

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINSATZ VON MONOZYTEN
IN DER KNOCHENHEILUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Buschner, Peter Thomas Martin

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. A. K. Nüssler
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. M. Krimmel

Meinen Eltern und Sandra

INHALT

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS/GLOSSAR	12
<hr/>		
II.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	19
<hr/>		
A	ALLGEMEINE EINLEITUNG	22
<hr/>		
B	EINLEITUNG	23
<hr/>		
B 1	STAMMZELLEN	23
B 1.1	Allgemeine Eigenschaften	23
B 1.2	Totipotente Stammzellen	26
B 1.3	Pluripotente Stammzellen	27
B 1.4	Adulte Stammzellen	28
B 1.5	Adulte Stammzellen des Knochenmarks	29
B 1.5.1	Hämatopoetische Stammzellen	29
B 1.5.2	Mesenchymale Stammzellen	31
B 1.6	Gewebeständige, adulte Stammzellen	33
B 1.7	Epigenetische Reprogrammierung	33
B 1.7.1	Zellkerntransfer	33
B 1.7.2	Zellfusion und Zellextrakt	34
B 1.7.3	Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs)	35
B 1.8	Stammzellnische	37
B 2	KNOCHEN	39

B 2.1	Anatomische Grundlagen	39
B 2.2	Knochenzusammensetzung	43
B 2.2.1	Zellformen	43
B 2.2.1.1	<i>Osteoblasten</i>	44
B 2.2.1.2	<i>Osteoklasten</i>	44
B 2.2.1.3	<i>Lining-Zellen</i>	46
B 2.2.2	Extrazelluläre Matrix	46
B 2.3	Knochenbildung	47
B 2.3.1	Embryonale Aspekte der Skelettentwicklung	47
B 2.3.2	Chondrale Ossifikation	47
B 2.3.3	Desmale Ossifikation	49
B 2.3.4	Knochenwachstum langer Röhrenknochen	50
B 2.4	Frakturheilung	51
B 2.4.1	Indirekte (sekundäre) Knochenheilung	52
B 2.4.2	Direkte (primäre) Knochenheilung	55
B 2.5	Knochenplastizität	56
B 2.6	Knochenresorption	57
B 2.7	Regulation des Knochenumbaus	59
B 3	TISSUE ENGINEERING	60
B 3.1	Begriffserklärung	60
B 3.2	Historisches	60
B 3.3	Knochentransplantate	61
B 3.3.1	Autologe Knochentransplantate	61
B 3.3.2	Allogene Knochentransplantate	61
B 3.4	Knochenersatzmaterialien	62

B 3.5	Zellvermittelte Strategien	63
B 4	MONOZYTEN	64
B 4.1	Allgemeines	64
B 4.2	Monozyten als Stammzellen	66
C	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	69
<hr/>		
D	MATERIAL UND METHODEN	71
<hr/>		
D 1	MATERIAL	71
D 1.1	Verwendete Geräte	71
D 1.2	Verbrauchsmaterialien	72
D 1.3	Chemikalien	73
D 1.4	Nährmedien und Zusätze	76
D 1.5	Verwendete Kits	78
D 1.6	Zytokine	78
D 1.7	Antikörper	79
D 1.8	Lösungen und Puffer	80
D 1.9	Kulturmedien	87
D 1.10	Software	90

D 2	METHODEN	90
D 2.1	Isolation und Kultivierung von humanen Osteoblasten	90
D 2.2	Isolation von humanen MSCs aus dem Knochenmark	91
D 2.3	Isolation und Kultivierung von Monozyten aus dem peripheren, venösen Vollblut	92
D 2.4	Passagieren von Zellen	93
D 2.5	Zellzahlbestimmung	93
D 2.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen	94
D 2.7	Generierung von MOMP_s aus Monozyten aus dem peripheren Vollblut	95
D 2.8	Generierung von PCMO_s aus Monozyten aus dem peripheren Vollblut	96
D 2.9	Osteogene Stimulation von humanen Osteoblasten	96
D 2.10	Osteogene Differenzierung von MOMP_s, PCMO_s und MSC_s	96
D 2.11	Adipogene Differenzierung von MSC_s	97
D 2.12	Reifung von Monozyten zu Makrophagen	97
D 2.13	Reifung von Monozyten zu Osteoklasten	97
D 2.14	AP-Aktivität	98
D 2.15	AP-Färbung	99
D 2.16	Alizarin Rot-Färbung	100
D 2.17	van Kossa-Färbung	101

D 2.18	Oil Red O-Färbung	102
D 2.19	TRAP-Färbung	102
D 2.20	Sulforhodamin B (SRB)-Färbung	103
D 2.21	Immunhistochemische Färbung	104
B 2.22	TGF-β-Bioassay mit MFB-F11-Zellen	105
D 2.23	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	107
D 2.24	AlamarBlue[®]-Test	108
D 2.25	RNA-Isolation	109
D 2.26	Erststrang-cDNA-Herstellung	110
D 2.27	Konventionelle RT-PCR	111
D 2.28	Gelelektrophorese	112
D 2.29	Durchflusszytometrie (FACS[®]-Analyse)	113
D 3	STATISTIK	115
D 4	ETHISCHE ERKLÄRUNG	115
E	ERGEBNISSE	116
<hr/>		
E 1	VORVERSUCHE	116
E 1.1	Proliferationskapazität von Monozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen	116
E 1.2	Einfluss des verwendeten Serums auf die Zellviabilität	118

E 1.3	Zelltoxizität von Dexamethason	119
E 1.4	Charakterisierung von Osteoblasten mittels AP- und van Kossa-Färbung	120
E 1.5	Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen durch osteogene und adipogene Differenzierung	121
E 2	ZELLVIABILITÄT VON MOMP_s UND PCMO_s	122
E 3	PHÄNOTYPISIERUNG	123
E 3.1	Zellmorphologie nach sechstägiger Kultivierung	123
E 3.2	Expression von Phänotypisierungsmarkern	124
E 3.2.1	Expression von CD 14, 45, 90 und 105	124
E 3.2.2	Expression von CD 34	126
E 3.2.3	Expression von CD 68	128
E 3.2.4	Aktivierung des Kollagen I-Genes	129
E 3.3	Funktionstestung	131
E 3.3.1	AP-Aktivität	131
E 3.3.2	Produktion extrazellulärer Matrix	133
E 3.4	Expression von Transkriptionsfaktoren	135
E 3.4.1	RUNX-2-Expression	135
E 3.4.2	Osterix-Expression	137
E 4	GENEXPRESSIONSPROFIL UNTERSCHIEDLICHER VOR- UND DIFFERENZIERUNGSBEHANDLUNGEN	139
E 5	ZELLMORPHOLOGIE NACH DIFFERENZIERUNGSBEHANDLUNG	140
E 6	CHARAKTERISIERUNG VON RIESENZELLEN	141
E 7	AP-AKTIVITÄT VON MAKROPHAGEN UND OSTEOKLASTEN	142

E 8	AP-AKTIVITÄT NACH AKTIVIERUNG VON MONOZYTEN	143
F	ZUSAMMENFASSUNG I (ERGEBNISSE)	145
<hr/>		
F 1	PROLIFERATIONSVERHALTEN	145
F 2	VERGLEICHBARER PHÄNOTYP	145
F 3	EINFLUSS DER DIFFERENZIERUNGSBEHANDLUNG	145
F 4	PERSISTENZ HÄMATOPOETISCHER OBERFLÄCHEN- MARKER IM RAHMEN DER DIFFERENZIERUNGS- BEHANDLUNG	146
F 5	STEIGERUNG DER AP-AKTIVITÄT IM RAHMEN DER MONOZYTEN-AKTIVIERUNG	146
G	DISKUSSION	147
<hr/>		
G 1	TRANSDIFFERENZIERUNG UND STAMMZELLCHARAKTER	147
G 2	SPONTANE DEDIFFERENZIERUNG	149
G 3	ÜBERGEORDNETE KONTROLLGENE	150
G 4	OSTEOKLASTÄRE DIFFERENZIERUNG	150
G 5	UNSPECIFISCHE MARKERGENEXPRESSION	151
G 6	AP-EXPRESSION UND -AKTIVITÄT IM RAHMEN DER MONOZYTÄREN REIFUNG	152
G 7	EINFLUSS VON DEXAMETHASON UND VITAMIN D	152

G 8	EINFLUSS VON AUTOLOGEM SERUM AUF DIE OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG	153
G 9	PROBLEM DER CHARAKTERISIERUNG MITTELS OBERFLÄCHENMARKER	153
H	ZUSAMMENFASSUNG II/AUSBLICK	155
<hr/>		
I	LITERATURANGABEN	157
<hr/>		
J	ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL	181
<hr/>		
K	DANKSAGUNG	182
<hr/>		

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS/GLOSSAR

A	Adenin
ABTS	2,2´-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Ad-MSC	<i>Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell</i>
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
ALK5	<i>Activin-like kinase 5</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
Asp	Asparaginsäure
ATPase	Adenosintriphosphatase
BBC	<i>British Broadcasting Corporation</i>
BM-MSC	<i>Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMU	<i>Basic Multicellular Unit</i>
bp	Basenpaare
BRC	<i>Bone Remodeling Compartment</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
CA	<i>California</i>
[Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]	Summenformel Hydroxylapatit
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
c-Fms	<i>Colony-stimulating Factor-1 receptor</i>
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
CFU-F	<i>Colony-Forming Unit - Fibroblast</i>
cm²	Quadratzentimeter

cm³	Kubikzentimeter
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
c-Myc	Protoonkogen cMyc
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CSF-1	<i>Colony-Stimulating Factor-1</i>
CXCR-4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBM	<i>Demineralised Bone Matrix</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
ddH₂O	<i>double distilled water</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dex	Dexamethason
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsuloxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGC	<i>Embryonic Germ Cell</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	Englisch
EpiSC	<i>Epiblast-derived Stem Cell</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ESC	<i>Embryonic Stem Cell</i>
et al.	<i>et alii bzw. et aliae</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibronektin
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung

G	Guanin
Gal-1	Galectin-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GMP	<i>Granulocyte Macrophage Progenitor</i>
GP	Glycerophosphat
gp 130	Glykoprotein 130
GTPase	Guanosintriphosphatase
GvHR	<i>Graft-versus-Host-Reaktion</i>
H	Wasserstoff
HA	Hydroxylapatit
HAM's F-12	Aminosäurereiches Kulturmedium
H⁺-ATPase	Protonenpumpe
HCl	Salzsäure
HCO₃⁻	Hydrogencarbonat (Bicarbonat)
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
hESC	<i>human Embryonic Stem Cell</i>
HEGF	<i>Human Epidermal Growth Factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
Hif1α	<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
H3K4me	Dreifachmethylierung des vierten N-terminalen Lysinrestes des Histons 3
HLA	Humanes Leukozytenantigen
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSC	<i>Haematopoietic Stem Cell</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IDO	Indoleamin 2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon gamma
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IHh	<i>Indian Hedgehog</i>
IL	Interleukin

IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
Inc.	<i>Incorporated</i>
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
iPSC	<i>induced Pluripotent Stem Cell</i>
IZM	Innere Zellmasse
JAK	Janus-Kinase
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
kb	Kilobase
Klf4	Krüppel-like factor 4
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LL-37	Cathelicidin LL-37
LSM	<i>Lymphocyte Separation Medium</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MPS	Mononukleäres Phagozytierendes System
MAD	<i>Mother Against Decapentaplegic</i>
maGSC	<i>multipotent adult Germline Stem Cell</i>
MAPC	<i>Multipotent Adult Progenitor Cell</i>
MAPK	Mitogen-Aktivierte Proteinkinase
M-CSF	<i>Monocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MDP	Macrophage/Dendritic Cell Progenitor
MDSC	<i>Muscle-Derived Stem Cell</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
Mesen.	Mesenchym
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
μg	Mikrogramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MGP	<i>Matrix Gla Protein</i>
miRNA	Mikro-RNA
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar

mol	Mol
µmol	Mikromol
M-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MOMP	<i>Monocyte-derived Mesenchymal Progenitor</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MW	Molekulargewicht
naBMC	<i>non-adherent Bone Marrow Cell</i>
Nanog	<i>Nanog homeobox</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NCC	<i>Neural Crest Cell</i>
NeoHeps	<i>Monocyte-derived hepatocyte-like cells</i>
NFATc1	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NIH	<i>National Institute of Health</i>
nm	Nanometer
4NPP	4-Nitrophenylphosphat
4NP	4-Nitrophenol
NSC	<i>Neural Stem Cell</i>
O	Sauerstoff
Oct-4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
ODF	<i>Osteoclast Differentiation Factor</i>
o. g.	oben genannt
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand
OR	<i>Oregon</i>
ORIF	<i>Open Reduction Internal Fixation</i>
OSF	<i>Osteoblast-Specific Factor 2</i>
p	p-Wert (Signifikanzniveau)
P	Phosphor/Phosphat
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PCMO	<i>Programmable Cell of Monocytic Origin</i>
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PGA	<i>Polyglycolic Acid</i>
PGE2	Prostaglandin E2
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
piPSC	<i>protein-induced Pluripotent Stem Cell</i>
PLA	Polylactid
PLDL	Poly-L-Co-D, L-Lactid
PLLA	Poly-L-Lactid
pNP	para-Nitrophenol
pNPP	para-Nitrophenyl-Dinatriumsalz-Hexahydrat
PNS	Peripheres Nervensystem
PUR	Polyurethan
RANK	<i>Receptor Activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RGD	Arginin, Glycin, Asparaginsäure
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RUNX-2	<i>Run-related transcription factor 2</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor 1</i>
SEAP	<i>Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Sma	<i>Small body size-Gen</i>
Smad	siehe Sma und MAD
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion Attachment protein Receptor</i>
sog.	sogenannt
Sox2	<i>(Sex-determining region Y)-box 2</i>
sRANK	<i>soluble RANK</i>
SRB	Sulforhodamin B
SSC	<i>Skeletal Stem Cell</i>

SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STRO-1	Mesenchymaler Stammzellmarker STRO-1
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SVZ	Subventrikuläre Zone
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCP	Tricalciumphosphat
β-TCP	beta-Tricalciumphosphat
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRANCE	<i>TNF-Related Activation-induced Cytokine</i>
TRAP	<i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG-6	<i>TNF-Stimulated Gene 6 protein</i>
TU	Technische Universität
U	<i>Units</i>
USA	<i>United States of America</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt	<i>Wingless/Int-1</i>
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung B_1	Entwicklungsmöglichkeiten der Stammzelle.....	24
Abbildung B_2	Kontrolle der asymmetrischen Zellteilung (Hypothesen).....	25
Abbildung B_3	Ursprung pluripotenter Stammzellen	28
Abbildung B_4	Stammzellhierarchie.....	29
Abbildung B_5	Abstammungslinien der hämatopoetischen Stammzelle.....	31
Abbildung B_6	Zellkerntansfer.....	34
Abbildung B_7	Zellfusion A. und Zellextrakt B.	35
Abbildung B_8	Induzierte pluripotente Stammzelle (iPSC)	36
Abbildung B_9	Aufbau und Komponenten der Stammzellnische	38
Abbildung B_10	Schematische Darstellung der Knocheneinteilung nach der Form.....	40
Abbildung B_11	Anatomie eines langen Röhrenknochens am Beispiel des rechten Humerus.....	41
Abbildung B_12	Mikroskopische Anatomie von kompaktem Knochen.....	42
Abbildung B_13	Aufbau Osteon	43
Abbildung B_14	Regulation der Oteoklastogenese.....	46
Abbildung B_15	Chondrale Ossifikation	49
Abbildung B_16	Wachstum langer Röhrenknochen.....	51
Abbildung B_17	Stadien der indirekten Frakturheilung	54
Abbildung B_18	Knochenresorption.....	58
Abbildung C_1	Übersichtsgrafik „Zielsetzung der Arbeit“	70
Abbildung D_1	Aufbau Neubauer-Zählkammer.....	93
Abbildung D_2	Aufbau Zählgitter.....	94
Abbildung D_3	Reaktionsschema der Alkalischen Phosphatase	98
Abbildung D_4	Verdünnungsreihe AP-Aktivität	99
Abbildung D_5	Reaktionsschema TRAP-Färbung.....	103
Abbildung D_6	MFB-F11-Zelle.....	105
Abbildung D_7	<i>Sandwich</i> -Elisa.....	107

Abbildung E_1/1	Langzeitkultivierung von Monozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen	116
Abbildung E_1/2	Langzeitkultivierung von Monozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen	117
Abbildung E_2	Zellviabilität nach 14-tägiger Kultivierung von Monozyten.....	118
Abbildung E_3	Zellviabilität nach 14-tägiger Vorbehandlung von Monozyten zur Generierung vonMOMPs und PCMOs ...	119
Abbildung E_4	Vergleich zwischen Dexamethason und Vitamin D bei der Langzeitkultivierung von Monozyten	120
Abbildung E_5	Osteogene Stimulation von Osteoblasten.....	121
Abbildung E_6	Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.....	121
Abbildung E_7	Zellviabilität nach 14-tägiger Vorbehandlung von Monozyten zur Generierung von MOMPs und PCMOs	122
Abbildung E_8	Zellmorphologie nach sechstägiger Vorbehandlung.....	123
Abbildung E_9	CD-Marker-Phänotypisierung in der Durchflusszytometrie.....	125
Abbildung E_10	Relative Expressions von CD 34 nach sechstägiger Vorbehandlung.....	127
Abbildung E_11	Relative Expressions von CD 34 nach osteogener Differenzierung.....	128
Abbildung E_12	Darstellung der CD 68-Expression von monozytären Zellen mittels immunhistochemischer Färbung.....	129
Abbildung E_13	Relative Expressions von Kollagen I nach sechstägiger Vorbehandlung.....	130
Abbildung E_14	Relative Expressions von Kollagen I nach osteogener Differenzierung.....	131
Abbildung E_15	Alkalische Phosphatase-Aktivität nach sechstägiger Vorbehandlung.....	132
Abbildung E_16	Alkalische Phosphatase-Aktivität nach osteogener Differenzierung.....	133
Abbildung E_17	Alizarin Rot-Messung nach sechstägiger Vorbehandlung.....	134

Abbildung E_18	Alizarin Rot-Messung nach osteogener Differenzierung.....	135
Abbildung E_19	Relative RUNX-2-Expression nach sechstägiger Vorbehandlung.....	136
Abbildung E_20	Relative RUNX-2-Expression nach osteogener Differenzierung.....	137
Abbildung E_21	Relative Osterix-Expression nach sechstägiger Vorbehandlung.....	138
Abbildung E_22	Relative Osterix-Expression nach osteogener Differenzierung.....	139
Abbildung E_23	Expressionsmuster verschiedener Markergene in der RT-PCR.....	140
Abbildung E_24	Mehrkernige Riesenzellen in der PCMO-Population nach osteogener Differenzierung.....	141
Abbildung E_25	TRAP-Färbung nach osteogener Differenzierung.....	141
Abbildung E_26	Alkalische Phosphatase-Aktivität von Monozyten Zellen nach Reifung zu Makrophagen und Osteoklasten	142
Abbildung E_27	AP-Aktivität und proinflammatorische Zytokine nach osteogener Differenzierung von PCMOs mit FCS-haltigem Serum	143
Abbildung E_28	AP-Aktivität und proinflammatorische Zytokine nach osteogener Differenzierung von PCMOs mit autologem Serum.....	144
Tabelle B_1	Differenzierungspotenzial von Stammzellen (Begriffserklärungen)	26
Tabelle D_1	Verdünnungsreihe Alizarin Rot.....	101
Tabelle D_2	Basensequenzen der verwendeten <i>Primer</i> -Paare	112
Tabelle D_3	Eingesetzte Farbstoffe bei der Durchflusszytometrie.....	114
Tabelle E_1	CD-Marker-Phänotypisierung in der Durchflusszytometrie.....	126

A ALLGEMEINE EINLEITUNG

Die Heilung großer Knochendefekte, wie sie beispielsweise durch ein Trauma, ossäre Infektionen oder eine Tumorerkrankung entstehen können, ist nach wie vor ein großes Problem in der Unfall- und orthopädischen Chirurgie [1].

Diese können durch herkömmliche Implantate oder Transplantate häufig nur insuffizient versorgt werden, was mit einer hohen Co-Morbidität verbunden sein kann [1-7]. Der vergleichsweise junge wissenschaftliche Zweig der „Regenerativen Medizin“ bietet hierbei eine verheißungsvolle Alternative, derartige Defekte zu heilen, um dem zunehmenden Funktionsverlust des muskuloskeletalen Systems Einhalt zu gebieten und somit einen drohenden Mobilitäts- und Autonomieverlust vom Patienten abzuwenden [1,5-8].

Die Idee, Implantate aus geeignetem Trägermaterial und geeigneten Zellen zu entwickeln, sie in Gewebedefekte zu integrieren, um schließlich eine vollständige Heilung zu erzielen, stößt schon seit einiger Zeit auf großes wissenschaftliches Interesse [1,9]. Ziel dieses als *Tissue engineering* bezeichneten Verfahrens ist es, den Transfer vom Implantat zu einem neuen, körpereigenen Gewebe zu bewerkstelligen. Neben dem strukturellen Aufbau und den mechanischen Eigenschaften des Trägermaterials kommt der Auswahl der Zellen, die auf dieses aufgebracht werden, eine entscheidende Rolle zu. Hier erscheinen körpereigene (autologe) Zellen ideal, um immunologische Abstoßungsreaktionen zu vermeiden [1,10]. Gerade Stammzellen bieten durch ihre Expansionsfähigkeit und Differenzierbarkeit eine vielversprechende Quelle zum *Tissue engineering* von Geweben [1,11].

Es wurden mittlerweile in vielen adulten Geweben multipotente Stammzellen gefunden, die für die Integrität des entsprechenden Gewebetyps verantwortlich sind [1,12]. Für mesenchymale Stammzellen (MSCs) im Speziellen konnte ein osteoblastäres Differenzierungspotenzial gezeigt werden [1,13]. Jedoch benötigt man invasive Methoden, um diese aus dem Knochenmark oder Fettgewebe zu isolieren [1,14]. Deshalb würden neue, weniger invasive Verfahren zur Gewinnung von Zellen mit osteogenem Differenzierungspotenzial als Quelle für den Gewebeersatz einen großen medizinischen Fortschritt bedeuten. In diesem Zu-

sammenhang sind Brichte über das multipotente Differenzierungspotenzial von Monozyten aus dem venösen Blut vielversprechend [1,15-17]. Ihnen wird ein Transdifferenzierungspotenzial in Zellen aller drei Keimblätter (Endothelzellen, Chondrozyten, Ostoblasten, Adipozyten, Myeloblasten, Epithelzellen, neuronale Zellen, Hepatozyten, Pankreasinselzellen, glatte Muskelzellen, Keratinozyten) nachgesagt, was bedeuten würde, dass sie das Differenzierungspotenzial vieler adulter Stammzellen sogar übertreffen würden [1,15-18]. Da sie darüber hinaus einfach zu gewinnen sind, könnten sie eine ideale Ressource für den autologen Gewebeersatz darstellen.

B EINLEITUNG

B 1 STAMMZELLEN

B 1.1 Allgemeine Eigenschaften

Als Stammzellen werden Zellen mit Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial bezeichnet, die solange in einem nicht differenzierten Zustand verharren, bis sie durch einen spezifischen extrinsischen oder intrinsischen Stimulus zur Teilung angeregt werden [19].

Sie zeichnen sich durch eine asymmetrische Zellteilung in zwei Tochterzellen mit jeweils identischem Phänotyp, Genexpressionsmuster und gleicher Anzahl an zukünftigen Teilungsmanövern aus. Die eine behält dabei die Eigenschaften der Mutterzelle (Selbsterneuerung der Stammzelle), die andere Zelle erfährt dagegen ein Differenzierungsschicksal.

Durch den zunehmenden Differenzierungsgrad (Stammzelle → Progenitorzelle → Precursorzelle) entsteht somit eine Spezialisierung, welche die Zelle für die Aufgaben des Gewebes, in dem sie sich befindet, befähigt [20].

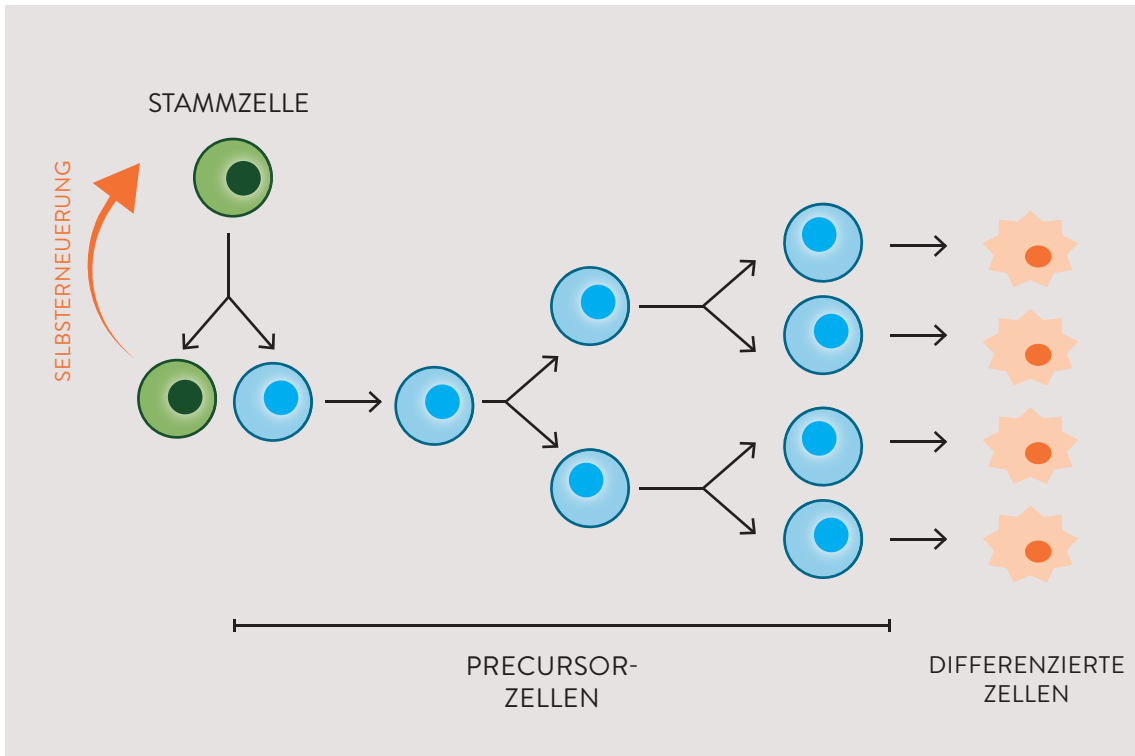


Abbildung B_1: Entwicklungsmöglichkeiten der Stammzelle

Im Rahmen der Stammzellteilung kommt es einerseits zur Selbsterneuerung der Stammzelle. Andererseits entwickelt sich eine Tochterzelle, die ein Differenzierungsschicksal erfährt. Dabei entstehen sog. Precursorzellen, die sich ihrerseits wiederum teilen.

Modifiziert aus: Raff M.: *Adult stem cell plasticity: fact or artifact?* *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:1-22, 2003.

Welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, ob die Tochterzelle ihren Stammzellcharakter beibehält oder sich weiter differenziert, ist derzeit noch unklar. Grundsätzlich könnten jedoch Einflüsse des Milieus, in dem sie sich befindet, durch die Mutterzelle weitergegebene Erbinformationen oder beides dafür verantwortlich sein [21,22]. Man kann annehmen, dass die asymmetrische Zellteilung allen Stammzellen gemeinsam ist [23,24].

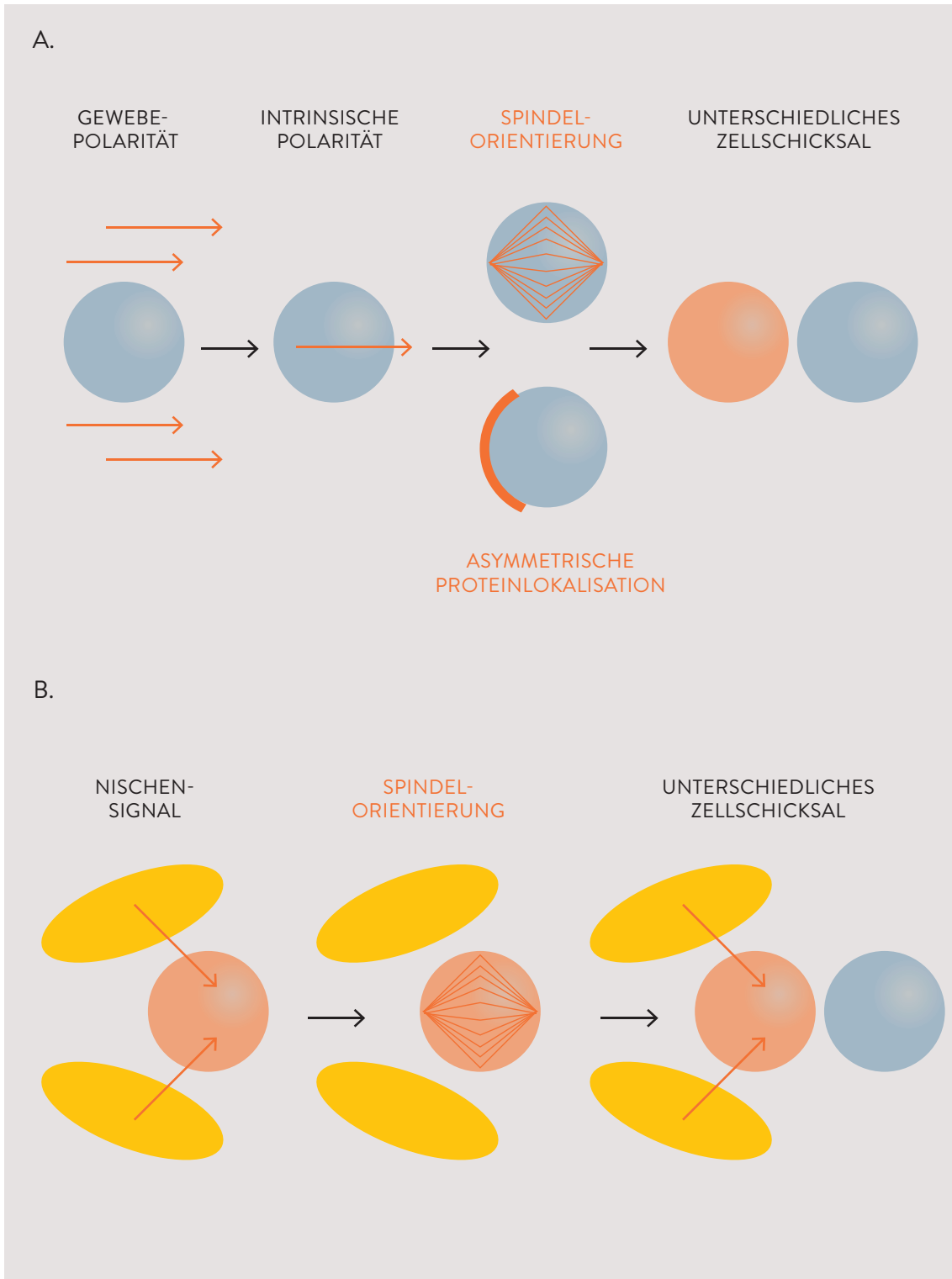


Abbildung B 2: Kontrolle der asymmetrischen Zellteilung (Hypothesen)

A. Intrinsische Regulation: Stammzellen etablieren in der Interphase eine Polaritätsachse, an der sich die Mitosespindel orientiert. Durch die polare Anordnung von Proteinen, die das Zellschicksal bestimmen, wird anschließend eine asymmetrische Zellteilung ausgelöst.

B. Extrinsische Regulation: Durch Signale der Stammzellnische erfolgt die Anordnung der Mitosespindel senkrecht zu dieser. Dadurch verbleibt eine Tochterzelle unter dem Einfluss der Stammzellnische und behält somit ihren Stammzellcharakter.

Modifiziert aus: Knoblich J. A.: *Mechanisms of asymmetric stem cell division. Cell. 132(4):583-597, 2008.*

Durch ihre hohe Telomerase-Aktivität sind sie zu einer nahezu unbegrenzten Zellteilung befähigt. Dabei ergänzt die Telomerase mehrfach eine repetitive Basensequenz (TTAGGG) am Chromosomenende, wodurch dessen schleichen-dem Verlust, der durch den Mechanismus der DNA-Polymerase begründet ist, Einhalt geboten ist [25].

Je nach Differenzierungsgrad und -potenz unterscheidet man totipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente und unipotente Stammzellen [26].

Differenzierungspotenzial von Stammzellen (Begriffserklärungen)

Begriff	Differenzierungspotenzial	Beispiel
Totipotenz	Fähigkeit einer Zelle, sämtliche Zellen eines Organismus sowie extraembryonales Gewebe zu bilden	Zygote und frühe Blastomere
Pluripotenz	Fähigkeit einer Zelle, die Derivate aller Keimblätter zu bilden	Embryonale Stammzelle
Multipotenz	Fähigkeit einer Zelle, verschiedene Zelltypen einer Entwicklungslinie (eines Organs) zu bilden	Hämatopoetische Stammzelle
Oligopotenz	Fähigkeit einer Zelle, wenige Zelltypen einer Entwicklungslinie (eines Organs) zu bilden	Neuronale Stammzelle
Unipotenz	Fähigkeit einer Zelle, ein Zelltyp einer Entwicklungslinie (eines Organs) zu bilden	Spermatogonien

Tabelle B_1: Modifiziert aus: *Jaenisch R., Young R.: Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell. 132(4):567-582, 2008.*

B 1.2 Totipotente Stammzellen

Als totipotent gelten lediglich die Zygote und frühe Blastomere, da diese nicht nur sämtliche Zellen eines Körpers bilden können, sondern auch den Organismus als solchen, indem aus ihnen der extraembryonale Trophoblast hervorgeht. Somit kommt im adulten menschlichen Organismus keine Zellform vor, die Totipotenz aufweist [19].

Bei den folgenden Zellteilungen im embryonalen Entwicklungszyklus verlieren die Zellen nach und nach ihre Differenzierungsfähigkeit [27-29].

B 1.3 Pluripotente Stammzellen

Die wohl bekannteste Form einer pluripotenten Zelle ist die embryonale Stammzelle (ESC). Sie wird aus der inneren Zellmasse der Blastozyste des sich entwickelnden Embryos gewonnen. Sie war und ist Gegenstand intensiver Forschung der letzten Jahrzehnte aber auch kontroverser Diskussionen – vor allem was ethische Aspekte in Bezug auf humane ESCs (hESCs) betrifft [30].

Dr. Martin Evans und Dr. Gail R. Martin gelang es 1981 nahezu zeitgleich erstmals embryonale Stammzellen aus Säugetieren zu gewinnen [31,32]. Im Weiteren war es Dr. James Thomson, der 1998 an der Universität von Wisconsin als Erster humane embryonale Stammzellen herstellte [33].

ESCs gelten als pluripotent, da sie zur Ausdifferenzierung in Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm und Mesoderm) fähig sind und könnten damit eine ideale Ressource zur Erforschung humaner Krankheiten sowie eine Quelle zur Gewinnung von patientenspezifischem „Ersatzgewebe“ darstellen [34]. Der klinische Einsatz dieser Zellen ist – neben ethischen Bedenken – insbesondere durch ihr tumorigenes Potenzial eingeschränkt [35].

Weitere Formen von pluripotenten Zellen sind die embryonale Keimzelle (EGC) und die postnatale spermatogonale Stammzelle (maGSC) [36-38].

Embryonale Keimzellen sind diejenigen Zellen, aus denen sich später Teile der Geschlechtsorgane sowie Ei- und Samenzellen entwickeln. Sie unterscheiden sich von den embryonalen Stammzellen – neben anderen optimalen Kultivierungsbedingungen – dadurch, dass sie in einer späteren Entwicklungsstufe des Organismus auftreten. Für EGCs und maGSCs konnte *in vitro* nach längerer Kultivierung ein Pluripotenzenpotenzial gezeigt werden, *in vivo* sind sie unipotent [39,40]. Neben der geringen Effizienz hinsichtlich der Gewinnung dieser Zellen ist ihr Einsatz insbesondere durch die Tatsache beschränkt, dass deren Existenz im humanen Organismus zweifelhaft ist bzw. deren Charakteristika schlecht definiert sind – abgesehen von ethischen Bedenken bzgl. der Gewinnung von EGCs [27].

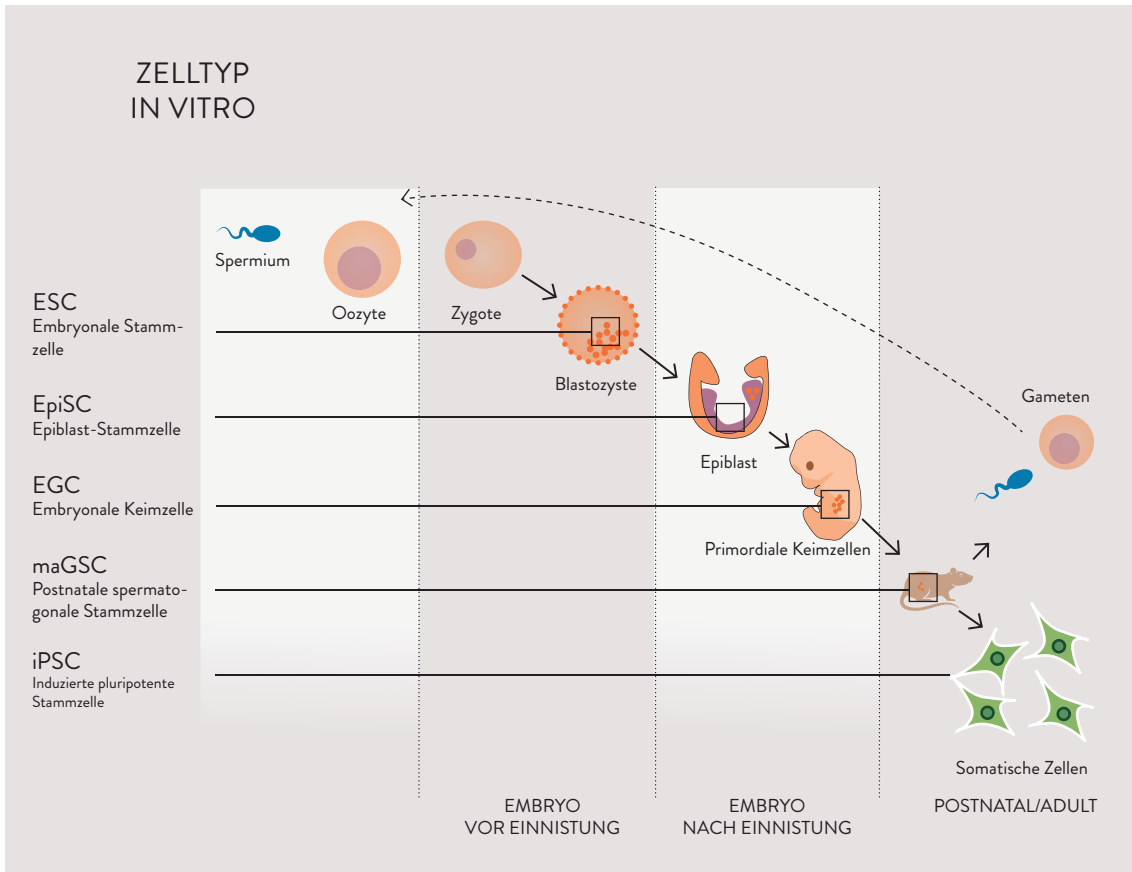


Abbildung B_3: Ursprung pluripotenter Stammzellen

Die Explantation von Zellen während eines bestimmten Stadiums der frühen embryonalen Entwicklung führt zur Gewinnung unterschiedlicher pluripotenter Stammzellen. MaGSC werden dabei aus dem Testis adulter Individuen, iPSC durch epigenetische Reprogrammierung von somatischen Zellen gewonnen (siehe dort).

Modifiziert aus: Hanna J. H., Saha K., Jaenisch R.: *Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues.* *Cell.* 143(4):508-525, 2010.

B 1.4 Adulte Stammzellen

Eine Differenzierungsstufe weiter befinden sich die in differenzierten Geweben und Organen ansässigen gewebespezifischen Stammzellen – auch adulte oder somatische Stammzellen genannt. Sie dienen der Gewebekomöostase, sprich dem Erhalt der Gewebe- bzw. Organintegrität [19].

Diese können multi-, oligo- oder unipotent sein (s. u.) [19].

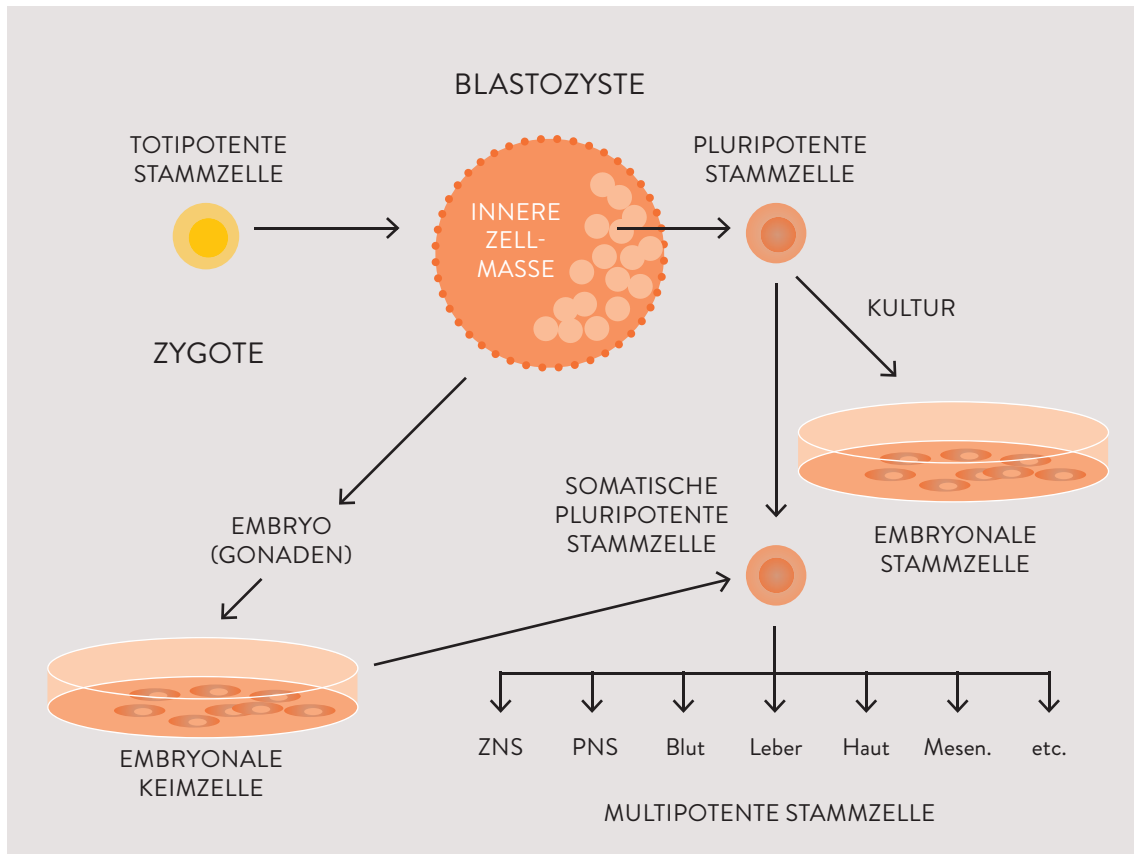


Abbildung B_4: Stammzellhierarchie

Die Befruchtung der Eizelle mit einem Spermium führt zur Entstehung der totipotenten Zygote. Aus dieser entsteht während der Blastulation der äußere Trophoblast, aus dem später die Plazenta und die Eihäute entstehen, sowie die innere Zellmasse (IZM), aus der die ESCs gewonnen werden können.

Aus den pluripotenten Stammzellformen gehen wiederum multipotente Stammzellen hervor, die für die Bildung der einzelnen Organe und Gewebe verantwortlich sind. In den Organen und Geweben des adulten Organismus befinden sich die gewebeständigen (adulten) Stammzellen, die deren Integrität gewährleisten.

Modifiziert aus: Anderson D. J., Gage F. H., Weissman I. L.: *Can stem cells cross lineage boundaries? Nat. Med.* 7(4): 393-395, 2001.

B 1.5 Adulte Stammzellen des Knochenmarks

B 1.5.1 Hämatopoetische Stammzellen

Der menschliche Organismus ist begrenzt zur Regeneration befähigt. Dies gilt in besonderem Maße für das blutbildende System (hämatopoetisches System), dessen Stammzellen besonders gut untersucht sind.

Die heutige Charakterisierung von Stammzellen, die sich auf deren Differenzierungs- bzw. Entwicklungspotenzial bezieht, wie auch die Erkenntnis des Selbsterneuerungspotenziales derselben, gehen auf Versuche mit HSCs zurück

[41-44]. Sie haben wesentlich zum Verständnis von Gewebedifferenzierung und -erhalt beigetragen.

HSCs kommen hauptsächlich im blutbildenden Knochenmark (rotes Knochenmark) vor. Während man dieses im kindlichen Skelett fast ubiquitär findet, beschränkt sich dessen Vorkommen im Erwachsenenskelett nahezu ausschließlich auf das Becken sowie die proximalen Ober- und Unterschenkelknochen. In geringerem Maße findet man sie auch im peripheren Blut [45].

HSCs sind in der Lage sämtliche Zellen des Blutes zu bilden. Diese Erkenntnis verdanken wir den Versuchen von Till und McCulloch, die 1961 nachweisen konnten, dass ein aus dem Knochenmark gewonnenes Zellgemisch, welches zuvor letal bestrahlten Mäusen intravenös injiziert wird, zur vollständigen Regeneration des blutbildenden Systems führt, indem es in der Milz zu Zellanhäufungen (CFU) kommt, die jeweils von einer einzelnen Zelle abstammen und aus welchen sich sämtliche Zellen des Blutes bilden können (Multipotenz) [43,46]. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass ein Teil der in den Kolonien enthaltenen Zellen neue Kolonien bilden können (Selbsterneuerung) [44]. Im Jahr 1988 war es die Arbeitsgruppe um Irving Weissman, die erstmals HSCs aus Mäusen isolierte [40]. Später gelang dies auch für humane HSCs [47,48].

Heute ist ein Teil der Faktoren bekannt, die für die Proliferation und Differenzierung der HSC-Precursorzellen notwendig sind. Beispielsweise hat die Kenntnis von G-CSF im klinischen Alltag Einzug erhalten. Dieser ermöglicht die Mobilisierung von HSCs aus ihrer Nische, was zu deren Gewinnung im Rahmen von Stammzelltransplantationen bedeutsam ist [49,50].

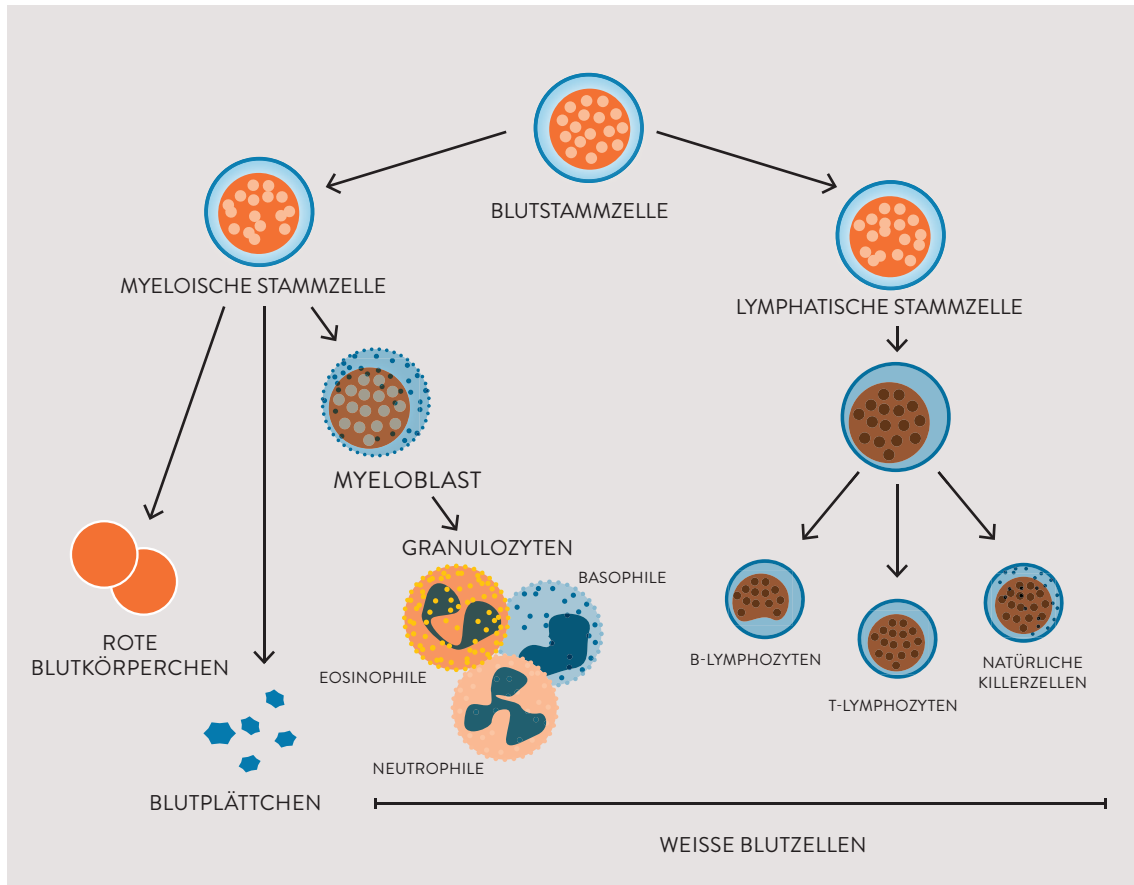


Abbildung B_5: Abstammungslinien der hämatopoetischen Stammzelle

Aus der HSC gehen die weißen (Leukozyten) und roten Blutkörperchen (Erythrozyten) hervor.

Die Blutplättchen (Thrombozyten) werden durch die Megakaryozyten (nicht dargestellt) gebildet.

Modifiziert aus: *Blitterswijk, C.: Tissue Engineering. Second Edition, Amsterdam, Elsevier, 2015.*

B 1.5.2 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen kommen im Knochenmark (neben HSCs), wo sie im Bindegewebe innerhalb eines Retikulozytennetzwerkes gefunden werden, aber auch in anderen Geweben vor [51]. Ihre Existenz wurde beispielsweise im peripheren Blut und Nabelschnurblut, in der Leber sowie der Zahnpulpa beschrieben [52]. Am häufigsten werden sie aus dem Knochenmark (BM-MS) oder Fettgewebe (Ad-MS) zu Kultivierungszwecken gewonnen, wobei sie im Knochenmark nur ca. 0,01 % der Population ausmachen [53-55]. Sie bilden einen Zell-Pool, aus dem mesenchymales Gewebe gebildet wird (Knochen, Knorpel, Fett, Muskulatur, Sehnen, Bänder, Stützgewebe) [13].

Erstmals beschrieben wurden diese Zellen als CFU-F (*Colony-forming unit* –

fibroblast) in Schweinen von Friedenstein *et al.* 1970, ehe Caplan 1992 die Isolation von humanen MSCs gelang [53,56].

In vitro erfolgte – je nach Stimulus – die Differenzierung in Knorpel-, Knochen-, Fett- und glatte Muskelzellen [13,57]. Neuere Forschungsergebnisse zeigen zudem ein hepatogenes Differenzierungspotenzial [58,59]. Zellen mit einem ähnlichen Profil an Oberflächenmarkern wie BM-MSCs konnten auch in der Perizyten-Population von Blutgefäßen gefunden werden [60], was ein Hinweis auf ein ubiquitäres Vorkommen von MSCs in allen Geweben sein könnte und insbesondere deren Beteiligung an der schnellen Antwort im Rahmen der Reparatur von Gewebeschäden nahelegt [61].

Zudem zeigen MSCs ein ausgeprägtes *Homing*-Verhalten: sie wandern ange-regt durch einen Stimulus, der über den Rezeptor CXCR-4 und dessen Ligan-den SDF-1 vermittelt wird, in Richtung Gewebeschaden, um dort am Heilungs-prozess mitzuwirken [62,63].

MSCs zeigen neben ihrer Beteiligung an der Gewebereparatur einen immunmo-dulatorischen und antiseptischen Charakter [64]. Neben diesem regulato-rischen Einfluss auf die Immunantwort scheinen MSCs Faktoren auszuschütten, die antibakteriell wirken. Dieser synergistische Effekt im Rahmen der Immunsup-pression wird über PGE2 und LL-37 vermittelt [65,66].

Klinisch bedeutsam sind diese Erkenntnisse vor allem hinsichtlich der in der Transplantationsmedizin gefürchteten *Graft-versus-Host*-Reaktion (GvHR). Le Blanc *et al.* konnten einen positiven Effekt von MSCs bezüglich Abstoßungs-reaktionen im Rahmen von Organtransplantationen zeigen [67,68].

Ebenfalls klinisch bedeutsam ist die Tatsache, dass periostal gelegene MSCs an der Kallusbildung im Rahmen der Knochenheilung beteiligt sind [69].

In vitro konnte gezeigt werden, dass MSCs unter mechanischer Stimulation über parakrine Faktoren die Angiogenese fördern, was gerade bei der Fraktur-heilung einen wesentlicher Faktor darstellt. Dies konnte im Tiermodell ebenfalls bestätigt werden [70,71].

Kultivierte mesenchymale Stammzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche zu 95 % die CD-Markergene (*cluster of differentiation*) 73, 90 und 105.

