehmende Sensibilität im Rahmen einer Polyneuropathie sowie vermindertes Sehvermögen im Rahmen einer Retinopathie. Des Weiteren erhöhen die strukturellen Veränderungen im Knochengewebe das Frakturrisiko [59].

Bei Patienten mit T1DM konnte als Ursache für das erhöhte Frakturrisiko eine erniedrigte Knochendichte (BMD) gezeigt werden. Im Unterschied dazu war die BMD bei T2DM-Patienten signifikant erhöht [58, 59, 61]. Eine mögliche Begründung für die erhöhte BMD ist, dass durch die Fettleibigkeit bei T2DM eine dauerhafte mechanische Stimulation zur verstärkten BMD führt [5, 62]. Die alleinige Messung der BMD bewertet allerdings nicht die Stärke und Qualität des Knochens [60, 61] und muss deswegen kritisch betrachtet werden. T2DM-Patienten haben eher eine insuffiziente Knochenqualität [5, 55]. Ein Grund dafür könnte die schlechte Balance zwischen organischer und anorganischer Knochenmatrix sein [63].

Die Genese der schlechten Knochenqualität bei DM ist komplex und abhängig von verschiedenen Proteinen, Transkriptionsfaktoren oder anderen Substanzen, die bei Hyperglykämie vermehrt gebildet werden (z.B. ROS, AGEs). Die wichtigsten Faktoren sind in Tabelle 1 kurz erklärt und zusammengefasst.

Veränderung bei DM	Auswirkung auf den Knochen	Referenz
FOXO1-Aktivität erhöht	- verschlechterte Wund- und Knochenheilung	[64-66]
ROS erhöht	- vermehrten Bildung von Osteoklasten → vermehrter Knochenabbau	[67]
Bildung von AGEs	- Inflammation - verminderte Knochenstärke - Schlechtere Anpassung des Knochens auf äußere Reize - Osteoklastendifferenzierung erhöht - Osteoblastendifferenzierung gesenkt - AP-Expression nimmt ab	[59] [66] [68]
PPARγ2 erhöht	- Inhibierung von RUNX2 - Hemmung der osteogenen Differenzierung	[59]
RUNX2 vermindert	- Abnahme der osteogenen Differenzierung	[8].
Sclerostin erhöht	- Inhibition Wnt/ β -catenin-Signalweg - Verminderte Osteoblastengenese - verstärkte Osteoklastendifferenzierung - Knochenresorption	[59]
Osteocalcin erniedrigt	- Marker für den Knochenumsatz - Knochenumsatz erniedrigt	[59]

Tabelle 1: Einflussfaktoren der diabetischen Osteopathie

1.4.1 Diabetische Frakturheilung

Neben dem erhöhten Risiko einer Fraktur zu unterliegen, ist bei DM-Patienten die Frakturheilung verschlechtert und die Hospitalisierung nach einer Fraktur ist bei diesem Patientenkollektiv signifikant erhöht [8, 69]. Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Frakturkonsolidierung bei Diabetikern um etwa 60% niedriger als bei Nicht-Diabetikern [5].

Die Zusammenhänge, die bei der verschlechterten diabetischen Frakturheilung eine Rolle spielen, sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

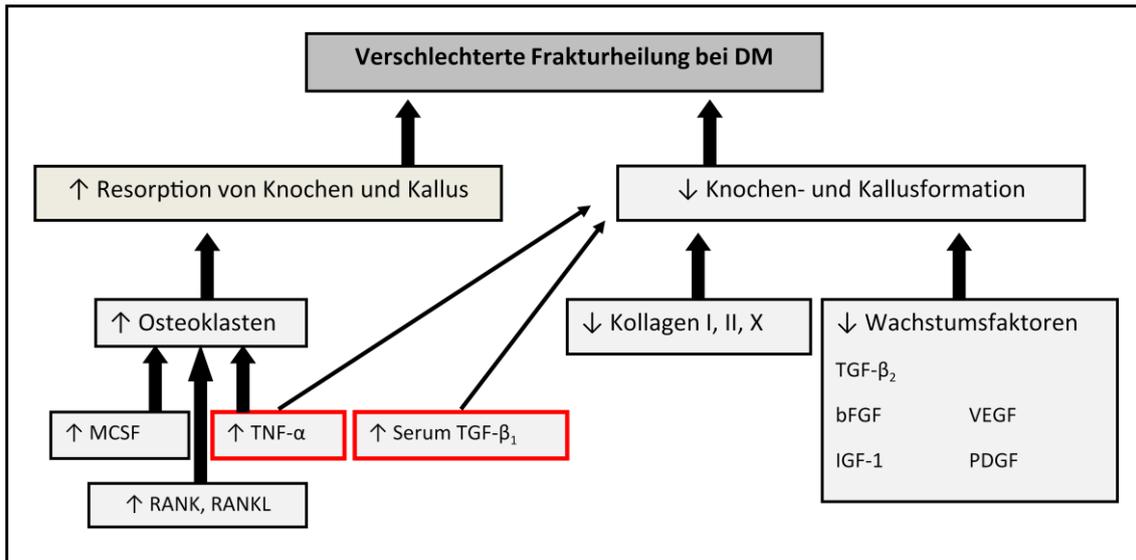


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zusammenhänge bei der diabetischen Frakturheilung
Eigene Darstellung nach Vorlage aus „The Diabetic Bone: A Cellular and Molecular Perspective“ Blakytny [70] und Einbezug weiterer Referenzen [6, 30, 66, 71]

Ein Grund für die mangelhafte diabetische Frakturheilung ist die verlängerte Inflammation. Aufgrund der erhöhten proinflammatorischen Zytokine (u.a. TNF- α) werden mehr Osteoklasten gebildet, was zu Knochenheilungsstörung und Osteoporose führt [66].

Ein weiterer Grund für die mangelhafte Frakturheilung ist das veränderte Serum-Zytokinprofil bei DM-Patienten [6, 7].

Besonders in der frühen Phase der Frakturheilung sind die Level an IL-6, -8, und TNF- α in diabetischen Ratten höher. TGF- β_2 und bFGF und PDGF sind niedriger [6, 71], was zu einer Abnahme der Knochen- und Kallusformation führt [70]. Der TGF- β_1 -Spiegel im Serum ist bei Patienten mit T2DM erhöht [7, 30, 72].

Die erhöhten Spiegel von TNF- α und TGF- β_1 werden als Grund diskutiert, warum bei Diabetikern die Frakturheilung und die Osteogenese verschlechtert ist [7, 30, 72-75].

Nach der inflammatorischen Phase muss der Knochen zunächst anhand einer Knorpelvorlage wieder aufgebaut werden. Beim Remodeling der Frakturheilung ist ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und der Resorption des knorpeligen Kallus wesentlich, um eine stabile Knochenstruktur zu gewährleisten.

Bei DM ist die Frakturheilung u.a. auch deswegen verschlechtert, da weniger kartillärer Kallus gebildet wird [63, 76].

Das Volumen des knöchernen Kallus ist bei T2DM ebenfalls signifikant verringert und die Zusammensetzung des zellulären Komplexes verändert. Die Anzahl von Adipozyten im Kallusgewebe ist erhöht und die Anzahl der OB an der Knochenoberfläche ist geringer. Auch das könnte ein möglicher Grund für die schlechte biomechanische Stabilität sein [77].

1.5 Monozytäre Zellen

Monozyten werden zusammen mit den Makrophagen dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) zugeordnet, welches die Gesamtheit aller von Monozyten abstammenden Phagozyten beschreibt [17, 78]. Monozyten werden im KM über myeloische Vorläufer aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Nach der ein- bis dreitägigen Zirkulation im Blutsystem migrieren die unspezifischen Monozyten in das Gewebe und entwickeln sich zu organ-/ gewebespezifischen Makrophagen [78-80]. PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sind eine inhomogene Zellpopulation und können anhand ihrer Oberflächenmarker in klassische $CD14^+/ CD16^-$ und nicht klassische $CD14^+/ CD16^+$ Monozyten eingeteilt werden [78]. Nach ihrer Aktivierung können die Monozyten in M1 oder M2 Makrophagen eingeteilt werden [81].

Die Zellen des MPS gehören zur unspezifischen zellulären Abwehr des menschlichen Organismus und können über membranständige Rezeptoren Pathogene binden. Innerhalb des Zytoplasmas finden sich Granula mit zytotoxischen Enzymen. Die monozytären Zellen sind phagozytosefähig und in der Lage, über MHC-II Antigene auf der Oberfläche zu präsentieren. Auf diese Weise wird eine Verstärkung der Abwehrreaktion des Organismus hervorgerufen [79, 80, 82].

Eine weitere wichtige Funktion im Rahmen der unspezifischen Immunantwort ist die Sekretion von Chemokinen, Wachstumsfaktoren, Komplementfaktoren und Zytokinen, die eine Entzündungsreaktion initiieren und regulieren können.

In dieser Arbeit wird der Fokus allerdings nicht auf die unspezifische Abwehrfunktion der monozytären Zellen, sondern auf deren Einfluss auf die Knochenfunktion bei der Frakturheilung gelegt.

Neben dem oben beschriebenen positiven Einfluss der monozytären Zellen auf die Frakturheilung [81, 83], gibt es bereits Hinweise auf einen Einfluss von monozytären Zellen auf die osteogene Differenzierung. So konnte in der Co-Kultur von Makrophagen und Knochenmarkstammzellen bereits eine, durch BMP-2-Sekretion angestoßene, Erhöhung der osteogenen Differenzierung beschrieben werden [81, 83].

Teil dieser Arbeit ist, diesen Einfluss genauer zu untersuchen und im Besonderen zu verstehen, wie genau dieser Einfluss funktioniert.

Mögliche Hypothesen für diesen Mechanismus ergeben sich aus dem bereits beschriebenen Einfluss von monozytären Zellen auf Hautzellen [84]. Die Behandlung von Hautwunden mit dem Überstand von PBMCs zeigte einen positiven Effekt auf die Proliferation und die Migration von Fibroblasten. Als mögliche Regulationsmechanismen wurde eine schnelle Aktivierung von CREB, Erk1/2, c-Jun, Akt und Hsp27 in Hautzellen detektiert [84].

Die entscheidende und in dieser Arbeit zu klärende Frage ist, ob die Regulationsmechanismen beim Knochen ähnlich sind.

1.5.1 Veränderungen bei Diabetes

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist, ob sich bei Diabetikern die monozytären Zellen anders verhalten und somit einen veränderten Einfluss auf die Frakturheilung haben. Es gibt bereits einige Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss von Hyperglykämie auf monozytäre Zellen befassen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von monozytären Zellen wie THP-1 oder PBMCs mit Glukose zu einer erhöhten Expression von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IL-6, sowie ROS, NF κ B, TLR2 und 4 und Transkriptionsfaktoren führt [73, 85-88]. Die Veränderungen innerhalb einer Zelle bei Hyperglykämie (HG) machen sich auch auf genetischer Ebene bemerkbar. So führt eine HG-Stimulation zu einer Erhöhung der Gene aus der Gruppe der Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Chemokin-Rezeptoren, Integrine

und Zytokine der TNF-Familie (TNF, IL-1 β , TNF-Rezeptor, MCP-1, CCR2-RB) [89].

Fettleibigkeit, die ebenfalls zur Pathogenese des T2DM gehört, führt dazu, dass Makrophagen das Fettgewebe vermehrt infiltrieren [90, 91].

Zusätzlich ist bei Diabetikern die Polarität der Makrophagen verändert. Man unterscheidet zwei Formen von Makrophagen.

Makrophagen Typ-1 (M1, klassisch aktivierte) sind proinflammatorisch und werden durch Interferon- γ und Toll-like-Rezeptor-Liganden (TLR-L) induziert. Sie sekretieren IL-6, TNF- α und IL-1 β . Die M1 Makrophagen kommen bei adipösen Mäusen vermehrt im Fettgewebe vor [92, 93]. Besonders bei älteren Mäusen bewirken M1 Makrophagen im Blut eine Verschlechterung der Knochenqualität. Im Fettgewebe schlanker Mäusen kommt hingegen vermehrt der alternativ aktivierte Makrophagen Typ-2 (M2) Phänotyp vor [81]. Den M2-Makrophagen werden durch die Expression von IL-10 eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Insulinsensitivität zugesprochen und sie führen zu einer verbesserten Osteoblastenfunktion [81, 90]. Nicht nur im Fettgewebe, sondern auch im peripheren Blut, ist die Polarität der Makrophagen verändert [94].

Wichtig für die Polarität der Makrophagen sind die sogenannten SOCS-Proteine [95]. Ein Stimulator der SOCS ist neben TLR, Zytokinen und Angiotensin II, eine hyperglykämische Stoffwechsellage [95]. Außerdem wird bei der veränderten Morphologie der Monozyten in HG-Bedingungen vermehrt eine Beeinflussung im NF κ B-Signalweg beschrieben [89].

Interessant ist, ob sich die bereits bekannte Veränderung der monozytären Zellen beim T2DM auch auf den Einfluss dieser Zellen im Rahmen der Frakturheilung auswirkt. Durch die Untersuchung dieses Zusammenhanges wäre man ggf. in der Lage, bereits früher klinisch zu intervenieren und einem großen Patientenkollektiv zu helfen.

1.6 Vorarbeiten

In vorangegangenen Studien des Siegfried-Weller-Institutes wurde mithilfe eines Zytokinarrays gezeigt (bisher nicht publizierte Daten und Daten aus der

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades von Larissa Mayer [13]), dass sich im Serum von T2DM-Patienten ein anderes Zytokinmuster detektieren lässt, als bei gesunden Probanden. Besonders fiel dabei auf, dass der MCP-2-Spiegel bei Patienten mit T2DM sehr viel niedriger war, als bei gesunden Kontrollpatienten (Abbildung 6).

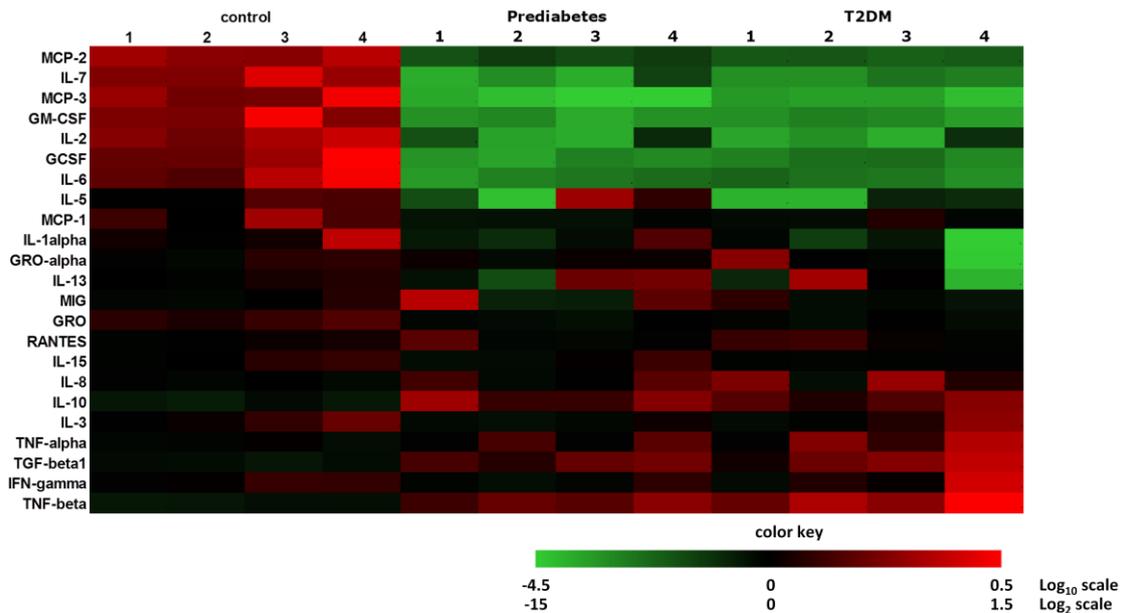


Abbildung 6: Zytokinprofil im Serum von Kontrollpatienten, Prädiabetikern und T2DM-Patienten
Das Level an MCP-2 im Serum von T2DM Patienten ist deutlich verringert. Die Graphik wurde von Dr. S. Ehnert u.a. aus den Daten der Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades von Larissa Mayer, Universität Tübingen [13] erstellt.

MCP-2 ist ein Zytokin, welches einen chemotaktischen Effekt auf monozytäre Zellen hat (s. Abbildung 7). Das Ergebnis des Migrationsassays zeigt, dass die Stimulation von THP-1-Zellen mit MCP-2 Auswirkung auf die Migration der Zellen hatte. Dieser positive Effekt schien mit der Konzentration (0-50 ng/ml) von MCP-2 zu korrelieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass dieser Effekt nicht signifikant ausgeprägt ist, wenn der Versuch innerhalb hyperglykämischer Bedingungen durchgeführt wird.

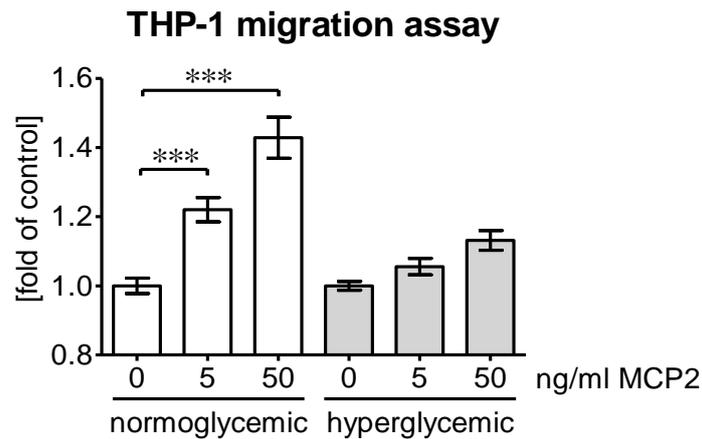


Abbildung 7: Migrationsassay mit Bydon chambers der THP-1-Zellen

Eine erhöhte Konzentration an MCP-2 regt THP-1-Zellen signifikant zur Migration an. Dieser Effekt wird durch hyperglykämische Konditionen aufgehoben. Aus der Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades von Larissa Mayer, Universität Tübingen, Abbildung 18, S. 48 [13].

Die Blockierung von MCP-1 führte im Mausmodell zu einer signifikant verschlechterten Kallusbildung und somit zu einer mangelhaften Frakturheilung [12]. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die, durch Chemokine, wie MCP-1 und -2, angeregte Migration monozytärer Zellen in den Frakturspalt ein wichtiges Schlüsselereignis in der Frakturheilung ist.

Eine mögliche Hypothese, die sich aus diesem Zusammenhang ergibt ist, dass es bei T2DM-Patienten durch eine geringere MCP-2-Serumkonzentration zu einer geringeren oder gar fehlenden Migration von monozytären Zellen in den Frakturspalt gibt. Die nähere Untersuchung dieser Hypothese könnte einen großen Schritt bei der Untersuchung der verschlechterten diabetischen Osteogenese spielen und ist die Grundlage dieser Arbeit.

2 Zielsetzung

Knochenheilung ist ein komplexer Prozess, bei dem sich Phasen von Inflammation, Kallusbildung und Remodeling aneinanderreihen und teilweise überschneiden. Einen großen Anteil an der inflammatorischen Phase der Frakturheilung haben Zytokine und immunologisch aktive Zellen, die in den Frakturspalt einwandern [10, 11].

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, im *in vitro* Modell herauszufinden, welchen Einfluss monozytäre Zellen (PBMCs und THP-1-Zellen) in dieser Phase der Frakturheilung haben. In diesem Zusammenhang wird der Effekt von monozytären Zellen auf die Migration, die Proliferation und die Funktion von humanen Osteoblasten untersucht.

Im Folgenden wird analysiert, durch welche intrazellulären Regulationsmechanismen der Überstand monozytärer Zellen auf den Knochen Einfluss nimmt.

Ein weiteres Ziel ist die Identifizierung eines Bestandteiles im Sekretom monozytärer Zellen, welches für den Einfluss auf Osteoblasten verantwortlich sein kann.

Geklärt werden sollen:

1. Haben monozytären Zellen einen Einfluss auf die Frakturheilung?
2. Wie wird dieser Einfluss reguliert?

Da es in den Vorarbeiten Hinweise gibt, dass durch ein verändertes Zytokinprofil bei T2DM-Patienten eine geringere Anzahl an monozytären Zellen im Frakturspalt gibt, soll in dieser Arbeit die Frage erläutert werden, ob der Einfluss monozytärer Zellen unter diabetischen Bedingungen verändert ist.

3. Ist der Einfluss von monozytären Zellen bei T2DM Verändert?
4. Spielen monozytäre Zellen eine Rolle bei der verschlechterten diabetischen Frakturheilung?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur primärer humaner Osteoblasten, PBMCs und THP-1-Zellen

3.1.1 Isolation primärer humaner Osteoblasten

Primäre humane Osteoblasten wurden aus Knochenrestgewebe, meist von endoprothetischen Eingriffen, der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik-Tübingen isoliert (365/2012BO2).

Das nachfolgende Protokoll wurde in verschiedenen Arbeiten in unserem Labor entwickelt [8, 9, 29, 72].

Die Spongiosa aus den Knochenfragmenten wurde mithilfe einer Luer-Zange, unter sterilen Bedingungen herausgelöst und in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Um Blut- und Fettrückstände zu entfernen wurden die Spongiosa-Bruchstücke mehrmalig mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen aus der knöchernen Struktur herausgelöst, indem 0,07%ige Collagenase II-Lösung (0,7 mg Collagenase II/ 1 ml DPBS) in gleicher Menge wie Spongiosa-Anteile für eine Stunde, bei einer Temperatur von 37 °C, zugegeben wurden.

Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Durch zweimaliges Waschen der Rückstände und wiederum Überführung in jenes Röhrchen, wurde gewährleistet, dass möglichst alle gelösten Zellen verwendet werden. Das neue Falcon-Röhrchen wurde nun für 10 min bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 12,5 ml Kulturmedium für phOB (250 ml MEM Earle's, 250 ml Ham's F12, 50 ml FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, 50 mM β -Glycerol-Phosphat-Lösung, 50 mM L-Ascorbat-2-Phosphat-Lösung) resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

Zusätzlich wurden 62,5 μ l einer Antibiotikum/Antimykotikum-Stocklösung zugefügt. Die Kulturflaschen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert. Nach der Isolation wurde das Medium am folgenden Tag gewechselt und erneut 62,5 μ l Antibiotikum/Antimykotikum-Stocklösung hinzugegeben. Die Zellen wurden bis Passage 3 expandiert. Die Versuche wurden in Passage 3 und 4 durchgeführt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-5 Tage.

3.1.2 Kultivierung von THP-1-Zellen

THP-1-Zellen sind eine humane monozytäre Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines 1-jährigen Jungens mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen wurde [96]. Im Unterschied zu kultivierten humanen PBMCs können immortalisierte Zellen bis zu Passage 25 kultiviert werden, ohne ihre Zellaktivität zu verlieren und bieten somit einen Vorteil in der experimentellen Anwendung [97].

Die THP-1-Zellen wurden im hergestellten RPMI-Medium (500 ml RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin, 50 ml FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin) im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) kultiviert und alle 3-5 Tage gesplittet. Beim Splitten wurde der Überstand der THP-1-Zellen für die Versuche asserviert [96].

3.1.3 Isolation von PBMCs

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) sind alle im Vollblut vorkommenden Zellen, die einen runden Nukleus besitzen, sowie Lymphozyten, Monozyten oder Makrophagen. Diese Zellen können durch Dichtezentrifugation aus dem Blut extrahiert werden (365/2012BO2). Zu diesem Zweck wurde ein Falcon-Röhrchen mit 15 ml LSM 1077 gefüllt und langsam, mithilfe einer Pipettierhilfe, humanes EDTA-Blut (max. 30 ml) auf das LSM 1077 gegeben. Danach wurde die Probe für 20 min bei 1000 g ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde das oben aufliegende Blutplasma verworfen. Die unter dem Plasma gelegene PBMC-Schicht wurde vorsichtig aspiriert und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und bei 600 g für 10 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder aspiriert und verworfen. Das Zellpellet konnte anschließend mit Kulturmedium (500 ml RPMI-1640 Medium mit L-Glutamine, 50 ml FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin) resuspendiert und in einer Kulturflasche inkubiert werden.

Nach 24 Stunden wurden die Suspensionszellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden, wie in 3.8.1. näher erläutert wird, lysiert [98, 99].

3.1.4 Kultivierung und Subkultivierung der humanen Zellen und Zelllinien

In dieser Arbeit wurden neben humanen primären Osteoblasten (phOB) und PBMCs auch THP-1-Zellen verwendet. PhOBs konnten erst ab der 3. Passage verwendet werden. Das Protokoll zur Kultivierung und Subkultivierung der unterschiedlichen Zellen wurde in unserem Labor bereits etabliert [7-9, 30, 72].

Um adhärenente Zellen zu passagieren oder sie auszuplattieren wurde zunächst das Medium (s.o.) und Trypsin/EDTA im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das alte Medium wurde aus den Kulturflaschen der zu passagierenden Zellen abgesaugt. Danach wurden die Zellen 2 Mal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin/EDTA (für T25 Flaschen 0,5 ml, für T75 Flaschen 1 ml und für T175 Flaschen 2 ml) auf die Zellen pipettiert und der Reaktionsansatz für 5-10 min im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Sobald sich alle Zellen durch Klopfen auf die Flasche vom Boden lösen ließen (mikroskopische Kontrolle) konnte die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium (s.o.) (für T25 5 ml, für T75 10 ml und für T175 15 ml) gestoppt werden. Sowohl bei adhärenenten, als auch bei Suspensionszellen, wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 600 g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand aspiriert und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Für die Passagierung der Zellen wurde die Zellsuspension in größere Kulturflaschen gegeben und mit Medium aufgefüllt (für T25 Flaschen 5 ml, für T75 Flaschen 15 ml und für T175 Flaschen 25 ml). Das Medium wurde alle 4-5 Tage gewechselt.

Um die Zellen für Versuche ausplattieren zu können, wurden diese mithilfe einer Zählkammer gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension, je nach benötigter Zellzahl, mit Kulturmedium verdünnt und je nach Versuchsaufbau in Well-Platten pipettiert.

3.1.5 Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Substanzen

3.1.5.1 Hyperglykämische Bedingungen

Um hyperglykämische Bedingungen im Versuch zu imitieren wurden die Zellen (THP-1/phOB) in ihrem Kultur- oder Differenzierungsmedium kultiviert. Dazu

wurden entweder 4,5 g/l Mannitol, 4,5 g/l Glukose, 4,5 g/l Mannitol + 160 i.E: Insulin oder 4,5 g/l Glukose + 160 i.E. Insulin hinzugefügt [9].

3.1.5.2 Inhibitoren

Zur Inhibition von p38 wurde der Inhibitor SB 203580 (Cell Signaling) nach Herstellerangaben, in einer Konzentration von 5 μ M, für die Inhibition von MEK1/2 der Inhibitor U0126 (Cell Signaling) nach Herstellerangaben, in einer Konzentration von 10 μ M, eingesetzt und zum Kulturmedium der phOB hinzugefügt.

3.1.5.3 IL-6 und TGF- β_1

Der Einfluss von TGF- β_1 auf phOB wurde nach dem Protokoll von Ehnert *et al.* untersucht [30].

Um den Einfluss von IL-6 und TGF- β_1 auf die phOB zu analysieren wurden die Zellen in Differenzierungsmedium über 21 Tage differenziert. Als Zusatz zum Medium wurden bei jedem Mediumwechsel 5 ng/ml TGF- β_1 oder 10 ng/ml IL-6 hinzugefügt. Zusätzlich wird THP-1-Überstand oder RPMI-Medium (Kontrolle) zugegeben.

3.2 Messung des Resazurinumsatzes von humanen Osteoblasten

Damit für die Messung der AP-Aktivität nur lebensfähige Zellen gemessen werden, wurde zunächst der Resazurinumsatz gemessen. Lebende Zellen mit mitochondrialer Aktivität sind in der Lage Resazurin in Resorufin zu konvertieren [100]. Diese Enzymreaktion wurde sich bei der Normalisierung der Zellen zu Nutze gemacht. Das hier verwendete Protokoll von Fields *et al.* wurde in unserem Labor fest etabliert [7, 9, 100].

Zunächst wurde das Medium von den Zellen aspiriert. Um beschädigte Zellen zu entfernen wurden die Zellen einmalig mit DPBS gewaschen.

Für die Resazurinlösung wurden 0,125 g Resazurin in 500 ml DPBS gelöst. Anschließend wurden 100 μ l der Mischung mit 1 ml DPBS/Medium vermischt und für den Versuch benutzt.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit der Resazurinlösung bedeckt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal mittels

eines *omega plate reader* bei 530 nm und 560 nm gemessen und die Zellviabilität anhand einer Standardkurve berechnet [100-102].

3.3 Messung der AP-Aktivität von humanen Osteoblasten

Um die AP-Aktivität zu messen und damit auf die Funktion der Osteoblasten zu schließen wurde ein standardisiertes Protokoll unseres Labors verwendet [7-9, 27].

Für die Messung der AP-Aktivität wurden für die die „AP-Substrat-Lösung“ 1 ml der „AP-Aktivitäts-Reaktionsansatz-Lösung“ (50 mM Glycine, 100 mM Tris-Base, 1 mM MgCl₂ in ddH₂O und NaOH, pH = 10,5) mit 1,3 mg 4-Nitrophenyl-Phosphat-Dinatrium-Hexahydrat (pNPP) gemischt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Für die Messung der AP-Aktivität wurden die Zellen 2 Mal mit DPBS gewaschen und anschließend mit der „AP-Substrat-Lösung“ bedeckt (für eine 96-Well-Platte 100 ml, für eine 48-Well-Platte 150 ml). Die Lösung wurde bei 37 °C für 20/40 min inkubiert bis eine deutlich gelbe Farbe zu erkennen war. Im Anschluss wurde mithilfe des *omega plate reader* (BMG) im Programm „AP ACTIVITY“ (Absorbance, Wellenlänge $\lambda = 405$ nm) die Absorption des gebildeten Farbstoffes gemessen.

Um die Messung auszuwerten wurde eine Standardkurve der pNP-Konzentration bestimmt. Dafür wurden die verschiedenen Konzentrationen (500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,25 μ M 15,625 μ M, 7,8125 μ M und 0 μ M) hergestellt und die Absorption, wie oben, gemessen.

Um die produzierte Menge an pNP und damit die AP-Aktivität zu bestimmen wurde die Trendlinie der Standardkurve ermittelt sowie die Messwerte nach $x = (y - b) / m$ aufgelöst. Die Messung wurde mit dem zuvor ermittelten Resazurinumsatz normalisiert. Auf diese Weise konnte die produzierte Menge an pNP in μ M/ lebende Zellen ermittelt werden. Unter 14.3.1. ist eine beispielhafte Standardkurve graphisch dargestellt.

3.4 Färbung von Osteoblasten mit Alizarin-Rot

Nachdem das Medium von den Zellen entfernt wurde, konnten die Zellen mit 99%igem Ethanol für 60 min fixiert werden. Nach 3-maligem Waschen mit

Wasser wurde für 30 min die 0,5%-Alizarin-Rot-Lösung (200 mg Alizarin Rot S und 40 ml H₂O) hinzugefügt. Nach erneutem Waschen konnten Fotos gemacht werden [103].

3.5 Färbung von Osteoblasten mit der von Kossa-Methode

Das Medium wurde von den Zellen entfernt. Die Zellen wurden zunächst für 60 min mit 99%igem Ethanol fixiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Danach wurde für 30 min eine 3%ige Silbernitratlösung zugefügt. Im Anschluss konnte diese durch Waschen (Leitungswasser) entfernt und für 2 min durch eine Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung (5% Na₂CO₃, 9-10% Formaldehyd) ersetzt werden. Anschließend wurden die Zellen wieder gewaschen und für 5 min mit einer 5%igen Natriumthiosulfat-Lösung bedeckt. Zuletzt wurden die gefärbten Zellen fotografiert [104].

3.6 „Scratch Assay“

Die Methode „scratch assay“ wurde genutzt, um den Schluss einer Lücke im Osteoblasten-Monolayer über den Zeitraum von 6-48 Stunden zu beurteilen und den Einfluss von z.B. THP-1-Überstand auf die Verschlusszeit zu dokumentieren. Die Durchführung des „Scratch Assay“ orientierte sich am Protokoll von Mildner *et al.* [84].

Zunächst wurden primäre Osteoblasten aus Passage 3 bis 4 in eine 48-Well Platte ausplattiert und abgewartet, bis die Konfluenz des Zellmonolayers 100% erreichte. Das alte Kulturmedium wurde aspiriert und verworfen. Um im Folgenden eine bestimmte Stelle im Well zu markieren, wurde der äußere Wellboden mit einem waagerechten Strich versehen. Nun konnte der *in vitro*-Frakturspalt durch das gleichmäßige Kratzen mit einer 100 µl Pipettenspitze über den Well-Boden hergestellt werden. Anschließend wurden die Wells der Platte sowohl mit 150 µl frischem Kulturmedium als auch mit der stimulierenden Substanz (THP-1 Überstand, PBMCs Überstand) gefüllt, wobei das Gesamtvolumen 250 µl entsprach.

Direkt nach Setzen der Kratzer wurden die Wells der 48-Well-Patte mithilfe des EVOS fl, Advanced Microscopy Group fotografiert und die Ausrichtung des Fokus auf der Markierung notiert. Der Schluss, der durch den Kratzer

entstandenen Lücke im Zellrasen, sollte zu einem Zeitpunkt dokumentiert werden, in dem die Lücke zwar signifikant aber noch nicht vollständig geschlossen war, um eine gute Evaluation zu ermöglichen. Dabei kristallisierte sich bei primären Osteoblasten ein Zeitrahmen von 24-28 Stunden als sinnvoll heraus. Die Bilder wurden mit dem Programm *ImageJ* (Image Processing and Analysis in Java) ausgewertet, indem der Flächeninhalt der Lücken gemessen und der Schluss prozentual im Verhältnis zwischen 0 und 24 Stunden angegeben wurde [84].

3.7 Fraktionierung des THP-1-Überstandes

Die Fraktionierung des THP-1-Überstandes wurde mit dem Vivaspin® 6- Set (Sartorius AG, Göttingen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieser versprach eine Fraktionierung in Fraktionen von < 3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa, 10-30 kDa, 30-50 kDa, 50-100 kDa und > 100 kDa Größe.

Der Überstand von THP-1-Zellen wurde, wie oben beschrieben (3.1.2.), gewonnen. Anschließend wurden 5 ml des Überstandes in den oberen Teil des 100 kDa-Falcon pipettiert und bei 4000 g für 15 min zentrifugiert. Die Lösung die sich anschließend im unteren Teil des Röhrchens befand, konnte dann in das nächst kleinere (50 kDa) Vivaspin-Gefäß gefüllt werden. Der im oberen Teil befindliche Anteil bildete die erste Fraktion (> 100 kDa). Der Prozess wurde so lange wiederholt bis alle o.g. Fraktionen getrennt waren. Diese wurden zu je 2 ml Alliquots bei -80 °C aufbewahrt. Die Fraktionen 5-10 kDa, 10-30 kDa, 30-50 kDa wurden aufgrund der geringen Menge, mit RPMI-Medium ohne FCS aufgefüllt.

3.7.1 Silberfärbung zur Kontrolle der Fraktionierung

Um zu kontrollieren, ob die Fraktionierung mittels Vivaspin® 6 funktionierte, wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fraktionen mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Genutzt wurde hierfür das Protokoll von Mortz *et al.* [105]. Dafür wurden die Proben, wie in Methode 3.8.4. auf ein SDS-Gel aufgebracht und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Danach wurde das Gel 2 Mal jeweils 15 min in einer Fixierlösung aus 40% Ethanol und 10%iger Essigsäure geschwenkt und dann zweimal je 20 min in 30%iger Ethanol-

Lösung und dreimal für 10 min in ddH₂O gewaschen. Unter Kühlung mit Eis wird das Gel nun eine Minute in 0,02% Na₂S₂O₃-Sensitizer-Lösung geschwenkt und anschließend 2 Mal mit ddH₂O gewaschen. Um die Proteine im Gel anzufärben wurde der Ansatz 20 min in einer Silber-Lösung (100 mM AgNO₃ in H₂O und 0,02% (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Nachdem diese Lösung vollständig entfernt wurde, konnte die Entwickler-Lösung (2 %ige Na₂CO₃-Lösung in H₂O und 0,04% Formaldehyd-Lösung) auf das Gel gegeben werden. Der Färbeprozess wurde durch kurzes Spülen mit ddH₂O und 5 min Schwenken in 5 %iger Essigsäure gestoppt.

3.8 Westernblot

Das nachfolgende Protokoll wurde in unserem Labor bereits erfolgreich etabliert und publiziert [7-9].

3.8.1 Gewinnung von Proteinlysaten

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden 500 µl der RIPA-Stock-Lösung (10 mM TRIS Base, 100 mM NaCl, 0,5% Tergitol Solution, 0,5% DOC und 10 mM EDTA, pH = 7,6) mit 1 µl Pepstatin A-Stock-Lösung (0,5 mg/ml Pepstatin A in Methanol), 1 µl Leupeptin-Stock-Lösung (2,5 mg/ml Leupeptin in ddH₂O), 1 µl PMSF-Stock-Lösung (0,5 M PMSF in DMSO), 1µl NaF-Stock-Lösung (2,5 M NaF in ddH₂O) und 1µl Na₃VO₄-Stock-Lösung (0,5 M Na₃VO₄ in ddH₂O) gemischt und auf Eis gelagert.

Das Kulturmedium wurde von den zu lysierenden Zellen entfernt und diese anschließend mit der Lösung bedeckt (40 µl/Well bei 6-Well-Platten, bei PBMCs je 500 ml pro Zellpellet).

Die RIPA-Stock-Lösung wurde mithilfe eines Zellschabers auf den Zellen verteilt und die Proteine durch kratzen über den Plattenboden gelöst.

Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C mit 13,000 g für 10 min zentrifugiert. Im Überstand befand sich anschließend das benötigte Proteinlysat.

3.8.2 Messung der Proteinkonzentration nach Lowry

Der Proteingehalt einer Lösung wurden mittels photometrischer Messung nach Lowry bestimmt [106]. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit

10 µg/µl, 8 µg/µl, 6 µg/µl, 4 µg/µl, 2 µg/µl, 1 µg/µl und 0 µg/µl BSA und ddH₂O angefertigt. Anschließend wurden 2 µl des angefertigten Standards und der Proben, als Duplikate oder Triplikate, in eine 96-Well-Platte pipettiert. 150 µl Stock-Lösung-A (0,02%ige Na-K-Lösung, 0,01%ige CuSO₄*5H₂O-Lösung und 2%igen Na₂CO₃-Lösung) wurden jeweils hinzugegeben. Nach 10 min Inkubationsdauer wurden je 30 µl einer 33%igen Folin-Lösung hinzugefügt und für weitere 1-6 Stunden auf dem Shaker inkubiert. Die Absorption wurde photometrisch mit dem *omega plate reader* bei 750 nm gemessen. Für die Berechnung der Proteinkonzentration in µg/µl wurde die Steigung der Standardkurve, anhand der Abhängigkeit der fotometrisch gemessenen Dichte von der Proteinkonzentration, berechnet. Jeder, durch Absorption gemessene Dichtewert einer zu untersuchenden Probe, konnte somit in die Proteinkonzentration umgerechnet werden. Die Ergebnisse der Duplikate/Triplikate wurden anschließend gemittelt (s. 14.3.2.).

