

**Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und
Wiederherstellungschirurgie,
Klinik der Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Böcker

Vergleich des multipotenten sowie proliferativen Potentials humaner mesenchymaler
Stammzellen aus Beckenkamm- und Tibiakopfspongiosa und ihre altersbezogenen
Unterschiede

Dissertation

Zum Erwerb des Doktors der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anna Katharina Scheumaier

aus Freising, Deutschland

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Wolf Christian Prall

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Albert
Priv.-Doz. Dr. Florian Haasters

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Hans Polzer
Dr. Maximilian Saller

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der
mündlichen Prüfung:

05.05.2022

Zusammenfassung

Humane mesenchymale Vorläuferzellen (hMSC) stellen die zelluläre Quelle der Knochenneubildung dar und sind ein wesentlicher Bestandteil von autologen Knochentransplantaten. Obwohl bereits weniger komplikationsbehaftete Entnahmestellen bekannt sind, werden autologe Knochentransplantate überwiegend an der Darmbeinschaukel des Beckenkamms gewonnen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher der Vergleich von hMSC des Beckenkamms und der proximalen Tibia in Hinblick auf die proliferative und die osteogene Differenzierungskapazität. Darüber hinaus wurde der Einfluß des Patientenalters auf diese biologischen Eigenschaften genauer untersucht.

hMSCs wurden aus spongiösem Knochen des Beckenkamms und der proximalen Tibia von 53 Patienten isoliert. Die proliferative Kapazität wurde mittels kumulativer Populationsverdopplung, Populationsverdopplungszeit, Anzahl koloniebildender Einheiten und Zellproliferation-Assays evaluiert. Die osteogene Kapazität wurde mittels der Quantifizierung extrazellulärer Calciumausscheidung und der Markergen-Expression (*DLX5*, *RUNX2*, *OSX*, *ALPL*, *SPP1* und *OCN*) beurteilt. Die Anzahl von hMSCs pro Gramm gewonnenen Gewebes wurde bestimmt. Zudem wurde die adipogene und chondrogene Differenzierungskapazität mittels BODIPY und Safranin-Orange-Färbungen quantifiziert. Zusätzliche Analysen erfolgten nach Gruppierung der Proben in junge (18–49 Jahre) und ältere (≥ 50 Jahre) Spender.

Die isolierten Zellen beider Entnahmestellen wiesen die Expression spezifischer Marker (CD105, CD90, CD73 und IBSP) auf und erfüllten die Kriterien von hMSCs. Die hMSCs der proximalen Tibia zeigten vergleichbare proliferative und osteogene Differenzierungskapazitäten. Für keine der durchgeführten Analysen zu diesen biologischen Eigenschaften wurden ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu hMSCs des Beckenkamms gefunden. Auch der Vergleich von hMSCs junger und älterer Spender zeigte keine signifikanten Unterschiede. Gleiches galt für hMSCs von beiden Entnahmestellen und der Analyse innerhalb der gleichen Altersgruppe.

Die vorliegende Arbeit zeigt vergleichbare biologische Eigenschaften von hMSCs des Beckenkamms und der proximalen Tibia. Darüber hinaus hat auch das Alter keinen relevanten Einfluß auf die proliferativen und osteogenen Differenzierungskapazitäten.

Als Konsequenz sollte die proximale Tibia als Entnahmestelle bei Patienten aller Altersgruppen daher enger in Betracht gezogen werden.

Abstract

Human mesenchymal stem cells (hMSC) are the cellular origin of bone formation and an essential component of autologous bone grafts. Autologous bone grafts are predominately harvested at the iliac crest, although alternative and less complication-afflicted sources are known. The aim of the present study was to compare hMSCs from the iliac crest and the proximal tibia with regards to their proliferative and osteogenic differentiation capacity. Furthermore, the influence of donor age on these biological properties was investigated in detail.

hMSCs we used were isolated from cancellous bone harvested at the iliac crest or the proximal tibia of 53 patients. The proliferative capacity was evaluated by cumulative population doublings, population doubling time, colony forming units and cell proliferation assays. The osteogenic capacity was assessed by quantification of extracellular calcium deposition and marker gene expression levels (*DLX5*, *RUNX2*, *OSX*, *ALPL*, *SPP1* and *OCN*). The number of hMSCs per gram harvested tissue was determined. Furthermore, the adipogenic and the chondrogenic differentiation capacity were quantified using BODIPY and Safranin Orange staining, respectively. Additional analyses were carried out after grouping young (18–49 years) and aged (≥ 50 years) donors.

The cells isolated from both harvesting sites featured the expression of specific markers (CD105, CD90, CD73 and IBSP) and fulfilled the criteria of hMSC. hMSCs derived from the proximal tibia showed a comparable proliferative and osteogenic differentiation capacity. No significant differences were found for any analysis conducted, when compared to hMSCs obtained from the iliac crest. Furthermore, no significant differences could be revealed when comparing young and aged donors. This was equally true for hMSCs from both donor sites after comparison within the same age group.