Im Gegensatz dazu lassen sich andere CD-Markergene nur selten nachweisen (unter 2 %): CD 34 (hämaopoetische Progenitorzellen/Endothelzellen), CD 45

(Leukozytenmarker), CD 14 (Makrophagen), CD 11b (Monozyten), CD 79a und CD 19 (jeweils spezifisch für B-Zellen) [72,73]. Für native MSCs wurden andere Marker wie STRO-1 und CD 271 beschrieben, die jedoch auf ihren kultivierten Nachkommen nicht mehr nachweisbar sind [74,75].

Letztendlich offenbart diese Tatsache die Schwierigkeit, MSCs durch Oberflächenmarker ausreichend charakterisieren zu können. Zwar konnte durch die Injektion bzw. Transplantation von autologem Knochenmark bzw. MSCs die Knochenheilung *in vivo* verbessert werden, jedoch bleibt der klinische Einsatz dieser Zellen zur Heilung großer Defekte bzw. ganzer Knochen aufgrund einer kritischen Vaskularisation limitiert [76-80].

B 1.6 Gewebeständige, adulte Stammzellen

Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass adulte Stammzellen nicht nur in Geweben mit hohem Zellumsatz (Blut, Haut, Darm, Hoden und Respirationstrakt) vorkommen, sondern sogar die meisten – wenn nicht alle Gewebetypen und Organe – Stammzellen enthalten oder sich diese aus jenen in der Zellkultur gewinnen lassen [81].

Beispiele für adulte Stammzellen sind Skelettmuskelstammzellen, neuronale, epidermale oder intestinale Stammzellen [82-84].

B 1.7 Epigenetische Reprogrammierung

Außer aus Embryos können pluripotente Stammzellen auch durch eine Reprogrammierung adulter Zellen – sowohl aus bereits terminal differenzierten Zellen als auch aus gewebespezifischen Stammzellen – gewonnen werden [85].

Bisher wurden mehrere Verfahren gezeigt, durch die über Dedifferenzierungsmechanismen eine Reprogrammierung von bereits differenzierten Zellen erreicht werden kann.

Im Folgenden sind drei Verfahren näher beschrieben.

B 1.7.1 Zellkerntransfer

Hinsichtlich der Erforschung von Reprogrammierungswegen sei an die Arbeiten von Dr. Ian Wilmut und dem bei der Preisvergabe etwas zu kurz gekommenen

Dr. Keith Campbell erinnert. Ihnen gelang es 1997 am Beispiel des berühmt gewordenen Schafs „Dolly“ einen differenzierten Donor-Zellkern in eine von ihrem Zellkern befreite Eizelle zu implantieren und schließlich einen Klon eines Säugtieres zu generieren [86].

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Effizienz des Zellkerntransfers vom Differenzierungsgrad der verwendeten Donor-Zelle abhängig ist. Je undifferenzierter, desto eher gewinnt man einen Klon [87,88].

Als problematisch gilt neben den ethischen Bedenken und der Ineffizienz dieses Verfahrens, dass es hauptsächlich bei der Implantation in unbefruchtete Eizellen etabliert ist. In Anbetracht der Tatsache, dass unbefruchtete Eizellen beim Menschen nur schwer zu gewinnen sind, benötigte man Verfahren, bei denen der Zellkerntransfer auch in eine bereits befruchtete Eizelle (Zygote) zu bewerkstelligen wäre [30,89,90].

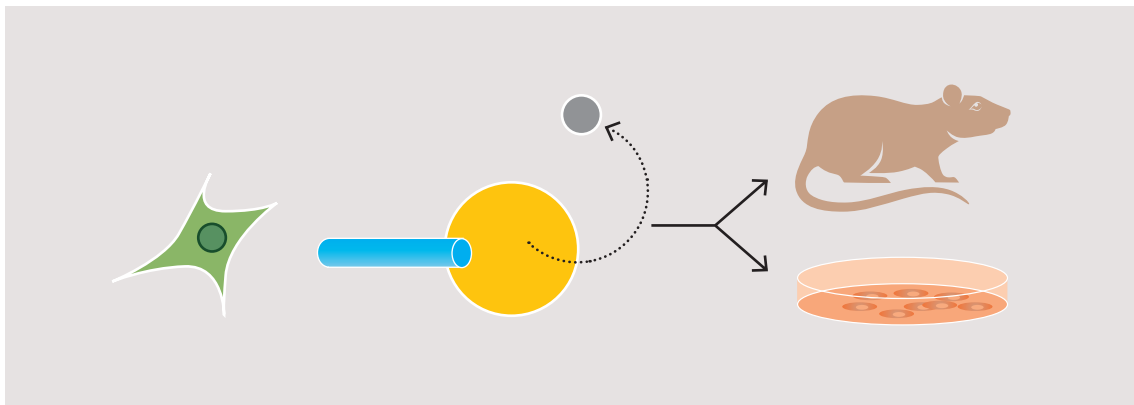


Abbildung B 6: Zellkerntransfer

Beim Zellkerntransfer wird einer entkernten Oozyte der Zellkern einer somatischen Zelle injiziert. Daraus können *in vitro* in Bezug auf die somatische Zelle genetisch identische embryonale Stammzellen bzw. durch Übertragung in eine Leihmutter Klone erzeugt werden (reproduktives Klonen).

Modifiziert aus: Hochedlinger K., Jaenisch R.: *Nuclear reprogramming and pluripotency. Nature. 441(7097):1061-1067, 2006.*

Neben dem o. g. Verfahren wurden weitere Methoden beschrieben, die zu einer Reprogrammierung von somatischen Zellen in pluripotente Stammzellen führen.

B 1.7.2 Zellfusion und Zellextrakt

Eine davon ist die sogenannte „Zellfusion“, bei der man differenzierte, adulte Stromazellen in Kultur mit weniger differenzierten Zellen (Stammzellen) bringt. Dabei kommt es zur Fusion und Generierung tetraploider Zellen, die – sowohl

phänotypisch als auch bezüglich ihres Differenzierungspotenzials – denen der weniger differenzierten Zellen der Kultur gleichen [91-94]. Dieses Verfahren wurde sowohl für murine als auch für humane Zellen beschrieben, schließt jedoch aufgrund des vierfachen Chromosomensatzes einen klinischen Einsatz aus [94-96].

Auch die Exposition von permeablen, somatischen Zellen mit Zellextrakten aus Stammzellen hat gezeigt, dass dadurch Reprogrammierungsvorgänge wie beispielsweise die Änderungen der Chromatinstruktur und die Hochregulation von bestimmten Transkriptionsfaktoren in Gang gesetzt werden können, auch wenn hiermit bisher keine stabilen reprogrammierten Zellen erzeugt werden konnten [97-99].

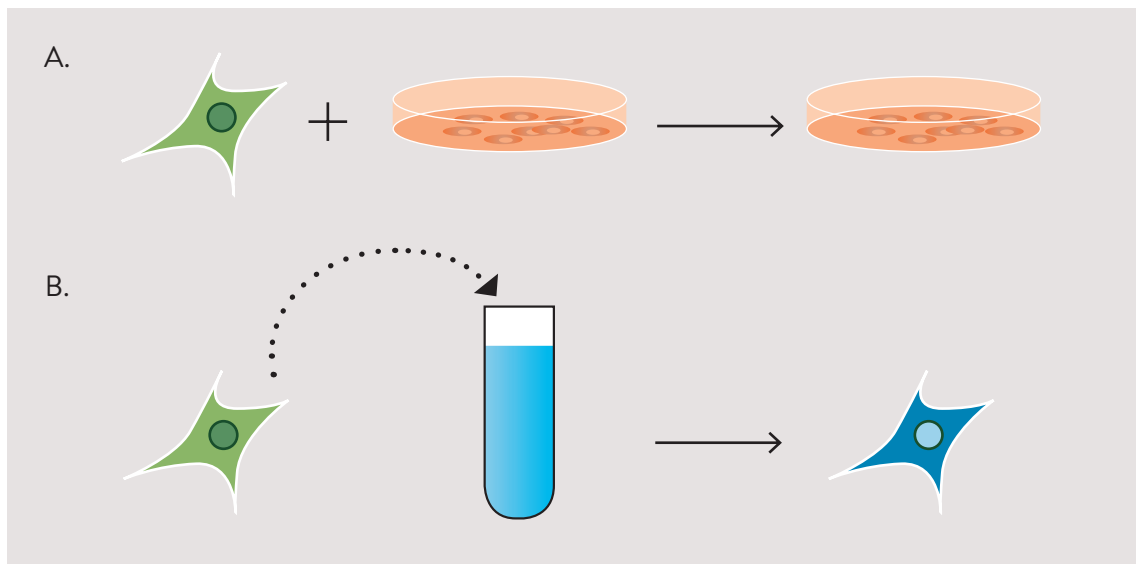


Abbildung B_7: Zellfusion A. und Zellextrakt B.

A. Aus der Zellfusion von differenzierten somatischen Zellen mit embryonalen Stammzellen entstehen pluripotente Stammzellen mit tetraploidem Chromosomensatz.

B. Die Exposition von permeablen, somatischen Zellen mit Stammzellextrakten setzen Reprogrammierungsvorgänge in Gang ohne jedoch eine funktionelle Reprogrammierung zu erzielen.

Modifiziert aus: *Hochedlinger K., Jaenisch R.: Nuclear reprogramming and pluripotency. Nature. 441(7097):1061-1067, 2006.*

B 1.7.3 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs)

All diesen Verfahren zur Dedifferenzierung und Reprogrammierung ist die Anwesenheit von karyo- bzw. zytoplasmatischen Faktoren gemein, die zur Entdifferenzierung adulter Zellen notwendig sind.

Ein neues, bahnbrechendes Verfahren zur Erzeugung reprogrammierter Zellen lieferten die Arbeiten von Shinya Yamanaka *et al.* Ihnen gelang 2006 die Er-

zeugung von Säuge-iPSCs durch die virale Einschleusung von Transkriptionsfaktoren (Oct-4, Sox2, c-Myc, Klf4) in Maus-Fibroblasten. Durch deren Überexpression schlagen diese einen Entdifferenzierungsweg ein und erlangen so ein Pluripotenzpotential [100-103]. Ein Jahr später war diese Arbeitsgruppe auch in der Lage, humane Fibroblasten in gleicher Weise in Richtung Pluripotenz zu reprogrammieren [104].

Von besonderer Bedeutung für die Stabilisierung und Reprogrammierung des Pluripotenzpotenzials von iPSCs sind die Überexpression der Transkriptionsfaktoren Oct-4 und Nanog. Problematisch hierbei ist die Einschleusung von Fremd-Nukleotiden in das Genom, was eine spätere Tumorentstehung nach Re-Implantation begünstigen könnte. Zudem gelingt dieses Verfahren nur mit geringer Effizienz [105,106].

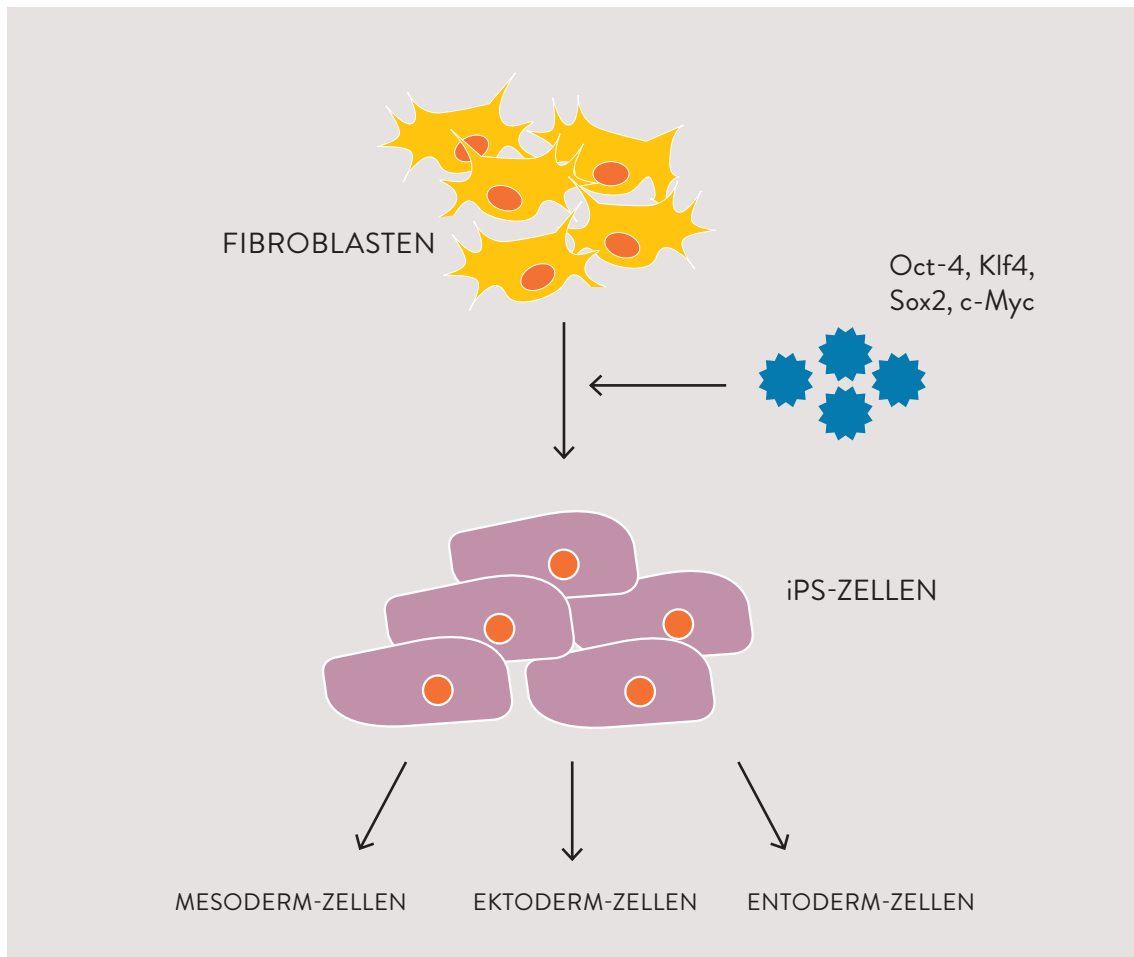


Abbildung B_8: iPSC (induzierte pluripotente Stammzelle)

Schematische Darstellung der Generation von iPSC-Zellen.

Durch virale Einschleusung bzw. durch Induktion von Pluripotenz-Transkriptionsfaktoren wie Oct-4, Sox2, c-Myc, Klf4 kann die Zelle umprogrammiert werden.

Modifiziert aus: www.sigmaaldrich.com/life-science/stem-cell-biology/ipsc.html

B 1.8 Stammzellnische

Adulte (gewebeständige) Stammzellen, die der Homöostase und Integrität eines Organs oder Gewebes dienen, befinden sich innerhalb des Organismus in einer definierten Umgebung, die ihren Stammzellcharakter gewährleistet (Stammzellnische) [107]. Dabei wirken neben verschiedenen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen extrinsische Faktoren auf die Stammzellen ein [107].

So dienen Cadherine der Zell-Zell-Interaktion, Integrine der Zell-Matrix-Interaktion, Neurone und Blutgefäße der Signal- und Botenstoffübertragung [107].

Durch die polarisierte Anordnung der Stammzellen in ihrer jeweiligen Nische ist eine asymmetrische Zellteilung und somit die Selbsterneuerung der Stammzelle neben ihrem Differenzierungsbestreben gewährleistet.

Lösliche Faktoren, die innerhalb der Nische eine Rolle spielen, sind z. B. FGF, BMP, Wnt, Angiopoietin, IGF, VEGF und PDGF. Die damit verbundenen Signalwege können je nach Gewebe- und Zelltyp unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle und deren Schicksal haben [107].

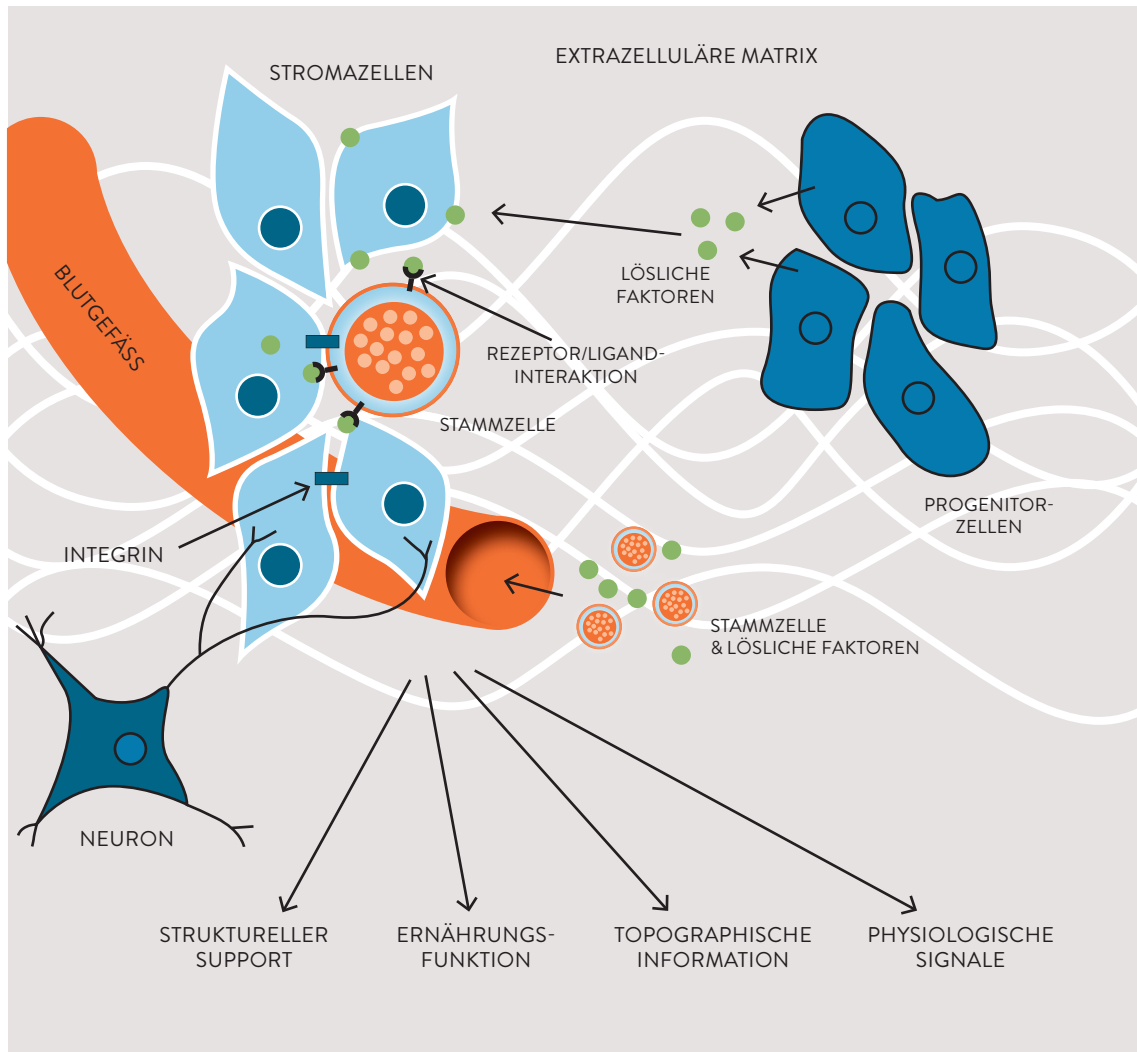


Abbildung B_9: Aufbau und Komponenten der Stammzellnische

Dargestellt ist der hypothetische Aufbau einer Stammzellnische. Die Grafik veranschaulicht zusammengefasst bekannte Komponenten, wie sie bei Säugern und Nicht-Säugetieren vorkommen.

Die Nische ihrerseits sendet und empfängt Signale von zellulären und nicht-zellulären Komponenten. Es handelt sich dabei um ein komplexes Wechselspiel, das wahrscheinlich von Nische zu Nische unterschiedlich ist. Dabei scheinen die Komponenten der jeweiligen Nische auf die erforderlichen Bedingungen angepasst zu sein.

Komponenten sind: Stammzellen, Stromazellen, extrazelluläre Matrix, lösliche Faktoren, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle, ein neuronales und vaskuläres Netzwerk.

Modifiziert aus: Jones D. L., Wagers A. J.: *No Place Like Home: Anatomy and Function of the stem cell niche*. *Nature Reviews*. 9:11-21, 2008.

B 2 KNOCHEN

B 2.1 Anatomische Grundlagen

Das menschliche Skelett besteht aus 213 Knochen (ausgenommen den Sesambeinen). Dabei handelt es sich um lange (*Clavicula, Humerus, Radius, Ulna, Phalanges, Ossa metacarpalia, Femur, Tibia, Fibula, Ossa metatarsalia*), kurze (*Ossa carpalia, Ossa tarsalia, Patella, Ossa sesamoidea*), flache (*Cranium, Mandibula, Scapula, Sternum, Costae, Ossa coxae*) und irreguläre (*Os hyoideum, Vertebrae, Pelvis, Os sacrum, Os coccygis*) Knochen [108].

Knochen dient als Stützapparat, dem Schutz der Eingeweide, als Reservoir für blut- und knochenbildende Zellen, als Speicher für Signal- und Botenstoffe, als Regulator des Säure-Basen-Haushaltes und nicht zuletzt stellt er einen wesentlichen Anteil unseres Bewegungsapparates dar [109].

Das menschliche Skelett besteht insgesamt aus ca. 80 % kortikalem (*Compacta*) und 20 % trabekulärem Knochen (*Spongiosa*), wobei sich diese prozentuale Verteilung innerhalb eines Knochens umgekehrt verhalten kann. Beispielsweise bestehen Wirbel aus 75 % spongiösem und 25 % kortikalem Knochen [110]. Kortikaler Knochen ist zu ca. 90 %, spongiöser Knochen nur zu ca. 15-25 % kalzifiziert, wobei dieser für die metabolische Funktion des Gewebes verantwortlich ist und neben dem meta- und diaphysären Bereich langer Röhrenknochen im Kortex flacher Knochen vorkommt [111].

Röhrenknochen zeigen einen regelhaften Aufbau. Dabei lässt sich ein Schaft- (Diaphyse) von einem gelenknahen Bereich (Epiphyse) unterscheiden. Die Markhöhle im Inneren langer Röhrenknochen wird von einer dünnen, spongiösen Schicht umgeben. Auf diese folgt eine kompakte und feste Mantelschicht aus kortikalem Knochen [110].

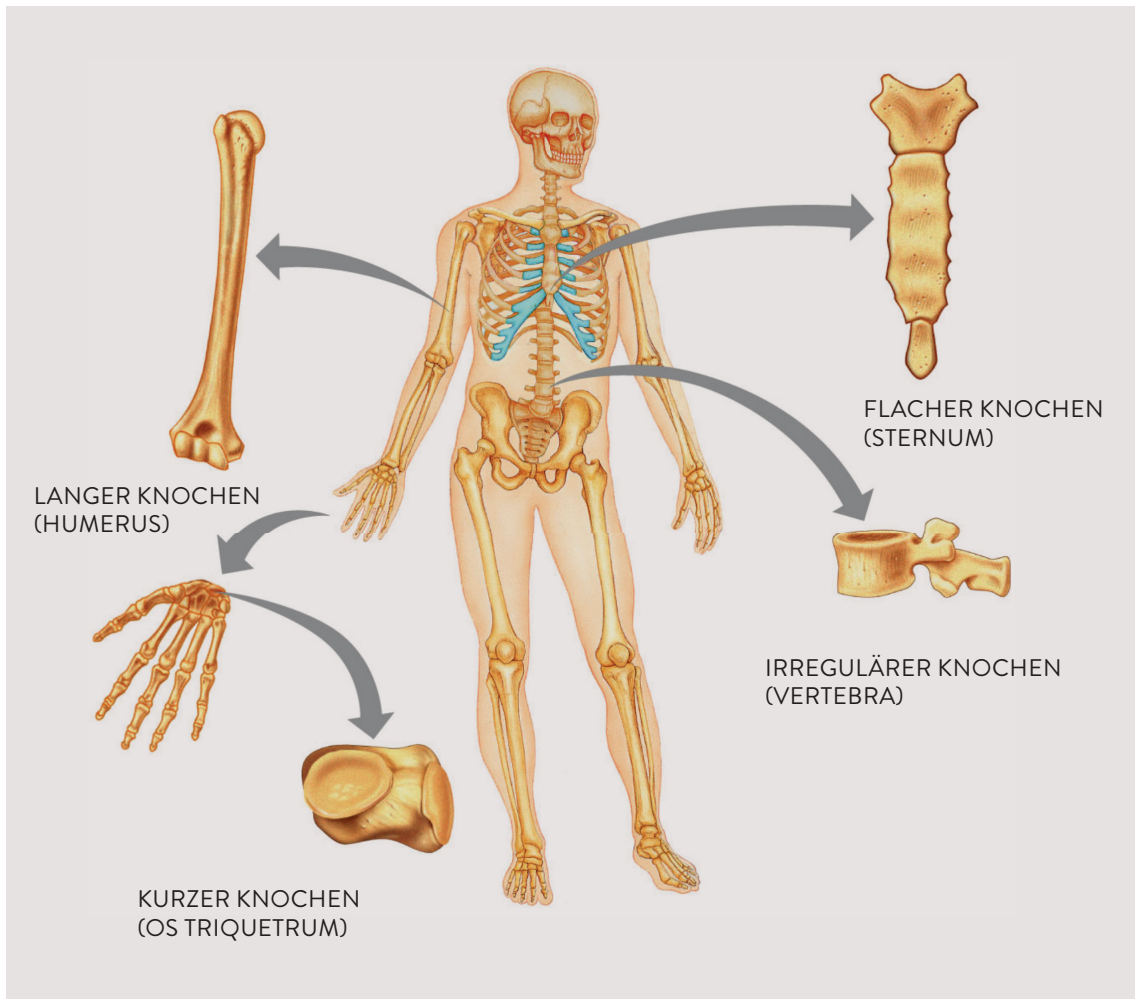


Abbildung B_10: Schematische Darstellung der Knocheneinteilung nach der Form (Erläuterungen siehe Text)
 Modifiziert aus: *Marieb E. N., Hoehn K.: Human Anatomy and Physiology. 7. Ausgabe, San Francisco, Pearson Education, 2007.*

Im Übergang zwischen Dia- und Epiphyse weitet sich der Knochen kegelartig auf, die kortikale Schicht wird dünner. Darunter liegt spongiöser Knochen. Hier findet das Längenwachstum statt. Anatomisch wird dieser Bereich als Metaphyse bezeichnet [110].

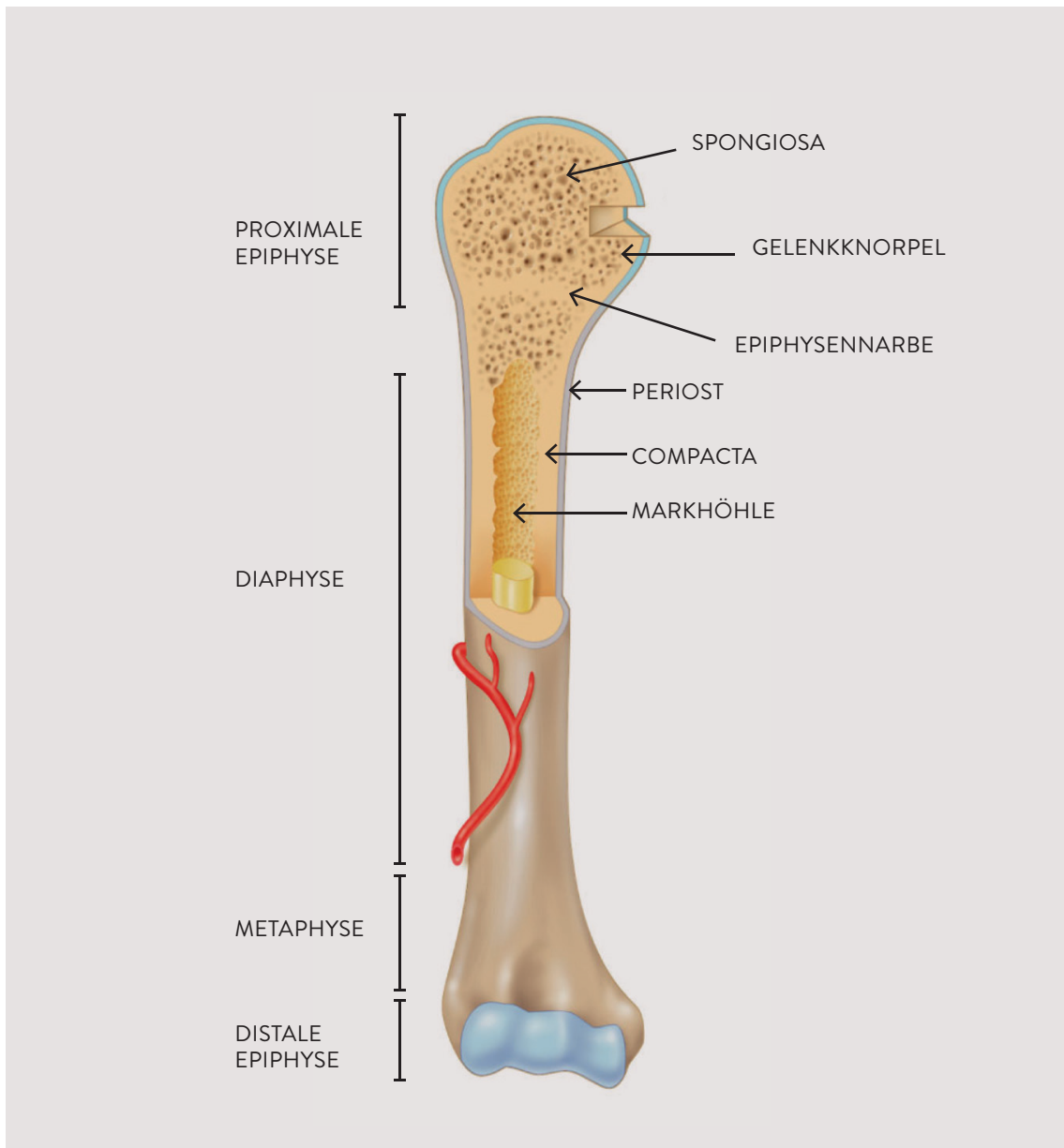


Abbildung B_11: Anatomie eines langen Röhrenknochens am Beispiel des rechten Humerus (Erläuterungen siehe Text)
 Modifiziert aus: Marieb E. N., Hoehn K.: *Human Anatomy and Physiology*. 7. Ausgabe, San Francisco, Pearson Education, 2007.

Mikroarchitektonisch besteht sowohl der reife kortikale als auch der spongiöse Knochen aus sogenannten, zylindrisch anmutenden Osteonen [112].

Diese entstehen bei der Reifung von Geflecht- oder Faserknochen in Lamellenknochen. Dabei „fressen“ sich phagozytierende Zellen (Osteoklasten) durch den unreifen Knochen und bilden Kanäle, welche durch konzentrisch angeordnete Osteoblasten ausgekleidet werden. In der Mitte dieser „Fressstraßen“ entstehen

die sogenannten Havers-Kanäle. Die Osteoblasten bilden gegenläufig angeordnete Kollagenfibrillen, welche unter dem Mikroskop im polarisierten Licht durch Doppelbrechung lamellenartig erscheinen [112].

Die Knochenoberfläche ist – mit Ausnahme der gelenknorpeltragenden Anteile – von Periost überzogen, welches neben Nerven und Blutgefäßen Osteoblasten und -klasten enthält. Hier findet das appositionelle Knochenwachstum statt, was zu einer zunehmenden Knochendicke im Laufe des Lebens führt [112].

Verbunden ist das Periost mit dem Knochen durch dicke Kollagenfibrillen (Sharpey-Fasern). Die Knochenhöhle wird durch das Endost ausgekleidet. Dieses enthält ebenfalls Osteoblasten und -klasten sowie Blutgefäße. Es ist zudem mit den Knochen trabekeln sowie den Blutgefäßen innerhalb des Knochens (Volkmann-Kanäle) verbunden. Im Laufe des Lebens übersteigen die hier stattfindenden Resorptionsvorgänge die Knochenneubildung, wodurch es zu einer allmählichen Weitung der Markhöhlen kommt [112].

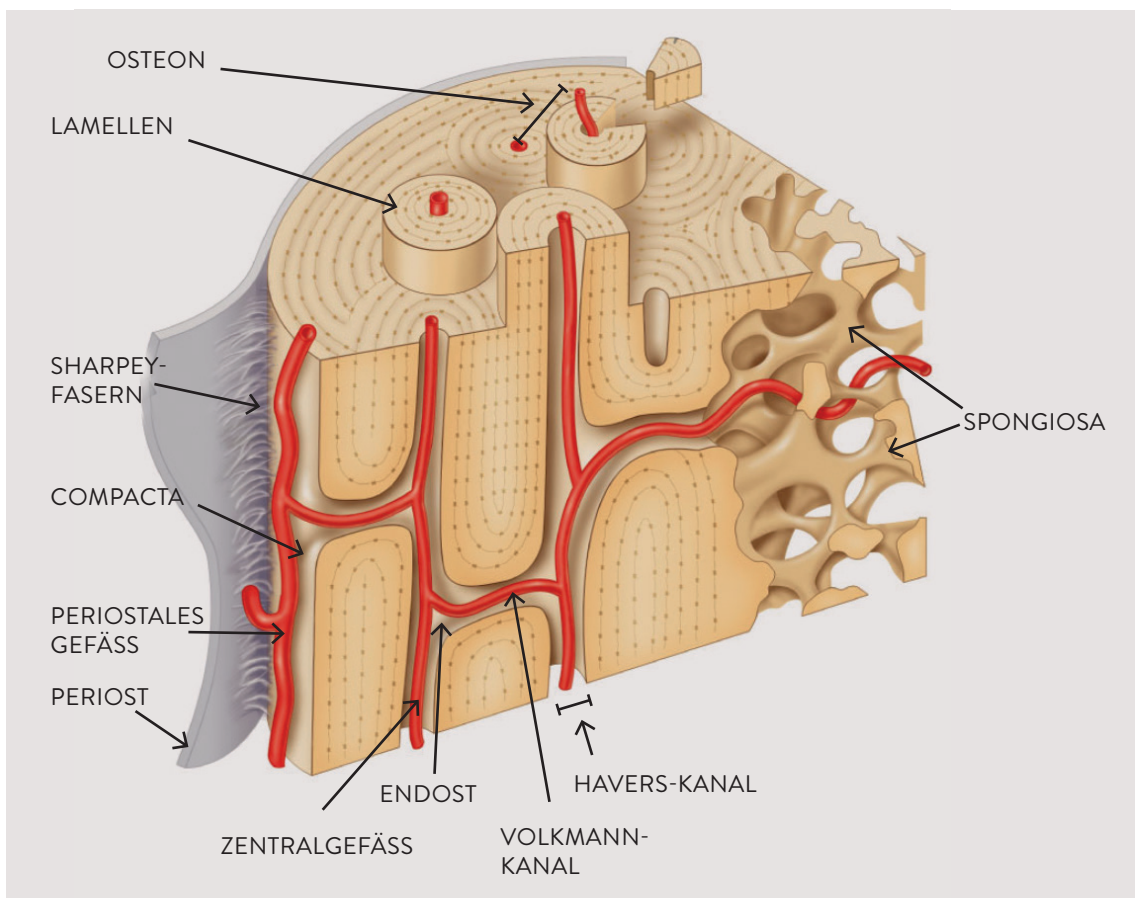


Abbildung B_12: Mikroskopische Anatomie von kompaktem Knochen (Erläuterungen siehe Text)
Modifiziert aus: Marieb E. N., Hoehn K.: *Human Anatomy and Physiology*. 7. Ausgabe, San Francisco, Pearson Education, 2007.

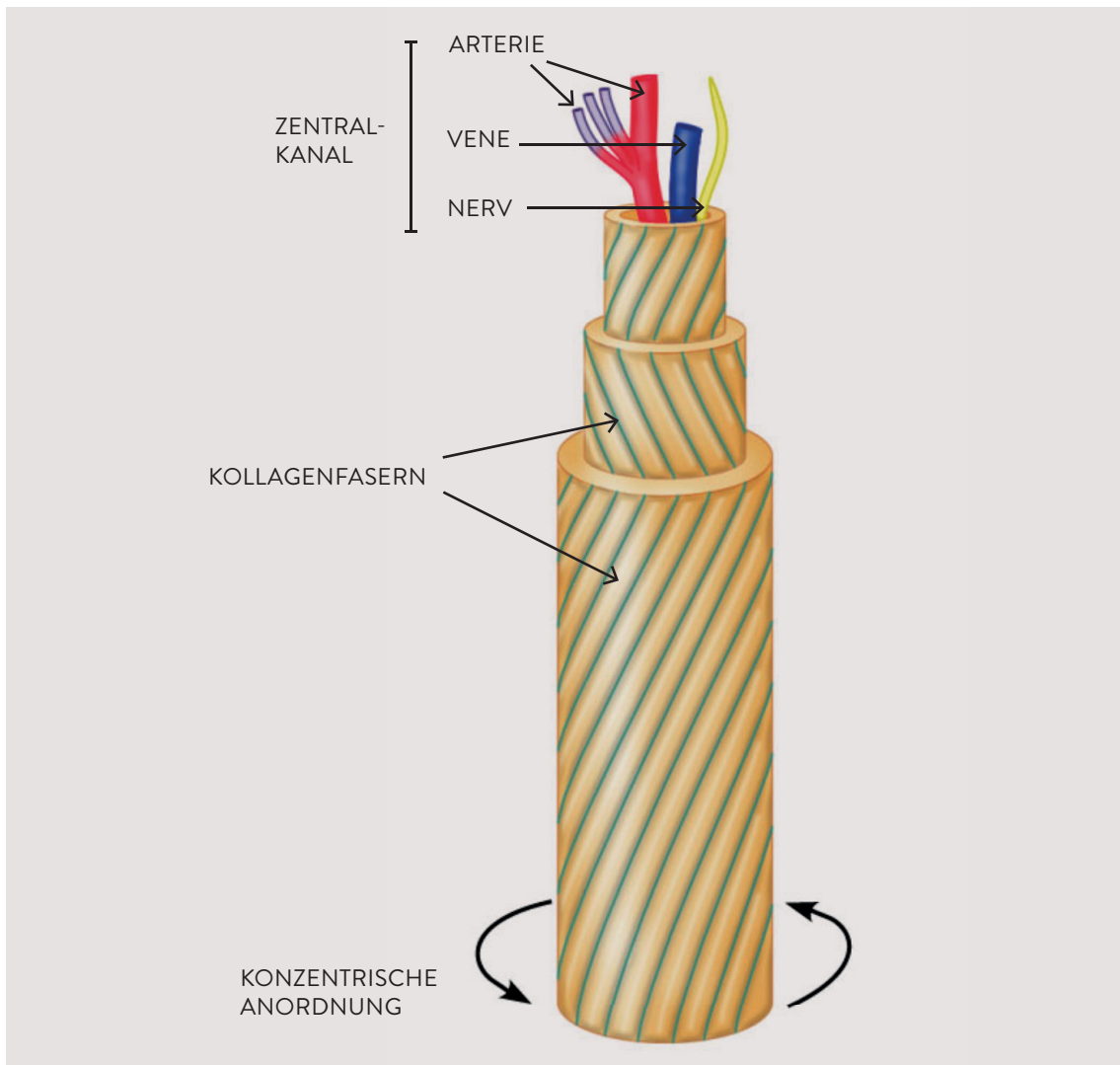


Abbildung B_13: Aufbau Osteon (Erläuterungen siehe Text)
 Modifiziert aus: Marieb E. N., Hoehn K.: *Human Anatomy and Physiology*. 7. Ausgabe, San Francisco, Pearson Education, 2007.

B 2.2 Knochenzusammensetzung

B 2.2.1 Zellformen

Während Osteoklasten vom Monozyten/Makrophagen-System abstammen, sind mesenchymale Vorläuferzellen des Knochenmarks der Ursprung der Osteoblasten. Auch die aus Osteoblasten entstehenden Osteozyten sowie die sog. *Lining*-Zellen, eine ruhende, einzellige Schicht auf der Knochenoberfläche, gehören der osteoblastären Zelllinie an [113-116].

B 2.2.1.1 Osteoblasten

Im Gegensatz zu Osteoklasten entstehen Osteoblasten aus nicht-hämatopoetischen Vorläuferzellen. Als Stammzellpool fungieren mesenchymale Stammzellen [13]. Osteoblasten entstehen durch die Aktivierung der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade. Dabei bilden sich aus spindelförmigen Osteoblastenvorläuferzellen (Progenitorzellen) über den Zwischenstatus des Pre-Osteoblasten kubische, reife Osteoblasten, die der Knochenmatrix anliegen [117].

Entscheidend beteiligt an der Differenzierung der MSCs zum Osteoblasten sind RUNX-2 und Osterix. RUNX-2 stellt dabei die Weiche in Richtung osteoblastäre Differenzierung aus der den Osteoblasten und Chondrozyten gemeinsamen Vorläuferzelle – der Skelett-Precursorzelle [119,120]. Die Bildung von RUNX-2 wiederum wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert. Dabei spielen vor allem TGF- β , BMPs, IHH und der bereits o. g. Wnt-Signalweg eine Rolle [115,118-121]. Die weitere Zellreifung und Produktion von extrazellulärer Matrix wird insbesondere durch Osterix vermittelt [118,119].

Reife Osteoblasten zeichnen sich durch einen großen Zellkern, große Golgi-Apparate und ein großes Endoplasmatisches Retikulum (ER) aus, was ihre Syntheseleistung unterstreicht. Hauptsyntheseprodukt sind das Kollagen I sowie Calciumphosphate und -carbonate [112].

Das Schicksal von Osteoblasten ist unterschiedlich. Ein Teil der Zellen geht durch Apoptose zugrunde. Daneben differenzieren sich andere Zellen zu sogenannten Osteozyten. Diese sind dadurch charakterisiert, dass sie von der gebildeten extrazellulären Matrix eingemauert wurden. Sie stehen durch Zellausläufer (*Canaliculi*) miteinander in Verbindung [122].

B 2.2.1.2 Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die aus der Monozyten/Makrophagen-Zelllinie entstehen und somit hämatopoetischen Ursprungs. Sie entwickeln sich aus einer mononukleären Precursorzelle [123]. Dabei entsteht aus der HSC zunächst die gemeinsame myeloische Vorläuferzelle (CMP) aus der schließlich die Granulozyten-Makrophagen Progenitorzelle (GMP) hervorgeht.

Für den weiteren Proliferationsprozess ist das sogenannte M-CSF (auch CSF-1)

von entscheidender Bedeutung. Man nimmt heute an, dass insbesondere Osteozyten für die Bildung des auf Osteoklastenvorläuferzellen wirkenden M-CSF verantwortlich sind, wenngleich auch für Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarkes eine Bildung von M-CSF gezeigt werden konnte [124,125]. Seine Wirkung entfaltet M-CSF dabei über den Tyrosinkinase-Rezeptor c-Fms. Die genauen molekularen Mechanismen der Signaltransduktion sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Letztlich ist dies für die Proliferation und den Erhalt von Osteoklasten-Precursorzellen entscheidend [126-128].

Neben M-CSF spielt eine weitere Gruppe von Liganden und Rezeptoren für die Osteoklastogenese eine wesentliche Rolle: das RANKL/RANK- und Osteoprotegerin-System.

RANKL (auch OPGL, ODF oder TRANCE genannt) wurde von unabhängigen Arbeitsgruppen bereits Ende der 1990er Jahre entdeckt [129-132]. Es gehört zur Gruppe der TNF-Superfamilie und entfaltet seine Wirkung durch Aktivierung des RANK-Rezeptors, der wiederum ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie darstellt [131]. Dabei führt das RANKL/RANK-System letztlich zur Aktivierung der Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen in Richtung Osteoklasten [124]. Auch hier sind die genauen molekularen Mechanismen nicht bekannt. Man geht davon aus, dass Osteozyten eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Knochen-*Remodelings* spielen. Daneben wird RANKL auch von anderen Zellen wie Stromazellen des Knochenmarks, Osteoblasten sowie T- und B-Zellen gebildet [129,130].

Als Gegenspieler des RANKL/RANK-Systems fungiert OPG, welches um die Rezeptorbindungsstelle mit RANKL konkurriert.

Studien mit *Knockout*-Mäusen haben gezeigt, dass das Fehlen von RANKL/RANK zur Ausbildung von Osteopetrose führt, wohingegen das Fehlen von OPG die Entstehung von Osteoporose nach sich zieht [133].

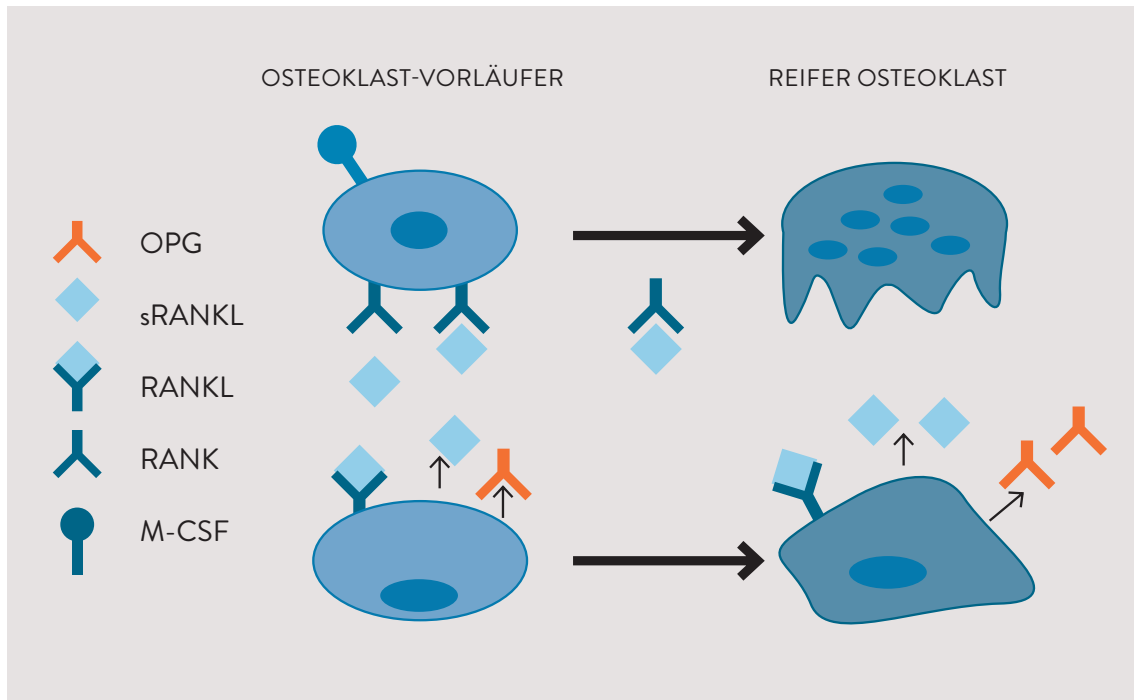


Abbildung B_14: Regulation der Osteoklastogenese

M-CSF stimuliert das Osteoklasten-Recruitment.

Es kommen zwei Formen des durch Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen und Osteozyten gebildeten RANKL vor. Zum einen eine membrangebundene Form, welche direkt benachbarte Osteoklasten-Vorläuferzellen aktiviert und zum anderen eine lösliche Form (sRANK), welche über den Interzellularraum diffundiert.

Als Gegenspieler konkurriert OPG um die Bindungsstelle von RANKL am RANK-Rezeptor.

Modifiziert aus: Clarke B.: *Normal Bone Anatomy and Physiology. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 3 (Suppl. 3):113-139, 2008.*

B 2.2.1.3 Lining-Zellen

Ein Teil der nach der Knochenbildung dem Zelltod durch Apoptose geweihten Osteoblasten formiert sich als sog. *Lining*-Zellen an der Knochenoberfläche. Dabei scheinen sie durch mechanische Stimuli und den Einfluss von Parathormon wieder in Osteoblasten redifferenzieren zu können [114,116,134].

Sie sind wesentlich an der Etablierung der Blut-Knochen-Schranke beteiligt [112].

B 2.2.2 Extrazelluläre Matrix

Knochen besteht zu ca. 50-70 % aus mineralischem (anorganischem) und zu ca. 20-40 % aus organischem Material. Daneben enthält er zu ca. 5-10 % Wasser und < 3 % Lipide. Der anorganische Anteil lässt sich untergliedern in Calciumphosphat (85-90 %), Calciumcarbonat (8-10 %), Magnesiumphosphat (1,5 %) und Calciumfluorid (0,3 %). Dabei liegen diese Mineralien als Apatit-Kristal-

le vor. Der größte Anteil davon macht Hydroxylapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ aus [135]. Der organische Anteil besteht aus ca. 20 verschiedenen Proteinen, von denen Kollagen I mit ca. 90 % den größten Anteil ausmacht [136].

B 2.3 Knochenbildung

B 2.3.1 Embryonale Aspekte der Skelettentwicklung

Die Anlage des Skelettes erfolgt in der vierten Embryonalwoche aus der paraaxialen und lateralen Mesodermplatte sowie aus der vom Neuroektoderm abstammenden Neuralleiste. Das Achsenskelett entwickelt sich dabei aus dem paraaxialen, die Extremitäten aus dem lateralen Mesoderm und die Knochen des Viszero- und Neurokraniums aus den vom Neuroektoderm abstammenden kranialen Neuralleistenzellen (NCCs).

Sich neu entwickelnde Knochen entstehen in *anterior-posteriorer* Richtung. Die Skelettentwicklung beginnt mit der Anlage der Schädelbasis. Zuletzt folgen die Knochen des Gesichtsschädels. An der Bildung des Skelettes sind neben Osteoblasten auch Chondrozyten und Osteoklasten beteiligt [137].

Die primäre Anlage von Knochengewebe entsteht über zwei unterschiedliche Mechanismen. Man unterscheidet die desmale (direkte) von der chondralen (indirekten) Knochenbildung. Dabei wird bei der desmalen Ossifikation Knochengewebe direkt aus dem Mesenchym gebildet, wohingegen bei der chondralen Ossifikation zunächst eine Knorpelmatrize angelegt wird, die später knöchern umgebaut wird [137].

B 2.3.2 Chondrale Ossifikation

Lange Röhrenknochen und das Achsenskelett entstehen hauptsächlich durch die chondrale Ossifikation. Dabei vollziehen sich deren Bildung und das spätere Längenwachstum im Bereich der sogenannten Wachstumsplatte als enchondrale Ossifikation.

Zunächst formieren sich zuvor wahllos arrangierte mesenchymale Stammzellen neu. Es kommt zu einer Kondensation der Zellen durch Proliferation und

Differenzierung in Richtung Chondrozyten sowie einer Neuordnung der Gefäßversorgung, wodurch das Zentrum dieses Kondensationskerns avaskulär bleibt. Die Gefäßversorgung ordnet sich in der Peripherie an. Die Begrenzung zwischen vaskulärer Zone und Zellen bildet das Perichondrium. Die Differenzierung der Skelett-Vorläuferzellen in Richtung Chondrozyten wird dabei über den Wnt-Signalweg gesteuert [117].

Dieser ist heruntergefahren, wodurch es zu einer verminderten Wirkung von β -Catenin und somit zu einer fehlenden Inhibierung von Sox2 kommt, was die Bildung von Chondrozyten begünstigt [118,119]. Ebenfalls scheint die geringe Sauerstoffversorgung innerhalb des Proliferationszentrums durch den Ausschluss der Vaskularisation die Chondrozytendifferenzierung positiv zu beeinflussen [138].

Hauptbestandteil der durch die Chondrozyten gebildeten extrazellulären Matrix ist zu diesem Zeitpunkt Kollagen II [137].

Die Zellen in der Mitte der Knorpelanlage beginnen sich nun in Säulen anzuordnen und zu proliferieren. Sie bilden Kollagen X, welches schließlich durch hypertroph werdende Chondrozyten mineralisiert wird (primäres Ossifikationszentrum) [137]. In der Randzone der Knorpelanlage kommt es zur Initiierung einer osteoblastären Differenzierung durch die Produktion von Ihh (*indian hedgehog*) durch Perichondriumzellen, was zur Ausbildung einer Knochenspanne führt (perichondrale Ossifikation) [139].

Die zunehmende Hypoxie im Bereich des Ossifikationszentrums führt zur Bildung des Transkriptionsfaktors Hif1 α , welcher über die Produktion von VEGF zu dessen Vaskularisation und zur Einschleusung von Osteoblasten und -klasten führt. Diese bauen die mineralisierte Matrix bestehend aus Kollagen II, X und Glykosaminoglykanen ab und bilden Kollagen I [137].