3.8.3 Probenvorbereitung

Nachdem die Proteinlysate gewonnen und die Proteinkonzentrationen bestimmt wurden, mussten die Proben für die gelelektrophoretische Trennung vorbereitet werden. Dabei wurde für ein 15 Well-Gel ein Gesamtvolumen der Probe von 21 µl, für 12 Well-Gele 25 µl und für 10 Well-Gele 27 µl benötigt.

Das Volumen der Proteinproben bestand zu 4/5 aus dem Proteinlysat (20-50 mg Protein mit ddH₂O und 1/5 aus dem Lämmli Lade Puffer (300 mM TRIS, 50%iges Glycerol, 5 mM EDTA, 10% SDS, 0,05% Bromphenol Blau, 12,5% 2-Mercaptoethanol). Die Proben wurden vorsichtig gemischt und für 10 min bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben vorsichtig zentrifugiert und direkt auf das Gel geladen.

3.8.4 Gelelektrophorese

Um Proteine mittels Gelelektrophorese aufzutrennen wurde ein Acrylamid-Gel hergestellt.

Zur Herstellung eines 10%igen Trenngels wurden 5,0 ml ddH₂O mit 3,2 ml 1,5 M TRIS-Lösung (pH = 8,8) und 4,3 ml 30%ige Acrylamide/Bisacrylamid-

Lösung gemischt. Zusätzlich wurden 127,5 µl 10% SDS-Lösung, 12,8 ml TEMED und 127,5 µl 1%ige Ammonium-Persulfat-Lösung hinzugegeben.

Das Gel wurde nun in die Kammer zwischen den beiden Glasplatten *Rothiphorese PROclamp MINI System* gegeben. Das Gel wurde mit Isopropanol bedeckt, bis dieses polymerisiert war. Nach der Polymerisierung konnte das Isopropanol abgeschüttet und das Ladegel (2,1 ml ddH₂O, 0,38 ml 1 M TRIS, 0,5 ml 30%igen Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung, 30 µl 10 %igen SDS-Lösung, 3 µl TEMED und 30 µl 10%igen Ammonium-Persulfat-Lösung) gegossen und anschließend der Trennkamm eingefügt werden. Sobald das Gel polymerisiert war, konnte es weiterverwendet oder bei 4 °C in feuchten Tüchern gelagert werden.

Um die Elektrophorese durchzuführen wurden die Acylamidgele mit der Proben tasche nach innen, in der inneren Laufkammer einer *Rothiphorese PROclamp MINI System* platziert. Die Laufkammer wurde in den Tank der Elektrophorese eingeführt und komplett mit Elektrophorese-Puffer (200 ml der Lösung aus 1 M Glycin, 125 mM TRIS, 0,5%iges SDS in ddH₂O mit 800 ml ddH₂O) gefüllt. Auch der Tank wurde mit diesem Puffer gefüllt, allerdings nur bis die Elektroden und der untere Teil des Gels bedeckt waren.

25 µl der Proben (12 Well-Gel) wurden nun in die Taschen des Ladegels pipettiert. Zusätzlich werden 7 µl des *Roti-Mark BICOLOR-Proteinmarker* in eine Kammer pipettiert. Direkt im Anschluss wurde der Tank geschlossen und die Elektroden angeschlossen. Die Spannung betrug 150 V für ca. 1,5 Stunden.

3.8.5 Tank Blot

Um die Proteine im Acrylamidgel für weitere Experimente zu nutzen, wurden diese mittels Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Zunächst wurden die beiden Puffer, 5- fache konzentrierter Tank-Puffer (TRIS 125 mM TRIS, 960 mM Glycine in ddH₂O) und einfach konzentrierter Tank-Puffer (200 ml des 5-fachen Tank-Puffers, 200 ml Methanol und 600 ml ddH₂O), gemischt.

Auf die schwarze Kassette, welche die negative Seite des *Rothiphorese PROclamp MINI System* markierte, wurde ein, in Tank-Puffer eingelegtes Schwammtuch und 2 Whatman-Paper, gelegt. Anschließend wurde vorsichtig

das zuvor angefertigte SDS-Gel aufgetragen. Dieses wurde mit einer Nitrocellulosemembran, 2 Whatman-Papern, einem Schwammtuch und der roten Kassette, welche die positive Seite markierte, bedeckt. Die geschlossene Kassette wurde unter Kontrolle der Pole in den Tank gestellt, der mit einfachem Tank-Puffer gefüllt war. Über einen Zeitraum von 14-17 Stunden konnte der Transfer bei 25 mA und 4 °C ablaufen.

3.8.6 Färbung mit Ponceau

Ponceau S wurde zur reversiblen Detektion von Proteinbanden auf Nitrozellulose oder PVDF Membrane genutzt. Die Membran wurde in einen weißen Plastikbehälter gelegt und mit Ponceau S Lösung, bestehend aus 0,2 g Ponceau S gelöst in 200 ml 1%iger Essigsäure, bedeckt. Der Versuchsansatz wurde bei RT für 1-5 min inkubiert. Nachdem die wiederverwendbare Lösung entfernt wurde, konnte die Membran vorsichtig mit Leitungswasser abgewaschen werden. Banden des Markers wurden markiert und die Membran wurde je nach Antikörpergebrauch geteilt. Zur Dokumentation wurde ein Foto mit der GelDoc-Kamera geschossen und die Membran weiter verwendet [107, 108].

3.8.7 Antikörperinkubation

Die Antikörperinkubation verläuft in mehreren Schritten.

Zunächst wurde die Membran für eine Stunde mit dem BSA-Block-Puffer (5% BSA in TBS-T-Waschpuffer) bedeckt und auf dem Schütteltisch platziert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran vorsichtig mit TBS-T Waschpuffer (100 mM TRIS, 1,5 M NaCl, pH = 7,6; 0,1% Tween-20-Lösung) gewaschen, um letzte Reste des Block-Puffers zu entfernen.

Nach Entfernung des Waschpuffers konnte die Membran mit dem primären Antikörper (s. Anhang, 14.1.4.) bedeckt werden. Der Reaktionsansatz wurde für etwa 2-4 Stunden bei RT inkubiert und ebenfalls auf den Schütteltisch platziert. Danach wurde die Membran für 3-4 Mal für 10 min mit TBS-T Waschpuffer gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper (s. Anhang, 14.1.4.) für 1-2 Stunden bei RT auf die Membran gegeben und der oben beschriebene Vorgang

wiederholt. Nach dem Waschen konnte nun im letzten Schritt die Detektion der gebundenen Antikörper mittels ELC erfolgen.

3.8.1 Detektion des gebundenen Antikörperkomplexes mittels ECL

Um eine Detektion der Banden zu ermöglichen, wurden eine Lösungen A (100 mM TRIS (pH= 8,5), 2,5 mM Luminol in DMSO, 0,4 mM p-Coumarinsäure in DMSO) und B (100 mM TRIS (pH = 8,5), 0,06%ige H₂O₂-Lösung) jeweils frisch hergestellt werden.

Lösung A und B wurden direkt vor der Detektion in gleichen Teilen gemischt und auf die Membran getragen. Die Expression konnte anschließend mithilfe der *ChemoCam* detektiert und gespeichert werden. Die Bilder wurden mithilfe von *ImageJ* ausgewertet. Der Hintergrund wurde abgezogen und das Chemolumineszenzsignal im Verhältnis zu GAPDH quantitativ ausgewertet.

Damit die Membran noch einmal verwendet werden konnte, wurde sie „gestrippt“ und zunächst 5 min mit TBS-T-Waschpuffer, danach für 5 min mit ddH₂O und im Anschluss für 5 min mit 200 mM NaOH-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Membran erneut für 5 min mit ddH₂O und danach für 5 min mit TBS-T-Waschpuffer gewaschen.

3.9 Intracellular Signaling Array

Das *PathScan® Intracellular Signaling Array Kit* wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Proteinlysate wurden mit einer Konzentration von 0,2 µg/µl in „Array Diluent Buffer“ gelöst und auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Multiwell-Kasten auf der Glasplatte befestigt. 100 µl „Array Blocking Buffer“ wurden in jedes Well pipettiert, für 15 min auf dem Shaker inkubiert und anschließend entfernt. Je 50 -75 µl der gelösten Lysate wurden in die Wells pipettiert und der Ansatz für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Proben entfernt und die Glasplatte mit je 100 µl „1X Array Wash Buffer“ 3 Mal für je 5 min gewaschen. 75 µl „1X Detection Antibody Cocktail“ wurden im Anschluss in jedes Well pipettiert und der Ansatz für eine weitere Stunde auf dem Shaker inkubiert. Danach wurde der Waschvorgang 4 Mal á 5 min mit je 100 µl „1X Array Wash Buffer“ wiederholt, um im Anschluss

75 µl „1X HRP-linked Streptavidin“ für 30 min hinzuzufügen. Das Waschen wurde 4 Mal, wie oben beschrieben, wiederholt und anschließend der Multiwell-Kasten abgebaut. Die Glasplatte wurde nun erneut in „1X Array Wash Buffer“ gewaschen. Währenddessen konnten 9 ml ddH₂O, 0,5 ml des „20X LumiGLO®“ und 0,5 ml „20X Peroxide“ gemischt werden. Die Detektion wurde, wie unter 3.8.1. beschrieben, durchgeführt. Die Signalintensität des Chemolumineszenzsignals wurde mithilfe der *ImageJ* software bestimmt. Nach Abzug des Hintergrundes wurde die Intensität im Verhältnis zum Mittelwert der Positivkontrollen errechnet und graphisch dargestellt.

3.10 IL-6-ELISA

Der IL-6-ELISA wurde nach Herstellerinformationen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden je 50 µl des „capture antibody“ pro Well auf eine weiße 96-Well-Platte aufgebracht und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Platte mehrmals mit dem Waschpuffer, aus 0,05%iger Tween-20-Lösung in PBS, gewaschen. Danach wurde der Ansatz für eine Stunde mit 1%iger BSA-Blocklösung inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurde die Platte mit dem mitgelieferte IL-6-Standards inkubiert. Die Überstände von THP-1-Zellen und PBMCs von Kontrollprobanden und T2DM-Patienten wurden aufgetragen und für 120 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je 50 µl des „detection antibody“ hinzu pipettiert und für weitere 120 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz erneut gewaschen und für 30 min das „Avidin HRP Konjugat“ in einer 1:2000 Verdünnung hinzugefügt. Nach erneutem Waschen konnte die ELC-Lösung zur Detektion wie oben beschrieben angesetzt werden. Die Lumineszenz wurde mithilfe des *omega plate readers* gemessen und in Abhängigkeit von der Standardkurve logarithmisch dargestellt.

3.11 Zytokinarray

Um zu ermitteln welches Zytokinprofil die THP-1-Überstände bzw. die PBMC-Überstände sezernieren wurde der „Human Zytokine Antibody Array C5“ von RayBio durchgeführt. Wie vom Hersteller angegeben wurde die Membran zunächst mit „Blocking-Buffer“ für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Überstände von THP-1-Zellen, PBMC und NG/HG-

kultivierte THP-1-Zellen auf die Membran gebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran je 3 Mal für 5 min mit dem mitgelieferten „Wash Buffer I“ und „Wash Buffer II“ gewaschen.

Damit die Antikörper an die Zytokine in der Probe binden konnten wurde nun 1 ml des „Biotinylated Antibody Cocktail“ pro Well aufgebracht und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Waschgänge wiederholt.

Um das Signal zu verstärken wurden 2 ml des, in „Blocking Buffer“ gelöste „HRP-Streptavidin Concentrate“, für 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgebracht.

Die Chemolumineszenz wurde mittels *ChemoCam* detektiert und die Bilder mithilfe der *ImageJ* Software ausgewertet. Dafür wurde die Signalintensität der einzelnen Zytokine, nach Abzug des Hintergrunds, ins Verhältnis zur Positivkontrolle gesetzt und graphisch als Heatmap dargestellt.

3.12 Statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden mithilfe von Microsoft Excel ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit *GraphPad Prism 5.0*. (San Diego, USA). Die graphische Darstellung erfolgte als Balkendiagramm (Mittelwert +/- 95% des Konfidenzintervalls). Die statistischen Unterschiede wurden mithilfe einer ONE WAY ANOVA (Kruskal Wallis H-Test) und dem Dunn's Multiple Comparison Test sowie t-Test (Mann-Whitney U-Test Wilcoxon) analysiert. $P < 0,05$ mit $\alpha = 0,05$ galt dabei als minimales Signifikanzniveau. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert +/- Standardabweichung.

Unterstützung bei der statistischen Auswertung leistete Frau Dr. S. Ehnert.

4 Ergebnisse

4.1 Der Überstand von THP-1-Zellen hat einen positiven Effekt auf die Funktion und Migration von phOB

4.1.1 Der Überstand von THP-1-Zellen verbessert die osteogene Differenzierung von phOB

Um die Rolle monozytärer Zellen bei der Frakturheilung genauer zu verstehen, wurde zunächst der Einfluss des Überstandes von THP-1-Zellen auf die Funktion und die Mineralisierung von phOB untersucht. Dafür wurden phOB von 8 Spendern isoliert und über 7/14 Tage differenziert. Als Kontrolle dienten Osteoblasten, die mit RPMI-Medium stimuliert wurden. Die AP-Aktivität wurde fotometrisch bestimmt, mithilfe des Resazurinumsatzes normalisiert und in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

Die gemessene AP-Aktivität der differenzierten OB war durch die Stimulation mit dem THP-1 konditionierten Medium sowohl an Tag 7, als auch an Tag 14 signifikant ($***p < 0,001$) erhöht. Die produzierte Menge an pNP/30 min der differenzierten OB bei Stimulation mit THP-1-Überstand an Tag 7 war im Vergleich zur Kontrolle um das 2,5-fache erhöht (7,2 pM pNP/30 min). Nach 14 Tagen lag der Unterschied sogar bei 16,5 pM pNP/30 min (25,5 pM pNP/30 min).

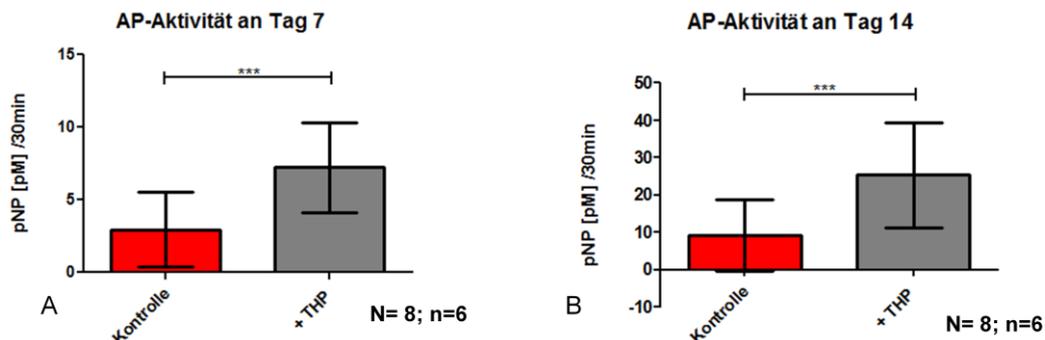


Abbildung 8: Stimulation mit THP-1-Überstand erhöht die AP-Aktivität bei humanen Osteoblasten phOB wurden differenziert und mit RPMI (Kontrolle) oder THP-1-Überstand über 7 (A) und 14 (B) Tagen stimuliert. Durch Zugabe von THP-1 Überstand konnte eine signifikant höhere AP-Aktivität ($***p < 0.0001$) im Vergleich zu Kontrolle ermittelt werden. N=8; n=6

Die phOB von 8 Spendern wurden 21 Tage differenziert und mit dem Überstand von THP-1-Zellen und zur Kontrolle mit RPMI-Medium stimuliert. Die mineralisierte Matrix wurde qualitativ mittels Alizarin rot (oben) und von-Kossa-Färbung (unten) untersucht. In Abbildung 9 wurde die Ausbildung der mineralisierten Matrix nach 21 Tagen bei phOB des Spenders 285 exemplarisch dargestellt.

Der Überstand von THP-1-Zellen führte zu einer deutlichen Verbesserung der Matrixmineralisierung humaner Osteoblasten.

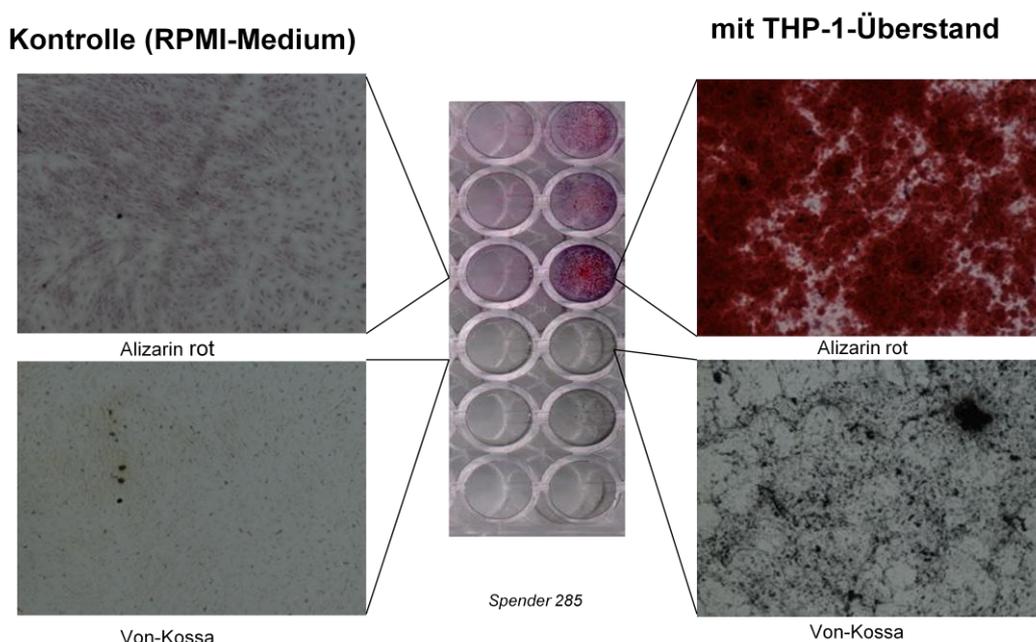


Abbildung 9: Verbesserung der Matrixmineralisierung bei Osteoblasten durch Stimulation mit THP-1-Überstand

phOB wurden über 21 Tage differenziert. Die Ausbildung mineralisierter Matrix wurde qualitativ mittels Alizarin rot (oben) und von-Kossa (unten) Färbung untersucht. Der Überstand von THP-1-Zellen führte zu einer deutlichen Verbesserung der Matrixmineralisierung humaner Osteoblasten. Beispielhaft dargestellt bei Spender 285.

4.1.2 Der Überstand monozytärer Zellen fördert die Migration von phOB

Mit dem Ziel, ein *in vitro* Frakturmodell zu simulieren und die Migration von Osteoblasten zu beurteilen, wurde, wie in 3.6. bereits beschrieben, das „Scratch Assay“ durchgeführt. Dafür wurden zunächst phOB von 13 Spendern (N=13) isoliert, kultiviert ausplattiert. Da in diesem Versuch untersucht werden sollte, ob

der Überstand monozytärer Zellen für den physiologischen Heilungsprozess einer Fraktur eine Bedeutung hat, wurden phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen stimuliert (+THP-1). In der Kontrollgruppe wurde den Zellen RPMI-Medium hinzugefügt.

Zusätzlich wurden PBMCs von 7 weiblichen und 3 männlichen, gesunden Kontrollprobanden isoliert und für 24 Stunden kultiviert. Danach wurden „Scratch Assays“ mit humanen Osteoblasten 5 unterschiedlicher Spender (N=5) durchgeführt (+ PBMCs, + THP-1, Kontrolle).

Die Zusammenfassung der prozentualen Zuwachsraten wurde in Abbildung 10 graphisch dargestellt. Die Einzelversuche wurden im Anhang (14.3.3. und 14.3.4.) getrennt dargestellt.

Die prozentuale Zuwachsrate des *in vitro* Frakturspalts war durch die Stimulation von phOB mit THP-1-Überstand im Mittel bei 52,5% und damit signifikant größer ($***p < 0.001$) als bei unstimulierten phOB (39,8%).

Die durchschnittliche Zuwachsrate bei einer Stimulation der phOB mit dem Überstand von PBMCs lag bei 53,7% und war ebenfalls im direkten Vergleich signifikant höher als bei der Kontrolle (unpaired t-Test und Mann Whitney Test $***p < 0.001$).

Trotz der deutlich vermehrten Zunahme der prozentualen Zuwachsrate durch Stimulation mit monozytären Zellen, muss betont werden, dass die durchschnittlichen prozentualen Zuwachsraten der phOB, durch die Stimulation mit PBMCs von unterschiedlichen Spendern, sehr starken Schwankungen unterlagen (s.14.3.3.). Bei Stimulation der Knochenzellen mit PBMCs der Spender 2, 5, 7 und 8, lag die Zuwachsrate sogar unterhalb der Kontrolle. Zwischen den PBMC-Überständen von männlichen und weiblichen Spendern gab es keinen Unterschied im Einfluss auf die Migration der Osteoblasten. Des Weiteren ergab der direkte Vergleich der Zuwachsrate der 5 phOB, die jeweils mit PBMCs, THP-1-Überstand und RPMI-Medium stimuliert wurden, lediglich einen Trend der Verbesserung durch die Stimulation mit monozytären Zellen.

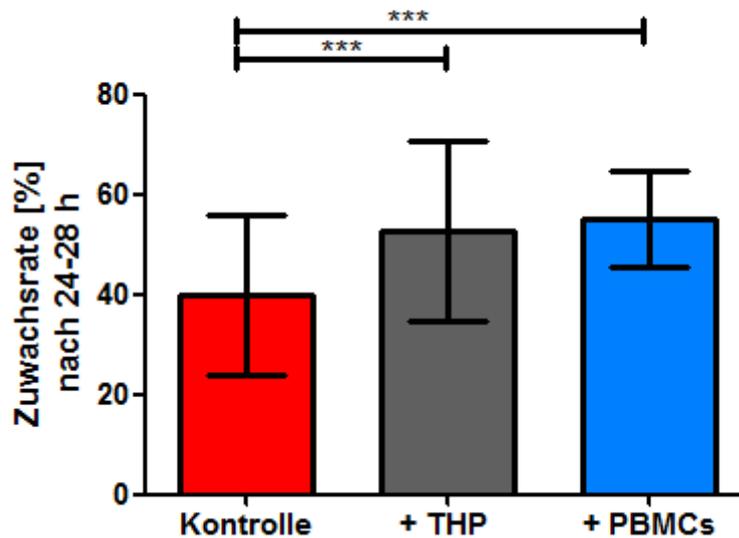


Abbildung 10: Signifikante Zunahme der Zuwachsrates im „Scratch Assay“ durch Zugabe des Überstandes von monozytären Zellen

Die prozentuale Zuwachsrates im „Scratch Assay“ phOB, die mit dem Überstand von THP-1-Zellen (N=13) und dem Überstand humaner PBMCs (N=5) stimuliert wurden, war im Vergleich zu Kontrolle signifikant (** $p < 0.001$) erhöht. (N=13/5; n=6)

Durch die Aufnahme mithilfe des *EVOS Mikroskop (Advanced Microscopy Group)* konnte eine deutlich vermehrte Migration der phOB in den hervorgerufenen *in vitro* „Frakturspalt“ detektiert werden, wenn die Zellen mit dem Überstand von THP-1-Zellen oder PBMCs stimuliert wurden. Beispielhaft sind dazu Aufnahmen mit den unterschiedlichen Stimulationen in Abbildung 11 dargestellt.

Nach 48 Stunden waren sowohl unter stimulierten, als auch unter unstimulierten Bedingungen, keine auswertbaren Lücken mehr feststellbar. Aus diesem Grund wurde für alle Versuche mit phOB die Zeitspanne von 24-28 Stunden für die Durchführung des „Scratch Assays“ festgelegt.

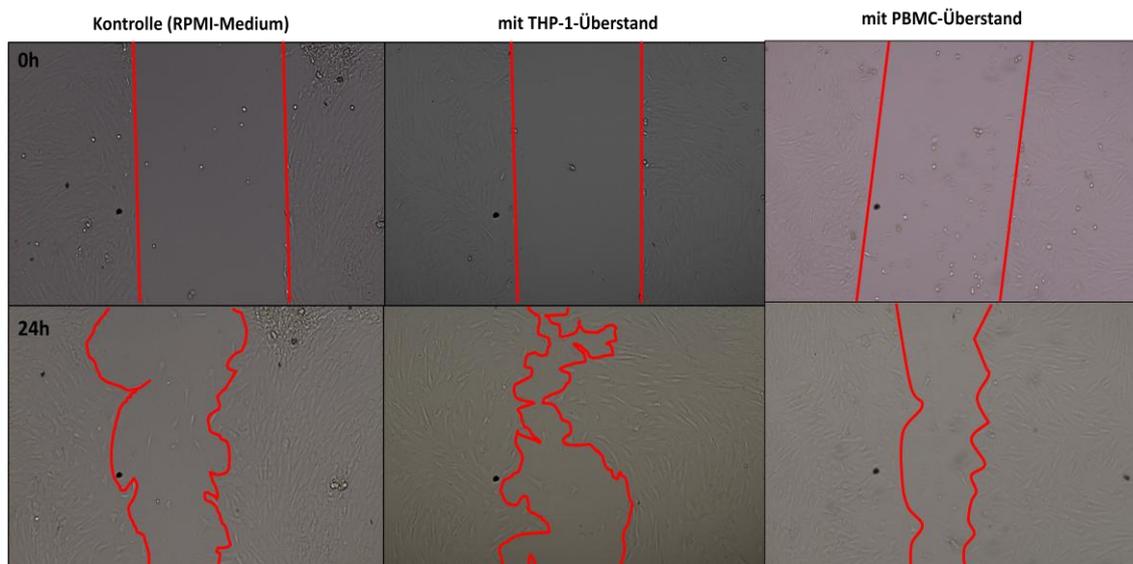


Abbildung 11: Mikroskopische Bilder zum Vergleich der signifikant erhöhten prozentualen Zuwachsrates bei Stimulation der primären humanen Osteoblasten mit dem Überstand von THP-1 Zellen

4.1.3 Kein Proliferationsnachweis bei Stimulation der phOB mit THP-1-Überstand

Um herauszufinden, ob der Überstand von THP-1-Zellen neben der Migration auch die Proliferation anregt, wurden phOB auf die Expression von Ki-67 und Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) untersucht.

PhOB von 5 Spendern wurden über 24 Stunden mit dem Überstand von THP-1-Zellen oder zur Kontrolle mit RPMI-Medium stimuliert. Im Anschluss wurden aus den Zellen Proteinlysate gewonnen. Im WB wurde die relative Expression von Ki67 und PCNA im Vergleich zur Expression von GAPDH (B) ermittelt und in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

Die relative Expression von Ki67 und von PCNA war durch Stimulation der phOB mit THP-1-konditioniertem Medium gegenüber der Kontrolle nicht erhöht. Eine vermehrte Proliferation der primären Osteoblasten durch den Überstand von THP-1-Zellen konnte damit nicht gezeigt werden.

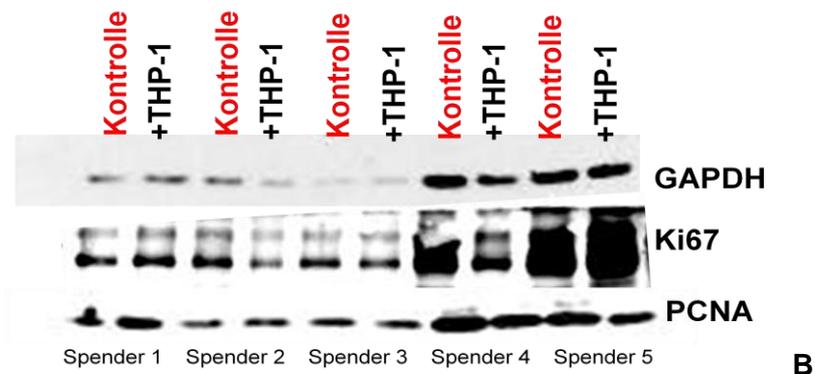
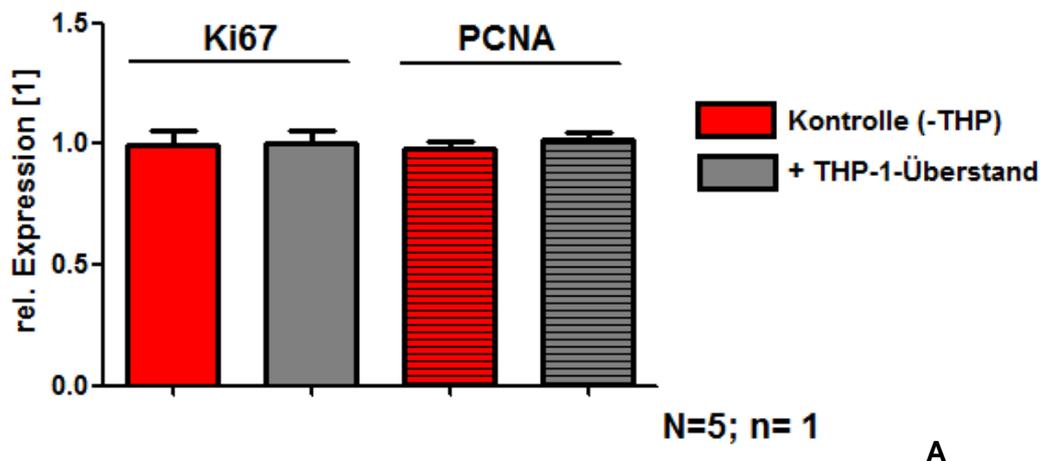


Abbildung 12: Keine Expression der Proliferationsmarker PCNA und Ki67 bei Stimulation der Osteoblasten mit THP-1-Überstand
 phOB wurden mit dem Überstand von THP-1-Zellen/RPMI Medium 24 Stunden stimuliert und die Expression von Ki67 und PCNA im Westernblot (B) ermittelt. Die Proliferationsmarker wurden bei Stimulation mit THP-1-Überstand nicht vermehrt exprimiert (A). (N=5, n=1)

4.1.4 Zusammenfassung 1: Einfluss monozytärer Zellen auf die Frakturheilung

Insgesamt konnte durch die Stimulation mit dem THP-1-Überstand eine signifikante Zunahme der AP-Aktivität und damit der Funktion differenzierter Osteoblasten gezeigt werden. Ebenso war die Mineralisierungsfähigkeit von Osteoblasten durch Zusatz des THP-1-Überstandes deutlich verbessert. Der Überstand von monozytären Zellen zeigte in den Versuchen einen positiven Einfluss auf die Migrationsfähigkeit im *in vitro* Frakturmodell. Einen Nachweis zur Verbesserung der Proliferationsmarker in phOB durch Stimulation mit dem Überstand monozytärer Zellen konnte jedoch in diesen Versuchen nicht gezeigt werden.

Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass monozytäre Zellen einen wichtigen Einfluss auf die Knochenfunktion und die Frakturheilung im *in vitro* Modell haben.

4.2 Rolle von Hyperglykämie beim Einfluss monozytärer Zellen auf den Knochen

4.2.1 Hyperglykämie verringert den positiven Einfluss von THP-1-Zellen auf die AP-Aktivität phOB nicht

Um den Einfluss des THP-1-Überstandes auf die osteogene Differenzierung unter normo- und hyperglykämischen Bedingungen vergleichen zu können, musste zunächst geprüft werden, ob der osmotische Einfluss einer Substanz, wie bspw. Glukose, einen Einfluss auf die AP-Aktivität nach Stimulation mit THP-1-Zellen hat. Dafür wurden phOB differenziert und mit dem Überstand von THP-1-Zellen sowie Mannitol (4,5 g/l) stimuliert und die AP-Aktivität gemessen (s. 14.3.5.). Sowohl ohne als auch mit Zugabe von Mannitol war nach Stimulation mit dem Überstand von THP-1-Zellen die AP-Aktivität humaner Osteoblasten signifikant höher. Der Vergleich mit der Kontrolle (mit RPMI-Medium stimulierte Osteoblasten) und Zusatz von Mannitol, ergab keinen signifikanten Unterschied in der AP-Aktivität. Genauso verhielt es sich beim Vergleich zwischen THP-1-Überstand-Zusatz und THP-1-Überstand + Mannitol. In den folgenden Versuchen wurde daher RPMI-Medium und Mannitol als Kontrollgruppe benutzt und die AP-Aktivität unter Stimulation mit Glukose damit verglichen.

PhOB wurden über 14 Tage differenziert und mit dem Überstand von THP-1-Zellen und Glucose (HG) sowie Insulin stimuliert.

Die Ergebnisse der AP-Messung an Tag 4, 7, und 14 wurden in Abbildung 13 in Relation zur Kontrollgruppe und Normalisierung durch den Resazurinumsatz graphisch dargestellt.

Die AP-Aktivität war bei Stimulation der phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen, sowohl unter HG (+ Glukose), als auch unter NG (+ Mannitol), an allen Tagen (A, B, C) signifikant ($***p < 0,0001$) erhöht. Dabei war die Menge an

produziertem pNP im Verhältnis zur Kontrolle mehr als verdoppelt (an Tag 4 um den Faktor 1,9; an Tag 7 um den Faktor 3,3; an Tag 14 um den Faktor 3,6).

Durch die Zugabe von Glukose (+HG) zum THP-1-Überstand, war die AP-Aktivität im Vergleich zur normoglykämischen Stimulation mit Mannitol (+NG) und THP-1-Überstand nicht verändert. Auch die Stimulation mit HG+THP-1-Überstand zeigte eine signifikante ($***p < 0,0001$) erhöhte AP-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle an allen Tagen.

Bei Zugabe von Insulin (160 i.E./l) zum THP-1-Überstand war die AP-Aktivität in phOB, sowohl in HG als auch in NG ($**p < 0,001$), an Tag 4 (A) vermindert. Dieser Effekt konnte an Tag 7 und 14 (B, C) nicht mehr beobachtet werden. Trotzdem hatte die Stimulation mit THP-1-Überstand, HG und Insulin an Tag 4 eine signifikant ($**p < 0,0001$) positive Auswirkung auf die AP-Aktivität im Verhältnis zur Kontrolle.

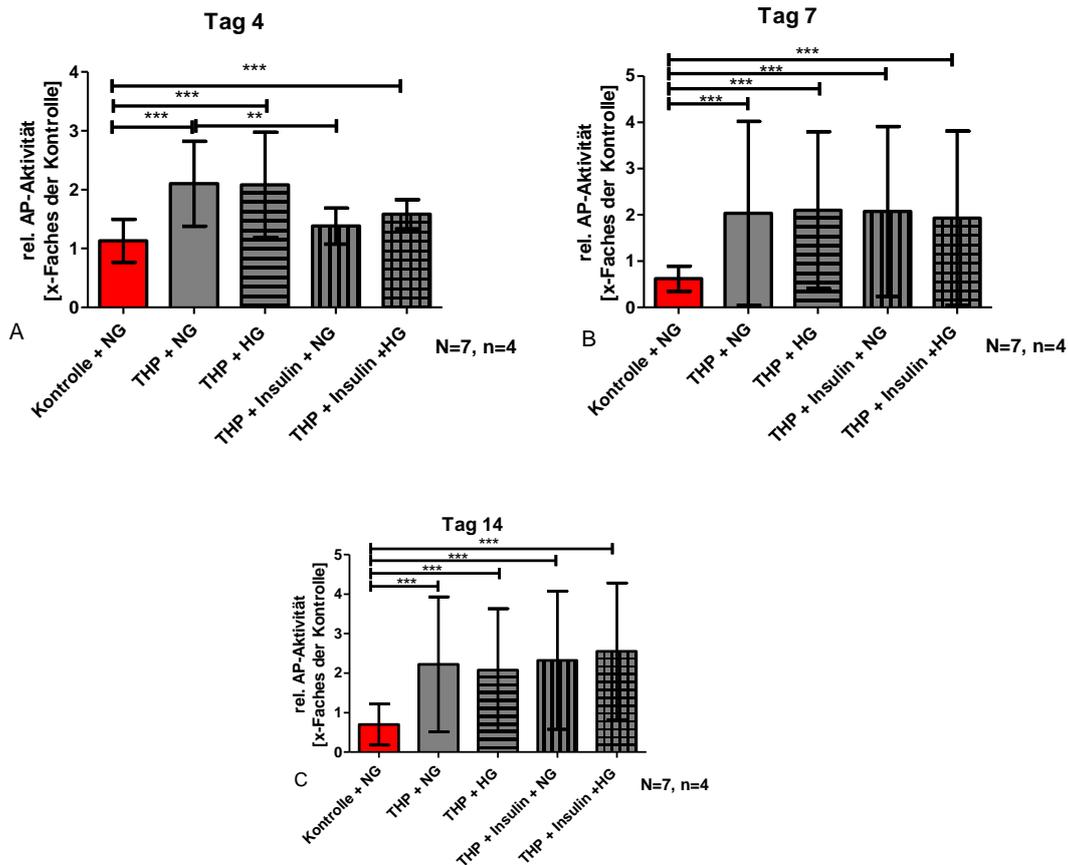


Abbildung 13: Hyperglykämie verringerte den positiven Einfluss von THP-1-Zellen auf die AP-Aktivität phOB nicht

PhOB wurden über 4 (A), 7 (B) und 14 (C) Tage differenziert. Der Einfluss auf die osteogene Differenzierung wurde durch Messung der AP-Aktivität analysiert. Die AP-Aktivität war bei Zugabe von THP-1-Überstand +/- Glucose (HG) im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die zusätzliche Stimulation mit Insulin bewirkte an Tag 4 eine geringere AP-Aktivität in phOB. Dieser Effekt war an Tag 7 und 14 nicht mehr zu sehen. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$) N=7; n=4

4.2.2 Hyperglykämie verändert den positiven Einfluss des THP-1-Überstandes auf die Migrationsfähigkeit phOB nicht

Eine weitere Frage dieser Arbeit war, ob sich die primären humanen Osteoblasten in einer hyperglykämischen Umgebung (Glukosekonzentration: 4,5 g/l) anders verhalten. Da der positive Einfluss des THP-1-Überstandes auf die Funktion differenzierter OB durch den Zusatz von Glukose nicht verändert war, sollte nun die Auswirkung von HG auf die Migrationsfähigkeit untersucht werden. Aus diesem Grund wurde das „Scratch Assay“ erneut durchgeführt. Dabei wurden Zellen von 4 Spendern RPMI-Medium (Kontrolle) oder THP-1-

Überstand (+THP) stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen entweder in einem hyperglykämischen (HG) (Glukosekonzentration: 4,5 g/l) oder in normoglykämischen (NG) Niveau kultiviert. Die prozentuale Zuwachsrate wurde nach 28 Stunden bestimmt und in Abbildung 14 graphisch dargestellt.