The present study reveals comparable biological properties of hMSCs derived from the iliac crest and the proximal tibia. Furthermore, aging does not alter proliferative and osteogenic differentiation capacity. Consequently, the proximal tibia should be considered more closely as an alternative donor site for patients of all age groups.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Klinische Relevanz	1
1.2. Knochenzellen	3
1.3. Besonderheiten des gealterten Knochens	7
1.4. Physiologie des Knochenumbaus	8
1.5. Knochentransplantate und Knochenersatzmaterial	11
1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Ethische Stellungnahme	15
2.2. Herkunft der Primärzellen und Spender	16
2.3. Operative Methoden	16
2.4. Zellisolation und Zellkultur	17
2.5. Erfassung der Zellzahl	17
2.6. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	18
2.7. Kumulative Populationsverdopplung	18
2.8. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	19
2.9. Metabolische Aktivität	19
2.10. Immunocytochemie	20
2.11. Osteogene Differenzierung	21

Inhaltsverzeichnis

2.12. Chondrogene Differenzierung	23
2.13. Adipogene Differenzierung	24
2.14. RNA-Extrahierung	25
2.15. cDNA und qPCR	25
2.16. Statistische Auswertung	28
3. Ergebnisse	29
3.1. Die entnommenen Spenderzellen entsprechen den Kriterien für humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	29
3.2. Die Proliferationskapazität der osteogenen Vorläuferzellen war unabhängig von Entnahmestelle und Spenderalter vergleichbar	31
3.3. Die metabolische Aktivität der Spenderzellen war für die Zellen aus beiden Entnahmestellen beider Altersgruppen vergleichbar	41
3.4. Die Spenderzellen aus beiden Entnahmestellen zeigten die Fähigkeit sowohl zur osteogenen, adipogenen als auch zur chondrogenen Differenzierung	43
4. Diskussion	63
4.1. Die Zellen wurden ausschließlich aus Knochenspongiosa gewonnen	64
4.2. Die Zellmenge, die Zellqualität und das Zellwachstum waren in beiden Gruppen vergleichbar	64
4.3. Die Spenderzellen erfüllten die minimalen Kriterien für hMSCs	66
4.4. Die Spenderzellen aller Gruppen waren zur chondrogenen, adipogenen und osteogenen Differenzierung fähig	67
5. Ausblick	70
6. Literaturverzeichnis	71
7. Anhang	81
8. Abkürzungsverzeichnis	83
9. Abbildungsverzeichnis	86
10. Tabellenverzeichnis	88

Inhaltsverzeichnis

11. Danksagung	89
12. Curriculum Vitae	90
13. Eidesstattliche Versicherung	93

1. Einleitung

1.1. Klinische Relevanz

Die Behandlung von Knochendefekten, komplexen Frakturen sowie verzögert oder nicht heilenden Knochenbrüchen erfordert häufig die Verwendung von Knochenersatzmaterial oder Knochentransplantaten. Gleiches gilt für die Durchführung von operativen Gelenkversteifungen (Kinaci et al., 2014). Obwohl bereits Versuche stattfinden, auch synthetische Knochenersatzmaterialien zu verwenden, ist die Gewinnung patienteneigener Knochentransplantate und die Durchführung autologer Spongiosaplastiken heute noch der „Goldstandard“ (Schieker and Mutschler, 2006). Weltweit werden jährlich etwa 2,2 Millionen solcher autologer Spongiosaplastiken bei Patienten aller Altersgruppen durchgeführt (Giannoudis et al., 2005). Die Entnahme erfolgt dabei überwiegend am Beckenkamm des Patienten. Leider erfordert dies einen invasiven Eingriff mit einer hohen Morbiditätsrate (Ahlmann et al., 2002; Arrington et al., 1996; Baumhauer et al., 2013). So kommt es häufig zu langanhaltenden Schmerzen an der Entnahmestelle und Sensibilitätseinschränkungen durch Nervenläsionen (Arrington et al., 1996). Es wird daher stets nach alternativen, weniger komplikationsbehafteten, Entnahmestellen gesucht. Prinzipiell ist die Spongiosaentnahme an der proximalen Tibia, dem Humerus und anderen Knochen, wie dem Radius, dem Calcaneus oder auch den Rippen möglich (Alt et al., 1999; Alt et al., 2003; Belthur et al., 2008).

Studien zeigen, dass die Gewinnung autologer Spongiosa aus der proximalen Tibia im Vergleich zum Beckenkamm ein geringeres Morbiditätsrisiko für den Patienten hat. Für die Entnahme von autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm wurden Komplikationsraten von bis zu 39% beschrieben, während es bei der Entnahme von Knochentransplantaten aus der proximalen Tibia nur in 1,9% der Fälle zu Komplikationen kam (Alt et al., 1999; Banwart et al., 1995; Hughes and Revington, 2002).

Grundsätzlich verfügt ein spongiöses Knochentransplantat mit der extrazellulären Matrix und den exprimierten Zytokinen über osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften (Baumhauer et al., 2014; Mauffrey et al., 2011). Darüber hinaus weisen spongiöse Knochentransplantate eine hohe Anzahl von mesenchymalen Vorläuferzellen (hMSCs) auf. hMSCs stellen die zelluläre Quelle der