Nun entsteht ein zweites Ossifikationszentrum im Kopfbereich der Knorpelanlage. Ein Teil der sich hier befindenden Knorpelzellen differenzieren dabei zu

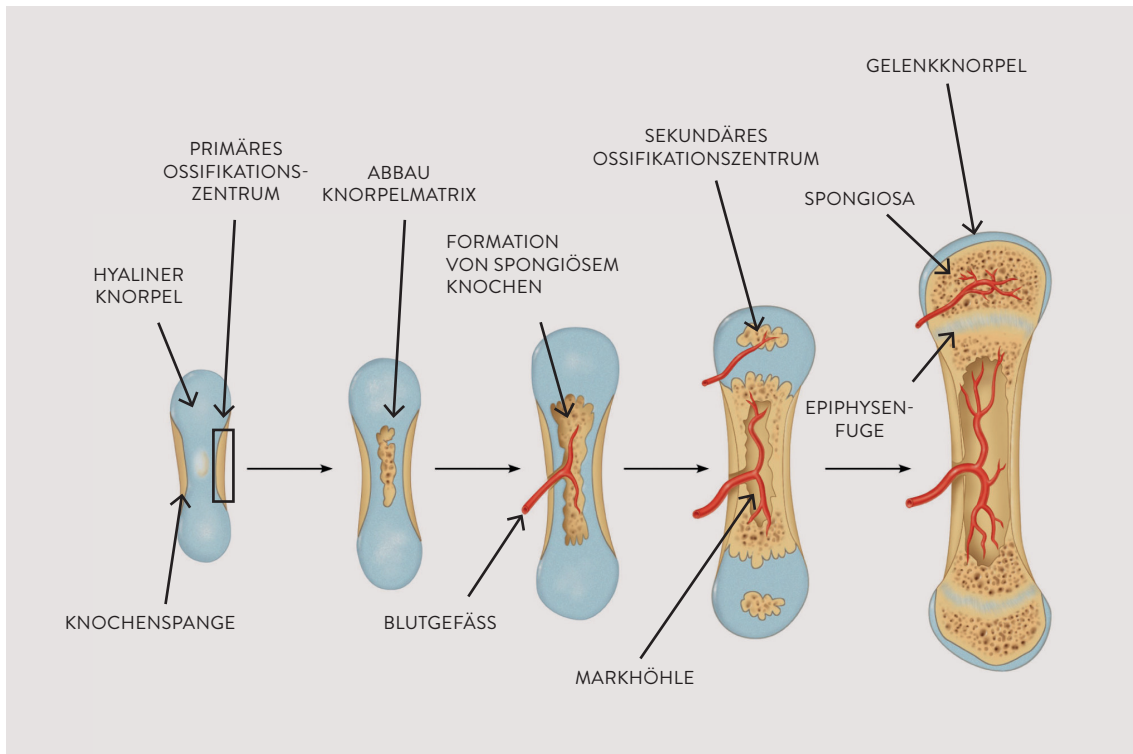


Abbildung B_15: Chondrale Ossifikation (Erläuterungen siehe Text)

Modifiziert aus: Marieb E. N., Hoehn K.: *Human Anatomy and Physiology*. 7. Ausgabe, San Francisco, Pearson Education, 2007.

Gelenkknorpel-bildenden Zellen, wohingegen der andere Teil an der Knochenbildung partizipiert. Dabei sind die zugrunde liegenden Schlüsselreize noch nicht bekannt [137].

B 2.3.3 Desmale Ossifikation

Die sogenannte desmale (direkte) Ossifikation zeichnet sich dadurch aus, dass sie sich direkt aus dem mesenchymalen Gewebe vollzieht ohne dabei eine Knorpelmatrix als Leitstruktur zu nutzen. Diese Art der Knochenbildung kommt vor allem bei der Bildung des Schädels, den flachen Anteilen des Schlüsselbeines sowie beim appositionellen Wachstum im Bereich der Röhrenknochen im Sinne ihrer Umfangvermehrung vor.

Zunächst kommt es dabei zur Vermehrung und Ansammlung von mesenchymalen Stammzellen im vaskularisierten mesenchymalen Gewebe.

Die Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen wird über den Wnt-Signalweg durch RUNX-2 und Osterix gesteuert (siehe oben) [118-120,140].

B 2.3.4 Knochenwachstum langer Röhrenknochen

Das Knochenwachstum langer Röhrenknochen vollzieht sich ebenfalls im Sinne der enchondralen Knochenbildung im Bereich der Wachstumsplatte.

Diese befindet sich im Übergang zwischen Dia- und Epiphyse (später nach Annäherung von Diaphyse und Epiphyse auch Wachstumsfuge genannt) und gliedert sich in unterschiedliche Zonen, wovon die oberste die Ruhezone darstellt. Diese besteht aus hyalinem Knorpel und Knorpelzellen, die den Vorrat für die darunter liegende Proliferationszone darstellen. In dieser findet die Vermehrung von Knorpelzellen statt, welche durch bindegewebige, longitudinal angeordnete Septen voneinander getrennt werden. Die Knorpelzellen selbst ordnen sich in Säulen an und sind jeweils durch transversale Septen voneinander separiert.

Diese strukturelle Anordnung nimmt in Richtung Diaphyse zu und bildet die sogenannte hypertrophe Zone, in der die Longitudinalsepten mineralisiert werden und die Knorpelzellen nach Auflösung der Transversalsepten apoptotisch werden. In die Longitudinalsepten wachsen schließlich Gefäße ein und mit diesen werden Osteoblasten eingeschleust, welche im Zusammenspiel mit Chondroblasten das Knorpelskelett (Primordialskelett) in Faserskelett umwandeln [139].

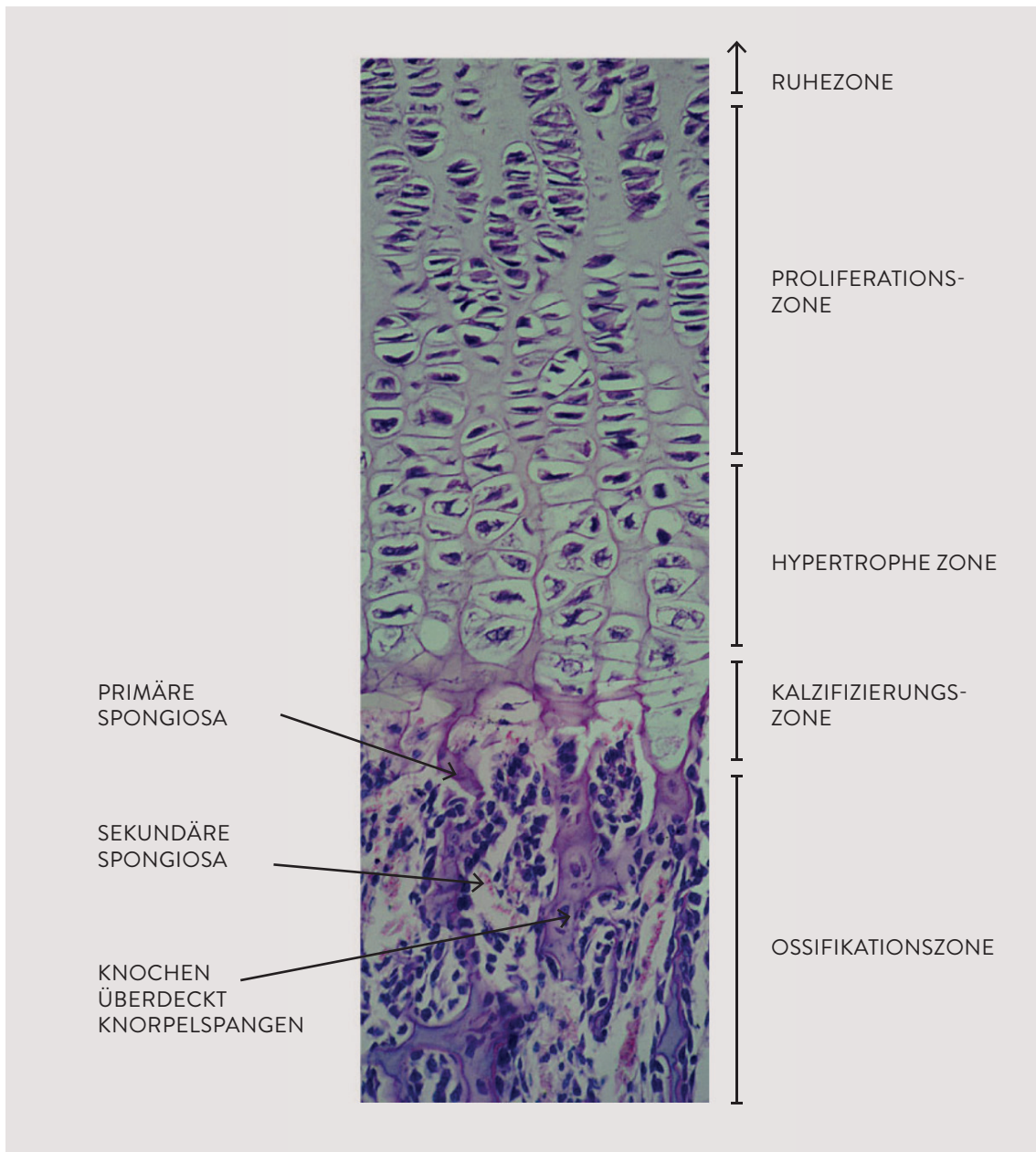


Abbildung B_16: Wachstum langer Röhrenknochen (Erläuterungen siehe Text)

Modifiziert aus: Marieb E. N., Hoehn K.: *Human Anatomy and Physiology*. 7. Ausgabe, San Francisco, Pearson Education, 2007.

B 2.4 Frakturheilung

Die Knochen- bzw. Frakturheilung vollzieht sich durch ein genau aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel von den an der Knochenheilung beteiligten Zellen und Gewebefaktoren (BMPs, TGF- β , VEGF) auf molekularer Ebene. Dabei kommt den physiologischen und biomechanischen Faktoren eine entscheidende

de Rolle zu [141-144]. Die Frakturheilung kann sich grundsätzlich auf zwei verschiedene Weisen vollziehen.

Zum einen über die primäre (direkte) und zum anderen über die sekundäre (indirekte) Heilung [145]. Am häufigsten erfolgt sie über den zweitgenannten Weg, da für die primäre Heilung ein direkter Knochenkontakt und eine starre und stabile Frakturposition erforderlich sind, die häufig nur durch invasive Maßnahmen (ORIF) erreicht werden können [145].

Knochen zeichnet sich im Gegensatz zu vielen anderen Geweben durch seine Regenerationsfähigkeit aus. Dadurch entsteht statt Narbengewebe eine *restitutio ad integrum*, also eine vollständige Regeneration ohne Funktionsverlust [145,146].

Wird die Knochenheilung in irgendeiner Weise kompromittiert, kann dies zur Heilung in Fehlstellung, verzögerten Knochenheilung oder gar zur ausbleibenden Heilung (Pseudarthrose) führen [147].

B 2.4.1 Indirekte (sekundäre) Knochenheilung

Wie oben erwähnt, stellt die sekundäre Knochenheilung die häufigste Form der Frakturheilung dar, weshalb sie hier zuerst besprochen wird. Sie ist eine Kombination aus desmaler und chondraler Ossifikation [145,146]. Im Unterschied zur primären Form benötigt sie keine starren und absolut stabilen Verhältnisse, sondern erfordert in gewissem Maße Mikrobewegungen und Belastungen [145]. Ein Zuviel an Bewegung und Belastung hingegen kann in ausbleibender Heilung münden [148].

Die Frakturheilung vollzieht sich in einer spezifischen Abfolge:

Frühe Entzündungsphase:

Diese ist gekennzeichnet durch die Entstehung eines Hämatoms, welches die Fraktur überbrückt und umgibt [145,146]. Mit diesem werden Zellen in die Frakturgegend gespült, die eine Vielzahl an proinflammatorischen Faktoren (IL-1, IL-6, TNF- α , IGF, FGF, PDGF, VEGF und TGF- β) bilden [149,150].

An der Ausschüttung dieser Faktoren beteiligt sind Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen, MSCs, Osteozyten, Osteoblasten und Chondrozyten [151,152].

Ihren Höhepunkt hat diese Phase innerhalb der ersten 24 Stunden und sie dau-

ert ca. eine Woche an [145]. Durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren kommt es letztlich durch die Umformierung des Frakturhämatoms zu einem fibrinösen Granulationsgewebe [153].

Zellrekrutierung:

Die an der Knochenheilung wesentlich beteiligten MSCs werden entweder direkt aus dem umliegenden Gewebe rekrutiert oder es werden zirkulierende MSCs aus dem Blut an die Frakturseite „gelockt“ [145,146].

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass an der Rekrutierung neben den ortsansässigen Zellen vor allem das *Homing*-Verhalten der MSCs eine wesentliche Rolle spielt, wobei durch die Überexpression von SDF-1 im Frakturbereich CXCR-4-tragende MSCs angelockt werden [61,62].

Ebenfalls beteiligt an der Rekrutierung soll Hif1 α sein, für den seinerseits über VEGF die Beteiligung an der Gefäßentstehung gezeigt wurde (siehe hierzu Kapitel B 2.3.2 „Chondrale Ossifikation“) [154].

Kallusbildung:

Nach ca. sieben bis neun Tagen beginnt sich in der Frakturzone ein weicher Kallus zu bilden, welcher durch enchondrale und perichondrale Ossifikation zwischen den Frakturrenden entsteht [155].

Der aus Kollagen II und Proteoglykanen bestehende weiche Kallus ist nicht belastbar, jedoch kommt es zu einer ersten Stabilisierung der Fraktur [156]. Daneben findet gleichzeitig unterhalb des den Frakturrenden anliegenden Periosts die Bildung von hartem Kallus durch desmale (direkte) Knochenbildung statt [145]. Letztlich wird der weiche, kalzifizierte Kallus durch harten Kallus ersetzt. Dies erfolgt in der Weise, wie es bereits bei der embryonalen, chondralen Knochenentstehung beschrieben wurde: durch den Abbau von Kollagen II und den Aufbau von Kollagen I und dessen anschließende Mineralisierung [145,146].

Entscheidend beteiligt ist hierbei der Wnt-Signalweg [157]. Die Überbrückung der Fraktur durch den harten Kallus macht diese allmählich belastbar [158]. Die Kallusbildung unterliegt der Steuerung durch TGF- β aufseiten des weichen und durch BMPs aufseiten des harten Kallus [159,160]. Die Bildung von hartem Kallus erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 14 Tagen [145].

Kallus-Remodeling:

Der gebildete Faserknochen des harten Kallus wird mit Beginn der dritten bis vierten Woche langsam in Lamellenknochen umgewandelt. Dabei kann die vollständige Umwandlung Jahre in Anspruch nehmen [161]. Hierbei erfolgt allmählich – neben osteoklastärem Knochenabbau – die Bildung von in Lamellen angeordneter Knochenmatrix durch Osteoblasten [145].

Angiogenese/Vaskularisation:

Entscheidend für eine suffiziente Knochenheilung ist das Einsprossen von Gefäßen in die Frakturregion sowie deren Neubildung [162,163].

Dabei spielen Angiopoietin 1 und 2 beim Einsprossen von bestehenden Gefäßen des Periosts in der Frühphase der Heilung eine Rolle [164].

Ganz wesentlich für die Knochenbildung durch Transformation des Knorpelgewebes in Knochengewebe im Rahmen der enchondralen Ossifikation ist VEGF (siehe hierzu auch Kapitel B 2.3.2 „Chondrale Ossifikation“) [163].

Dies konnte durch Versuche belegt werden, bei denen VEGF-Rezeptoren blockiert wurden, was zur Unterbrechung des Heilungsprozesses führte. Im Gegensatz dazu konnte die Überexpression von VEGF diesen fördern [141,163].

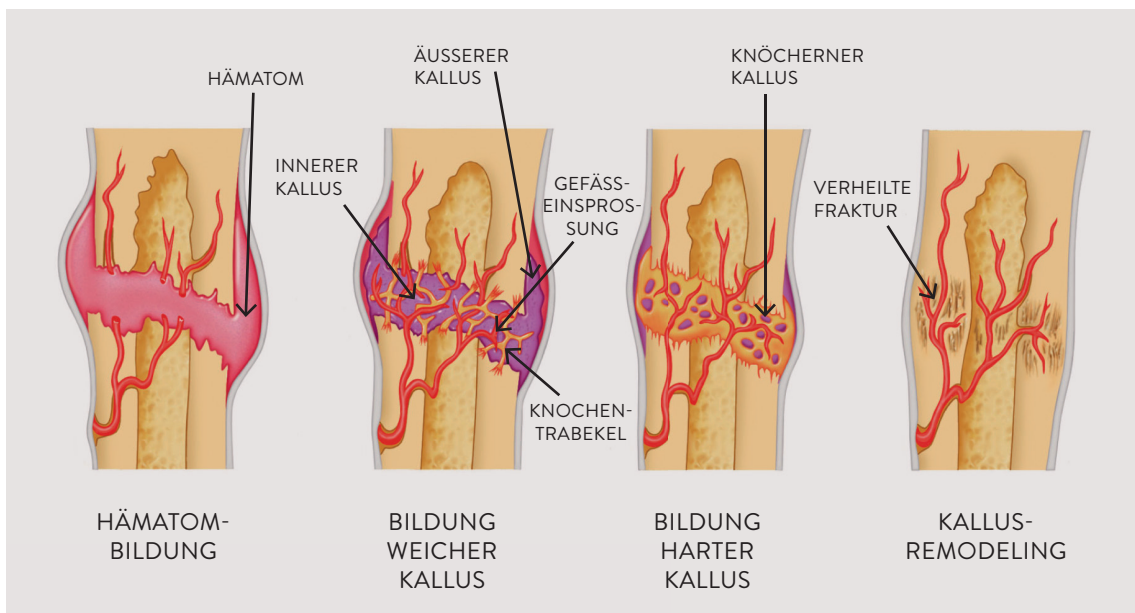


Abbildung B_17: Stadien der indirekten Frakturheilung (Erläuterungen siehe Text)

Modifiziert aus: Marieb E. N., Hoehn K.: *Human Anatomy and Physiology*. 7. Ausgabe, San Francisco, Pearson Education, 2007.

B 2.4.2 Direkte (primäre) Knochenheilung

Neben der indirekten Knochenheilung besteht die Möglichkeit der direkten Knochenheilung. Dieser Prozess kommt natürlicherweise nicht vor, da er eine anatomisch korrekte und vor allem regide Reposition voraussetzt, welche eine interfragmentäre Belastung weitestgehend ausschließt [145]. Im Unterschied zur indirekten Knochenheilung tritt hierbei eine direkte knöcherne Heilung durch die Umformierung des Lamellenknochens, der Havers-Kanäle sowie der Blutgefäße auf [155].

Dabei werden wiederum zwei Formen voneinander unterschieden:
Die Kontaktheilung einerseits und die Spaltheilung andererseits.

Kontaktheilung tritt dann auf, wenn der Abstand zwischen den Frakturrenden weniger als 0,01 mm beträgt und die interfragmentäre Beanspruchung geringer als 2 % ist [165]. Bereits vorhandene Osteone, die den Frakturspalt überbrücken, bilden die sogenannten *Cutting cones* [166], an deren Spitze Osteoklasten positioniert sind, die in axialer Richtung Kavernen in den Knochen schneiden. Dies geschieht in einer Geschwindigkeit von ca. 50-100 µm/Tag [145].

Durch das nachgeschaltete Einwandern von Osteoblasten in die Kavernen und deren Einlagerung von Osteoid erfolgt eine knöcherne Durchbauung ohne Kallusbildung und die simultane Neuformierung des Havers-Systems [155,167]. Das folglich neugebildete System führt zum Einsprossen von Gefäßen, wodurch die zelluläre Versorgung für die weiteren Umbauvorgänge zum Lamellenknochen gewährleistet ist [156,168].

Die zweite Form wird als sogenannte Spaltheilung bezeichnet. Dabei sollte der Spalt jedoch nicht mehr als 0,8-1 mm betragen [167]. Im Gegensatz zur Kontaktheilung wird das Havers-System hierbei nicht simultan gebildet, sondern es erfolgt zunächst die Überbrückung des Spaltes mit parallel angeordnetem Lamellenknochen, in dem sich parallel angeordnete Osteone bilden, was ca. drei bis acht Wochen in Anspruch nimmt [145]. Der Lamellenknochen wird anschließend durch einen Remodellierungsprozess – ähnlich dem der Kontaktheilung durch *Cutting cones* – umgebaut [165].

B 2.5 Knochenplastizität

Zeitlebens ist das Skelett Umbau- sowie Ab- und Aufbauvorgängen unterworfen. Diese stellen ein streng aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel aus Resorption und Neubildung dar. Damit wird gewährleistet, dass altes Knochengewebe ab- und neues aufgebaut wird (*Remodeling*). Zudem wird dadurch der Calcium/Phosphat-Haushalt geregelt [113]. Im Zuge der Alterung laufen diese Prozesse zunehmend ungleichmäßig ab, wodurch es zum allmählichen Verlust von Knochenmasse kommt (Osteoporoseentstehung) [113].

Daneben ist Knochen in der Lage, sich an veränderte Anforderungen (z. B. höhere Belastungen) anzupassen, indem Knochen an Stellen höherer Beanspruchung an- und an anderen Stellen geringerer Belastung abgebaut wird (*Modeling*) [113].

Diese Adaptation von Knochen an dessen biomechanische Beanspruchung wurde bereits durch Julius Wolff 1892 beschrieben (Wolff'sches Gesetz) [169]. Neben bestimmten Krankheiten wie der renalen Osteodystrophie im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz und beim Hyperparathyreodismus werden diese Umbauvorgänge (*Modeling*) auch durch äußere Einflüsse getriggert (z. B. Anabolika-Einnahme) [170-172].

Im Speziellen erfolgen die Umbauvorgänge durch ein Zusammenspiel aus Osteoklasten und -blasten sowie den *Lining*-Zellen und Osteozyten [173,174].

Die Knochenumbauvorgänge laufen im Sinne einer funktionellen und anatomischen Einheit – den sogenannten BMUs (*basic multicellular units*) – ab, wovon es ca. ein bis zwei Millionen innerhalb des Skelettsystems gibt und welche asynchron nebeneinander arbeiten [173].

Die Summe dieser Einheiten stellt die Gesamtheit des Knochen*remodelings* dar. Dabei ist das *Remodeling* im trabekulären Knochen höherfrequent als im kortikalen Knochen. Dieses beträgt lediglich 2-3 % im Jahr, was ausreichend für den Erhalt der mechanischen Integrität des Knochens ist. Dies scheint ein Hinweis auf die größere Beteiligung des spongiösen Knochens am Calcium/Phosphat-haushalt zu sein [112].

Das *Remodeling* erfolgt in mehreren Stufen. Zunächst erfolgt der Knochenabbau über die Rekrutierung von Osteoklastenvorläuferzellen, die sich schließlich

zu mehrkernigen Klasten zusammenschließen. Wesentlich am Rekrutierungsvorgang beteiligt ist M-CSF.

Die Aktivierung der Osteoklastenvorläufer erfolgt durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes von Osteoprotegerin zugunsten von RANKL. RANKL, welches wiederum im Wesentlichen von Osteozyten gebildet wird, wirkt dabei in zellgebundener oder löslicher Form auf Osteoklastenvorläufer über den entsprechenden Rezeptor ein und führt zu deren Differenzierung in Richtung Osteoklasten. Daneben spielen IL-1 und -6, Parathormon, 1-25-dihydroxyvitamin D und Calcitonin eine Rolle [175].

Neben der Resorptionsphase der Osteoklasten, erfolgt die Bildung von Osteoblasten aus ihren Vorläuferzellen (MSC → Osteoprogenitorzelle), welche für die Bildung von Osteoid und dessen spätere Mineralisierung zuständig sind. Man nimmt heute an, dass beide Prozesse in sogenannten *Bone remodeling compartments* (BRC) ablaufen, die von einem Dach aus Osteozyten bedeckt sind [114,174,176].

Dabei sind beide Prozesse miteinander gekoppelt, um den Verlust von Knochenmasse zu verhindern. Die molekularen Mechanismen dieser Kopplung sind bis dato noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass sowohl systemische als auch lokale Faktoren, die Freisetzung von Botenstoffen aus der Knochenmatrix (z. B. IGF-1 und TGF- β) als auch Zell-Zell-Interaktionen daran beteiligt sein könnten [177-183].

B 2.6 Knochenresorption

Die Resorption des Knochens erfolgt in einem abgeschlossenen Raum unterhalb des Faltsaumes (*ruffled border*) der Osteoklasten [184]. Das Milieu in diesem Resorptionsraum ist im Vergleich zur Umgebung durch die Tätigkeit von H⁺-Adenosintriphosphatasen (H⁺-ATPasen) saurer mit einem pH-Wert um ca. 4.5 [185]. Die Quelle der H⁺-Ionen stellt dabei Kohlensäure dar, aus der durch eine intrazelluläre Carboanhydrase H⁺-Ionen und eine konjugierten Base (HCO₃⁻) entstehen. Dem elektrischen Gradienten folgend werden in den Resorptionsraum neben H⁺-Ionen über Chloridkanäle passiv Cl⁻-Ionen geschleust. Diese gelangen über die antiresorptive Seite der Zelle im Austausch mit HCO₃⁻ in die Zelle [186].

Um die organischen Anteile der Knochensubstanz abzubauen, bedarf es des Enzyms Cathepsin K, welches per Vesikeltransport durch den Mechanismus der vesikulären Exozytose in den Resorptionsraum gelangt [187]. Die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran wird über SNARE-Proteine (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors*) unter der Regulation von Synaptotagmin bewerkstelligt [188].

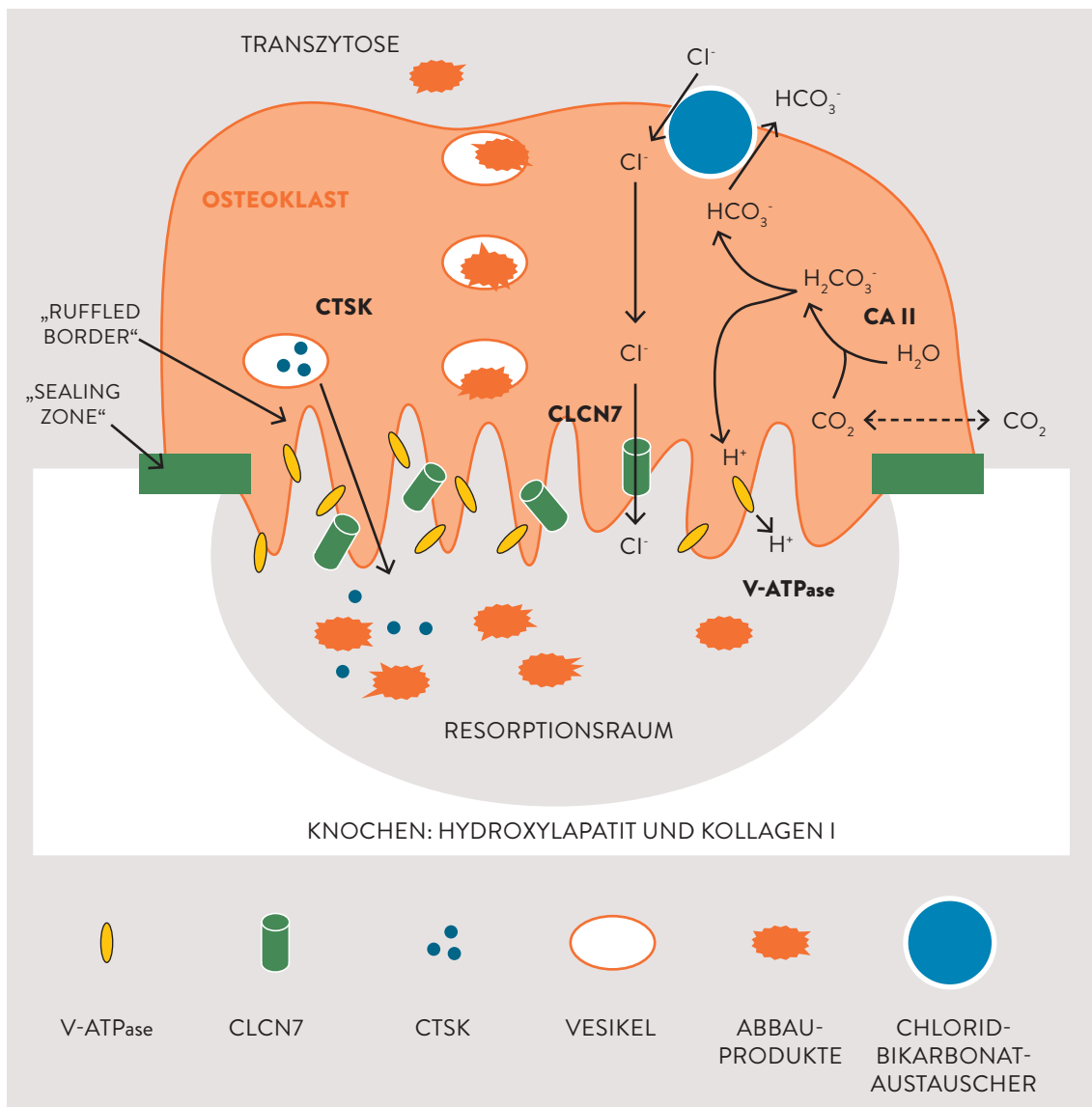


Abbildung B_18: Knochenresorption (Erläuterungen siehe Text)

CA II (Carboanhydrase), V-ATPase (Protonenpumpe), CLCN7 (Chloridkanal), CTSK (Cathepsin K)

Modifiziert aus: Feng X., McDonald J. M.: Disorders of bone remodeling. *Annu. Rev. Pathol.* 6:21-145, 2011.

Die Bindung der Osteoklasten an die Knochenmatrix erfolgt über das Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Dieses erkennt dabei die RGD-Sequenz von verschiedenen Matrixproteinen (Osteopontin, Vitronectin, *bone sialoprotein*). Dadurch kommt es letztlich über eine Signalkaskade zur Aktivierung einer intrazellulären GTPase, welche an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist. Schließlich kommt es zur Ausbildung eines Actinrings, welcher den Resorptionsraum von seiner Umgebung isoliert [189-194].

B 2.7 Regulation des Knochenbaus

Wenngleich bis heute nicht vollständig geklärt ist, welche Mechanismen in Gänze für die Regulation des Knochenbaus verantwortlich sind, so ist es doch wahrscheinlich, dass es sich um ein Zusammenspiel der o. g. Mechanismen handelt [112]. Die Prozesse, die den Resorptionsvorgang beenden und die Neubildung durch Bildung von extrazellulärer Matrix und deren spätere Mineralisation steuern, sind nicht gänzlich bekannt [112]. Proteine aus der extrazellulären Matrix (BMPs, IGF-1 und -2, TGF- β , PDGF, FGF) scheinen dabei jedoch eine Rolle zu spielen [195-197].

Die Ausbildung von Resorptionsräumen durch Änderung des Zytoskeletts, die Bildung des Faltensaums durch Insertion von H^+ -ATPasen in die Zellmembran und die Exozytose von Cathepsin K-haltigen Vesikeln ebenso wie die Rekrutierung und Reifung von Osteoklastenvorläufern durch M-CSF und RANKL/RANK spielen dabei eine entscheidende Rolle. Zudem scheint es wahrscheinlich, dass sich diese Aktivierungskaskaden auch gegenseitig beeinflussen [198-201].

Neuere Erkenntnisse geben Grund zu der Annahme, dass weitere Mechanismen in diesen Regulationskreislauf eingreifen. Es konnte beispielsweise *in vitro* ein weiterer Aktivator des c-Fms-Rezeptors gefunden werden: das Zytokin IL-34 [202]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IFN- γ den RANKL-Signalweg inhibiert [203-206].

B 3 TISSUE ENGINEERING

B 3.1 Begriffserklärung

Eine allgemeingültige Definition von *Tissue engineering* fehlt zwar, jedoch lässt sich sagen, dass im Zentrum des Bestrebens die Regeneration und Reparatur von biologischem Gewebe durch die Anwendung wissenschaftlicher Prinzipien bezüglich dessen Form, Konstruktion, Modifikation und Wachstum steht. Dabei kommen lebende Zellen, Biomaterialien und bioaktiven Substanzen zum Einsatz [9,207].

Tissue engineering steht im Kontext mit der Interdisziplinarität von Medizin, Wissenschaft und Ingenieurwesen [9]. Heutzutage hat *Tissue Engineering* das Ziel, Gewebedefekte durch ortsspezifisches, funktionales Gewebe zu ersetzen (z. B. Knochen durch Knochen). Hierfür ist eine Vaskularisation des Transplantates, dessen Integration und Umbau von Nöten [208].

In Hinblick auf *Tissue engineering* von Knochen bilden die drei Hauptkomponenten osteogene Zellen, osteokonduktives Trägermaterial und osteoinduktive Wachstumsfaktoren [208]. Ein Augenmerk liegt dabei auch auf der Kostenreduktion [209,210].

Somit ist aus ökonomischer Sicht ein schneller, planbarer und mechanisch kompetenter Knochenersatz zu erzielen [10].

B 3.2 Historisches

Die Anfänge dieser Fachdisziplin lassen sich nur schwer festlegen. Wenngleich im Buch Genesis bereits von ersten Erfahrungen hinsichtlich der Erschaffung des Menschen die Rede ist [211] und Lexer 1908 die Verwendung von Kadaver-Amputaten zur Gelenkrekonstruktion erforschte [212], so kann aus wissenschaftlicher Sicht vielleicht die Entdeckung der Autoinduktion von Zellen zur Knochenheilung durch Urist 1965 [213] und die daraus hervorgegangene Isolierung der BMPs gut 15 Jahre später durch Sampath und Reddi (1981 und 1983) [214,215] als Initialzündung für das *Tissue engineering* des Knochens angesehen werden. Bis zum klinischen Einsatz von BMP 7 sollte es noch bis zum Jahr 2001 dauern [216].

1970 untersuchte Green das Verhalten von kultivierten Chondrozyten zur Knorpelheilung. Dabei waren diese auf sterilisiertem Knochen aufgebracht. Auch wenn diese Versuche größtenteils fehlschlagen, schlussfolgerte er, dass durch die Besiedlung von geeignetem Trägermaterial mit Zellen eine Gewebeheilung möglich sein könnte [217].

Die BBC-Dokumentation *Tomorrow's World* rückte *Tissue engineering* 1997 erstmals in das kollektive Bewusstsein. Sie zeigte die Versuche von Cao und Vacanti, die auf dem Rücken einer Maus Knorpelzellen in Form eines menschlichen Ohres formten [218].

B 3.3 Knochentransplantate

B 3.3.1 Autologe Knochentransplantate

Goldstandard, um Knochendefekte zu heilen, ist die Verwendung von Knochen selbst. Dabei kommt den autologen Transplantaten hinsichtlich ihrer Biokompatibilität sowie ihrer biologischen Aktivität, nämlich ihrer osteogenen, osteoinduktiven, osteokonduktiven und osteointegrativen Eigenschaften, die größte Bedeutung zu [219-221]. Dies lässt sich nicht zuletzt aus der Tatsache ableiten, dass Knochen durch Knochen der gleichen Spezies und desselben Organismus transplantiert wird. Dadurch sind Abstoßungsreaktionen bei identischer HLA-Expression ausgeschlossen [222].

Am häufigsten werden dabei kortiko-spongiöse Transplantate aus dem Beckenkamm gewonnen, da dieser leicht zugänglich ist und oft ausreichend Knochen-substanz bietet [221].

Problematisch hingegen ist die Komorbidität aufseiten der Entnahmestelle (iatrogene Frakturen, chronische Schmerzen, operative Komplikationen) sowie die Verlängerung der OP-Zeit [6,223-225].

B 3.3.2 Allogene Knochentransplantate

Ebenfalls von großer klinischer Bedeutung sind allogene Knochentransplantate [226,227]. Sie zeigen jedoch naturgemäß hinsichtlich ihrer Biokompatibilität

große Nachteile, was eine vorherige Behandlung derselben mittels Kryotechnik und Bestrahlung notwendig macht [228]. Dies wiederum führt zu deutlich schlechteren biologischen und mechanischen Eigenschaften der Transplantate [229-236].

Neben der möglichen Gefahr von Krankheitsübertragungen (HIV, Hepatitis) oder der Einschleusung von Tumorzellen können immunologisch bedingte Reaktionen zur verminderten Implantateinheilung führen [235,237].

B 3.4 Knochenersatzmaterialien

Man unterscheidet zwischen anorganischen (Metalle, Keramiken, Glas) und organischen Knochenersatzmaterialien. Die organischen Materialien werden wiederum unterteilt in natürliche (demineralisierte Knochenmatrix, Cellulose, Kollagen, Hyaluronsäure, Fibrin) und synthetische Polymere (z. B. Polylactide (PLA), Polyethylenglycol (PEG), Polyglycolsäure (PGA) und Polyurethan (PUR)) [135,221,222,238].

Der entscheidende Vorteil von synthetischen Knochenersatzmaterialien gegenüber autologen oder allogenen Knochenmaterialien ist ihre uneingeschränkte Verfügbarkeit, die Beschaffungsprozedur sowie deren Unbedenklichkeit hinsichtlich Krankheitsübertragungen [135].

Zudem besteht durch moderne Methoden die Möglichkeit „maßgeschneiderte“ Implantate zu entwickeln, die den Knochendefekt exakt ausfüllen [135]. Knochenersatzmaterialien, die dazu verwendet werden Knochenheilung zu generieren, können auf unterschiedliche Weise für dieses Ziel herangezogen werden. Dabei stehen sich zelluläre und nichtzelluläre Ansätze gegenüber [154].

Beim zellulären Ansatz werden die Knochenersatzmaterialien als Trägersubstanzen benutzt, die *in vitro* mit Zellen beimpft werden, um *in vivo* Knochen zu bilden [238].

Beim nicht-zellulären Ansatz erfolgt die Einbringung eines Knochenersatzmaterials ohne dabei Zellen miteinzuschleusen [238]. Dabei besteht jeweils die Möglichkeit, die Matrize mit knocheninduktiven Substanzen (BMP, TGF- β) zu benetzen [238].

Bestenfalls sollten Knochenersatzmaterialien, die dem Zweck der Knochenneubildung dienen sollen, folgende Eigenschaften aufweisen [135]:

→	Dreidimensionalität
→	Zeitliche Kopplung von Implantatabbau und neuer Knochenformation
→	Fehlende Toxizität der verwendeten Stoffe und möglichst vollständige Ausschleußung aus dem Organismus
→	Biokompatibilität, Osteoinduktion, Osteokonduktion, (Osteogenität)
→	Stabile Verbindung von Implantat und Knochen
→	Knochenähnliche biomechanische Eigenschaften
→	Sterilisierbarkeit
→	Anpassung an die Defektsituation („ <i>custom made</i> “)

B 3.5 Zellvermittelte Strategien

Zellvermittelte Strategien bedienen sich der Fähigkeiten von bestimmten (nicht-differenzierten) Zellen, in Zellen mit Eigenschaften des zu ersetzenden Gewebes zu differenzieren. Dabei werden sie entweder in undifferenzierter oder differenzierter Form auf die Matrize aufgebracht. Eine andere Strategie verfolgt endogene Einflüsse der auf das Trägermaterial aufgebrachten Zellen, beispielsweise durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z. B. BMPs), welche für die Rekrutierung, Differenzierung und sekretorischen Eigenschaften bestimmter ortsansässiger Zellen (z. B. SSCs) notwendig sind [10].

Neben der Wahl der geeigneten Zellen in Bezug auf ihre osteogene Differenzierbarkeit (z. B. ESCs, iPSCs, BM-MSCs, Ad-MSCs) kommt dabei ihrer Kultivier- und Expansionsfähigkeit *in vitro* sowie ihrer phänotypischen Stabilität große Bedeutung zu [9,208]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass MSCs nach einer gewissen Kultivierungsdauer Alterungserscheinungen unterliegen [239]. Der Gewinnung von primären Osteoblasten oder ihren Vorläuferzellen wiederum steht zudem ein invasives Verfahren gegenüber, was zu einer Komorbidität sei-

tens der Entnahmestelle führt [224]. Auch das Einbringen retroviraler Vektoren oder die Kultur mit xenogenem Serum lassen aufgrund der damit verbundenen Infektionsgefahr den Einsatz im humanen Modell unwahrscheinlich erscheinen [240].

Für andere Zellen konnte ein weniger invasives Verfahren zu deren Gewinnung sowie gute Ergebnisse bzgl. der Behandlung größerer Knochendefekte gezeigt werden [241-244].

B 4 MONOZYTEN

B 4.1 Allgemeines

Monozyten gehören der Leukozytenpopulation an und machen rund 10 % dieser im Blut aus [245]. Sie stammen letztlich von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab, aus der – wie oben erwähnt – sämtliche Zellen des blutbildenden Systems hervorgehen [43,46].

Ihre Reifung erfolgt im Knochenmark sowie der Milz aus der gemeinsamen myeloischen Progenitorzelle (CMP), über die Granulozyten/Makrophagen Progenitorzelle (GMP) und schließlich über die Makrophagen/DC (*dendritic cell*) Progenitorzelle (MDP) [245-248]. Unter dem Einfluss von Kolonie-stimulierenden Faktoren entwickeln sich aus der monozytären Progenitorzelle Makrophagen, dendritische Zellen, Osteoklasten, Mikroglia und Kupffer-Zellen [245,246,249-251]. Entscheidend für deren Entwicklung ist auf molekularer Ebene der M-CSF sowie dessen Rezeptor [252]. Dabei scheint die Reifung der hämatopoetischen Stammzelle in Richtung myeloische und schließlich in Richtung monozytäre Zellformen eng mit dem Transkriptionsfaktor PU.1 verbunden zu sein [253]. Man fand beispielsweise bei M-CSF-Rezeptor-defizienten Mäusen eine deutlich verminderte Anzahl an Monozyten im Blut [255-257]. Andererseits konnten bei alleiniger Expression des M-CSF-Rezeptors bei PU.1-defizienten Mäusen keine Makrophagen entwickelt werden, was die Bedeutung des Transkriptionsfaktors für deren Entwicklung unterstreicht [258]. Darüber hinaus scheint IL-34 ebenfalls wesentlich an der Entwicklung der mononukleären, phagozytierenden Linie beteiligt zu sein [203].

Den Monozyten kommt im Rahmen der immunologischen Sofortreaktion eine entscheidende Bedeutung bei der angeborenen, zellulären Immunantwort zu. Dabei phagozytieren und verdauen sie Bakterien und andere Zellen und pro-

duzieren Entzündungsmediatoren, die Bakterien, Parasiten und Viren abtöten bzw. andere Zellen aktivieren [251,259]. Sie agieren zudem als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem, indem sie spezifische Immunzellen durch Antigen-Präsentation aktivieren [246]. Des Weiteren sind sie an der Aufrechterhaltung der Blut- und Organhomöostase beteiligt, indem sie Stoffwechselmetaboliten und apoptotische Zellen beseitigen [260].

Ursprünglich fasste man unter dem mononukleären, phagozytierenden System (MPS) die im Blut zirkulierenden Monozyten sowie die aus ihnen hervorgehenden Gewebsmakrophagen zusammen [361]. Die Entdeckung der dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen zeigte darüber hinaus, dass Monozyten neben ihrer phagozytierenden Funktion eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation spielen [262].

Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass das mononukleäre, phagozytierende System deutlich komplexer aufgebaut ist, als ursprünglich angenommen [245]. Dabei unterscheiden sich insbesondere dendritische Zellen und Makrophagen hinsichtlich ihres Phänotyps, Ursprungs, ihrer Lokalisation, ihres Proliferationsverhaltens sowie ihrer Funktion [262,263]. Man geht heute davon aus, dass den meisten Zellformen des mononukleären, phagozytierenden Systems eine gemeinsame myeloische Progenitorzelle zugrunde liegt, die ihrerseits aus der hämatopoetischen Stammzelle entsteht [247,264-266]. Dieser sogenannte MDP hat das Differenzierungspotenzial in Richtung Granulozyten verloren [247,267,268]. Aus dieser Progenitorzelle entstehen sowohl Monozyten, Makrophagen als auch über eine gemeinsame Vorläuferzelle klassische dendritische Zellen der lymphatischen Organe und plasmazytoide dendritische Zellen des peripheren Blutes. Diese entwickeln sich jedoch nicht aus einer monozytären Zellform [247,267,268].

Im Gegensatz zur früheren Annahme, Monozyten würden lediglich eine Zwischenstufe auf dem Weg zu reifen Gewebsmakrophagen darstellen, weiß man heute, dass sie im Knochenmark, Blut sowie der Milz zirkulieren und sich während eines Entzündungsgeschehens zu Antigen-prozessierenden und -präsentierenden dendritischen Zellen sowie zu Makrophagen differenzieren, die sich jedoch von klassischen oder plasmazytoiden dendritischen Zellen sowie vielen Gewebsmakrophagen – wie zum Beispiel Langerhans-Zellen und Mikroglia – unterscheiden [245,246]. Beispielsweise bilden sich Langerhans-Zellen aus einer embryonalen Vorläuferzelle, welche bereits vor der Geburt die Epidermis besiedelt und während der ersten Lebenswoche das Langerhans-Netzwerk etabliert. Die weitere Rekrutierung erfolgt aus diesem Netzwerk selbst. Sie bilden

somit ihren eigenständigen Vorläufer-Pool ohne aus Monozyten zu entstehen – Ähnliches gilt für die Mikroglia [245,246,269]. Wie oben erwähnt etabliert sich ein Großteil der dendritischen Zellen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle. Zur Charakterisierung von humanen Monozyten mittels Oberflächenmarker wird meist CD 14 herangezogen, jedoch ist dieser nicht zweifelsohne spezifisch. Beispielsweise exprimieren auch manche dendritische Zellen und B-Zellen CD 14 [270,271]. Anhand ihres Musters bzgl. der Expression von CD 14 und CD 16 lassen sich humane Monozyten in zwei Gruppen unterscheiden: CD 14⁺/CD 16⁻ (klassische Monozyten) sowie CD 14⁺/CD 16⁺ (nicht-klassische Monozyten) Zellen [272,273]. Erstere machen ca. 80-90 % der Monozyten im Blut aus und produzieren nach Stimulation mit LPS insbesondere IL-10, wohingegen CD 14⁺/CD 16⁺-Zellen als proinflammatorisch gelten und sich durch die Produktion von TNF- α und IL-1 auszeichnen [274-276]. Die CD 14⁺/CD 16⁺-Zellform wurde später noch weiter unterschieden: in nicht-klassische (CD 14^{low}/CD 16⁺⁺) und intermediäre (CD 14⁺⁺/CD 16⁺) Monozyten [277]. Während eine eindeutige Charakterisierung dieser intermediären Monozyten noch aussteht, gibt es Hinweise auf deren Beteiligung bei Entzündungsgeschehnissen [278]. Zudem wird ihnen ein prognostischer Nutzen in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen beige-messen [279].

B 4.2 Monozyten als Stammzellen

Vorangegangene Arbeiten zeigten für Monozyten aus dem peripheren Blut einen Stammzellcharakter, welcher sich durch die Expression von Pluripotenz-assoziierten Genen, vorübergehende Zellteilungsmanöver sowie schließlich die Entwicklung eines differenzierten Phänotyps auszeichnet [19,281].

2003 berichteten Zhao *et al.* über eine Subpopulation der monozytären Zelllinie im peripheren Blut. Ihnen gelang dabei *in vitro* die Differenzierung in Zellen mit Eigenschaften von Makrophagen, T-Lymphozyten, Epithel- und Endothelzellen, neuronalen Zellen und Hepatozyten [282].

Später konnten Romagnani *et al.* für CD 14⁺/CD 34^{low}-Zellen aus der Monozyten-Population des peripheren Blutes ein multipotentes Differenzierungspotenzial in Zellen mit endothelialen oder osteoblastären sowie adipozytären oder neuronalen Eigenschaften zeigen [282].

Ebenfalls 2003 waren es Kuwana *et al.*, die aus dem peripheren Blut zirkulierende Zellen mit einem einzigartigen Phänotyp isolieren konnten (*Monocyte-derived*

Mesenchymal Progenitor: MOMP) [16]. Diese Zellen waren für die CD-Marker 14, 34, 45 sowie Kollagen I positiv. Ihre Generierung erfolgte auf Fibronectin-benetzten Kulturschalen sowie in mit CD14-Zellen konditioniertem Medium. Sie zeigten *in vitro* ein mesenchymales Differenzierungspotenzial, wobei sie zu Zellen mit Eigenschaften von Knochen-, Knorpel-, Fett- und Skelettmuskelzellen stimuliert wurden [258].

Im Folgenden gelang Kodama *et al.* die Differenzierung von MOMP in Kardio-myozyten-ähnliche und neuronale Zellen [283,284].

Kuwana *et al.* wiederum gelang 2006 deren endotheliale Differenzierung *in vitro* und *in vivo* [285]. Dabei zeigte sich jedoch im xenogenen Tumorstromavaskularisationsmodell eine geringe Tendenz zur Neovaskularisation. Vielmehr steigerte die Co-Injektion der MOMP mit Kolonkarzinom-Zellen die Angiogenese der Tumore [258].

2008 beschrieben Pufe *et al.* eine weitere von der CD14⁺-Population aus dem peripheren Blut abstammende Zellform, die sogenannte *Programmable Cell of Monocytic Origin* (PCMO) [15]. Dabei erfolgte die Gewinnung dieser Zellen über einen Dedifferenzierungsweg *in vitro* durch die Kultivierung in M-CSF- und IL-3-haltigem Medium. Ihnen gelang dabei über eine anschließende Behandlung mit IGF-1, TGF- β sowie BMP 2 und/oder BMP 7 eine chondrogene Re-Differenzierung. Darüber hinaus fanden sie Hinweise auf eine osteoblastäre Differenzierbarkeit im Sinne einer Produktion von Kollagen I [15]. Dabei wurde für PCMOs ebenfalls ein charakteristisches Expressionsprofil an Oberflächenmarkern gezeigt [15]. Dieses zeichnete sich durch die Expression von CD 14, 45, 90 sowie geringen Mengen CD 34 aus [15].

Ruhnke *et al.* gelang 2005 über eine spezifische Re-Differenzierungsbehandlung *in vitro*, die Generierung von Hepatozyten-ähnlichen Zellen (*NeoHeps*) mit FGF-4-haltigem Medium sowie von Insulin-produzierenden Zellen über HGF- und EGF-haltiges Medium nach anschließender Transplantation in Mäuse [18,286]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Re-Differenzierung dieser Zellen von der Re-Aktivierung der Pluripotenz-Transkriptionsfaktoren Nanog und Oct-4 abhängig ist und dies mit der Aktivierung des Proliferations-assoziierten MAPK/ERK-Signalwegs einhergeht [287,288].

Ungefroren *et al.* konnten die Regulationsmechanismen, die dem Pluripotenz-Potenzial und der mitotischen Aktivität von PCMOs im Rahmen ihrer Kultivierung zugrunde liegen, näher beschreiben. So zeigten sie, dass die Expression der Pluripotenzmarker Oct-4 und Nanog über Activin/Smad2 positiv und über TGF- β /Smad3 negativ kontrolliert wird [380].

Die Proliferationskapazität von PCMOs konnte bisher über zwei Maßnahmen gesteigert werden: zum einen durch die Verwendung von autologem Serum anstelle von fetalem Kälberserum, zum anderen durch die Zugabe von exogenem EGF und HB-EGF in das Kulturmedium [388,389].

C ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Berichte über die Dedifferenzierungs- bzw. Transdifferenzierungsfähigkeit von Monozyten aus dem peripheren Blut sind eine vielversprechende Alternative für das *Tissue engineering* von Knochen mittels einer autologen Zellressource. Für gewöhnlich sind adulte Stammzellen selten, es mangelt an spezifischen Markern für deren Charakterisierung und ihre Vermehrung *in vitro* stellt ein Problem dar [18]. Darüber hinaus stehen Stammzellen zur klinischen Anwendung aufgrund ethischer und gesetzlicher Fragen, der Gefahr von Krankheitsübertragungen oder Immunreaktionen häufig nicht zur Verfügung [281].

Ein osteoblastäres Differenzierungspotenzial würde diese Zellen zu einer geeigneten Quelle für das *Tissue engineering* von Knochen machen, da sie leicht und in großer Zahl zu gewinnen und darüber hinaus ethisch unbedenklich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grundlage der Versuche von Kuwana *et al.* sowie Pufe *et al.* die Eignung von Monozyten für das *Tissue engineering* von Knochen überprüft, indem ihre osteoblastäre Differenzierbarkeit untersucht wurde [15,16].

IM SPEZIELLEN HATTE DIE VORLIEGENDE ARBEIT FOLGENDE ZIELSETZUNGEN:

1. Die Generierung von PCMOs und MOMPps in Anlehnung an die Protokoll von Pufe *et al.* und Kuwana *et al.* [15,16].
2. Die phänotypische Charakterisierung dieser Zellen nach einer sechstägigen Vorbehandlung sowie nach einer vierzehntägigen Differenzierungsbehandlung im Vergleich zu MSCs und primären Osteoblasten über:
 - I. Die Zellmorphologie.
 - II. Die Expression von Oberflächenmarkern.
 - III. Die Expression von Schlüssel-Transkriptionsfaktoren im Rahmen der osteoblastären Differenzierung.
 - IV. Die Genexpression von „typischen“ Osteoblastenmarkern auf RNA-Ebene.
3. Die Überprüfung der osteoblastären Differenzierung von PCMOs und MOMPps hinsichtlich funktioneller Aspekte.