Der Überstand von THP-1-Zellen hatte sowohl in NG als auch in HG Konditionen einen signifikant ($***p < 0,0001$) positiven Einfluss auf die Zuwachsrate des „Scratch Assays“. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass die Zugabe von Glukose die Migrationsfähigkeit der phOB nicht beeinflusst. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der prozentualen Zuwachsrate unter NG und HG Bedingungen in diesem Modell.

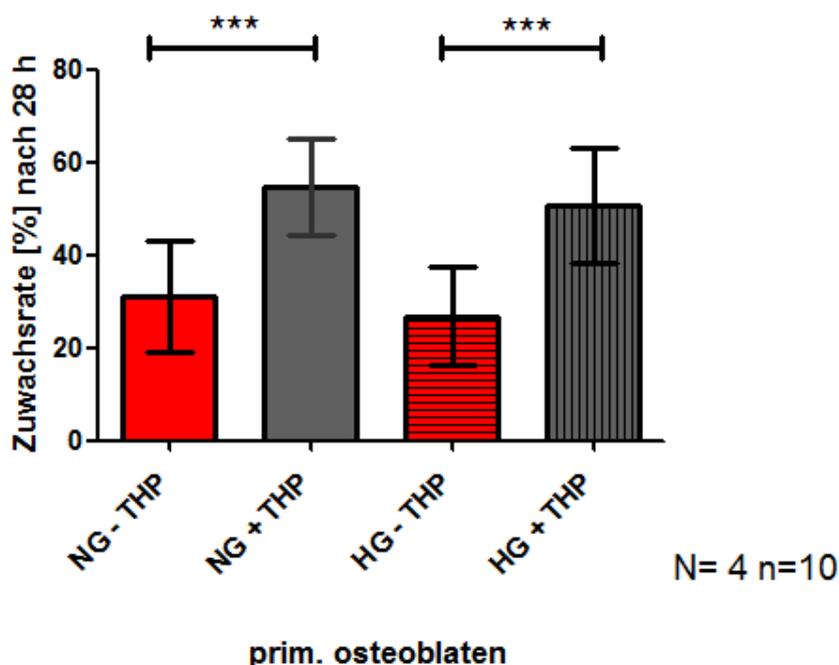


Abbildung 14: THP-1-Überstand bewirkte eine signifikant größere Zuwachsrate bei Normo- und Hyperglykämie

Sowohl unter normoglykämischen (Mannitol 4,5g/l) als auch unter hyperglykämischen Bedingungen (Glukose 4,5 g/l) beobachtete man eine signifikant ($***p < 0,0001$) größere prozentuale Zuwachsrate in 28h des *in vitro* Frakturspalts („Scratch Assay“) bei primären humanen Osteoblasten, die mit dem Überstand von THP-1-Zellen (+THP) stimuliert wurden. (N=4, n=10)

4.2.3 Zusammenfassung 2: Hyperglykämie verändert den Einfluss von monozytären Zellen auf die Frakturheilung nicht

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob der Einfluss von monozytären Zellen bei T2DM verändert ist. Im Modell wird T2DM mit einem

Zustand der Hyperglykämie gemäß der Pathogenese dieser Erkrankung [1, 54] dargestellt. Dabei zeigte sich sehr deutlich, dass der zuvor beschriebene Einfluss monozytärer Zellen auf die Funktion und Migrationsfähigkeit der Osteoblasten, durch die modellhafte Darstellung eines hyperglykämischen Milieus, nicht verändert war.

4.3 Identifikation möglicher intrazellulärer Regulationsmechanismen für die Wirkung von THP-1-Überstand auf phOB

Von besonderem Interesse für diese Arbeit, waren die intrazellulären Regulationsmechanismen, welche für die Wirkung des THP-1-Überstandes auf phOB verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurden phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen oder zur Kontrolle mit RPMI-Medium stimuliert und anschließend Proteinlysate der Zellen hergestellt und auf die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege untersucht.

4.3.1 Identifikation der aktivierten MAP-Kinasen und Optimierung der Stimulationszeit

Da es in der Literatur Hinweise für die Aktivierung von MAP-Kinasen durch den Überstand von THP-1-Zellen gibt, wurden zunächst die Stimulationszeitpunkte für die MAP-Kinase-Aktivierung in phOB orientierend ermittelt [84].

Aus diesem Grund wurden phOB für 15 oder 30 min bzw. 1, 2 oder 4 Stunden mit dem Überstand von THP-1-Zellen stimuliert. Als Kontrolle wurden die Zellen lediglich mit RPMI-Medium stimuliert.

Anschließend wurden aus den Zellen Proteinlysate hergestellt und Westernblots durchgeführt. Die qualitative Expression von phospho-38, phospho-SAPK, phospho-Erk1/2 und phospho-Hsp27 wird in Abbildung 15 dargestellt. Eine regelmäßige Proteinverteilung wurde durch die Färbung nach Ponceau (14.3.6.) festgestellt.

Die höchste Expression war bei phospho-Erk1/2 und p38 bereits nach 15min, bei pSAPK/JNK nach 15-30 min zu detektieren. Für pHsp27 war die Expression erst nach einer Stunde besonders ausgeprägt, weswegen, im Vergleich mit der Literatur, ein Stimulationszeitraum von 30 min als guter Kompromiss gewählt wurde [84]. Zu beachten ist, dass in der rein qualitativen Darstellung bereits

eine erhöhte Expression der MAP-Kinasen bei Stimulation der Osteoblasten mit dem Überstand von THP-1-Zellen, im Vergleich zur RPMI-stimulierten Kontrolle, zu sehen war.

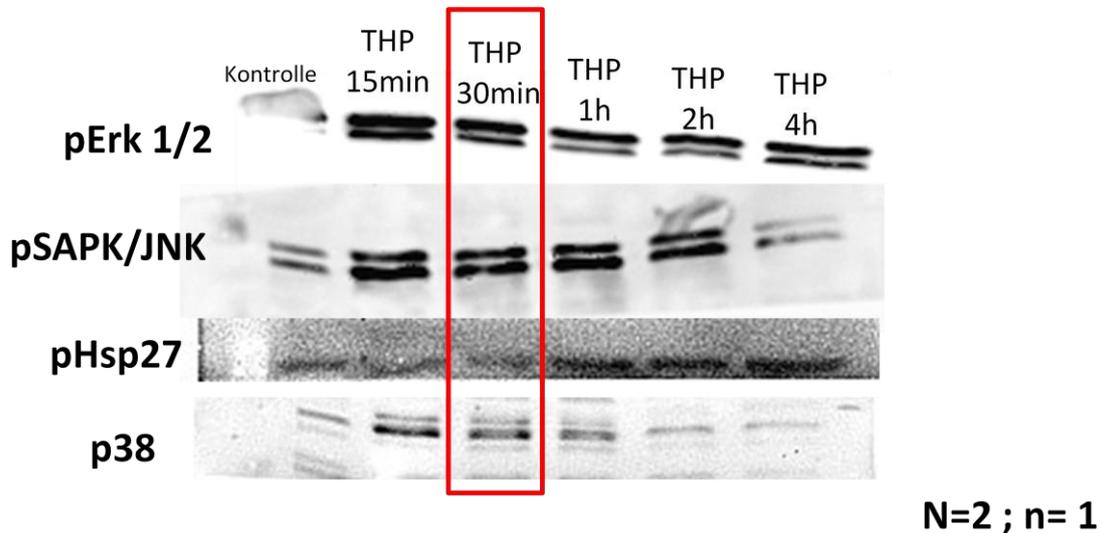


Abbildung 15: Expression der MAP-Kinasen phospho-Erk1/2, phospho-p38, phospho-SAPK/JNK und phospho-Hsp27 nach 15 min, 30 min, 1 h, 2 h oder 4 h Stimulation mit THP-1 Überstand
 phOB wurden mit dem Überstand von THP-1 Zellen stimuliert und anschließend Proteinlysate gewonnen. Die Expression der MAP-Kinasen wurde mittels Westernblot detektiert und nach regelmäßiger Proteinverteilung in der Ponceau Färbung qualitativ ausgewertet. Für phospho-Erk1/2, phospho-p38, phospho-SAPK/JNK war bereits nach 15-minütiger Stimulation die höchste Expression zu detektieren. Für phospho-Hsp27 war die Expression nach 1 Stunde besonders ausgeprägt. Es zeigte sich bei allen MAP-Kinasen eine erhöhte Expression bei Stimulation mit dem THP-1 Überstand im Vergleich zur Kontrollgruppe. (N=2, n=1)

4.3.2 Inhibition der MAP-Kinasen im „Scratch Assay“

Die Ergebnisse im WB zeigten eine Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und Erk1/2 durch die Stimulation von phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen. Um diese Aktivierung weiter zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die Auswirkung der Inhibitoren beider Signalwege auf die Migrationsfähigkeit von phOB im „Scratch Assay“ untersucht.

PhOB wurden mit dem Überstand von THP-1-Zellen (+THP) sowie dem Inhibitor SB 203580 (5 μ M) für die MAP-Kinase p38 (p38i) und U0126 (10 μ M) für die MAP-Kinase Erk1/2 (Erk i) stimuliert und ein „Scratch Assay“ durchgeführt, um einen möglichen Einfluss von Erk1/2 und p38 auf die Zuwachsrate und die Migration der Zellen bei Stimulation mit THP-1-Überstand zu ermitteln.

Wie in Abbildung 16 graphisch verdeutlicht wurde, zeigte sich eine signifikant verbesserte prozentuale Zuwachsrates im *in vitro* „Scratch Assay“ durch die Stimulation von phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen (34,9%) im Vergleich zur Kontrolle (** $p = 0,0024$; Mann-Whitney U-Test) mit 25,6%.

Durch die Zugabe des MAP-Kinase-Inhibitors SB 203580 (p38) zum RPMI Medium (-THP) war die prozentuale Zuwachsrates im „Scratch Assay“ mit 29,4% der phOB tendenziell höher als bei der Kontrolle. Die Zugabe von THP-1-Überstand zum Inhibitor zeigte, im Vergleich zur Zuwachsrates ohne den THP-1-Überstand, im Mittel eine etwas höhere Zuwachsrates. Allerdings war diese im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit THP-1-Überstand nicht statistisch relevant verändert.

Bei Stimulation der Osteoblasten mit Erk-Inhibitor (U0126) zum RPMI Medium (-THP) war die prozentuale Zuwachsrates im Scratch Assay der phOB (24,0%) im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert. Auffällig war allerdings, dass durch die Zugabe des Erk-Inhibitors und dem Überstand von THP-1-Zellen die Zuwachsrates des „Scratch“ nach 24 Stunden deutlich geringer ($p = 0,0399$; Mann-Whitney U-Test) war, als ohne die Inhibition von Erk1/2 (27,6%).

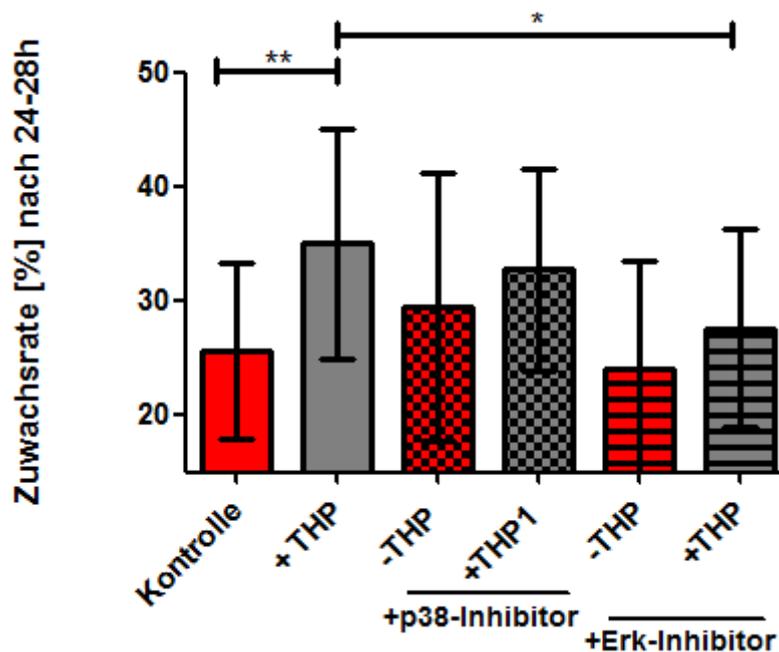


Abbildung 16: Einfluss von MAP-Kinase-Inhibitoren auf die prozentuale Zuwachsrate im „Scratch Assay“ humaner Osteoblasten

phOB wurden mit dem Überstand von THP 1-Zellen (+THP) sowie dem Inhibitor SB 203580 (für p38) und U0126 (für Erk1/2) stimuliert und ein „Scratch Assay“ durchgeführt. Die prozentuale Zuwachsrate zeigte eine signifikante ($p = 0,0024$) Zunahme bei Zellen, die mit dem Überstand von THP-1-Zellen stimuliert wurden im Vergleich zur Kontrolle. Es gab einen Trend, dass dieser Einfluss auch gegeben war, trotz Zugabe der Inhibitoren. Bei Stimulation der Osteoblasten mit Erk-Inhibitor und dem Überstand von THP-1 Zellen war die Zuwachsrate des „Scratch“ nach 24 h deutlich geringer ($p = 0,0399$) als ohne die Inhibition von Erk1/2. N=2; n=12

Anders als erwartet nahm die prozentuale Zuwachsrate im „Scratch Assay“ durch die Stimulation mit dem Inhibitor für p38 und dem THP-1 Überstand nicht signifikant ab. Durch die Behandlung der phOB mit dem Inhibitor für Erk1/2 konnte eine Tendenz zu einer geringeren Zuwachsrate gezeigt werden. Dies lässt auf einen gewissen Einfluss von Erk1/2, nicht aber von p38 auf die verbesserte Migrationsfähigkeit von phOB nach Stimulation mit dem THP-1-Überstand schließen.

4.3.3 Identifikation von MAP-Kinasen und STAT Signalwegen bei Stimulation von phOB mit THP-1-Überstand mithilfe des PathScan® „Intracellular Signaling Array“

Die Ergebnisse des WB zeigten, dass MAP-Kinasen vermehrt durch die Stimulation mit THP-1-Überstand in phOB aktiviert wurden. Die Ergebnisse im

„Scratch Assay“ mit den Inhibitoren von Erk1/2 und p38 lieferten weitere aber nicht ausreichende Erkenntnisse über mögliche Regulationsmechanismen der monozytären Zellen auf Osteoblasten. Um einen genauen Überblick über die Signalkaskaden zu erhalten, die durch Stimulation von phOB mit dem Überstand monozytärer Zellen aktiviert werden, wurde das PathScan® „Intracellular Signaling Array“ durchgeführt. Dafür wurden phOB von 13 Spendern (N = 13) mit dem Überstand von THP-1-Zellen oder zur Kontrolle mit RPMI-Medium stimuliert, Proteinlysate hergestellt und die relative Expression der Signalproteine detektiert.

Zusätzlich wurde der Einfluss des THP-1-Überstandes auf die Signalaktivierung von phospho-p38 und phospho-Erk 1/2, zum Vergleich mit Ergebnissen in der Literatur [84, 109] und denen im „Scratch Assay“ genauer untersucht. Dafür wurden phOB von 7 Spendern (N=7) zusätzlich mit THP-1-Überstand und SB 203580/ p 38 i (5 µM) oder U 0126/ Erk i (10 µM) stimuliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 als Heatmap dargestellt. Zur genaueren Darstellung wurden die Ergebnisse der relativen Expression von phospho-STAT1 und -STAT3, phospho-SAPK/JNK, phospho-Erk1/2, phospho-Hsp27 und phospho-Akt (Ser473) in phOB, bei Stimulation mit dem THP-1-Überstand im Vergleich zur Kontrolle, zusätzlich als Balkendiagramm in Abbildung 17 verdeutlicht.

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der relativen Expression der Signalproteine bei Stimulation mit THP-1-Überstand im Vergleich zur Kontrolle. Nach Stimulation mit THP-1-Überstand wurden in phOB eine signifikant (**p < 0.0001) verstärkte Expression von phospho-STAT1 und -STAT3 (Abbildung 17 F, G) sowie phospho-SAPK/JNK (A), phospho-Erk1/2 (B), phospho-Hsp27 (C) und phospho-Akt (Ser473) nachgewiesen. Die relative Expression von phospho- p70 S6 Kinase war durch die Stimulation der phOB mit THP-1-Überstand ebenfalls signifikant erhöht (**p = 0,0056, Mann-Whitney-U-Test).

Die relative Expression von phospho-GSK3-β und p53 nahm im Vergleich zur Kontrolle tendenziell eher zu.

Die Stimulation von phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen bewirkte keine Veränderung in der relativen Expression von phospho-p38 und phospho-Akt

(Thr 308). Ebenso bewirkte die Stimulation von phOB mit dem THP-1-Überstand, im Vergleich zur Kontrolle, keine statistisch relevante Veränderung in der relativen Expression von phospho-AMPK. Die relative Expression von phospho-S6 Ribosomal Protein in phOB nahm dagegen durch die Stimulation mit THP-1-Überstand signifikant ab ($***p < 0.0001$). Zusätzlich zeigte sich durch die Stimulation der phOB mit dem Überstand der THP-1-Zellen eine geringere relative Expression von phospho-PRAS 40 ($***p = 0,0002$; Mann-Whitney U-Test) und cleavage-PARP ($**p = 0,0023$; Mann-Whitney-U-Test). Diese Tendenz zeigte sich ebenfalls bei der relativen Expression von phospho-mTOR. Bei Betrachtung der visuellen Darstellung der Ergebnisse des „Intracellular Signaling Array“ fielen besonders die Ergebnisse nach Stimulation mit den Inhibitoren von Erk1/2 und p38 auf. Durch die Stimulation der phOB mit THP-1-Überstand und den Inhibitoren für Erk1/2 und p38 war die Aktivität des proapoptotischen Signalproteins Bad signifikant erhöht. Die Stimulation mit THP-1-Überstand alleine bewirkte keinen Anstieg der phospho-Bad-Expression in phOB.

Zusätzlich wurde bei Stimulation mit beiden Inhibitoren deutlich mehr phospho-STAT1, 3, phospho-SAPK/JNK, phospho-Akt (Ser 473)/(Thr 308), phospho-GSK 3 β , phospho-mTOR, phospho-AMPK- α , phospho-PRAS 40, phospho-S6 Ribosomal Protein sowie phospho-p70 S6 Kinase in phOB exprimiert.

PARP, Caspase3, p53 und pHsp27 wurden durch die Stimulation mit dem Inhibitor für Erk1/2 und dem THP-1-Überstand vermehrt aktiviert im Vergleich zur Kontrolle bzw. alleiniger Stimulation mit THP-1-Überstand.

Als zentrales Ergebnis dieses Versuches musste allerdings die Aktivierung von Erk1/2 und p38 betrachtet werden. Durch Inhibition dieser beiden Signalwege wurde jeweils eine verminderte Aktivierung vermutet. Die relative Expression von phospho-p38 konnte allerdings in den stimulierten phOB nicht durch den Zusatz des p38-Inhibitors SB 203580 unterdrückt werden. Diese war sogar im Vergleich zur Kontrolle und zur alleinigen Stimulation mit THP-1-Überstand signifikant ($***p < 0,0001$) erhöht.

Auch die relative Expression von phospho-Erk1/2 konnte durch Zusatz von SB 203580 und U 0126 zum THP-1-Überstand nicht unterdrückt werden. Die

Ergebnisse

relative Expression von phospho-Erk1/2 stieg bei Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB 203580 signifikant ($***p < 0,0001$) an. Zusätzlich war die Aktivierung von phospho-Erk1/2, trotz Zugabe des Inhibitors, signifikant ($***p < 0,0001$) höher als bei der Kontrolle.

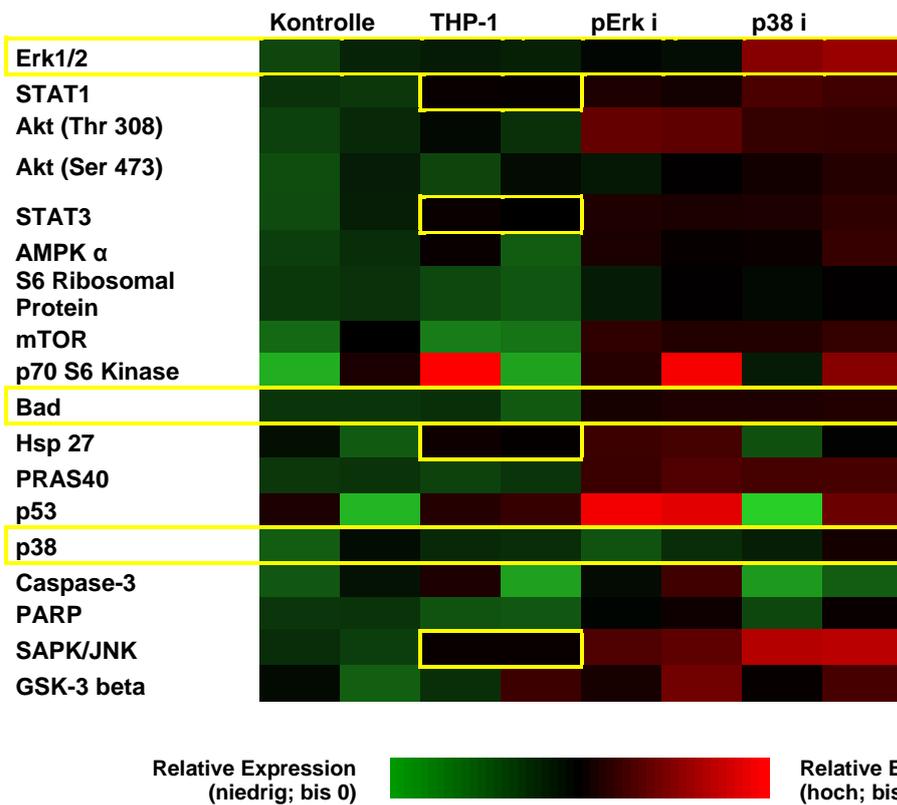


Tabelle 2: Veränderte Expression der interzellulären Signalproteine bei Stimulation der phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen

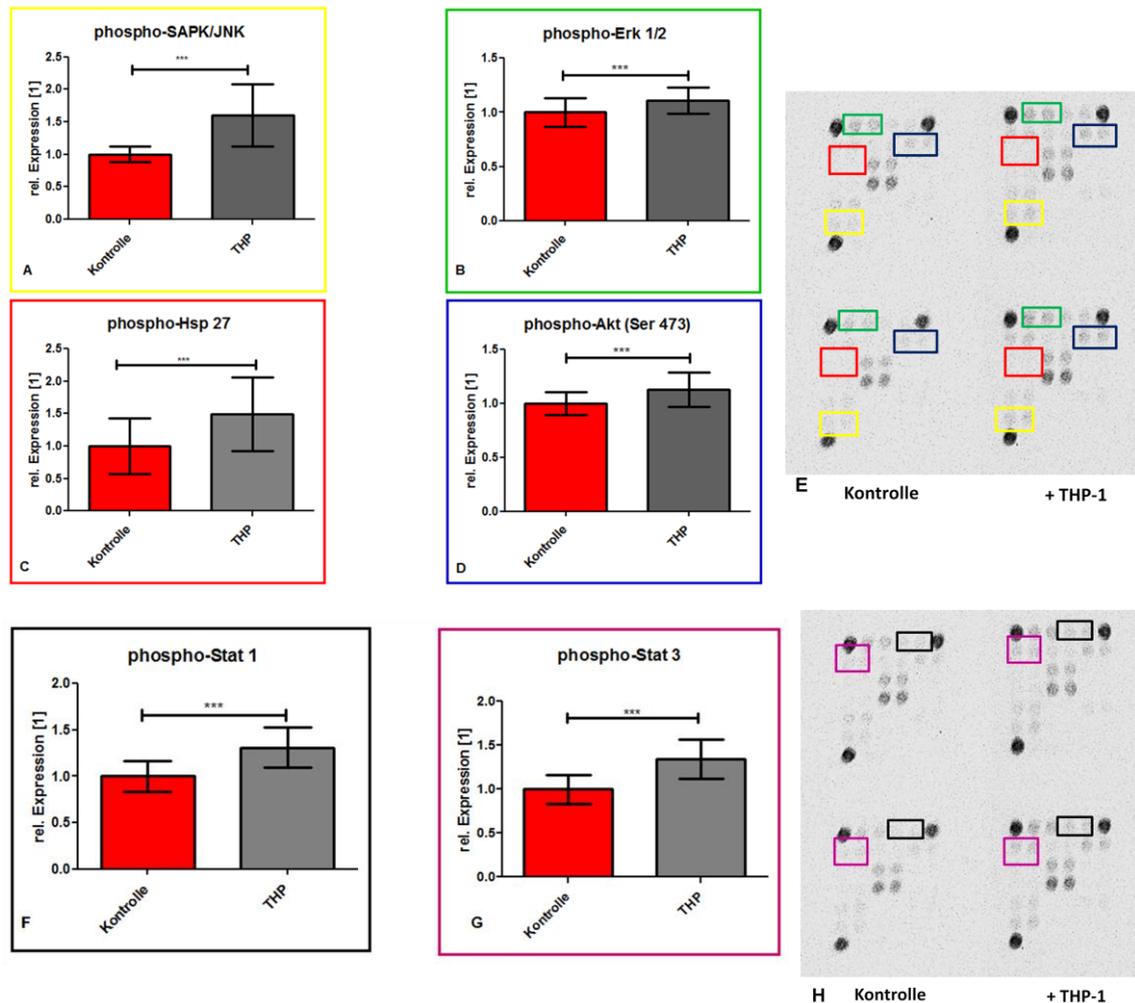


Abbildung 17: THP-1-Überstand aktivierte SAPK/JNK, Erk 1/2, Akt, Hsp27 sowie STAT1 und 3 in phOB

phOB wurden 30min mit dem Überstand von THP-1-Zellen (THP) und RPMI-Medium (Kontrolle) stimuliert und anschließend Proteinlysate hergestellt. Die Stimulation der phOB mit dem THP-1-Überstand führte zu einer signifikanten ($***p < 0,0001$) Erhöhung der Aktivität von SAPK/JNK(A), Erk1/2(B), Akt (Ser 473 (C)) und Hsp27(D). Des Weiteren war die relative Expression von phospho-STAT1 (schwarz/F) und phospho-STAT3 (violett/G) durch die Stimulation mit THP-1-Überstand signifikant erhöht ($***p < 0,0001$). N=13; n=2

4.3.4 Verminderte Aktivierung von Erk1/2 in phOB nach Stimulation hyperglykämisch kultivierter THP-1-Zellen

Da Erk1/2 im „Intracellular Signaling Array“ als ein wichtiger Signalweg identifiziert wurde, der bei Stimulation von phOB mit THP-1-Überstand aktiviert wird, sollte nun auch exemplarisch die Auswirkung von hyperglykämisch kultivierten THP-1-Zellen auf diesen Signalweg identifiziert werden. Dazu wurden THP-1-Zellen über 2 Tage in 4,5 g/l Mannitol +/- 160 i.E. Insulin oder 4,5 g/l Glucose +/- 160 i.E. Insulin zusätzlich zu RPMI-Medium kultiviert. Mit den entstandenen Überständen wurden anschließend phOB (N = 4) 30 min lang

stimuliert, Proteinlysate erstellt und der Westernblot durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 18 graphisch verdeutlicht.

Durch die Stimulation der phOB mit THP-1-Zellen konnte hier nur eine leichte, aber nicht signifikant erhöhte Erk 1/2-Aktivierung gesehen werden. Ähnlich war der Trend bei der Stimulation mit THP-1-Zellen, die mit Mannitol (NG) kultiviert wurden. THP-1-Zellen, die in Glukose (HG) kultiviert wurden, zeigten eine ähnliche Expression von phospho-Erk1/2. Es gab einen Trend, dass die Stimulation mit Insulin (NG+I) zu einer leichten Verminderung der Aktivierung von Erk1/2 führte. Die Ergebnisse in diesem Westernblot zeigten allerdings nur eine Tendenz. Die relativen Expressionen von Erk1/2 waren nicht signifikant verändert.

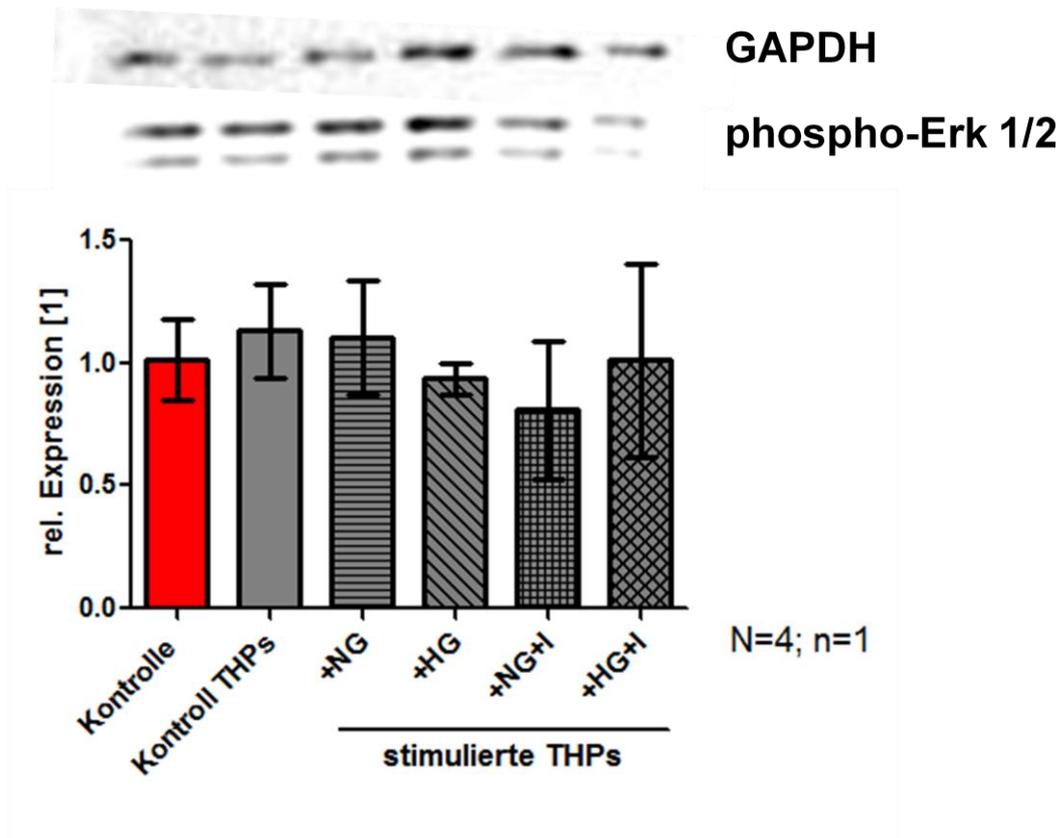


Abbildung 18: leichte Veränderungen in der Aktivierung von Erk1/2 bei Stimulation der phOB mit dem Überstand hyperglykämisch kultivierter THP-1-Zellen

Die Ergebnisse des Westernblots zeigten, eine dezente, aber nicht signifikante Verminderung der phospho-Erk1/2-Expression aus phOB nach Stimulation mit hyperglykämisch kultivierten THP-1-Zellen (HG). Oben wurde exemplarisch die Expression von phospho-Erk1/2 und GAPDH von Spender 281 (Membran 1) dargestellt.

4.3.5 Zusammenfassung 3: Identifikation von MAP-Kinasen und STAT-Signalwegen als mögliche regulatorische Mechanismen des Einflusses monozytärer Zellen auf den Knochen

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation der phOB mit dem Überstand von THP-1 Zellen im Vergleich zur Kontrolle, zu einer signifikant erhöhten relativen Expression von phospho-SAPK/JNK, phospho-Erk1/2, phospho-Hsp27 sowie phospho-Akt (Ser 473) führt. Außerdem ließ sich, im Vergleich zur Kontrolle, eine erhöhte Aktivierung von STAT1 und STAT3 durch die Stimulation von phOB mit dem THP-1-Überstand darstellen. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse des „Intracellular Signaling Array“, dass eine Stimulation der phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen und den Inhibitoren von Erk1/2 und p38 zu einer erhöhten Aktivierung vieler Signalwege führte. Insbesondere aktivierte diese Stimulation vermehrt proapoptotische Signalwege (Bad, p53) und führte nicht zur erwarteten Inhibition von Erk1/2 und p38. Entsprechend der Ergebnisse konnte die Aktivierung von Erk1/2, nicht aber von p38, für die verbesserte Migrationsfähigkeit und Funktion von phOB nach Stimulation mit dem THP-1-Überstand festgestellt werden.

4.4 Identifikation der durch PBMCs und THP-1-Zellen exprimierten Zytokine

4.4.1 Migration von phOB ist bei Stimulation mit unterschiedlichen Fraktionen des THP-1-Überstandes nicht verbessert

Nach den interessanten Ergebnissen im „Intracellular Signaling Array“ bestand weiterhin die Frage, welcher Bestandteil des THP-1-Überstandes in der Lage ist, die Migrationsfähigkeit während der Frakturheilung sowie die osteogene Differenzierung von Knochenzellen, positiv zu beeinflussen. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, durch Fraktionierung mithilfe des Vivaspin 6® von Sartorius, eine bestimmte Fraktion des THP-1-Überstandes für die Wirkung auf die Migrationsfähigkeit verantwortlich zu machen.

THP-1-Zellen wurden kultiviert und die Überstände mithilfe des Vivaspin 6® in Fraktionen von > 100 kDa, 100-50 kDa, 50-30 kDa, 30-10 kDa, 10-5 kDa, 5-3 kDa und < 3 kDa getrennt.

Anschließend wurde ein „Scratch Assay“ mit phOB von 6 Spendern (N = 6) mit dem THP-1-Überstand und den Fraktionen durchgeführt. Für die Kontrolle wurden, wie oben beschrieben, phOB mit RPMI-Medium stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt.

Durch die Stimulation der phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen ist die prozentuale Zuwachsrate im „Scratch Assay“ signifikant höher als ohne Zellüberstand (*p = 0,0226, Mann Whitney U-Test).

Bei den prozentualen Zuwachsraten im „Scratch Assay“ der phOB, die mit den unterschiedlichen Fraktionen des THP-1-Überstandes stimuliert wurden, gab es keine klar erkennbaren Unterschiede. Die durchschnittliche Zuwachsrate lag zwischen 39 und 45%. Es gab keinen Hinweis darauf, dass es eine spezifische Fraktion gibt, die die Zuwachsrate von phOB besonders beeinflusst.

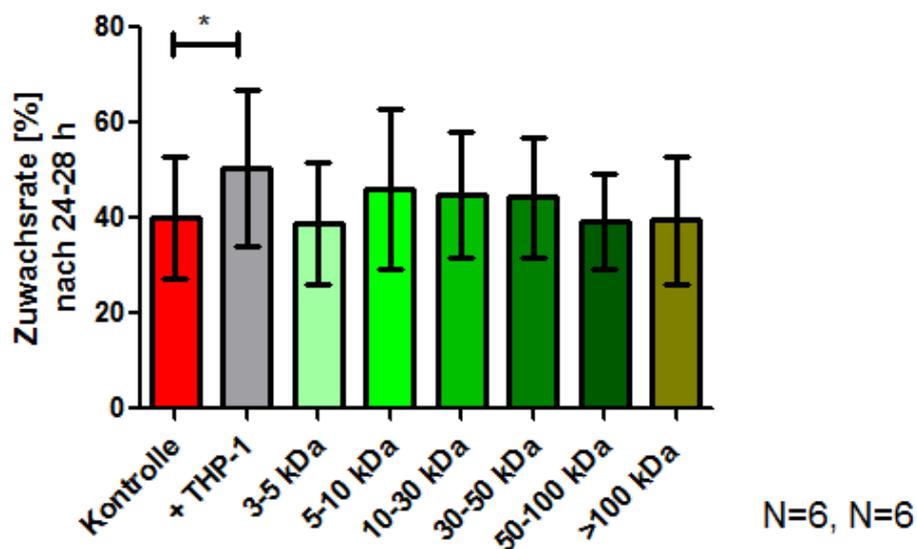


Abbildung 19: Einfluss der unterschiedlichen Fraktionen des THP-1 Überstandes auf die prozentuale Zuwachsrate im „Scratch Assay“

PhOB wurden mit Fraktionen, des Überstandes von THP-1 Zellen stimuliert und ein „Scratch Assay“ durchgeführt. Im Vergleich zur Kontrolle, war die prozentuale Zuwachsrate, der mit dem THP-1 Überstand stimulierten Osteoblasten, signifikant (*p = 0,0226) größer. Die prozentuale Zuwachsrate im „Scratch Assay“ wies keine Veränderung nach Stimulation mit den unterschiedlichen Fraktionen auf.

Bei genauerer Betrachtung der Rohdaten fiel zudem auf, dass es sehr starke Spendervariabilität gab (s. 14.3.8.).

Das „Scratch Assay“ mit den verschiedenen Fraktionen des THP-1-Überstandes, konnte keine Fraktion als besonders einflussreich auf die Zuwachsrates identifizieren. Zusätzlich fielen bei diesem Versuch sehr große Varianzen auf. Aus diesem Grund wurden die Fraktionen des THP-1-Überstandes im Anschluss durch gelelektrophoretische Auftrennung untersucht (s. 14.3.8.). Diese und anschließende Silberfärbung zeigten, dass sich die Proteinfractionen des THP-1-Überstandes, die eine Größe von 100-50, 50-30, 30-10 und 10-5 kDa haben sollten, alle eine Proteinbande von 50 kDa aufwiesen. Die Fraktionen 3-5 kDa und <3 kDa zeigten überhaupt keine gefärbten Proteinbanden. Die Fraktionierung mittels Vivaspin 6 ® konnte somit nicht den erwarteten Effekt zeigen und es wurden keine weiteren Versuche mit den fraktionierten THP-1-Überständen durchgeführt.

4.4.2 Kein Einfluss von IL-6 auf die Funktion von phOB

Im „Intercellular Signaling Array“ konnte eine Aktivierung von MAP-Kinasen und STAT1/3 durch den THP-1-Überstand gezeigt werden.

Aus diesem Grund wurde nach einem Bestandteil im Überstand der monozytären Zellen gesucht, der diese Signalkaskaden aktivieren könnte.

Zwei Proteine, die in der Lage sind, MAP-Kinasen und STAT-Signalwege zu aktivieren, sind TGF- β_1 und IL-6 [110-117]. Zusätzlich gibt es in der Literatur Hinweise auf das Vorhandensein der beiden Zytokine im Sekretom von monozytären Zellen [118-120].

Aus diesem Grund wurde die Wirkung von TGF- β_1 und IL-6 auf die osteogene Differenzierung im Zusammenspiel mit dem THP-1-Überstand näher untersucht.

PhOB wurden differenziert und mit dem Überstand von THP-1-Zellen sowie IL-6 (10 ng/ml) und TGF- β_1 (5 ng/ml) stimuliert. Die Ergebnisse des Differenzierungsversuches sind in Abbildung 20 graphisch dargestellt.