Einleitung

Knochenneubildung dar, da sie an der Empfängerstelle proliferieren und osteogen ausdifferenzieren (Bauer and Muschler, 2000). Narbona-Carceles et al. konnten zeigen, dass die als Knochenmarkaspirate aus der Tibia gewonnenen hMSCs den vergleichbaren immunologischen Phänotyp und eine vergleichbare multilineare Differenzierungspotenz besaßen wie die hMSCs aus dem Beckenkamm. Die Gruppe untersuchte allerdings lediglich Patienten ab einem Alter von 64 Jahren (Narbona-Carceles et al., 2014). Zusätzlich fanden Takemoto et al. vergleichbare Konzentrationen der knochenmorphogenetischen Proteine (BMPs, bone morphogenetic proteins) in Knochenmarkaspiraten der beiden unterschiedlichen Entnahmestellen (Takemoto et al., 2010). Zahlreiche Studien untersuchten potentielle altersassoziierte Veränderungen von hMSCs unterschiedlicher Entnahmestellen. Die Anzahl von hMSCs, die am proximalen Femur isoliert werden können scheint in älteren Patienten niedriger zu sein (Garvin et al., 2007). Auch die Anzahl von Vorläuferzellen im Knochenmark des Beckenkamms scheint in einzelnen Studien mit dem Alter abzunehmen (Baxter et al., 2004; Muschler et al., 2001; Nishida et al., 1999; Stolzing et al., 2008). hMSCs, die am Beckenkamm älterer Patienten isoliert wurden, wiesen in der Studien von Ziam et al. eine herabgesetzte osteogene Differenzierungskapazität (Zaim et al., 2012) und in der Studie von Li et al. eine niedrigere proliferative Kapazität auf (Li et al., 2014). Die verfügbare Evidenz zum Effekt des Alterungsprozesses von hMSCs untersucht aber lediglich Zellen, die am Beckenkamm oder am proximalen Femur gewonnen wurden. Es gibt keine Studie, die den Einfluß des Patientenalters auf das osteogene Differenzierungs- und Proliferationspotential von hMSCs aus Knochentransplantaten der proximalen Tibia untersucht. Es ist auch diesem Mangel an Evidenz geschuldet, dass sich die proximale Tibia noch nicht als alternative Entnahmestelle in der klinischen Routine durchgesetzt hat. Sollte der Nachweis gelingen zu zeigen, dass die osteogene Differenzierungskapazität und das proliferative Potential von an der proximalen Tibia gewonnenen hMSCs auch im Alter ausreichend erhalten sind, könnte der Patientenkomfort und die Patientensicherheit deutlich verbessert werden. Die vorliegende Arbeit hat daher das Ziel, den Einfluß der Entnahmestelle und des Patientenalters auf die osteogene Differenzierungskapazität und das proliferative Potential von hMSCs des Beckenkamms und der proximalen Tibia zu untersuchen.

1.2. Knochenzellen

1.2.1. Osteoblasten

hMSCs besitzen die Fähigkeit, sich zu verschiedenen Vorläuferzellen zu differenzieren, welche in der Lage sind, unter anderem Knochen, Knorpel und Fettgewebe zu bilden (Pittenger et al., 2011). Im Rahmen der Knochenneubildung proliferieren hMSC und differenzieren zu Osteoblasten. Osteoblasten ihrerseits besitzen die Fähigkeit Kollagene, Hydroxylapatit, Calciumphosphate und weitere Komponenten wie Osteocalcin und Bone Sialoprotein zu produzieren. Diese Produkte können in der Wissenschaft auch als Differenzierungsmarker genutzt werden (Aubin, 1998; Freemont, 1993).

Die Entwicklung zu Osteoblasten durchläuft mehrere Zwischenstufen, die über die Transkription und Translation verschiedenster Signalproteine gesteuert werden (Abbildung 1). Hier spielen vor allem der BMP/RUNX2-Pfad (Bone morphogenetic proteins/Runt-related transcription factor 2) und die Wnt-Signalkaskade eine große Rolle (Gaur et al., 2005). Der Beginn der Osteogenese wird durch Zytokine der BMP/TGF- β -Familie (Bone morphogenetic proteins/Transforming growth factor- β), vor allem BMP2, BMP4 und BMP7, eingeleitet. Diese aktivieren den Smad-Signalkaskadenpfad, welcher sodann in Zusammenspiel mit dem Indian hedgehog (Ihh)-Signalpfad den RUNX2-Pfad aktiviert (Kulterer et al., 2007; Neman et al., 2012; Thies et al., 1992; Wan and Cao, 2005).

Hierdurch entwickeln sich die mesenchymalen Stammzellen zu osteogenen Vorläuferzellen. Durch Einwirkung von Prostaglandinen und IGF (Insulinwachstumsfaktor) sowie Aktivierung der Wnt-Signalkaskade erfolgt die weitere Differenzierung zu Präosteoblasten und weiter zu Osteoblasten (Hock et al., 2018; Neman et al., 2012; Weinreb et al., 1997). Weiterhin spielen bestimmte, von den Zellen exprimierte Moleküle sowie regulierende Transkriptionsfaktoren, eine Rolle. Während jeder Entwicklungsstufe werden einige von ihnen spezifisch synthetisiert (Abbildung 1). Die genauen Entwicklungsschritte wurden unter anderem von Aubin et al. untersucht (Aubin, 1998).