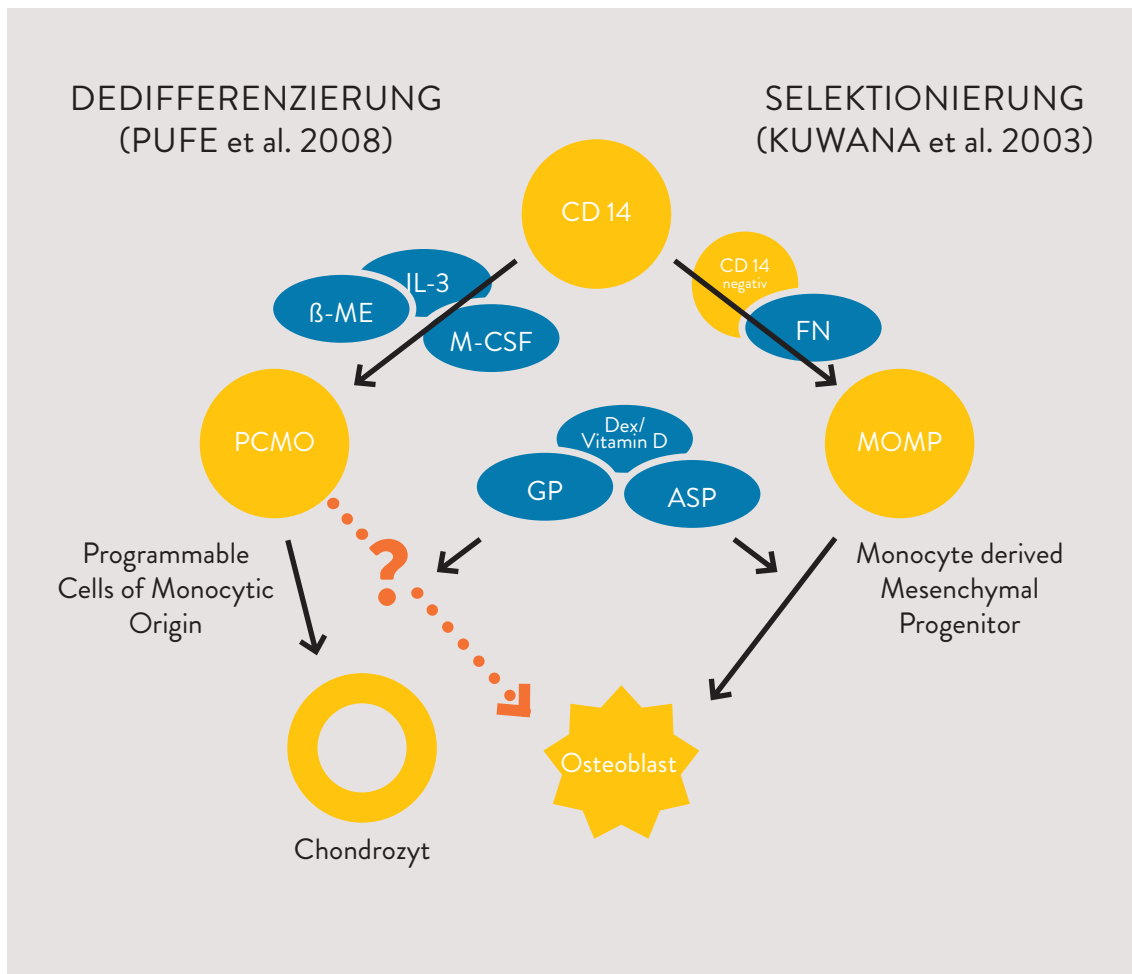


Abbildung C_1: Übersichtsgrafik „Zielsetzung der Arbeit“

CD 14-positive Zellen lassen sich entsprechend den Versuchen von Pufe *et al.* sowie Kuwana *et al.* in Zellen mit Stammzellcharakter dedifferenzieren respektive selektionieren [15,16]. Diese Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass durch eine entsprechende Differenzierungsbehandlung die Generierung von Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften möglich ist.

D MATERIAL UND METHODEN

D 1 MATERIAL

D 1.1 Verwendete Geräte

Dako Autostainer Link 48	Dako, Hamburg, Deutschland
Elektrophorese-System SubCell® GT Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
FACS Canto II	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE 2005-5	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
FLUOstar Omega	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Inkubator HERAcell 150	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Intas Gel iX Image Instrument	Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss, München, Deutschland
<i>Mastercycler</i> EP S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

NanoDrop®	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Sterilwerkbank MSC Advantage	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Stickstofftank LS 3000	Tylor-Wharton, Husum, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Wasserbad inkl. Thermostat	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

D 1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Kryoröhrchen (2 ml)	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Einmal-Injektionskanülen Sterican®	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen Inject® 2teilig	Braun, Melsungen, Deutschland
Multiwellplatten	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pasteurpipetten (150 + 230 mm), Glas	neoLab, Heidelberg, Deutschland

PCR-Reaktionsgefäße Multiply®-Strip	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten (2,5; 5, 10, 25 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plastikküvetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15, 50 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen (75, 175 cm ²)	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Zellkulturschalen (10 cm ²)	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Zellschaber (20 mm Lamelle)	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich

D 1.3 Chemikalien

Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
AlamarBlue®-Reagenz	Biozol, Eching, Deutschland
Alizarin Rot S	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Avidin HRP Konjugat	BioLegend, San Diego, CA, USA
2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase II	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Desoxyribonukleosdtriphosphate (dNTP-Mix)	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
99,9 %iges N, N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Echtblausalz	Waldeck GmbH & Co. KG
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Essigsäure ($\geq 99,0$ %)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol (70 und 100 %)	Apotheke Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<i>Fast red violet</i> LB Salz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Formaldehyd-Lösungen (verschiedene Konzentrationen)	Apotheke Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

(Dako Real™) Hämatoxylin	Dako, Hamburg, Deutschland
H ₂ O PCR <i>grade</i>	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Isopropanol	Apotheke Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
LSM 1077	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magnesiumchloridlösung (25 µM)	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Naphtol-AS-MX-Phosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumtartrat Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Oil Red O</i>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
para-Nitrophenol-Lösung (pNP)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
para-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat (pNPP)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PBS	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
10x Reaktionspuffer (Mg ²⁺ -frei)	Axon, Kaiserslautern, Deutschland

Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sulforhodamin B-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Taq DNA-Polymerase (1000 U)	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
TRIFAST	Peqlab, Erlangen, Deutschland
TRIS-Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau (0,5 %)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Tween-20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

D 1.4 Nährmedien und Zusätze

L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DMEM	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
DMEM <i>low glucose</i>	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich

Dulbecco's PBS	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
FCS	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Fibronectin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
L-Glutamin	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HAM's-F12	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
HEPES	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hygromycin B	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Indomethacin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Insulin	Apotheke Universitätsklinikum Tübingen, Deutschland
MEM-EARLE	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
RPMI 1640	PAA Lab. GmbH, Pasching, Österreich
Vitamin D	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

D 1.5 **Verwendete Kits**

<i>Dako REAL™ EnVision™ DetectionSystem, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse</i>	Dako, Hamburg, Deutschland
<i>First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	ThermoFisher, Darmstadt, Deutschland
<i>Great EscApe™ SEAP FluorescenceDetection Kit</i>	Clontech, Mountain View, CA, USA

D 1.6 **Zytokine**

Rekombinates, humanes TNF- α	Preprotech, Hamburg, Deutschland
Rekombinanter, humaner sRANK Ligand	Preprotech, Hamburg, Deutschland
Rekombinanter, humaner M-CSF	Preprotech, Hamburg, Deutschland
Rekombinantes, humanes IL-3	Preprotech, Hamburg, Deutschland

D 1.7 Antikörper

Polyklonaler <i>anti-human</i> sRANK Ligand AK (Kaninchen)	Preprotech, Hamburg, Deutschland
Biotinylierter, polyklonaler <i>anti-human</i> sRANK Ligand AK (Kaninchen)	Preprotech, Hamburg, Deutschland
Polyklonaler <i>anti-human</i> TNF- α AK (Kaninchen)	Preprotech, Hamburg, Deutschland
Biotinylierter, polyklonaler <i>anti-human</i> TNF- α AK (Kaninchen)	Preprotech, Hamburg, Deutschland
CD 14 <i>mouse anti-human</i> : FITC	Biozol, Eching, Deutschland
CD 45 <i>mouse anti-human</i> : FITC	Biozol, Eching, Deutschland
CD 90 <i>mouse anti-human</i> : APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD 105 <i>mouse anti-human</i> : PE	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA

D 1.8 Lösungen und Puffer

AGAROSE-GEL

1,5 %ige Agarose

1x konzentrierter TBE-Puffer

→ Erhitzen in der Mikrowelle

→ 1,5 µl Ethidiumbromid/50 ml Gel

0,5 %ige ALIZARIN ROT-FÄRBELÖSUNG (STOCK) (pH 4)

200 mg Alizarin Rot S 0,5 %

40 ml ddH₂O

AP-FÄRBEPUFFER (500 ml)

2,5 ml 99,9 %iges Dimethylformamid 0,5 %

203,5 mg MgCl₂ (MW 203,3 g/mol) 2 mM

500 ml 0,1 M TRIS-Puffer (pH 8,5)

1 M AP-PUFFER (pH 10,5)

3,75 g Glycin (MW 75,07 g/ mol) 50 mM

12,11 g TRIS-Base (MW 121,1 g/ mol) 100 mM

203 mg MgCl₂ (MW 203,3 g/ mol) 1 mM

→ auf 900 ml mit ddH₂O auffüllen

→ pH mit NaOH auf 10,5 einstellen

→ auf 1 L mit ddH₂O auffüllen und bei RT lagern

AP-REAKTIONSPUFFER (1 ml)

0,6 mg Echtblausalz
0,1 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat
in 1 ml AP-Färbepuffer

AP-SUBSTRATLÖSUNG

1,3 mg para-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat (pNPP)
1 ml 0,1 M AP-Puffer (pH 10,5)

L-ASCORBINSÄURE-2-PHOSPHAT-LÖSUNG

128 mg L-Ascorbinsäure-2-Phosphat
10 ml PBS
→ Sterilfiltration
→ Aliquotierung: 20 x 0,5 ml; 1 Aliquot/500 ml Medium (0,05 M)
→ Lagerung bei -20 °C

BLOCKIERUNGSPUFFER ELISA

10 mg BSA 1 %
1 ml PBS
→ Sterilfiltration, bei 4 °C eine Woche haltbar

10 %iges CETYLPYRIDIUMCHLORID

10 mg Cetylpyridiumchlorid 10%
100 ml ddH₂O

0,7 %ige KOLLAGENASE-LÖSUNG

0,7 mg Kollagenase II in 1ml PBS

0,7 %

DEPC H₂O

1 ml DEPC

1 L ddH₂O

→ Inkubation für 1 h bei 37 °C

→ Autoklavieren

→ Abkühlung bei RT vor Anwendung

ESSIGSÄURELÖSUNG (1 %)

44.5 ml ddH₂O

500 µl Essigsäure ≥ 99,0 %

1 %

→ Lagerung bei RT

FIXIERUNGSPUFFER TRAP-FÄRBUNG

50 µl Triton-X-100

0,1 %

50 ml 3,7 %ige Formaldehyd-Lösung

β-GLYCEROPHOSPHAT-LÖSUNG

108 mg β-Glycerophosphat

10 ml PBS

→ Sterilfiltration

Aliquotierung: 20 x 0,5 ml; 1 Aliquot/500 ml Medium (0,05 M)

→ Lagerung bei -20 °C

10x LADEPUFFER GELELEKTROPHORESE (10 ML)

50 % Glycerol

1 mM EDTA

1 Spatelspitze Bromphenolblau

→ 20 Minuten autoklavieren und bei RT aufbewahren

NATRIUMCARBONAT-FORMALDEHYD-LÖSUNG

50 g Natriumcarbonat

250 ml 35-40 % Formaldehyd

1 L ddH₂O

5 %ige NATRIUMTHIOSULFAT-LÖSUNG

50 g Natriumthiosulfat

1 L ddH₂O

OIL RED O-STOCKLÖSUNG

0,7 g *Oil Red O*

0,35 %

200 ml Isopropanol

→ bei RT lagern

OIL RED O-ARBEITSLÖSUNG

6 ml *Oil Red O*-Stocklösung

0,2 %

4 ml ddH₂O

→ jeweils frisch ansetzen

PCR-LADEPUFFER (5x KONZENTRIERT)

1 mg Bromphenolblau

25 ml 10x konzentrierter TBE-Puffer

5 ml Glycerol

20 ml H₂O

→ Lagerung bei 4 oder - 20 °C

3 %ige SILBERNITRATLÖSUNG

30 g Silbernitrat

1 L ddH₂O

→ dunkel lagern

SULFORHODAMIN B (SRB)-LÖSUNG

0,2 g Sulforhodamin B

0,4 %

→ auf 50 ml mit 1 %iger Essigsäure auffüllen

→ bei RT dunkel lagern

TBE-PUFFER (10x KONZENTRIERT)

540 g Tris-aminomethan (MW 121,14 g/mol)

275 g Borsäure (MW 6,83 g/mol)

37,3 g EDTA (MW 372,24 g/mol)

5 L H₂O

→ auf pH 8,3 kalibrieren

TRAP-FÄRBE LÖSUNG

1 mg Naphtol AS-MX Phosphat 0,01 %

6 mg *Fast red violet* LB Salz 0,06 %

100 µl 99,9 %iges N, N-Dimethylformamid 1 %

10 ml TRAP-Färbepuffer (pH 5)

TRAP-FÄRBEPUFFER (pH 5)

3,28 g Natriumacetat 40 mM

2,3 di-Natriumtartrat Dihydrat 10 mM

800 ml ddH₂O

→ pH auf 5 mit HCl titrieren

→ mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen

10 MM UNGEPUFFERTE TRIS-LÖSUNG (pH 10-10,5)

0,606 g TRIS-Base 10 mM

→ auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen

→ bei RT lagern

0,1 M TRIS-PUFFER (pH 8,5)

12,11 g TRIS-Base (MW 121,14 g/mol)

1 L ddH₂O

→ auf pH 8,5 mit HCl kalibrieren

TRYPANBLAU-LÖSUNG

0,75 ml Trypanblau 0,5 %

0,125 %

2,25 ml PBS

WASCHPUFFER ELISA

0,250 ml Tween-20

0,05 %

500 ml PBS

D 1.9 Kulturmedien

KULTURMEDIUM FÜR PRIMÄRE OSTEOLASTEN

500 ml MEM/HAM's-F12 im Verhältnis 1:1
50 ml FCS (10 %)
5 ml Penicillin/Streptomycin (2 mM)
5 ml L-Glutamin (2 mM)
0,5 ml L-Ascorbinsäure-2-Phosphat-Lösung (0,5 mM)
0,5 ml β -Glycerophosphat-Lösung (0,5 mM)

KULTURMEDIUM FÜR MSCs

500 ml DMEM *high-glucose*
50 ml FCS (10 %)
5 ml Penicillin/Streptomycin (2 mM)
5 ml L-Glutamin (2 mM)

KULTURMEDIUM FÜR MFB-F11-ZELLEN

500 ml DMEM	
5 ml Penicillin/Streptomycin (2mM)	1 %
5 ml L-Glutamin (2 mM)	
50 ml FCS	10 %
560 μ l Hygromycin B 15 μ g/ μ l	15 μ g/ml

KULTURMEDIUM FÜR MONOZYTEN

RPMI 1640
10 % autologes Serum
2 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 μ g/ml Streptomycin

KULTURMEDIUM FÜR MOMP_s

DMEM *low glucose*

10 % autologes Serum

2 mM L-Glutamin

10 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

D10-MEDIUM

DMEM

10 % FCS

DEDIFFERENZIERUNGSMEDIUM FÜR PCMO_s

RPMI 1640

10 % autologes Serum

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

5 ng/ml M-CSF

0,4 ng/ml IL-3

140 µmol/L β-Mercaptoethanol

ADIPOGENES DIFFERENZIERUNGSMEDIUM FÜR MSC_s (8 ml)

7,9 ml Kulturmedium für MSC_s

8 µl Dexamethason 10⁻⁶ M

48 µl Insulin 2x 10⁻⁶ M

8 µl 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) 0,5 mM

11,2 µl Indomethacin 0,2 mM

OSTEOGENES DIFFERENZIERUNGSMEDIUM FÜR MOMP_s, PCMO_s UND MSC_s

Jeweiliges Kulturmedium

50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

10 mM β-Glycerophosphat

100 nM Dexamethason oder 5 µM Vitamin D

OSTEOGENES DIFFERENZIERUNGSMEDIUM FÜR OSTEOLASTEN

DMEM/HAM's F-12 im Verhältnis 1:1

5 % FCS

1 % Penicillin/Streptomycin

10 mM β-Glycerophosphat

200 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

25 mM HEPES

1,6 mM Calciumchlorid

100 nM Dexamethason

D 1.10 Software

Endnote X5

Japone/Team LnDL, Thomas Reuters, San Francisco, USA

FlowJo

Tree Star Inc., Ashland, OR, USA

GraphPad Prism 6.0

GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA

ImageJ 1.48

National Institute of Health, USA

Intas Image Software

Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland

OMEGA Software FLUOstar, V1.10

BMG Labtech, Offenburg, Deutschland

D 2 METHODEN

D 2.1 Isolation und Kultivierung von humanen Osteoblasten

Die Gewinnung von Osteoblasten erfolgte durch Zerkleinerung von gespendeten Hüftköpfen unter der Sterilwerkbank mittels einer Luer-Zange auf ein Volumen von ca. 1 cm³.

Die so gewonnenen Knochenstücke wurden in ein mit 40 ml PBS-Puffer befülltes 50 ml Falcon-Röhrchen (A) überführt. Anschließend wurde das Röhrchen auf 50 ml mit PBS-Puffer aufgefüllt und die Knochenfragmente wurden durch Schwenken gewaschen. Der Überstand wurde mithilfe einer serologischen Pipette entfernt und pro 1 ml Knochenvolumen die entsprechende Menge einer 0,7 %igen Kollagenase-Lösung hinzugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation im Wasserbad bei 37 °C und gelegentlichem Schwenken der Lösung wurde

der Überstand in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen (B) überführt und die Knochenfragmente zweimal mit PBS gewaschen. Dieser Überstand wurde ebenfalls dem Röhrchen B zugeführt. Die so vorbehandelten Knochenfragmente wurden in Kulturflaschen von 175 cm² überführt und nach Zugabe von 25 ml Kulturmedium (MEM/HAM's F-12) in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelegt. Der Überstand aus Röhrchen B wurde bei 20 °C und 600 g ohne Bremsfunktion zentrifugiert und das Pellet nach Resuspension in 25 ml MEM/HAM's F-12-Medium ebenfalls in einer 175 cm² Kulturflasche ausgesät. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C und 5 %igem CO₂-Gehalt [290,291].

D 2.2 Isolation von humanen MSCs aus dem Knochenmark

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark wurden im Rahmen von Hüftgelenktotalendoprothesen-Implantationen bei Schenkelhalsfrakturen gewonnen. Das schriftliche Einverständnis der Spender lag jeweils vor.

Die gewonnenen Proben mussten je nach Viskosität zunächst mit PBS verdünnt werden, um sie pipettieren zu können.

Je 8 ml Knochenmark/PBS-Suspension wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 ml LSM 1077 aufgeschichtet.

Anschließend erfolgte eine zwanzigminütige Zentrifugierung bei 344 g und Raumtemperatur (RT) zur Phasentrennung. Die oberste, fettige Phase wurde abgesaugt und die Serumphase durchstoßen, um die mononukleären Zellen zu gewinnen. Dabei wurden alle Zellen eines Spenders in eine 75 cm² Zellkulturflasche gegeben und mit 15 ml Osteoblastenmedium versehen.

Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 48 Stunden. Dabei wurden nicht-adhären wachsende Zellen entfernt. Anschließend erfolgte je nach Versuchsanordnung das Passagieren der Zellen bei einer Konfluenz von 70-80 %. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Die nicht-adhären Zellen (naBMCs) wurden als Kontrolle verwendet [292,293].

D 2.3 Isolation und Kultivierung von Monozyten aus dem peripheren, venösen Vollblut

Die Gewinnung von peripherem Vollblut erfolgte mittels Blutabnahmesystemen in EDTA-Röhrchen.

Anschließend wurde das Blut in sterilen Falcon-Gefäßen gesammelt und dessen Gesamtvolumen sowie die Zellzahl bestimmt.

Nun erfolgte die Dichtegradientenzentrifugierung, indem auf je 15 ml LSM 1077 35 ml Vollblut vorsichtig aufgebracht wurden, ohne die entstehenden Phasen miteinander zu vermischen. Die so vorbereiteten Falcon-Gefäße wurden in einer Zentrifuge bei 22 °C und 1000 g ohne Bremsfunktion 20 Minuten zentrifugiert.

Entsprechend ihrer Dichte erfolgte die Anordnung der Phasen. Von oben nach unten: Plasma, Monozytenphase, Gemisch aus LSM und Lymphozyten, Erythrozyten. Das Spenderplasma wurde abpipettiert, bei 57 °C inaktiviert und für spätere Anwendungen bei -20 °C eingefroren.

Die Monozytenphase wurde in neue Falcon-Gefäße überführt und anschließend mit PBS wieder in Suspension gebracht, um die Zellen zu waschen.

Es schloss sich eine erneute, zehnmündige Zentrifugierung bei 22 °C und 630 g mit Bremsfunktion an. Der Überstand wurde entfernt. Dieser Vorgang (Waschen in PBS und Zentrifugierung) wurde einmal wiederholt und die Zellzahl der Suspension aus Zellen und Kulturmedium erneut bestimmt.

Anschließend wurden die Zellen bei einer Dichte von 10×10^4 Zellen/cm² auf unbehandelte Kulturflaschen ausgesät. Nach 2 Stunden konnten die nicht-adhären wachsenden Zellen mit PBS entfernt und die adhären Zellen dem jeweiligen Versuchsaufbau entsprechend im jeweiligen Kulturmedium expandiert werden [18,286-289].

D 2.4 Passagieren von Zellen

Adhärenz wachsende Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert und bei einer Konfluenz von ca. 70-80 % des Flaschenbodens zur weiteren Expansion passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Ablösung der adhärenz wachsenden Zellen durch fünfminütige Inkubation mit Trypsin bei 37 °C im Brutschrank. Die Ablösung wurde lichtmikroskopisch überprüft und die Zellsuspension abgesaugt. Das durch zehnmünütige Zentrifugierung bei 600 g gewonnene Zellpellet wurde mit Kulturmedium in Suspension gebracht und anschließend entsprechend den Versuchsanforderungen auf neue Kulturflaschen oder -schalen bzw. auf Wellplatten bei einer Dichte von ca. 10×10^4 ausgesät.

D 2.5 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl (beispielsweise beim Einfrieren und Auftauen von Zellen) wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Diese wie auch das Deckglas wurde mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Das Deckglas wurde nach Anfeuchten der Trägerstege mit Atemluft in der Weise aufgebracht, dass Newton'sche Interferenzfarben sichtbar wurden. Anschließend wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt. Wiederum 10 µl dieser Mischung wurden in die Zählkammer überführt und die 4 Eckquadrate des Zählgitters ausgezählt. Die Gesamtzahl wurde gemittelt und mit 10.000 sowie dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Dadurch ergab sich die Zellzahl pro Mikroliter.

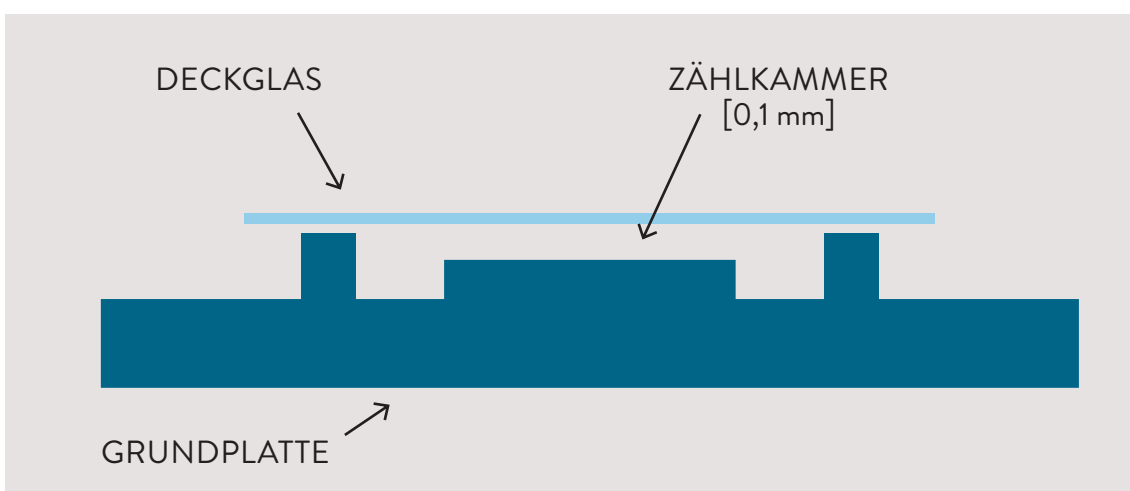


Abbildung D_1: Aufbau Neubauer-Zählkammer

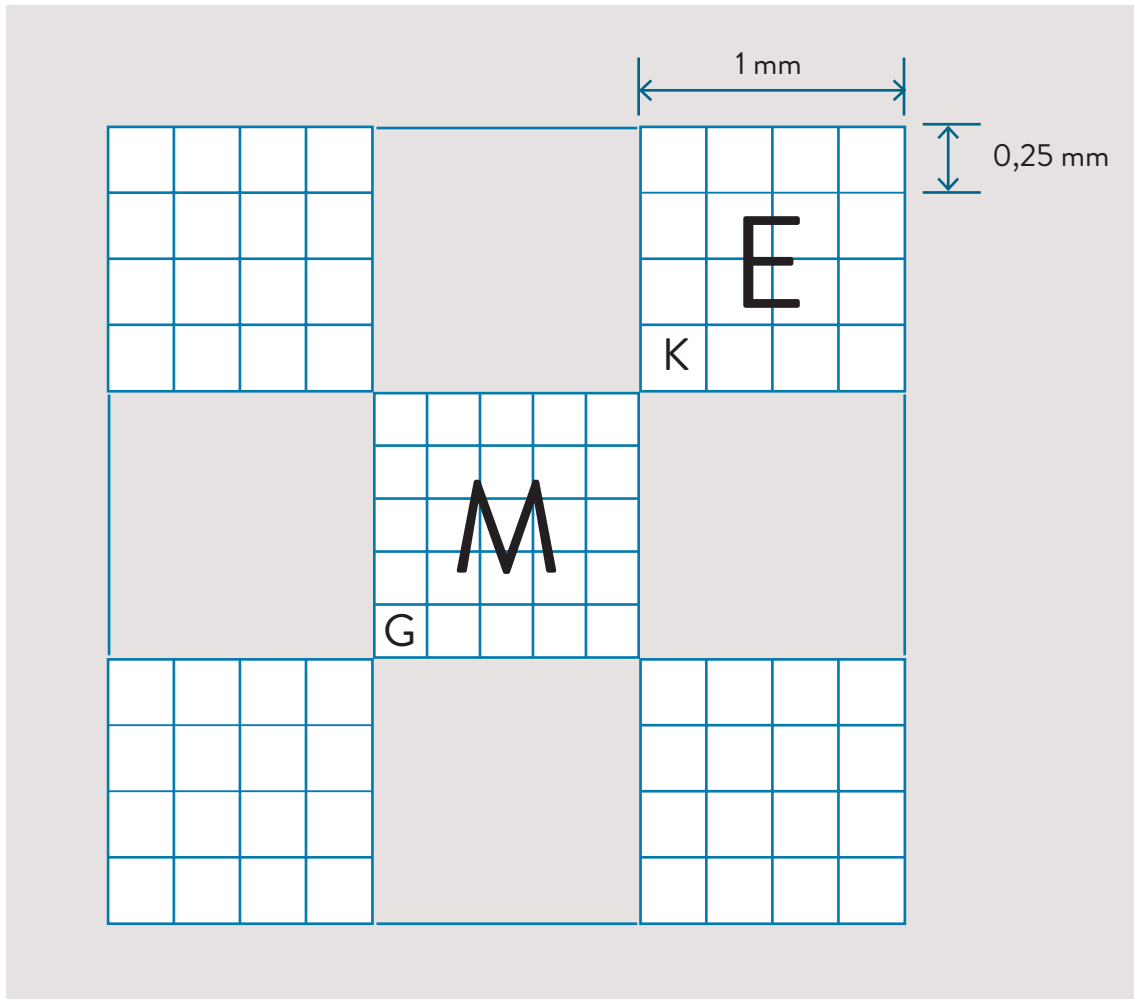


Abbildung D 2: Aufbau Zählgitter (E = Eckquadrat, M = Mittelquadrat, K = Kleinquadrat, G = Gruppenquadrat)

D 2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Von den einzelnen Spendern wurden unterschiedliche Zellpopulationen nach Passagieren derselben für spätere Versuche und Analysen eingefroren. Dabei mussten adhärent wachsende Zellen bei einer Dichte von ca. 80 % des Flaschenbodens durch Zugabe von einfach konzentriertem Trypsin 5-10 Minuten im Brutschrank (37,0 °C, 5 % CO₂) abgelöst werden. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei 22 °C und 300 g zentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert, um deren Zellzahl zu bestimmen.

Die Zellen wurden mit kaltem Kryomedium (50 % Kulturmedium, 40 % FCS Gold, 10 % DMSO) bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml nach vorheriger zehninüti-

ger Zentrifugierung bei 4 °C und 300 g in Suspension gebracht. Je 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden in vorgekühlte Kryoröhrchen aufgeteilt und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Nach zweitägiger Lagerung bei -80 °C wurden sie in einen Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese mit auf 37 °C erwärmtem Kulturmedium benetzt und die Zellsuspension anschließend in ein Sammelgefäß (50 ml Falcon-Röhrchen) überführt. Nach dem Auftauen aller Zellen erfolgte eine zehnmütige Zentrifugierung bei RT und 300 g, um das DMSO zu entfernen. Schließlich wurden die Zellen in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und je nach Versuchsanordnung auf Kulturflaschen, -schalen oder Wellplatten verteilt. Das Medium wurde nach Adhäsion der Zellen 24 Stunden später gewechselt. Nach weiteren 24 Stunden konnten die Versuche durchgeführt werden.

D 2.7 Generierung von MOMP_s aus Monozyten aus dem peripheren Vollblut

Von Monozyten abstammende mesenchymale Progenitorzellen (MOMP_s: *Monoocyte-derived Mesenchymal Progenitors*) wurden in Anlehnung an das Protokoll von Kuwana *et al.* generiert, indem Monozyten mittels Dichtegradientenzentrifugierung – wie oben beschrieben – aus dem venösen Vollblut von Spendern gewonnen wurden [16].

Anschließend wurden die Zellen bei einer Dichte von 10×10^4 Zellen/cm² auf Fibronektin-benetzte Plastik Kulturschalen ausgesät. Das Fibronektin wurde dabei bei 4 °C in einer Konzentration von 10 µg/ml über Nacht auf die Kulturflaschen gegeben.

Die Kultivierung erfolgte in DMEM *low glucose*-Medium ohne den Zusatz von Zytokinen für 6 Tage. Beigemischt wurden autologes Serum, L-Gutamin, Penicillin und Streptomycin. Anstatt Kälberserum wurde entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche (s. u.) sowie den Erkenntnissen von Ehnert *et al.* autologes Serum verwendet [289].

Die MOMP_s wuchsen dabei adhärent. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt, wobei die nicht-adhären Zellen in Co-Kultur gehalten wurden (konditioniertes Medium).

D 2.8 Generierung von PCMOs aus Monozyten aus dem peripheren Vollblut

Die Gewinnung von PCMOs (*Programmable Cells of Monocytic Origin*) wurde durch Pufe *et al.* beschrieben [15].

In Anlehnung an deren Beschreibung erfolgte zunächst die Gewinnung von Monozyten aus dem venösen Vollblut – wie oben beschrieben.

Die monozytären Zellen wurden anschließend auf unbehandelte Kulturflaschen bei einer Dichte von $10 \times 10^4/\text{cm}^2$ ausgesät und für 2 Stunden in RPMI 1640 Medium, welches L-Glutamin, Streptomycin und Penicillin enthielt, kultiviert, bis die Monozyten adhärent waren. Außerdem enthielt das Medium entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche (s. u.) sowie den Erkenntnissen von Ehnert *et al.* autologes Serum statt Kälberserum [289].

Nach Entfernung des Nähmediums und vorsichtigem Waschen der Zellen mit PBS, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen, wurde Dedifferenzierungsmedium hinzugegeben. Dieses enthielt neben dem o. g. Nährmedium als Zusatz β -Mercaptoethanol, rekombinantes IL-3 und rekombinanten M-CSF. Die Dedifferenzierungsbehandlung erfolgte über 6 Tage. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt.

D 2.9 Osteogene Stimulation von humanen Osteoblasten

Die osteogene Stimulation von humanen Osteoblasten erfolgte durch den Wechsel des Kulturmediums auf DMEM/HAM's-F12 und Zugabe von FCS, Penicillin/Streptomycin, β -Glycerophosphat, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, HEPES, Calciumchlorid und Dexamethason. Die Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel [294].

D 2.10 Osteogene Differenzierung von MOMP, PCMOs und MSCs

Die osteogene Differenzierung von MOMP, PCMOs und MSCs wurde durch einen Wechsel des Kulturmediums zum Differenzierungsmedium vorgenommen. Dabei wurde den jeweiligen Kulturmedien L-Ascorbinsäure-2-Phosphat,

β -Glycerophosphat sowie Dexamethason oder Vitamin D zugefügt. Die Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel [293,295].

D 2.11 Adipogene Differenzierung von MSCs

Die adipogene Differenzierung von MSCs wurde durch einen Wechsel des Kulturmediums zum Differenzierungsmedium vorgenommen. Dabei wurde dem Kulturmedium Dexamethason, Insulin, IBMX und Indomethacin zugefügt. Die Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zugabe von Insulin erhöht dabei die Aufnahme von Glucose in die Zellen, die wiederum zu Triglyceriden umgewandelt werden [293,295].

D 2.12 Reifung von Monozyten zu Makrophagen

Humane monozytäre Zellen wurden – wie oben beschrieben – aus dem venösen Vollblut von Spendern gewonnen.

Nach der Aussaat der Zellen bei einer Dichte von $10 \times 10^4/\text{cm}^2$ auf unbehandelte Kulturflaschen wurden die nicht-adhären wachsenden Zellen nach 24 Stunden mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch den Zusatz von rekombinantem, humanem M-CSF (10 ng/ml) 7 Tage kultiviert. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel [296].

D 2.13 Reifung von Monozyten zu Osteoklasten

Humane monozytäre Zellen wurden – wie oben beschrieben – aus dem venösen Vollblut von Spendern gewonnen.

Nach der Aussaat der Zellen bei einer Dichte von $10 \times 10^4/\text{cm}^2$ auf unbehandelte Kulturflaschen wurden die nicht-adhären wachsenden Zellen nach 24 Stunden mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch den Zusatz von rekombinantem, humanem RANK-Liganden (20 ng/ml) 6 Tage kultiviert.

Schließlich wurde dem Kulturmedium statt RANKL M-CSF (25 ng/ml) hinzugegeben und die Zellen erneut in Kultur gehalten. Die Kultivierung erfolgte dabei insgesamt für 20 Tage. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel [297].

D 2.14 AP-Aktivität

Die AP-Aktivität von Zellen kann als Maß für deren osteoblastäre Differenzierung herangezogen werden. Dabei macht man sich die Reaktion von para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu para-Nitrophenol, die durch die Alkalische Phosphatase katalysiert wird, zunutze.

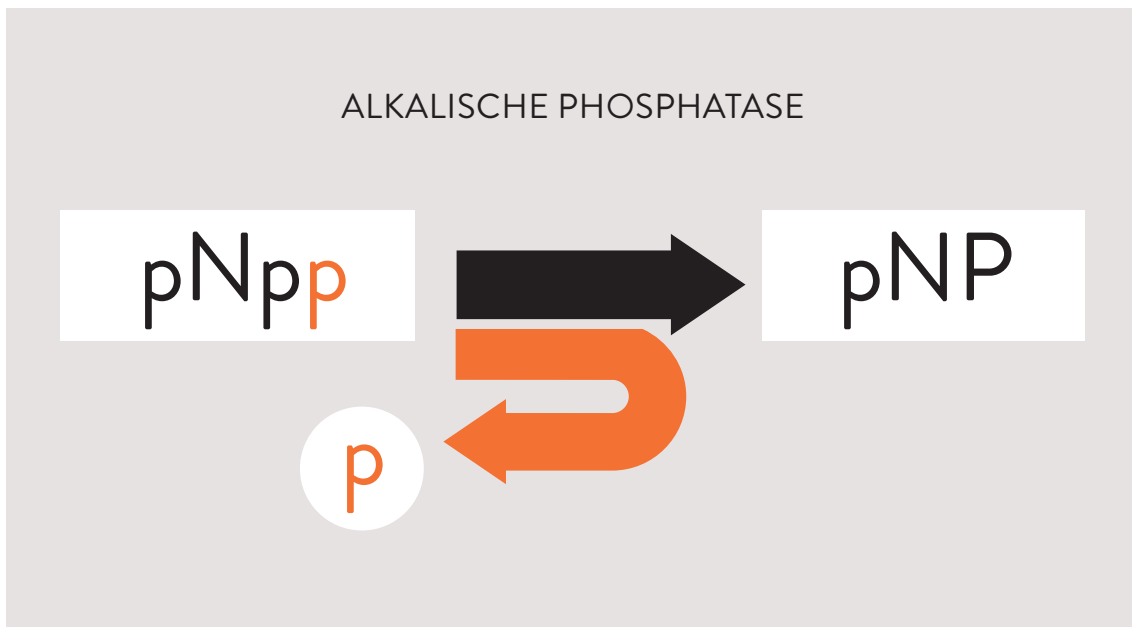


Abbildung D_3: Reaktionsschema der Alkalischen Phosphatase

Die Zellen wurden hierfür in 96-, 24- oder 12-Wellplatten entsprechend der Versuchsanordnung kultiviert und nach Entfernung des Kulturmediums mittels PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit der AP-Substratlösung (100 μl /96er Well, 500 μl /24er Well, 1000 μl /12er Well) 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die AP-Substratlösung setzte sich aus 1,3 mg p-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat pro ml AP-Puffer (50 mM Glycin, 100 mM TRIS-Base, 1 mM MgCl_2 , pH 10,5) zusammen.

Das wasserlösliche, gelbliche pNP wurde absorptionsphotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Über eine Verdünnungsreihe von pNP konnte auf die AP-Aktivität rückgeschlossen und diese letztlich über die Bestimmung der relativen Proteinmenge mittels Sulforhodamin B (SRB)-Färbung oder der Zellviabilität mittels *AlamarBlue*[®]-Test normalisiert werden [294].



Abbildung D_4: Verdünnungsreihe AP-Aktivität

D 2.15 AP-Färbung

Zum färberischen Nachweis der Alkalischen Phosphatase wurde das Medium der Zellen, die in 12- oder 24-Wellplatten kultiviert wurden, vorsichtig abgenommen und die Zellen 10 Minuten mit 3,7 %igem Formaldehyd bei RT fixiert. Anschließend wurde die frisch angesetzte AP-Färbelösung aufgebracht (1 ml/24er Well bzw. 2 ml/12er Well). Es folgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 30 Minuten. Danach erfolgte die Fotodokumentation nach Abnahme der Färbelösung. Die positiven Zellen zeigten eine Blaufärbung [293].

D 2.16 Alizarin Rot-Färbung

Die Alizarin Rot-Färbung dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis calciumphosphathaltiger, extrazellulärer Matrix. Dabei bildet Alizarin Rot mit Calciumphosphat einen fluoreszierenden Chelatkomplex.

Das Kulturmedium wurde zunächst entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 1 Stunde bei -20 °C mit 99 %igem Ethanol fixiert. Dieses wurde mit Leitungswasser abgewaschen und die Zellen mit 200 µl (24er Well) Alizarin Rot-Färbelösung 10 Minuten bei RT inkubiert. Um ungelöstes Alizarin Rot zu entfernen, erfolgte eine gründliche Spülung mit Leitungswasser.

Nach einer Fotodokumentation der gefärbten Zellen wurde der gebundene Farbstoff 10 Minuten bei RT mit Cetylpyridiniumchlorid (100 µl/24er Well) gelöst. Die Quantifizierung erfolgte mittels Absorptionsmessung bei 562 nm über die Kalibrierung einer Standardkurve für Alizarin Rot [293,298].

Standard	Final (µmol)	Alizarin Rot-Stock (µl)	10% Cetylpyridiniumchlorid (µl)
1	0	0	1000
2	1	0.68	999.32
3	5	3.4	996.6
4	10	6.84	993.16
5	25	17.1	982.9
6	50	34.2	965.8
7	100	68.4	931.6
8	200	136.8	863.2
9	300	205.2	794.8
10	400	273.6	726.4

Tabelle D_1: Verdünnungsreihe Alizarin Rot

D 2.17 van Kossa-Färbung

Zur Darstellung extrazellulärer, mineralisierter Kollagen-Matrix wurde die van Kossa-Färbemethode angewendet. Dabei färbt sich die mineralisierte Extrazellulärmatrix braunschwarz.

Zunächst wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend 10 Minuten mit kaltem Methanol inkubiert. Es schloss sich ein dreimaliger Waschschritt mit Leitungswasser an, ehe die Zellen mit Silbernitratlösung (1 ml/24er Well bzw. 2 ml/12er Well) benetzt und 10 Minuten bei RT und Licht inkubiert wurden. Es folgte wiederum ein dreimaliges Waschen der Zellen mit Leitungs-

wasser und schließlich eine Reduktion durch Zugabe von Natriumcarbonat-Formaldehyd für 2 Minuten bei RT. Nach abermaligem Waschen mit Leitungswasser (3x) wurde das Silbernitrat mit Natriumthiosulfat durch fünfminütige Inkubation bei RT entfernt und die Färbung unter dem Lichtmikroskop beurteilt und fotodokumentiert [299].

D 2.18 Oil Red O-Färbung

Die *Oil Red O*-Färbung dient dem Nachweis neutraler Lipide in Zellen.

Das Kulturmedium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 3,7 %-igem Formaldehyd 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe der *Oil Red O*-Färbelösung wurden die Zellen auf dem Schwenkinkubator 15 Minuten bei RT inkubiert (50 µl/96er Well, 300 µl/48er Well, 600 µl/24er Well). Ungebundene Färbelösung wurde mit Leitungswasser entfernt und die Färbung unter dem Lichtmikroskop beurteilt und fotodokumentiert [300].

D 2.19 TRAP-Färbung

Eine biochemische Kennzeichnung von Osteoklasten ist ihre Produktion von tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP) [301]. Sie katalysiert die Reaktion von Naphthol-AS-MX-Phosphat zu Naphthol-AS-MX und Phosphat, wobei jenes mit *Fast red violet* rötlich gefärbt werden kann. Dieser Nachweis kennzeichnet mehrkernige Zellen als Osteoklasten.

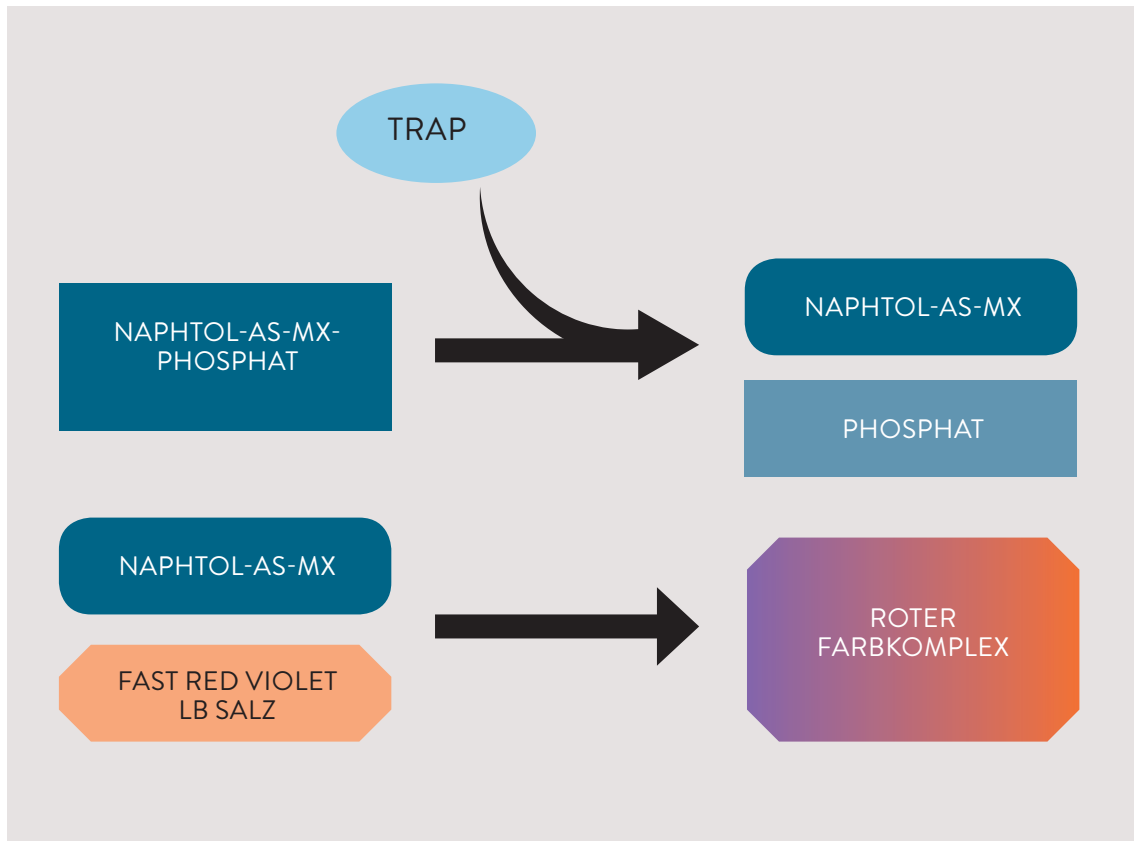


Abbildung D_5: Reaktionsschema TRAP-Färbung

Die zu färbenden Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit TRAP-Fixierungspuffer 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Puffer entfernt und die Zellen 5 Minuten bei RT getrocknet, ehe die TRAP-Färbelösung hinzugegeben wurde (50 µl/96er Well, 250 µl/48er Well, 500 µl/24er Well).

Die Färbung wurde unter dem Lichtmikroskop beurteilt und fotodokumentiert.

D 2.20 Sulforhodamin B (SRB)-Färbung

Sulforhodamin bindet in saurem Milieu an Oberflächenproteine.

Zur Färbung wurden die Zellen auf Wellplatten (96, 48 oder 24 Wells) kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen 15 Minuten mit Methanol fixiert. Anschließend wurden sie nach Entfernung des Methanols mit Sulforhodamin B-Lösung benetzt (50 µl/96er Well, 300 µl/48er Well, 600 µl/24er

Well). Die Inkubation erfolgte auf dem Schwenkinkubator für 30 Minuten bei RT. Danach wurde die Sulforhodamin B-Lösung abgesaugt und die Zellen viermal mit 1 %iger Essigsäure gewaschen, um ungebundenes SRB zu entfernen. Das gebundene SRB wurde mittels 10 mM TRIS gelöst und in Wellplatten überführt (100 µl/96er Well, 500 µl/48er Well, 1000 µl/24er Well). Die Absorptionsmessung erfolgte bei 565 nm. Um Störabsorptionen auszuschließen, erfolgte eine zweite Messung bei 690 nm (außerhalb der charakteristischen Absorptionsbande von SRB). Diese wurde hinterher von den Absorptionsmessungen bei 565 nm subtrahiert [302,303].

D 2.21 Immunhistochemische Färbung

Zur Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen 10 Minuten mit 4 %iger Formaldehydlösung fixiert. Danach wurden die Zellen mit ddH₂O gewaschen und anschließend unter Raumluftbedingungen getrocknet. So konnten die Zellen bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden, bevor sie letztlich gefärbt wurden.

Zur Färbung wurden die Zellen 15 Minuten mit TRIS-Puffer rehydriert; durch überschüssige Zugabe von 0,3 %iger Wasserstoffperoxidlösung für 30 Minuten konnte die endogene Peroxidase inaktiviert werden. Anschließend wurden die Zellen ausgiebig mit TRIS-Puffer gewaschen.

Die Färbung wurde mit dem EnVision™-Kit Peroxidase/DAB+ der Firma Dako durchgeführt. Diesem liegt die indirekte Immunperoxidase-Methode zugrunde, bei der ein primär gegen ein Antigen gerichteter Antikörper in geeigneter Verdünnung (in vorliegendem Fall 1:2000 für CD 68) den Zellen zugegeben wird. Nach einer zehnminütigen Inkubation wurde ein zweiter (sekundärer) Antikörper, der über Dextran (Polymer) mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) und einem gegen Maus- und Kaninchen-Immunglobuline gerichteten Ziegenantikörper gekoppelt war, hinzugefügt und ebenfalls 10 Minuten inkubiert.

1-5 %iges 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) wurde entsprechend den Herstellerangaben mit H₂O₂-haltigem Dako Substrat-Puffer als Substrat-Arbeitslösung hinzugegeben und folglich zweimal für 3 Minuten inkubiert.

Zuletzt erfolgte die Hämatoxylin-Gegenfärbung mit der dafür vorgesehenen Dako Hämatoxylin-Reagenz für 1-2 Minuten. Alle Färbeschritte wurden in einem

Dako-Färbeautomat vorgenommen. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop [16,286].



<http://www.dako.com.cn/download.pdf?objectid=104958005>

D 2.22 TGF- β -Bioassay mit MFB-F11-Zellen

Um die Menge an aktivem TGF- β , das von Zellen produziert und ins Kulturmedium abgegeben wird, messen zu können, wurde der *Bioassay* mit MFB-F11-Zellen angewendet [304].

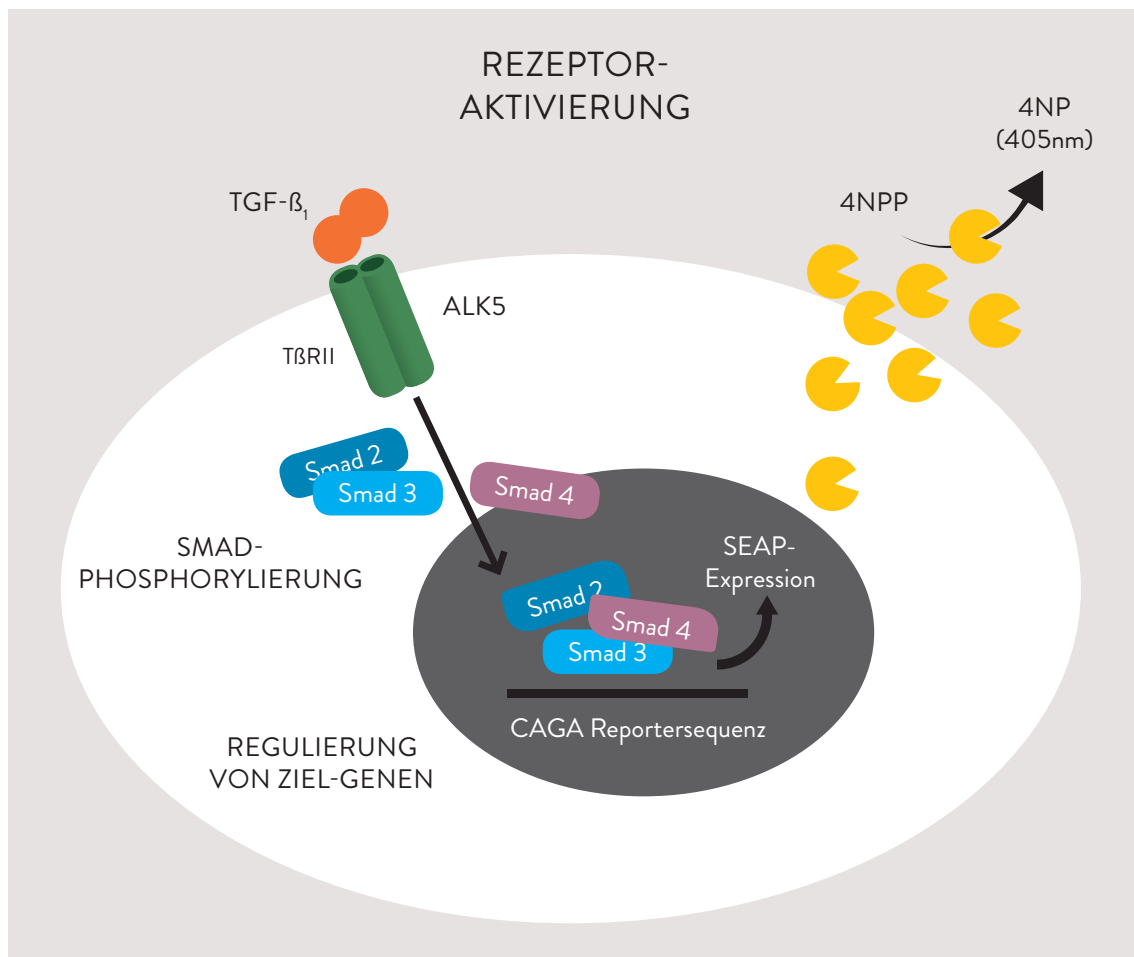


Abbildung D_6: MFB-F11-Zelle (Erläuterungen siehe Text)

Dabei werden embryonale Fibroblasten von *Knockout*-Mäusen (*Tgfb1*^{-/-}) mit einem *Reporter*-Plasmid transfiziert, das über Smad-Bindeelemente aktiviert wird und eine Alkalische Phosphatase sezerniert (SEAP), deren Aktivität wiederum gemessen werden kann.

Zunächst wurden die gefrorenen Zellen mit 10 ml 37 °C warmem PBS aufgetaut und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

Nach einer zehnminütigen Zentrifugierung bei RT und 600 g wurde das gewonnene Zellpellet mit warmem Kulturmedium in Suspension gebracht und in 75 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Dichte von 90 % des Flaschenbodens kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gesplittet. Zur Stimulierung wurden die Zellen in 96-Wellplatten in einer Dichte von 4 x 10⁴/Well ausgesät und in D10-Medium 3-4 Stunden kultiviert, bis sie adhärent waren.

Nun wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je 50 µl FCS-freies DMEM-Medium sowie Probenmaterial pro Well hinzugegeben. Nach 48 Stunden wurde die SEAP-Aktivität mit dem entsprechenden Kit der Firma Clontech absorptionsphotometrisch gemessen.



http://www.clontech.com/NO/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Chemiluminescent_Reporters/ibcGetAttachment.jsp?cltemId=27231&fileId=5896764&sitex=10020:22372:US

Hierzu wurden 25 µl des Mediums als Triplikate in konische 96-Wellplatten überführt und mit 25 µl einfachem Verdünnungspuffer aus dem Kit ergänzt.