Durch die Stimulation der phOB mit THP-1-Überstand konnte, wie schon in anderen Versuchen, eine signifikant (***) höhere AP-Aktivität als bei der Kontrolle detektiert werden. Der Zusatz von IL-6 ebenso wie die Kombination aus IL-6 und TGF- β_1 führten an Tag 4 (A) zu einer signifikant (***) niedrigeren AP-Aktivität im Vergleich zur Stimulation

Ergebnisse

mit dem THP-1-Überstand. Der Trend bestand ebenfalls an Tag 7 und 14 (B, C).

Bei der Stimulation der phOB mit einer Kombination aus dem Überstand der THP-1-Zellen und dem TGF- β_1 zeigte sich eine signifikante Zunahme der AP-Aktivität, im Vergleich zur Kontrolle an allen Tagen (A, B, C). Dabei war die verbesserte AP-Aktivität ähnlich hoch wie bei der reinen Stimulation mit THP-1-Überstand. Es zeigte sich an Tag 4 eine Menge von 11,6 pM pNP/h, an Tag 7 24,3 pM pNP/h und an Tag 14 81,4 pM pNP/h.

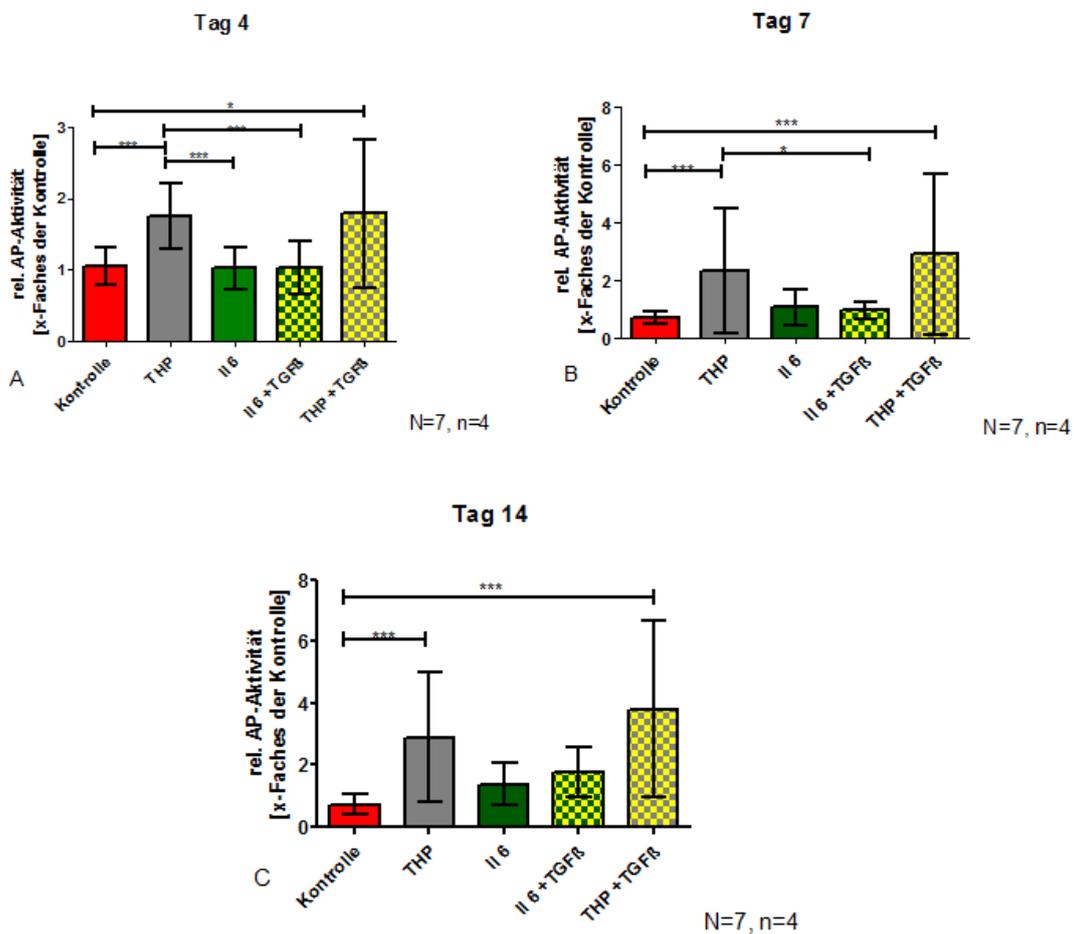


Abbildung 20: Verbesserung der AP-Aktivität bei der Zugabe von THP-1-Überstand und TGF- β_1
phOB wurden über 4 (A), 7 (B) und 14 (C) Tage differenziert und mit Überstand von THP-1-Zellen sowie IL-6 und TGF- β_1 stimuliert. Die Stimulation mit dem Überstand der THP-1 Zellen führte bei phOB zu einer signifikant erhöhten AP-Aktivität an Tag 4, 7 und 14 (** $p < 0,0001$). Der Zusatz von IL-6 ebenso wie der Zusatz von IL-6+TGF- β_1 war an Tag 4 signifikant schlechter, als der Zusatz von THP-1-Überstandes für die AP-Aktivität (** $p < 0,0001$). Die Kombination aus dem THP-1-Überstand und TGF- β_1 führte an Tag 4 (* $p < 0,05$) 7 und 14 (** $p < 0,001$) zu einer signifikant erhöhten AP-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. N=7; n=4

4.4.3 Vermehrte Expression von IL-6 aus PBMCs

Die Ergebnisse der AP-Messungen wiesen nicht direkt darauf hin, dass IL-6 das Schlüssel-Protein im Überstand von THP-1-Zellen ist, welches einen positiven Einfluss auf den Knochen hat. Allerdings gibt es verschiedene Untersuchungen, die auf eine Expression von IL-6 aus monozytären Zellen hindeuten [119]. Aus diesem Grund wurde mit den Überständen von THP-1-Zellen und PBMCs von Kontrollprobanden und T2DM-Patienten der IL-6-ELISA durchgeführt. THP-1-Zellen wurden wie in 3.1.2 kultiviert und der Überstand benutzt. Die PMBCs wurden aus EDTA Blut von 5 Kontrollprobanden und 3 Patienten mit T2DM, mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert und für 24 Stunden inkubiert. Die Zell-Überstände wurden für den IL-6-ELISA benutzt. Die ermittelte IL-6-Konzentration wurde in Abbildung 21 dargestellt.

Die mittels ELISA detektierte Proteinkonzentration an IL-6 war bei allen Proben mit einer Konzentration von unter 1,5 ng/ml gering.

Während die Konzentration bei den untersuchten Überständen der Zelllinie THP-1 am geringsten ausfielen (<1,5 ng/ml), konnten bei den untersuchten humanen PBMC-Überständen signifikant (**p < 0,0001) höhere IL-6 Spiegel detektiert werden. Sowohl die Konzentration im PBMC-Überstand von gesunden Kontrollprobanden, als auch die Konzentration von IL-6 im Überstand der PBMCs hospitalisierter T2DM Patienten war gegenüber dem THP-1-Überstand erhöht.

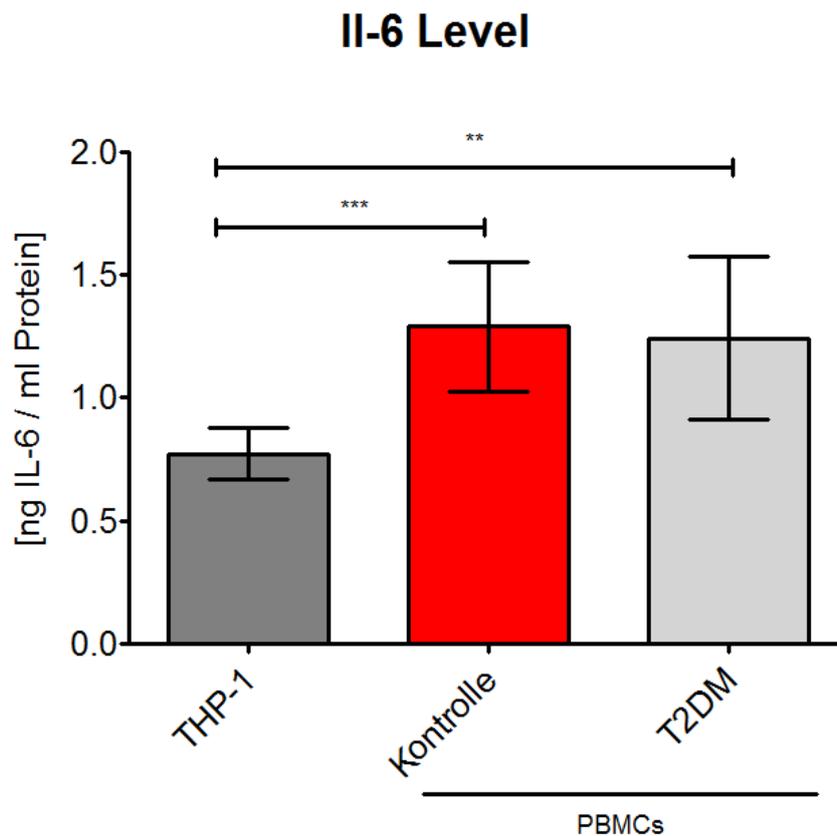


Abbildung 21: IL-6-Konzentrationen im Überstand von THP-1-Zellen und PBMCs gesunder Kontrollprobanden und T2DM-Patienten

Der IL-6-ELISA wurde mit Überständen von THP-1-Zellen und PBMCs gesunder Kontrollprobanden und T2DM-Patienten, die zur Zeit der Untersuchung in der BG Unfall Klinik Tübingen hospitalisiert waren, durchgeführt. Die IL-6-Konzentration aus THP-1-Zellen war niedrig (> 1 ng/ml). Die Konzentration im PBMC-Überstand von gesunden Kontrollprobanden war signifikant ($***p < 0,0001$) höher als bei THP-1-Zellen. Die Konzentration von IL-6 im Überstand der PBMCs hospitalisierter T2DM Patienten war ebenfalls signifikant ($**p = 0,0013$) erhöht. N = THP- 7, Mono 5 D3 //n = 1

4.4.4 Verändertes Zytokinprofil bei T2DM und hyperglykämisch kultivierten THP-1-Zellen

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob monozytäre Zellen eine Rolle bei der verschlechterten diabetischen Frakturheilung spielen. In diesem Zusammenhang wurde mithilfe des „Human Cytokine Array C5“ von RayBio untersucht, inwieweit es eine Veränderung im Zytokinprofil bei T2DM bzw. hyperglykämisch kultivierten THP-1-Zellen im Vergleich zu Normalbedingungen gab (s. 3.11.).

Zunächst wurde ausgeschlossen, dass die Zellzahl oder unterschiedliche Kultivierungstage von THP-1-Zellen einen Unterschied im Zytokinprofil zur Folge haben. Dazu wurden 4 unterschiedliche THP-1-Überstände (1, 2, 3, 4),

Überstände von THP-1-Zellen, die mit einer definierten Zellzahl ($2,5 \times 10^6$, 10^7 und 2×10^7 Zellen/ml) kultiviert wurden und gepoolten humanen Monozyten (PBMCs) gesunder Kontrollprobanden (N=10) untersucht und verglichen (s. 14.3.10.).

Das Zytokinprofil der untersuchten Überstände war, bis auf vereinzelte Ausreißer, sehr ähnlich. Es gab zwar eine gewisse Varianz in der Zytokinexpression der Überstände, allerdings schien die Zellzahl, mit der THP-1-Zellen kultiviert wurden, keinen Einfluss auf die Quantität der Expression der Zytokine zu haben. Die Zytokinexpression der gepoolten PBMCs gesunder Kontrollprobanden zeigte ein ähnliches Muster wie das der hier untersuchten THP-1-Überstände. Die Zytokinexpression von PBMCs und THP-1-Zellen konnte somit mit der Zytokinexpression unter diabetischen Bedingungen weiter untersucht und dargestellt werden.

Dazu wurde das Zytokinprofil von humanen monozytären Zellen (PBMCs) im Vergleich zu hyperglykämisch bzw. normoglykämisch kultivierten THP-1-Zellen (+ Mannitol; + Glucose, + Mannitol/Insulin, + Glucose/Insulin) getestet. Die PBMCs wurden aus dem Vollblut von 10 gesunden Kontrollprobanden (N=10) oder von 5 Patienten aus der BG Unfallklinik Tübingen mit T2DM (N=5) isoliert und über 24 Stunden kultiviert. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 3 als Heatmap dargestellt.

Eine hohe Expression von Wachstumsfaktoren wie BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), IL-16, RANTES (Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted), EGF (epidermal growth factor), FGF-9 (fibroblast growth factor 9), GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor), IGFBP-2 (Insulin-like-growth-factor-binding-protein-2), VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A), TGF- β_2 und Chemokinen, wie GCP-2 (Granulocyte chemotactic protein 2), MIP 1- β (Macrophage Inflammatory Proteins 1- β), Fractalkine sowie Angiogenin, wurden in allen untersuchten Überständen deutlich. Zusätzlich konnte eine Zytokinexpression von OSM (Oncostatin M), OPG (Osteoprotegerin) und OPN (Osteopontin) in allen untersuchten Überständen gezeigt werden. Proinflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-10, IL-8, TNF- α und INF- γ wurden von THP-1-Zellen und Kontroll-PBMCs kaum sezerniert.

Das Zytokinprofil der PBMCs von T2DM-Patienten war im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden stark verändert. Auffällig war zunächst eine deutlich stärkere Zytokinexpression in annähernd allen untersuchten Zytokingruppen. Einzig die relative Expression von IL-10, IGFBP-3, IL-6, VEGF-A, G-CSF, IL-13 und IL-8 war bei T2DM-Patienten nicht deutlich verstärkt (s.u.). In der Darstellung (Tabelle 3) wurde deutlich, dass sowohl die in NG (+/-Insulin) als auch in HG (+/-Insulin) kultivierten THP-1-Zellen eine deutlich hohe Expression von u.a. Angiogenin, RANTES, EGF, GDNF; IP-10 und TGF- β_2 zeigten. Die zugeführte Glukose hatte einen negativen Einfluss auf die Expression von u.a. PLGF, NT-3, OPG, Eotaxi-3, IL-12, IL-15, G-CSF im Vergleich zur Kontrolle (Mannitol).

Auf MCP-1, 2, 3, und 4 zeigte die Behandlung mit Glukose keinen negativen Einfluss. Die Expression blieb annähernd gleich niedrig.

Wie auch unter Normalbedingungen (Tabelle 3) konnte im Überstand von THP-1-Zellen, die in Mannitol +/- Insulin oder Glukose +/- Insulin kultiviert wurden, nur eine geringe Expression an TNF- α , TGF- β_1 und IL-6 detektiert werden (s.u.).

Die Zugabe von Insulin zum Kulturmedium der THP-1-Zellen führte zu einer Steigerung der Expression von IL-7, IL-8 und IL-10.

In den Überständen der Kontroll-PBMCs konnte eine signifikant höhere relative Expression von IL-6, im Vergleich zum THP-1-Überstand und den Überständen von T2DM-Patienten, detektiert werden. Allerdings war die Expression von IL-6 sehr gering und lag mit $> 4\%$ unterhalb der Schwankung von 2 Standardabweichungen. Die detektierte Chemolumineszenz war oftmals im Bereich des Signals der Negativkontrolle.

Die relative Expression von VEGF-A unterschied sich nicht bei den untersuchten Zellüberständen und lag bei knapp $> 17\%$.

Bei THP-1-Zellen, die in Glukose bzw. in Glukose und Insulin kultiviert wurden, war die relative Zytokinexpression von Angiogenin signifikant erniedrigt. Die relative Expression von VEGF-A war durch die Kultivierung der Zellen in Glukose signifikant erhöht. Allerdings nahm die relative Expression von VEGF-A durch die Kultivierung der THP-1-Zellen in Glukose + Insulin signifikant ab.

Ergebnisse

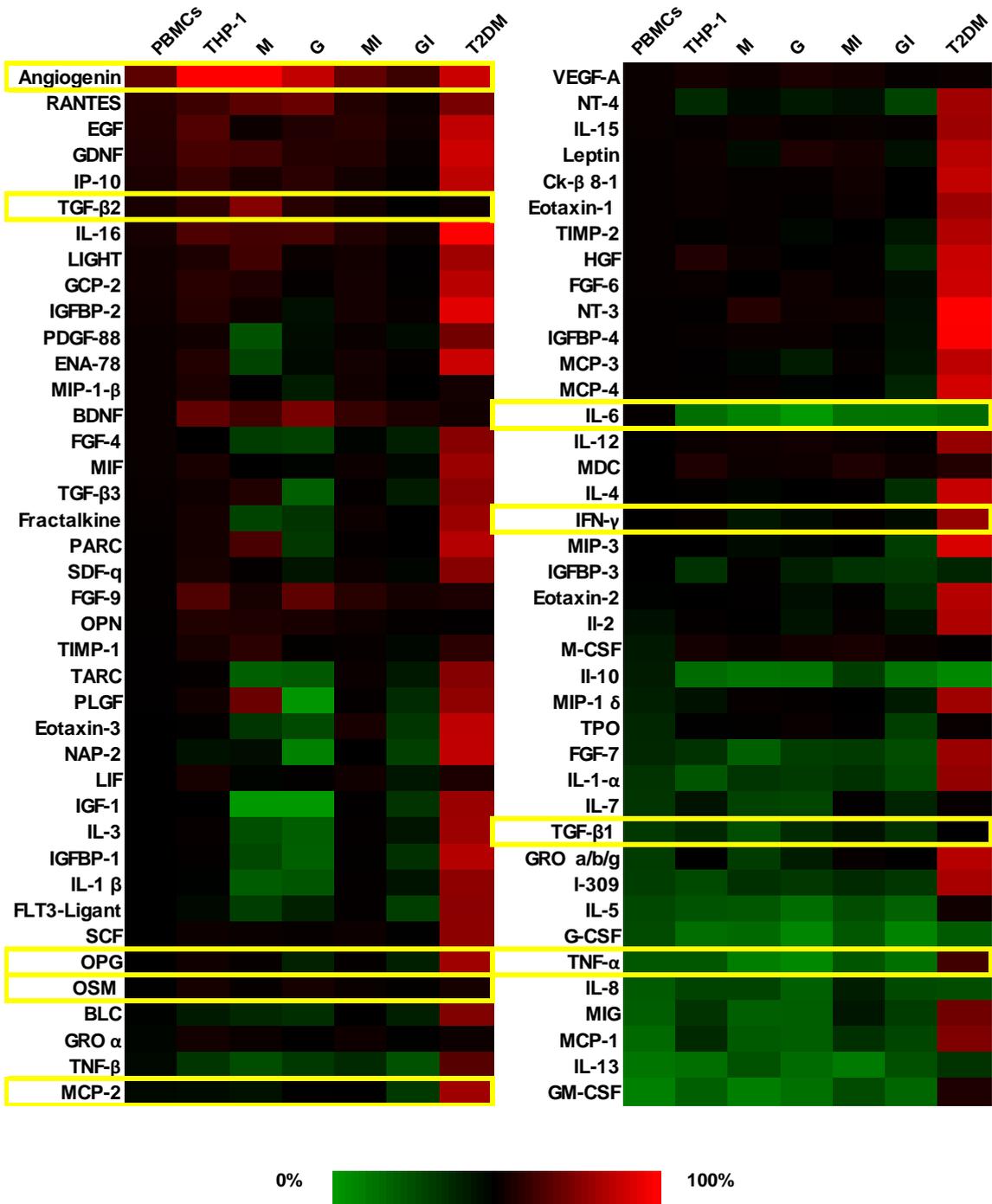


Tabelle 3: Verändertes Zytokinprofil bei PBMCs von T2DM Patienten

Zur vereinfachten und deutlicheren Darstellung einzelner Zytokinlevel wurde die Zytokinexpression von TNF- α , INF- γ , TGF- β_1 , OSM und OPG zusätzlich als Balkendiagramm (s. Abbildung 22-24) dargestellt.

Die relative Zytokinexpression von TNF- α war bei THP-1-Zellen sowie Kontroll-PBMCs sehr gering und lag teilweise unterhalb des Detektionsniveaus (Negativkontrolle/0%).

Allerdings konnte bei PBMCs der T2DM-Patienten eine signifikant erhöhte (**p < 0,0001, 50,6%) relative Zytokinexpression von TNF- α , im Vergleich zu PBMCs der Kontrollprobanden (4%), als auch den THP-1-Zellen (4,8%) gezeigt werden (A).

Bei den THP-1-Zellen wiesen die in Insulin kultivierten Zellen eine signifikant (**p < 0,001) erhöhte relative Expression von TNF- α auf (bis 4,1%). Dieser Effekt konnte beim Vergleich von THP-1-Zellen, die in Mannitol und Mannitol + Insulin kultiviert wurden, gezeigt werden. Ebenso bei dem Vergleich von THP-1-Zellen, die in Glukose und Glukose + Insulin (2%) kultiviert wurden (*p < 0,05) (B).

Ähnlich verhielt sich die Zytokinexpression von INF- γ (C, D). Diese war ebenfalls bei PBMCs der T2DM-Patienten im Vergleich zu PBMCs der Kontrollprobanden um ca. 88% erhöht (**p < 0,0001). Gleichzeitig zeigte sich eine leicht verminderte relative INF- γ -Expression von ca. 4% bei PMBCs im Vergleich zur Ziellinie THP-1 (*p < 0,05) (C).

Wie auch bei TNF- α (B) zeigte sich eine signifikant (**p < 0,0001) erhöhte INF- γ Expression bei THP-1-Zellen, die in Mannitol und Insulin, im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Insulin kultiviert wurden (D). Anders als bei TNF- α konnte dieser Effekt nicht beim Vergleich Glukose vs. Glukose + Insulin gezeigt werden.

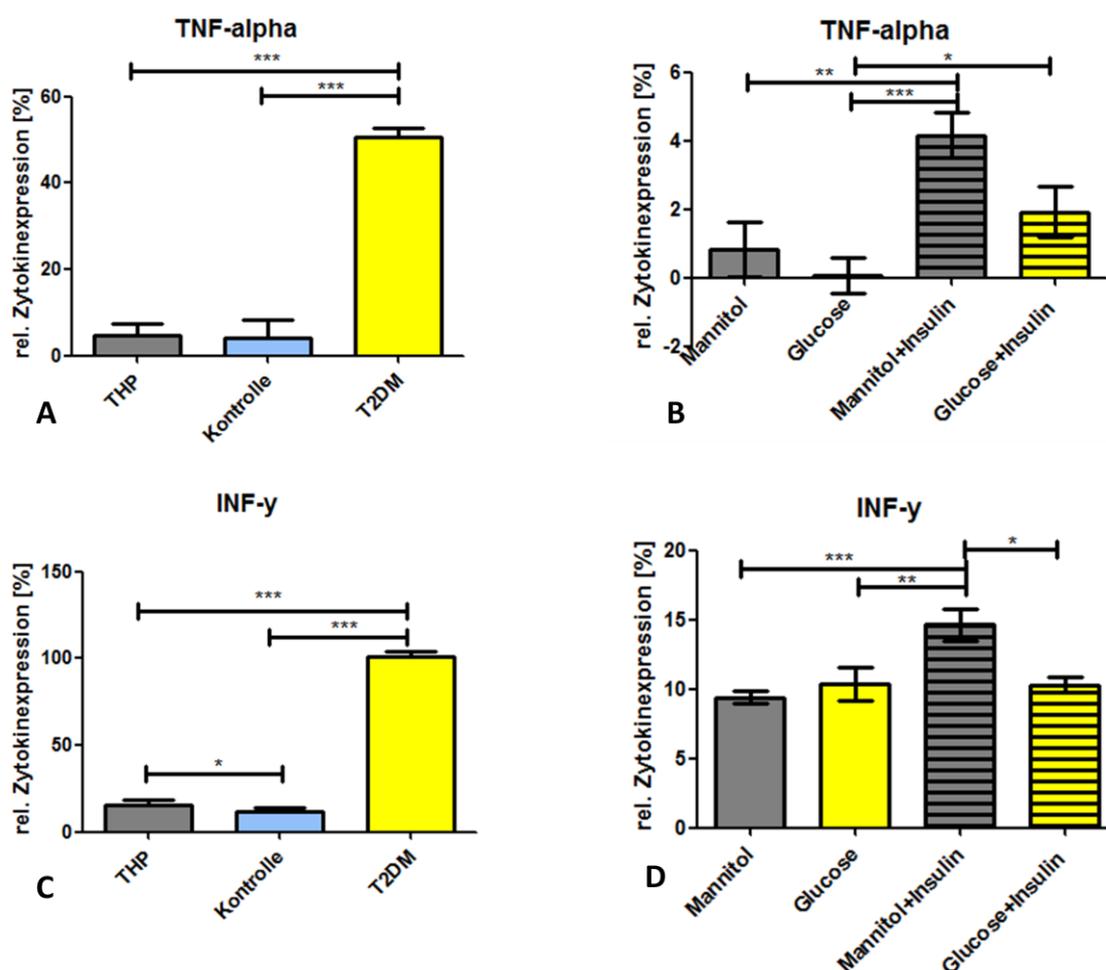


Abbildung 22: Erhöhte Zytokinexpression von TNF- α und INF- γ bei T2DM

Die relative Zytokinexpression von TNF- α und INF- γ von PBMC gesunder Kontrollprobanden und Patienten mit T2DM sowie THP-1-Zellen (A,C) wurden mit dem „Human Cytokine Array C5“ untersucht. Ebenso wurde die Zytokinexpression von THP-1-Zellen, welche in Mannitol (+/- Insulin) und Glucose (+/- Insulin) kultiviert wurden, gemessen (B,D). Die relative Zytokinexpression von TNF- α sowie von INF- γ war bei PBMCs der T2DM-Patienten, im Vergleich zu PBMCs der Kontrollprobanden als auch der THP-1-Zellen, signifikant erhöht ($***p < 0,0001$). Die Stimulation von THP-1-Zellen mit Insulin führte zu einer signifikant erhöhten Expression von TNF- α und INF- γ . Durch die Zugabe von Glucose zum THP-1-Medium konnte eine tendenziell geringere Expression von TNF- α erzielt werden (C).

Wie schon beschrieben, war das Zytokinprofil der T2DM-PBMCs deutlich verändert und zeigte neben der vermehrten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α) eine signifikant höhere Expression (12%) von TGF- β_1 , im Vergleich zu THP-1-Zellen ($**p < 0,001$) und Kontroll-PBMCs ($***p < 0,0001$) (A).

Die relative Expression von TGF- β_1 war bei THP-1-Zellen, die in Mannitol und Insulin (10%) kultiviert wurden signifikant ($***p < 0,0001$) höher als bei NG-Kultivierung (Mannitol, 5%). Zusätzlich war die relative Expression von TGF- β_1

bei Stimulation der THP-1-Zellen mit Glukose im Vergleich zu Mannitol signifikant ($*p < 0,05$) erhöht (B)

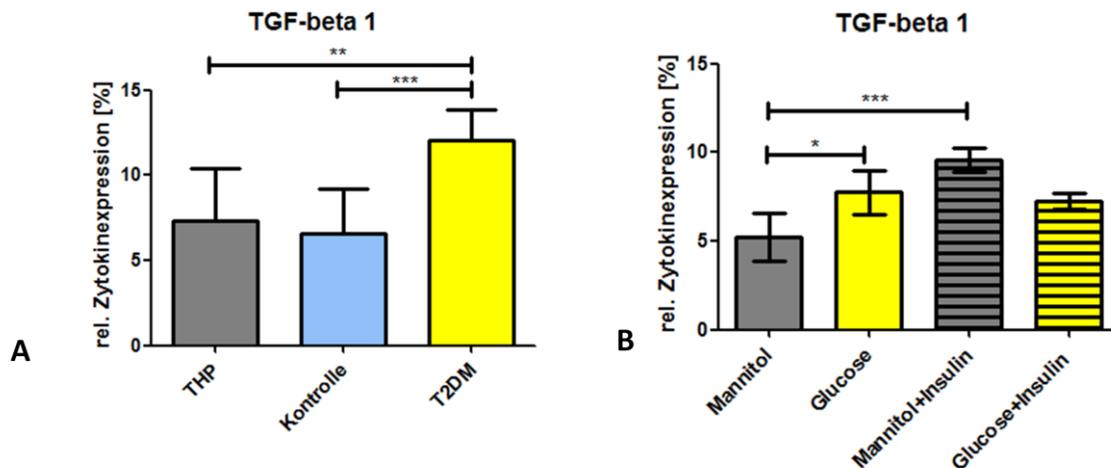


Abbildung 23: Erhöhte Zytokinexpression von TGF-β₁ bei T2DM und durch Glukose

Die relative Zytokinexpression von TGF-β₁ von PBMC gesunder Kontrollprobanden und Patienten mit T2DM sowie THP-1-Zellen wurde mit dem „Human Cytokine Array C5“ untersucht. Die relative Zytokinexpression von TGF-β₁ war bei PBMCs der T2DM-Patienten im Vergleich zu PBMCs der Kontrollprobanden ($***p < 0,0001$) als auch der THP-1-Zellen ($**p < 0,001$) signifikant erhöht. Die Stimulation von THP-1-Zellen mit Insulin führte zu einer signifikant höheren Expression von TGF-β₁ durch die Zugabe von Glukose zum THP-1-Medium konnte eine signifikant erhöhte Expression von TGF-β₁ erzielt werden (B) als bei der Kontrolle ($*p < 0,05$).

In den Überständen der PBMCs gesunder Kontrollprobanden war die relative Expression von OSM mit 18,7% am geringsten und unterschied sich signifikant ($**p < 0,001$) von der relativen Expression der THP-1-Zellen und der PBMCs von T2DM Patienten ($***p < 0,0001$) (A). Zudem war die relative Expression von OSM bei den untersuchten Überständen der T2DM-PBMCs signifikant ($***p < 0,0001$) höher, als bei den Überständen von THP-1-Zellen.

Gleichzeitig war bei THP-1-Zellen, die in Glukose kultiviert wurden, die relative Zytokinexpression von OSM signifikant ($**p < 0,001$) erhöht, im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten Zellen (B). Hingegen war die OSM-Expression durch die Anwesenheit von Insulin mit 26% ähnlich hoch wie unter NG-Bedingungen (24%). Eine Kombination aus Insulin und Glukose zeigte eine signifikant geringere OSM-Expression als die alleinige Kultivierung mit Glukose ($***p < 0,0001$).

Die Expression von OPG war durch die Kultivierung der Zellen in Glukose signifikant ($***p < 0,0001$) verringert (D).

Im Vergleich mit der Heatmap (Tabelle 3) konnte gezeigt werden, dass die relative Expression von OPG, OPN und RANTES aus THP-1-Zellen durch die Kultivierung in Insulin reduziert wurde.

Die Expression von OPG war ebenfalls bei PBMCs der T2DM Patienten, im Vergleich zu den Überständen von gesunden PBMCs und THP-1-Zellen, signifikant (** $p < 0,0001$) erhöht.

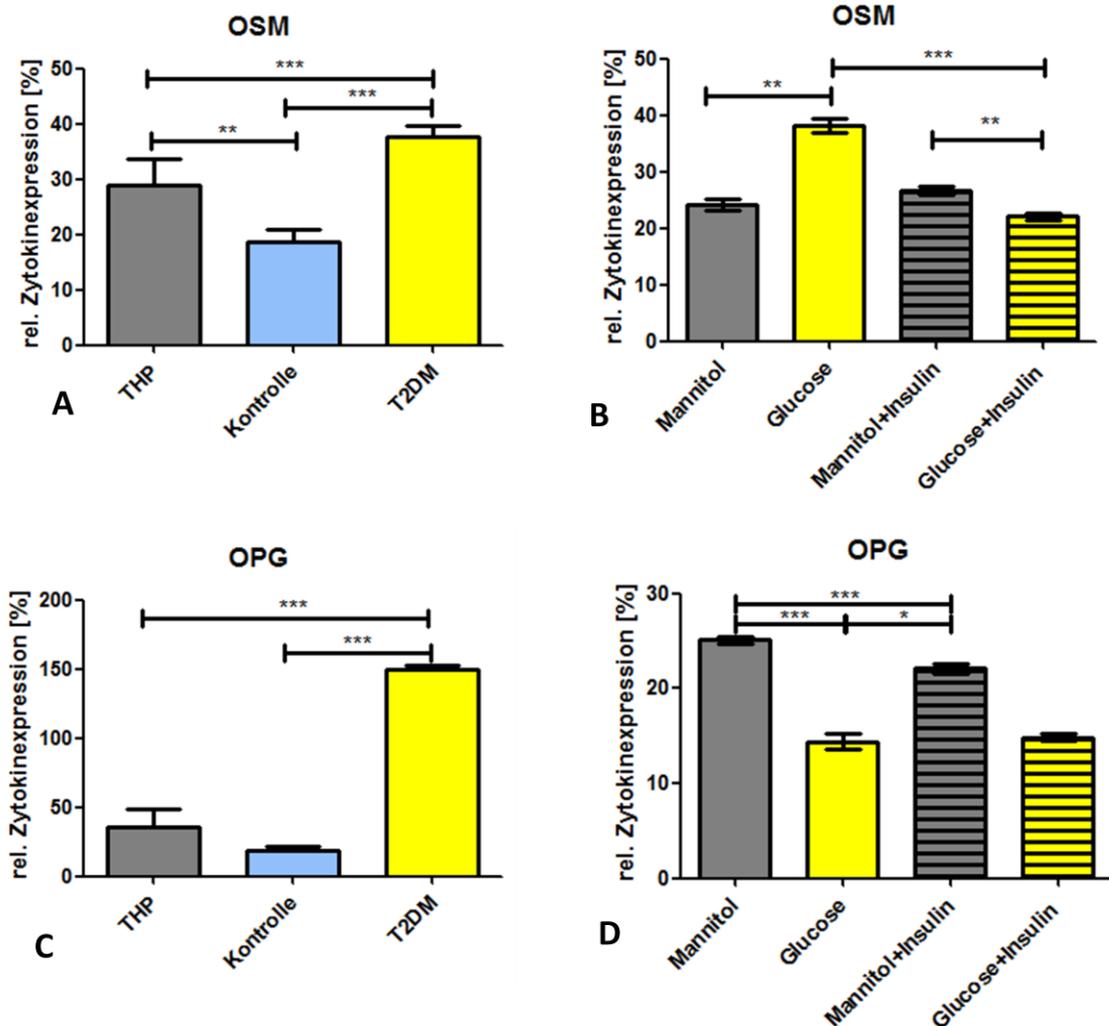


Abbildung 24: Verändertes Zytokinprofil von OSM und OPG bei T2DM und hyperglykämischer Kultivierung von THP-1-Zellen

Die relative Zytokinexpression von OSM und OPG von PBMC gesunder Kontrollprobanden und Patienten mit T2DM sowie THP-1-Zellen (A,C) wurde mit dem „Human Cytokine Array C5“ untersucht. Ebenso wurde die Zytokinexpression von THP-1-Zellen, welche in Mannitol (+/- Insulin) und Glucose (+/-Insulin) kultiviert wurden, gemessen (B,D). Die relative Zytokinexpression von OSM und OPG war bei PBMCs der T2DM-Patienten im Vergleich zu PBMCs der Kontrollprobanden als auch der THP-1-Zellen signifikant erhöht (** $p < 0,0001$). Die Stimulation von THP-1-Zellen mit Glucose führte zu einer signifikant erhöhten Expression von OSM (B) aber zu einer signifikant erniedrigten OPG-Expression (D).

4.4.5 Zusammenfassung 4: T2DM und Hyperglykämie verändert das Zytokinprofil von TGF- β_1 , OSM, OPG und TNF- α

Der durchgeführte „Human Cytokine Array C5“ von RayBio gab deutliche Aufschlüsse über das Zytokinprofil, welches sowohl von monozytären Zellen unter normoglykämischen, als auch hyperglykämischen/diabetischen Bedingungen sezerniert wurde.

Die Zugabe von Insulin zum Kulturmedium führte bei THP-1-Zellen zu einer signifikant erhöhten Expression von TNF- α , INF- γ und TGF- β_1 . Glucose selbst führt nur zu einer leicht verstärkten Expression von TGF- β_1 .

Die Kultivierung von THP-1-Zellen in Glucose-konditioniertem Medium führte zu einer erhöhten Sekretion von OSM. Eindrücklich ist auch die signifikante Abnahme der Expression von OPG durch den Zusatz von Glucose (+/- Insulin). Deutlich zu erkennen war die extreme Veränderung im Zytokinprofil der PBMCs von T2DM-Patienten. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression von den meisten im Array getesteten Wachstumsfaktoren und Zytokinen, mit Ausnahme von TGF- β_2 , VEGF-A, MIP-1- β , BDNF, FGF-9, OPN, TIMP-1, LIF, OSM, GRO- α , IL-6, MDC, IGFBP-3, M-CSF, IL-10, TPO, IL-7, G-CSF, IL-8 und IL-13.

5 Diskussion

Die Knochenheilung ist ein multizellulärer Prozess, der in dieser Arbeit vereinfacht dargestellt wurde. Dabei wurde besonders der Einfluss von monozytären Zellen auf die Frakturheilung und die damit zusammenhängenden Regulationsmechanismen untersucht.

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine weit verbreitete Erkrankung [1] und führt auch in der unfallchirurgischen Versorgung zu Problemen [5]. Die diabetische Frakturheilung und die T2DM-abhängigen Knochenveränderungen sind immer noch nicht ausreichend verstanden [5, 7, 66].

In dieser Arbeit wurde die Rolle von monozytären Zellen bei der diabetischen Frakturheilung untersucht. Dabei wurde im Besonderen getestet, ob monozytäre Zellen überhaupt einen Einfluss auf den Knochen während der Frakturheilung haben und ob die Zellen selber durch den Diabetes eine Veränderung erleiden.

5.1 Diskussion der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

5.1.1 Überstand von monozytären Zellen hat einen positiven Effekt auf phOB

Nach einer Fraktur sind zunächst neutrophile Granulozyten die vorherrschende Zellart im Frakturspalt. Monozytäre Zellen migrieren nach etwa 3 Tagen in das entstandene Frakturhämatom [12, 44].

Dass die monozytären Zellen einen essentiellen Beitrag in der Frakturheilung leisten, konnten beispielweise Sanberg *et al.* im Mausmodell zeigen. Eine Depletion von Makrophagen führt besonders in den ersten Tagen nach einem Trauma zu einer unzureichenden Kallusbildung [45, 47, 48, 51].

In der Literatur ist vielfach der Effekt monozytärer Zellen auf die späten Phasen der Frakturheilung, insbesondere auf die Kallusbildung beschrieben [47, 48, 51]. In dieser Arbeit wurde allerdings der Einfluss des Sekretoms monozytärer Zellen auf Osteoblasten direkt untersucht und damit ein stärkerer Fokus auf die inflammatorische Phase der Frakturheilung gelegt [10, 11].

Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der AP-Aktivität und damit der Funktion differenzierter Osteoblasten durch die Stimulation mit dem THP-1-

Überstand. Ebenso war die Mineralisierungsfähigkeit von Osteoblasten durch Zusatz des THP-1-Überstandes deutlich verbessert.