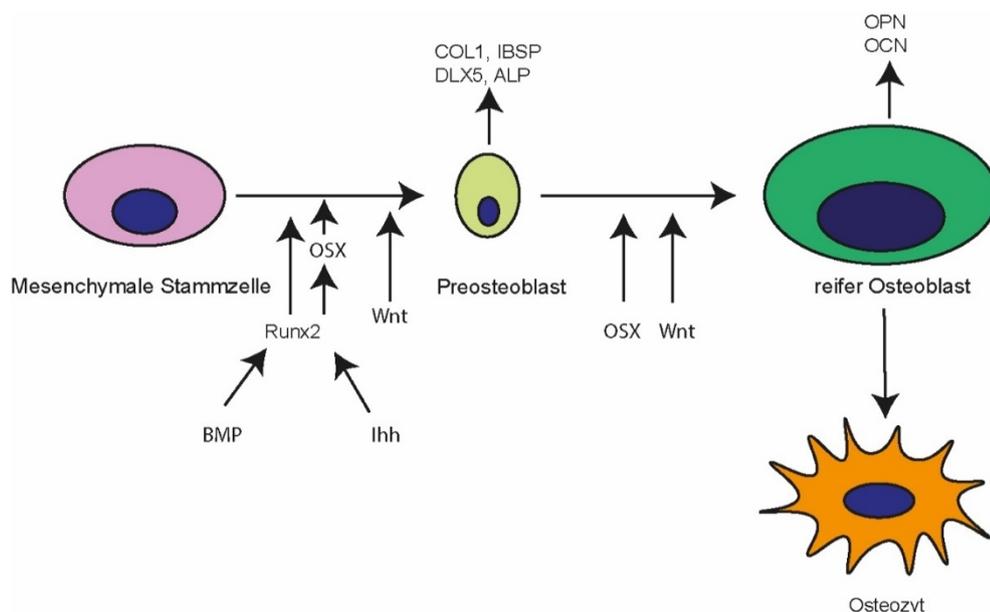


Abbildung 1: Entwicklung der mesenchymalen Stammzelle zum Osteoblasten durch Einfluss von RUNX2 und der Wnt-Signalkaskade.

Zunächst erfolgt die durch RUNX2, OSX und Wnt-vermittelte Differenzierung der hMSC zu einem Präosteoblasten. Während der weiteren Entwicklung zum reifen Osteoblasten werden die Matrixproteine IBSP, Col1, ALP und DLX5 exprimiert. Die reifen Osteoblasten exprimieren zusätzlich OCN und OPN. Von Gewebe umgebene Osteoblasten entwickeln sich zu Osteozyten. Diese sind für den Austausch von Stoffwechselprodukten sowie die Zell-Zell-Kommunikation verantwortlich. Abkürzungen: BMP (Bone morphogenetic protein), RUNX2 (Runt related transcription factor 2), OSX (Osterix), COL1 (Kollagen Typ 1), DLX5 (distal-less homeobox 5), IBSP (Bone sialoprotein), ALP (Alkalische Phosphatase), OPN (Osteopontin), OCN (Osteocalcin).

Der erste Entwicklungsschritt wird von RUNX2 eingeleitet, einem Transkriptionsfaktor, der die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu Präosteoblasten steuert. Zusätzlich aktiviert RUNX2 den Transkriptionsfaktor Osterix (OSX), welcher die Expression vieler Matrixproteine und Transkriptionsfaktoren wie Kollagen Typ 1, DLX5 (distal-less homeobox 5), Osteopontin, Osteocalcin, alkaline Phosphatase oder Bone Sialoprotein (IBSP) und die weitere Entwicklung zu adulten Osteoblasten lenkt (Bruderer et al., 2014; Sinha and Zhou, 2013; Wysokinski et al., 2015).

Während der Entwicklung der Vorläuferzellen zu Präosteoblasten kommt es zu einer Hochregulierung von IBSP und Kollagen Typ 1 sowie bereits zu einem leichten Anstieg der Alkalinen Phosphatase. Das nicht-kollagene Protein IBSP ist ein Bestandteil mineralisierter Gewebe, wie zum Beispiel Knochen und kalzifiziertem Knorpel und wird von Preosteo- und Osteoblasten gebildet (Aubin, 1998; Aubin and Turksen, 1996; Clarke, 2008). Kollagen Typ I ist Teil einer Gruppe von Strukturproteinen, welche ein

Einleitung

Bestandteil von Bindegewebe und extrazellulärer Matrix sind. Kollagen Typ I ist das am häufigsten im menschlichen Körper vertretene Protein der Gruppe und kommt vor allem in der Haut, in Knochengewebe, Sehnen und Bändern vor (Welsch U., 2018). Im Knochen wird es RUNX2-vermittelt von den Osteoblasten gebildet (Clarke, 2008; Kern et al., 2001; Sandberg et al., 1988). Insgesamt sind bis zu 28 verschiedene Kollagentypen bekannt, die unter anderem in Knorpel, der Basallamina und der Haut vorkommen (Welsch U., 2018). Zusätzlich exprimieren die Präosteoblasten das Protein DLX5 (distal-less homeobox 5), welches von Ihh neben RUNX2 in diesem frühen Stadium der osteogenen Differenzierung aktiviert wird (Neman et al., 2012). Die Alkaline Phosphatase (ALP) wird als eines der ersten Enzyme während der Einleitung der Mineralisierungsphase exprimiert und spielt durch die Hydrolysierung von anorganischem Pyrophosphat in Phosphat für die Knochenmineralisierung eine große Rolle, da hierdurch der Einbau von Hydroxyapatit ermöglicht wird (Delgado-Calle et al., 2011).