Die Wellplatten wurden mit Aluminiumfolie bedeckt und bei 65 °C 30 Minuten inkubiert und schließlich 2-3 Minuten auf Eis gekühlt, um sie der RT anzugleichen. Danach wurden 97 µl Testpufferlösung pro Well aus dem Kit hinzugegeben und 5 Minuten bei RT inkubiert.

Folglich wurden die Proben mit 3 µl 4-Methylumbelliferyl-phosphat 60 Minuten in Dunkelheit bei RT inkubiert.

Die Messung erfolgte im Fluorometer bei einer Reizwelle von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 449 nm. Als Positivkontrolle diente plazentare Alkalische Phosphatase. Die Ergebnisse wurden mit der relativen Proteinmenge aus dem SRB-Assay normalisiert.

D 2.23 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung von Zytokinen wurde der mehrschichtige (*Sandwich*-)ELISA nach den Herstellerangaben von Peprotech, UK, verwendet.

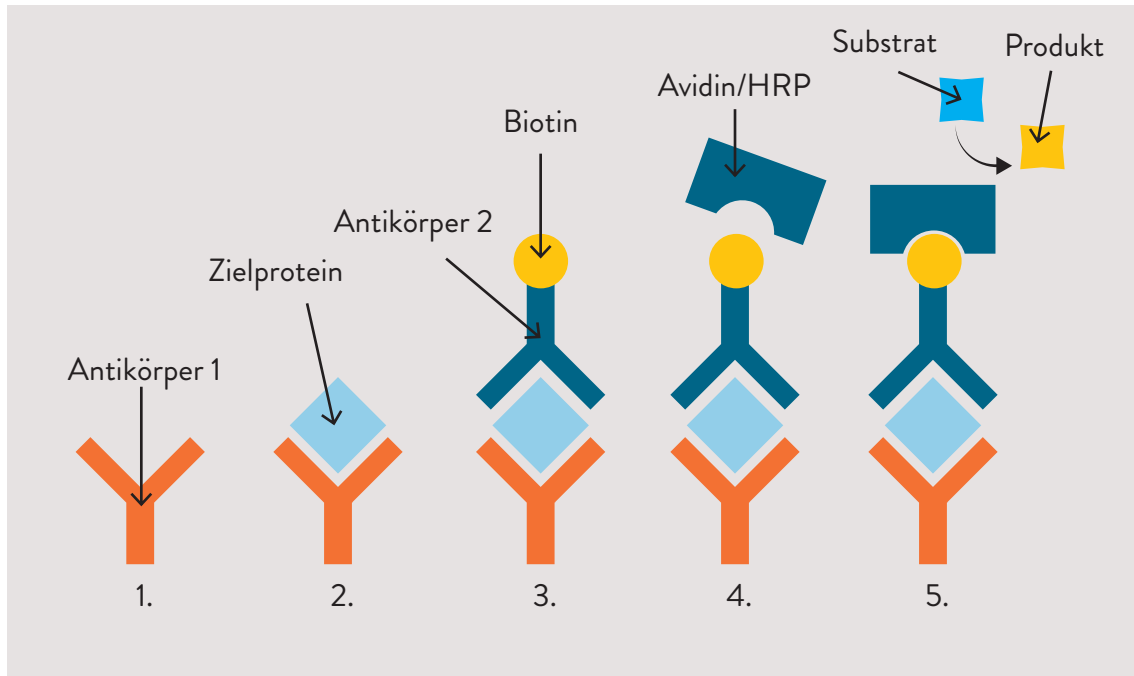


Abbildung D_7: Sandwich-ELISA (Erläuterungen siehe Text)

Dabei wird ein entsprechender Antikörper, der gegen das zu detektierende Antigen (im vorliegenden Fall RANKL und TNF- α) gerichtet ist, auf eine ELISA-Mikroplatte aufgebracht. Dieser bindet das Substrat und ein zweiter Biotin-gebundener Antikörper wird hinzugegeben, der ebenfalls das Antigen bindet (*Sandwich*). Biotin hat dabei die Eigenschaft mit Avidin einen Komplex einzugehen, wobei Avidin seinerseits mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, welche ein später hinzugefügtes Substrat umsetzt. Der dadurch entstehende Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden [305].

Über Nacht wurden die ELISA-Mikroplatten mit 100 μ l des entsprechenden ersten Antikörpers (Konzentration 1 μ g/ml) bei RT auf dem Schwenkinkubator benetzt. Die ungebundenen Antikörper wurden durch viermaliges Waschen mit der Waschpufferlösung entfernt und die Platten bei RT getrocknet. Im nächsten Schritt wurden 300 μ l Blockierungspuffer in die Mikroplatten pipettiert und 1 Stunde bei RT auf dem Schwenkinkubator inkubiert, woraufhin sich ein erneuter,

viermaliger Waschschrift anschloss.

Anschließend wurden 100 µl der Probe bzw. des Standards (als Standardreihe wurde rekombinantes, humanes RANKL oder TNF-α verwendet) auf die Platten gegeben und wiederum 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurde der zweite, biotinylierte Antikörper in entsprechender Konzentration (je nach Herstellerangabe) hinzugegeben.

100 µl pro Well des 1:2000 verdünnten Avidin-HRP-Konjugates wurden nach viermaligem Waschen der Platten hinzugegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden zuletzt 100 µl des ABTS-Substrats beigemischt und in fünfminütigem Abstand bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen (Referenzwellenlänge 650 nm).

Die Ergebnisse wurden mit der relativen Proteinmenge aus dem SRB-Assay normalisiert [289,294].



<https://www.peprotech.com/Lists/PTProtocol/Attachments/19/Sandwich%20ELISA%20-%20web.pdf>

D 2.24 AlamarBlue®-Test

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit der *AlamarBlue*®-Analyse des Herstellers Biozol.

Bei diesem Vitalitäts-/Toxizitätstest macht man sich das reduzierende Milieu metabolisierender Zellen zunutze.

Durch die Reduktion des fluorimetrischen/colorimetrischen REDOX-Indikators Resazurin (oxidierte Form) in Resorufin (reduzierte Form) kann der reduzierte Status spektrophotometrisch dargestellt werden.

Dabei ist die oxidierte Form des *AlamarBlue*®-Indikators blau und nicht fluoreszierend. Wenn dieser mit lebenden Zellen inkubiert wird, erfolgt ein Farbwechsel nach Rot. Die reduzierte Form hat nun fluoreszierende Eigenschaften. Die Messung erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion bei einer Reizwelle von 530-560 nm und einer Ausgabewellenlänge von 590 nm. Alternativ kann die Messung absorptionsspektrometrisch bei einer Wellenlänge von 570 und 600 nm gemessen werden. Im vorliegenden Fall wurde die Messungen bei einer Reizwelle von 544 nm und einer Ausgabewelle von 590 nm durchgeführt [306].

Vorgehen:

- Aussaat der Zellen auf 96er-Wellplatten mit den entsprechenden Kulturmedien für Monozyten, PCMOs und MOMP
- Stimulation der Zellen für 6 Tage im Inkubator (siehe dort)
- *Blank*-Kontrolle: Medium mit *AlamarBlue*[®]-Reagenz ohne Zellen
- Negativkontrolle: abgetötete Zellen (0,5 % Triton oder Methanol für 10 Minuten)
- Positivkontrolle: unbehandelte Zellen
- Zugabe von *AlamarBlue*[®]-Reagenz im Verhältnis 1:10 (z. B. 10 µl Reagenz in 100 µl Medium)
- Wiederholte Messungen zwischen 1 und 6 Stunden (nach 1, 2, 3, 4, 5, 6 Stunden)

D 2.25 RNA-Isolation

Zur Vorbereitung der RT-PCR wurde die Gesamt-RNA der auf 25, 75 oder 175 ml Flaschen konfluent wachsenden Zellen gesammelt. Hierzu wurde das Kulturmedium entfernt und TRIFAST (500 µl/25 ml Kulturflasche, 1000 µl/75 ml Kulturflasche, 1500 µl/175 ml Kulturflasche) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines *Collectors* gesammelt und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Die Lysezeit betrug 5 Minuten bei RT. Durch die Zugabe von 100 µl Chloroform pro 500 µl TRIFAST und die sorgfältige Durchmischung der beiden Reagenzien erhielt man nach fünf- bis zehnminütiger Inkubation bei RT und anschließender zehnminütiger Zentrifugierung bei 4 °C und 14.000 g eine Phasentrennung. Die obere RNA-haltige, wässrige Schicht wurde in ein Eppendorf-Gefäß, in welchem Isopropanol vorgelegt war (250 µl Isopropanol/500 µl TRIFAST), überführt. Nach sorgfältiger Durchmischung und einer ca. zehnminütigen Inku-

bation auf Eis erfolgte erneut eine zehnmütige Zentrifugierung bei 4 °C und 14.000 g – wie oben beschrieben. Danach konnte das RNA-Präzipitat durch Entfernen des Überstandes gewonnen und mit 1 ml 70 %igem Ethanol durch abermalige zehnmütige Zentrifugierung bei 4 °C und 14.000 g gewaschen werden. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und das RNA-Pellet anschließend in 30-50 µl DEPC H₂O gelöst. Das restliche Ethanol wurde bei geöffneten Eppendorf-Gefäßen 10 Minuten verdampft.

Menge und Reinheit der RNA wurde durch Photometrie bei 260 bzw. 280 nm ermittelt (100 µl einer 1:50 Verdünnung der Probe mit DEPC H₂O). Die Integrität wurde mittels Gelelektrophorese überprüft.

(0,5 µg RNA + DEPC H₂O + PCR-Ladepuffer → Marker (1 µl) + Proben bei 90 V für 30-40 Minuten → Fotodokumentation) [289,307].

D 2.26 Erststrang-cDNA-Herstellung

Zum Umschreiben der mRNA in cDNA wurde ein Kit der Firma ThermoFisher verwendet. Dabei wurde die RNA-Probe (1 ng bis 4 µg) zunächst mit einem Gemisch aus Oligo(dT)18- und einem *Random-Hexamer-Primer* (jeweils 5 µl) versetzt und schließlich mit Nuklease-freiem Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Sämtliche Proben mussten dabei frisch aufgetaut und auf Eis verarbeitet werden.

Dann erfolgte die Inkubation im *Thermocycler* bei 65 °C für 5 Minuten.

Danach wurden – nach Lagerung auf Eis – 2 µl dNTP-Mischreagenz, 2 µl M-MuLV Reverse Transkriptase, 4 µl fünffach konzentrierter Reaktionspuffer und 1 µl RNase-Inhibitor (Gesamtvolumen 20 µl) hinzugegeben. Die erneute Inkubation im *Thermocycler* fand bei 37 °C für 60 Minuten statt. Die Reaktion wurde durch eine fünfminütige Temperaturerhöhung auf 70 °C beendet.

Schließlich wurden die Proben mit DEPC H₂O auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und bei -80 °C eingefroren, nachdem eine Qualitätskontrolle der cDNA durch PCR für GAPDH erfolgte [289,307,308].



[https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/
MAN0012612_FirstStrand_cDNA_Synthesis_Kit_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ MAN0012612_FirstStrand_cDNA_Synthesis_Kit_UG.pdf)

D 2.27 Konventionelle RT-PCR

Zur Untersuchung der cDNA erfolgte deren Amplifikation mit unterschiedlichen *Primern*. Die Liste der verschiedenen *Primer*, deren Größe, *Annealing*-Temperaturen sowie Basensequenzen sind in Tabelle D_1 zusammengefasst. Die entsprechende Anzahl der Zykluswiederholungen wurde in Vorversuchen optimiert.

Zur Durchführung der Versuche wurden die bei -20 oder -80 °C (je nach Dauer der Lagerungszeit) aufbewahrten Proben aufgetaut und auf Eis verarbeitet. Auch die einzelnen Reagenzien zur Bereitstellung des Mastermixes wurden auf Eis nach deren Auftauen weiterverarbeitet.

Der Mastermix setzte sich dabei aus folgenden Komponenten zusammen:

Reaktionspuffer B (Mg ²⁺ -frei)	1 µl
Vorwärts- <i>Primer</i>	1 µl
Rückwärts- <i>Primer</i>	1 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTP Mix	0,5 µl

Die eingesetzte Menge an cDNA variierte zwischen 5 und 100 ng. Bei einem Zielvolumen von 20 µl pro Eppendorfgefäß ergab sich daraus eine variable Menge an Nuklease-freiem Wasser, die hinzugefügt werden musste.

Diese berechnete sich wie folgt:

$$\text{Volumen (H}_2\text{O)} = \text{Volumen (gesamt)} - (\text{Volumen (Mastermix)} + \text{Probemenge})$$

sprich **Volumen (H₂O) = 20 – (5,6 + Probe) µl**

Kern einer Amplifikation bildeten 30-40 Zykluswiederholungen (je nach *Primer*) mit einer entsprechenden *Annealing*-Temperatur von 53-62 °C.

Ein Zyklus bestand aus einer jeweils 45-sekündigen Denaturierungsphase (bei

95 °C) gefolgt von den ebenso langen *Annealing*- (variable Temperatur) und Verlängerungsphasen (72 °C). Zu Beginn einer jeden Amplifikation stand eine initiale fünfminütige Denaturierungsphase bei 95 °C und am Ende stand eine finale Verlängerungsphase bei 72 °C von ebenfalls 5 Minuten, bevor das Gerät auf 4 °C herunterkühlte [289,307,309].

GEN	EINTRAGS- NUMMER GENBANK	VORWÄRTS-PRIMER 5' →3'	RÜCKWÄRTS-PRIMER 5' →3'	ANNEA- LING- TEMPE- RATUR	AMPLIFI- KATIONS- GRÖSSE [bp]
GAPDH	NM 002046.3	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGTCTACATGGCAACTG	58 °C	419 bp
CD 34	NM 001025109	AGAAAGGCTGGGCGAAGACCC	AGTGGGGAAGGGTTGGGCGT	56 °C	311 bp
Kollagen I	NM 000088.3	CAGCCGCTTCACCTACAGC	TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC	56 °C	84 bp
RUNX-2	NM 001015051.3	TGCCTAGGCGCATTTCAGGTGC	GGTGGTGGTGCATGGCGGAA	58 °C	359 bp
Osterix	NM 152860	CCCAGGCAACTCTACTC	GGCTGGATTAAGGGGAGCAA	62 °C	175 bp
Osteonectin	NM 003118	AGCACCCCATTGACGGGTA	GGTCACAGGTCTCGAAAAAGC	60 °C	105 bp
Osteopontin	NM 000582	CTCCATTGACTCGAACGACTC	CGTCTGTAGCATCAGGGTACTG	60 °C	257 bp
Osteocalcin	NM 199173.3	ATGAGAGCCCTCACACTCTC	GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	62 °C	294 bp
Bone Sialoprotein	NM 004967	TGACTCATCCGAAGAAAATGGAG	CTGGATTGCAGCTAACCCCTGT	60 °C	202 bp
Alkalische Phosphatase	NM 000478.4	ACGTGGCTAAGAATGCATC	CTGGTAGGCGATGCCTTA	53 °C	475 bp
Matrix-Gla-Protein	NM 000900	AGATGGAGAGCTAAAGTCCAAGA	GTAGCGTTCGCAAAGTCTGTA	60 °C	102 bp
Osteoblast specific factor 2	NM 006475	TAAGTTTGTTCTGGTAGCACC	GTGTGGGTCCTTCAGTTTTGATA	60 °C	140 kb
BMP 2	NM 001200	CCCCCTACATGCTAGACCTGT	CACTCGTTTCTGGTAGTTCTTCC	60 °C	150 kb
BMP 4	NM 130851	TGGTCTTGAGTATCCTGAGCG	GCTGAGGTTAAAGAGGAAACGA	60 °C	130 kb
RANKL	NM 033012.3	TCCAAGTTCTCATACCCTGA	CATCCAGGAAATACATAACTCC	56 °C	245 bp
Osteoprotegerin	NM 002546.3	CCGAAACAGTGAATCAACTC	AGGTTAGCATGTCCAATGTG	60 °C	313 bp

Tabelle D_2: Basensequenzen der verwendeten *Primer*-Paare [1]

D 2.28 Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde die Gelelektrophorese angewendet. Dabei wirkt eine elektrische Kraft auf ein Ion. Dieser Kraft ist eine Reibungskraft entgegengesetzt, welche von der Größe des Ions sowie der Viskosität der Probenlösung abhängt. Im elektrischen Feld bestimmt die Resultierende der beiden

Kräfte die Fließgeschwindigkeit der Probe im Gel. Es wurde 1,5 %iges Agarosegel, welches mit 1,5 µl Ethidiumbromid versetzt wurde, verwendet. Nach Abkühlen des Gels in der Elektrophoresekammer und Entfernung des Steckkammes wurde 1 µl Ladepuffer pro 10 µl Probe hinzugegeben und das Gemisch in eine Kammer pipettiert. Zur Größenbestimmung wurde ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug zwischen 80 und 120 V. Die Laufzeit wurde nach einer Strecke von ca. 2/3 des Gels gestoppt. Die Dokumentation erfolgte mit einem Gel-Dokumentationssystem der Firma Intas. Die Quantifizierung wurde mit der ImageJ-Software (NIH, USA) vorgenommen und mit GAPDH normalisiert [289,307].

D 2.29 Durchflusszytometrie (FACS®-Analyse)

Die Durchflusszytometrie erlaubt es, Zellen neben ihrer Größe und Granularität auch hinsichtlich ihrer Expression von Oberflächenmarkern (z. B. CD-Markern) zu differenzieren. Dabei werden die Zellen hydrodynamisch fokussiert durch eine Messkammer geschleust, auf die ein Laserstrahl gerichtet ist. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, wird er als ein mit der Zellgröße korrelierendes, vorwärts gerichtetes Streulicht (FSC) sowie ein mit der Granulation der Zelle korrelierendes, seitwärts gerichtetes Streulicht (SSC) umgelenkt.

Neben der Lichtstreuung ermöglicht die Durchflusszytometrie die Messung von Lichtemissionen. Dabei werden mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenmoleküle durch eine Lichtquelle oder mehrere Lichtquellen unterschiedlicher Wellenlänge (Argon-Laser mit 488 nm, Dioden-Laser mit 633 nm) angeregt. Sie absorbieren Licht eines bestimmten Spektrums (Absorptionsspektrum). Dadurch werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Fallen sie wieder auf ihr ursprüngliches Niveau herab, kommt es zur Emission von Energie in Form von Photonen. Diese als Fluoreszenz bezeichnete Lichtemission erfolgt ebenfalls in einem für den eingesetzten Farbstoff charakteristischen Spektrum (Emissionsspektrum). Die Emission ist dabei von geringerer Energie als die Absorption, weshalb die Wellenlängen größer sind.

Die Emission wird über farbselektive Bandpassfilter getrennt und von Detektoren (*Multiplier*) erfasst und verstärkt. Das optische Signal wird in elektrische Ströme und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt [310].

Fluoreszenzfarbstoff	Laser	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Allophycocyanin (APC)	633 nm	650 nm	660 nm
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	488 nm	495 nm	519 nm
R-Phycoerythrin (PE)	488 nm	565 nm	578 nm

Tabelle D_3: Eingesetzte Farbstoffe bei der Durchflusszytometrie

Zur Oberflächenmarkierung wurde zunächst bei einer Zellkonfluenz von 80-90 % auf 175 cm² Kulturflaschen das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.

Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin benetzt und bei 37 °C im Brutschrank 5-10 Minuten inkubiert, bis sich die Zellen unter lichtmikroskopischer Kontrolle vom Flaschenboden abgelöst hatten. Die Zellen wurden mithilfe eines *Collectors* gesammelt und in Eppendorf-Gefäße überführt. Bei RT erfolgte eine fünfminütige Zentrifugierung bei 650 g. Das gewonnene Zellpellet wurde anschließend in PBS resuspendiert.

Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,5 µg/10⁶ Zellen in 100 µl verwendet.

Die Datenverarbeitung erfolgte mit der FlowJo-Software (Tree Star, USA). Dabei erfolgte die Darstellung der Ergebnisse in sogenannten „*dot-plots*“ (zweidimensionale Punktdiagramme) oder in eindimensionalen Histogrammen. Zur Auswahl einer bestimmten Zellpopulation erfolgte die Selektierung über das sogenannte „*gating*“, wodurch die Zellpopulationen, die nicht von Interesse waren, ausgeschlossen wurden. Der Negativbereich wurde mittels Isotypenkontrollen definiert. Sich überschneidende Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome wurden durch die automatische Kompensationsroutine vom Gerät ermittelt und jeweils zur Korrektur abgezogen [16].

D 3 STATISTIK

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Säulen- und Kurvendiagrammen, wobei die Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM angegeben wurden. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism verwendet. Dabei erfolgte die Auswertung mit der einfaktoriellen Varianzanalyse gefolgt von Benferroni's multiplem Vergleichstest.

Als statistisches Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

D 4 ETHISCHE ERKLÄRUNG

Sämtliche Zellen wurden während der Implantation von Hüftgelenktotalendoprothesen im Rahmen der Versorgung von proximalen Femurfrakturen gewonnen. Die Operationen fanden in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der BG Klinik Tübingen statt. Alle Patienten gaben im Vorfeld ihr schriftliches Einverständnis. Die Arbeit wurde von der Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigt.

E ERGEBNISSE

E 1 VORVERSUCHE

E 1.1 Proliferationskapazität von Monozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen

Bei der *in vitro*-Kultivierung zeigte sich eine deutlich eingeschränkte Proliferationskapazität der Monozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark.

Dabei ließ sich in der Langzeitkultivierung ein *Peak* nach ca. 3 Wochen feststellen. Danach kam es zu einem allmählichen Absterben der Zellen nach ca. 4 Wochen.

Im Vergleich hierzu zeigten mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark eine deutlich gesteigerte Proliferationskapazität mit einem Maximum nach ca. 8-9 Wochen (Abbildung E_1/1 und E_1/2).

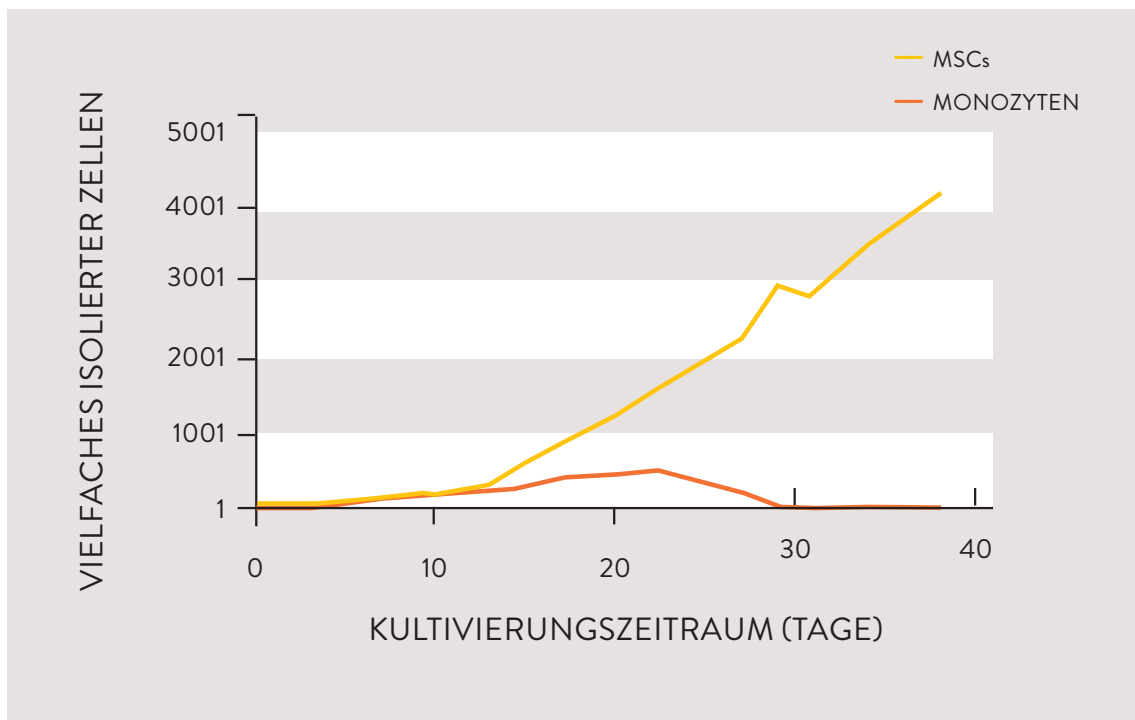


Abbildung E_1/1: Langzeitkultivierung von Monozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (BM-MSCs). (N = 4, n = 3).

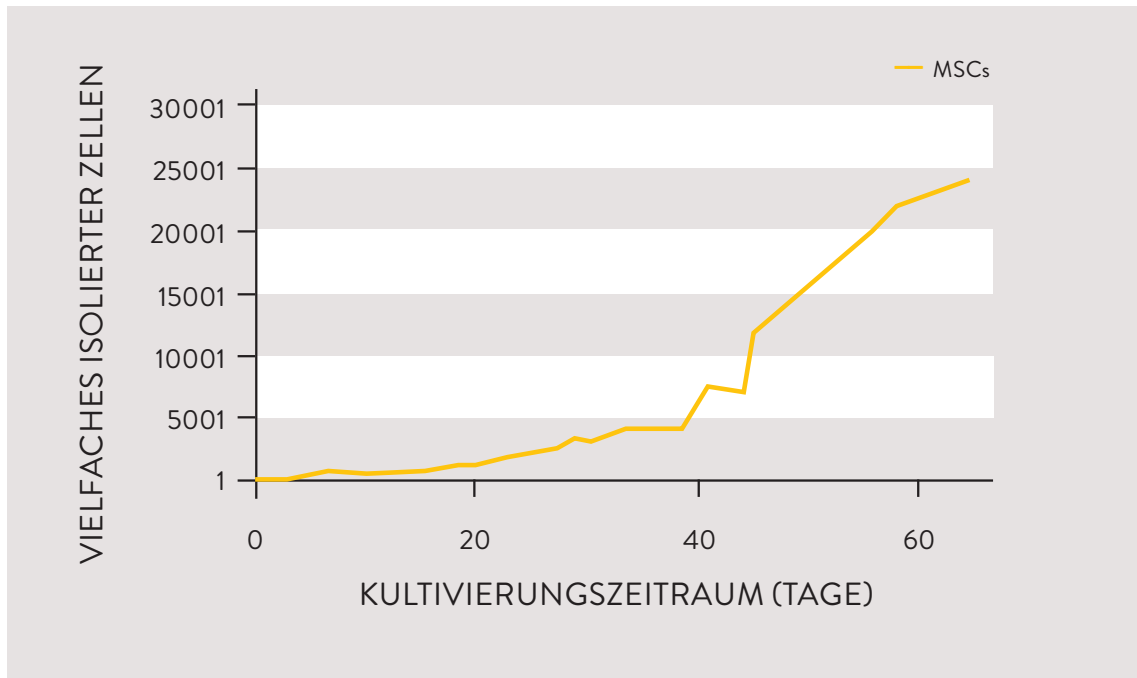


Abbildung E_1/2: Langzeitkultivierung von Monozyten im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (BM-MSCs). (N = 4, n = 3).

E 1.2 Einfluss des verwendeten Serums auf die Zellviabilität

Bezüglich des verwendeten Serums im Kulturmedium zeigten sich Unterschiede.

Die Verwendung von autologem Serum erwies sich im *AlamarBlue*[®]-Test verglichen zu fetalem Kälberserum als signifikant überlegen. Gegenüber verschiedenen AB-Seren zeigte sich ebenfalls eine höhere Zellviabilität, wobei eine statistische Signifikanz hier nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung E_2).

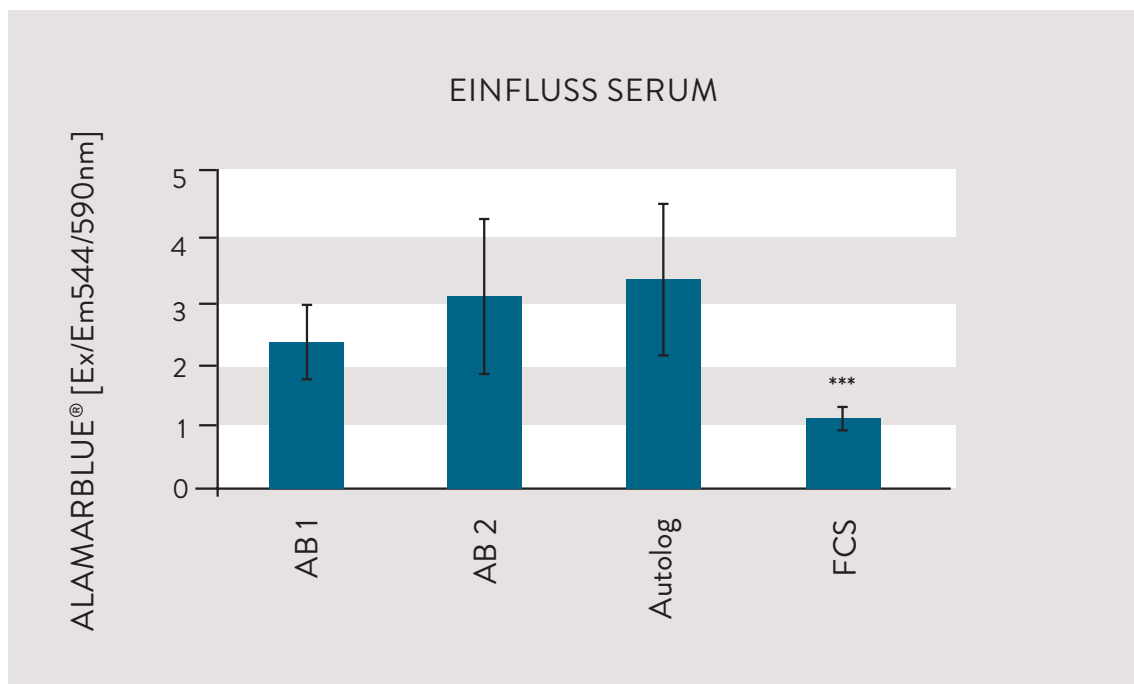


Abbildung E_2: Zellviabilität nach 14-tägiger Kultivierung von Monozyten. Die Messung erfolgte mittels *AlamarBlue*[®]-Testsystem. AB 1: AB-Serum Charge 1; AB 2: AB-Serum Charge 2; Autolog: autologes Serum; FCS: fetales Kälberserum. (N = 4, n = 3). (***)p < 0,01).

E 1.3 Zelltoxizität von Dexamethason

Die Zugabe von Dexamethason in das Kulturmedium von Monozyten führte zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität im *AlamarBlue*[®]-Test nach 6 Tagen im Vergleich zu den anderen Vorbehandlungs- bzw. Kulturmedien ohne Dexamethason (Abbildung E_3).

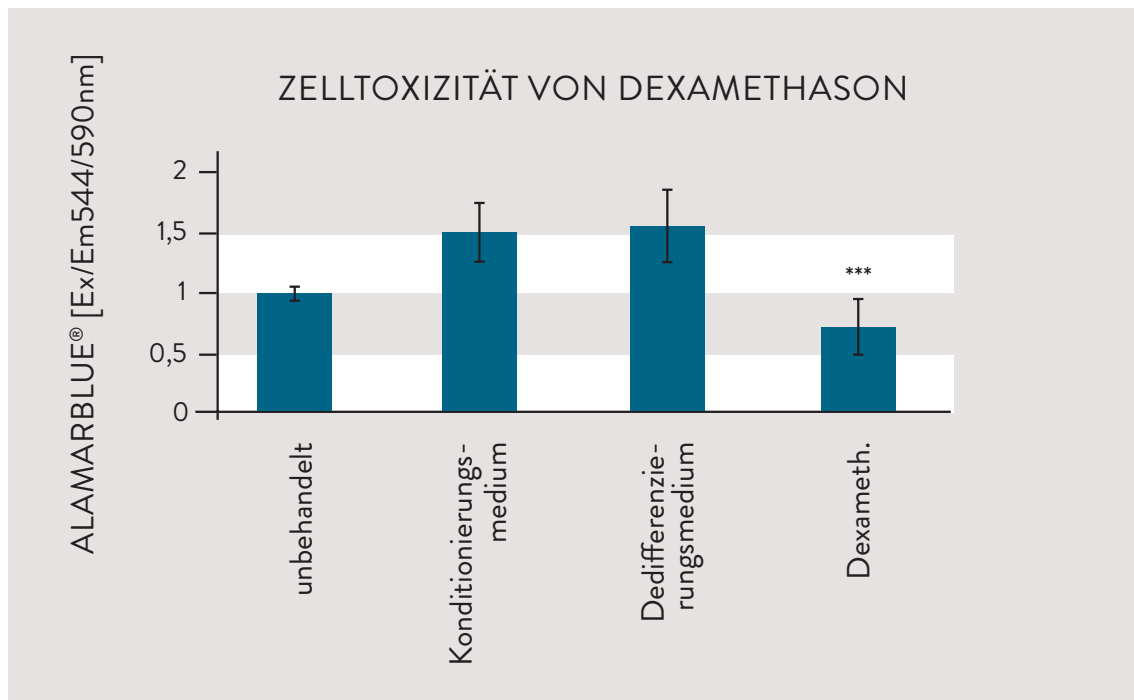


Abbildung E_3: Zellviabilität nach sechstägiger Vorbehandlung von Monozyten zur Generierung von MOMP's und PCMO's. Monozyten wurden als Kontrolle in Kulturmedium gehalten. Die Messung erfolgte mittels *AlamarBlue*[®]-Testsystem. Unbehandelt: Kontroll-Monozyten; Konditionierungsmedium: Vorbehandlung zur Generierung von MOMP's; Dedifferenzierungsmedium: Vorbehandlung zur Generierung von PCMO's; Dexameth.: Zugabe von Dexamethason in das Monozyten-Kulturmedium. (N = 8, n = 3). (***)p < 0,01).

Nach prolongierter Kultivierung mit Dexamethason kam es zu einer Zellzahlverminderung von ca. 60 % nach 14 Tagen, was schließlich zu einem vollständigen Absterben der Zellen führte (Abbildung E_4/A+B).

Bei der Verwendung von Vitamin D zeigte sich eine verbesserte Proliferationskapazität unter lichtmikroskopischer Kontrolle im gleichen Zeitraum (Abbildung E_4/C+D).

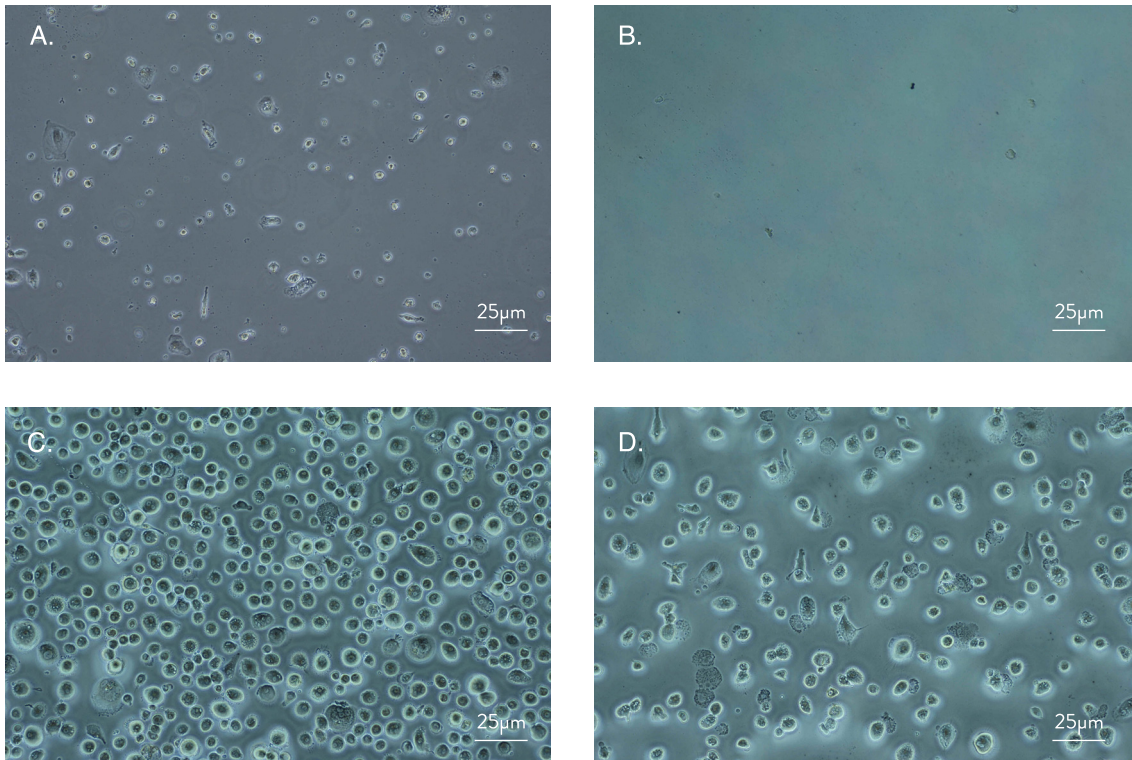


Abbildung E_4: Vergleich zwischen Dexamethason und Vitamin D bei der Langzeitkultivierung von Monozyten. (Vergrößerung 100x).

- A. Monozyten nach 14-tägiger Kultivierung in Dexamethason-haltigem Medium
- B. Monozyten nach 21-tägiger Kultivierung in Dexamethason-haltigem Medium
- C. Monozyten nach 14-tägiger Kultivierung in Vitamin D-haltigem Medium
- D. Monozyten nach 21-tägiger Kultivierung in Vitamin D-haltigem Medium

E 1.4 Charakterisierung von Osteoblasten mittels AP- und van Kossa-Färbung

Zur Überprüfung einer erfolgreichen osteogenen Stimulation von Osteoblasten erfolgte der färbereiche Nachweis von Alkalischer Phosphatase über die AP-Färbung (Abbildung E_5/A).

Der Nachweis von mineralisierter, extrazellulärer Matrix gelang über die van Kossa-Färbung (Abbildung E_5/B).

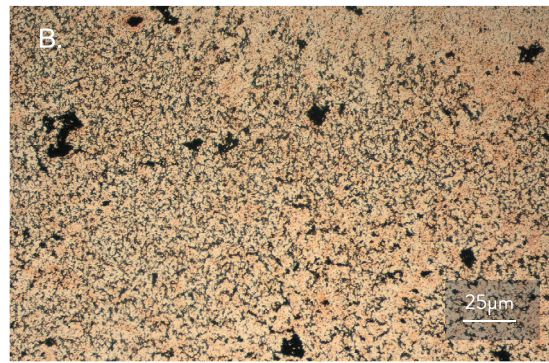
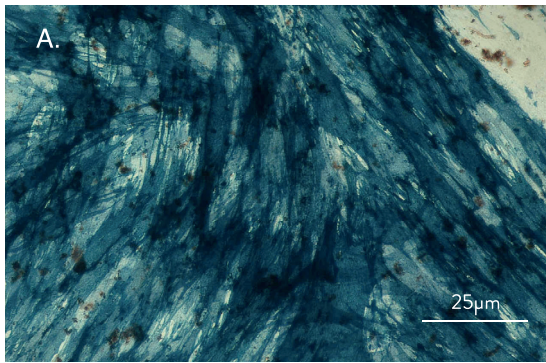


Abbildung E_5: Osteogene Stimulation von Osteoblasten
 A. Alkalische Phosphatase-Färbung. (Vergrößerung 200x).
 B. van Kossa-Färbung. (Vergrößerung 100x).

E 1.5 Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen durch osteogene und adipogene Differenzierung

Zum Nachweis der erfolgreichen Isolation von mesenchymalen Stammzellen erfolgte eine osteogene und adipogene Differenzierung derselben. Dabei gelang nach 14-tägiger Differenzierung ein positiver färberischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase sowie positive van Kossa- und *Oil Red O*-Färbungen (Abbildung E_6).

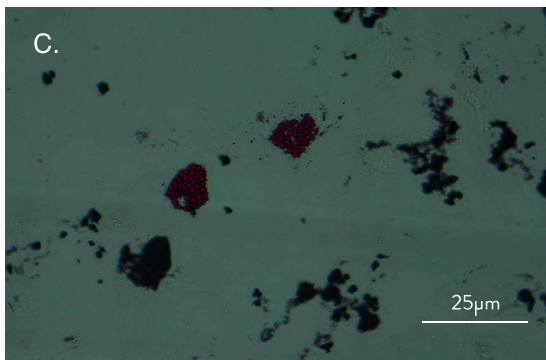
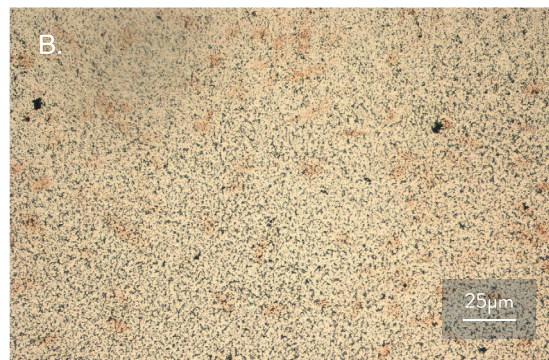
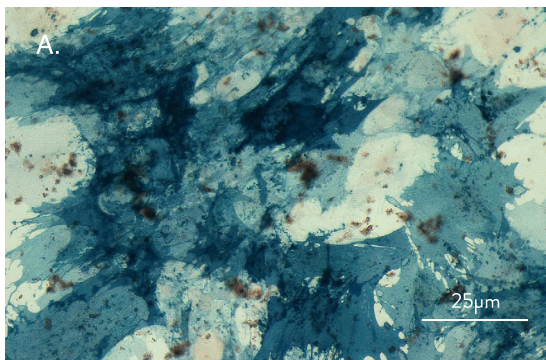


Abbildung E_6: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen
 A. Alkalische Phosphatase-Färbung. (Vergrößerung 200x).
 B. van Kossa-Färbung. (Vergrößerung 100x).
 C. *Oil Red O*-Färbung. (Vergrößerung 200x).

E 2 ZELLVIABILITÄT VON MOMP_s UND PCMO_s

Die Zellviabilität von MOMP_s und PCMO_s wurde mit der von in Kulturmedium gehaltenen Monozyten verglichen. Die Messung erfolgte mittels *AlamarBlue*[®]-Test.

Im Vergleich zu in Kultur- bzw. Konditionierungsmedium gehaltenen Monozyten bzw. MOMP_s zeigten PCMO_s nach einer sechstägigen Dedifferenzierungsbehandlung mit IL-3, M-CSF und β-Mercaptoethanol eine deutlich höhere Zellviabilität. Diese erwies sich sowohl gegenüber den kultivierten Monozyten als auch gegenüber den MOMP_s als statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte die höhere Viabilität der MOMP_s gegenüber den kultivierten Monozyten keine statistische Signifikanz.

Entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche sowie den Erkenntnissen von Ehnert *et al.* [289] erfolgte die Kultivierung bzw. die sechstägige Konditionierung/Dedifferenzierung durch Zugabe von autologem Serum des jeweiligen Spenders (Abbildung E_7).

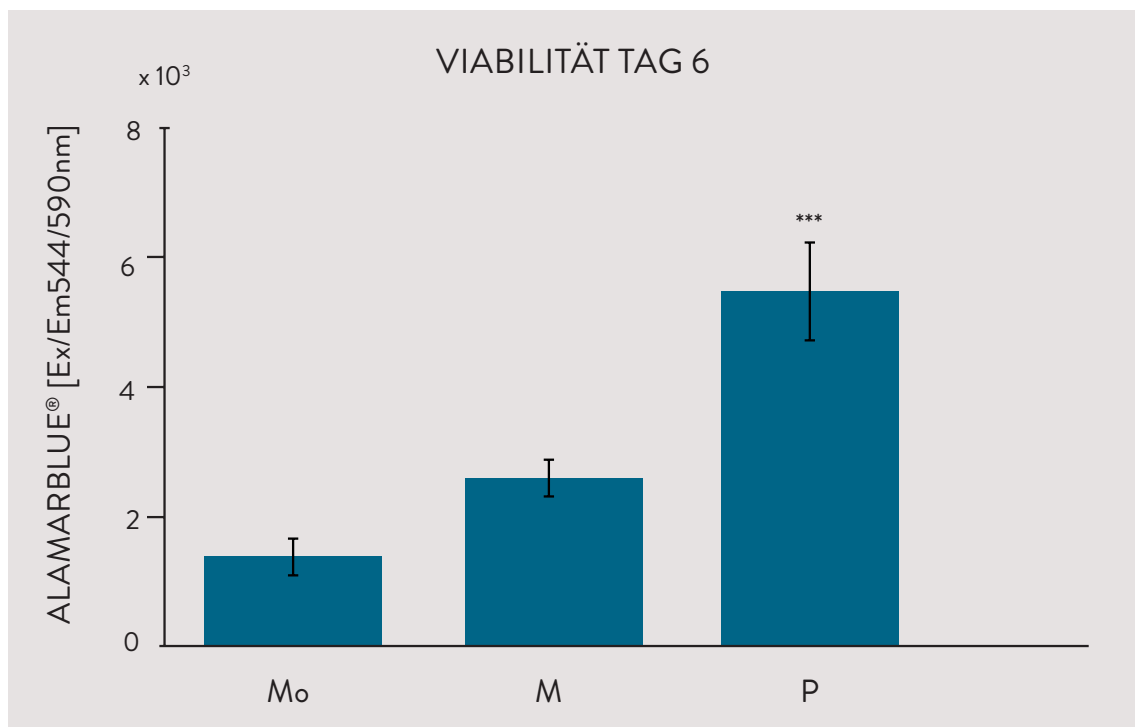


Abbildung E_7: Zellviabilität nach sechstägiger Vorbehandlung von Monozyten zur Generierung von MOMP_s und PCMO_s. Monozyten wurden als Kontrolle in Kulturmedium gehalten. Die Messung erfolgte mittels *AlamarBlue*[®]-Testsystem. P zeigt eine signifikant höhere Viabilität als M. Monozyten (Mo), MOMP_s (M) und PCMO_s (P) 6: Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung. (N = 4, n = 3). (***) $p < 0,001$ [1].

E 3 PHÄNOTYPISIERUNG

E 3.1 Zellmorphologie nach sechstägiger Kultivierung

Nach einer sechstägigen Vorbehandlung in Richtung PCMOs und MOMP_s sowie in der Kontrollkultur der Monozyten zeigten sich lichtmikroskopisch im Wesentlichen zwei unterschiedliche Zellmorphologien.

Zum einen längliche, spindelförmige Zellen und zum anderen flache, rundliche Zellen.

Dabei ließen sich Unterschiede zwischen den einzelnen Zellpopulationen feststellen. Während in den Kulturen der Kontroll-Monozyten und MOMP_s vermehrt ein Mischbild aus spindelförmigen und runden Zellmorphologien zu beobachten war (Abbildung E_8/A+B), zeigte sich in den PCMO-Kultur vorwiegend die rundliche Zellform (Abbildung E_8/C).

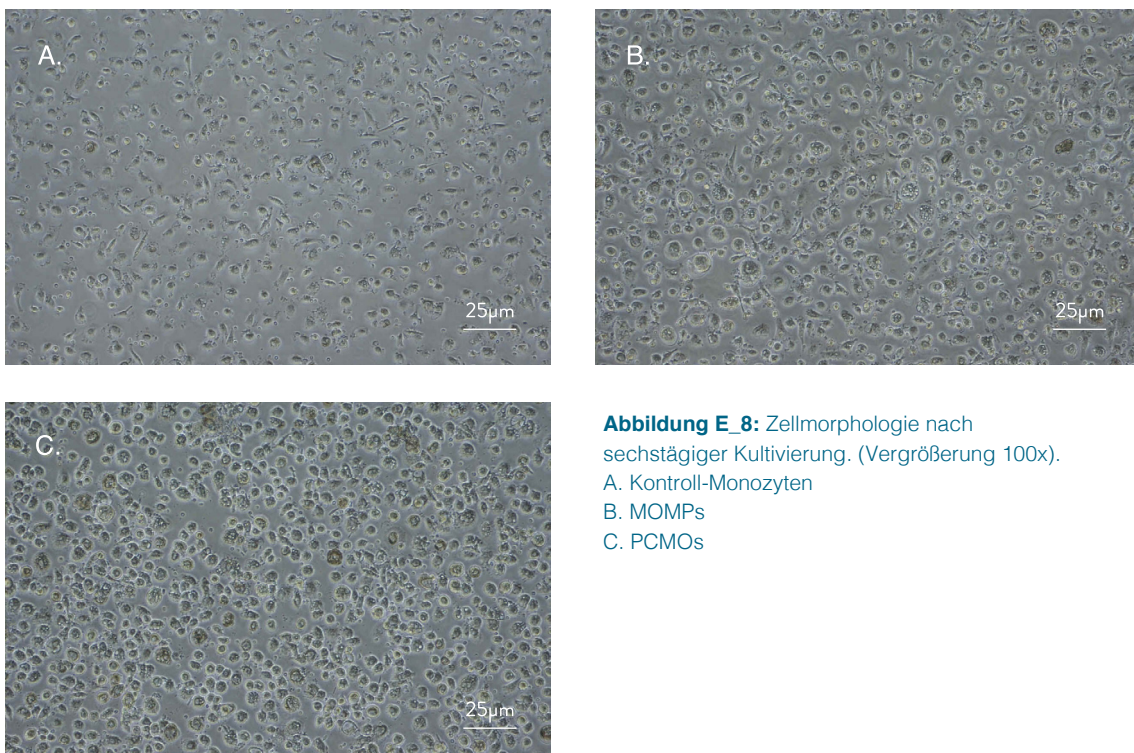


Abbildung E_8: Zellmorphologie nach sechstägiger Kultivierung. (Vergrößerung 100x).
A. Kontroll-Monozyten
B. MOMP_s
C. PCMOs

E 3.2 Expression von Phänotypisierungsmarkern

Nach sechstägiger Kultivierung sowie vierzehntägiger Differenzierungsbehandlung wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker bei den MOMP, PCMO und Kontroll-Monozyten verglichen.

Namentlich waren dies die hämatopoetischen Oberflächenmarker CD 14, 34, 45 und 68 sowie die mesenchymalen Marker CD 90, 105 und Kollagen I.

E 3.2.1 Expression von CD 14, 45, 90 und 105

In der FACS®-Analyse zeigten sowohl die Kontroll-Monozyten wie auch MOMP und PCMO nach sechstägiger Kultivierung eine Expression von CD 14, 45, 90 und 105 ohne sich dabei jeweils wesentlich in der Expressionsstärke voneinander zu unterscheiden (Abbildung E_9 + Tabelle E_1).

Nach einer vierzehntägigen Differenzierungsbehandlung zeigte sich keine bzw. keine wesentliche Abnahme der Expression der hämatopoetischen Oberflächenmarker CD 14 und 45, wohingegen die Stammzellmarker CD 90 und 105 geringer exprimiert wurden (Abbildung E_9 + Tabelle E_1).

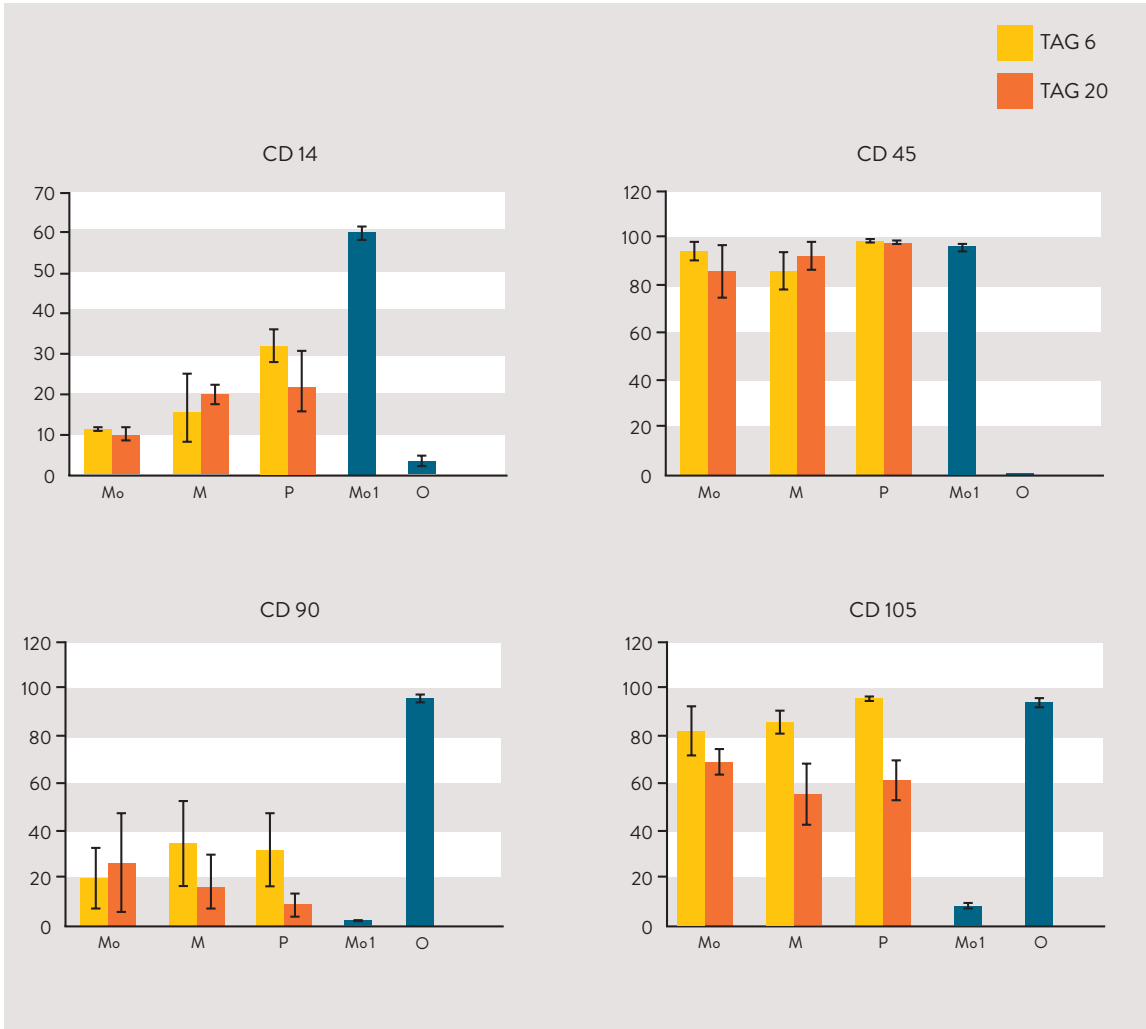


Abbildung E_9: Phänotypisierung monozytärer Zellen mittels unterschiedlicher CD-Marker in der Durchflusszytometrie. Dunkelblau = frisch isolierte Monozyten (Mo1) und primäre Osteoblasten (O); gelb = Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung; orange = Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium. Monozyten (Mo), MOMP (M), PCMO (P). (N = 3, n = 3) [1].