Ein Effekt monozytärer Zellen auf die osteogene Differenzierung wurde bereits von Pirraco *et al.* gezeigt. Besonders bei Co-Kultur von hMSC (mesenchymale Vorläuferzellen) mit monozytären Zellen zeigte sich an Tag 7 eine signifikant verbesserte AP-Aktivität [83].

Diese Ergebnisse konnten ebenfalls von Nicolaidou *et al.* gezeigt werden, die die Wirkung von PBMCs auf die osteogene Differenzierung von MSCs untersuchten. Dabei zeigte sich, besonders bei Zellkontakt zwischen den Zelltypen (MSCs+PBMCs), eine signifikant verbesserte AP-Aktivität und Mineralisierung bei MSCs [109].

Neben der Funktion der Osteoblasten ist für die Frakturheilung die Migrations- und Proliferationsfähigkeit der Knochenvorläuferzellen von existentieller Bedeutung [10, 39, 121].

Diese Arbeit zeigt, dass die prozentuale Zuwachsrate des *in vitro* Frakturspaltes im „Scratch Assay“ und damit auch die Migrationsfähigkeit, bei THP-1-Überstand/PBMC-stimulierten phOB, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, signifikant erhöht ist (s. Abbildung 10, 11).

In anderen Versuchen unseres Labors konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Überstand von PMA stimulierten, adhärenen THP-1-Zellen (Makrophagen-Zellmodell), einen noch größeren Effekt auf die Zuwachsrate im „Scratch Assay“ hat. Hier wurde deutlich, dass der Überstand von THP-1-Zellen chemotaktisch auf phOB wirkt [120].

Ähnliche Ergebnisse konnten Mildner *et al.* für die Migrationsfähigkeit von Fibroblasten zeigen. Auch hier konnte durch den Einfluss monozytärer Zellen eine signifikant erhöhte Zuwachsrate im „Scratch Assay“ erzielt werden. Des Weiteren wurde durch bei Behandlung von Hautwunden mit dem Überstand von PBMCs, sowohl die Proliferation als auch die Migration von Fibroblasten erreicht. Mildner *et al.* zeigten durch die Behandlung von Hautwunden mit monozytären Zellüberständen insgesamt eine verbesserte Wundheilung *in vivo* [84].

Mildner *et al.* benutzte für die Versuche stets den Überstand von PBMCs.

Da die Darstellung des „Scratch Assays“ zunächst gute Ergebnisse lieferte, sollte der Einfluss von humanen monozytären Zellen (PBMCs) auf die phOB getestet werden [84]. Auch in dieser Arbeit wurden PBMCs aus dem Blut gesunder Kontrollprobanden isoliert und anschließend mit PBMC-Überstand stimulierten phOB „Scratch Assays“ durchgeführt. Die Ergebnisse waren im direkten Vergleich tendenziell weniger aussagekräftig, als bei den Versuchen mit der Zelllinie (s. Anhang 14.3.4.). Ein möglicher Grund dafür, könnte die kürzere Kultivierung der Zellen in ihrem Medium sein. Die PBMCs wurden nur über 24 Stunden kultiviert, die THP-1-Zellen hingegen über 5-7 Tage.

Eine weitere Problematik ist, dass das *in vitro* „Scratch Assay“ mit humanen Primärzellen durchgeführt wurde. Die Vermutung liegt nahe, dass Zellmaterial von unterschiedlichen Spendern (hier: phOB und PBMCs) aufgrund ihrer Oberflächenantigene anders aufeinander reagieren, als Zellen von ein und demselben Spender [122-125].

Gegen diese Einschätzungen sprechen allerdings die Ergebnisse von Pirraco *et al.* [83]. Die Differenzierungsfähigkeit von hMSC war hier nach Co-Kultur mit PBMCs deutlich verbessert. Dabei wurden ebenfalls unterschiedliche Spendermaterialien genutzt [83].

In den dargestellten Ergebnissen konnte ein positiver Einfluss des Überstandes von monozytären Zellen sowohl auf die Migrationsfähigkeit, als auch auf die osteogene Differenzierung und Mineralisierung gezeigt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur [83, 84, 109, 120] und unterstützen die Hypothese, dass das Sekretom monozytärer Zellen für eine effektive Frakturheilung und eine funktionierende osteogene Differenzierung eine wichtige Bedeutung haben.

5.1.1 Positiver Einfluss monozytärer Zellen auf die Frakturheilung ist unter Hyperglykämie nicht verändert

Da hier deutlich herausgearbeitet wurde, dass monozytäre Zellen einen positiven Einfluss auf die nicht-diabetische Frakturheilung haben, musste im Anschluss geklärt werden, ob dieser Einfluss bei T2DM verändert ist. Eine mögliche Erklärung für die Rolle von Monozyten bei der verschlechterten

diabetischen Frakturheilung, ist die Überlegung, dass die Zellen zwar ausreichend im Frakturspalt vorhanden sind, aber im Zustand der chronischen Hyperglykämie, ihr Einfluss nicht mehr die gleiche positive Auswirkung auf den Knochen hat. In dieser Arbeit war der positive Einfluss monozytärer Zellen auf die Funktion und Migrationsfähigkeit der Osteoblasten, durch die modellhafte Darstellung eines hyperglykämischen Milieus, nicht verändert. Ein deutlich negativer Effekt auf die Funktionsfähigkeit von Osteoblasten zeigte sich aber bei Zusatz von Insulin zum Überstand der THP-1-Zellen.

Ähnliche Ergebnisse konnten Freude *et al.* bezüglich des Einflusses von Hyperglykämie auf den Knochen alleine zeigen. In diesen Versuchen zeigte die Stimulation mit Glukose keinen negativen Effekt auf die Funktion und Mineralisierung von differenzierten phOB. Die Zugabe von Insulin verschlechterte die AP-Aktivität allerdings massiv und führte zu einer signifikant schlechteren Mineralisierung der Knochenzellen [9].

Auch Srikanthan *et al.* zeigten, dass eine erhöhte Insulinresistenz und die damit einhergehende primäre Hyperinsulinämie zu einer verminderten Knochenstärke führt [126].

Da der Zustand der Hyperinsulinämie, zu einer deutlichen Abschwächung des positiven Effekts monozytärer Zellen auf die Funktion des Knochens führt, muss dies bei der Untersuchung und Behandlung der diabetischen Frakturheilung mit berücksichtigt werden. Dabei sind besonders Patienten gefährdet, die eine eskalierende Therapie des T2DM mit Insulin [2, 3, 54] erhalten, oder sich in einer pathologischen Hyperinsulinämie während der Entwicklung einer peripheren Insulinresistenz befinden [1, 3, 57].

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wird deutlich, dass der positive Einfluss des THP-1-Überstandes auch unter HG-Bedingungen sowohl auf die osteogene Differenzierung, als auch auf die Migrationsfähigkeit der phOB gegeben ist. Damit kann die anfängliche Hypothese, dass der Einfluss monozytärer Zellen auf die phOB unter HG verändert ist, im Modell widerlegt werden. Monozytäre Zellen scheinen also auch einen wichtigen Einfluss bei der diabetischen Frakturheilung zu haben. Die Frage die sich daraus ergibt ist, wie dieser Einfluss funktioniert.

5.1.2 Erk1/2-Aktivierung spielt bei der verbesserten Frakturheilung durch monozytäre Zellen eine Rolle

Um zu untersuchen, wie THP-1-Zellen die AP-Aktivität und die Migrationsfähigkeit von Osteoblasten regulieren, wurde zunächst die Aktivierung von MAP-Kinasen untersucht [84, 109]. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation der phOB mit dem Überstand von THP-1 Zellen im Vergleich zur Kontrolle, zu einer signifikant erhöhten relativen Expression von phospho-SAPK/JNK, phospho-Erk1/2, phospho-Hsp27 sowie phospho-Akt (Ser 473) führt. Außerdem ließ sich eine erhöhte Aktivierung von STAT1 und STAT3 durch die Stimulation von phOB mit dem THP-1-Überstand darstellen.

Diese Ergebnisse passen zu den von Mildner *et al.* mittels WB detektierten Signalwegen, nach Stimulation von Fibroblasten mit dem Überstand von PBMCs. Hier konnte eine schnelle Aktivierung von Erk1/2, c-Jun, Akt und Hsp27 in Hautzellen detektiert werden [84].

Die Aktivierung von MAP-Kinasen durch den Überstand der THP-1-Zellen, scheint im Hinblick auf die, bereits in dieser Arbeit untersuchte, positive Beeinflussung der Differenzierung und der Migration von phOB, schlüssig.

MAP-Kinasen sind für den Knochenmetabolismus von großer Bedeutung und können u.a. durch mechanischen Stress oder Zytokine aktiviert werden [127]. So ist beispielsweise die Aktivität der Kinase JNK wichtig, um über die Expression von ATF4, die späte osteogene Differenzierung zu beeinflussen [127, 128].

Die Aktivität von Erk1/2 ist essentiell für die osteogene Differenzierung, die Matrixmineralisierung und die Proliferation in humanen Knochenzellen [28, 129]. Im Zellmodell konnte eine verringerte AP-Aktivität bei Inhibition der Kinaseaktivität durch eine retrovirale Infektion gezeigt werden [28, 130]. In der Signalkaskade wird von der phosphorylierten Kinase Erk1/2, die Transkription von RUNX2 aktiviert [131]. RUNX2 ist ein Schlüsselfaktor in der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten [25, 26].

Im Gegensatz zu den hier dargestellten und den von Mildner *et al.* ermittelten Ergebnissen hat Nicolaidou *et al.* im Westernblot zusätzlich eine erhöhte

Expression von p38 nach Kultivierung von MSCs mit PBMCs, nachweisen können [84, 109]. Die Aktivität von p38 beeinflusst u.a. die Skelettentwicklung und ist wichtig für die osteogene Differenzierung [28, 132]. Außerdem kann über den ASK1-p38 Signalweg auch die MCP-3 Freisetzung aus Osteoblasten gefördert werden und lokale monozytäre Zellen zur Migration anregen [127]. Aus diesem Grund war eine Aktivierung von p38 durch den Überstand monozytärer Zellen zu Beginn der Arbeit durchaus anzunehmen. Allerdings konnte weder eine vermehrte Expression von p38 im „Intracellular Signaling Array“, noch eine abnehmende prozentuale Zuwachsrates im „Scratch Assay“ mit dem p38-Inhibitor gezeigt werden. Zur Verifizierung der wichtigsten untersuchten und vermuteten Signalkaskaden, wurde die Wirkung einer Inhibition von Erk1/2 und p38 auf die Migrationsfähigkeit und die Expression des Signalweges getestet. Bei Stimulation der phOB mit dem Erk-Inhibitor und dem Überstand von THP-1-Zellen war die Zuwachsrates des „Scratches“ nach 24 Stunden geringer als ohne Inhibition von Erk1/2. Dieser Versuch unterstreicht die Rolle von Erk1/2 als Regulationsmechanismus bei der Migration unter dem Einfluss monozytärer Zellen.

Die Ergebnisse bei Behandlung mit Inhibitoren von p38 und Erk1/2 müssen allerdings kritisch betrachtet werden.

Im „Intracellular Signaling Array“ fiel eine signifikant erhöhte Aktivierung des proapoptotischen Signalproteins Bad, bei Stimulation der phOB mit den Inhibitoren für Erk1/2 und p38, auf. Außerdem konnte die Expression von phospho-p38 und phospho-Erk1/2 im „Intracellular Signaling Array“ vom jeweiligen Inhibitor nicht hinreichend unterdrückt werden. Die Erhöhung von Bad zeigt, dass die Zellen durch den Zusatz der Inhibitoren, einem deutlich erhöhten Stressniveau unterlagen [133-135].

Die Konzentration (5/10 μ M) von SB 203580 (p38-Inhibitor) und U0126 (Erk-Inhibitor) wurden auch in der Literatur angewendet und in ähnlichen Konzentrationen in unserer Arbeitsgruppe durch Toxizitätstests als sinnvoll ermittelt [136-138]. Trotzdem schränken die Ergebnisse im „Intracellular Signaling Array“ damit die Aussagekraft ein, dass Erk1/2, aber nicht p38, für die verbesserte Migration von Osteoblasten durch den Einfluss von monozytären

Zellüberständen verantwortlich ist. Im Hinblick auf die hier herausgearbeitete Wirkung des Monozytenüberstands auf die osteogene Differenzierung und Migrationsfähigkeit der Osteoblasten, ist die Aktivierung von Erk1/2 weiterhin als wichtiger und zentraler Regulationsmechanismus zu sehen [28, 129, 131, 139]. Dass dieser Signalweg auch für eine verschlechterte diabetische Frakturheilung verantwortlich sein könnte, zeigten die Ergebnisse im Westernblot. Durch den Einfluss von hyperglykämisch kultivierten THP-1-Zellen konnte die Erk1/2-Aktivierung in phOB, im Vergleich zu normoglykämisch kultivierten THP-1-Zellen, in einem geringen Maß abgeschwächt werden (s. Abbildung 18). Somit hat Erk1/2 einen Einfluss bei der diabetischen Frakturheilung. Der Erk-Signalweg ist aber sehr wahrscheinlich, aufgrund der anderen hier aktivierten Signalkaskaden nicht der einzige Regulationsmechanismus, beim Einfluss monozytärer Zellen auf die diabetische Frakturheilung [84, 109, 140].

Neben den MAP-Kinasen, konnte im „Intracellular Signaling Array“ eine verstärkte Expression von STAT1 und 3 in phOB, durch die Stimulation mit dem Überstand von THP-1-Zellen gezeigt werden.

STAT-Proteine werden u.a. durch Bindung von Zytokinen, wie IL-6, IL-10, IL-11, Oncostatin M (OSM), Leukemia inhibitory factor (LIF), Cardiotrophin1, Neurotrophin1/ B-Zell-stimmulierenden Faktor 3, an den GP130-Rezeptor, aktiviert [140, 141]. Dabei kommt es durch die Bindung am Rezeptor zur Homodimerisierung von GP130 und daraufhin zur Phosphorylierung von bspw. STAT3 durch eine JAK [116, 141, 142].

Eine Inaktivierung von STAT3 reduziert die Knochenmasse, -stärke und belastungsabhängige Knochenformation. Zhou *et al.* konnte diesen Zusammenhang bei STAT3-KO-Mäusen zeigen. Außerdem fand die Arbeitsgruppe heraus, dass diese KO-Mäuse ein höheres ROS-Level aufweisen [141]. STAT3 ist demnach ebenfalls wichtig für die ROS-Regulation im MTH und führt bei Depletion zu erhöhten Spiegeln von oxidativem Stress [141].

Es konnte gezeigt werden, dass STAT3 eine wichtige Rolle in der Knochenhomöostase und Mechanotransduktion spielt [141].

Eine interessante Hypothese für die Erklärung der STAT3-Aktivierung durch den Überstand der THP-1-Zellen, ergibt sich durch die publizierten Ergebnisse von Kozawa *et al.*. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von p38 zu einer Sekretion von IL-6 aus Osteoblasten führt, die sich wiederum autoregulatorisch gegenseitig verstärkt aktivieren können. Angenommen wird dabei, dass die Produktion von IL-6 in Osteoblasten durch eine von bFGF ausgelöste Aktivierung bzw. Phosphorylierung von p38 erfolgt (bFGF → p38 → IL-6) [136]. Möglicherweise produzieren die monozytären Zellen einen Wachstumsfaktor (z.B: bFGF), welcher die Phosphorylierung der p38-MAPK fördert. Diese Signalkaskade könnte daraufhin die Osteoblasten selber zur Produktion von IL-6 anregt. Die Produktion von IL-6 könnte somit gar nicht im Überstand der THP-1-Zellen, sondern im Osteoblasten selber geschehen. Daher konnte diese IL-6-Produktion auch nicht über den Zytokinarray oder den ELISA im THP-1-Überstand detektiert werden. Die Sekretion von bFGF wurde im „Human Cytokine Array“ nicht miterfasst und bleibt damit eine Spekulation.

IL-6 aktiviert die STAT3-Signalkaskade [117]. Diese Überlegung könnte eine Erklärung sein, dass die Expression von STAT3 bei den stimulierten Zellen höher ist, da evtl. die Autoproduktion von IL-6 diesen Signalweg aktiviert. Somit regten sich die OB in Anwesenheit des THP-1-Überstandes autoregulatorisch selber zur verbesserter Differenzierung und Mineralisierung an.

Trotz der guten Vergleichbarkeit mit der Literatur, müssen die hier erzielten Ergebnisse in ihrer Limitierung beschrieben werden. Sicherlich haben die hier identifizierten Signalwege einen wichtigen Einfluss auf die osteogene Differenzierung und Migration der Osteoblasten. Allerdings zeigen auch eigene Ergebnisse aus dem Labor, dass es weitere Signalwege gibt, die den Einfluss von monozytären Zellen, insbesondere auf die Migration, erklären. Ehnert *et al.* haben herausgefunden, dass durch den Überstand von THP-1-Zellen, eine TGF- β abhängige Induktion von NOX4 und der damit assoziierten Aktivierung einer FAK in Osteoblasten, für die verbesserte Migration verantwortlich sein könnte [120]. Des Weiteren ist eine Beeinflussung der Migration durch oxidativen Stress und Hypoxie denkbar [120].

Diese Arbeit beschränkt sich nur auf die Aktivierung der Proteine im „Intracellular Signaling Array“.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der THP-1-Überstand in phOB zu einer erhöhten Aktivierung von u.a. von Erk1/2, SAPK/JNK, Akt, Hsp27, STAT1 und STAT3 führt. Die genannten Signalwege sind dafür bekannt die osteogene Differenzierung zu verbessern und auf die Migrationsfähigkeit von Knochenzellen zu wirken [28, 84, 109, 111, 127, 130, 131, 140, 141]. Aus diesem Grund erklärt die Aktivierung von Erk1/2, SAPK, Akt, Hsp27, STAT1 und STAT3, dass der Überstand von THP-1-Zellen einen positiven Effekt auf die osteogene Differenzierung und Migrationsfähigkeit im Rahmen der Frakturheilung hat.

5.1.3 Einfluss, der von monozytären Zellen exprimierten Zytokine

Ein wichtiger Meilenstein in der Untersuchung, wie monozytäre Zellen die Frakturheilung beeinflussen, ist die Identifizierung eines oder mehrerer Zytokine, die im Überstand von monozytären Zellen exprimiert werden [109, 120]. Im Zusammenhang mit den hier entdeckten Signalkaskaden, entstand die Überlegung, einen konkreten Zusammenhang zwischen Zytokin, Signalweg und Wirkung auf den Knochen zu finden.

Diskutieren muss man die wichtigsten und für den Knochenmetabolismus relevantesten Proteine, die im Zytokinarray gefunden wurden.

5.1.3.1 Angiogenin und VEGF-A als mögliche Einflussfaktoren auf die Frakturheilung

Besonders auffällig ist, dass durch die THP-1-Zellen und PBMCs, Zytokine in einer hohen Konzentration exprimiert werden, die für die Angiogenese eine wichtige Rolle spielen.

Angiogenin (ANG) ist ein potentes angiogenetisches Protein. Es ist in der Lage neue Blutgefäßformationen zu induzieren [143]. Im Zellmodell reguliert ANG die Proliferation, Migration, Zellinvasion und -adhäsion [143].

VEGF-A spielt ebenfalls eine zentrale Rolle in der Regulation der Angiogenese. Besonders wichtig ist VEGF-A in der embryonalen Entwicklung [52, 144]. VEGF-A reguliert die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie die

Gefäßpermeabilität, der von Endothelzellen gebildeten Gefäße. [144]. Des Weiteren spielt VEGF-A eine Rolle in der Organhomöostase, indem das Protein Faktoren aus Endothelzellen freisetzt, um nach einer Verletzung das Organ zu regenerieren. VEGF-A spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Krankheiten, wie bspw. der diabetischen Retinopathie oder der Genese verschiedener Tumoren [52, 144-146].

In dieser Arbeit wurden diese beiden Zytokine im Überstand von PBMCs sowie THP-1-Zellen detektiert, wobei die Sekretion von Angiogenin extrem hoch war und im Array sogar eine höhere Expression als die Positivkontrolle aufwies.

Betrachtet man die Wirkungsweisen dieser angiogenetischen Faktoren weiter, ist ein Einfluss auf die Frakturheilung, wie in dieser Arbeit beschrieben, anzunehmen.

Im *in vitro* Modell konnte durch Joensuu *et al.* gezeigt werden, dass durch die Co-Kultur von Knochenmarksstammzellen mit PBMCs und Zugabe von VEGF-A, die AP-Aktivität und Mineralisierung deutlich gesteigert ist [147].

Des Weiteren sind VEGF-A und RANTES, die im THP-1-Überstand exprimiert wurden, in der Lage, die Migration von Osteoblasten anzuregen [145, 146, 148-150].

Aufgrund der Ergebnisse im Zytokin Array und dem Vergleich mit der oben genannten Literatur, kann der Einfluss von Angiogenin und VEGF-A im Überstand von monozytären Zellen auf Knochenzellen bestätigt werden.

Dabei wirken die Zytokine zum einen, direkt auf die Osteoblasten [145-150], zum anderen induzieren sie Angiogenese.

Die Angiogenese ist für eine funktionierende Fraktur- und Wundheilung sehr wichtig [11, 84].

Auch Mildner *et al.* zeigte bei Stimulation von Hautwunden mit PBMC-Überstand erhöhte Neoangiogenese [84]. Bekannt ist, dass Angiogenin und VEGF besonders für die frühe Frakturheilung wichtig sind [151]. Auch Hoff *et al.* konnte eine signifikant erhöhte Konzentration von VEGF im Frakturhämatom identifizieren [44].

Dabei muss aber auch klar beleuchtet werden, dass die Angiogenese nicht nur durch die Zugabe der monozytären Zellen, sondern auch durch den Zustand

der Hypoxie im Frakturspalt induziert wird. Während der Inflammation wird, durch die im Frakturspalt herrschende Hypoxie, HIF-1 α freigesetzt [149]. Das wiederum induziert eine anschließende VEGF-abhängige Revaskularisierung des Knochens [149]. Diese weiteren Aspekte konnten in Ihrer Komplexität in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden.

Da ein Ziel dieser Arbeit war, mögliche Zusammenhänge zwischen den von monozytären Zellen sekretierten Zytokine und den in Osteoblasten ausgelösten Signalkaskaden zu identifizieren, ist die Frage, ob Angiogenin und VEGF-A in der Lage sind diese zu aktivieren.

Angiogenin ist in der Lage den Erk1/2-Signalweg in Endothelzellen zu aktivieren [139]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Angiogenin das Tumorwachstum und Angiogenese in humanen Tumor-Zelllinien durch die Aktivierung des Erk1/2-Signalweges aktiviert [152].

Auch VEGF-A aktiviert den Erk1/2-Signalweg [153, 154] und kann auf diesem Weg beispielsweise die Angiogenese induzieren [155]. Allerdings wurde zusätzlich eine Aktivierung der JAK/STAT-Signalwege durch VEGF-A beschrieben [149, 156-158].

Betrachtet man also den Zusammenhang der Wirkung und der aktivierten Signalwege, ist ein Einfluss von VEGF-A und Angiogenin beim Zusammenspiel zwischen monozytären Zellen und der Verbesserung der Frakturheilung anzunehmen (s. Abbildung 25).

Die im Zytokinarray ermittelten Ergebnisse ließen allerdings auf weitere Einflussfaktoren im THP-1-Überstand schließen.

5.1.3.2 Einfluss monozytärer Zellen auf die Frakturheilung durch Expression von OPG und OSM

In allen untersuchten Überständen konnte eine Sekretion von osteogenen Substanzen wie OSM, OPG und OPN nachgewiesen werden.

OPG ist für den Knochenstoffwechsel sehr wichtig (s. 1.1.6.). Es schützt durch die Bindung von RANKL den Knochen vor einer exzessiven Resorption [33].

OPN ist ein Matrixprotein des Knochengewebes und kann von verschiedenen Zellen, wie Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten, Chondrozyten, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Leukozyten, Hepatozyten, Muskelzellen und

Endothelzellen, freigesetzt werden [159]. OPN ist für den Knochenmetabolismus von wichtiger Bedeutung und fördert u.a. das Anhaften von Osteoklasten und somit die Knochenresorption [160]. Zusätzlich wird dem Protein eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen (Multipler Sklerose und Morbus Crohn) und kardiovaskulären Erkrankungen zugesprochen. Interessant ist ebenfalls, dass OPN eine Rolle in der Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz spielt [159].

OSM gehört zur Familie der IL-6-Zytokine [161] und induziert die Proliferation sowie Kollagensynthese im Knochen [162]. Des Weiteren hemmt OSM die Knochenresorption und erhöht die Osteoblastenaktivität [162].

Nicolaidou *et al.* konnte, wie schon beschrieben, ebenfalls einen signifikanten Einfluss von Monozyten (PBMCs) auf die osteogene Differenzierung zeigen. In dem Zusammenhang wurden der STAT3, Erk, JNK und p38-Signalweg aktiviert [109]. Nicolaidou *et al.* benennt Oncostatin M (OSM) als wichtiges Zytokin im Sekret der monozytären Zellen und als Auslöser der STAT3-Kaskaden-Aktivierung [109]. Bei Inhibition dieser Signalkaskade ist die osteogene Differenzierung von MSCs signifikant verringert [109].

Die hier identifizierte Expression von OSM im Überstand der monozytären Zelle, sowie die ebenfalls identifizierte verstärkte Aktivierung von STAT3 in phOB, unterstützt die These von Nicolaidou *et al.* [109].

Neben den hier genannten osteogenen Zytokinen gibt es eine weitere Hypothese für den Einfluss eines osteogen wirkenden Zytokins, das von PBMCs sezerniert wird. Piracco *et al.* gehen beispielsweise davon aus, dass die monozytäre BMP-2 Produktion für die verbesserte osteogene Differenzierung verantwortlich ist. Dieser Zusammenhang ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden.

5.1.3.3 Einfluss von TGF- β_1 , IL-6 und anderen proinflammatorischen Zytokinen auf die Frakturheilung

Betrachtet man die Literatur und die Ergebnisse des Zytokinarrays, gibt es allerdings noch weitere Zytokine, die für die Wirkung von den monozytären

Zellüberständen auf Osteoblasten verantwortlich sein könnten [12, 114, 117, 120]. Aufgrund der Ergebnisse im „Intracellular Signaling Array“ wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einem Zytokin gesucht, welches im THP-1-Überstand enthalten und in der Lage ist, die MAP-Kinasen und/oder STATs zu aktivieren. Zunächst wurde die Anwesenheit von TGF- β_1 , welches in der Lage ist MAP-Kinasen zu aktivieren, und IL-6, das wiederum STAT3 aktiviert, im Überstand der monozytären Zellen vermutet [30, 110, 112, 117, 120, 132, 163]. TGF- β_1 ist ein wichtiger Einflussnehmer im Knochenstoffwechsel. Das Zytokin ist in der Lage MAPK zu aktivieren und hat gleichzeitig einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung und die Migrationsfähigkeit von Knochenzellen [110, 120, 164, 165]. TGF- β_1 kann durch die Aktivierung von p38 zu einer erhöhten Expression von RUNX2 in MSCs führen. Auf diese Weise fördert TGF- β die Osteogenese [110]. Allerdings konnte durch Ehnert *et al.* konzentrationsabhängig eine niedrigere AP-Aktivität, aber eine verbesserte Mineralisierung von Osteoblasten nach Stimulation mit TGF- β_1 gezeigt werden [30].

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TGF- β_1 durch die Induktion von p38, Erk1/2 und SAPK/JNK in Osteoblasten, zur Synthese von VEGF und damit zur Angiogenese führt [111]. Andere Versuche dieser Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass TGF- β_1 über die Hochregulation von NOX 4, zur Aktivierung einer „Focal adhesion kinase“ (FAK) und dadurch zur vermehrten Migration von phOB führt [120]. Ehnert *et al.* zeigten TGF- β_1 als Teil des Überstandes monozytärer Zellen [120]. In dieser Arbeit wurde nicht nur der Einfluss der monozytären Zellen auf die Migration, sondern auch auf die AP-Aktivität ermittelt.

Hier wiesen die Untersuchung der AP-Aktivität nicht darauf hin, dass TGF- β_1 , als Teil des Monozyten-Überstandes, einen besonderen Einfluss auf die Funktion der phOB hat (s. Abbildung 20).

Dadurch kann spekuliert werden, dass TGF- β_1 zwar die Migration anregt [120], aber nicht für den positiven Effekt des Monozyten-Überstandes auf die Funktion der Osteoblasten verantwortlich ist [30, 120]. TGF- β_1 führt zu einer Abnahme der AP-Aktivität der OB [30]. Allerdings unterdrückte der Zusatz von TGF- β_1 den positiven Einfluss des THP-1-Überstandes auf die Funktion phOB nicht.

Dieser, zunächst widersprüchlich wirkende Zusammenhang, lässt darauf schließen, dass es nicht nur ein Zytokin im Überstand der monozytären Zellen gibt, welches für die Rolle bei der Frakturheilung entscheidend ist.

Die Aktivierung des STAT-Signalweges, der ein zentraler Regulationsmechanismus zu sein scheint, ist über mehrere Einflussfaktoren möglich [109]. Gut untersuchte Aktivatoren des STAT3-Signalweges sind Interleukine. Insbesondere IL-6 ist in der Lage über den GP130-Rezeptor die Signalkaskade zu aktivieren [116, 140-142]. Das wirft die Hypothese auf, dass IL-6 im Sekretom enthalten sein könnte.

Im Versuch führte die Stimulation von phOB mit IL-6 zu einer signifikant niedrigeren AP-Aktivität im Vergleich mit THP-1-Überstand-Stimulation. Dies spricht im Rahmen dieser Arbeit, gegen die Hypothese, dass IL-6 von Monozyten sekretiert wird und dadurch die Knochenheilung verbessert. Es ist allerdings bekannt, dass IL-6 für die Frakturheilung eine wichtige Rolle spielt [166]. Im Mausmodell konnte von Yang *et al.* gezeigt werden, dass IL-6 besonders in der frühen Phase der Frakturheilung bei der Kallusmineralisierung und Remodelation wichtig ist. Bei IL-6-KO-Mäusen gestaltet sich die Frakturheilung mangelhaft [166].

Die Ergebnis des ELISA, Zytokinarrays und des mangelhaften Einflusses von IL-6 auf die osteogenen Differenzierung, lässt darauf schließen, dass die IL-6-Spiegel in den hier verwendeten Überstand von den monozytären Zellen, gering ist. IL-6 kann damit hier nicht für die Aktivierung des STAT-Signalweges verantwortlich gemacht werden. Allerdings schließt dies nicht aus, dass IL-6 eine wichtige Rolle in der späten Frakturheilung, wie durch Yang *et al.* beschrieben, übernimmt [166].

Eine Hypothese, die man in diesem Zusammenhang natürlich diskutieren kann, ist, dass die geringe Konzentration von IL-6 trotzdem eine hohe Potenz hat und zu einer ausreichenden Aktivierung des STAT3-Signalweges führt. Dagegen spricht allerdings, dass in Versuchen von Lieder *et al.* rekombinantes IL-6 in einer Konzentration von 5ng/ml ebenfalls keinen Effekt auf die osteogene Differenzierung von Knochenmarksstammzellen gezeigt hat [167]. Dieselbe Konzentration führte aber zu einer veränderten Differenzierung von Leukämie-

Zellen [163]. Die Potenz der Wirkung von IL-6 ist in der Regel abhängig von der Konzentration [163] und der Wirkungsdauer [115, 163, 168]. Eine geringe Konzentration (bis zu 100ng/ml) zeigte, je nach Zellmodell gar keine Wirkung [169]. Auf Grund dessen ist eine Einwirkung des geringen IL-6-Levels im Monozytenüberstand auf die phOB eher unwahrscheinlich.

Es stellt sich weiterhin die Frage, welcher Bestandteil des THP-1Überstandes für den positiven Einfluss auf den Knochen verantwortlich ist und eine Aktivierung der MAP-Kinasen und STAT-Signalwege auslöst.

In der Heatmap (s. Abbildung 35) wird deutlich, dass proinflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-10, IL-8, TNF- α und INF- γ von THP-1-Zellen kaum sezerniert werden.

Unterschiedlich dazu sind die Ergebnisse, die von Nicolaidou *et al.* beschrieben wurden. Im „Human Cytokine ELISA 30plex Luminax Assay Kit“ von Invitrogen ließen sich erhöhte Spiegel von IL-6,-8,-10 und IL-1- β sowie TNF- α in den Überständen von PBMCs nachweisen [109].

TNF- α ist ebenfalls in der Lage, die osteogene Differenzierung von MSCs zu begünstigen [12, 170].

TNF- α wird besonders in den ersten 24 bis 72 Stunden eines Traumas sekretiert und wirkt chemotaktisch für andere Zellen, die für den weiteren Heilungsprozess der Fraktur wichtig sind [10, 12, 38, 171]. Aus diesem Grund ist es eher verwunderlich, dass TNF- α kaum im Überstand von THP-1-Zellen exprimiert wird.

Allerdings muss dabei das gesamte Zusammenspiel von zellulären und humoralen Bestandteilen während der inflammatorischen Phase betrachtet werden. Proinflammatorische Zytokine werden im Prozess der Frakturheilung nicht nur von den monozytären Zellen sondern z.B. auch von granulozytären Zellen sekretiert [12].

Dieser Umstand wurde in dieser Arbeit bewusst nicht mit einbezogen, darf aber bei der Diskussion des Gesamteinflusses natürlich nicht außer Acht gelassen werden.

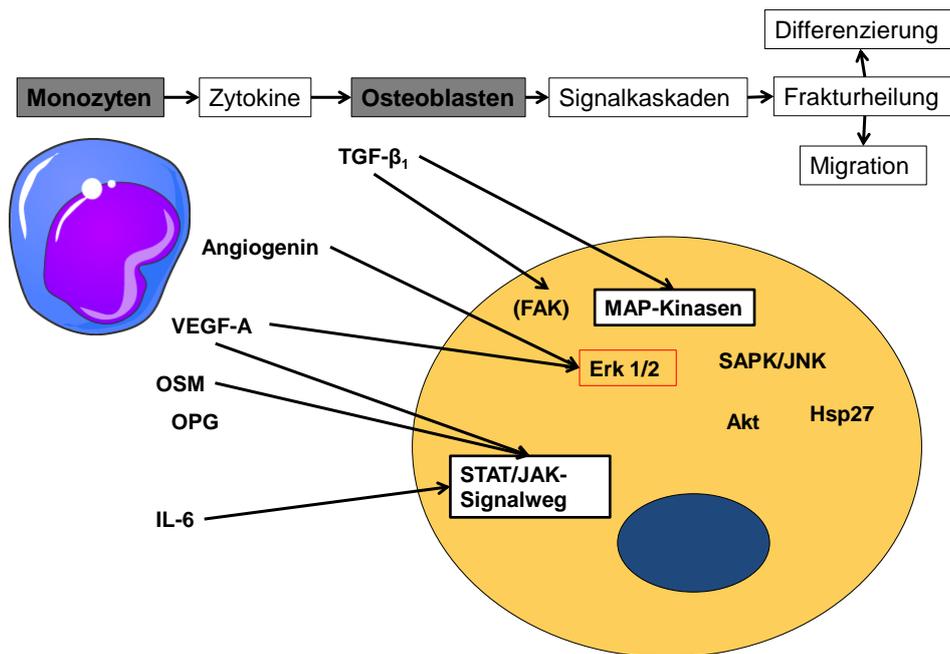


Abbildung 25: Einfluss der von monozytären Zellen sekretierten Zytokine auf die in phOB aktivierten Signalkaskaden unter normoglykämischen Bedingungen

Graphik einer monozytären Zelle von https://smart.servier.com/smart_image/monocyte-23/ (frei verfügbar: Creative Commons Attribution 3.0) 07/2019

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass monozytäre Zellen Zytokine sekretieren, die über eine Aktivierung von MAP-Kinasen (Erk1/2, Hsp27, SAPK/JNK, Akt) und STAT (STAT1, STAT3) zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung und Migrationsfähigkeit von phOB führen. Dabei sind, anders als vermutet, nicht IL-6 oder TNF- α für diesen Effekt verantwortlich, sondern eher Proteine wie Angiogenin, VEGF-A, RANTES, OSM, OPN und OPG und TGF- β_1 .

5.1.1 Veränderter Einfluss von monozytären Zellen bei der diabetischen Frakturheilung durch ein verändertes Zytokinprofil

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen der diabetischen Frakturheilung und monozytären Zellen ist eine Überlegung, dass sich nicht nur der Knochen, (s.o.) sondern auch die monozytären Zellen in der Hyperglykämie anders verhalten. Diese Überlegung ist naheliegend, wenn man sich mit der Pathogenese des T2DM auseinandersetzt.

Beim DM-Patienten herrscht ein Zustand der chronischen Hyperglykämie [3]. Diese führt zu einer Veränderung im gesamten Metabolismus [1]. Bei monozytären Zellen führt der chronische Einfluss von Hyperglykämie zu einer veränderten Polarität von Makrophagen [90, 93]. Man unterscheidet zwei Formen von Makrophagen. M1 (klassisch aktivierte) sind proinflammatorisch und werden durch INF- γ und Toll-like-Rezeptor-Liganden (TLR-L) induziert. Sie sekretieren IL-6, TNF- α und IL-1 β . Die M1-Makrophagen kommen bei adipösen Mäusen vermehrt im Fettgewebe vor [92, 93]. Im Fettgewebe schlanker Mäusen kommt hingegen vermehrt der alternativ aktivierte M2 Phänotyp vor. Diese werden von IL-4 und IL-13 aktiviert [92, 93]. Diesen M2-Makrophagen wird durch die Expression von IL-10 eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Insulinsensitivität zugesprochen [90]. Nicht nur im Fettgewebe, sondern auch im peripheren Blut ist die Polarisierung der Makrophagen verändert [94].

Bekannt ist, dass anti-inflammatorische M2-Makrophagen zu einer verbesserten Osteoblastenqualität führen [81]. Die inflammatorisch wirkenden M1-Makrophagen bewirken eher eine verschlechterte Knochenqualität [81]. Dabei differenzieren sich in Anwesenheit von M1-Makrophagen hämatopoetische Stammzellen eher zu Osteoklasten, und bei Anwesenheit von M2-Makrophagen die MSCs eher zu Osteoblasten. Dieser Effekt ist besonders bei alten Menschen, die ebenfalls vermehrt an T2DM erkranken, größer [81].

Neben der Polaritätsveränderung ist die Oberflächenstruktur der Monozyten von großer Bedeutung für ihr Sekretionsverhalten. PBMCs sind eine eher inhomogene Zellpopulation und können anhand ihrer Oberflächenmarker in klassische CD14⁺⁺ CD16⁻ und nicht klassische CD14⁺ CD16⁺ Monozyten eingeteilt werden. Ziegler-Heitbrock *et al.* konnten zeigen, dass das Zytokinprofil, das von monozytären Zellen sezerniert wird, sich je nach Oberflächendifferenzierung unterscheidet [78].