Entwickeln sich die Präosteoblasten weiter zu adulten Osteoblasten kommt es während des Abschlusses der Differenzierung und während der Mineralisierungsphase zusätzlich zu einer Hochregulation von Osteocalcin (OCN), und Osteopontin (OPN). Osteocalcin gilt als spezifischer Marker für Osteoblasten und wird während der Mineralisationsphase post-proliferativer Osteoblasten exprimiert. Die Höhe der Expression unterscheidet sich je nach Knochen- und Zellalter sowie den Umgebungsbedingungen (Aubin, 1998; Groot et al., 1986). Osteopontin ist ebenfalls ein regulierendes Protein der Knochenmineralisierung und spielt ebenfalls eine Rolle bei der Osteoklastenrekutierung (Chen et al., 1993; Denhart and Guo, 1993). Manche Osteoblasten werden von der neu entstehenden Knochenmatrix eingeschlossen und entwickeln sich zu Osteozyten (Dudley and Spiro, 1961). Inaktive Osteoblasten bilden eine flache Schicht an der Oberfläche des Knochens und schützen ihn so vor dem Abbau durch Osteoklasten (Freemont, 1993).

1.2.2. Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige, knochenresorbierende Zellen (Dudley and Spiro, 1961). Sie entwickeln sich aus mononukleären Vorläuferzellen der hämatopoetischen Monozyten-Makrophagen-Linie. Die Osteoklastogenese wird durch den Wachstumsfaktor CSF-1 (Koloniestimulierender Faktor 1) sowie das Transmembranprotein RANK (Receptor Activator of NF- κ B) und seinen durch Osteoblasten und Osteozyten

Einleitung

sezernierten Liganden (RANKL, Receptor Activator of NF- κ B Ligand) gesteuert (William J. Boyle et al., 2003). Zusammen aktivieren CSF-1 und RANKL die Expression von Genen wie Cathepsin K (CATK), tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP) und β_3 -Integrin, welche die Entwicklung der Osteoklasten fortführen und eine Rolle bei der Knochenresorption spielen (Lacey et al., 1998; William J. Boyle et al., 2003).

Im Gegensatz hierzu steht das ebenfalls von Osteoblasten exprimierte Osteoprotegerin, welches die Differenzierung der Osteoklasten hemmt. Hiermit wird ein Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten und somit zwischen Knochenauf- und Knochenabbau sichergestellt (Roodman, 1999; William J. Boyle et al., 2003). Dadurch spielen die Osteoklasten eine große Rolle beim Remodelling des Knochens (Clarke, 2008). Remodelling beschreibt die Kontrolle der Knochenmasse durch die Balance zwischen der Aktivität der Knochenresorption durch Osteoklasten und des Knochenaufbaus durch Osteoblasten.

Zusätzlich spielen Osteoklasten eine Rolle bei der Regulation des Calciumhaushaltes des Organismus, indem sie durch Signale, u.a. von Parathormon, Calcium aus dem Knochen freisetzen. Ebenso haben sie durch das Abtragen nekrotischer Knochenanteile einen Anteil an der Frakturheilung (Harada and Rodan, 2003; Kanczler and Oreffo, 2008). Lokalisiert sind die Zellen in von ihnen selbst erschaffenen Aushöhlungen des Knochens (Abbildung 2). An den Stellen, an denen die Osteoklasten Kontakt zur Knochenoberfläche haben, zeigen sich in Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop herausgelöste Fragmente mineralisierten Kollagens sowie Hydroxylapatits (Dudley and Spiro, 1961). Diese Herauslösung des Knochenmaterials erfolgt durch die Schaffung eines stark säurehaltigen Milieus, welches dadurch zur Dekalzifizierung des Knochens beiträgt (Blair et al., 1989; Freemont, 1993).

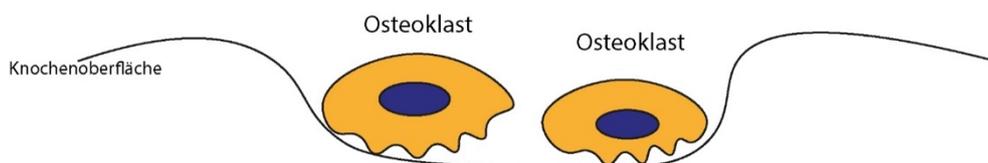


Abbildung 2: Osteoklasten in den von ihnen erschaffenen Knochenaushöhlungen.

Nach der Differenzierung der Präosteoklasten zu adulten Osteoklasten nehmen diese Kontakt zur Knochenoberfläche auf und beginnen durch Erschaffung eines stark säurehaltigen Milieus mit der Herauslösung des Knochenmaterials. Hierdurch entstehen Knochenaushöhlungen.