	Monozyten Tag 1	Monozyten Tag 6	MOMPs Tag 6	PCMOs Tag 6	Monozyten Tag 20	MOMPs Tag 20	PCMOs 20 Tage	Osteo- blasten
CD 14	59,78 ± 3,98	11,16 ± 0,77	16,37 ± 8,62	33,62 ± 5,41	9,97 ± 1,83	19,69 ± 2,49	22,92 ± 7,69	3,52 ± 3,04
CD 45	96,65 ± 4,01	93,71 ± 4,29	85,72 ± 7,52	98,60 ± 0,45	85,56 ± 10,97	91,77 ± 6,29	97,49 ± 0,72	0,61 ± 0,36
CD 90	2,23 ± 1,37	19,83 ± 13,43	35,53 ± 17,71	32,24 ± 16,13	26,80 ± 21,02	16,98 ± 13,70	9,51 ± 4,38	96,35 ± 1,76
CD 105	8,73 ± 3,05	82,87 ± 10,56	86,29 ± 4,83	96,38 ± 0,91	69,44 ± 5,73	55,67 ± 13,12	61,85 ± 8,28	94,77 ± 1,78

Tabelle E_1: Phänotypisierung monozytärer Zellen mittels unterschiedlicher CD-Marker in der Durchflusszytometrie. Monozyten Tag 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten Tag 6: Kontroll-Monozyten nach sechstägiger Kultivierung; MOMPs Tag 6: Monozyten nach sechstägiger Vorbehandlung zur Generierung von MOMPs; PCMOs Tag 6: Monozyten nach sechstägiger Vorbehandlung zur Generierung von PCMOs; Monozyten Tag 20: Kontroll-Monozyten nach Differenzierungsbehandlung; MOMPs Tag 20: MOMPs nach Differenzierungsbehandlung; PCMOs Tag 20: PCMOs nach Differenzierungsbehandlung; Osteoblasten: primäre Osteoblasten. (N = 3, n = 3). Zahlenwerte = Prozent positiver Zellen. ± = Standardfehler.

E 3.2.2 Expression von CD 34

Hinsichtlich des hämatopoetischen Oberflächenmarkers CD 34 waren die PCMOs, MOMPs und Kontroll-Monozyten ebenfalls positiv. Die Testung erfolgte mittels RT-PCR. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg nach sechstägiger Kultivierung in allen drei Gruppen (Kontroll-Monozyten, PCMOs und MOMPs) im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten.

Selbiges zeigte sich verglichen zu nicht-adhärenenten Knochenmarkszellen. Dabei erwiesen sich die Anstiege der CD 34-Expression nach 6 Tagen bei den Kontroll-Monozyten wie auch bei den MOMPs als statistisch signifikant (Abbildung E_10).

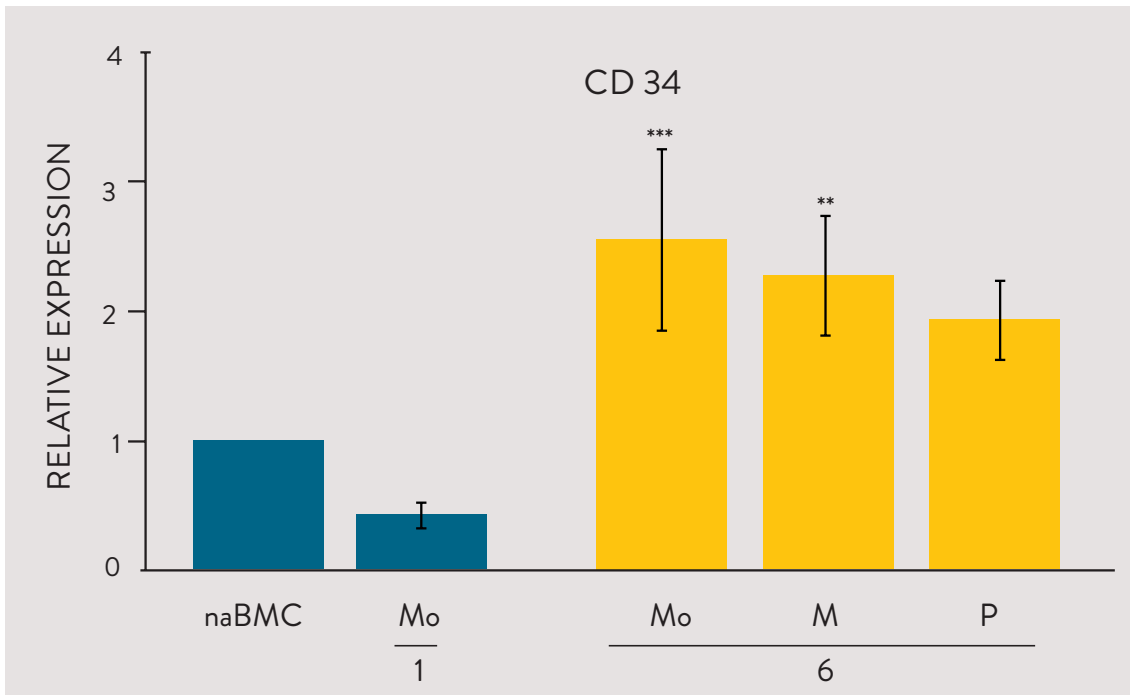


Abbildung E_10: Relative Expression von CD 34 nach sechstägiger Vorbehandlung von humanen monozytären Zellen zur Generierung von MOMP und PCMOs. Monozyten wurden als Kontrolle in Kulturmedium gehalten. Die Messung erfolgte mittels RT-PCR. Die Werte wurden mit GAPDH und schließlich mit der CD 34-Expression von nicht-adhären wachsenden Knochenmarkszellen (naBMC) als interne Kontrolle normalisiert. P und M zeigten eine signifikant höhere CD 34-Expression als Mo an Tag 1. Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP (M) und PCMO (P) 6: Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung. (N = 3, n = 3). (**p < 0,01, ***P < 0,001) [1].

Nach einer vierzehntägigen Differenzierungsbehandlung zeigte sich eine Abnahme der CD 34-Genaktivität bei PCMOs, MOMP und Kontroll-Monozyten. Dabei war die Abnahme der Aktivität bei den Kontroll-Monozyten signifikant. Die Genexpression war vergleichbar niedrig mit der von frisch isolierten Monozyten und nicht-adhären wachsenden Knochenmarkszellen (Abbildung E_11).

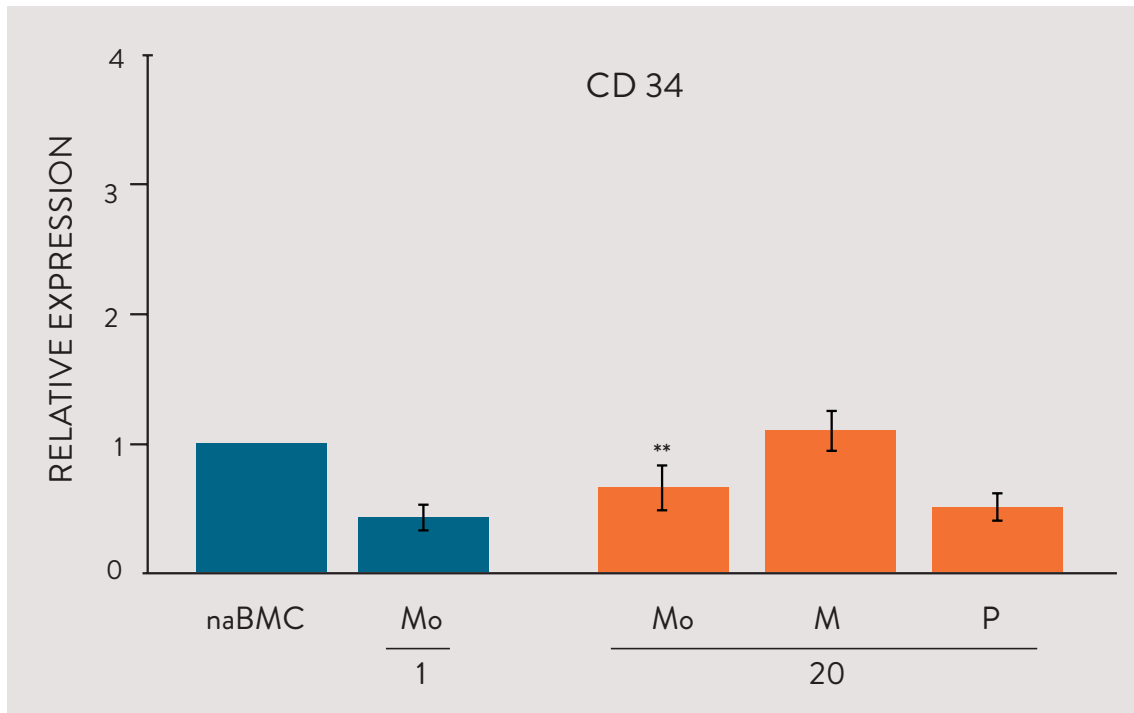


Abbildung E_11: Relative Expression von CD 34 nach osteogener Differenzierung von MOMP's und PCMO's. Monozyten dienten als Kontrolle. Die Messung erfolgte mittels RT-PCR. Die Werte wurden mit GAPDH und schließlich mit der CD 34-Expression von nicht-adhären wachsenden Knochenmarkszellen (naBMC) als interne Kontrolle normalisiert. Nach der Differenzierungsbehandlung war die CD 34-Expression der Mo signifikant niedriger im Vergleich zu derjenigen von Mo nach 6 Tagen. Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP's (M) und PCMO's (P) 20: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium. (N = 3, n = 3). (**p < 0,05) [1].

E 3.2.3 Expression von CD 68

Die immunhistochemische Färbung des Oberflächenmarker CD 68 nach sechstägiger Kultivierung (Kontroll-Monozyten), Dedifferenzierung (PCMO's) und Konditionierung (MOMP's) war positiv. Ebenso zeigte sich die Färbung nach der osteogenen Differenzierung positiv.

Die Verwendung von Vitamin D anstatt Dexamethason hatte darauf keinen Einfluss (Abbildung E_12).

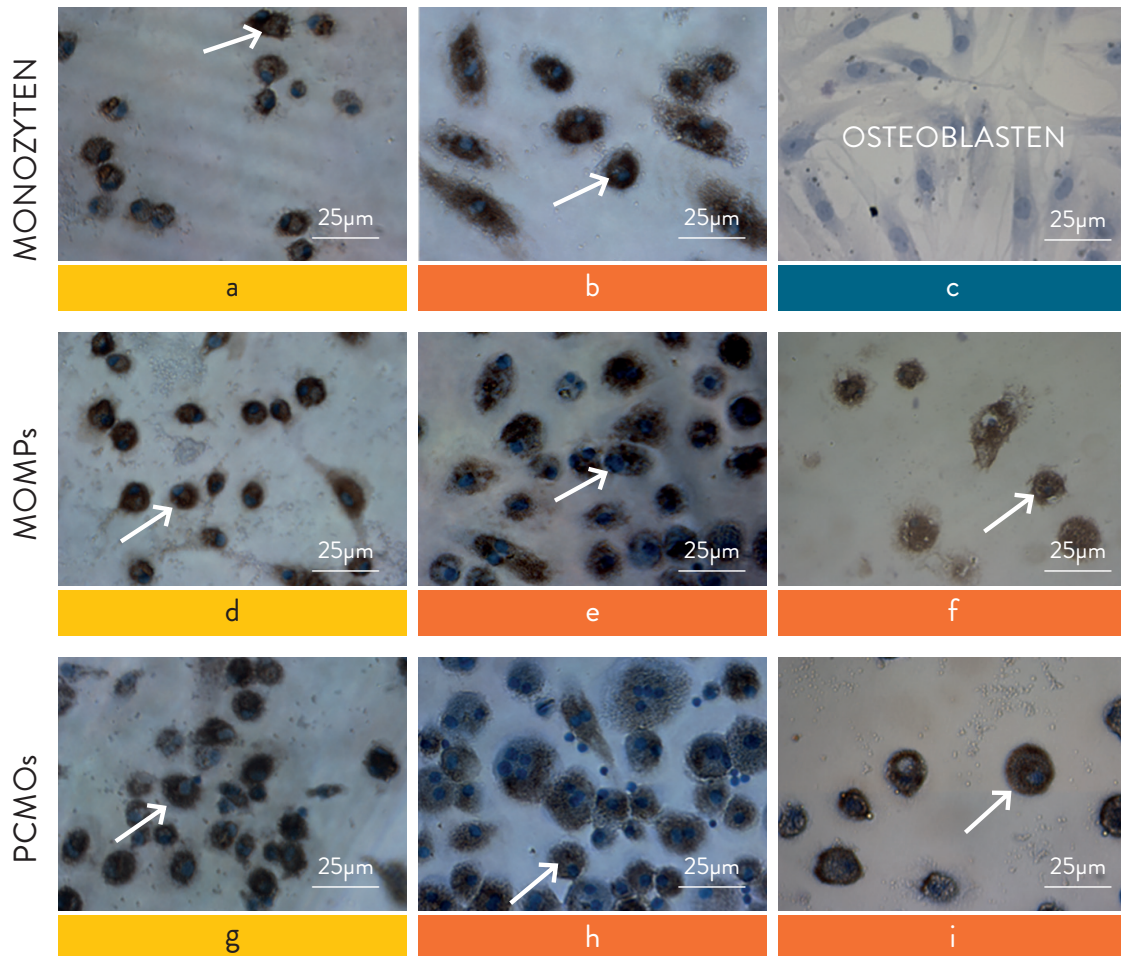


Abbildung E_12: Darstellung der CD 68-Expression von monozytären Zellen mittels immunhistochemischer Färbung. Monozyten, MOMPs und PCMOs waren nach 6 Tagen positiv für CD 68 (erste Spalte; Bilder a, d, g). Ebenso waren sie nach der osteogenen Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium bzw. nach 20-tägiger Kultivierung positiv für CD 68 (zweite Spalte; Bilder b, e, h). Auch die Differenzierungsbehandlung mit Dexamethason-haltigem Medium führte zu einem positiven Ergebnis (zweite Spalte; Bilder f und i). Primäre Osteoblasten waren negativ (zweite Spalte; Bild c). Pfeile markieren Makrophagen-artige Zellen. (N = 3, n = 3). (Vergrößerung 200x) [1].

E 3.2.4 Aktivierung des Kollagen I-Genes

Bezüglich der Transkriptionsrate des Kollagen I-Genes zeigte sich nach sechstägiger Vorbehandlung bzw. Kultivierung kein Anstieg. Dies galt sowohl für die Kontroll-Monozyten als auch für die PCMO- und MOMP-Gruppe. Als Referenz dienten frisch isolierte Monozyten.

Darüber hinaus zeigten sowohl PCMOs, MOMPs und Kontroll-Monozyten eine lediglich geringe Kollagen I-Transkriptionsrate in der RT-PCR – vergleichbar mit der von frisch isolierten Monozyten.

Primäre Osteoblasten hingegen zeigten eine damit verglichen statistisch signifikant höhere Transkriptionsrate von Kollagen I (Abbildung E_13).

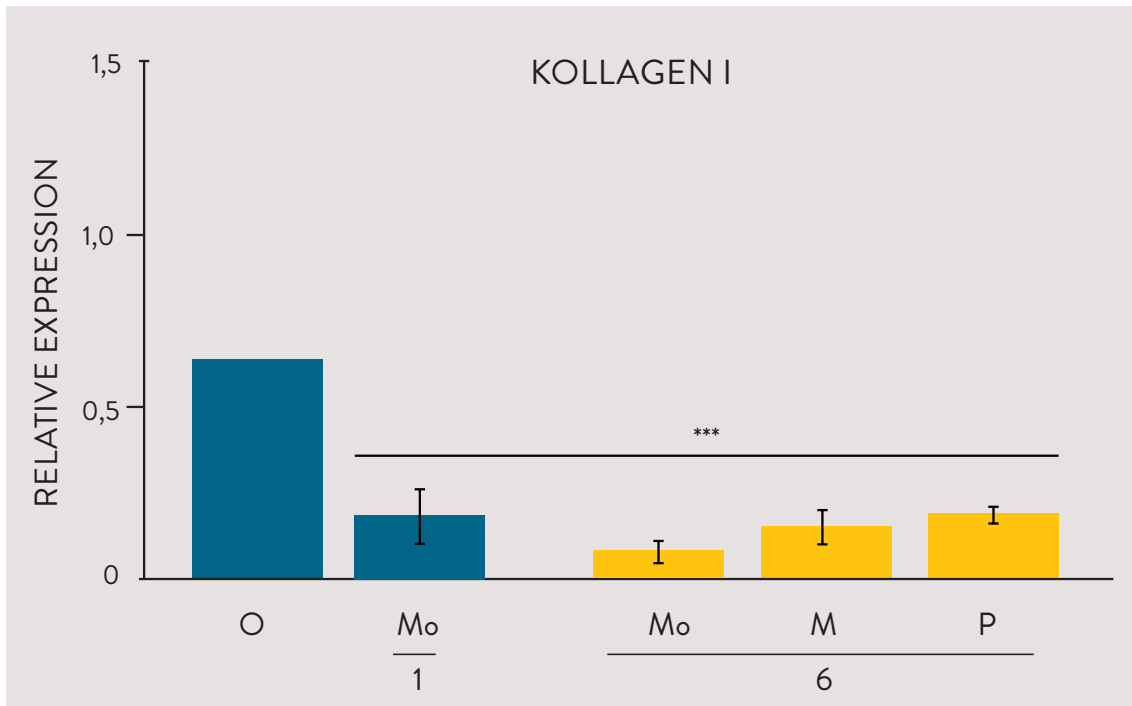


Abbildung E_13: Relative Expression von Kollagen I nach sechstägiger Vorbehandlung von humanen monozytären Zellen zur Generierung von MOMPs und PCMOs. Monozyten wurden als Kontrolle in Kulturmedium gehalten. Die Messung erfolgte mittels RT-PCR. Die Werte wurden mit GAPDH und schließlich mit der Kollagen I-Expression von primären Osteoblasten (O) als interne Kontrolle normalisiert. Alle Zellformen zeigten im Vergleich zu primären Osteoblasten eine signifikant geringere Kollagen I-Expression. Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMPs (M) und PCMOs (P) 6: Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung. (N = 3, n = 3). (**p < 0,001) [1].

Das Aktivitätsniveau des Kollagen I-Genes bleibt auch nach 20-tägiger Kultivierung für PCMOs, MOMPs und Kontroll-Monozyten konstant niedrig (Abbildung E_14).

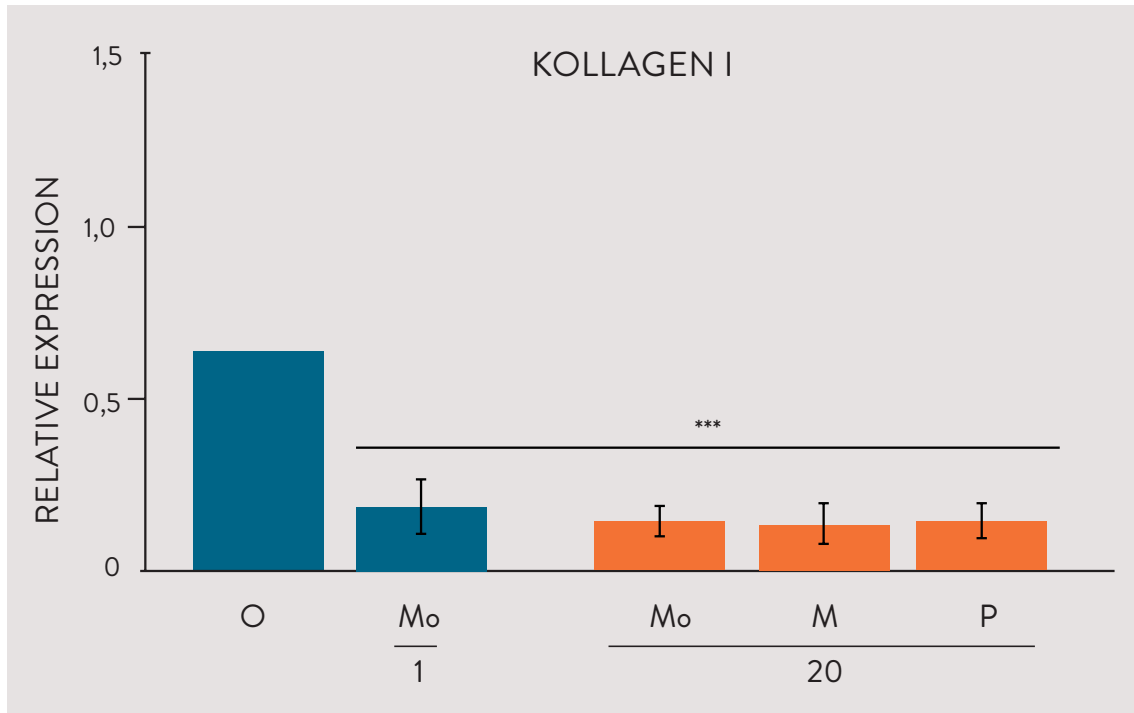


Abbildung E_14: Relative Expression von Kollagen I nach osteogener Differenzierung von MOMP und PCMOs. Monozyten dienen als Kontrolle. Die Messung erfolgte mittels RT-PCR. Die Werte wurden mit GAPDH und schließlich mit der Kollagen I-Expression von primären Osteoblasten (O) als interne Kontrolle normalisiert. Alle Zellformen zeigten im Vergleich zu primären Osteoblasten eine signifikant geringere Kollagen I-Expression. Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP (M) und PCMO (P) 20: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium. (N = 3, n = 3). (***) $p < 0,001$ [1].

E 3.3 Funktionstestung

E 3.3.1 AP-Aktivität

Die AP-Aktivität nach den unterschiedlichen Vor- und Differenzierungsbehandlungen wurde ermittelt und mit dem *AlamarBlue*[®]-Test quantifiziert. Im Vergleich zu primären Osteoblasten zeigte sich eine niedrigere AP-Aktivität bei den aus Monozyten gewonnenen PCMOs und MOMP sowie bei der Kontrollgruppe der Monozyten nach sechstägiger Kultivierung.

Dabei wurde kein wesentlicher Unterschied zu frisch isolierten Monozyten gesehen (Abbildung E_15).

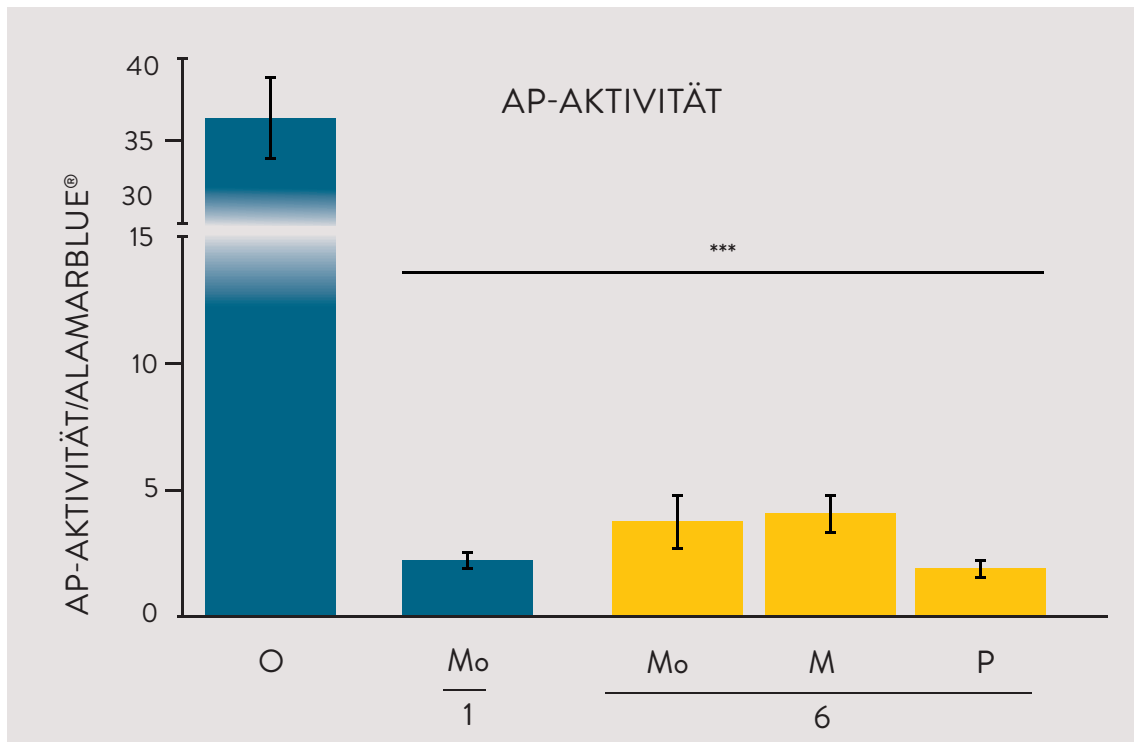


Abbildung E_15: Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}$] nach sechstägiger Vorbehandlung von humanen monozytären Zellen zur Generierung von MOMP_s und PCMO_s. Monozyten wurden als Kontrolle in Kulturmedium gehalten. Osteoblasten (O): primäre Osteoblasten; Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP_s (M) und PCMO_s (P) 6: Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung. (N = 4, n = 3). (***) $p < 0,001$ [1].

Bei allen drei Zellformen (PCMO_s, MOMP_s und Kontrollmonozyten) zeigte sich ein Anstieg der AP-Aktivität im Rahmen der Differenzierungsbehandlung bzw. der Langzeitkultivierung, jedoch blieb die AP-Aktivität signifikant niedriger als die primärer Osteoblasten (Abbildung E_16).

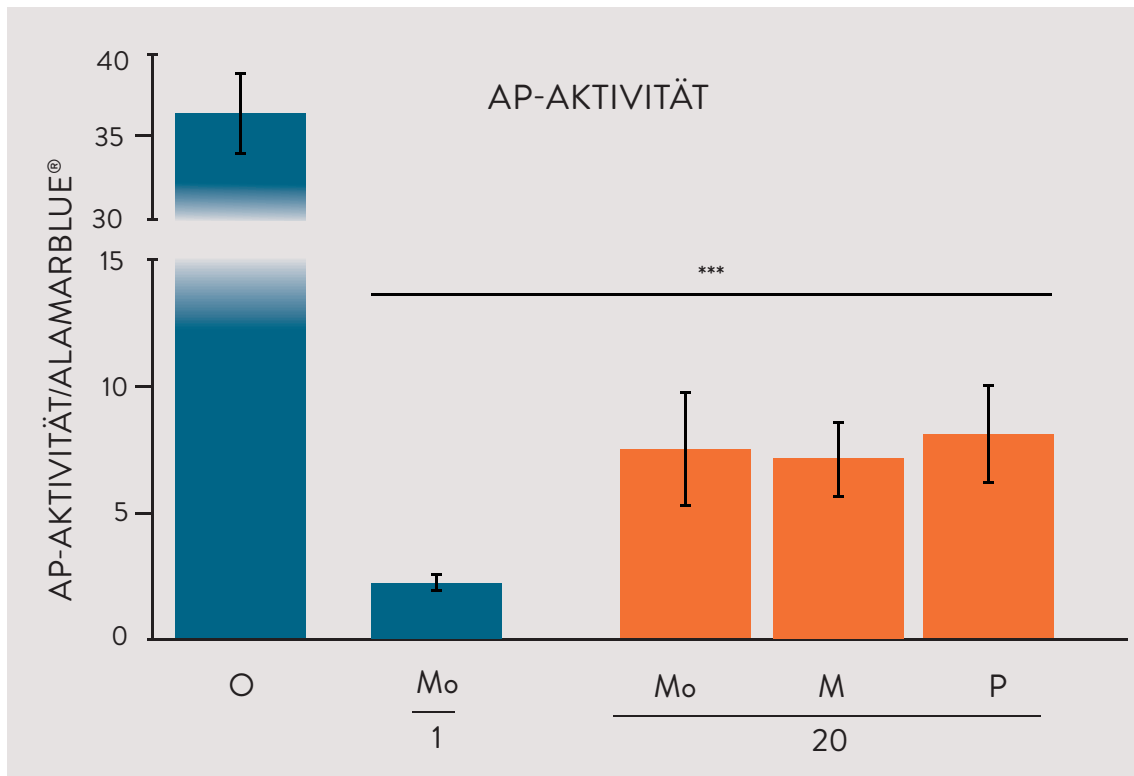


Abbildung E_16: Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität [µmol/min] nach osteogener Differenzierung von MOMPs und PCMOs. Monozyten dienten als Kontrolle. Osteoblasten (O): primäre Osteoblasten; Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMPs (M) und PCMOs (P) 20: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium. (N = 4, n = 3). (***) $p < 0,001$ [1].

E 3.3.2 Produktion extrazellulärer Matrix

Im Vergleich zu primären Osteoblasten zeigte sich nach sechstägiger Kultivierung kein signifikanter Anstieg der Produktion von extrazellulärer Matrix bei der Alizarin Rot-Färbung. Dabei waren die Werte von MOMPs und Kontroll-Monozyten vergleichbar mit denen von frisch isolierten Monozyten. PCMOs zeigten etwas höhere Werte. Insgesamt erwiesen sich die Werte jedoch signifikant niedriger als die von primären Osteoblasten (Abbildung E_17).

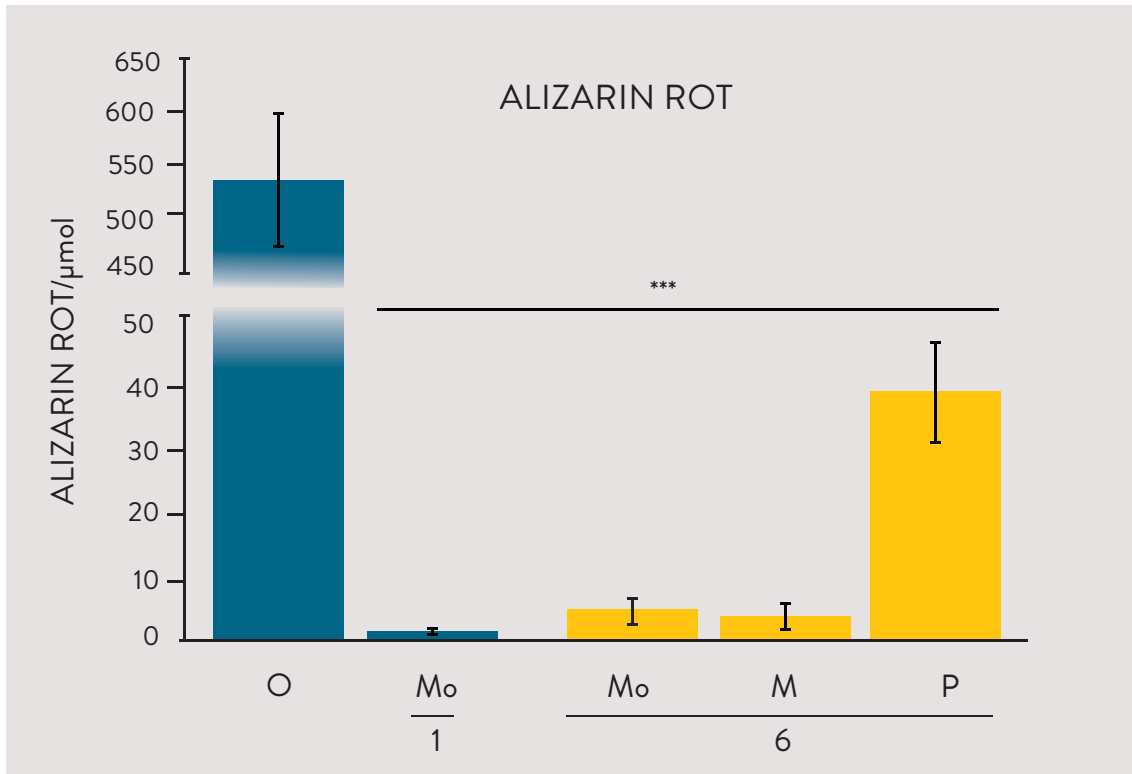


Abbildung E_17: Alizarin Rot-Messung [μmol] nach sechstägiger Vorbehandlung von humanen monozytären Zellen zur Generierung von MOMP_s und PCMO_s. Monozyten wurden als Kontrolle in Kulturmedium gehalten. Osteoblasten (O): primäre Osteoblasten; Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP_s (M) und PCMO_s (P) 6: Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung. (** $p < 0,001$). (N = 4, n = 3) [1].

Im Rahmen der Differenzierungsbehandlung konnte kein Anstieg der Produktion extrazellulärer Matrix registriert werden (Abbildung E_18).

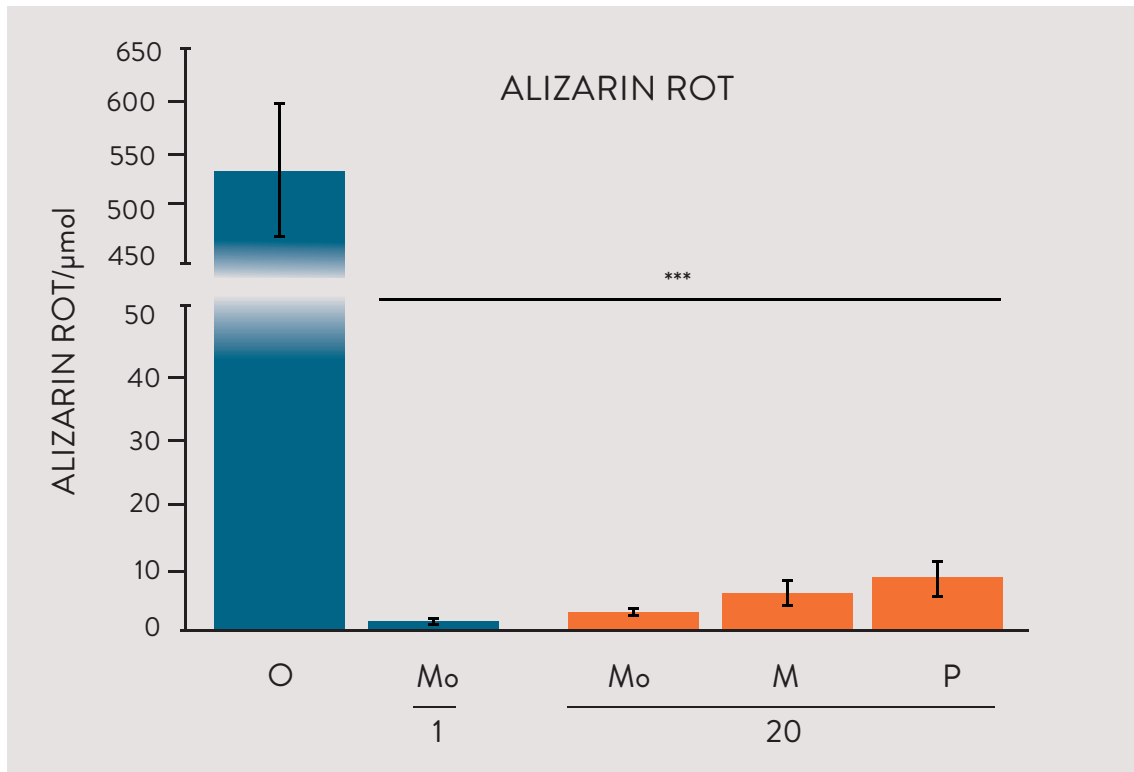


Abbildung E_18: Alizarin Rot-Messung [μmol] nach osteogener Differenzierung von MOMPs und PCMOs. Monozyten dienten als Kontrolle. Osteoblasten (O): primäre Osteoblasten; Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMPs (M) und PCMOs (P) 20: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium. (N = 4, n = 3). (**p < 0,001) [1].

E 3.4 Expression von Transkriptionsfaktoren

E 3.4.1 RUNX-2-Expression

Die Expression von RUNX-2 als übergeordnetes Schlüsselgen wurde mittels RT-PCR ermittelt. Primäre Osteoblasten zeigten im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten sowie zu MOMPs und Kontroll-Monozyten eine wesentlich höhere Expressionsrate von RUNX-2. Signifikant höhere Werte zeigten hingegen PCMOs, diese waren mit denen von primären Osteoblasten vergleichbar (Abbildung E_19).

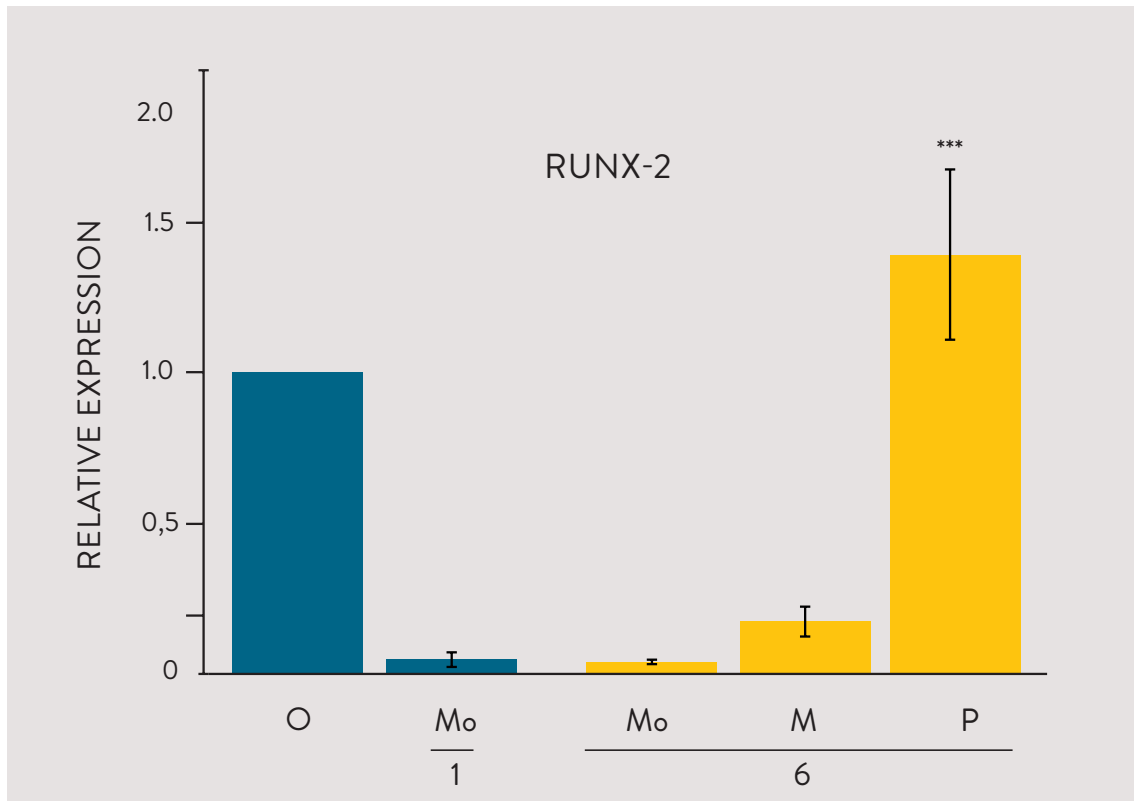


Abbildung E_19: Relative RUNX-2-Expression nach sechstägiger Vorbehandlung von humanen monozytären Zellen zur Generierung von MOMPs und PCMOs. Monozyten wurden als Kontrolle in Kulturmedium gehalten. Die Messung erfolgte mittels RT-PCR. Die Werte wurden mit GAPDH und schließlich mit der RUNX-2-Expression von primären Osteoblasten (O) als interne Kontrolle normalisiert. Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMPs (M) und PCMOs (P) 6: Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung. (N = 3, n = 3) (***) $p < 0,001$ [1].

Im Vergleich zu dem nach sechstägiger Dedifferenzierungsbehandlung festgestellten signifikanten Anstieg der RUNX-2-Expression bei PCMOs zeigte sich diese nach der Differenzierungsbehandlung wiederum signifikant erniedrigt und befand sich auf einem vergleichbar niedrigen Level mit der von MOMPs und Kontroll-Monozyten zum gleichen Zeitpunkt (Abbildung E_20).

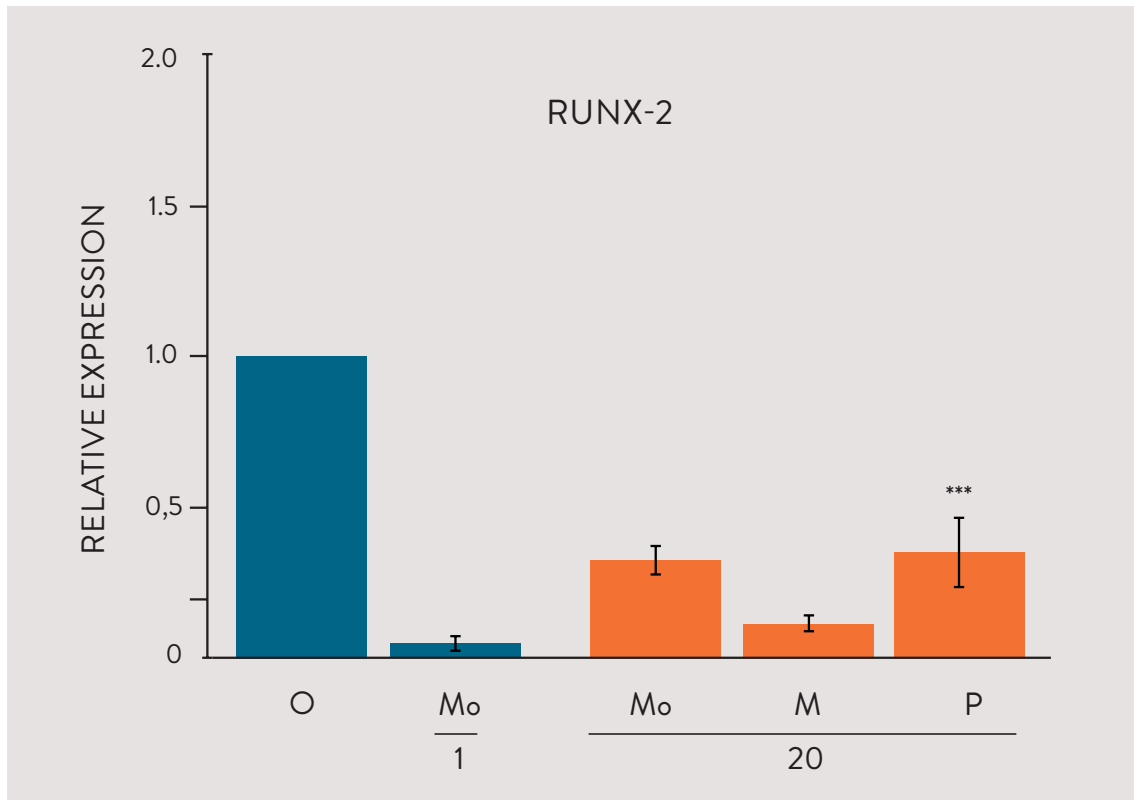


Abbildung E_20: Relative RUNX-2-Expression nach osteogener Differenzierung von MOMP's und PCMO's. Monozyten dienten als Kontrolle. Die Messung erfolgte mittels RT-PCR. Die Werte wurden mit GAPDH und schließlich mit der RUNX-2-Expression von primären Osteoblasten (O) als interne Kontrolle normalisiert. Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP's (M) und PCMO's (P) 20: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium. (N = 3, n = 3). (***) $p < 0,001$ [1].

E 3.4.2 Osterix-Expression

Als weiteres übergeordnetes Schlüsselgen fungiert Osterix, dessen Expression ebenfalls mittels RT-PCR bestimmt wurde.

Diese steigt nach der sechstägigen Kultivierung von Monozyten ebenso wie nach der Konditionierung von Monozyten zu MOMP's im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten signifikant an. Bei PCMO's zeigte sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg (Abbildung E_21).

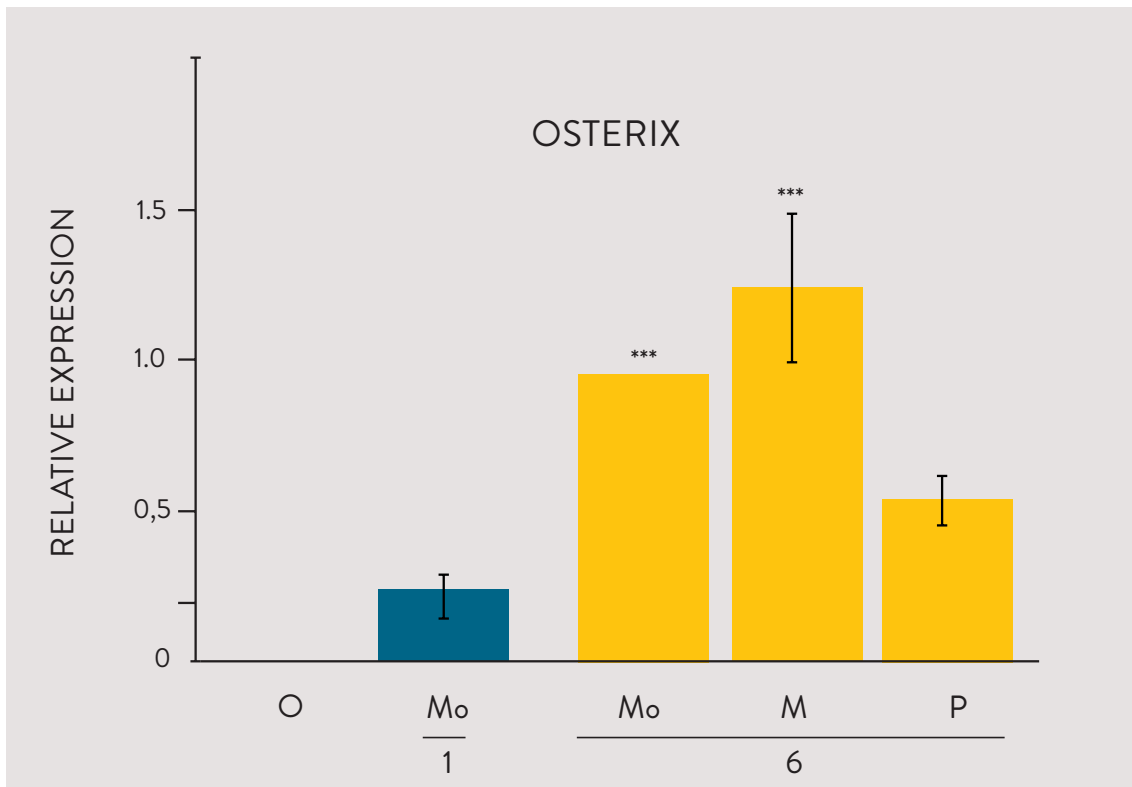


Abbildung E_21: Relative Osterix-Expression nach sechstägiger Vorbehandlung von humanen monozytären Zellen zur Generierung von MOMPs und PCMOs. Monozyten wurden als Kontrolle in Kulturmedium gehalten. Die Messung erfolgte mittels RT-PCR. Die Werte wurden mit GAPDH und schließlich mit der Osterix-Expression der Kontroll-Monozyten als interne Kontrolle normalisiert. Osteoblasten (O): primäre Osteoblasten; Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMPs (M) und PCMOs (P) 6: Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung. (N = 3, n = 3). (***) $p < 0,001$ [1].

Die signifikant erhöhte Osterix-Expression nach sechstägiger Vorbehandlung der MOMPs sowie Kultivierung der Kontroll-Monozyten zeigte im Rahmen der Differenzierungsbehandlung respektive Langzeitkultivierung einen signifikanten Abfall und war verglichen mit den PCMOs zum selben Zeitpunkt und den frisch isolierten Monozyten auf einem ähnlich niedrigen Niveau (Abbildung E_22).

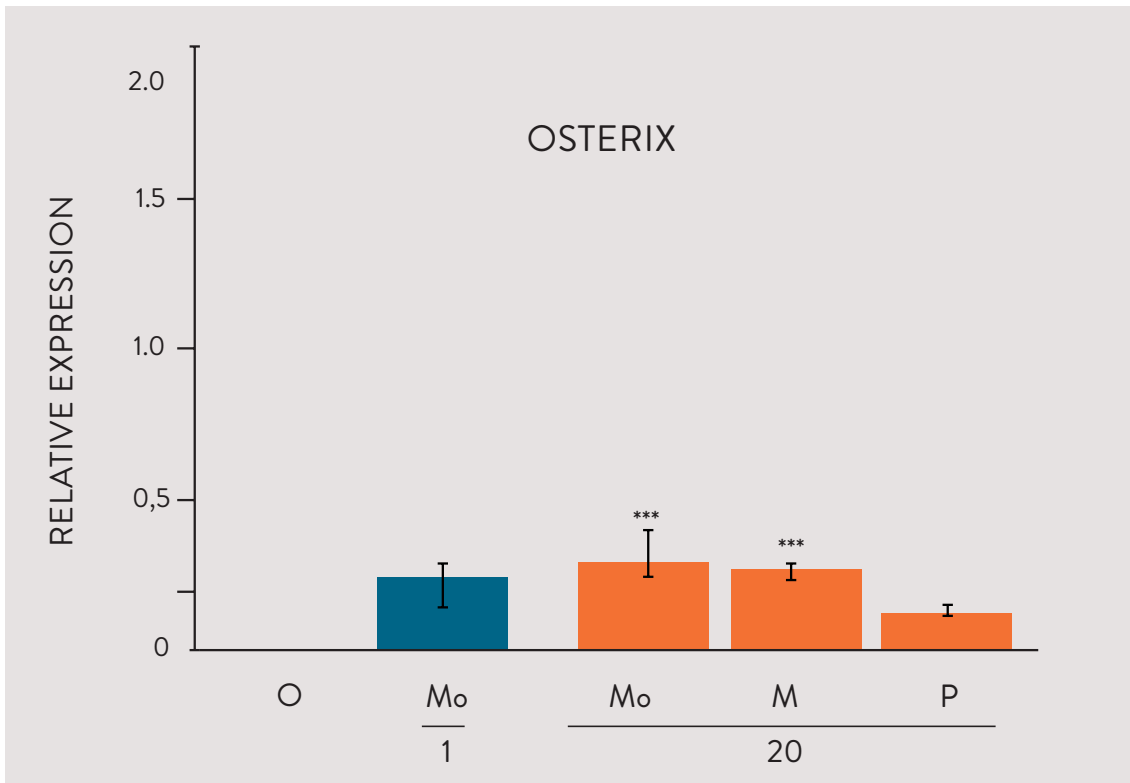


Abbildung E_22: Relative Osterix-Expression nach osteogener Differenzierung von MOMP und PCMOs. Monozyten dienten als Kontrolle. Die Messung erfolgte mittels RT-PCR. Die Werte wurden mit GAPDH und schließlich mit der Osterix-Expression der Kontroll-Monozyten (Mo) als interne Kontrolle normalisiert. Osteoblasten (O): primäre Osteoblasten; Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP (M) und PCMOs (P) 20: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium. (N = 3, n = 3). (**p < 0,01) [1].

E 4 GENEXPRESSIONSPROFIL UNTERSCHIEDLICHER VOR- UND DIFFERENZIERUNGSBEHANDLUNGEN

Der Einfluss der Vor- und Differenzierungsbehandlungen auf das Expressionsprofil von osteogenen Markergenen wurde mittels RT-PCR untersucht. Verglichen wurden sowohl die unterschiedlichen Vorbehandlungen der MOMP und PCMOs sowie deren osteogene Differenzierung sowohl mit Dexamethason- als auch Vitamin D-haltigem Differenzierungsmedium. Dabei zeigte sich kein wesentlicher Einfluss der unterschiedlichen Behandlungen auf die Expression der untersuchten Markergene (Abbildung E_23).