Die immortalisierte Zelllinie THP-1 wird als M5 Subtyp eingeteilt. Es gibt einige Unterschiede zwischen der Zelllinie und PBMCs. Beispielsweise reagieren Monozyten im Vergleich zu THP-1-Zellen, mehr auf die Stimulation mit LPS.

Dies liegt an der unterschiedlichen Oberflächenstruktur und der weniger starken Expression von CD 14 und TLR 4 [97].

Die Polaritätsveränderung bzw. die Oberflächenstruktur wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Es sind aber weitere entscheidende Faktoren, wenn man den Einfluss von DM auf die Frakturheilung und den Knochenmetabolismus untersucht. Da der Polaritätswechsel u.a. der langen Stoffwechseleränderung zu Grunde liegt, haben *in vitro* Modelle hier generell einen Nachteil [172-174]. Zudem kann die Zelllinie THP-1 nur begrenzt die Veränderung bei DM widerspiegeln [119].

Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit, neben dem veränderten Zytokinprofil der PBMCs von T2DM-Patienten, ebenfalls eine Veränderung im Zytokinprofil hyperglykämisch kultivierter THP-1-Zellen detektiert werden. Ähnlich, wie in den dargestellten Ergebnissen, konnten bereits ein abweichendes Zytokinprofil und eine Veränderung der Funktion von monozytären Zellen unter dem Einfluss von Glucose in anderen Arbeiten gezeigt werden [85, 87-89, 175].

Kajiura *et al.* zeigten im ELISA mit dem Überstand von THP-1-Zellen, dass die monozytäre Zelllinie unter HG-Bedingungen und besonders bei Stimulation mit LPS, mehr IL-6, MCP-1 und TNF- α produzieren als unter normoglykämischen Bedingungen [85]. Guha *et al.* konnten mittels RT-PCR zeigen, dass die HG-Stimulation (18 h, 15 nM) von THP-1-Zellen und PBMC zu einer erhöhten Expression von TNF- α , ROS, NF κ b und AP-1-TKF führt [88].

Zusätzlich zum veränderten Zytokinprofil konnte von anderen Forschungsgruppen eine Aktivierung von TLR 2 und 4 in monozytären Zellen durch eine hyperglykämische Kultivierung erzielt werden. Dabei wurde eine HG-induzierte Aktivierung von PKC α und PKC δ in humanen Monozyten durch die Expression von TLR 2 und 4 erklärt [87]. In der Publikation von Dasu *et al.* konnte eine Veränderung in der mRNA-Expression für TLR 2 und 4 in Monozyten, durch eine Erhöhung des Glukosespiegels gezeigt werden [87]. Dabei gibt es Hinweise darauf, dass die Veränderung der monozytären Zellen unter HG, konzentrationsabhängig ist [87].

Im *in vitro* Modell konnte bei Miao *et al.*, unter diabetischen Bedingungen kultivierten THP1-Zellen, Veränderungen in der Histon-lysin-methylierungen identifiziert werden [175].

Des Weiteren beobachtete Shanmugam *et al.* durch eine 72 stündige Stimulation mit Glukose (HG Stimulation 15 mmol/l für 72 h) eine veränderte Genregulation in THP-1-Zellen und eine Erhöhung der Gene aus der Gruppe der Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Chemokin Rezeptoren, Integrine und TNF-Familie (IL-1b, TNF-Rezeptor, MCP-1, CCR2-RB) [89].

Die Ergebnisse im Zytokinarray sind aufgrund der schon beschriebenen Veränderung von monozytären Zellen also keinesfalls ungewöhnlich. Allerdings wurde diese beschriebene Veränderung bisher nicht mit einer Veränderung in der diabetischen Frakturheilung assoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit kristallisierten sich mögliche Signalwege heraus, die bei der Wirkung monozytärer Zellen auf die Frakturheilung eine wichtige Rolle spielen. Diese Aktivierung passen auch zu den detektierten Zytokinen im Überstand (s. Abbildung 24, 35). Wie sind allerdings die identifizierten Signalketten im Gesamtkontext bei der diabetischen Frakturheilung zu verstehen?

Durch die Untersuchung des Überstandes von monozytären Zellen konnten, im Zusammenhang mit den aktivierten Signalkaskaden (Erk1/2, SAPK, Akt, Hsp27, STAT1 und STAT3), Zytokine, wie Angiogenin, VEGF-A, OSM und OPG als wahrscheinliche Schlüsselproteine, für den positiven Effekt von monozytären Zellen auf die osteogene Differenzierung und Migrationsfähigkeit im Rahmen der Frakturheilung identifiziert werden (s. Abbildung 24). Als logische Schlussfolgerung wäre dann anzunehmen, dass Zytokine wie OSM, OPG, Angiogenin und VEGF-A bei der verschlechterten Frakturheilung von Diabetikern und diabetischen THP-Modellen, weniger exprimiert werden. Dementsprechend könnte man dann auf eine geringere Aktivierung der ermittelten Signalkaskaden schließen.

Dieser kausale Zusammenhang zeigte sich in der Zytokinexpression der monozytären Zellen unter diabetischen Bedingungen nicht. Sowohl im Zytokinarray mit den Überständen von T2DM-PBMCs, als auch bei THP-1-

Zellen, die unter HG-Bedingungen kultiviert wurden, zeigen sich Unterschiede zu den sezernierten Proteinen von unbehandelten THP-1-Zellen und PBMCs gesunder Probanden. Bei PBMCs von hospitalisierten T2DM-Patienten wurden VEGF-A und IL-6 gleich stark exprimiert, wie bei der Kontrolle. Alle anderen, hier diskutierten Zytokine, wurden vermehrt exprimiert. Insbesondere waren hierbei die inflammatorischen Zytokine, wie TNF- α und INF- γ bei den Diabetikern höher exprimiert. Diese Veränderungen ließen sich bei den THP-1-Modellen nicht zeigen.

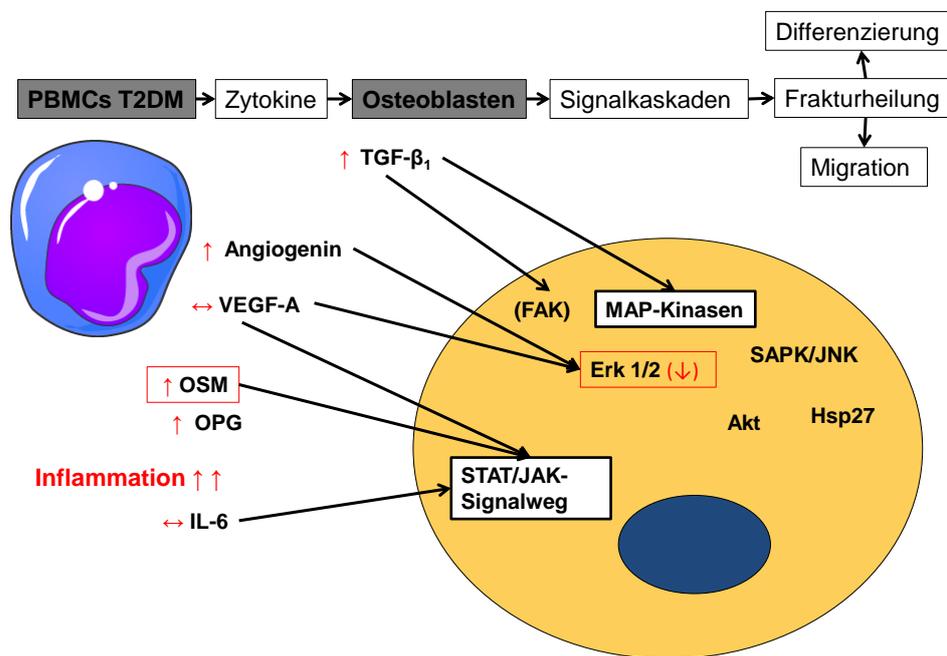


Abbildung 26: Veränderungen im Zytokinprofil bei T2DM

Graphik einer monozytären Zelle von https://smart.servier.com/smart_image/monocyte-23/ (frei verfügbar: Creative Commons Attribution 3.0) 07/2019

Wenn man die Veränderung des Zytokinprofils diskutiert, muss man auf jeden Fall eine wichtige Limitation dieser Arbeit betrachten und daher diskutieren, ob ein Vergleich der Modellzellen mit den PBMCs hier sinnvoll ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PBMCs von T2DM-Patienten isoliert. Diese Patienten waren alle in der berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik hospitalisiert und hatten ein Trauma und/oder eine Operation hinter sich. Die Patienten waren, entsprechend der Pathophysiologie des T2DM, alle im Alter > 50 Jahre. Verglichen wurde das Sekretom dieser PBMCs mit dem Sekretom aus PBMCs

gesunder Kontrollprobanden. Diese Probanden waren alle im Alter zwischen 20 und 40 Jahren, gesund und hatten zuvor kein Trauma oder eine Fraktur.

Die Konstellation der untersuchten Überstände muss dabei durchaus kritisch gesehen werden.

Zunächst einmal spielt auch das Alter eine wichtige Rolle, wenn man sich die Veränderung von Monozyten anguckt. Bei alten Patienten konnte eine Veränderung im Phänotyp von Monozyten und zusätzlich eine dysregulierte Funktion der Zellen entdeckt werden [176].

Nach einem Trauma verändern sich die Serumzytokinspiegel, insbesondere der proinflammatorischen Zytokine, wie die von IL-6. Des Weiteren verändert der menschliche Körper seinen Metabolismus. Dabei nimmt bspw. die Insulinsensitivität ab [177-179].

Ein Vergleich der Zytokine, besonders der inflammatorischen Zytokine, ist zwischen den posttraumatischen T2DM-PBMCs und den gesunden PBMCs, aufgrund dieser Veränderung im Stoffwechsel, nur bedingt aussagekräftig.

Eine deutlich verbesserte Aussagekraft, hätte der Vergleich zwischen PBMCs von T2DM-Patienten mit gematchten Patienten im selben Alter ohne DM. Des Weiteren wäre die Isolation der monozytären Zellen aus dem Blut von T2DM-Patienten ohne vorangegangenes Trauma und ohne postoperativen Zustand deutlich sinnvoller.

Dadurch wären zum einen die Zytokinunterschiede in Bezug auf das Alter der Patienten und zum anderen für den Zustand nach Trauma ausgeglichen [81].

Die Rekrutierung von nicht hospitalisierten T2DM-Patienten und gematchter Kontrollen war allerdings im Rahmen der Kooperation mit der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik und dem dort vorherrschenden Patientenkollektiv nicht möglich.

Eine andere, hier durchgeführte Alternative war die Etablierung von einer diabetischen monozytären Zelllinie.

Bei genauerer Betrachtung der Zytokinveränderungen unter Hyperglykämie und Hyperinsulinämie, findet man kein Zytokin, welches bei den PBMCs von T2DM Patienten ähnlich verändert war. Damit lässt sich kein Faktor finden, der hier

komplett zu vergleichen wäre und eine ausreichende Erklärung für die Rolle der Monozyten bei der verschlechterten Diabetischen Frakturheilung gibt.

Eine wichtige Erkenntnis aus dem Zytokinarray ist allerdings, dass bei Hyperinsulinämie, ähnlich wie bei den PBMCs der T2DM Patienten, inflammatorische Proteine vermehrt exprimiert werden. Die Wirkung von Insulin ist eher anti-inflammatorisch und reduziert beispielsweise die ischämieinduzierte TNF- α -Produktion in Kardiomyozyten über den Akt-eNOS-NO-Signalweg [180, 181].

Desweiteren wird Insulin sogar eine positive Wirkung in der Wundheilung zugesprochen. Lui *et al.* haben publiziert, dass Insulin die Chemotaxis von monozytären Zellen anregt und so zu einer verbesserten Wundheilung führt [182]. Wenn, wie hier ermittelt, Insulin inflammatorisch wirkt, widerspricht dies einer verbesserten Frakturheilung.

Im Rahmen der hier dargestellten Veränderung der inflammatorischen Zytokine könnte ein weiterer Mechanismus, der für die verschlechterte Frakturheilung bei Diabetikern verantwortlich ist, die Varianz im TNF- α -Spiegel sein [73, 74]. Bei Frakturen ist der Serumspiegel an TNF- α und IL-6 bei T2DM Patienten deutlich höher als bei Patienten ohne DM und Fraktur. Beim Frakturereignis steigen die Serumspiegel generell an [73].

Im Mausmodell konnte Ko *et al.* zeigen, dass bei diabetischen Tieren die TNF- α -Level deutlich erhöht und die MSC-Menge im Frakturspalt deutlich verringert ist [75]. Deswegen wird angenommen, dass die erhöhte TNF- α -Produktion bei Diabetikern zur Minimierung der Stammzellen und somit zu einer schlechteren Frakturheilung führt [75]. Allerdings wurde bei dieser Publikation ein Mausmodell mit T1DM genutzt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Veränderungen der Inflammation könnten somit ein Grund sein, weshalb der Einfluss monozytärer Zellen bei der diabetischen Frakturheilung verändert ist.

Neben der Inflammation ist die Veränderung der Angiogenese bei der diabetischen Frakturheilung bereits in den Fokus der Forschung getreten. Die Ergebnisse des Zytokinarray zeigten, eine erniedrigte relative Expression von Angiogenin bei THP-1-Zellen, die in Glukose bzw. Glukose und Insulin kultiviert

wurden. Die relative Expression von VEGF-A war durch die Kultivierung der Zellen in Glukose signifikant erhöht (s. 4.4.4.). Auch Kayal *et al.* konnte bei diabetischen Mäusen mit Fraktur ein erhöhtes Level an RANKL, TNF- α , MCSF und VEGF-A detektieren. Diskutiert wird hier, dass es vermehrt Hinweise gibt, dass bei DM die Angiogenese verstärkt wird [76]. Im Vergleich dazu zeigte Brown *et al.*, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Kallus-Neovaskularisierung bei T2DM gegenüber Wildtyp-Mäusen gibt [77]. Dies widerspricht den hier ermittelten Veränderungen von VEGF-A durch die Kultur von THP-1-Zellen in Glukose und Glukose-Insulin. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die VEGF-Level bei Diabetikern nach einer Fraktur deutlich höher sind als bei nicht DM [183].

Betrachtet man nun also den Gesamtzusammenhang des veränderten Zytokinprofils bei Diabetikern und bei diabetisch kultivierten THP-1-Zellen, fällt auf, dass mit den Ergebnissen dieser Arbeit, kein kausaler Zusammenhang mit der verschlechterten diabetischen Frakturheilung nachzuweisen ist.

Es gibt kein Zytokin, das in allen untersuchten Überständen gleichermaßen mehr oder weniger exprimiert wird. Um den Einfluss monozytärer Zellen bei der diabetischen Frakturheilung vollständig zu untersuchen, bedarf es im Anschluss an diese Arbeit noch weiterer Forschung (s. Ausblick).

Durch diese Arbeit konnte ein Grundstein, in der Untersuchung des Einflusses monozytäre Zellen auf die diabetische Frakturheilung gelegt werden. In den dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass monozytäre Zellen eine wichtige Rolle in der Frakturheilung spielen. Zusätzlich lieferte diese Arbeit verschiedene Erklärungen, welche Regulationsmechanismen dabei aktiviert werden. Aufgrund des veränderten Zytokinprofils und der hier erläuterten Wirkungsweise der veränderten Zytokine, bleibt ein großer Einfluss monozytärer Zellen bei der diabetischen Frakturheilung wahrscheinlich.

Monozyten sind, wie hier beschrieben, ein sehr leicht zu veränderndes Zellsystem. Ihre Funktion und Differenzierung passt sich den äußeren Bedingungen an und ist damit auch für die Pathogenese von Erkrankungen, wie auch dem Diabetes wichtig [118, 184]. Die multifaktoriellen Einflüsse, die

ebenfalls die Entstehung des Diabetes mellitus bedingen, (Adipositas, Alter, Ernährung) wirken ebenfalls auf die monozytären Zellen ein [79, 82, 87, 94, 176, 184]. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung monozytärer Zellen bei der Frakturheilung klar herausgearbeitet. Es ist also anzunehmen, dass ein solch sensibles Zellsystem eben diesen Einfluss bei der diabetischen Frakturheilung verändert. Die Frage, welcher Faktor für diese Veränderung ausschlaggebend ist, konnte nicht vollständig ermittelt werden. Allerdings konnte in dieser Arbeit, durch die angewendeten Screeningverfahren, ein breiter Überblick über mögliche Regulationsmechanismen ermittelt werden, die nun im Rahmen der weiteren Forschung expliziter untersucht werden können.

5.2 Diskussion weiterer Hypothesen

5.2.1 Sind bei T2DM weniger monozytäre Zellen im Frakturspalt anwesend?

Eine weitere mögliche Erklärung für die verschlechterte Frakturheilung bei DM-Patienten ist, dass die für die Frakturheilung wichtigen monozytären Zellen (s.o.), weniger in den Frakturspalt migrieren. Diese Hypothese kommt zustande, da in Vorarbeiten unseres Labors, ein verringerter MCP-2-Spiegel im Serum von Diabetikern ermittelt wurde [13]. Wie bereits in den Vorarbeiten untersucht, wirkt MCP-2 auf monozytäre Zellen chemotaktisch (s.1.6.) [13].

Die Rolle der MCP-Spiegel, insbesondere die von MCP-1, bei der diabetischen Frakturheilung, wird bereits in der Literatur diskutiert. Dazu gib es unterschiedliche Ergebnisse. In einer Schweizer Studie konnte bei Patienten mit T2DM eine deutliche Erhöhung der Serum-MCP-1-Spiegel nach einer Fraktur detektiert werden [6]. Dabei wird vermutet, dass die Erhöhung des MCP-1-Spiegels eine Gegenregulation des Körpers darstellt, der vorzeitigen Resorption des Kallus durch Osteoklasten entgegen zu wirken [6, 76, 185]. In Versuchen unseres Labors wurde hingegen im Serum von T2DM-Patienten ein verringerter MCP-1-Spiegel detektiert [7]. Die Erhöhung der MCP-1-Spiegel im Serum wurde als ein zentraler Faktor für die verschlechterte Frakturheilung bei DM diskutiert [186]. Chan *et al.* fanden heraus, dass eine Inhibition von CCR2 (MCP-1-Rezeptor) *in vivo* die enchondrale Frakturheilung bei Mäusen deutlich

verschlechtert [12]. Beim Diabetiker ist die Kallusbildung und damit zusammenhängend auch die Frakturheilung, deutlich verschlechtert [76]. Die Kallusbildung hängt signifikant von der Anwesenheit von Makrophagen ab [47, 48, 83].

Diskutiert wird in diesem Zusammenhang, ob eine lokale Erhöhung des MCP-Spiegels zu einer verbesserten Kallusformation bei Diabetikern beitragen könnte [6, 12]. Im *in vivo* Modell von Chan *et al.* gelang dies, aufgrund der suboptimalen Pharmakodynamik des Proteins allerdings nicht [12]. Allerdings zeigte eine „Low-dose-TNF- α “-Behandlung durch die Rekrutierung von Immunzellen, einen deutlich positiven Effekt bei der Frakturheilung *in vivo* [12]. Auch bei der diabetischen Wundheilung sind monozytäre Zellen wichtig. Beim Auftragen einer Mischung aus PBMCs und Wachstumsfaktoren auf ein diabetisches Gangrän zeigte, dass die *in vitro* Wundheilung deutlich verbessert ist [187].

Die Frage, ob tatsächlich weniger monozytäre Zellen im Frakturspalt bei T2DM vorhanden sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt. Die Identifizierung von der Menge an monozytären Zellen im Frakturspalt bei DM-Patienten ist weiterhin ein interessanter Teil der Forschung. Die Klärung der Frage könnte einen großen Betrag zum Thema „verschlechterte Frakturheilung bei DM-Patienten“ leisten und einen möglichen Grundstein für die erweiterte Therapie diabetischer Frakturheilung leisten (s. Ausblick).

5.3 Limitierung der Arbeit

5.3.1 „Scratch Assay“ als *in vitro* Frakturmodell

Die Methode des „Scratch Assays“ wurde als *in vitro* Frakturmodell angewendet, um die unterschiedlichen Effekte von THP-1-/Monozyten-Überstand und deren Bestandteile auf das Wachstum eines Osteoblasten-Monolayers zu beobachten. Der *in vitro* „Scratch Assay“ ist eine etablierte Methode um die Migration von Zellen zu untersuchen [84, 121, 188, 189]. Die Ergebnisse in dieser Arbeit haben gezeigt, dass dieses Modell in Bezug auf Osteoblasten einige Probleme aufweist.

Zum einen fiel auf, dass das Wachstum der Osteoblasten innerhalb des „Scratch“ sehr unregelmäßig und eher punktuell als flächig beschrieben werden muss. Zum anderen waren die Zellen am Rand des „Scratch“ teilweise umgeschlagen und hatten somit ein Wachstum in einer anderen Ebene und nicht mehr im Monolayer zur Folge. Dieses Wachstum wird bei der Messung des Flächenareals nicht berücksichtigt und führt zu falsch niedrigeren Werten. Wir haben uns bewusst entschieden alle Wells in die Ergebnisermittlung einzubeziehen, um durch die hohe Anzahl eine gute Aussagekraft zu bekommen.

Ähnliche Probleme wurden ebenfalls von Liang *et al.* beschrieben, die den *in vitro* „Scratch Assay“ mit anderen Migrationsassays verglichen haben.

Um dieses Problem zu umgehen hätte man die Zellen nach Durchführung des „Scratch“ mehrmals mit Medium waschen können [189]. Eine andere Möglichkeit zur Verbesserung der Methode, wäre die Durchführung mit Hilfe eines Migrationsassays, z.B. „Culture-Inserts“ von ibidi [190, 191] oder Aufnahme mit Time-Lap Mikroskopie gewesen [189, 192]. Beide Varianten sind allerdings deutlich aufwendiger und kostenintensiver. Außerdem haben eigene Vorversuche mit den „Culture-Inserts“ von ibidi keine guten Ergebnisse mit phOB gezeigt. Bei Entfernung der Inserts wurden die Zellen oft komplett mit abgelöst.

Die Migration von Osteoblasten ist für die Frakturheilung ein wichtiger Prozess. Allerdings stellt die Frakturheilung *in vivo* ein komplexes Zusammenspiel aus zellulären und humoralen Bestandteilen dar [10, 11, 39, 49, 121]. Der *in vitro* „Scratch Assay“ ist dementsprechend als Frakturmodell sehr einseitig und kann nur Auskunft über die Migration und die Zuwachsrate einer Monolayer-Lücke geben. Faktoren wie die Hypoxie, Neovaskularisierung, 3D-Wachstum, Kallusbildung und Remodeling werden dabei außer Acht gelassen.

Ein Vorteil der Methode ist, dass nur der Einfluss von den monozytären Überständen und nicht von granulozytären oder lymphozytären Zellen, auf die Knochenzellen getestet werden kann.

In der Literatur wird der „Scratch Assay“ nicht nur als Migrations-, sondern auch als Proliferationsassay beschrieben [84, 120]. Allerdings konnte nach

Stimulation mit THP-1-Überstand keine vermehrte Expression der Proliferationsmarker Ki67 und PCNA gezeigt werden. Ein Einfluss des THP-1-Überstandes auf die Proliferation der phOB ist damit eher zu vernachlässigen. Insgesamt ist als Nachteil der Methode zu sehen, dass eine hohe Anzahl von Versuchen notwendig ist, um einen Trend in den Ergebnissen glaubhaft zu untermauern [189].

Wenn man sich den gesamten und komplexen Prozess der Frakturheilung angucken möchte, scheinen die in der Literatur beschriebenen *in vivo* Modelle, besser geeignet zu sein. So konnte bspw. Chan *et al.* im Mausmodell die Kallusbildung direkt identifizieren [12]. Ebenso zeigen die Ergebnisse von Sandberger *et al.* die Bedeutung der Anwesenheit von monozytären Zellen während der Frakturheilung im Mausmodell [47]. Allerdings kann in den Beschriebenen *in vivo* Modellen eben nicht der alleinige Einfluss einer immunologischen Zelllinie, wie Monozyten untersucht werden. Denn bei dem gesamten Prozess der Frakturheilung spielen granulozytäre Zellen ebenfalls eine bekannte Rolle [10, 11].

Der „Scratch Assay“ ist ein gutes Werkzeug, um die Migrationsfähigkeit von phOB zu untersuchen. Die Ergebnisse müssen allerdings aufgrund des unregelmäßigen Wachstums kritisch betrachtet werden.

5.3.2 Fraktionierung

Zunächst wurde dafür versucht durch Ultrafiltration mit dem Vivaspin 6 eine Fraktion des Überstandes herauszufiltern, die einen besonders großen Einfluss hat. Im „Scratch Assay“ konnte dabei keine spezielle Fraktion ermittelt werden. Es zeigte sich hingegen eine extreme Varianz der Ergebnisse im „Scratch Assay“ mit den Fraktionen des THP-1-Überstand. Die anschließende Untersuchung der fraktionierten Überstände auf ihre Größe mittels Gelelektrophorese und Silberfärbung zeigte eine unzureichende Größenauftrennung des THP-1-Überstandes. Dies passt nicht zu den ermittelten Zytokinen in den gleichen THP-1-Überständen. Dabei müssten allein durch das Vorhandensein von Proteinen wie Angiogenin (14 kDa), RANTES (8 kDa) und VEGF-A (45 kDa) unterschiedliche Proteinbanden, bei regelrechter Auftrennung und Fraktionierung vorhanden sein [193-196].

Daraufhin konnten weitere Versuche mit den Fraktionen nicht durchgeführt und ausgewertet werden. Der Versuch, mithilfe des „Vivaspin 6 Kit“ von Sartorius, eine Größenfraktion für den Effekt des THP-1-Überstand auf phOB ausfindig zu machen scheiterte.

5.3.3 Darstellung von Diabetes im Modell

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle monozytärer Zellen auf die diabetische Frakturheilung näher untersucht werden. Der diabetische Zustand wurde dabei durch eine Hyperglykämie, Hyperinsulinämie oder einer Kombination beider Konditionen erzeugt [9]. Besonders der Zustand einer Hyperglykämie entspricht der Pathogenese des T2DM [1, 3, 54].

Im Rahmen dieser Arbeit, wurden die Zellen immer nur für einen kurzen Zeitraum (24 Stunden oder 14 Tagen) im hyperglykämischen Milieu kultiviert. Bei T2DM-Patienten herrscht der hyperglykämische Zustand über Jahrzehnte an und verändert so den Knochen [1-3, 57, 59]. Auch dieser Faktor bringt eine Limitation der durchgeführten Versuche mit sich und erschwert zusätzlich die Vergleichbarkeit mit PBMCs der Diabetes-Patienten, die diesen langjährigen Veränderungen ausgesetzt waren.

In dieser Arbeit wurde der Fokus besonders auf die Veränderung der Glukosespiegel bei T2DM gelegt. Der T2DM ist allerdings eine sehr komplexe Erkrankung [1, 3, 55, 197, 198]. Bei der Pathogenese spielen deutlich mehr Einflussfaktoren eine Rolle, als der Zustand der Hyperglykämie [1, 2, 55]. Patienten mit T2DM sind in der Regel ältere Menschen. Des Weiteren leiden die Patienten meist an einer Adipositas und dem Symptomkomplex des metabolischen Syndroms. Beides spielt gleichzeitig in der Entstehung des DM eine wichtige Rolle [1, 3]. Auch diese Krankheitsfaktoren beeinflussen den Knochen [58, 59, 66] aber eben auch den Phänotyp der monozytären Zellen deutlich [86, 87, 89, 94].

Des Weiteren werden Patienten mit T2DM in der Regel mit oralen Antidiabetika, wie beispielsweise Metformin, behandelt [2]. Ähnlich wie der in dieser Arbeit beschriebene Einfluss von Insulin, gibt es Hinweise auf die Veränderung der Zellpopulation bei DM durch den Einsatz der oralen Therapeutika. Die Behandlung von T2DM mit Metformin und Sulfonylharnstoffen verhindert die

hyperglykämischen Folgeschäden des DM und ist dadurch auch mit einem abnehmendem Frakturrisiko assoziiert [199]. Metformin hemmt allerdings auch die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und verändert somit die Funktion der Zellen [200]. Andere Therapeutika wie Glibenclamide führen in humanen Makrophagen zu einer vermehrten Expression von M2-Markern und reduzieren nachweislich die M1-Oberflächenmarker in Monozyten [201]. Ähnliche Veränderung konnten durch den Einsatz von Pioglitazonen im Rattenmodell gezeigt werden [94, 202]. Diese weiteren wichtigen Einflussfaktoren konnten und wurden in dieser Arbeit nicht mit berücksichtigt. Deswegen muss hier klar herausgestellt werden, dass nur der Einfluss von monozytärer Zellen während Hyperglykämie/Hyperinsulinämie auf die Frakturheilung untersucht wurde. Die komplexen Zusammenhänge im Rahmen des T2DM wurden nicht weiter berücksichtigt. Die genannten Einflussfaktoren spielen aber alle eine wichtige Rolle beim Einfluss monozytärer Zellen auf die diabetische Frakturheilung.

Ein möglicher Lösungsansatz den Einfluss monozytärer Zellen auf die diabetische Frakturheilung im Zusammenspiel mit weiteren diabetestypischen Veränderungen zu untersuchen, wäre beispielsweise, die Funktion und Migration der Osteoblasten von diabetischen Kontrollprobanden mit dem Überstand der eigenen PBMCs zu untersuchen.

6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen eindeutig darauf hin, dass monozytäre Zellen eine wichtige Rolle in der Frakturheilung sowohl bei DM-Patienten als auch bei Nicht-DM-Patienten spielen.

Um den Einfluss monozytärer Zellen bei der diabetischen Frakturheilung vollständig zu untersuchen, bedarf es im Anschluss an diese Arbeit noch weiterer Forschung. Es sollte zunächst geklärt werden, welcher Signalweg genau für die Migration und welcher für die Funktionsfähigkeit der Osteoblasten wichtig ist. Danach kann separat getestet werden, wie sich die einzelnen Signalwege unter dem Einfluss der diabetisch kultivierten THP-1-Zellen oder PBMCs verändern. Um dabei ganz explizit jeden einzelnen Weg zu beleuchten, sollte nicht nur der Überstand von Monozyten, sondern auch die einzelnen Zytokine in Ihrer Wirkung auf die Frakturheilung und die Aktivierung der Signalkaskaden getestet werden. Möglich wären dafür bspw. Migrations- und Differenzierungsversuche mit den einzelnen Zytokinen (Angiogenin, RANTES, VEGF-A, OSM, OPG, OPN) und jeweiligen Inhibitoren der Signalkaskaden.

Die Verwendung des „Srcatch Assays“ als Migrationsassay ist dabei eine gute Möglichkeit, die Wirkung von monozytäre Zellen auf diesen besonderen Teil der Frakturheilung zu untersuchen. Allerdings sollten für die Gesamtheit der Frakturheilung trotzdem weitere mögliche *in vitro/in vivo* Frakturmodelle hinzugezogen werden [18, 189].

Um die komplexen Veränderung der monozytären Zellen im Rahmen des T2DM zu berücksichtigen, kann eine FACS-Analyse der PBMCs die Unterschiede in der Oberflächendifferenzierung aufdecken und diese in den weiteren Versuchen einbezogen werden [78]. Zusätzlich sollten bei weiteren Versuchen mit PBMCs von Patienten mit T2DM Faktoren wie Alter, Medikation, Ernährung und Fettleibigkeit so gut wie möglich an die Kontrollgruppe angeglichen werden [94, 118, 176, 200-202].

Die Hypothese, dass durch die verringerte Expression von MCP-2 beim T2DM, weniger monozytäre Zellen zur Migration angeregt werden ist wahrscheinlich,

aber durch diese Arbeit nicht weiter untersucht worden. Der Zusammenhang könnte bspw. durch Untersuchung des Frakturhämatoms bei DM-Patienten oder einem äquivalenten *in vivo* Mausmodell geprüft werden. Eine weitere Überlegung wäre die Untersuchung der Frakturheilung im MCP-2-KO-Mausmodell [12].

Eine genauere Erkenntnis der Zytokin-Einflüsse, Aktivierung der Signalwege und tatsächliches Vorhandensein der Monozyten im Frakturspalt, könnte in Zukunft die Therapie der Frakturheilung, insbesondere bei DM-Patienten positiv unterstützen.

Eine denkbare Therapiemethode ist das Einbringen monozytärer Zellen oder ihres Überstandes in den Frakturspalt. Auf diese Weise könnte nicht nur die Heilung von Hautwunden sondern auch von Frakturen verbessert werden [187]. Ebenso ist die Injektion von Zytokinen (z.B. VEGF-A, OSM) in den Organismus oder sogar direkt in den Frakturspalt denkbar [12].

T2DM-Patienten könnten besonders von dieser Behandlung profitieren. Um diese therapeutischen Möglichkeiten zu untermauern bedarf es noch einiger Versuche. Zunächst müsste die therapeutische Wirkung eines monozytären Zellüberstandes *in vivo* untersucht werden. Auch dafür würde sich die Etablierung eines Mausmodells eignen [12, 84].

In dieser Arbeit wurde ein wichtiger Grundstein gelegt, um die Veränderungen im Einfluss monozytärer Zellen auf die Frakturheilung zu verstehen. Wenn im Rahmen der weiteren Forschung, kausale Zusammenhänge zwischen der monozytären Veränderung bei DM und der verschlechterten Frakturheilung identifiziert sind, ergeben sich dadurch auch therapeutische Ansätze. Dabei könnte beispielsweise durch den Einsatz von Medikamenten (z.B. Insulin, TNF- α) eine bestimmte Veränderung der monozytären Zellen induziert werden und zu einer verbesserten Frakturheilung beitragen [12, 182].

7 Zusammenfassung

Diabetes mellitus (DM) ist eine der häufigsten Stoffwechselkrankheiten in den heutigen Industriestaaten [1, 2]. Im Rahmen der unfallmedizinischen Forschung besteht, im Hinblick auf die Verbesserung der Therapie, ein großes Interesse an den Knochenveränderungen durch Diabetes mellitus und an der diabetischen Frakturheilung [5, 7, 9, 29].

Zur Verbesserung der Knochenqualität von Diabetikern und zur Reduzierung des Frakturrisikos sowie zur Verbesserung der postoperativen Versorgung der Frakturen in diesem Patientenkollektiv, bedarf es einem grundlegenden Verständnis der Unterschiede zwischen der Frakturheilung bei DM-Patienten und gesunden Patienten [5, 7-9].

Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess, in dem besonders in der frühen Phase inflammatorische Zytokine, Granulozyten und Monozyten einen wichtigen Teil zur Initiierung des Knochenwiederaufbaus leisten [10, 11]. Die Rolle von monozytären Zellen ist dabei unumstritten aber nicht hinreichend erklärt [10, 12, 39].

Ein Ziel dieser Arbeit war es, im *in vitro* Modell herauszufinden, welchen Einfluss monozytäre Zellen (PBMCs und THP-1-Zellen) in dieser Phase der Frakturheilung haben. In diesem Zusammenhang wurde der Effekt von monozytären Zellen auf die Migration, die Proliferation und die Funktion von humanen Osteoblasten untersucht. Der THP-1-Überstand verbesserte signifikant sowohl die AP-Aktivität als auch die Matrix-Mineralisierung von Osteoblasten. Des Weiteren konnte durch die Zugabe des Überstandes von monozytären Zellen ein signifikant schnelleres Zuwachsen des *in vitro* Frakturspalts („Scratch Assay“) beobachtet werden. Eine Zunahme der Proliferation durch den monozytären Überstand konnte mithilfe von Westernblots ausgeschlossen werden.

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass das Sekretom von THP-1 Zellen durch Stimulation sowohl der Funktion als auch der Migrationsfähigkeit von Knochenzellen einen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung hat. Dieser positive Einfluss auf die Knochenzellen war nicht nur unter normoglykämischen, sondern auch unter hyperglykämischen Bedingungen gegeben.

Als mögliche regulatorische Mechanismen wurden die Aktivierung von Erk1/2, SAPK/JNK, Akt, Hsp27 sowie STAT1 und STAT3 im Westernblot und „Intracellular Signaling Array“ identifiziert. Diese Signalwege konnten durch die Sekretion von Zytokinen, wie OSM, OPG, TGF- β_1 , Angiogenin und VEGF-A, im Zytokinarray des Überstandes von monozytären Zellen, erklärt werden.

Um den Zusammenhang zwischen verschlechterter diabetischer Frakturheilung und monozytärer Zellen zu klären, wurden die Zellüberstände von Typ-2-DM-PBMCs und hyperglykämisch kultivierten THP-1-Zellen untersucht. Dabei konnte ein deutlich verändertes Zytokinprofil bei Typ-2-DM-PBMCs detektiert werden.

Im Zusammenhang mit den ermittelten regulatorischen Mechanismen, die in dieser Arbeit gefunden wurden und für den Einfluss von monozytären Zellen auf die Frakturheilung verantwortlich sind, konnte allerdings keine eindeutige Erklärung für eine verschlechterten diabetischen Frakturheilung durch Veränderung der monozytären Zellen gefunden werden.

Durch diese Arbeit konnte ein Grundstein in der Untersuchung des Einflusses monozytärer Zellen auf die diabetische Frakturheilung gelegt werden. In den dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass monozytäre Zellen eine wichtige Rolle in der Frakturheilung spielen. Zusätzlich lieferte diese Arbeit verschiedene Erklärungen, welche Regulationsmechanismen dabei aktiviert werden. Aufgrund des veränderten Zytokinprofils und der hier erläuterten Wirkungsweise der veränderten Zytokine, ist ein großer Einfluss monozytärer Zellen bei der diabetischen Frakturheilung wahrscheinlich.

8 Literaturverzeichnis

1. Blair, M., *Diabetes Mellitus Review*. Urol Nurs, 2016. 36(1): p. 27-36.
2. VersorgungsLeitlinien, P.f.N. *Nationale Versorgungs Leitlinie -Therapie des Typ-2-Diabetes*. 2014 08.07.2018 [cited 2014; Available from: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/dm-therapie-1aufl-vers4-kurz.pdf.
3. Herold, G., *Innere Medizin*. 2015, Köln: .
4. Loder, R.T., *The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures*. Clin Orthop Relat Res, 1988(232): p. 210-6.
5. Pscherer, S., et al., *Delayed Fracture Healing in Diabetics with Distal Radius Fractures*. Acta Chir Orthop Traumatol Cech, 2017. 84(1): p. 24-29.
6. Liuni, F.M., et al., *Impaired healing of fragility fractures in type 2 diabetes: clinical and radiographic assessments and serum cytokine levels*. Aging Clin Exp Res, 2015. 27 Suppl 1: p. S37-44.
7. Ehnert, S., et al., *Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation - description of a novel in vitro model*. Exp Cell Res, 2015. 332(2): p. 247-58.
8. Haug, A.T., et al., *Gene expression changes in cancellous bone of type 2 diabetics: a biomolecular basis for diabetic bone disease*. Langenbecks Arch Surg, 2014. 399(5): p. 639-47.
9. Freude, T., et al., *Hyperinsulinemia reduces osteoblast activity in vitro via upregulation of TGF-beta*. J Mol Med (Berl), 2012. 90(11): p. 1257-66.
10. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S7-21.
11. Claes, L., S. Recknagel, and A. Ignatius, *Fracture healing under healthy and inflammatory conditions*. Nat Rev Rheumatol, 2012. 8(3): p. 133-43.
12. Chan, J.K., et al., *Low-dose TNF augments fracture healing in normal and osteoporotic bone by up-regulating the innate immune response*. EMBO Mol Med, 2015. 7(5): p. 547-61.
13. Mayer, L., *Der Einfluss von Zytokin MCP-2 auf die Wundheilung von Typ II Diabetikern*, in *Siegfried-Weller-Institut der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen*. 2018, Universität Tübingen Tübingen.
14. Taichman, R.S., *Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche*. Blood, 2005. 105(7): p. 2631-9.
15. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. 3 Suppl 3: p. S131-9.
16. Michael Schünke, E.S., Udo Schumacher *PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. 2. Auflage ed. 2009
17. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie 3*. Ausgabe ed. 2009, Stuttgart
18. Blair, H.C., et al., *Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro*. Tissue Eng Part B Rev, 2017. 23(3): p. 268-280.