1.2.3. Osteozyten

Osteozyten sind die am häufigsten vorkommende Zellart des Knochengewebes (Buenzli and Sims, 2015; Knothe et al., 2004; Welsch U., 2018). Sie entwickeln sich aus Osteoblasten, die von neu gebildetem Knochenmaterial eingebaut wurden (Dudley and Spiro, 1961). Während ihrer Transformation verlieren sie die typische, eher runde Form der Osteoblasten und entwickeln sternförmige Ausläufer. Dabei verlieren sie auch einen Großteil ihres Volumens. (Knothe et al., 2004). Die sie umgebenden Hohlräume werden Lakunen genannt. Die einzelnen Osteozyten sind durch ein System aus feinsten Kanälchen miteinander verbunden. Hierüber kommt es zu einem Austausch von Stoffwechselprodukten und über sogenannte Gap Junctions zur Kommunikation der Zellen miteinander (Doty, 1981). Osteozyten dienen als Mechanosensoren und spielen über das lakunokanalikuläre Netzwerk eine Rolle bei der Regulierung des Knochenauf- bzw. -abbaus, indem sie die Osteoblastenrekrutierung mittels Sclerostin hemmen und Osteoklasten über den RANK/RANKL/OPG-Signalweg aktivieren. (Aarden et al., 1996; Rupp, M., 2018). Im Gegensatz zu Osteoblasten und Osteoklasten sind Osteozyten sehr langlebig und haben eine mittlere Lebenserwartung von 25 Jahren, sofern sie nicht vorher von Osteoklasten abgebaut werden (Knothe et al., 2004). Die Anzahl toter Osteozyten steigt mit dem Lebensalter an. Hier wird vor allem bei Frauen in der Menopause ein Zusammenhang mit den sinkenden Östrogenleveln vermutet (Tomkinson et al., 1997).

1.3. Besonderheiten des gealterten Knochens

Die Knochenalterung geht einher mit einem Verlust von Knochenmasse sowie einer verminderten Knochensteifigkeit (Parfitt et al., 1983). Dies führt zu einem erhöhten Frakturrisiko (Chan and Duque, 2002). Zurückgeführt werden diese Veränderungen auf eine veränderte Balance zwischen dem Knochenaufbau und dem Knochenabbau. Hierfür wird eine sinkende Anzahl an osteogenen Stamm- bzw. Vorläuferzellen und somit Osteoblasten verantwortlich gemacht (Manolagas, 2000; Zhang et al., 2008). Es kommt hierdurch zu einem Knochenumbau, welcher zu einer Reduktion sowohl des trabekulären als auch des kortikalen Knochens führt (Mgeough and Barker, 1993; Parfitt et al., 1983). Dies resultiert in einem biologischen Ungleichgewicht des gealterten Knochens. Diab et al. zeigten, dass das Knochengewebe älterer Menschen bei Dauerbelastung eher zu einer Bildung von linearen Mikrorissen neigte, die mit

Einleitung

Knochenfrakturen assoziiert sind, während jüngere Menschen bei Belastung diffuse Schädigungen des Knochens zeigten, welche eine energieabsorbierende und frakturpräventive Wirkung besitzen (Diab et al., 2006). Bei Frauen spielt zusätzlich das Eintreten der Menopause eine Rolle, welche mit einer verminderten Östrogensekretion zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität und damit zu vermehrtem Knochenabbau führt (Manolagas et al., 1995). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es im Alter zu einer verminderten Anzahl von mesenchymalen Stamm- und osteogenen Vorläuferzellen im Knochenmark kommt (Garvin et al., 2007; Muschler et al., 2001; Nishida et al., 1999). In einigen experimentellen Laborstudien konnte dargestellt werden, dass die verminderte Anzahl von Zellen teilweise mit einer verminderten Qualität der Zellen einhergeht. Die höchste Anzahl an ALP-positiven Kolonien konnte bei Kindern im Alter unter 10 Jahren nachgewiesen werden. Diese Anzahl sank mit steigendem Alter immer weiter ab (Nishida et al., 1999). Auch die Proliferationsstärke sowie die Fähigkeit zur osteogenen und adipogenen Differenzierung der isolierten mesenchymalen Stammzellen nimmt mit zunehmendem Alter ab. Zusätzlich kam es zu einer veränderten Zellmorphologie (Zaim et al., 2012). Allerdings gibt es dem entgegenstehend Studien, welche zwar eine verminderte Anzahl aspirierter Zellen im Alter zeigten, jedoch nach 24 Stunden Inkubationszeit die gleiche Anzahl Zellen wie bei jüngeren Patienten adhäriert war. Auch zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der gebildeten ALP-positiven Kolonien (Muschler et al., 2001).

1.4. Physiologie des Knochenumbaus

1.4.1. Physiologischer Knochenumbau „Bone Remodelling“

Jeder Knochen des menschlichen Körpers unterliegt einem andauernden physiologischen Knochenumbau, der darin besteht, altes Knochenmaterial durch neues zu ersetzen. Der Knochenumbau basiert auf einer Interaktion verschiedenster Faktoren. Die Funktion der einzelnen Knochenzellen wurde unter Abschnitt 1.2 bereits erläutert. Remodelling führt zu einer besseren Anpassung an die Einwirkung biomechanischer Kräfte, sowie zu einer Reparatur aufgetretener Schäden wie Mikrofrakturen oder -rissen und damit zu einer Erhaltung der Knochenstabilität. Das Remodelling verläuft in vier verschiedenen Phasen.