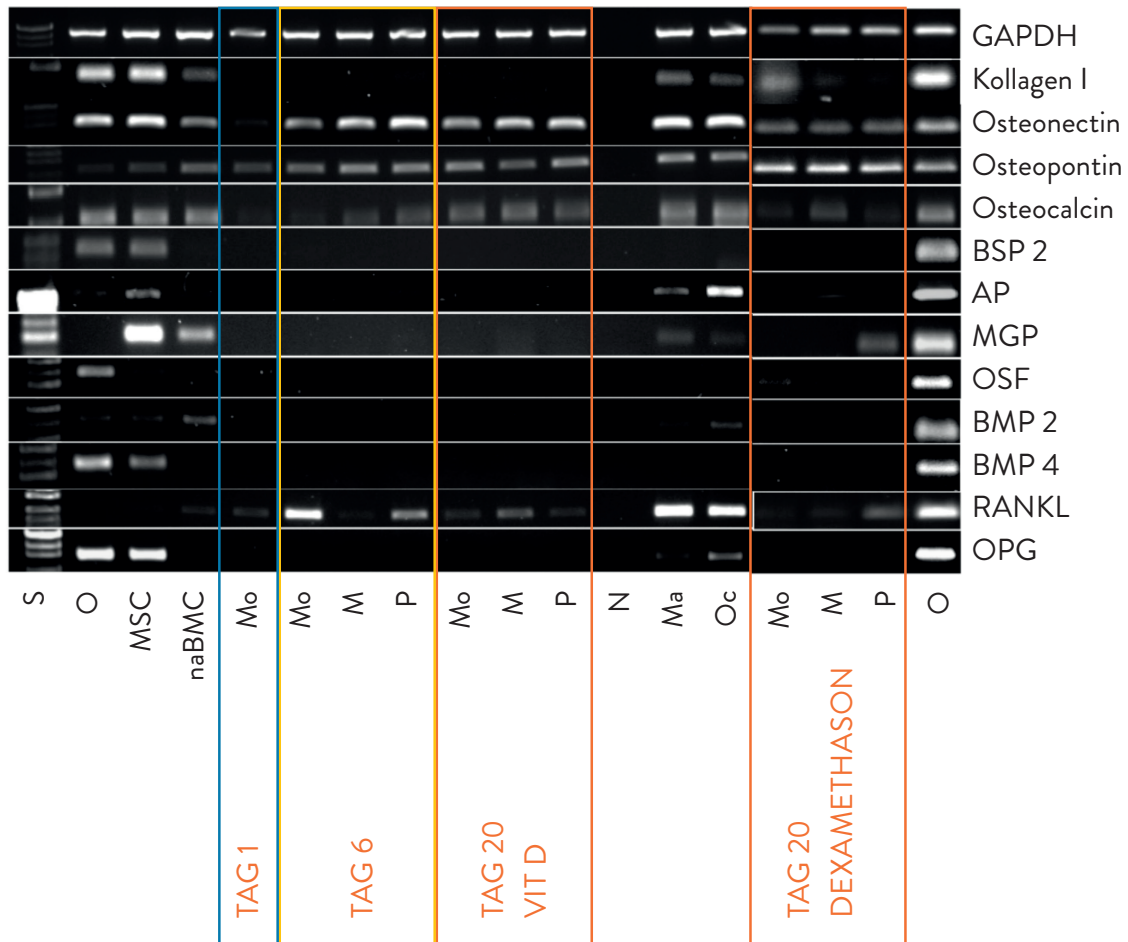


Abbildung E_23: Expressionsmuster verschiedener Markergene in der RT-PCR.

Monozyten (Mo) Tag 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP (M) und PCMO (P) Tag 6: Zellen nach sechstägiger Kultivierung bzw. Vorbehandlung; Monozyten (Mo), MOMP (M) und PCMO (P) Tag 20 Vit D: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium; Monozyten (Mo), MOMP (M) und PCMO (P) Tag 20 Dexamethason: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Dexamethason-haltigem Medium; Kontrollen: primäre Osteoblasten (O); mesenchymale Stammzellen (MSC); nicht-adhärenent wachsende Knochenmarkszellen (naBMC). Amplifikationsgröße (S) [1].

E 5 ZELLMORPHOLOGIE NACH DIFFERENZIERUNGSBEHANDLUNG

Neben den o. g. spindelförmigen und runden Zellen zeigte sich nach der Differenzierungsbehandlung eine dritte Zellform: mehrkernige Riesenzellen. Diese zeigten sich vor allem in der Population der PCMOs nach osteogener Differenzierung mit Vitamin D-haltigem Medium. Ihre Anzahl unterschied sich dabei von Spender zu Spender (Abbildung E_24)

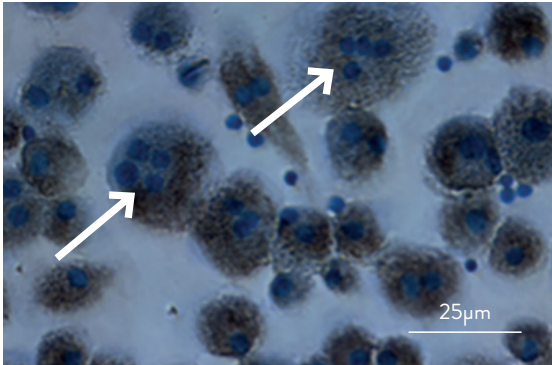
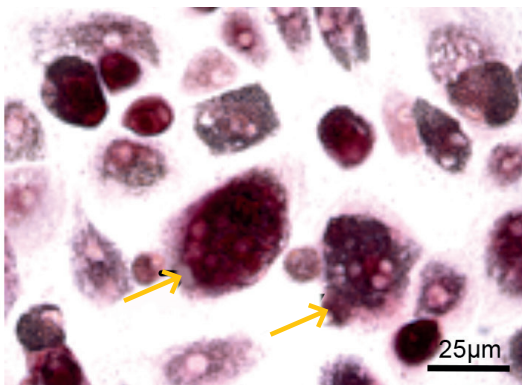


Abbildung E_24: Mehrkernige Riesenzellen in der PCMO-Population nach osteogener Differenzierung mit Vitamin D-haltigem Medium. (Vergrößerung 200x) [1].

E 6 CHARAKTERISIERUNG VON RIESENZELLEN

Zur weiteren Charakterisierung der o. g. mehrkernigen Riesenzellen erfolgte eine TRAP-Färbung. Hierbei zeigten die mehrkernigen Zellen ein stark positives Ergebnis (Figur 3).

A.



B.

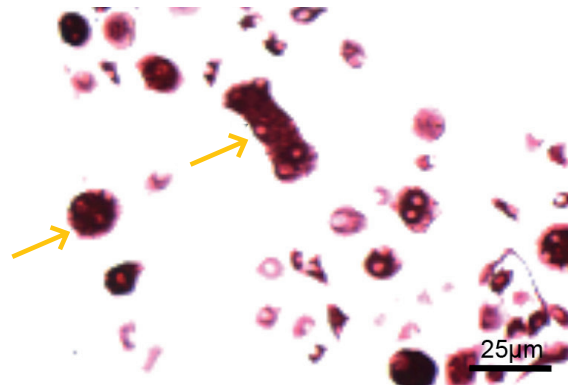


Abbildung E_25: TRAP-Färbung der mehrkernigen Riesenzellen nach osteogener Differenzierung der PCMOs mit Vitamin D-haltigem Medium (A). TRAP-Färbung von Kontroll-Makrophagen (B). (Vergrößerung 200x) [1].

E 7 AP-AKTIVITÄT VON MAKROPHAGEN UND OSTEOKLASTEN

Um zu prüfen, ob der beobachtete Anstieg der AP-Aktivität im Rahmen der Differenzierungsbehandlung von MOMP's und PCMO's bzw. der Langzeitkultivierung von Kontroll-Monozyten ein Zeichen der Aktivierung und Differenzierung von Monozyten in Richtung Makrophagen oder Osteoklasten sein könnte, wurde die AP-Aktivität von Makrophagen und Osteoklasten bestimmt. Dabei zeigte sich eine vergleichbar hohe AP-Aktivität von Makrophagen mit der von Kontroll-Monozyten, MOMP's und PCMO's, wohingegen Osteoklasten keine wesentlich erhöhte Aktivität zeigten (Abbildung E_26).

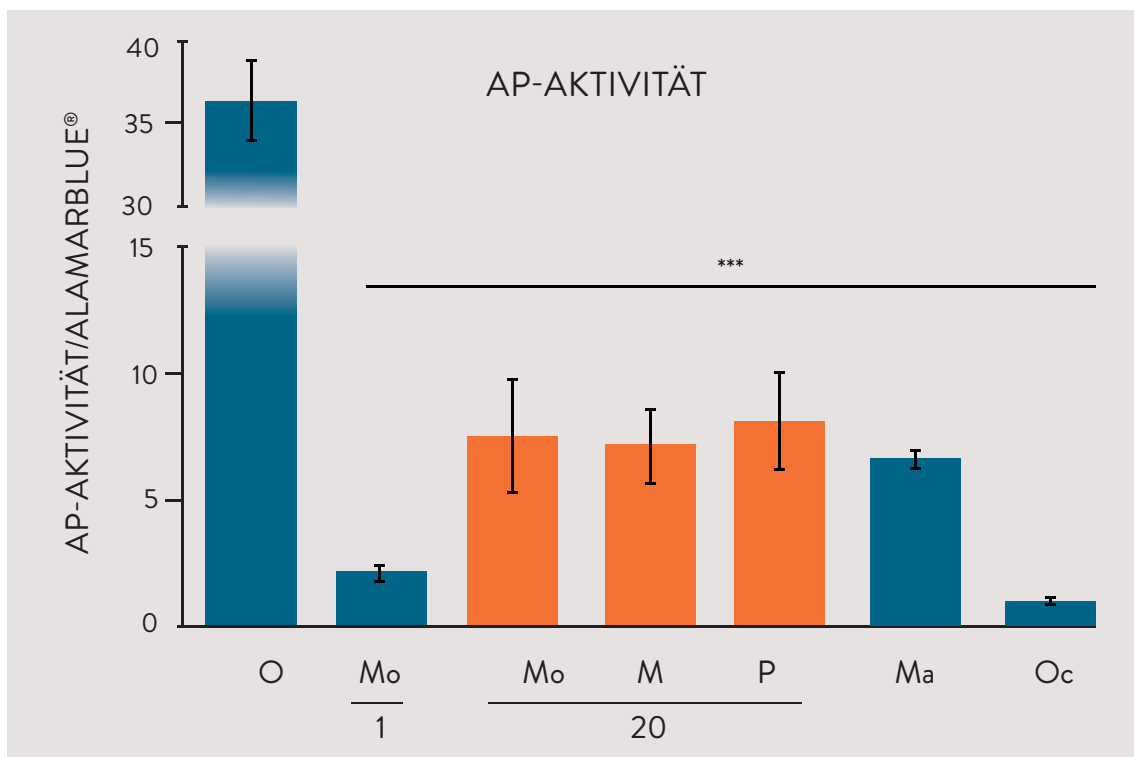


Abbildung E_26: Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}$] von Monozyten nach Reifung zu Makrophagen (Ma) bzw. Osteoklasten (Oc). Primäre Osteoblasten zeigten eine signifikant höhere AP-Aktivität im Vergleich zu den anderen Zellformen. Die Normalisierung erfolgte mit der über das *AlamarBlue*®-Testsystem ermittelten Zellviabilität. Monozyten (Mo) 1: frisch isolierte Monozyten; Monozyten (Mo), MOMP's (M) und PCMO's (P) 20: Zellen nach Differenzierungsbehandlung mit Vitamin D-haltigem Medium. (N = 4, n = 3). (***) $p < 0,001$ [1].

E 8 AP-AKTIVITÄT NACH AKTIVIERUNG VON MONOZYTEN

Um eine mögliche Korrelation der AP-Aktivität mit dem Aktivierungsstatus von Monozyten zu untersuchen, wurden die Zellen durch Zugabe von Kälberserum aktiviert. Dieser Effekt wurde an PCMOs überprüft, die in den Vorversuchen die höchste AP-Aktivität aufwiesen.

Dies führte neben einem Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , TGF- β und RANKL zu einer Erhöhung der AP-Aktivität im Vergleich zur Population, deren Differenzierungsmedium autologes Serum enthielt (Abbildung E_27).

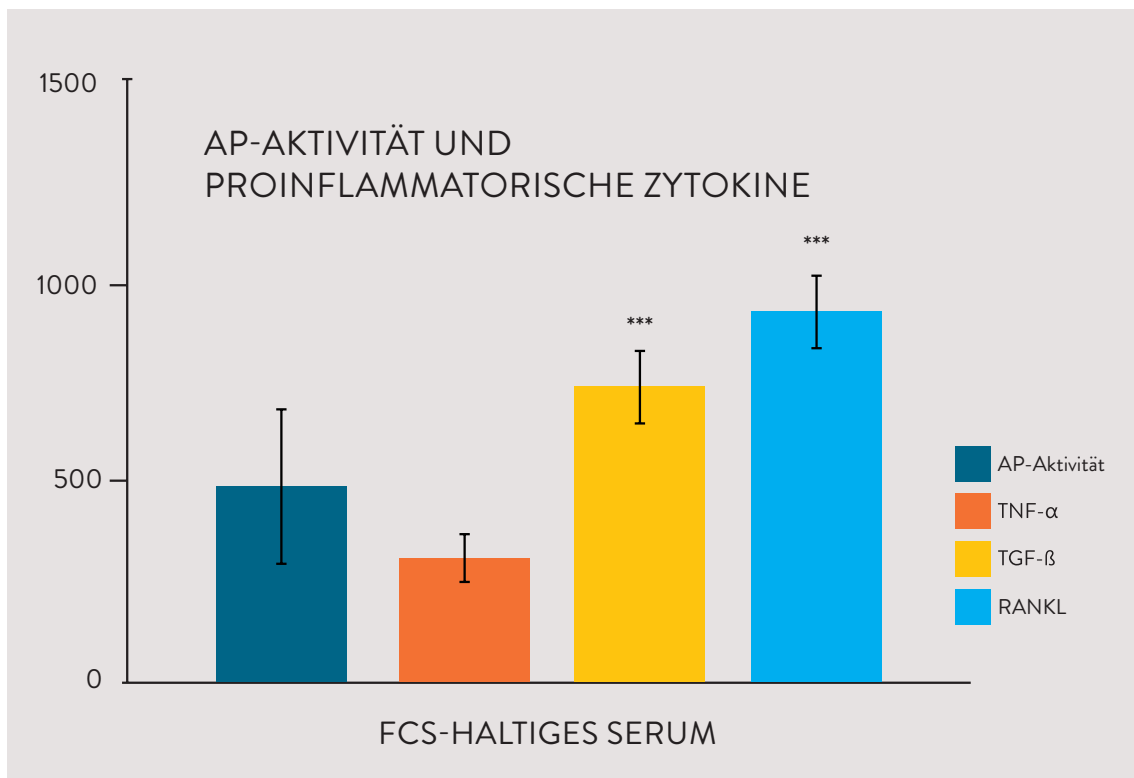


Abbildung E_27: Verhalten der AP-Aktivität sowie verschiedener proinflammatorischer Zytokine nach osteogener Differenzierung von PCMOs mit FCS- (fetales Kälberserum) haltigem Serum. Die Normalisierung erfolgte mit der relativen Proteinmenge aus der SRB-Analyse. AP-Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}$]; TNF- α [pg/mL]; TGF- β [pg/mL]; RANKL [pg/mL]. (N = 5, n = 3). (***)p < 0,001 [1].

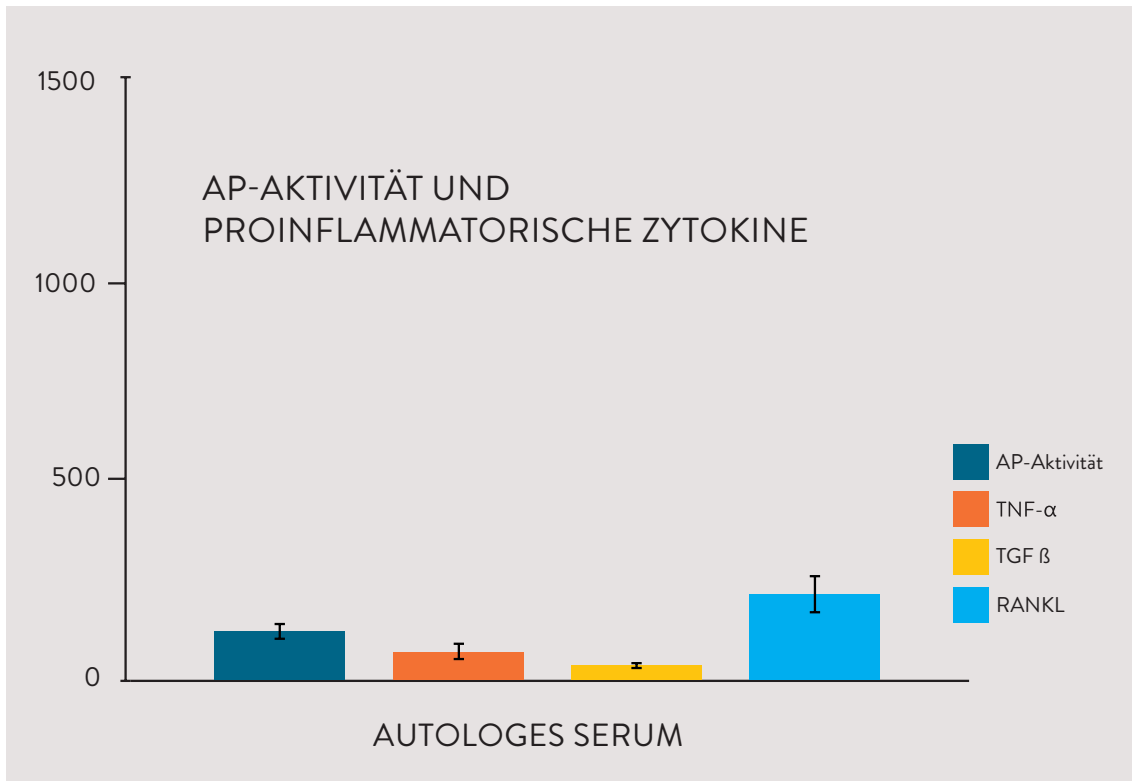


Abbildung E_28: Verhalten der AP-Aktivität sowie verschiedener proinflammatorischer Zytokine nach osteogener Differenzierung von PCMOs mit autologem Serum. Die Normalisierung erfolgte mit der relativen Proteinmenge aus der SRB-Analyse. AP-Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}$]; TNF- α [pg/mL]; TGF- β [pg/mL]; RANKL [pg/mL]. (N = 5, n = 3). (***) $p < 0,001$ [1].

F ZUSAMMENFASSUNG I (ERGEBNISSE)

F 1 PROLIFERATIONSVERHALTEN

Im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen zeigten die Monozyten in der Langzeitkultivierung eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit. Diese wurde durch Zugabe von Dexamethason in das Kulturmedium zusätzlich negativ beeinflusst. Vitamin D zeigte diesen zytotoxischen Effekt nicht. Autologes Serum ist im Vergleich zu FCS signifikant überlegen.

F 2 VERGLEICHBARER PHÄNOTYP

Nach sechstägiger Kultivierung zeigten MOMP's und PCMO's sowie die Kontroll-Monozyten einen ähnlichen Phänotyp. Dabei traten im Wesentlichen zwei Zellmorphologien auf: längliche, spindelförmige und flache, rundliche Zellen. Unterschiede zeigten sich in Bezug auf deren Häufigkeitsverteilung.

MOMP's, PCMO's und Kontroll-Monozyten exprimierten sowohl die hämatopoetischen Oberflächenmarker CD 14, 34, 45 sowie die mesenchymaler Marker CD 90, 105 und Kollagen I. Schließlich erwies sich die Expression des monozytären Markers CD 68 in der immunhistochemischen Färbung ebenfalls jeweils als positiv.

F 3 EINFLUSS DER DIFFERENZIERUNGSBEHANDLUNG

Im Rahmen der Differenzierungsbehandlung zeigte sich das Auftreten einer dritten Zellform: CD 68-positive mehrkernige Riesenzellen. Diese traten insbesondere in der PCMO-Population nach Behandlung mit Vitamin D-haltigem Differenzierungsmedium auf und waren bei der TRAP-Färbung positiv.

In den funktionellen Tests bzgl. der AP-Aktivität und der Produktion von mineralisierter, extrazellulärer Matrix zeigte sich in der RT-PCR zum einen ein Anstieg der AP-Aktivität im Rahmen der Differenzierungsbehandlung. Dies galt für alle drei Zellpopulationen (MOMP's, PCMO's, Kontroll-Monozyten). Dabei war die Aktivität der Alkalischen Phosphatase jedoch weitaus geringer als die von primären Osteoblasten. Zum anderen erwies sich die Produktion mineralisierter,

extrazellulärer Matrix für alle Zellpopulationen als sehr gering. Bei der Untersuchung der übergeordneten Kontrollgene RUNX-2 und Osterix konnte nach der Differenzierungsbehandlung keine wesentliche Aktivität dieser beiden Transkriptionsfaktoren festgestellt werden. Im Gegenteil nahm deren Aktivität wieder signifikant ab, nachdem sie zwischenzeitlich – im Rahmen der Vorbehandlung – teilweise signifikant gestiegen war. Ähnlich dieser Beobachtung zeigte sich bei der Untersuchung von osteoblastären Markergenen kein wesentlicher Einfluss der Differenzierungsbehandlung auf deren Expression. Jedoch zeigte sich bereits nach der Vorbehandlung bei allen drei Zellpopulationen die Expression von Osteopontin, Osteocalcin und Osteonectin. Überraschenderweise erwiesen sich sogar primär isolierte Monozyten, Osteoklasten und Makrophagen positiv bzgl. dieser Marker.

F 4 PERSISTENZ HÄMATOPOETISCHER OBERFLÄCHEN-MARKER IM RAHMEN DER DIFFERENZIERUNGS-BEHANDLUNG

Es zeigte sich im Rahmen der Differenzierungsbehandlung die Persistenz der hämatopoetischen Oberflächenmarker CD 14, 45. Im Gegensatz dazu nahm die Expression der Stammzellmarker CD 34 und 90 ab. Zudem konnte beobachtet werden, dass der monozytäre Marker CD 68 ebenfalls durchgehend exprimiert wurde.

F 5 STEIGERUNG DER AP-AKTIVITÄT IM RAHMEN DER MONOZYTEN-AKTIVIERUNG

Die beobachtete Steigerung der AP-Aktivität bei den MOMP, PCMO und Kontroll-Monozyten wurde hinsichtlich ihrer Korrelation in Bezug auf die Aktivierung von Monozyten untersucht. Aus Monozyten gereifte Makrophagen zeigten – im Gegensatz zu Osteoklasten – ebenfalls eine gesteigerte AP-Aktivität. Es zeigte sich bei der Differenzierung von PCMO (diese zeigten nach der Differenzierungsbehandlung die höchste AP-Aktivität) mit FCS-haltigem Medium – im Vergleich zu mit autologem Serum versetztem Differenzierungsmedium – neben einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen eine gesteigerte AP-Aktivität.

G 1 TRANSDIFFERENZIERUNG UND STAMMZELLCHARAKTER

Ein entscheidendes Momentum bei der Entwicklung von Wirbeltieren stellt die Etablierung der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm sowie die Zuordnung der Zellen zu diesen dar [26].

Dabei nahm man lange Zeit an, dass diese Keimblattzugehörigkeit zeitlebens aufrecht erhalten wird und dabei das Schicksal einer Zelle vom Stammzellstatus über Progenitor- und Precursorzellen bis hin zu reifen, differenzierten Zellen bis auf wenige Ausnahmen vorprogrammiert sei [12,26].

Man ging davon aus, dass adulte Stammzellen nur für die Regeneration und Integrität des Gewebes, in dem sie vorkommen, verantwortlich sind [311,312].

Dies würde bedeuten, dass gewebespezifische Stammzellen die Fähigkeit, Zellen anderer Zelllinien zu generieren, unwiderruflich verloren hätten.

Gegen Ende der neunziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts zeigten Ferrari *et al.*, dass aus dem Knochenmark von Mäusen stammende myogene Progenitorzellen zur Regeneration von Skelettmuskelgewebe befähigt sind. Eglitis und Mezey konnten deren Differenzierungspotenzial in Gehirnzellen (Astrozyten) zeigen [313,314].

Um die Jahrhundertwende folgte eine ganze Reihe von Arbeiten, die über eine Differenzierungsfähigkeit von Knochenmarkszellen in Neurone, Hepatozyten, Myokard-, Endothel- und Gliazellen berichteten [315-320].

Weitere Arbeiten postulieren diese Form der Plastizität auch für andere Stammzellen [321-326].

Dabei scheint nicht nur ein Differenzierungspotenzial in ortsfremde Gewebe des gleichen Keimblattes, sondern auch in Gewebe eines anderen Keimblattes möglich zu sein [26].

Der Übergang einer differenzierten Zelle in eine Zelle mit anderem Differenzierungsstatus – ggf. auch im Sinne einer neuen Keimblattzugehörigkeit – wird gemeinhin als Transdifferenzierung bezeichnet [1,327,328].

Dies entspricht nicht unserem eigentlichen Verständnis der hierarchisch gegliederten Entwicklung einer Zelle: von der Befruchtung der Eizelle über eine schritt-

weise zunehmende Differenzierung bis hin zur ausdifferenzierten Zelle, die in ihrem Gewebeverbund ihrer Bestimmung nachkommt [328].

Transdifferenzierungen kommen auch natürlicherweise – insbesondere bei der Heilung von Gewebe und dem damit verbundenen schnellen Gewebeumsatz – vor. Beispielsweise in der Muskulatur nach wiederholtem Trauma, in Narbengewebe oder in Gefäßen im Rahmen der Arteriosklerose [1,329].

Dabei können neben physiologischen Geweben auch solche entstehen, die als Vorstufe von Malignomen gezählt werden (Dysplasie). Ein bekanntes Beispiel ist der Barrett-Ösophagus im Rahmen des gastroösophagealen Refluxes, aus dem im Verlauf ein Ösophaguskarzinom entstehen kann [330].

Die Differenzierung von Monozyten in Zellen mit osteoblastären Eigenschaften würde ebenfalls eine solche Transdifferenzierung darstellen.

Eine Transdifferenzierung von Zellen mit entwicklungsgeschichtlich enger Beziehung zueinander scheint dabei einfacher vonstattenzugehen, teilweise sogar ohne die Notwendigkeit einer vorangeschalteten Zellteilung (DNA-Replikation). Dagegen scheint die Transdifferenzierung von Zellen eines Keimblattes in Zellen eines anderen Keimblattes deutlich komplizierter zu sein, was womöglich einen Reprogrammierungsschritt in Richtung eines weniger differenzierten Zellstatus verlangt, dem neben epigenetischen Veränderungen eine Vielzahl von Zellteilungsmanövern zugrunde liegt [328,331].

Es wurden bisher verschiedene Beispiele gezeigt, bei denen monozytäre Zellen aus dem peripheren Blut ihre hämatogene Differenzierung verlassen und in Zellen anderer Keimblattzugehörigkeit differenzieren können.

Choi *et al.* beispielsweise postulierten für Fibrozyten ein osteo- und chondrogenes Differenzierungspotenzial [17].

Kuwana *et al.* fanden unter der monozytären Zellpopulation des venösen Blutes eine CD 14⁺-Zellform, die durch eine Co-Kultur mit CD 14⁻-Zellen ein mesenchymales Differenzierungspotenzial entwickelt (*Monocyte-derived Mesenchymal Progenitor*). Dabei erfolgte eine myogene, adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung [16].

Eine weitere CD 14⁺-Population wurde von Pufe *et al.* beschrieben. Dabei konnte über eine reprogrammierte Zellform (*Programmable Cells of Monocytic Origin*)

ebenfalls ein mesenchymales Differenzierungspotenzial zu Kollagen II produzierenden Chondrozyten gezeigt werden [15].

Ruhnke *et al.* konnten anschließend für reprogrammierte Monozyten aus dem venösen Vollblut (PCMOs) ein hepatogenes Differenzierungspotenzial zeigen. Darüber hinaus konnten sie aus dieser Zellform Pankreasinseln generieren, die Insulin produzierten [18].

Für beide Zellformen (PCMOs und MOMP) wurde dabei ein Stammzellcharakter beschrieben, der neben hämatopoetischen Oberflächenmarkern auch mesenchymale Marker beinhaltet.

Für MOMP gilt dabei die Expression der CD-Markern 14, 34, 45, 105 sowie Kollagen I als charakteristisch, wohingegen für PCMOs die Expression von CD 14, 34, 45 und 90 gezeigt wurde [1,15,332]. Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch, dass MOMP darüber hinaus auch CD 90 und PCMOs CD 105 auf ihrer Oberfläche exprimieren, so dass eine Unterscheidung dieser Zellformen diesbezüglich nicht möglich ist [1].

Des Weiteren zeigte sich, dass lediglich in Kulturmedium gehaltene Monozyten nach 6 Tagen ebenfalls ein derartiges Expressionsprofil aufwiesen, somit ist die Bedeutung der unterschiedlichen Vorbehandlungen dahingehend zu relativieren [1].

G 2 SPONTANE DEDIFFERENZIERUNG

Der Dedifferenzierungsprozess von PCMOs *in vitro* wurde von Ungefroren *et al.* näher beschrieben [1,287].

Dabei zeigten sie, dass im Zuge einer sechstägigen Dedifferenzierung mit M-CSF und IL-3 eine Induktion von Nanog und Oct-4, insbesondere der Oct-4A-Isoform, die als Pluripotenz-assoziiert gilt, sowie ein genereller Anstieg der H3-Methylierung im Sinne einer aktiven Chromatinstruktur festzustellen ist [287]. Darüber hinaus zeigten sie, dass auch bei aufgereinigten CD 14⁺-Zellkulturen eine Dedifferenzierung in die Stammzellform möglich ist, ohne eine Co-Kultur oder andere, lösliche Faktoren in den Dedifferenzierungsprozess miteinzubeziehen [287].

Während der Vorbehandlung von MOMP und PCMOs war im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten eine Herunterregulation des Monozytenmarkers CD

14 zu beobachten, wohingegen Stammzellenmarker wie CD 34, 90 und 105 hochreguliert wurden.

Beachtenswert ist ferner, dass sich diese Konstellation auch bei Monozyten, die ohne spezielle Behandlung in Kultur gehalten wurden, nach 6 Tagen zeigte, so dass von einer spontanen Dedifferenzierung der Zellen im Rahmen der *in vitro*-Kultivierung ausgegangen werden kann.

Eine spezifische Vorbehandlung (Kuwana, Pufe) scheint nicht ausschlaggebend zu sein. Wahrscheinlicher sind diese Beobachtungen auf die Kultivierungsbedingungen *in vitro* zurückzuführen [1,333].

G 3 ÜBERGEORDNETE KONTROLLGENE

Von grundsätzlich großer Bedeutung im Rahmen der Zelldifferenzierung scheinen übergeordnete Kontrollgene zu sein. Dabei hat deren Aktivierung wiederum die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Folge, welche in ihrem komplexen Zusammenspiel das Differenzierungsschicksal einer Zelle bestimmen [1,334]. Die Aktivierung von RUNX-2 und Osterix spielt eine herausragende Rolle bei der osteogenen Zelldifferenzierung [335,336].

Um die Kriterien der Transdifferenzierung zu erfüllen, ginge mit der Aktivierung dieser übergeordneten Kontrollgene eine Veränderung der Phänotypisierungsmarker einher, dergestalt, dass ursprüngliche Marker verloren gingen und solche des neuen Differenzierungszustandes exprimiert würden [1,328].

Zwar zeigte sich ein Anstieg der RUNX-2-Expression insbesondere bei den PCMOs im Zuge der sechstägigen Vorbehandlung. Jedoch schlug sich dies nicht in einem entsprechend veränderten Expressionsprofil von „Osteoblasten-typischen“ Markern nieder. Selbiges zeigte sich bei der Untersuchung der Osterix-Expression, wobei hier ein Anstieg insbesondere bei den Kontroll-Monozyten sowie den MOMP's zu verzeichnen war.

G 4 OSTEOKLASTÄRE DIFFERENZIERUNG

Auch funktionell zeigten die Zellen dabei kein Hinweis auf eine osteoblastäre Differenzierung, insbesondere durch eine ausbleibende Produktion relevanter

Mengen extrazellulärer Matrix.

Im Gegenteil behielten die Zellen im Rahmen ihrer Differenzierungsbehandlung ein für Monozyten typisches Oberflächenmarker-Expressionsprofil, wobei die anhaltende Expression der CD-Marker 14, 45 und 68 hervorzuheben ist [1].

Die Persistenz der CD 68-Expression im Rahmen der Differenzierungsbehandlung sowie deren charakteristischer Phänotyp deuten darauf hin, dass es sich hierbei um Zellen des Monozyten-/Makrophagen-Systems handelte [1,337].

Dies wird durch die Erkenntnisse von Aristorena *et al.* und Lastres *et al.* gestützt, die zeigen konnten, dass eine Hochregulation der CD 105-Expression – wie oben beschrieben – im Rahmen der Makrophagenreifung zu beobachten ist [338,339].

Die positive TRAP-Färbung der mehrkernigen Riesenzellen, die im Wesentlichen bei der PCMO-Differenzierungsbehandlung auftraten, wies diese eindeutig als Ostoklasten aus [1,301].

G 5 UNSPEZIFISCHE MARKERGENEXPRESSION

Im Besonderen konnte gezeigt werden, dass Osteonectin, Osteopontin und Osteocalcin, welche in einigen Studien als Marker einer erfolgreichen osteoblastären Differenzierung herangezogen werden, bereits bei den PCMOs und MOMPs wie auch bei nicht behandelten Monozyten nach sechstägiger Kultur nachzuweisen waren [1,16,17].

Der Eindruck, dass diese Marker somit nicht als Zeichen einer osteoblastären Differenzierung zu werten sind, verstärkte sich durch die Tatsache, dass deren Expression auch bei frisch isolierten Monozyten zu finden war.

Dabei ist die Expression von Osteonectin und Osteopontin bereits für andere Gewebearten beschrieben worden [1,340,341].

Im Speziellen wurde Osteocalcin im Fettgewebe, in Gefäßen sowie in differenzierten Monozyten gefunden, obwohl es als sehr spezifischer Marker der knöchernen Differenzierung gilt und für deren Charakterisierung herangezogen wird [1,342-344].

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die alleinige Expression von zwar typischen – jedoch nicht immer spezifischen – Markern für die Charakterisierung des Differenzierungsstatus einer Zelle nicht ausreichend ist. Vielmehr scheint die Differenzierung einer Zelle in besonderem Maße von ihrer Umgebung und deren direkten und indirekten Einflüssen abzuhängen (Stammzellnische), wobei

die Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarkern per se nicht deren Funktion im Zellverbund bestimmt [12,26,345].

G 6 AP-EXPRESSION UND -AKTIVITÄT IM RAHMEN DER MONOZYTÄREN REIFUNG

Betrachtet man den Anstieg der AP-Aktivität im Rahmen der Differenzierungsbehandlung, so fällt zwar deren Anstieg auf, jedoch ist dies für sich gesehen ebenfalls kein spezifisches Charakteristikum der osteogenen Differenzierung, wobei bekannt ist, dass deren Aktivität auch in anderen Zellformen des myeloischen Systems wie den neutrophilen Granulozyten und den dendritischen Zellen nachzuweisen ist [1,346].

In vivo zeigen die von Monozyten abstammenden mehrkernigen Riesenzellen in Granulomen ebenso eine Aktivität von Alkalischer Phosphatase wie dies auch im Rahmen der Monozyten-Differenzierung *in vitro* zu beobachten ist [1,344,347].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Reifung von Monozyten zu Makrophagen mit einer gesteigerten AP-Expression und -Aktivität einhergeht.

Die spontane Differenzierung von Osteoklasten aus Monozyten *in vitro* ist ein bekanntes Phänomen, was durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt wird [1,344,348,349]. Diese geht ebenfalls mit einer gesteigerten AP-Expression auf RNA-Ebene einher, wobei deren Aktivität allenfalls gering ist [1].

G 7 EINFLUSS VON DEXAMETHASON UND VITAMIN D

Bei der Verwendung von Dexamethason-haltigem Medium zeigte sich ein apoptotischer Effekt auf die Monozyten-Population. Dies entspricht den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen sowie der Erkenntnis der eingeschränkten Effizienz von Glukokortikoiden bei der osteogenen Stimulation [1,350,351].

Bei der Verwendung von Vitamin D anstelle von Dexamethason blieb dieser apoptotische Effekt zwar aus, jedoch konnte – wie oben beschrieben – keine suffiziente osteogene Differenzierung beobachtet werden [1,352]. Während für beide Substanzen ein positiver Einfluss auf myeloproliferative Erkrankungen gezeigt wurde, unterscheiden sie sich bezüglich ihrer Wirkung auf Monozyten. Für

Dexamethason konnte ein apoptotischer Effekt nachgewiesen werden, wohingegen Vitamin D im Rahmen der monozytären Reifung eine Rolle spielt [1,353]. Dabei scheint Vitamin D die Reifung von Monozyten zu Osteoklasten zu fördern [1,354].

Dies zeigte sich hier in gleicher Weise. Neben dem o. g. negativen Einfluss von Dexamethason auf die Vitalität der Zellen, kam es im Rahmen der osteogenen Stimulation mit Vitamin D-haltigem Medium zum vermehrten Auftreten von Osteoklasten [1].

G 8 EINFLUSS VON AUTOLOGEM SERUM AUF DIE OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Ehnert *et al.*, die zeigen konnten, dass die hepatogene Differenzierung von monozytären Zellen durch die Verwendung von autologem Serum verbessert werden kann, zeigte sich diesbezüglich kein gesteigertes osteogenes Differenzierungspotenzial, wenngleich die Ergebnisse eine verbesserte Kultivierbarkeit im Vergleich zu fetalem Kälberserum bzw. verschiedenen AB-Seren nahelegen [1,289].

Dies konnte bereits durch Bieback *et al.* für MSCs gezeigt werden [240].

G 9 PROBLEM DER CHARAKTERISIERUNG MITTELS OBERFLÄCHENMARKER

Berichte über zirkulierende, monozytäre Zellen im peripheren Blut, deren Charakterisierung mittels Oberflächenmarkern ein Mischbild aus hämatopoetischen und mesenchymalen Markern zeigt, sind zahlreich [15,16,355-358].

Dabei bleibt bis dato unklar, welche Rolle sie im Organismus spielen. Möglicherweise kommt ihnen eine Bedeutung im Rahmen der Knochenentstehung während der Entwicklung des Organismus und/oder bei der Frakturheilung zu [359,360].

Kan *et al.* konnten zeigen, dass Monozyten bei der Bildung von heterotopen Ossifikationen eine entscheidende Rolle spielen [361]. Diese Erkenntnis wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen von Suda *et al.* gestützt [356]. Die-

se fanden eine adhärent wachsende, monozytäre Zellform im peripheren Blut, die – ähnlich den o. b. PCMOs und MOMPps – hämatopoetischen Ursprungs zu sein scheint und bei der Bildung von heterotopen Ossifikationen bedeutsam ist [356].

Daraus lässt sich jedoch nicht ohne Weiteres ein osteogenes Potenzial von im Blut zirkulierenden Monozyten ableiten.

Für mesenchymale Stammzellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie im Rahmen von Entzündungsprozessen eine Rolle bei der Gewebereparatur darstellen und im peripheren Blut zirkulieren [61]. Ihre eindeutige Charakterisierung per Oberflächenmarker ist jedoch nach wie vor ein großes Problem [14].

Deschaseaux *et al.* beispielsweise konnten die Expression von CD 45 auf mesenchymalen Stammzellen nachweisen [362].

Grundsätzlich ist es ebenfalls denkbar, dass Zellen aus dem Knochenmark zeitweise ein Mischbild aus hämatopoetischen und mesenchymalen Markern zeigen. Ihre gemeinsame Stammzellnische lässt zumindest eine enge Beziehung dieser Zellformen vermuten [363].

Somit ist nicht auszuschließen, dass mesenchymale Charakteristika auch auf mesenchymale Stammzellen zurückzuführen sind, die hämatopoetische Oberflächenmarker exprimieren.

Ein weiteres Problem bei der Charakterisierung von Zellen mittels Oberflächenmarkern konnten Pilz *et al.* veranschaulichen. Sie fanden auf MSCs die Expression von kreuzreaktiven Epitopen, die mit CD 14-Antikörpern in der Durchflusszytometrie reagierten. Dies führte zu der fälschlichen Annahme einer Expression von hämatopoetischen Oberflächenmarkern [364]. Grundsätzlich ist dies auch für andere CD-Marker denkbar.

Dies verdeutlicht die Schwierigkeit, spezifische Oberflächenexpressionsprofile zu erstellen, aus denen sich eine eindeutige Charakterisierung ableiten lässt.

Trotz zahlreicher Berichte über die Fähigkeit von Stammzellen ihre Keimblattzugehörigkeit zu durchbrechen sowie Berichte über die mesenchymale Differenzierbarkeit von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut, ist deren Nutzen für den klinischen Einsatz als Ressource zur Reparatur von erkranktem oder verletztem Gewebe noch weitestgehend unklar.

Grundsätzlich sind die Berichte über erfolgreiche osteogene Transdifferenzierungsversuche von monozytären Zellen zwar vielversprechend, jedoch fehlt bis dato die Evidenz dafür, dass es sich hierbei zum einen um erfolgreiche Transdifferenzierungen im Sinne der Definition handelt und zum anderen, ob die Kriterien zur Charakterisierung dieser Zellen ausreichend sind [328]. Dabei ist es sowohl entscheidend, die eingesetzten Zellen als auch deren Differenzierungsprodukt möglichst eindeutig zu charakterisieren. Dafür ist die Etablierung spezifischer Marker Grundvoraussetzung [26,312].

Darüber hinaus kann eine Zellpopulation nur dann als ursprünglich für eine erfolgreiche Umdifferenzierung angesehen werden, wenn sich beweisen lässt, dass die „neue“ Zelle ihren Ursprung in der Ausgangszelle hat [12,312,328]. Hierfür ist die prospektive Isolation der zu untersuchenden Zelle Voraussetzung [12,312]. Eine bloße Anreicherung von Zellpopulationen lässt den Schluss einer erfolgreichen Transdifferenzierung nicht zu.

Je ungenauer eine Zellpopulation, die für Transdifferenzierungsversuche herangezogen wird, definiert ist, desto unklarer sind die Mechanismen, die dem Differenzierungsprozess zugrunde liegen. So könnten beispielsweise „Verunreinigungen“ mit Stammzellen zu spontanen Zellfusionen führen und andere Zellen dazu befähigen teilweise oder vollständig Eigenschaften der Zellen zu gewinnen, mit denen sie fusioniert haben [26,365,366]. Dies würde jedoch keine Transdifferenzierung darstellen.

Von außerordentlicher Bedeutung ist es zweifelsohne, dass neben der Charakterisierung bzgl. morphologischer und phänotypischer Aspekte die funktionelle Integrität einer transdifferenzierten Zelle nachgewiesen ist. Ausschließlich dann darf von erfolgreicher Transdifferenzierung gesprochen werden [26].

Ungeachtet der Möglichkeit, dass eine Transdifferenzierung lediglich ein *in vitro*-Phänomen darstellen könnte, welches *in vivo* nicht auftritt, bleibt die Fra-

ge nach der Häufigkeit erfolgreicher Transdifferenzierungsvorgänge. Es ist bekannt, dass diese allgemein in geringer Frequenz auftreten, was den klinischen Einsatz begrenzt [12,26,311].

Nicht zuletzt muss man sich mit der Problematik auseinandersetzen, inwieweit ein klinischer Einsatz von Zellen möglich ist, bei denen sich lediglich unter kulturellen Bedingungen ein Stammzellcharakter entwickeln lässt. Die Veränderungen des Erbguts und deren mögliche Folgen im Organismus lassen sich derzeit nicht abschätzen [12].

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die o. g. Beobachtungen am ehesten als Vorgänge der monozytären Reifung in Richtung Makrophagen und Osteoklasten gesehen werden müssen, denn als Zeichen einer erfolgreichen osteoblastären Differenzierung.

Nichtsdestotrotz ist es zwar denkbar, dass sich Monozyten aus dem peripheren Blut zur osteogenen Differenzierung eignen, jedoch reichen die bisherigen Erkenntnisse nicht aus, diese Potenz zweifelsohne unter Beweis zu stellen.

Deshalb bleibt es von wissenschaftlicher und klinischer Relevanz, Dedifferenzierungs- und Transdifferenzierungsphänomene weiter zu untersuchen und deren Natur zu verstehen, um sie in Zukunft für die Erforschung und Therapie von Krankheiten nutzbar zu machen.

I LITERATURANGABEN

- [1] Schmitt A., Ehnert S., Schyschka L., Buschner P., Kühnl A., Döbele S., Siebenlist S., Lucke M., Stöckle U., Nussler AK.: Monocytes do not transdifferentiate into proper osteoblasts. *The Scientific World Journal*. 2012:384936, 2012.
- [2] Forriol F., Longo U. G., Concejo C., Ripalda P., Maffulli N., Denaro V.: Platelet-rich plasma, rhOP-1 (rhBMP-7) and frozen rib allograft for the reconstruction of bony mandibular defects in sheep. A pilot experimental study. *Injury*. 40(Suppl.3): 44-49, 2009.
- [3] Kokkonen A., Ikävalko M., Tiihonen R., Kautiainen H., Belt E. A.: High rate of osteolytic lesions in medium-term followup after the AES total ankle replacement. *Foot Ankle Int*. 32(2):168-175, 2011.
- [4] Pelissier P., Boireau P., Martin D., Baudet J.: Bone reconstruction of the lower extremity: complications and outcomes. *Plast. Reconstr. Surg*. 111(7):2223-2229, 2003.
- [5] Schmitt A., van Griensven M., Imhoff A. B., Buchmann S.: Application of stem cells in orthopedics. *Stem Cells Int*. 2012:394962, 2012.
- [6] Arrington E. D., Smith W. J., Chambers H. G., Bucknell A. L., Davino N. A.: Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 329:300-309, 1996.
- [7] Banwart J. C., Asher M. A., Hassanein R. S.: Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine*. 20(9):1055- 1060, 1995.
- [8] Kaiser L. R.: The future of multihospital systems. *Top Health Care Financ*. 18(4):32-45, 1992.
- [9] Vacanti C. A., Bonassar L. J.: An overview of tissue engineered bone. *Clin. Orthop. Relat. Res. Suppl*. 367:375-381, 1999.
- [10] Goldstein S. A., Patil P. V., Moalli M. R.: Perspectives on tissue engineering of bone. *Clin. Orthop. Relat. Res. Suppl*. 367:419-423, 1999.
- [11] Bruder S. P., Fox B. S.: Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin. Orthop. Relat. Res. Suppl*. 367:68-83, 1999.
- [12] Anderson D. J., Gage F. H., Weissman I. L.: Can stem cells cross lineage boundaries?. *Nat. Med*. 7(4):393-395, 2001.
- [13] Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411):143-147, 1999.
- [14] Jones E., Yang X.: Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury*. 42(6):562-568, 2011.
- [15] Pufe T., Petersen W., Fändrich F., Varoga D., Wruck C. J., Mentlein R., Helfenstein A., Hoseas D., Dressel S., Tillmann B., Ruhnke M.: Programmable cells of monocytic origin (PCMO): a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes. *J. Orthop. Res*. 26(3):304-313, 2008.
- [16] Kuwana M., Okazaki Y., Kodama H., Izumi K., Yasuoka H., Ogawa

- Y., Kawakami Y., Ikeda Y.: Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 74(5):833-845, 2003.
- [17] Choi Y. H., Burdick M. D., Strieter R. M.: Human circulating fibrocytes have the capacity to differentiate osteoblasts and chondrocytes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42(5):662-671, 2010.
- [18] Ruhnke M., Ungefroren H., Nüssler A., Martin F., Brulport M., Schormann W., Hengstler J. G., Klapper W., Ulrichs K., Hutchinson J. A., Soria B., Parwaresch R. M., Heeckt P., Kremer B., Fändrich F.: Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology.* 128(7):1774-1786, 2005.
- [19] Jaenisch R., Young R.: Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell.* 132(4):567-582, 2008.
- [20] Morrison S. J, Kimble J.: Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 441(7097):1068-1074, 2006.
- [21] Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T.: Stem cells find their niche. *Nature.* 414(6859):98-104, 2001.
- [22] Watt F. M., Hogan B. L.: Out of Eden: stem cells and their niches. *Nature.* 287(5457):1427-1430, 2000.
- [23] Betschinger J. , Knoblich J. A.: Dare to be different. Asymmetric cell division in drosophila, *C. elegans* and vertebrates. *Curr. Biol.* 14(16):674-685, 2004.
- [24] Horvitz H. R., Herskowitz I.: Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell.* 68(2):237-255, 1992.
- [25] Greider C. W., Blackburn E. H.: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 43(2Pt.1):404-413, 1985.
- [26] Wagers A., Weissmann I.: Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 116(5):639-648, 2004.
- [27] Hanna J. H., Saha K., Jaenisch R.: Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell.* 143(4):508-525, 2010
- [28] Knoblich J. A.: Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell.* 132(4):583-597, 2008.
- [29] Hochedlinger K1, Jaenisch R.: Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature.* 441(7097):1061-1067, 2006.
- [30] Saran M.: The ethics of cloning and human embryo research. *Princet. J. Bioeth.* 5:25-36, 2002.
- [31] Evans M. J., Kaufman M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 292(5819):154-156, 1981.
- [32] Martin G. R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(12):7634-7638, 1981.
- [33] Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282(5391):1145-1147, 1998.

- [34] Murry C. E., Keller G.: Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 132(4):661-680, 2008.
- [35] Deb K. D., Sarda K.: Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J. Transl. Med.* 6:7, 2008.
- [36] Matsui Y., Zsebo K., Hogan B. L.: Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 70(5):841-847, 1992.
- [37] Resnick J. L., Bixler L. S., Cheng L., Donovan P. J.: Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. 359(6395):550-551, 1992.
- [38] Shambloott M. J., Axelman, J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Gearhart J. D.: Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(23):13726–13731, 1998.
- [39] Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba S., Kato T., Kazuki Y., Toyokuni S., Toyoshima M., Niwa O., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., Shinohara T.: Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*. 119(7):1001-1012, 2004.
- [40] Guan K., Nayernia K., Maier L. S., Wagner S., Dressel R., Lee J. H., Nolte J., Wolf F., Li M., Engel W., Hasenfuss G.: Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis: *Nature*. 440(7088):1199-1203, 2006.
- [41] Ford C. E., Hamerton J. L., Barnes D. W., Loutit J. F.: Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 177(4506):452-454, 1956.
- [42] Till J. E., McCulloch E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14:213-222, 1961.
- [43] Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E.: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells: *Nature*. 197:452-454, 1963.
- [44] Wu A. M., Till J. E., Siminovitch L., McCulloch E. A.: A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J. Cell Physiol.* 69(2):177-184, 1967.
- [45] Calvi L. M., Link D. C.: Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Calcif. Tissue Int.* 94(1):112–124, 2014.
- [46] Nowell P. C., Cole L. J., Habermeyer J. G., Roan P. L.: Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice. *Cancer Res.* 16(3):258-261, 1956
- [47] Spangrude G. J., Heimfeld S., Weissman I. L.: Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells: *Science*. 241 (4861):58-62, 1988.
- [48] Baum C. M., Weissman I. L., Tsukamoto A. S., Buckle A. M., Peault B.: Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(7):2804–2808, 1992.
- [49] Moore M. A.: Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing. *J. Cell Biochem. Suppl.* 38:29–38, 2002.
- [50] Lapidot T., Petit I.: Current understanding of stem cell mobilization:

- the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.* 30(9), 973–981, 2002.
- [51] Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C. W., Corselli M., Park T. S., Andriolo G., Sun B., Zheng B., Zhang L., Norotte C., Teng P. N., Traas J., Schugar R., Deasy B. M., Badylak S., Buhring H. J., Giacobino J. P., Lazzari L., Huard J., Péault B.: A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 3(3):301–313, 2008.
- [52] Da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B.: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119(Pt.11):2204-2213, 2006.
- [53] Haynesworth S. E., Goshima J., Goldberg V. M., Caplan A. I.: Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 13(1):81-88, 1992
- [54] Kassem, M., Kristiansen M., Abdallah B. M.: Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 95(5):209-214, 2004.
- [55] Barry, F. P., Murphy J. M.: Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36(4):568-584, 2004.
- [56] Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S.: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3(4):393-403, 1970.
- [57] Minguell J. J., Erices A., Conget P.: Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 226(6), pp. 507-520, 2001.
- [58] Aurich, H., Sgodda, M., Kaltwasser, P, Vetter M., Weise A., Liehr T., Brulport M., Hengstler J. G., Dollinger M., Fleig W. M., Christ B. E.: Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut.* 58(4):570-581, 2009.
- [59] Mizuno, H.: Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J. Nippon Med. Sch.* 76(2):56-66, 2009.
- [60] Covas D. T., Panepucci R. A., Fontes A. M., Silva W. A. Jr., Orellana M. D., Freitas M. C., Neder L., Santos A. R., Peres L. C., Jamur M. C., Zago M. A.: Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol.* 36(5):642-654, 2008.
- [61] Caplan A. I., Correa D.: The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell.* 9(1):11-15, 2011.
- [62] Marquez-Curtis L. A., Janowska-Wieczorek A.: Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *Biomed Res. Int.* 561098, 2013.
- [63] Caplan A. I., Dennis J. E.: Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.* 98(5):1076-1084, 2006.
- [64] Aggarwal S., Pittenger M. F.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 105(4):1815-1822, 2005.
- [65] Németh K., Leelahavanichkul A., Yuen P. S., Mayer B., Parmelee A., Doi K., Robey P. G., Leelahavanichkul K., Koller B. H., Brown J.