19. Gerhard Aumüller, G.A., Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Giovanni Maio, Artur Mayerhofer, *Duale Reihe Anatomie* 4. Auflage ed. 20. September 2017.
20. Baron, R., *Anatomy and Ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
21. Baron, R. and M. Kneissel, *WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments*. *Nat Med*, 2013. 19(2): p. 179-92.
22. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. *Nature*, 2003. 423(6937): p. 337-42.
23. Robling, A.G., et al., *Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin*. *J Biol Chem*, 2008. 283(9): p. 5866-75.
24. Rubin, C.T. and L.E. Lanyon, *Kappa Delta Award paper. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: function as a determinant for adaptive remodeling in bone*. *J Orthop Res*, 1987. 5(2): p. 300-10.
25. Bruderer, M., et al., *Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis*. *Eur Cell Mater*, 2014. 28: p. 269-86.
26. Caetano-Lopes, J., H. Canhao, and J.E. Fonseca, *Osteoblasts and bone formation*. *Acta Reumatol Port*, 2007. 32(2): p. 103-10.
27. Ehnert, S., et al., *Primary human osteoblasts with reduced alkaline phosphatase and matrix mineralization baseline capacity are responsive to extremely low frequency pulsed electromagnetic field exposure - Clinical implication possible*. *Bone Rep*, 2015. 3: p. 48-56.
28. Suzuki, A., et al., *Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation*. *Bone*, 2002. 30(1): p. 91-8.
29. Ehnert, S., et al., *Distinct Gene Expression Patterns Defining Human Osteoblasts' Response to BMP2 Treatment: Is the Therapeutic Success All a Matter of Timing?* *Eur Surg Res*, 2016. 57(3-4): p. 197-210.
30. Ehnert, S., et al., *TGF-beta1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation*. *PLoS One*, 2010. 5(11): p. e14073.
31. Siddiqui, J.A. and N.C. Partridge, *Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement*. *Physiology (Bethesda)*, 2016. 31(3): p. 233-45.
32. Teitelbaum, S.L. and F.P. Ross, *Genetic regulation of osteoclast development and function*. *Nat Rev Genet*, 2003. 4(8): p. 638-49.
33. Boyce, B.F. and L. Xing, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9 Suppl 1: p. S1.
34. Kohli, N., et al., *Bone remodelling in vitro: Where are we headed? -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro*. *Bone and Mineral*, 2018. 110: p. 38–46.
35. Weinstein, R.S., et al., *Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids*. *J Clin Invest*, 2002. 109(8): p. 1041-8.

36. Jilka, R.L., et al., *Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone*. J Clin Invest, 1999. 104(4): p. 439-46.
37. Einhorn, T.A. and L.C. Gerstenfeld, *Fracture healing: mechanisms and interventions*. Nat Rev Rheumatol, 2015. 11(1): p. 45-54.
38. Einhorn, T.A., *The science of fracture healing*. J Orthop Trauma, 2005. 19(10 Suppl): p. S4-6.
39. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. 42(6): p. 551-5.
40. Aho, A.J., *Electron microscopic and histological observations on fracture repair in young and old rats*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1966: p. Suppl 184:1-95.
41. Brighton, C.T. and A.G. Krebs, *Oxygen tension of healing fractures in the rabbit*. J Bone Joint Surg Am, 1972. 54(2): p. 323-32.
42. Kolar, P., et al., *The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. 16(4): p. 427-34.
43. Julier, Z., et al., *Promoting tissue regeneration by modulating the immune system*. Acta Biomater, 2017. 53: p. 13-28.
44. Hoff, P., et al., *Immunological characterization of the early human fracture hematoma*. Immunol Res, 2016. 64(5-6): p. 1195-1206.
45. Schmidt-Bleek, K., et al., *Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep*. J Orthop Res, 2009. 27(9): p. 1147-51.
46. Caetano-Lopes, J., et al., *Upregulation of inflammatory genes and downregulation of sclerostin gene expression are key elements in the early phase of fragility fracture healing*. PLoS One, 2011. 6(2): p. e16947.
47. Sandberg, O.H., et al., *Temporal role of macrophages in cancellous bone healing*. Bone, 2017. 101: p. 129-133.
48. Schlundt, C., et al., *Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification*. Bone, 2018. 106: p. 78-89.
49. Ai-Aql, Z.S., et al., *Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis*. J Dent Res, 2008. 87(2): p. 107-18.
50. Gerstenfeld, L.C., et al., *Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis*. J Histochem Cytochem, 2006. 54(11): p. 1215-28.
51. Raggatt, L.J., et al., *Fracture healing via periosteal callus formation requires macrophages for both initiation and progression of early endochondral ossification*. Am J Pathol, 2014. 184(12): p. 3192-204.
52. Keramaris, N.C., et al., *Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF*. Injury, 2008. 39 Suppl 2: p. S45-57.
53. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. 27(5): p. 1047-53.
54. DeFronzo, R.A., et al., *Type 2 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers, 2015. 1: p. 15019.

55. Federation, I.D. *IDF diabetes atlas 2017* 08.07.2018]; 8th edition:[Available from: <http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.
56. Thomas Haak, K.-D.P., *Diabetologie für die Praxis: Fallorientierte Darstellung - Diagnostik und Therapie*. 1. Auflage ed. 2012, Stuttgart.
57. Stefan Silbernagl, F.L., *Taschenatlas Pathophysiologie* 5. Auflage ed. 2017, Stuttgart
58. Liefde, d., *Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study*. Osteoporos Int, 2004.
59. Sanches, *The impact of type 2 diabetes on bone metabolism*. DOI, 2017.
60. Jackuliak, P. and J. Payer, *Osteoporosis, fractures, and diabetes*. Int J Endocrinol, 2014. 2014: p. 820615.
61. Vestergaard, P., *Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes - a meta-analysis*. Osteoporos Int., 2007. 18(4): p. 427-44.
62. Heath, H., 3rd, L.J. Melton, 3rd, and C.P. Chu, *Diabetes mellitus and risk of skeletal fracture*. N Engl J Med, 1980. 303(10): p. 567-70.
63. Kasahara, T., et al., *Malfuction of bone marrow-derived osteoclasts and the delay of bone fracture healing in diabetic mice*. Bone, 2010. 47(3): p. 617-25.
64. Hameedalddeen, A., et al., *FOXO1, TGF-beta regulation and wound healing*. Int J Mol Sci, 2014. 15(9): p. 16257-69.
65. Wang, Y., Y. Zhou, and D.T. Graves, *FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 925350.
66. Jiao, H., E. Xiao, and D.T. Graves, *Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing*. Curr Osteoporos Rep, 2015. 13(5): p. 327-35.
67. Garcia-Hernandez, A., et al., *High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells*. Bone, 2012. 50(1): p. 276-88.
68. Sanguineti, R., et al., *Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1126: p. 166-72.
69. Ganesh, S.P., et al., *The impact of diabetes on patient outcomes after ankle fracture*. J Bone Joint Surg Am, 2005. 87(8): p. 1712-8.
70. Blakytny, *The Diabetic Bone: A Cellular and Molecular Perspective*. The International Journal of Lower Extremity Wounds, 2011.
71. Jiang, X., H. Lui, and Q. Chen, *Experimental study on levels of related Cytokines and behavior changes during the course of fracture healing in streptozotocin-induced diabetic rats* Chin J Behav Med Brain Sci, 2012.
72. Pscherer, S., et al., *Anti-diabetic treatment regulates pro-fibrotic TGF-beta serum levels in type 2 diabetics*. Diabetol Metab Syndr, 2013. 5(1): p. 48.
73. Sun, M., et al., *TNF-alpha is upregulated in T2DM patients with fracture and promotes the apoptosis of osteoblast cells in vitro in the presence of high glucose*. Cytokine, 2016. 80: p. 35-42.
74. Buie, H.R., et al., *Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis*. Bone, 2007. 41(4): p. 505-15.

75. Ko, K.I., et al., *Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNFalpha-mediated mechanism*. Diabetologia, 2015. 58(3): p. 633-642.
76. Kayal, R.A., et al., *Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity*. J Bone Miner Res, 2007. 22(4): p. 560-8.
77. Brown, M.L., et al., *Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus*. PLoS One, 2014. 9(6): p. e99656.
78. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. 81(3): p. 584-92.
79. Hume, D.A., *The mononuclear phagocyte system*. Curr Opin Immunol, 2006. 18(1): p. 49-53.
80. Parihar, A., T.D. Eubank, and A.I. Doseff, *Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death*. J Innate Immun, 2010. 2(3): p. 204-15.
81. Abdelmagid, S.M., M.F. Barbe, and F.F. Safadi, *Role of inflammation in the aging bones*. Life Sci, 2015. 123: p. 25-34.
82. Randolph, G.J., C. Jakubzick, and C. Qu, *Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells*. Curr Opin Immunol, 2008. 20(1): p. 52-60.
83. Pirraco, R.P., R.L. Reis, and A.P. Marques, *Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs*. J Tissue Eng Regen Med, 2013. 7(5): p. 392-400.
84. Mildner, M., et al., *Secretome of peripheral blood mononuclear cells enhances wound healing*. PLoS One, 2013. 8(3): p. e60103.
85. Kajiura, Y., et al., *beta-carotene suppresses Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-mediated cytokine production in THP-1 monocytes cultured with high glucose condition*. Cell Biol Int, 2018. 42(1): p. 105-111.
86. Devaraj, S., et al., *Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c-{alpha} and -{beta}*. Diabetes, 2005. 54(1): p. 85-91.
87. Dasu, M.R., et al., *High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation*. Diabetes, 2008. 57(11): p. 3090-8.
88. Guha, M., et al., *Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways*. J Biol Chem, 2000. 275(23): p. 17728-39.
89. Shanmugam, N., et al., *High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells*. Diabetes, 2003. 52(5): p. 1256-64.
90. Chawla, A., K.D. Nguyen, and Y.P. Goh, *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(11): p. 738-49.

91. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1796-808.
92. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. 117(1): p. 175-84.
93. McArdle, M.A., et al., *Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. 4: p. 52.
94. Satoh, N., et al., *Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone*. Diabetes Care, 2010. 33(1): p. e7.
95. Wilson, H.M., *SOCs Proteins in Macrophage Polarization and Function*. Front Immunol, 2014. 5: p. 357.
96. Tsuchiya, S., et al., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. Int J Cancer, 1980. 26(2): p. 171-6.
97. Chanput, W., J.J. Mes, and H.J. Wichers, *THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach*. Int Immunopharmacol, 2014. 23(1): p. 37-45.
98. Ehnert, S., et al., *Further characterization of autologous NeoHepatocytes for in vitro toxicity testing*. Toxicol In Vitro, 2011. 25(6): p. 1203-8.
99. Ehnert, S., et al., *Autologous serum improves yield and metabolic capacity of monocyte-derived hepatocyte-like cells: possible implication for cell transplantation*. Cell Transplant, 2011. 20(9): p. 1465-77.
100. Fields, R.D. and M.V. Lancaster, *Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity*. Am Biotechnol Lab, 1993. 11(4): p. 48-50.
101. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, 2000. 267(17): p. 5421-6.
102. McMillian, M.K., et al., *An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells*. Cell Biol Toxicol, 2002. 18(3): p. 157-73.
103. Sheehan, D. and B. Hrapchak, *Theory and Practice of Histotechnology*. 2nd ed. 1980, Columbus, OH: Battelle Press.
104. Bonewald, L.F., et al., *von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation*. Calcif Tissue Int, 2003. 72(5): p. 537-47.
105. Mortz, E., et al., *Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis*. Proteomics, 2001. 1(11): p. 1359-63.
106. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. 193(1): p. 265-75.
107. Grundtner, P., et al., *The IL-10R1 S138G loss-of-function allele and ulcerative colitis*. Genes Immun, 2009. 10(1): p. 84-92.
108. Aldrich, S. *PONCEAU S STAINING SOLUTION Sigma Prod. No. P 7170*. 03/20/98]; Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p7170pis.pdf.

109. Nicolaidou, V., et al., *Monocytes induce STAT3 activation in human mesenchymal stem cells to promote osteoblast formation*. PLoS One, 2012. 7(7): p. e39871.
110. Lee, K.S., S.H. Hong, and S.C. Bae, *Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein*. Oncogene, 2002. 21(47): p. 7156-63.
111. Kanno, Y., et al., *SAPK/JNK plays a role in transforming growth factor-beta-induced VEGF synthesis in osteoblasts*. Horm Metab Res, 2005. 37(3): p. 140-5.
112. Chen, G., C. Deng, and Y.P. Li, *TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation*. Int J Biol Sci, 2012. 8(2): p. 272-88.
113. Bellido, T., et al., *Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells*. J Clin Invest, 1996. 97(2): p. 431-7.
114. Blanchard, F., et al., *The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. 20(1): p. 19-28.
115. Ishimi, Y., et al., *IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption*. J Immunol, 1990. 145(10): p. 3297-303.
116. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. 334 (Pt 2): p. 297-314.
117. Itoh, S., et al., *A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation*. Bone, 2006. 39(3): p. 505-12.
118. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations*. Blood, 1992. 79(2): p. 503-11.
119. Schildberger, A., et al., *Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide*. Mediators Inflamm, 2013. 2013: p. 697972.
120. Ehnert, S., et al., *Immune Cell Induced Migration of Osteoprogenitor Cells Is Mediated by TGF-beta Dependent Upregulation of NOX4 and Activation of Focal Adhesion Kinase*. Int J Mol Sci, 2018. 19(8).
121. Thiel, A., et al., *Osteoblast migration in vertebrate bone*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018. 93(1): p. 350-363.
122. Gonwa, T.A., et al., *Antigen-presenting capabilities of human monocytes correlates with their expression of HLA-DS, an Ia determinant distinct from HLA-DR*. J Immunol, 1983. 130(2): p. 706-11.
123. Drukker, M., et al., *Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(15): p. 9864-9.
124. Nunez, G., et al., *Expression of HLA-DR, MB, MT and SB antigens on human mononuclear cells: identification of two phenotypically distinct monocyte populations*. J Immunol, 1984. 133(3): p. 1300-6.

125. Reyes-Botella, C., et al., *Expression of molecules involved in antigen presentation and T cell activation (HLA-DR, CD80, CD86, CD44 and CD54) by cultured human osteoblasts*. J Periodontol, 2000. 71(4): p. 614-7.
126. Srikanthan, P., et al., *Insulin resistance and bone strength: findings from the study of midlife in the United States*. J Bone Miner Res, 2014. 29(4): p. 796-803.
127. Matsui, H., et al., *The expression of Fn14 via mechanical stress-activated JNK contributes to apoptosis induction in osteoblasts*. J Biol Chem, 2014. 289(10): p. 6438-50.
128. Matsuguchi, T., et al., *JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation*. J Bone Miner Res, 2009. 24(3): p. 398-410.
129. Ehnert, S., et al., *Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields cause antioxidative defense mechanisms in human osteoblasts via induction of *O2(-) and H2O2*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 14544.
130. Lai, C.F., et al., *Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2001. 276(17): p. 14443-50.
131. Kanno, T., et al., *Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts*. J Cell Biochem, 2007. 101(5): p. 1266-77.
132. Greenblatt, M.B., et al., *The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice*. J Clin Invest, 2010. 120(7): p. 2457-73.
133. Howells, C.C., et al., *The Bcl-2-associated death promoter (BAD) lowers the threshold at which the Bcl-2-interacting domain death agonist (BID) triggers mitochondria disintegration*. J Theor Biol, 2011. 271(1): p. 114-23.
134. Willis, S., et al., *The Bcl-2-regulated apoptotic pathway*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 20): p. 4053-6.
135. Fulda, S., et al., *Cellular stress responses: cell survival and cell death*. Int J Cell Biol, 2010. 2010: p. 214074.
136. Kozawa, O., et al., *Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in basic fibroblast growth factor-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts*. J Cell Biochem, 1999. 74(3): p. 479-85.
137. Cell Signaling Technology, I. SB203580. 2014 20.07.2018; Available from: <https://media.cellsignal.com/pdf/5633.pdf>.
138. Cell Signaling Technology, I. U0126 2015 20.07.2018; Available from: <https://media.cellsignal.com/pdf/9903.pdf>.
139. Liu, S., et al., *Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 287(1): p. 305-10.
140. Nakamura, R., et al., *IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis*. Nat Commun, 2015. 6: p. 7847.

141. Zhou, H., et al., *Osteoblast/osteocyte-specific inactivation of Stat3 decreases load-driven bone formation and accumulates reactive oxygen species*. Bone, 2011. 49(3): p. 404-11.
142. Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi, *Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors*. Oncogene, 2000. 19(21): p. 2548-56.
143. Sheng, J. and Z. Xu, *Three decades of research on angiogenin: a review and perspective*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2016. 48(5): p. 399-410.
144. Matsumoto, K. and M. Ema, *Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours*. J Biochem, 2014. 156(1): p. 1-10.
145. Mayr-Wohlfart, U., et al., *Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts*. Bone, 2002. 30(3): p. 472-7.
146. Fiedler, J., et al., *VEGF-A and PIGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 334(2): p. 561-8.
147. Joensuu, K., et al., *Enhanced osteoblastic differentiation and bone formation in co-culture of human bone marrow mesenchymal stromal cells and peripheral blood mononuclear cells with exogenous VEGF*. Orthop Traumatol Surg Res, 2015. 101(3): p. 381-6.
148. Hengartner, N.E., et al., *IL-1beta inhibits human osteoblast migration*. Mol Med, 2013. 19: p. 36-42.
149. Wan, C., et al., *Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(2): p. 686-91.
150. Yano, S., et al., *Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts*. Endocrinology, 2005. 146(5): p. 2324-35.
151. Weiss, S., et al., *Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration--distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing*. Bone, 2005. 37(6): p. 781-90.
152. Miyake, M., et al., *Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metalloproteinase-2 expression via the ERK1/2 pathway*. Oncogene, 2015. 34(7): p. 890-901.
153. Narasimhan, P., et al., *VEGF Stimulates the ERK 1/2 signaling pathway and apoptosis in cerebral endothelial cells after ischemic conditions*. Stroke, 2009. 40(4): p. 1467-73.
154. Almalki, S.G. and D.K. Agrawal, *ERK signaling is required for VEGF-A/VEGFR2-induced differentiation of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells*. Stem Cell Res Ther, 2017. 8(1): p. 113.
155. Shin, M., et al., *Vegfa signals through ERK to promote angiogenesis, but not artery differentiation*. Development, 2016. 143(20): p. 3796-3805.
156. Koch, S. and L. Claesson-Welsh, *Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(7): p. a006502.

157. Bartoli, M., et al., *Vascular endothelial growth factor activates STAT proteins in aortic endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. 275(43): p. 33189-92.
158. Liao, X.H., et al., *VEGF-A Stimulates STAT3 Activity via Nitrosylation of Myocardin to Regulate the Expression of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation Markers*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 2660.
159. Kahles, F., H.M. Findeisen, and D. Bruemmer, *Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes*. Mol Metab, 2014. 3(4): p. 384-93.
160. Reinholt, F.P., et al., *Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(12): p. 4473-5.
161. Ryan, R.E., et al., *Oncostatin M binds to extracellular matrix in a bioactive conformation: implications for inflammation and metastasis*. Cytokine, 2015. 72(1): p. 71-85.
162. Jay, P.R., et al., *Oncostatin-M: a new bone active cytokine that activates osteoblasts and inhibits bone resorption*. Endocrinology, 1996. 137(4): p. 1151-8.
163. Tonozuka, Y., et al., *A GTPase-activating protein binds STAT3 and is required for IL-6-induced STAT3 activation and for differentiation of a leukemic cell line*. Blood, 2004. 104(12): p. 3550-7.
164. Lai, C.F. and S.L. Cheng, *Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2002. 277(18): p. 15514-22.
165. Javelaud, D. and A. Mauviel, *Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis*. Oncogene, 2005. 24(37): p. 5742-50.
166. Yang, X., et al., *Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice*. Bone, 2007. 41(6): p. 928-36.
167. Lieder, R. and O.E. Sigurjonsson, *The Effect of Recombinant Human Interleukin-6 on Osteogenic Differentiation and YKL-40 Expression in Human, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells*. Biores Open Access, 2014. 3(1): p. 29-34.
168. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. 6(10): p. a016295.
169. Barnes, T.C., M.E. Anderson, and R.J. Moots, *The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis*. Int J Rheumatol, 2011. 2011: p. 721608.
170. Glass, G.E., et al., *TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(4): p. 1585-90.
171. Einhorn, T.A., *Bone healing: little secrets*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2011. 8(1): p. 17-20.
172. Hattangady, N.G. and M.S. Rajadhyaksha, *A brief review of in vitro models of diabetic neuropathy*. Int J Diabetes Dev Ctries, 2009. 29(4): p. 143-9.

173. Al-Awar, A., et al., *Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models*. J Diabetes Res, 2016. 2016: p. 9051426.
174. Katt, M.E., et al., *In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform*. Front Bioeng Biotechnol, 2016. 4: p. 12.
175. Miao, F., et al., *Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes*. J Biol Chem, 2007. 282(18): p. 13854-63.
176. Hearps, A.C., et al., *Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function*. Aging Cell, 2012. 11(5): p. 867-75.
177. Simsek, T., H.U. Simsek, and N.Z. Canturk, *Response to trauma and metabolic changes: posttraumatic metabolism*. Ulus Cerrahi Derg, 2014. 30(3): p. 153-9.
178. Biffi, W.L., et al., *Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation?* Ann Surg, 1996. 224(5): p. 647-64.
179. Chung, M.Y., S.J. Hong, and J.Y. Lee, *The influence of obesity on postoperative inflammatory cytokine levels*. J Int Med Res, 2011. 39(6): p. 2370-8.
180. Sun, Q., J. Li, and F. Gao, *New insights into insulin: The anti-inflammatory effect and its clinical relevance*. World J Diabetes, 2014. 5(2): p. 89-96.
181. Li, J., et al., *Insulin inhibits tumor necrosis factor-alpha induction in myocardial ischemia/reperfusion: role of Akt and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation*. Crit Care Med, 2008. 36(5): p. 1551-8.
182. Liu, Y., et al., *Insulin regulates multiple signaling pathways leading to monocyte/macrophage chemotaxis into the wound tissue*. Biol Open, 2018. 7(1).
183. Kottstorfer, J., et al., *The influence of non-osteogenic factors on the expression of M-CSF and VEGF during fracture healing*. Injury, 2013. 44(7): p. 930-4.
184. Netea, M.G., et al., *Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages*. Blood, 2009. 113(10): p. 2324-35.
185. Kayal, R.A., et al., *Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment*. Bone, 2009. 44(2): p. 357-63.
186. Edderkaoui, B., *Potential Role of Chemokines in Fracture Repair*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. 8: p. 39.
187. Asai, J., et al., *Successful treatment of diabetic gangrene with topical application of a mixture of peripheral blood mononuclear cells and basic fibroblast growth factor*. J Dermatol, 2006. 33(5): p. 349-52.
188. Jones, S.J. and A. Boyde, *The migration of osteoblasts*. Cell Tissue Res, 1977. 184(2): p. 179-93.
189. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. 2(2): p. 329-33.

190. Haasters, F., et al., *Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 452(1): p. 118-23.
191. Hung, S.P., et al., *Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells*. *J Orthop Res*, 2012. 30(2): p. 260-6.
192. Justus, C.R., et al., *In vitro cell migration and invasion assays*. *J Vis Exp*, 2014(88).
193. Alam, R., et al., *RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils*. *J Immunol*, 1993. 150(8 Pt 1): p. 3442-8.
194. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. *Immunity*, 2000. 12(2): p. 121-7.
195. Li, S., S. Ibaragi, and G.F. Hu, *Angiogenin as a molecular target for the treatment of prostate cancer*. *Curr Cancer Ther Rev*, 2011. 7(2): p. 83-90.
196. van der Loos, C.M., et al., *Anti-human vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody selection for immunohistochemical staining of proliferating blood vessels*. *J Histochem Cytochem*, 2010. 58(2): p. 109-18.
197. Pscherer, S., et al., *Delayed Fracture Healing in Diabetics with Distal Radius Fractures*. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 2015. 82(4): p. 268-73.
198. Saito, M., et al., *Diabetes, collagen, and bone quality*. *Curr Osteoporos Rep*, 2014. 12(2): p. 181-8.
199. Vestergaard, P., L. Rejnmark, and L. Mosekilde, *Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk*. *Diabetologia*, 2005. 48(7): p. 1292-9.
200. Vasamsetti, S.B., et al., *Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis*. *Diabetes*, 2015. 64(6): p. 2028-41.
201. Kewcharoenwong, C., et al., *Glibenclamide Reduces Primary Human Monocyte Functions Against Tuberculosis Infection by Enhancing M2 Polarization*. *Front Immunol*, 2018. 9: p. 2109.
202. Gao, B.T., et al., *Pioglitazone alters monocyte populations and stimulates recent thymic emigrants in the BBDZR/Wor type 2 diabetes rat model*. *Diabetol Metab Syndr*, 2015. 7: p. 72.
203. KG, C.R.G.C. *Gebrauchsanweisung Roti®-Mark 10-150*. 2017 08.07.2018; Available from: https://www.carlroth.com/downloads/ba/de/T/BA_T850_DE.pdf.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Überblick der Veränderungen während der Knochenreifung	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Knochenstoffwechsels.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Schritte in der sekundären Frakturheilung	12
Abbildung 4: Modell der frühen Inflammatorischen Phase im Frakturspalt.....	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zusammenhänge bei der diabetischen Frakturheilung	19
Abbildung 6: Zytokinprofil im Serum von Kontrollpatienten, Prädiabetikern und T2DM-Patienten	23
Abbildung 7: Migrationsassay mit Bydon chambers der THP-1-Zellen.....	24
Abbildung 8: Stimulation mit THP-1-Überstand erhöht die AP-Aktivität bei humanen Osteoblasten	40
Abbildung 9: Verbesserung der Matrixmineralisierung bei Osteoblasten durch Stimulation mit THP-1- Überstand.....	41
Abbildung 10: Signifikante Zunahme der Zuwachsrate im „Scratch Assay“ durch Zugabe des Überstandes von monozytären Zellen	43
Abbildung 11: Mikroskopische Bilder zum Vergleich der signifikant erhöhten prozentualen Zuwachsrate bei Stimulation der primären humanen Osteoblasten mit dem Überstand von THP-1 Zellen	44
Abbildung 12: Keine Expression der Proliferationsmarker PCNA und Ki67 bei Stimulation der Osteoblasten mit THP-1-Überstand.....	45
Abbildung 13: Hyperglykämie verringerte den positiven Einfluss von THP-1-Zellen auf die AP-Aktivität phOB nicht.....	48
Abbildung 14: THP-1-Überstand bewirkte eine signifikant größere Zuwachsrate bei Normo- und Hyperglykämie	49
Abbildung 15: Expression der MAP-Kinasen phospho-Erk1/2, phospho-p38, phospho-SAPK/JNK und phospho-Hsp27 nach 15 min, 30 min, 1 h, 2 h oder 4 h Stimulation mit THP-1 Überstand.....	51

Abbildung 16: Einfluss von MAP-Kinase-Inhibitoren auf die prozentuale Zuwachsrates im „Scratch Assay“ humaner Osteoblasten.....	53
Abbildung 17: THP-1-Überstand aktivierte SAPK/JNK, Erk 1/2, Akt, Hsp27 sowie STAT1 und 3 in phOB	57
Abbildung 18: leichte Veränderungen in der Aktivierung von Erk1/2 bei Stimulation der phOB mit dem Überstand hyperglykämisch kultivierter THP-1-Zellen	58
Abbildung 19: Einfluss der unterschiedlichen Fraktionen des THP-1 Überstandes auf die prozentuale Zuwachsrates im „Scratch Assay“	60
Abbildung 20: Verbesserung der AP-Aktivität bei der Zugabe von THP-1-Überstand und TGF- β_1	62
Abbildung 21: IL-6-Konzentrationen im Überstand von THP-1-Zellen und PBMCs gesunder Kontrollprobanden und T2DM-Patienten	64
Abbildung 22: Erhöhte Zytokinexpression von TNF- α und INF- γ bei T2DM.....	69
Abbildung 23: Erhöhte Zytokinexpression von TGF- β_1 bei T2DM und durch Glucose	70
Abbildung 24: Verändertes Zytokinprofil von OSM und OPG bei T2DM und hyperglykämischer Kultivierung von THP-1-Zellen.....	71
Abbildung 25: Einfluss der von monozytären Zellen sekretieren Zytokine auf die in phOB aktivierten Signalkaskaden unter normoglykämischen Bedingungen .	88
Abbildung 26: Veränderungen im Zytokinprofil bei T2DM	92
Abbildung 27: Beispielhafte Standardkurve zur Berechnung der AP-Aktivität	134
Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung einer Standardkurve für die Proteinmessung nach Lowry	135
Abbildung 29: Signifikante Zunahme der Zuwachsrates im „Scratch Assay“ durch Zugabe von THP-1-Überstand	135
Abbildung 30: Prozentuale Zuwachsrates der humanen Osteoblasten im „Scratch Assay“ bei Stimulation mit THP-1-Überstand oder PBMC –Überstand gesunder Kontrollprobanden.....	136
Abbildung 31: osmolare Aktivität von Mannitol verschlechtert nicht den Einfluss auf die AP-Aktivität bei Stimulation der phOB mit THP-1-Überstand.....	136

Abbildung 32: Aktivierung von Erk 1/2, p38 und Bad nach Stimulation primärer Osteoblasten mit SB 203580 und U0126	138
Abbildung 33: Einfluss der unterschiedlichen Fraktionen des THP-1 Überstandes auf die prozentuale Zuwachsrates im „Scratch Assay“	139
Abbildung 34: Keine gelelektrophoretische Trennung der Fraktionen des THP-1-Überstand.....	140
Abbildung 35: Zytokinexpression in den Überständen von THP-1-Zellen und PBMCs:	142

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einflussfaktoren der diabetischen Osteopathie.....	18
Tabelle 2: Veränderte Expression der interzellulären Signalproteine bei Stimulation der phOB mit dem Überstand von THP-1-Zellen	56
Tabelle 3: Verändertes Zytokinprofil bei PBMCs von T2DM Patienten	67

11 Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir zitierten Quellen verwendet habe.

Die Arbeit wurde im Sigfried-Weller-Institut der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen unter Betreuung von Dr. S. Ehnert und Prof. Dr. A. Nüssler angefertigt.

Alle hier aufgeführten Versuche wurden, nach Einarbeitung und Anleitung durch Dr. S. Ehnert, von mir selbstständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung mit D. S. Ehnert eigenständig.

Die humanen Knochenzellen stammen von Patienten der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen und wurden im Rahmen des Ethikantrages 365/2012BO2 aus Knochenabfällen von endoprothetischen Operationen isoliert.

12 Veröffentlichungen

- Vorträge:**
- Vereinigung Süddeutscher Orthopäden und Unfallchirurgen e.V. in Baden-Baden (April 2016)
 - IZKF–Promotionskolleg, Universität Tübingen (Januar 2016)
 - **THP-1/Monozyten Überstand fördert die Funktion primärer humaner Osteoblasten – Relevanz für die diabetische Frakturheilung?**
 - **Systemischer Einfluss von Diabetes mellitus auf die Frakturheilung - Rolle der Monozyten**
-
- Poster:**
- Forschungskolloquium der Universität Tübingen (April 2016)
 - **THP-1/ Monozyten Überstand fördert die Funktion primärer humaner Osteoblasten – Relevanz für die diabetische Frakturheilung?**
-
- Journal Article**
- S. Ehnert, C. Linnemann, R.H. Aspera-Werz, D. Bykova, S. Biermann, L. Fecht, P.M. De Zwart, A.K. Nüssler (Juni 2018)
 - **Immune cell- induced migration of osteoprogenitor cells is mediated by TGF- β dependent upregulation of NOX4 and activation of focal adhesion kinase [120]**

13 Danksagung

Ich bedanke mich aufrichtig bei Dr. S. Ehnert für die Planung und Betreuung meiner Versuche und Unterstützung bei Fragen und Problemen. Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. A. Nüssler für die Leitung des Projektes.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Team des Siegfried-Weller-Institutes für die Unterstützung und die kollegiale Zusammenarbeit.

Für die Unterstützung des IZKF Promotionskollegs möchte ich mich auch herzlich bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Freunden, die mich in der Zeit meiner Promotion unterstützt und motiviert haben. Ganz besonders bedanke ich mich bei Frederike Fabian, Isabelle Grünwald, Johannes Birk, Marius Alexander Münch, Stefanie Ginster, Ann-Sophie Volle und Viktoria Müller.

Meiner Familie, Nicola, Peter, Kristina und Eva Biermann, möchte ich für jedes aufbauende und beratende Gespräch danken. Ihr habt mir die letzten Jahre unendlich viel Kraft gegeben, um dieses Studium und die Promotion zu meistern.