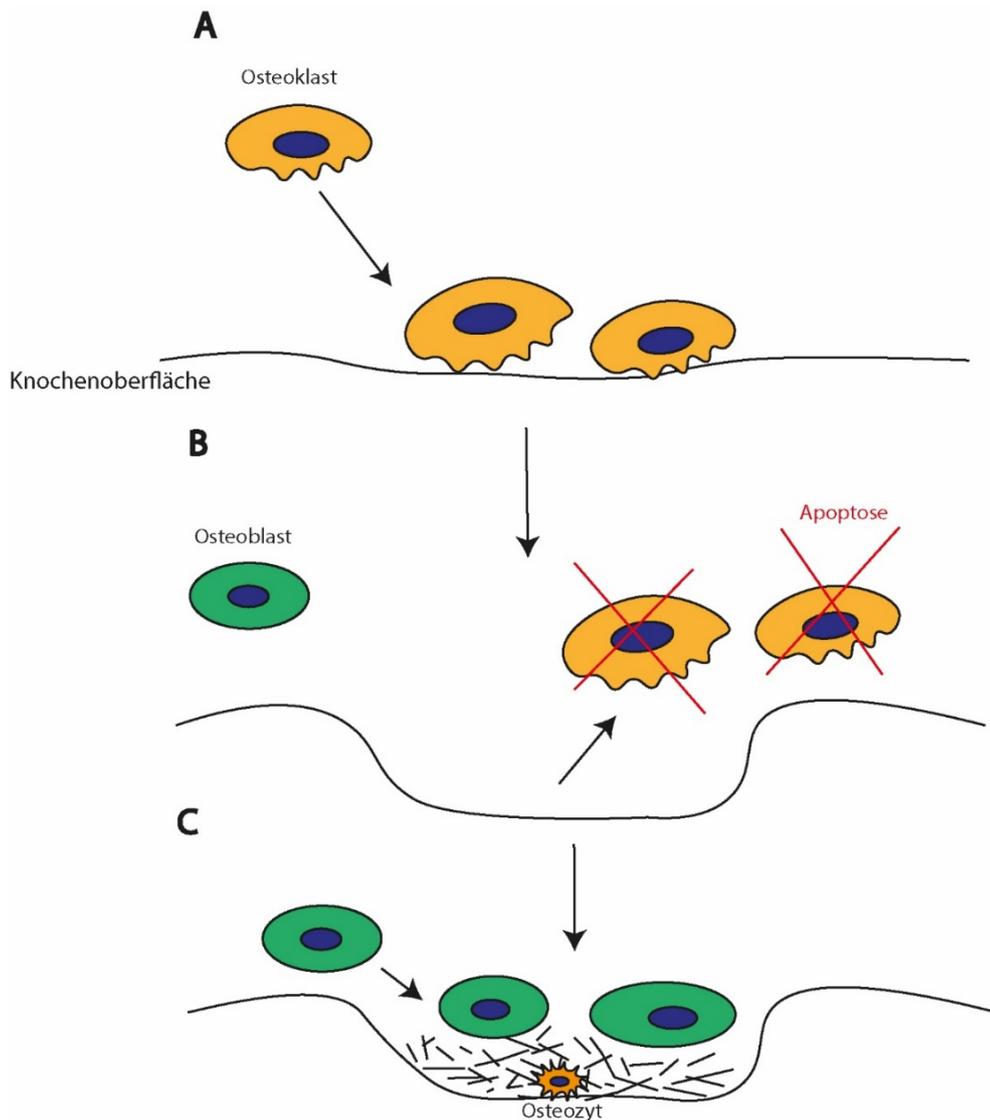


Abbildung 3: Bone Remodelling.

Osteoklasten binden sich an die Knochenoberfläche und führen zu einer Dekalzifizierung und Resorption des alten Knochens (A). Nach Abschluss der Resorptionsphase gehen die Osteoklasten in Apoptose und Osteoblasten wandern in die gebildete Knochenlücke ein (B). Nun erfolgt die Neusynthese von kollagenem Material und damit die Knochenneubildung. Eingeschlossene Osteoblasten werden zu Osteozyten (C).

Zunächst kommt es zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen (Roodman, 1999). Diese werden zu Preosteoklasten, welche sich an die Knochenmatrix binden. Dies erfolgt über eine Interaktion membranständiger Integrine mit Peptiden der Knochenoberfläche (William J. Boyle et al., 2003). Nach der RANKL-vermittelten Fusion und Weiterentwicklung zu Osteoklasten erfolgt dann die Knochenresorption (William J. Boyle et al., 2003). Diese dauert in der Regel zwei bis vier Wochen (Clarke, 2008). Nach Abschluss der Resorption gehen die Osteoklasten

Einleitung

in Apoptose (Aubin and Bonnelye, 2000). Noch während des Abschlusses der Resorptionsphase kommt es zu einer Rekrutierung von Präosteoblasten. Diese wandern in die gebildete Knochenlakune ein und synthetisieren nach der Weiterentwicklung zu Osteoblasten die neue kollagene, mineralisierte Matrix. (Clarke, 2008; Knothe et al., 2004). Im Gegensatz zur relativ kurzen Dauer der Knochenresorption dauert der komplette Knochenaufbau mindestens 3-6 Monate (Clarke, 2008; Harada and Rodan, 2003). Abbildung 3 fasst das Bone Remodelling noch einmal zusammen.

1.4.2. Frakturheilung

Nach einer Knochenfraktur muss das ursprüngliche Gewebe bestmöglich wiederhergestellt werden, um eine erneute Stabilität des Knochens zu gewährleisten (Einhorn, 1998). Man unterscheidet die primäre und die sekundäre Knochenheilung. Die primäre Knochenheilung findet vor allem in der Kortikalis statt, dafür müssen die beiden Knochenenden direkten Kontakt haben. Hierzu wird in der Regel eine operative interne Knochenfixation benötigt. Die sekundäre Knochenheilung erfolgt durch eine Reaktion des Periosts. Durch mesenchymale Stammzellen und osteogene Vorläuferzellen kommt es hier zu einer enchondralen Knochenbildung und intramembranösen Ossifikation (Einhorn, 1998).