- M., Hu X., Jelinek I., Star R. A., Mezey E.: Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent repro-gramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* 15(1):42-49, 2009.
- [66] Krasnodembskaya A., Song Y., Fang X., Gupta N., Serikov V., Lee J. W., Matthay M. A.: Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 28(12):2229-2238, 2010.
- [67] Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringdén O.: HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 31(10):890-896, 2003.
- [68] Le Blanc K., Tammik L., Sundberg B., Haynesworth S. E., Ringdén O.: Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* 57(1):11-20, 2003.
- [69] Nakahara H., Bruder S. P., Haynesworth S. E., Holecek J. J., Baber M. A., Goldberg V. M., Caplan A. I.: Bone and cartilage formation in diffusion-chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone.* 11(3):181-188, 1990.
- [70] Kasper G., Dankert N., Tuischer J., Hoeft M., Gaber T., Glaeser J. D., Zander D., Tschirschmann M., Thompson M., Matziolis G., Duda G. N.: Mesenchymal stem cells regulate angiogenesis according to their mechanical environment. *Stem Cells.* 25(4):903-910, 2007.
- [71] Schumann P., Tavassol F., Lindhorst D., Stuehmer C., Bormann K. H., Kampmann A., Mülhaupt R., Laschke M. W., Menger M. D., Gellrich N. C., Rucker M.: Consequences of seeded cell type on vascularization of tissue engineering constructs in vivo. *Microvasc. Res.* 78(2):180-190, 2009.
- [72] Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8(4):315–317, 2008.
- [73] Ishii M., Koike C., Igarashi A., Yamanaka K., Pan H., Higashi Y., Kawaguchi H., Sugiyama M., Kamata N., Iwata T., Matsubara T., Nakamura K., Kurihara H., Tsuji K., Kato Y.: Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332(1):297–303, 2005.
- [74] Simmons P. J., Torokstorb B.: Identification of stromal cell precursors in human bone-marrow by a novel monoclonal-antibody, Stro-1. *Blood.* 78(1):55–62, 1991.
- [75] Bühring H. J., Battula V. L., Treml S., Schewe B., Kanz L., Vogel W.: Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann. NY Acad. Sci.* 1106:262-271, 2007.
- [76] Goel A., Sangwan S. S., Siwach R. C., Ali A. M.: Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury.* 36(1):203-206, 2005.
- [77] Gangji V., Hauzeur J. P., Matos C., De Maertelaer V., Toungouz M., Lambermont M.: Treatment of osteonecrosis of the femoral head

- with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A(6):1153-1160, 2004.
- [78] Neen D., Noyes D., Shaw M., Gwilym S., Fairlie N., Birch N.: Healos and bone marrow aspirate used for lumbar spine fusion: a case controlled study comparing healos with autograft. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 31(18):E636-640, 2006.
- [79] Wright J. G., Yandow S., Donaldson S., Marley L.; Simple Bone Cyst Trial Group: A randomized clinical trial comparing intralesional bone marrow and steroid injections for simple bone cysts. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90(4):722-730, 2008.
- [80] Rouwkema J., Rivron N. C., van Blitterswijk C. A.: Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 26(8):434-441, 2008.
- [81] Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L.: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414(6859):105-111, 2001.
- [82] Kuang S., Rudnicki M. A.: The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 14(2):82-91, 2008.
- [83] Gritti A., Vescovi A. L., Galli R.: Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J. Physiol., Paris*. 96(1-2):81-90, 2002.
- [84] Barker N., van Es J. H., Kuipers J., Kujala P., van den Born M., Cozijnsen M., Haegebarth A., Korving J., Begthel H., Peters P. J., Clevers H.: Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*. 449(7165):1003-1007, 2007.
- [85] Hochedinger K., Jaenisch R.: Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*. 415(6875):1035-1038, 2002.
- [86] Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385(6619):810-813, 1997.
- [87] Blelloch R., Wang Z., Meissner A., Pollard S., Smith A., Jaenisch R.: Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells*. 24(9):2007-2013, 2006.
- [88] Inoue K, Noda S., Ogonuki N., Miki H., Inoue S., Katayama K., Mekada K., Miyoshi H., Ogura A.: Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. *Stem Cells*. 25(5):1279-1285, 2007.
- [89] Egli D., Rosains J., Birkhoff G., and Eggan K.: Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature*. 447(7145):679-685, 2007.
- [90] Greda P., Karasiewicz J., Modlinski J. A.: Mouse zygotes as recipients in embryo cloning. *Reproduction*. 132(5):741-748, 2006.
- [91] Miller R. A., Ruddle F. H.: Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell*. 9(1):45-55, 1976.
- [92] Tada M. Morizane A., Kimura H., Kawasaki H., Ainscough J. F., Sasai Y., Nakatsuji N., Tada T.: Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells. *Dev. Dyn.* 227(4):504-510, 2003.
- [93] Tada M., Tada T., Lefebvre L., Barton S. C., Surani M. A.: Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.* 16(21):6510-6520, 1997.
- [94] Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T.: Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES

- cells. *Curr. Biol.* 11(19):1553-1558, 2001.
- [95] Cowan C. A., Atienza J., Melton D. A., Eggan K.: Nuclear reprogramming of somatic cell after fusion with human embryonic stem cells. *Science.* 309(5739):1369-1373, 2005.
- [96] Yu J., Vodyanik M. A., He P., Slukvin I. I., Thomson J. A.: Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells.* 24(1):168-176, 2005.
- [97] Taranger C. K., Noer A., Sørensen A. L., Håkelién A. M., Boquest A. C., Collas P.: Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 16(12):5719-5735, 2005.
- [98] Kikyo N., Wade P. A., Guschin D., Ge H., Wolffe A. P.: Active remodeling of somatic nuclei in egg cytoplasm by the nucleosomal ATPase ISWI. *Science.* 289(5488):2360-2362, 2000.
- [99] Hansis C., Barreto G., Maltry N., Niehrs C.: Nuclear reprogramming of human somatic cells by *Xenopus* egg extract requires BRG1. *Curr. Biol.* 14(16):1475-1480, 2004.
- [100] Takahashi K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126(4):663-676, 2006.
- [101] Boyer L. A., Lee T. I., Cole M. F., Johnstone S. E., Levine S. S., Zucker J. P., Guenther M. G., Kumar R. M., Murray H. L., Jenner R. G., Gifford D. K., Melton D. A., Jaenisch R., Young R. A.: Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 122(6):947-956, 2005.
- [102] Loh Y. H., Wu Q., Chew J. L., Vega V. B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K. Y., Sung K. W., Lee C. W., Zhao X. D., Chiu K. P., Lipovich L., Kuznetsov V. A., Robson P., Stanton L. W., Wei C. L., Ruan Y., Lim B., Ng H. H.: The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genet.* 38(4):431-440, 2006.
- [103] Marson A., Foreman R., Chevalier B., Bilodeau S., Kahn M., Young R. A., Jaenisch R.: Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell.* 3(2):132-135, 2008.
- [104] Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131(5):861-872, 2007.
- [105] Pera M. F.: Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature.* 471(7336):46-47, 2011.
- [106] Kastenbergh, Z. J., Odorico J. S.: Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells. *Transplant. Rev. (Orlando).* 22(3):215- 222, 2008.
- [107] Jones D. L., Wagers A. J.: No Place Like Home: Anatomy and Function of the stem cell niche. *Nature Reviews.* 9(1):11-21, 2008.
- [108] Standring S.: Musculoskeletal system. *Gray's Anatomy.* New York, Elsevier. 39. Ausgabe, 83-135, 2004.
- [109] Taichman R. S.: Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. *Blood.* 105(7):2631-2639, 2005.
- [110] Eriksen E. F., Axelrod D. W., Melsen F.: Bone Histomorphometry.

- New York, Raven Press. 1-12, 1994.
- [111] Marieb, E. N., Hoehn, K.: Human anatomy and physiology. San Francisco, Pearson Education. 39. Ausgabe, 2007.
 - [112] Clarke B.: Normal Bone Anatomy and Physiology. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 3(Suppl.3):113-139, 2008.
 - [113] Teitelbaum S. L.: Bone resorption by osteoclasts. Science. 289(5484):1504-1508, 2000.
 - [114] Hauge E. M., Qvesel D., Eriksen E. F., Mosekilde L., Melsen F.: Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. J. Bone Miner. Res. 16(9):575-1582, 2001.
 - [115] Ducy P., Schinke T., Karsenty G.: The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science. 289(5484):501-504, 2000.
 - [116] Parfitt A. M.: The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. J. Bone Miner. Res. 16(9):1583-1585, 2001.
 - [117] Logan C. Y., Nusse R.: The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 20:781-810, 2004.
 - [118] Hill T. P., Später D., Taketo M. M., Birchmeier W., Hartmann C.: Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Dev. Cell. 8(5):727-738, 2005.
 - [119] Day T. F., Guo X., Garrett-Beal L., Yang Y.: Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. Dev. Cell. 8(5):739-750, 2005.
 - [120] Karsenty G., Wagner E. F.: Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. Dev. Cell. 2(4):389-406, 2002.
 - [121] Manolagas S. C.: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr. Rev. 21(2):115-37, 2000.
 - [122] Burger E. H., Klein-Nuland J., Smit T. H.: Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodeling osteon: A proposal. J. Biomech. 36(10):1452-1459, 2003.
 - [123] Roodman G. D.: Cell biology of the osteoclast. Exp. Hematol. 27(8):1229-1241, 1999.
 - [124] Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M. T., Martin T. J.: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocrine reviews. 20(3):345-357, 1999.
 - [125] Seeman E.: Bone modeling and remodeling. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 19(3):219-233, 2009.
 - [126] Sherr C. J.: Colony-stimulating factor-1 receptor. Blood. 75(1):1-12, 1990.
 - [127] Hamilton J. A.: CSF-1 signal transduction. J. Leukoc. Biol. 62(2):45-55, 1997.
 - [128] Joos H., Trouiliaris S., Helftenbein G., Niemann H., Tamura T.: Tyrosine phosphorylation of the juxtamembrane domain of the v-Fms oncogene product is required for its association with a 55-kDa protein. J. Biol. Chem. 271(40):24476-24481, 1996.
 - [129] Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M.,

- Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(7):3597-3602, 1998.
- [130] Lacey D. L., Timms E., Tan H. L., Kelley M. J., Dunstan C. R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y. X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W. J.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 93(2):165-176, 1998.
- [131] Anderson D. M., Maraskovsky E., Billingsley W. L., Dougall W. C., Tometsko M. E., Roux E. R., Teepe M. C., DuBose R. F., Cosman D., Galibert L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 390(6656):175-179, 1997.
- [132] Wong B. R., Rho J., Arron J., Robinson E., Orlinick J., Chao M., Kalachikov S., Cayani E., Bartlett F. S. 3rd, Frankel W. N., Lee S. Y., Choi Y.: TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.* 272(40):25190-25194, 1997.
- [133] Bucay N., Sarosi I., Dunstan C. R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Tan H. L., Xu W., Lacey D. L., Boyle W. J., Simonet W. S.: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 12(9):1260-1268, 1998.
- [134] Dobnig H., Turner R. T.: Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology.* 136(8):3632-3638, 1995.
- [135] Lichte P., Pape H. C., Pufe T., Kobbe P., Fischer H.: Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury.* 42(6):569-573, 2011.
- [136] Boskey A. L., Posner A. S.: Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop. Clin. North Am.* 15(4):597-612, 1984.
- [137] Karperien M., Roelen B. A. J., Poelman R. E., Gittenberger-de Groot A. C., Hierck B. P., DeRuiter M. C., Meijer D., Gibbs S.: Tissue formation during embryogenesis. In: Van Blitterswijk C. A., De Boer J.: *Tissue engineering.* Amsterdam, Elsevier. 2. Ausgabe, 67-109, 2015.
- [138] Schipani E.: Hypoxia and HIF-1alpha in chondrogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* 1068:66-73, 2006.
- [139] Kronenberg H. M.: Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 423(6937):332-336, 2003.
- [140] Nakashima K., de Crombrugge B.: Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends. Genet.* 19(8):458-466, 2003.
- [141] Ai-Aql Z. S., Alagl A. S., Graves D. T., Gerstenfeld L. C., Einhorn T. A.: Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J. Dent. Res.* 87(2):107-118, 2008.
- [142] Giannoudis P. V., Einhorn T. A., Marsh D.: Fracture healing: a

- harmony of optimal biology and optimal fixation? *Injury*. 38(Suppl.4):1-2, 2007.
- [143] Laurencin C. T., Einhorn T. A., Lyons K.: Fracture repair: challenges and opportunities. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90(Suppl.1):1-2, 2008.
- [144] Pountos I., Georgouli T., Blokhuis T. J., Pape H. C., Giannoudis P. V.: Pharmacological agents and impairment of fracture healing: what is the evidence? *Injury*. 39(4):384-394, 2008.
- [145] Marsell R., Einhorn T. A.: The biology of fracture healing. *Injury*. 42(6):551-555, 2011.
- [146] Giannoudis P. V., Einhorn T. A., Marsh D.: Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 38(Suppl.4):3-6, 2007.
- [147] Marsell R., Einhorn T. A.: Emerging bone healing therapies. *J. Orthop. Trauma*. 24(1):4-8, 2010.
- [148] Green E., Lubahn J. D., Evans J.: Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. *J. Surg. Orthop. Adv.* 14(2):64-72, 2005.
- [149] Bolander M. E.: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200(2):165-70, 1992.
- [150] Einhorn T. A., Majeska R. J., Rush E. B., Levine P. M., Horowitz M. C.: The expression of cytokine activity by fracture callus. *J. Bone Miner. Res.* 10(8):1272-1281, 1995.
- [151] Tsiridis E., Giannoudis P. V.: Transcriptomics and proteomics: advancing the understanding of genetic basis of fracture healing. *Injury*, vol. 37(Suppl.1):13-19, 2006.
- [152] Tsiridis E., Upadhyay N., Giannoudis P. V.: Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*. 38(Suppl.1):11-25, 2007.
- [153] Lindahl A., Brittberg M., Gibbs D., Dawson J. I., Kanczler J., Black C., Tare R., Oreffo R. O.: Cartilage and bone regeneration. In: Van Blitterswijk C. A., De Boer J.: *Tissue engineering*. Amsterdam, Elsevier. 2. Ausgabe, 529-82, 2015.
- [154] Ceradini D. J., Kulkarni A. R., Callaghan M. J., Tepper O. M., Bastidas N., Kleinman M. E., Capla J. M., Galiano R. D., Levine J. P., Gurtner G. C.: Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* 10(8):858-864, 2004.
- [155] Rahn B. A.: Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Fackelman G. E.: *Bone in clinical orthopedics*. Stuttgart, NY, Thieme. 287-326, 2002.
- [156] Einhorn T. A.: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res. Suppl.* 355:7-21, 1998.
- [157] Chen Y., Alman B. A.: Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J. Cell Biochem.* 106(3):353-362, 2009.
- [158] Gerstenfeld L. C., Alkhiary Y. M., Krall E. A., Nicholls F. H., Stapleton S. N., Fitch J. L., Bauer M., Kayal R., Graves D. T., Jepsen K. J., Einhorn T. A.: Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 54(11):1215-1228, 2006.
- [159] Cho T. J., Gerstenfeld L. C., Einhorn T. A.: Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 17(3):513-520, 2002.

- [160] Marsell R., Einhorn T. A.: The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury*. 40(3):4-7, 2009.
- [161] Wendeborg B.: Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85. *Acta Orthop*. 52:1-79, 1961.
- [162] Giannoudis P. V., Einhorn T. A., Schmidmaier G., Marsh D.: The diamond concept--open questions. *Injury*. 39(Suppl.2):5-8, 2008.
- [163] Keramaris N. C., Calori G. M., Nikolaou V. S., Schemitsch E. H, Giannoudis P. V.: Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 39(2):45-57, 2008.
- [164] Lehmann W., Edgar C. M., Wang K., Cho T. J., Barnes G. L., Kakar S., Graves D. T., Rueger J. M., Gerstenfeld L. C., Einhorn T. A.: Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone*. 36(2):300-310, 2005.
- [165] Shapiro F.: Cortical bone repair. The relationship of the lacunarcanalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J. Bone Joint Surg. Am*. 70(7):1067-1081, 1988.
- [166] Hulse D., Hyman B.: Fracture biology and biomechanics. In: Slatter D.: *Textbook of small animal surgery*. Philadelphia, WB Saunders. 1595-1603, 1993.
- [167] Kaderly R. E.: Primary bone healing. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*. 6(1):21-25, 1991.
- [168] Greenbaum M. A., Kanat I. O.: Current concepts in bone healing. Review of the literature. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc*. 83(3):123-129, 1993.
- [169] Wolff J.H.: *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, Hirschwald, Berlin, 1892.
- [170] Ubara Y., Tagami T., Nakanishi S., Sawa N., Hoshino J., Suwabe T., Kaitori H., Takemoto F., Hara S., Takaichi K.: Significance of minimodeling in dialysis patients with adynamic bone disease. *Kidney Int*. 68(2):833-839, 2005.
- [171] Ubara Y., Fushimi T., Tagami T., Sawa N., Hoshino J., Yokota M., Kaitori H., Takemoto F., Hara S.: Histomorphometric features of bone in patients with primary and secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 63(5):1809-1816, 2003.
- [172] Lindsay R., Cosman F., Zhou H., Bostrom M., Shen V., Cruz J., Nieves J. W., Dempster D. W.: A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest biopsy: Early actions of teriparatide. *J. Bone. Miner. Res*. 21(3):366-373, 2006.
- [173] Parfitt A. M.: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of cellular biochemistry*. 55(3):273-286, 1994.
- [174] Feng X., McDonald J. M.: Disorders of bone remodeling. *Annual review of pathology*. 6:121-145, 2011.
- [175] Teitelbaum S. L.: Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 289(5484):1504-1508, 2000.
- [176] Kristensen H. B., Andersen T. L., Marcussen N., Rolighed L., Delaisse J. M.: Increased presence of capillaries next to remodeling sites in adult human cancellous bone. *J. Bone Miner*.

- Res. 28(3):574-578, 2013.
- [177] Raisz L. G.: Hormonal regulation of bone growth and remodeling. Ciba Foundation symposium. 136:226-238, 1988.
- [178] Mohan S., Baylink D. J.: Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption. Hormone Research. 45(Suppl.1):59-62, 1996.
- [179] Tang Y., Wu X., Lei W., Pang L., Wan C., Shi Z., Zhao L., Nagy T. R., Peng X., Hu J., Feng X., Van Hul W., Wan M., Cao X.: TGF-beta1- induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. Nat. Med. 15(7):757-65, 2009.
- [180] Xian L., Wu X., Pang L., Lou M., Rosen C. J., Qiu T., Crane J., Frassica F., Zhang L., Rodriguez J. P., Xiaofeng J., Yakar S., Xuan S., Efstratiadis A., Wan M., Cao X.: Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. Nat. Med. 18(7):1095-1101, 2012.
- [181] Falany M. L., Thames A. M. 3rd, McDonald J. M., Blair H. C., McKenna M. A., Moore R. E., Young M. K., Williams J. P.: Osteoclasts secrete the chemotactic cytokine mim-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281(1):180-185, 2001.
- [182] Martin T., Gooi J. H., Sims N. A.: Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 19(1):73- 88, 2009.
- [183] Andersen T. L., Sondergaard T. E., Skorzynska K. E., Dagnaes-Hansen F., Plesner T. L., Hauge E. M., Plesner T., Delaisse J. M.: A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. Am. J. Pathol. 174(1):239-247, 2009.
- [184] Schlesinger P. H., Blair H. C., Teitelbaum S. L., Edwards J. C.: Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. J. Biol. Chem. 272(30):18636-18643, 1997.
- [185] Blair H. C., Teitelbaum S. L., Ghiselli R., Gluck S.: Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. Science. 245(4920):855-857, 1989.
- [186] Blair H. C., Teitelbaum S. L., Tan H. L., Koziol C. M., Schlesinger P. H.: Passive chloride permeability charge coupled to H(+)-ATPase of avian osteoclast ruffled membrane. Am. J. Physiol. 260(6Pt.1):1315-1324, 1991.
- [187] Drake F. H., Dodds R. A., James I. E., Connor J. R., Debouck C., Richardson S., Lee-Rykaczewski E., Coleman L., Rieman D., Barthlow R., Hastings G., Gowen M.: Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. J. Biol. Chem. 271(21):12511-12516, 1996.
- [188] Rizo J., Chen X., Arac D.: Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. Trends Cell Biol. 16(7):339-350, 2006.
- [189] Zou W., Teitelbaum S. L.: Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton. Ann. NY Acad. Sci. 1192:27-31, 2010.
- [190] Ross F. P., Chappel J., Alvarez J. I., Sander D., Butler W. T., Farach-Carson M. C., Mintz K. A., Robey P. G., Teitelbaum S. L., Cheresch D. A.: Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. J. Biol. Chem.

- 268(13):9901-9907, 1993.
- [191] Flores M. E., Norgård M., Heinegård D., Reinholt F. P., Andersson G.: RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. *Exp. Cell Res.* 201(2):526-530, 1992.
- [192] Helfrich M. H., Nesbitt S. A., Dorey E. L., Horton M. A.: Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin. *J. Bone Miner. Res.* 7(3):335-343, 1992.
- [193] Faccio R., Teitelbaum S. L., Fujikawa K., Chappel J., Zallone A., Tybulewicz V. L., Ross F. P., Swat W.: Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat. Med.* 11(3):284-290, 2005.
- [194] Zou W., Kitaura H., Reeve J., Long F., Tybulewicz V. L., Shattil S. J., Ginsberg M. H., Ross F. P., Teitelbaum S. L.: Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J. Cell Biol.* 176(6):877-888, 2007.
- [195] Bonewald L., Mundy G. R.: Role of transforming growth factor beta in bone remodeling. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 250:261-76, 1990.
- [196] Hock J. M., Centrella M., Canalis E.: Insulin-like growth factor I (IGF-I) has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology.* 122(1):254-260, 2004.
- [197] Locklin R. M., Oreffo R. O., Triffitt J. T.: Effects of TGFbeta and bFGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. *Cell Biol. Int.* 23(3):185-194, 1999.
- [198] Faccio R., Takeshita S., Zallone A., Ross F. P., Teitelbaum S. L.: c-Fms and the alphavbeta3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J. Clin. Invest.* 111(5):749-758, 2003.
- [199] Zou W., Reeve J. L., Liu Y., Teitelbaum S. L., Ross F. P.: DAP12 couples c-Fms activation to the osteoclast cytoskeleton by recruitment of Syk. *Mol. Cell.* 31(3):422-431, 2008.
- [200] Faccio R., Novack D. V., Zallone A., Ross F. P., Teitelbaum S. L.: Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by beta3 integrin. *J. Cell Biol.* 162(3):499-509, 2003.
- [201] Faccio R., Takeshita S., Colaianni G., Chappel J., Zallone A., Teitelbaum S. L., Ross F. P.: M-CSF regulates the cytoskeleton via recruitment of a multimeric signaling complex to c-Fms Tyr-559/697/721. *J. Biol. Chem.* 282(26):18991-18999, 2007.
- [202] Lin H., Lee E., Hestir K., Leo C., Huang M., Bosch E., Halenbeck R., Wu G., Zhou A., Behrens D., Hollenbaugh D., Linnemann T., Qin M., Wong J., Chu K., Doberstein S. K., Williams L. T.: Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science.* 320(5877):807-811, 2008.
- [203] Takahashi N., Mundy G. R., Roodman G. D.: Recombinant human interferon-gamma inhibits formation of human osteoclast-like cells. *J. Immunol.* 137(11):3544-3549, 1986.
- [204] Lacey D. L., Erdmann J. M., Teitelbaum S. L., Tan H. L., Ohara J., Shioi A.: Interleukin 4, interferon-gamma, and prostaglandin E impact the osteoclastic cell-forming potential of murine bone marrow macrophages. *Endocrinology.* 136(6):2367-2376, 1995.

- [205] Fox S. W., Chambers T. J.: Interferon-gamma directly inhibits TRANCE-induced osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276(3):868-872, 2000.
- [206] Kamolmatyakul S., Chen W., Li Y. P.: Interferon-gamma down-regulates gene expression of cathepsin K in osteoclasts and inhibits osteoclast formation. *J. Dent. Res.* 80(1):351-355, 2001.
- [207] Langer R., Vacanti J. P.: Tissue engineering. *Science.* 260(5110):920- 926, 1993.
- [208] Khan W. S., Rayan F., Dhinsa B. S., Marsh D.: An osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic tissue-engineered product for trauma and orthopaedic surgery: how far are we? *Stem Cells Int.* Artikel 236231, 2012.
- [209] Praemer A., Furner S., Rice D. P.: Costs of Musculoskeletal Conditions. *Musculoskeletal Conditions in the United States.* Park Ridge, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons. 145-170, 1992.
- [210] Yelin E., Callahan L. F.: The economic cost and social and psychological impact of musculoskeletal conditions. *Arthritis Rheum.* 38(10):1351-1362, 1995.
- [211] Genesis 2:21-22: Die Bibel: Altes und neues Testament. Einheitsübersetzung. Freiburg im Breisgau. Verlag Herder. 1999.
- [212] Lexer E.: Die Verwendung der freien Knochenplastik nebst Versuchen ueber Gelenkversteifung and Gelenktransplantation. *Arch. Klin. Chir.* 86:939-954, 1908.
- [213] Urist M. R.: Bone: Formation by autoinduction. *Science.* 150(3698):893, 1965.
- [214] Sampath T. K., Reddi A. H.: Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(12):7599-7603, 1981.
- [215] Sampath T. K., Reddi A. H.: Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80(21):6591-6595, 1983.
- [216] Friedlaender G. E., Perry C. R., Cole J. D., Cook S. D., Cierny G., Muschler G. F., Zych G. A., Calhoun J. H., LaForte A. J., Yin S.: Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83-A(Suppl.1(Pt.2)):151-158, 2001.
- [217] Green W. T. Jr.: Articular cartilage repair: Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin. Orthop.* 124:237-250, 1977.
- [218] Cao Y., Vacanti J. P., Paige K. T., Upton J., Vacanti C. A.: Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast. Reconstr. Surg.* 100(2):297-302, Diskussion 303-304, 1997.
- [219] Blokhuis T. J., Arts J. J.: Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury.* 42(Suppl.2):26-29, 2011.
- [220] Springfield D. S.: Massive autogenous bone grafts. *Orthop. Clin. North. Am.* 18(2):249-256, 1987.
- [221] Giannoudis P. V., Dinopoulos H., Tsiridis E.: Bone substitutes: an update. *Injury.* 36(Suppl.3):20-27, 2005.

- [222] Zimmermann G., Moghaddam A.: Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 42(Suppl.2):16-21, 2011.
- [223] Dodd C. A., Fergusson C. M., Freedman L., Houghton G. R., Thomas D.: Allograft versus autograft bone in scoliosis surgery. *J. Bone Joint Surg. Br.* 70(3):431-434, 1988.
- [224] Summers B. N., Eisenstein S. M.: Donor site pain from the ilium: a complication of lumbar spine fusion. *J. Bone Joint Surg. Br.* 71(4):677-680, 1989.
- [225] Younger E. M., Chapman M. W.: Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma*. 3(3):192-195, 1989.
- [226] Carter G.: Harvesting and implanting allograft bone. *AORN J.* 70(4):660-670, 1999.
- [227] Friedlaender G. E., Mankin H. J.: Transplantation of osteochondral Allografts. *Ann. Rev. Med.* 35:311-324, 1984.
- [228] Friedlaender G. E., Strong D. M., Tomford W., Mankin H. J.: Long term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop. Clin. North Am.* 30(4):583-588, 1999.
- [229] Bonfiglio M., Jeter W. S.: Immunological responses to bone. *Clin. Orthop.* 18:19-27, 1972
- [230] Bos G. D., Goldberg V. M., Zika J. M., Heiple K. G., Powell A. E.: Immune responses of rats to frozen bone allografts. *J. Bone Joint Surg. Am.* 65(2):239-246, 1983.
- [231] Damien C. J., Parsons J. R.: Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J. Appl. Biomater.* 2(3):187-208, 1991.
- [232] Goldberg V. M., Stevenson S., Shaffer J. W.: Biology of autografts and allografts. In: Friedlaender G. E, Goldberg V. M.: *Bone and cartilage allografts: biology and clinical applications*. Park Ridge, Illinois: The American Academy of Orthopaedic Surgeons. 3-11, 1991.
- [233] Henman P, Finlayson D.: Ordering allograft by weight: suggestions for the efficient use of frozen bone-graft for impaction grafting. *J. Arthroplasty*. 15(3):368-371, 2000.
- [234] Keating J. F., McQueen M. M.: Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J. Bone Joint Surg. Br.* 83(1):3-8, 2001.
- [235] Palmer S. H, Gibbons C. L., Athanasou N. A.: The pathology of bone allograft. *J. Bone Joint Surg. Br.* 81(2):333-335, 1999.
- [236] Pelker R. R., Friedlaender G. E.: Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop. Clin. North Am.* 18(2):235-239, 1987.
- [237] Ehrler D. M., Vaccaro A. R.: The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin. Orthop.* 371:38-45, 2000.
- [238] Burg K. J., Porter S., Kellam J. F.: Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 21(23):2347-2359, 2000.
- [239] Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M.: Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 33(6):919-926, 2003.
- [240] Bieback K., Hecker A., Kocaömer A., Lannert H., Schallmoser K., Strunk D., Klüter H.: Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*. 27(9):2331-2341, 2009.

- [241] Gimble J. M., Katz A. J., Bunnell B. A.: Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* 100(9):1249-1260, 2007.
- [242] Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7(2):211-228, 2001.
- [243] Cowan C. M., Shi Y. Y., Aalami O. O., Chou Y. F., Mari C., Thomas R., Quarto N., Contag C. H., Wu B., Longaker M. T.: Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat. Biotechnol.* 22(5):560-567, 2004.
- [244] Yoon E., Dhar S., Chun D. E., Gharibjanian N. A., Evans G. R.: In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.* 13(3):619-627, 2007.
- [245] Auffray C., Sieweke M. H., Geissmann F.: Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:669-692, 2009.
- [246] Geissmann F., Manz M. G., Jung S., Sieweke M. H., Merad M., Ley K.: Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 327(5966):656-661, 2007.
- [247] Fogg D. K., Sibon C., Miled C., Jung S., Aucouturier P., Littman D. R., Cumano A., Geissmann F.: A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science.* 311(5757):83-87, 2006.
- [248] Iwasaki H., Akashi K.: Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity.* 26:726-740, 2007.
- [249] Miyamoto T., Ohneda O., Arai F., Iwamoto K., Okada S., Takagi K., Anderson D. M., Suda T.: Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood.* 98(8):2544-2554, 2001.
- [250] Servet-Delprat C., Arnaud S., Jurdic P., Nataf S., Grasset M. F., Soulas C., Domenget C., Destaing O., Rivollier A., Perret M., Dumontel C., Hanau D., Gilmore G. L., Belin M. F., Rabourdin-Combe C., Mouchiroud G.: Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia. *BMC Immunol.* 3:15, 2002.
- [251] Naito M., Hasegawa G., Takahashi K.: Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc. Res. Tech.* 39(4):350-364, 1997.
- [252] Kawasaki E. S., Ladner M. B., Wang A. M., Van Arsdell J., Warren M. K., Coyne M. Y., Schweickart V. L., Lee M. T., Wilson K. J., Boosman A., et al.: Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science.* 230(4723):291-296, 1985.
- [253] Nerlov C., Graf T.: PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev.* 12(15):2403-2412, 1998.
- [254] Dai X. M., Ryan G. R., Hapel A. J., Dominguez M. G., Russell R. G., Kapp S., Sylvestre V., Stanley E. R.: Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased

- primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. 99(1):111-120, 2002.
- [255] Cecchini M. G., Dominguez M. G., Mocci S., Wetterwald A., Felix R., Fleisch H., Chisholm O., Hofstetter W., Pollard J. W., Stanley E. R.: Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development*. 120(6):1357-1372, 1994.
- [256] Wiktor-Jedrzejczak W., Gordon S.: Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol. Rev.* 76(4):927-947, 1996.
- [257] DeKoter R. P., Walsh J. C., Singh H.: PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J.* 17(15):4456-4468, 1998.
- [258] Seta N., Kuwana M.: Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14+ monocytes. *Exp. Hematol.* 38(7):557-563, 2010.
- [259] Auffray C., Fogg D., Garfa M., Elain G., Join-Lambert O., Kayal S., Sarnacki S., Cumano A., Lauvau G., Geissmann F.: Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 317(5838):666-670, 2007.
- [260] Van Furth R., Cohn Z. A.: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128(3):415-435, 1968.
- [261] Steinman R. M., Lustig D. S., Cohn Z. A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* 139(6):1431-1445, 1974.
- [262] Banchereau J., Steinman R. M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392(6673):245-252, 1998.
- [263] Taylor P. R., Gordon S.: Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity*. 19(1):2-4, 2003.
- [264] Kennedy D. W., Abkowitz J. L.: Mature monocytic cells enter tissues and engraft. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(25):14944-14949, 1998.
- [265] Inaba K., Inaba M., Deguchi M., Hagi K., Yasumizu R., Ikehara S., Muramatsu S., Steinman R. M.: Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90(7):3038-3042, 1993.
- [266] Manz M. G., Traver D., Akashi K., Merad M., Miyamoto T., Engleman E. G., Weissman I. L.: Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann. NY Acad. Sci.* 938:167-173, 2001.
- [267] Varol C., Landsman L., Fogg D. K., Greenshtein L., Gildor B., Margalit R., Kalchenko V., Geissmann F., Jung S.: Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204(1):171-180, 2007.
- [268] Waskow C., Liu K., Darrasse-Jèze G., Guermonprez P., Ginhoux F., Merad M., Shengelia T., Yao K., Nussenzweig M.: The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 9(6):676-683, 2008.
- [269] Chorro L., Sarde A., Li M., Woollard K. J., Chambon P., Malissen B., Kissenpfennig A., Barbaroux J. B., Groves R., Geissmann F.:

- homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J. Exp. Med.* 206(13):3089-3100, 2009.
- [270] Schwarz H., Schmittner M., Duschl A., Horejs-Hoeck J.: Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One.* 9(12):e113840, 2014.
- [271] Ziegler-Heitbrock H. W., Pechumer H., Petersmann I., Durieux J. J., Vita N., Labeta M. O., Ströbel M.: CD14 is expressed and functional in human B cells. *Eur. J. Immunol.* 24(8):1937-1940, 1994.
- [272] Passlick B., Flieger D., Ziegler-Heitbrock H. W.: Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 74(7):2527-2534, 1989.
- [273] Geissmann F., Jung S., Littman D. R.: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19(1):71-82, 2003.
- [274] Venkataraman M.: Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood.* 79(2):503-511, 1992.
- [275] Ziegler-Heitbrock H. W., Ströbel M., Kieper D., Fingerle G., Schlunck T., Petersmann I, Ellwart J, Blumenstein M, Haas JG.: Definition of human blood monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 67(5):603-606, 2000.
- [276] Belge K. U., Dayyani F., Horelt A., Siedlar M., Frankenberger M., Frankenberger B., Espevik T., Ziegler-Heitbrock L.: The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* 168(7):3536-3542, 2002.
- [277] Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D. N., Leenen P. J., Liu Y. J., MacPherson G., Randolph G. J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J. M., Lutz M. B.: Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 21;116(16):e74-80, 2010.
- [278] Ziegler-Heitbrock L., Hofer T. P.: Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front. Immunol.* 4:23, 2013.
- [279] Rogacev K. S., Cremers B., Zawada A. M., Seiler S., Binder N., Ege P., Große-Dunker G., Heisel I., Hornof F., Jeken J., Rebling N. M., Ulrich C., Scheller B., Böhm M., Fliser D., Heine G. H.: CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60(16):1512-1520, 2012.
- [280] Ungefroren H., Hyder A., Hinz H., Groth S., Lange H., El-Sayed K. M., Ehnert S., Nüssler A. K., Fändrich F., Gieseler F.: Pluripotency gene expression and growth control in cultures of peripheral blood monocytes during their conversion into programmable cells of monocytic origin (PCMO): evidence for a regulatory role of autocrine activin and TGF- β . *PLoS One.* 10(2):e011809, 2015.
- [281] Zhao Y., Glesne D., Huberman E.: A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(5):2426-2431, 2003.
- [282] Romagnani P., Annunziato F., Liotta F., Lazzeri E., Mazzinghi B., Frosali F., Cosmi L., Maggi L., Lasagni L., Scheffold A., Kruger M., Dimmeler S., Marra F., Gensini G., Maggi E., Romagnani S.: CD14+CD34^{low} cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors.

- Circ. Res. 97(4):314-322, 2005.
- [283] Kodama H., Inoue T., Watanabe R., Yasuoka H., Kawakami Y., Ogawa S., Ikeda Y., Mikoshiba K., Kuwana M.: Cardiomyogenic potential of mesenchymal progenitors derived from human circulating CD14+ monocytes. *Stem Cells Dev.* 14(6):676-686, 2005.
- [284] Kodama H., Inoue T., Watanabe R., Yasutomi D., Kawakami Y., Ogawa S., Mikoshiba K., Ikeda Y., Kuwana M.: Neurogenic potential of progenitors derived from human circulating CD14+ monocytes. *Immunol. Cell Biol.* 84(2):209-217, 2006.
- [285] Kuwana M., Okazaki Y., Kodama H., Satoh T., Kawakami Y., Ikeda Y.: Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells. *Stem Cells.* 24(12):2733-2743, 2006.
- [286] Ruhnke M., Nussler A. K., Ungefroren H., Hengstler J. G., Kremer B., Hoeckh W., Gottwald T., Heeckt P., Fändrich F.: Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation.* 79(9):1097-1103, 2005.
- [287] Ungefroren H., Groth S., Hyder A., Thomsen N., Hinz H., Reiling N., Grage-Griebenow E., Held-Feindt J., Schulze M., Nüssler A. K., Fändrich F.: The generation of programmable cells of monocytic origin involves partial repression of monocyte/macrophage markers and reactivation of pluripotency genes. *Stem Cells Dev.* 19(11):1769-1780, 2010.
- [288] Hyder A., Ehnert S., Hinz H., Nüssler A. K., Fändrich F., Ungefroren H.: EGF and HB-EGF enhance the proliferation of programmable cells of monocytic origin (PCMO) through activation of MEK/ERK signaling and improve differentiation of PCMO-derived hepatocyte-like cells. *Cell Commun. Signal.* 10(1):23, 2012.
- [289] Ehnert S., Seeliger C., Vester H., Schmitt A., Saidy-Rad S., Lin J., Neumaier M., Gillen S., Kleeff J., Friess H., Burkhart J., Stöckle U., Nüssler A. K.: Autologous serum improves yield and metabolic capacity of monocyte-derived hepatocyte-like cells: possible implication for cell transplantation. *Cell Transplant.* 20(9):1465-1477, 2011.
- [290] El-Amin S. F., Botchwey E., Tuli R., Kofron M. D., Mesfin A., Sethuraman S., Tuan R. S., Laurencin C. T.: Human osteoblast cells: isolation, characterization, and growth on polymers for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 76(3):439-449, 2006.
- [291] Robey P. G., Termine J. D.: Human bone cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 37(5):453-460, 1985.
- [292] Kassem M., Risteli L., Mosekilde L., Melsen F., Eriksen E. F.: Formation of osteoblast-like cells from human mononuclear bone marrow. *APMIS.* 99(3):269-274, 1991.
- [293] Catterson E. J., Nesti L. J., Danielson K. G., Tuan R. S.: Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol. Biotechnol.* 20(3):245-256, 2002.
- [294] Ehnert S., Baur J., Schmitt A., Neumaier M., Lucke M., Dooley S., Vester H., Wildemann B., Stöckle U., Nussler A. K.: TGF- β 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *PLoS One.* 5(11):e14073, 2010.

- [295] Kim D., Monaco E., Maki A., de Lima A. S., Kong H. J., Hurley W. L., Wheeler M. B.: Morphologic and transcriptomic comparison of adipose- and bone-marrow-derived porcine stem cells cultured in alginate hydrogels. *Cell Tissue Res.* 341(3):359-370, 2010.
- [296] Pilling D., Fan T., Huang D., Kaul B., Gomer R. H.: Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One.* 4(10):e7475, 2009.
- [297] Herrmann M., Schmidt J., Umanskaya N., Colaianni G., Al Marrawi F., Widmann T., Zallone A., Wildemann B., Herrmann W.: Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone.* 41(4):584-591, 2007.
- [298] Wildemann B., Lübberstedt M., Haas N. P., Raschke M., Schmidmaier G.: IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating maintain their activity over long-term storage-cell culture studies on primary human osteoblast-like cells. *Biomaterials.* 25(17):3639-3644, 2004.
- [299] Meloan S. N., Puchtler H.: Chemical mechanisms of staining methods: Von Kossa's technique. What von Kossa really wrote and a modified reaction for selective demonstration of inorganic phosphate. *J. Histotechnol.* 8:11-13, 1985.
- [300] Ramírez-Zacarías J. L., Castro-Muñozledo F., Kuri-Harcuch W.: Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry.* 97(6):493-497, 1992.
- [301] Prallet B., Male P., Neff L., Baron R.: Identification of a functional mononuclear precursor of the osteoclast in chicken medullary bone marrow cultures. *Bone Miner. Res.* 7(4):405-414, 1992.
- [302] Voigt W.: Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol. Med.* 110:39-48, 2005.
- [303] Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82(13):1107-1112, 1990.
- [304] Tesseur I., Zou K., Berber E., Zhang H., Wyss-Coray T.: Highly sensitive and specific bioassay for measuring bioactive TGF-beta. *BMC Cell Biol.* 7:15, 2007.
- [305] Engvall E., Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8(9):871-874, 1971.
- [306] Jonsson K. B., Frost A., Larsson R., Ljunghall S., Ljunggren O.: A new fluorometric assay for determination of osteoblastic proliferation: effects of glucocorticoids and insulin-like growth factor-I. *Calcif. Tissue Int.* 60(1):30-36, 1997.
- [307] Freude T., Braun K. F., Haug A., Pscherer S., Stöckle U., Nussler A. K., Ehnert S.: Hyperinsulinemia reduces osteoblast activity in vitro via upregulation of TGF- β . *J. Mol. Med. (Berl).* 90(11):1257-1266, 2012.
- [308] Spiegelman S., Watson K. F., Kacian D. L.: Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68(11):2843-2845, 1971.
- [309] Carothers A. M., Urlaub G., Mucha J., Grunberger D., Chasin L. A.: Biotechniques. Point mutation analysis in a mammalian gene:

- rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method. 7(5):494-496, 498-499, 1989.
- [310] Hulett H. R., Bonner W. A., Barrett J., Herzenberg L. A.: Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*. 166(3906):747-749, 1969.
- [311] Raff M.: Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19:1-22, 2003.
- [312] Morrison S. J.: Stem cell potential: Can anything make anything? *Curr. Biol.* 11:7-9, 2001.
- [313] Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F.: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 279(5356):1528-1530, 1998.
- [314] Eglitis M. A., Mezey E.: Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(8):4080-4085, 1997.
- [315] Brazelton T. R., Rossi F. M., Keshet G. I., Blau H. M.: From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 290(5497):1775-1779, 2000.
- [316] Mezey E., Chandross K. J., Harta G., Maki R. A., McKercher S. R.: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 290(5497):1779-1782, 2000.
- [317] Petersen B. E., Bowen W. C., Patrene K. D., Mars W. M., Sullivan A. K., Murase N., Boggs S. S., Greenberger J. S., Goff J. P.: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 14;284(5417):1168-1170, 1999.
- [318] Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., Anversa P.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 410(6829):701-705, 2001.
- [319] Lin Y., Weisdorf D. J., Solovey A., Hebbel R. P.: Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.* 105(1):71-77, 2000.
- [320] Priller J., Persons D. A., Klett F. F., Kempermann G., Kreutzberg WG. W., Dirnagl U.: Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 155(5):733-738, 2001.
- [321] Bjornson C. R., Rietze R. L., Reynolds B. A., Magli M. C., Vescovi A. L.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 283(5401):534-537, 1999.
- [322] Galli R., Borello U., Gritti A., Minasi M. G., Bjornson C., Coletta M., Mora M., De Angelis M. G., Fiocco R., Cossu G., Vescovi A. L.: Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 3(10):986-991, 2000.
- [323] Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlström H., Lendahl U., Frisén J.: Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 288(5471):1660-1663, 2000.
- [324] Kopen G. C., Prockop D. J., Phinney D. G.: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 14;96(19):10711-10716, 1999.
- [325] Krause D. S., Theise N. D., Collector M. I., Henegariu O., Hwang S.,

- Gardner R., Neutzel S., Sharkis S. J.: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 105(3):369-377, 2000.
- [326] Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flint A. F., Kunkel L. M., Mulligan R. C.: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 401(6751):390-394, 1999.
- [327] Okada T. S.: Transdifferentiation. Flexibility in Cell Differentiation. Oxford, Clarendon Press, 1991.
- [328] Slack J. M., Tosh D.: Transdifferentiation and metaplasia-switching cell types. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11(5):581-586, 2001.
- [329] Tosh D., Slack J. M.: How cells change their phenotype. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(3):187-194, 2002.
- [330] Zibadi S., Coppola D.: Surgical and Molecular Pathology of Barrett Esophagus. *Cancer Control*. 22(2):177-185, 2015.
- [331] Eguchi G., Kodama R.: Transdifferentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5(6):1023-1028, 1993.
- [332] Seta N., Kuwana M.: Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J. Med.* 56(2):41-47, 2007.
- [333] Nöth U., Osyczka A. M., Tuli R., Hickok N. J., Danielson K. G., Tuan R. S.: Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J. Orthop. Res.* 20(5):1060-1069, 2002.
- [334] Li W. C., Yu W. Y., Quinlan J. M., Burke Z. D., Tosh D.: The molecular basis of transdifferentiation. *J. Cell. Mol. Med.* 9(3): 569-582, 2005.
- [335] Ducy P.: Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev. Dyn.* 219(4):461-471, 2000.
- [336] Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J. M., Behringer R. R., de Crombrughe B.: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108(1):17-29, 2002.
- [337] Hou J. M., Lin J. L., Wen J. P., Jin L., Tang F. Q.: Immunohistochemical identification of osteoclasts and multinucleated macrophages. *Cell Immunol.* 292(1-2):53-56, 2014.
- [338] Aristorena M., Blanco F. J., de Las Casas-Engel M., Ojeda-Fernandez L., Gallardo-Vara E., Corbi A., Botella L. M., Bernabeu C: Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization. *J. Cell Sci.* 127(12):2723-2735, 2014.
- [339] Lastres P., Bellon T., Cabañas C., Sanchez-Madrid F., Acevedo A., Gougos A., Letarte M., Bernabeu C.: Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur. J. Immunol.* 22(2):393-397, 1992.
- [340] Brekken R. A., Sage E. H.: SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol.* 19(8):816-827, 2001.
- [341] Ramaiah S. K., Rittling S.: Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol. Sci.* 103(1):4-13, 2008.
- [342] Foresta C., Strapazzon G., De Toni L., Giancesello L., Calcagno A., Pilon C., Plebani M., Vettor R.: Evidence for osteocalcin production

- by adipose tissue and its role in human metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(7):3502-3506, 2010.
- [343] Shioi A., Katagi M., Okuno Y., Mori K., Jono S., Koyama H., Nishizawa Y.: Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ. Res.* 91(1):9-16, 2002.
- [344] Heinemann D. E., Siggelkow H., Ponce L. M., Viereck V., Wiese K. G., Peters J. H.: Alkaline phosphatase expression during monocyte differentiation. Overlapping markers as a link between monocytic cells, dendritic cells, osteoclasts and osteoblasts. *Immunobiology.* 202(1):68- 81, 2000.
- [345] Riquelme P., Wundt J., Hutchinson J. A., Brulport M., Jun Y., Sotnikova A., Girreser U., Braun F., Gövert F., Soria B., Nüssler A., Clement B., Hengstler J. G., Fändrich F.: A refined characterisation of the NeoHepatocyte phenotype necessitates a reappraisal of the transdifferentiation hypothesis. *Differentiation.* 77(3):263-276, 2009.
- [346] Tsuruta T., Tani K., Hoshika A., Asano S.: Alkaline phosphatase, defensin gene expression and effect of myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. *Leuk. Lymphoma.* 32(3-4):237-247, 1999.
- [347] Heinemann D. E., Peters J. H.: Follicular dendritic-like cells derived from human monocytes. *BMC Immunol.* 6:23, 2005.
- [348] Yuasa K., Mori K., Ishikawa H., Sudo A., Uchida A., Ito Y.: Characterization of two types of osteoclasts from human peripheral blood monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356(2):354-360, 2007.
- [349] Kaplan G., Gaudernack G.: In vitro differentiation of human monocytes. Differences in monocyte phenotypes induced by cultivation on glass or on collagen. *J. Exp. Med.* 156(4):1101-1114, 1982.
- [350] Ottonello L., Bertolotto M., Montecucco F., Dapino P., Dallegri F.: Dexamethasone-induced apoptosis of human monocytes exposed to immune complexes. Intervention of CD95- and XIAP-dependent pathways. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18(3):403-415, 2005.
- [351] Cooper M. S., Hewison M., Stewart P. M.: Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J. Endocrinol.* 163(2):159-164, 1999.
- [352] Zhou Y. S., Liu Y. S., Tan J. G.: Is 1,25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? *Chin. Med. J. (Engl).* 119(15):1278-1286, 2006.
- [353] Kanatani Y., Kasukabe T., Okabe-Kado J., Yamamoto-Yamaguchi Y., Nagata N., Motoyoshi K., Honma Y.: Role of CD14 expression in the differentiation-apoptosis switch in human monocytic leukemia cells treated with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 or dexamethasone in the presence of transforming growth factor beta1. *Cell Growth Differ.* 10(10):705-712, 1999.
- [354] Quinn J. M., Fujikawa Y., McGee J. O., Athanasou N. A.: Rodent osteoblast-like cells support osteoclastic differentiation of human cord blood monocytes in the presence of M-CSF and 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29(1):

- 173-179, 1997.
- [355] Pignolo R. J., Shore E. M.: Circulating osteogenic precursor cells. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20(2):171-180, 2010.
- [356] Suda R. K., Billings P. C., Egan K. P., Kim J. H., McCarrick-Walmsley R., Glaser D. L., Porter D. L., Shore E. M., Pignolo R. J.: Circulating osteogenic precursor cells in heterotopic bone formation. *Stem Cells.* 27(9):2209-2219, 2009.
- [357] Zvaifler N. J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G., Edwards C. J., Moss J., Burger J. A., Maini R. N.: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2(6):477-488, 2000.
- [358] Kuznetsov S. A., Mankani M. H., Gronthos S., Satomura K., Bianco P., Robey P. G.: Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* 153(5):1133- 1140., 2001.
- [359] Kumagai K., Vasanji A., Drazba J. A., Butler R. S., Muschler G. F.: Circulating cells with osteogenic potential are physiologically mobilized into the fracture healing site in the parabiotic mice model. *J. Orthop. Res.* 26(2):165-175, 2008.
- [360] Eghbali-Fatourehchi G. Z., Lamsam J., Fraser D., Nagel D., Riggs B. L., Khosla S. N.: Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *Engl. J. Med.* 352(19):1959-166, 2005.
- [361] Kan L., Liu Y., McGuire T. L., Berger D. M., Awatramani R. B., Dymecki S. M., Kessler J. A.: Dysregulation of local stem/progenitor cells as a common cellular mechanism for heterotopic ossification.: *Stem Cells.* 27(1):150-156, 2009.
- [362] Deschaseaux F., Gindraux F., Saadi R., Obert L., Chalmers D., Herve P.: Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45^{med,low} phenotype. *Br. J. Haematol.* 122(3):506-517, 2003.
- [363] Sacchetti B, Funari A, Michienzi S. Di Cesare S., Piersanti S., Saggio I., Tagliafico E., Ferrari S., Robey P. G., Riminucci M., Bianco P.: Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 131:324–336, 2007.
- [364] Pilz G. A., Braun J., Ulrich C., Felka T., Warstat K., Ruh M., Schewe B., Abele H., Larbi A., Aicher W. K.: Human mesenchymal stromal cells express CD14 cross-reactive epitopes. *Cytometry A.* 79(8):635-645, 2011.
- [365] Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D. M., Nakano Y., Meyer E. M., Morel L., Petersen B. E., Scott E. W.: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 416(6880):542-545, 2002.
- [366] Ying Q. L., Nichols J., Evans E. P., Smith A. G.: Changing potency by spontaneous fusion. *Nature.* 416(6880):545-548, 2002.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ich versichere die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard Karls Universität beachtet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die hier vorliegende Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Die Arbeit wurde in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der BG Klinik Tübingen durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Professor Dr. A. K. Nüssler, Leiter des Siegfried Weller Instituts für Unfallmedizinische Forschung der BG Klinik Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden selbständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anleitung von Professor Dr. A. K. Nüssler durch mich.

Peter Th. M. Buschner

K DANKSAGUNG

Ich bedanke mich aufrichtig und herzlich bei Herrn Professor Andreas Nüssler, dem Leiter des Siegfried Weller Institutes für Unfallmedizinische Forschung der BG Klinik Tübingen, für die vertrauensvolle und freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Seinem Engagement ist deren Gelingen zu verdanken.

Besonderer Dank gebührt Herrn Professor Ulrich Stöckle, dem ärztlichen Direktor der BG Klinik Tübingen, für seine Unterstützung.

Diese Arbeit wäre ohne die bedingungslose Unterstützung und Liebe, das geduldige Verständnis und das offene Herz von Sandra Loos nicht entstanden. Ich liebe dich.

Meinen Eltern Marianne und Thomas Buschner sowie meinem Bruder Dr. Maximilian Buschner danke ich für ihre liebevolle Fürsorge, geschwisterliche Freundschaft und ihr immerwährendes Vertrauen.

Ich danke meinem verstorbenen Freund Florian Kober für seine positive Lebensenergie, die er stets mit allen geteilt hat und die mir zum Vorbild wurde. Ich vermisse dich.

Meinen lieben Freunden Sascha Arnold und Cornel Dexheimer danke ich für alles, was sie für mich getan haben. Insbesondere für den Halt, den sie mir während meines Studiums gaben.

Der Familie Volker Daniel und Alexandra Wanitschke danke ich für den Ort des Rückzugs und der Ruhe.

Den folgenden Personen danke ich für ihre fachliche und/oder persönliche Unterstützung (in alphabetischer Reihenfolge):

Dr. Paul Heidekrüger, Dr. Sebastian Hofmaier, Professor Frank Hölzle, Iris Hoppenbrock, Dr. Joachim Karl, Dr. Edwin Khazzaka, Simon Kober, Dr. Thorsten Kraus, Dr. Clemens Netter, Dr. Carl Neuerburg, Professor Werner Plötz, Dr. Claudine Seeliger, Dr. Andreas Schmitt, Marina Unger, Dominik Wiendl