14 Anhang

14.1 Material und Geräte

14.1.1 Geräteliste

Gerät	Hersteller	Artikel-Nr.
Abzug Secuflow	WALDNER: Laboreinrichtungen	200/02895/300
Analysewaage ABJ 120-4M	KERN & Sohn	WB1140084
Chemilumineszenz-Immunoassay- Analysegerät Chemo Cam Imager 3.2	INTAS Science Imaging	
CO ₂ -Inkubator C-150 (37 °C, 5% CO ₂)	Binder	9040-0078
Fluoreszenzmikroskop EVOS	AMG	91-AF-4301
Gefrierschrank (-20 °C) Power Cooling Forma 900 Series	LIEBHERR	7081896-04
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific	827860-2521
Geldokumentationssystem	INTAS Science Imaging	
Kühlschrank/ Gefrier- Kombi (+4 °C/ -20 °C)	Liebherr	7081896-04
Laborwaage Kern PCB	KERN & Sohn	WD110036863
LVis Platte	BMG Labtech	0680B0001C
Mehrkanalpipette Lambda Plus (10- 50 µl, 20-200 µl)	Corning Incorporated	151820048 151630049
Mikrowelle	Severin	8068.0000
pH-Meter Five Easy FE20	Mettler Toledo	1232315296
Pipetten Lambda Plus (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Corning Incorporated	
Pipettierhilfe ROTA-Filler 3000		HS08348
plate reader FluoStar Omega	BMG Labtech	415-1264
Rothiphorese PROclamp MINISystem	Carl ROTH	3501.1
Spannungsmesser Power Pac 200	Bio Rad	285BR
Sterilbank Thermo Scientific Safe 2020	Thermo Scientific	51026934

Gerät	Hersteller	Artikel-Nr.
Thermoshaker TS-100	PeqlabBiosysteme	010120-1106-0186 & 010120-1103-0065
Tischzentrifuge Hereaus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific	41250019
Umkehrmikroskop Primo Vert	Carl Zeiss Microimaging	415510-1101-000
Vortexer	Corning	S1101243
Wasserbad AUQAline AL 25	LAUDA	LCB0727
Wippschüttler DRS-12	LTF Labortechnik	11DE090 & 11DE243
Zentrifuge HERAEUS MEGAFUGE 40R Centrifuge	Thermo Scientific	75004518

14.1.2 Materialienliste

Material	Hersteller	Artikel Nr.
0,2 ml Mikroreaktionsgefäß	Carl Roth	CH88.1 CH89.1 CH90.1
0,5 ml Mikroreaktionsgefäß	Sarstedt	72.699
1,5 ml Mikroreaktionsgefäß	Carl Roth	4209.1 4189.1
12-Well-Platte	Corning, Corning	3512
24-Well-Platte	Greinerbio-one,	662160
6-Well-Platte	Corning, Corning	353046
96-Well-Platte	Greiner bio-one	E14030HI
Drigalskispatel	Carl Roth	K732.1
Elektrische Pipettierhilfe	HS	HS08348
Falcontube (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one Sarstedt	188271 62.547.004
Glasflaschen (200 ml, 500 ml, 1000 ml)	Schott AG	
Handschuhe: Peha-soft nitrile, Purple nitrile Nitrilhandschuhe	Paul Hartmann	942207 52002M
Indikatorpapier Pehanon	Macherey-Nagel	904 17
Knopfkanüle	Eigene Konstruktion	
Kulturflaschen (T25, T75, T175)	Greiner bio-one Corning Greiner bio-one	660025 430641 660175
Nitrocellulose-Membran	Carl Roth	HP40.1

Material	Hersteller	Artikel Nr.
Pasteurpipette (150 mm, 230 mm)	Carl Roth	4518.1 4522.1
Petrischalen 100 x 20 mm	Greiner bio-one	664 160
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific Sarstedt Ratiolab	720011 70760 2100610
Spritzen (1 ml BD Plastipak, 10 ml, 20 ml, 50 ml Injectomat)	Becton Dickinson	300026 4606108V 4606205V 9000701
Sterilfilter	Millipore Ireland Ltd.	SLGPO33RS
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning	4487 4101 4489 4490
Whatman Paper	Carl Roth	CL67.1
Zellschaber	Corning	13312013

14.1.3 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller	Artikel-Nr.
10%iges Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich	A3678-25G
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.3
3,3'-Methylen-bis(4-hydroxycumarin) (Dicumarol)	Sigma Aldrich	M1390
30 % H ₂ O ₂ Solution	Carl Roth	CP26.5
4-Methylumbelliferon	Sigma Aldrich	M1381
4-Nitrophenylphosphat- dinatriumhexahydrat (pNPP)	Carl Roth	4165.1
5-(6)Carboxy-2'7'-dichlorofluorescein- diacetat (CFDA)	Sigma Aldrich	21884
5-Azacytidin	Sigma Aldrich	A7506
5-Carboxyfluorescein (5-CF)	Sigma Aldrich	86826
7-Benzoyloxy-4-trifluoromethylcoumarin	Sigma Aldrich	B5057
7-Ethoxycumarin	Sigma Aldrich	2644
7-Hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin	Sigma Aldrich	368512
7-Hydroxycumarin (Umbelliferon)	Sigma Aldrich	H24003
Acetaminophen	Sigma Aldrich	A5000
Acetonitril	Carl Roth	3620.1
Acrolein	Sigma Aldrich	01679

Anhang

Chemikalie	Hersteller	Artikel-Nr.
Agarose	Carl Roth	2267.1
AgNO ₃	Carl Roth	9370.1
Alginic acid sodium salt from brown algae, 2000 cp	Sigma Aldrich	A2033
Alizarin Rot S	Carl Roth	0348.2
Ammoniumchlorid	Carl Roth	K298.1
Antibiotikum/Antimykotikum-Stocklösung	PAA Pasching	P11-002
BSA (Bovine Serum Albumine)	Carl Roth	8076.4
Brom Phenol Blue	Carl Roth	A512.1
Collagenase II	PAA Pasching	K21-240
CuSO ₄ *5H ₂ O	Carl Roth	P024.1
ddH ₂ O	Carl Roth	3175.1
DEPC (Diethylenpyrocarbonat)	Carl Roth	K020.3
Desoxycholsäure (DOC)	Carl Roth	3484.1
Dexamethason	Sigma Aldrich	D2915
Dibenzylfluorescein	Sigma Aldrich	D7191
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth	4720.2
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma Aldrich	D5796
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	Sigma Aldrich	D8537
EDTA	Carl Roth	8043.2
Essigsäure	Carl Roth	3738.4
Ethanol 99.9%	SAV	ETO-5000-99-1
Ethidiumbromidlösung 1 % in Wasser	Carl Roth	2218.1
Ethidiumhomodimer	Sigma Aldrich	46043
FBS (South American)	Invitrogen	41G3510K
FCS	Invitrogen	41G7141K
Fetal bovine/calw serum (FCS); hitzeinaktiviert	Invitrogen	41G7141K
Fluorescein	Sigma Aldrich	46955
Folinreagenz	Sigma Aldrich	F9252
Formaldehydlösung 37 % p.a.	Carl Roth	4979.1
Glukose (D-(+))	Sigma Aldrich	G7021
Glukoseoxidase	Sigma Aldrich	G6125-10kU
Glycerol	Carl Roth	7530.1
Glycine	Carl Roth	3908.2
Ham's F12	Sigma Aldrich	21765-037
Hepes	Sigma Aldrich	H3375
Humanes Insulin	Novo Nordisk	
Humanes Insulin (Actrapid Flex Pen)	Apotheke des UKT	
Hydrocortison	Pfizer	
Isopropanol	VWR	20842.330

Anhang

Chemikalie	Hersteller	Artikel-Nr.
IST	Sigma Aldrich	I3146
Kaliumchlorid	Carl Roth	HN02.2
Kupfersulfat*5 H ₂ O	Carl Roth	P024.1
L-Ascorbinsäure	Sigma Aldrich	A2385
Leupeptin	Carl Roth	CN33.2
L-Glutamin	Sigma Aldrich	R8758
L-Ornithin	Sigma Aldrich	O2375
LSM 1077 (Lymphocyte Separation Medium)	PAA	J15-004
Luminol	Carl Roth	4203.1
Magnesiumchlorid	Carl Roth	KK36.2
Mannitol	Carl Roth	4175.1
MEM Earle's	Sigma Aldrich	M4655
Methanol	Carl Roth	8355.5
MgCl ₂	Carl Roth	KK36.2
N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid	Carl Roth	4342.1
N,N,N',N' - TEMED	Carl Roth	2367.1
Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma Aldrich	72049
Na ₃ VO ₄	Carl Roth	0735.1
NaOH (2M) Natronlauge	Carl Roth	T135.1
Natriumacetat	Carl Roth	X891.2
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth	P028.1
Natriumchlorid (NaCl)	VWR	27.810.295
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth	P756.1
Natrium-Kalium-Tartrat	Sigma Aldrich	S2377
Natrium-L-Lactat	Sigma Aldrich	71718-10G
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich	S6508-10G
Natrium-Pyruvat-Lösung (100 mM)	Sigma Aldrich	S11-003/S8636
Natriumthiosulfat	Carl Roth	HN25.2
Nicotinamid	Sigma Aldrich	72340
O-Phthalaldehyd	Sigma Aldrich	P1378
p-Coumarinsäure	Carl Roth	9908.1
Penicillin/ Streptomycin	Sigma Aldrich	P0781
Pepstatin A	Sigma Aldrich	P4265-5MG
Peroxidase	Sigma Aldrich	P8250-5kU
Phalloidin	Sigma Aldrich	P2141-1MG
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth	6367.1
Ponceau S	Carl Roth	5938.1
Resazurin	Sigma Aldrich	199303
Rhodamin 123	Sigma Aldrich	83702
Salicylamid	Sigma Aldrich	84230
Salzsäure (HCl) 2 M	Carl Roth	T134.1
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth	X873.1

Chemikalie	Hersteller	Artikel-Nr.
SDS	Carl Roth	CN30.2
Tergitol-Lösung	Sigma Aldrich	NP40S-100ml
TriFast (peqGold)	Peqlab	30-2020
TRIS (hydroxymehtyl) aminomethan	Carl Roth	AE15.1
TRIS-Base	Sigma Aldrich	T1503
Trypanblau 0,5%	Carl Roth	CN76.1
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich	T3924
Tween-20	Sigma Aldrich	P1378-1L
Wasserstoffperoxid (30 % H ₂ O ₂)	Carl Roth	CP26.5

14.1.4 Antikörper und Kits

Name	Hersteller	Artikel-Nr.
Anti-Mouse IgG HRP-linked Antibody	Santa Cruz Biotechnology	7076
Anti-PCNA antibody	Abcam	Ab92552
Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody	Santa Cruz Biotechnology	7074
GAPDH Antikörper	Sigma Aldrich	G9545
Goat anti-mouse IgM	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2064
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2004
Human Cytokine Antibody Array C5	RayBiotech	AAH-CYT-5-8
Human IL-6 ELISA Kit	Sigma Aldrich	RAB0306
Ki-67 (M-19)	Santa Cruz Biotechnology	sc-7846
PathScan® „Intracellular Signaling Array“Kit	Cell Signaling	7323
Phospho-p44/42 (erk ½) Antikörper	Cell Signaling	4370
Phosphor-SAPK/JNK Antikörper	Cell Signaling	4668
Phspho-p38 MAPK Antikörper	Cell Signaling	4511
Roti-Mark BICOLOR	Carl Roth	2086.1
SB203580 (p23 Inhibitor)	Cell Signaling	5633
U0126 (MEK ½ Inhibitor)	Cell Signaling	9903
Vivaspin 6	Sartorius	VS0671

14.1.5 Softwareliste

Programm	Name	Anwendung
Endnote X8	Japone/Team LnDL, Thomas Reuters	Zitation
GraphPadPrism5	GraphPadPrism5	Statistische Auswertung und graphische Darstellung
ImageJ	Image Processing and Analysis in Java	Bildauswertung
Microsoft Office 2010	Microsoft Word Microsoft Excel Microsoft PowerPoint	Textgestaltung, Datenauswertung, Abbildungsgestaltung
Omega 1.3	BMG Labtech	Messung der Absorption/ Fluoreszenz

14.2 Lizenzen für Abbildungen

14.2.1 Lizenz für Abbildung 1:

Schematischer Überblick der Veränderungen während der Knochenreifung aus „Hyperinsulinemia reduces osteoblast activity in vitro via upregulation of TGF-beta“ [9]

- Lizenz erteilt durch Dr. S. Ehnert am 22.08.2018

14.2.2 Lizenz für Abbildung 2:

Schematische Darstellung des Knochenstoffwechsels aus Scharla S. 426-e Paget-Krankheit und andere Knochendysplasien. In: Suttrop N, Möckel M, Siegmund B *et al.*, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Auflage. ABW Wissenschaftsverlag; 2016.4

- Lizenz erteilt, durch Stephanie Säger, ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin, 04.06.2019

Sehr geehrte Frau Biermann,

bitte entschuldigen Sie die urlaubsbedingt verzögerte Rückmeldung.
Handelt es sich um die Abbildung 426e-1, Schematische Darstellung von Einflussfaktoren auf Differenzierung und Funktion der Osteoklasten und Osteoblasten und Bedeutung des RANK-Signalweges? Gern können Sie diese Abbildung unter Angabe der vollständigen Quelle in Ihrer Doktorarbeit verwenden.

Wir wünschen Ihnen viel Erfolg und alles Gute für Ihre Arbeit.

Mit den besten Grüßen,
Stephanie Sängler

ABW Wissenschaftsverlag GmbH
Altensteinstraße 42
14195 Berlin-Dahlem

i. A.
Stephanie Sängler
Vertrieb / Marketing / Projektmanagement

Tel.: +49 30 308 316 30
Fax: +49 30 308 316 79
E-Mail: stephanie.saenger@abw-verlag.de
Internet: www.abw-verlag.de

Geschäftsführender Gesellschafter: Dr. med. Axel Bedürftig
AG Charlottenburg HRB 80400

14.2.3 Lizenz für Abbildung 3:

Schematische Darstellung der Schritte in der sekundären Frakturheilung
Schematische Darstellung von Dr. S. Ehnert; Bildmaterial aus dem Siegfried-Weller-Institut der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen und Graphiken von <https://smart.servier.com/> (Open Access)

- Lizenz erteilt durch Dr. S. Ehnert am 22.08.2018

14.2.4 Lizenz für Abbildung 4:

Modell der frühen Inflammatorischen Phase im Frakturspalt aus „Low-dose TNF augments fracture healing in normal and osteoporotic bone by up-regulating the innate immune response“ [12]

- Graphik im Rahmen Open Access frei verfügbar
- <http://embomolmed.embopress.org/content/7/5/547.long>
(20.03.2019)

14.2.5 Lizenz für Abbildung 5:

Zytokinprofil im Serum von Kontrollpatienten, Prädiabetikern und T2DM-Patienten: Das Level an MCP-2 im Serum von T2DM Patienten ist deutlich verringert. Aus der Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades von Larissa Mayer, Universität Tübingen

- Lizenz erteilt durch Dr. S. Ehnert am 22.08.2018

Alle weiteren Abbildungen wurden eigenständig Hergestellt.

14.3 Bildanhang

14.3.1 Bildanhang: Beispielhafte Standardkurve zur Berechnung der AP-Aktivität

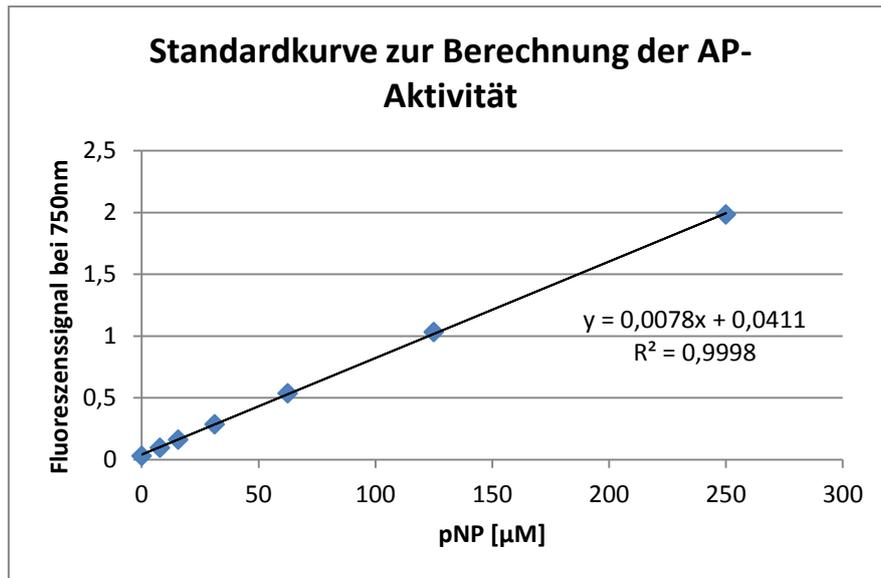


Abbildung 27: Beispielhafte Standardkurve zur Berechnung der AP-Aktivität

Auf der x-Achse wurden die Konzentrationen von pNP [μM] angegeben. Diese wurden auf der y-Achse den Mittelwerten ($n=3$) des gemessenen Fluoreszenzsignals zugeordnet. Eine Trendline wurde ermittelt und die Funktion zur weiteren Berechnung oben dargestellt.

14.3.2 Bildanhang: Beispielhafte Standardkurve für die Proteinmessung nach Lowry

In Abbildung 28 ist eine beispielhafte Standardkurve für die Proteinmessung nach Lowry graphisch dargestellt. Eine Messung nach Lowry wurde für jeden Versuch erneut durchgeführt.

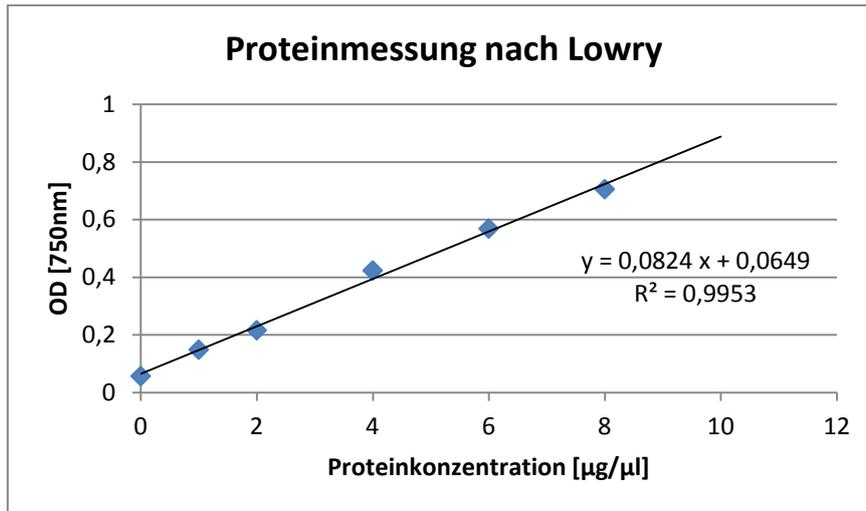


Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung einer Standardkurve für die Proteinmessung nach Lowry
Die Proteinkonzentration von BSA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$] wurde den Mittelwerten ($n = 3$) der gemessenen optischen Dichte bei 750 nm zugeordnet. Die Funktion der Trendline ($y = 0,0824 x + 0,0649$) wurde zur Berechnung der benötigten Proteinkonzentrationen hinzugezogen.

14.3.3 Bildanhang: Der Überstand monozytärer Zellen fördert die Migration von phOB

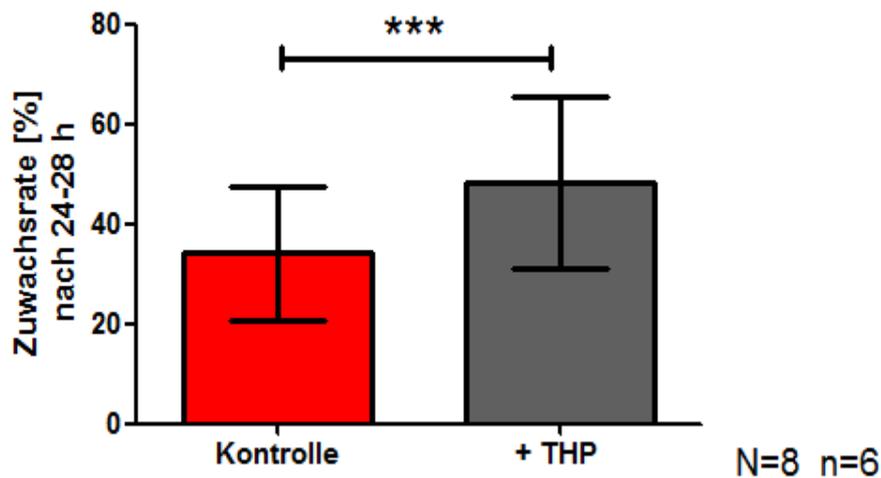


Abbildung 29: Signifikante Zunahme der Zuwachsrate im „Scratch Assay“ durch Zugabe von THP-1-Überstand

Das „Scratch Assay“ wurde mit phOB, die mit THP-1-Überstand oder RPMI-Medium (Kontrolle) stimuliert wurden, durchgeführt ($N=8$, $n=6$). Im Vergleich zur Kontrolle konnte eine signifikant ($***p < 0.001$) größere prozentuale Zuwachsrate in 24-28 h des *in vitro* Frakturspalts (scratch assay) bei phOB beobachtet werden, die mit dem Überstand von THP-1-Zellen (+THP) stimuliert wurden.

14.3.4 Bildanhang: Einfluss von PBMC-Überstand auf phOB

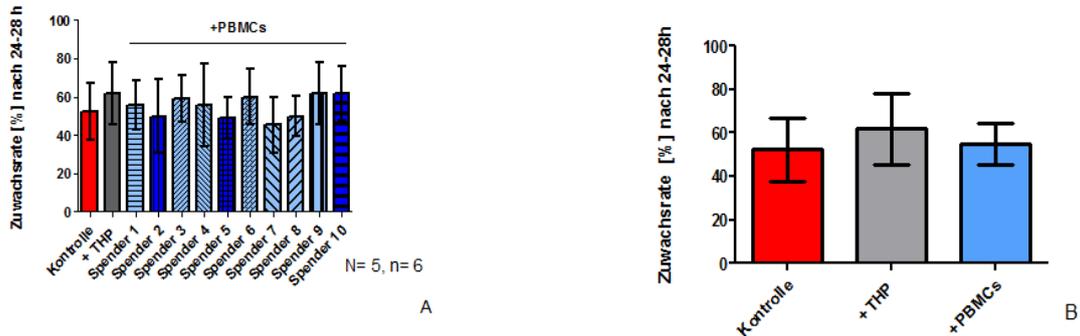


Abbildung 30: Prozentuale Zuwachsrates der humanen Osteoblasten im „Scratch Assay“ bei Stimulation mit THP-1-Überstand oder PBMC –Überstand gesunder Kontrollprobanden

(A) „Scratch Assays“ wurden mit phOB durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Überstand von THP-1 Zellen sowie dem Überstand von 24 h kultivierten PBMCs von gesunden Kontrollprobanden (hellblau weiblich (N=7), blau männlich (N=3)) stimuliert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsbedingungen gezeigt werden. (B) Zusammenfassung der Ergebnisse des „Scratch Assays“ mit stimulierten Osteoblasten mit Überstand von PBMCs und THP-1 Zellen ohne signifikante Unterschiede (N=5; n=6).

14.3.5 Bildanhang: Mannitol zeigt keinen Einfluss auf die Funktion humaner Osteoblasten

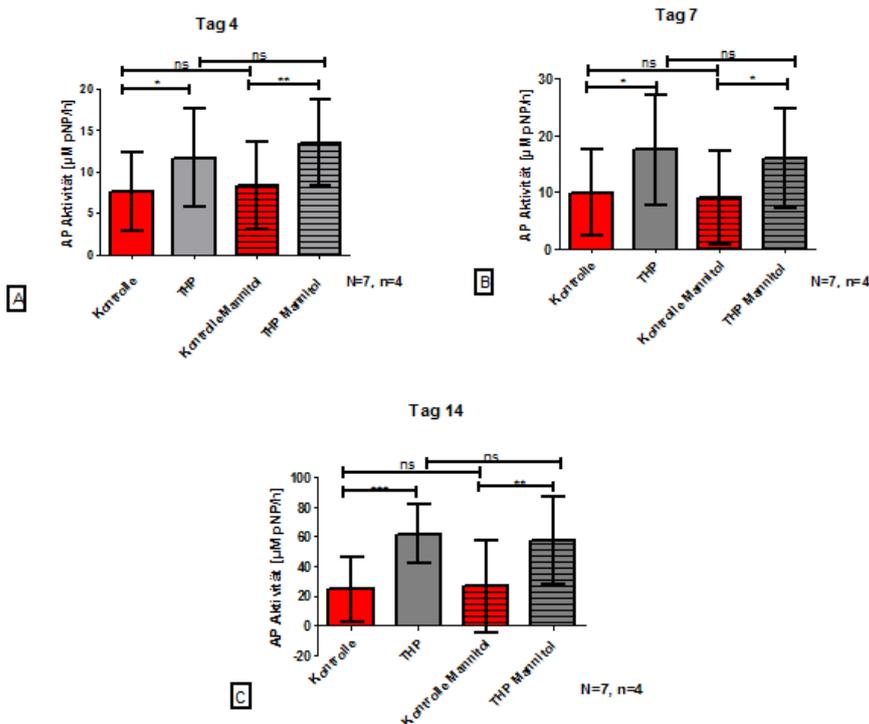
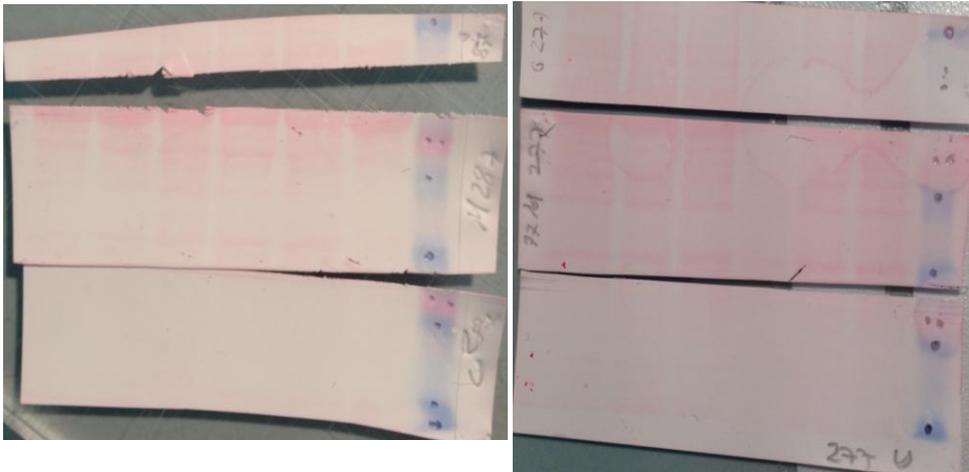


Abbildung 31: osmolare Aktivität von Mannitol verschlechtert nicht den Einfluss auf die AP-Aktivität bei Stimulation der phOB mit THP-1-Überstand

PhOB wurden über 4 (A), 7 (B) und 14 (C) Tage differenziert. Der Einfluss auf die osteogene Differenzierung wurde durch Messung der AP-Aktivität analysiert. Die Zugabe des THP-1-Überstandes wirkt sich sowohl unter Normalbedingungen sowie durch Zugabe von Mannitol (4,5 g/l) und der damit einhergehenden Veränderung der Osmolarität, signifikant (*p < 0,05; **p < 0,001 ***p < 0,0001) positiv auf die Funktion der Osteoblasten aus. (N=7; n=4)

14.3.6 Bildanhang: Regelmäßige Ponceau-Färbung bei Westernblots



14.3.7 Bildanhang: Aktivierung von Bad, p38 und Erk1/2 durch SB 203580 und U0126

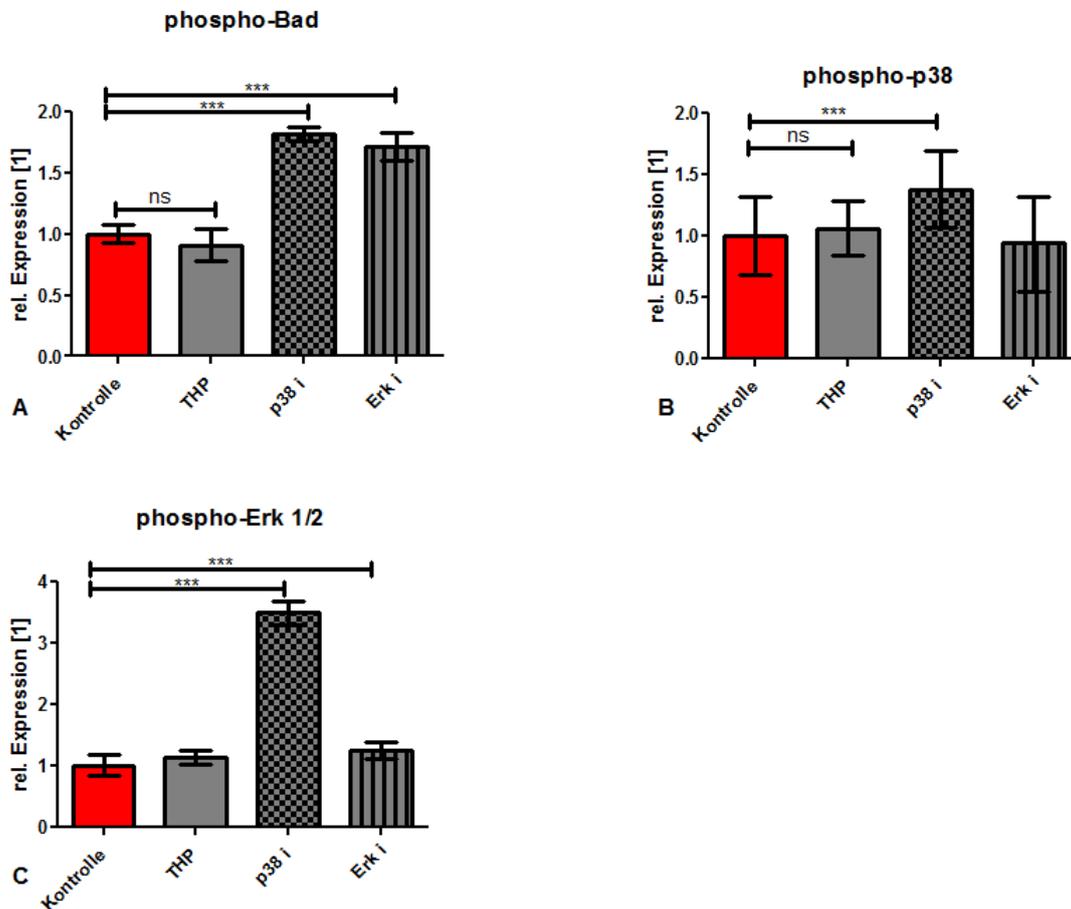


Abbildung 32: Aktivierung von Erk 1/2, p38 und Bad nach Stimulation primärer Osteoblasten mit SB 203580 und U0126

PhOB wurden mit SB 203580 (p38) und U0126 (Erk) und dem Überstand von THP-1 Zellen stimuliert. Die relative Expression des proapoptotischen Signalproteins phospho-Bad war im Vergleich zur Kontrolle und Zusatz von THP-1-Überstand signifikant erhöht (A). Durch den Zusatz des p38-Inhibitors SB 203580 konnte die relative Expression von phospho-p38 nicht unterdrückt werden. Diese war signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (B). Des Weiteren konnte der Zusatz von SB 203580 und U0126 die relative Expression von phospho-Erk1/2 nicht unterdrücken. Die relative Expression von phospho-Erk1/2 stieg bei Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB 203580 signifikant an. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ (N=7; n=2)

14.3.8 Bildanhang: Spendervariabilität bei Stimulation der phOB mit Fraktionen des THP-1-Überstandes

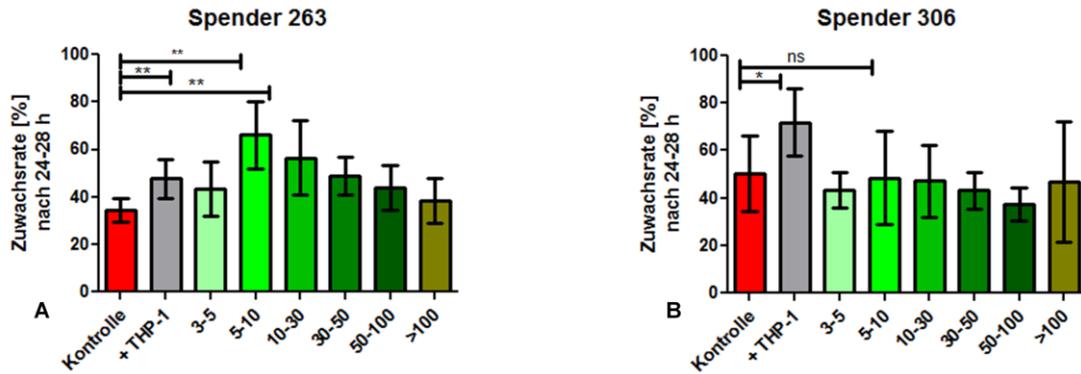


Abbildung 33: Einfluss der unterschiedlichen Fraktionen des THP-1 Überstandes auf die prozentuale Zuwachsrate im „Scratch Assay“

PhOB des Spenders 263 (A) und 306 (B) wurden mit den unterschiedlichen, durch Vivaspin® 6 dichte-zentrifugierten Fraktionen, des Überstandes von THP-1 Zellen stimuliert und das „Scratch Assay“ durchgeführt. Dabei vielen extreme Spendervariabilitäten aus, die hier nur exemplarisch dargestellt wurden.

14.3.9 Bildanhang: Trennung in vorgegebene Proteinfractionen konnte durch Gelelektrophorese und Silberfärbung nicht gezeigt werden

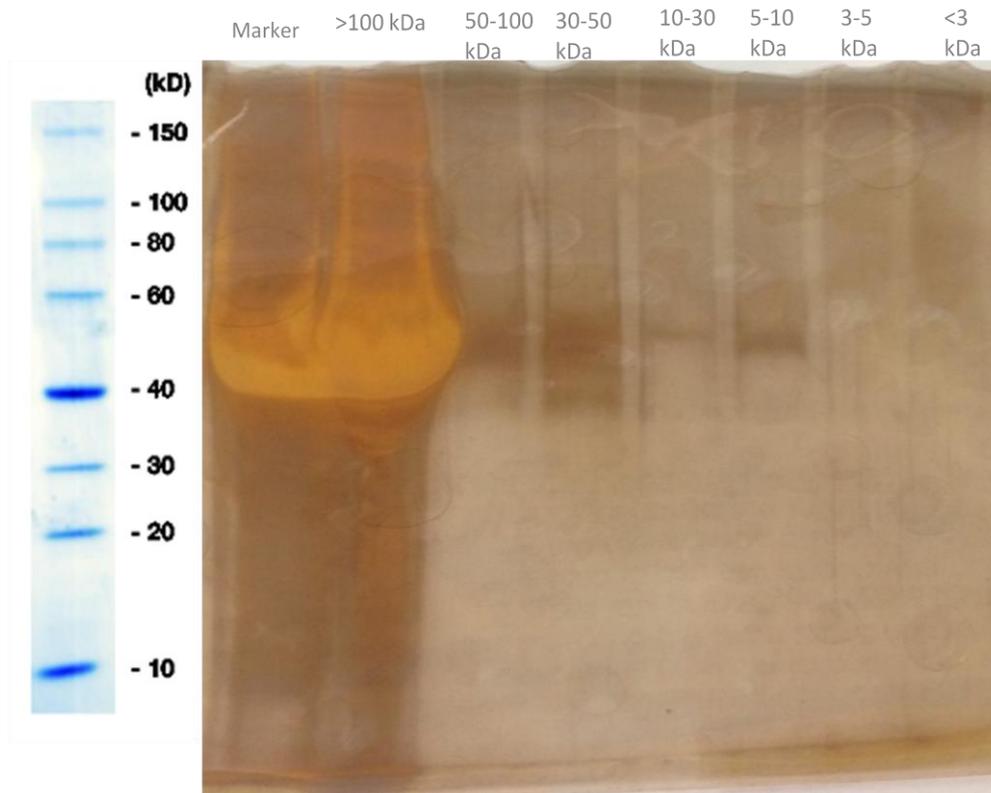
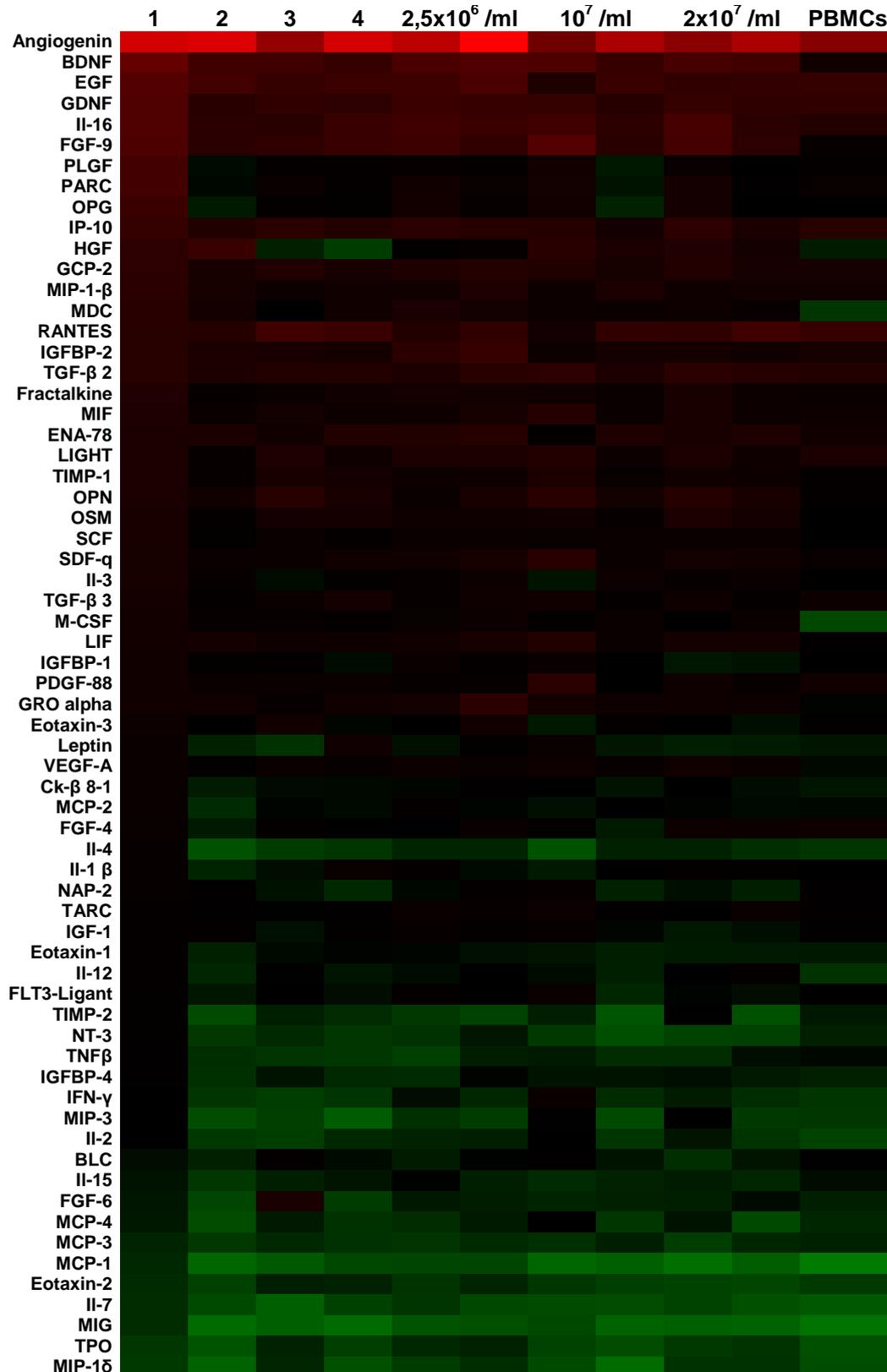


Abbildung 34: Keine gelelektrophoretische Trennung der Fraktionen des THP-1-Überstand

Der Überstand von THP-1-Zellen wird mittels Vivaspin® 6 von Sartorius in unterschiedliche Proteinfractionen getrennt. Die Fraktionen sowie der Roti-Mark BICOLOR [203] werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Silbernitratfärbung nach Mortz et al. sichtbar gemacht. Die Proteinfraction > 100 kDa zeigt Proteinbanden im gesamten Bereich des SDS-Gels. Sowohl die Fraktionen 100-50 kDa, als auch die Fraktionen 50-30, 30 -10 und 10-5 kDa zeigen lediglich eine Proteinbande zwischen bei 50 kDa. Die Fraktionen 3-5 kDa und < 3 kDa zeigen überhaupt keine gefärbten Proteinbanden.

14.3.10 Bildanhang: Expression der Zytokine aus monozytären Zellen ist unabhängig von Kultivierungszeitpunkt und Zellzahl



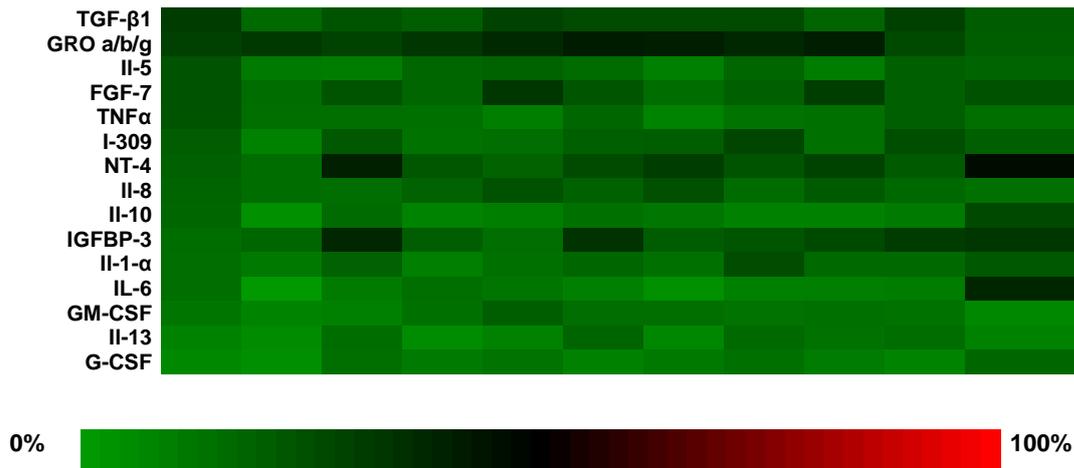


Abbildung 35: Zytokinexpression in den Überständen von THP-1-Zellen und PBMCs:

Das „human Cytokin Array“ wurde mit den Überständen von THP-1-Zellen sowie Überständen von PBMCs gesunder Kontrollprobanden durchgeführt. Die relative Zytokinexpression wurde im Vergleich zur Positivkontrolle ermittelt und als Heatmap graphisch dargestellt. Es zeigte sich eine geringe Expression von u.a. IL-6, TNF- α und TGF- β_1 in allen untersuchten Zellüberständen. In allen Überständen lässt sich ein hohes Level an u.a. Angiogenin, BDNF, IL-16, RANTES, EGF, GDNF und TGF- β_2 detektieren. Die Expression der untersuchten Überstände (Probe 1-4) ist, abgesehen von wenigen Ausreißern, sehr ähnlich.

Die Überstände 3 und 4 der THP-1-Zellen zeigen, ebenso wie die untersuchten PBMCs, eine geringere relative Expression von HGF (Hepatocyte growth factor). Ebenfalls fiel eine geringere relative Expression von OPG, PLGF und PARC bei Überstand 2 und den THP-1-Zellen mit 10^7 Zellen/ml. PBMCs zeigten eine relative Expression von MDC und M-CSF. Des Weiteren gab es Unterschiede in der relativen Expression von Leptin bei den untersuchten Überständen. IL-4 wurde in Überstand 1 vermehrt exprimiert. Ähnliche Schwankungen gab es bei IL-2, MIP3 (Macrophage Inflammatory Protein-3) TNF- β (Tumor Nekrose Faktor- β), TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2) und NT-3 (Neurotrophin-3).

Die relative Expression von NT-4 (Neurotrophin-4) und IGFBP-3 war in den Überständen 3 und bei PBMCs höher.