Es gibt verschiedene Heilungsphasen (Abbildung 4), welche sich in ihrer zeitlichen Dauer deutlich unterscheiden (Garcia and Raschke, 2014; Niethard et al., 2017). Initial kommt es zur Bildung eines Hämatoms und zu einer Entzündungsreaktion. Die Aufgabe des Hämatoms und der Entzündungsreaktion ist die Freisetzung von Signalmolekülen und Zytokinen wie TGF13 (Transformierender Wachstumsfaktor 13), IL (Interleukin) 1 und 6 sowie verschiedene BMPs, die die weiteren Stufen der Knochenheilung regulieren (Barnes et al., 1999). Dies passiert innerhalb von Stunden (Niethard et al., 2017). Über die nächsten Tage folgt die Kallusbildung mit Einsprossung von Blutgefäßen und die Bildung von Knorpelgewebe. Durch die Kalzifizierung des Knorpels nach ca. 3-6 Wochen, den Umbau zu Knochengewebe innerhalb von 3 Monaten und den weitergehenden Knochenumbau, welcher mindestens 6 Monate benötigt, wird die Heilung abgeschlossen. Nach 6 Wochen bis 3 Monaten kann der frakturierte Knochen wieder voll belastet werden. In unserer Studie wurde das Zellwachstum über 8 Wochen beobachtet.

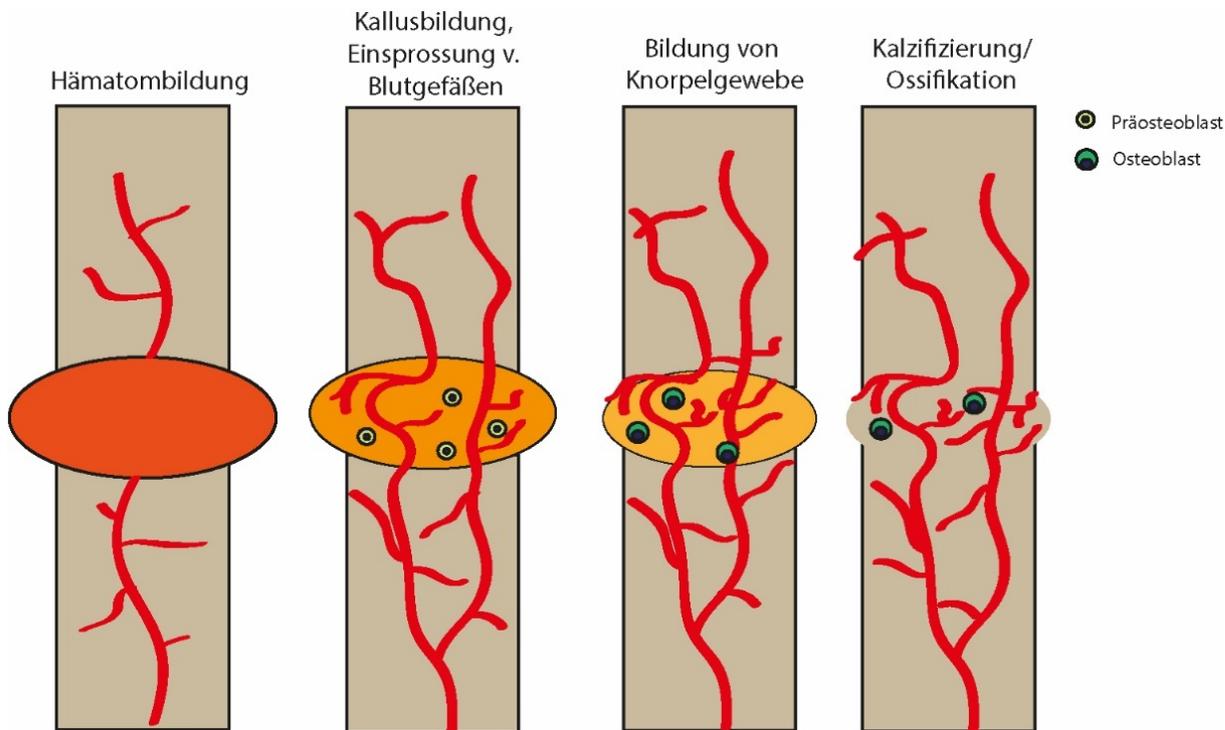


Abbildung 4: Sekundäre Frakturheilung.

Nach der Bildung eines Hämatoms und der Entstehung einer Entzündungsreaktion kommt es initial zu einer Kallusbildung an der Frakturstelle. Durch Einsprossung von Blutgefäßen und durch Migration von osteogenen Zellen kommt es zunächst zu einer Knorpelbildung und dann zu einer zunehmenden Kalzifizierung des neu gebildeten Gewebes.

1.5. Knochentransplantate und Knochenersatzmaterial

1.5.1. Geschichte

Es gibt verschiedene Arten von Knochentransplantaten und Knochenersatzmaterial. Man unterscheidet heute fünf Hauptgruppen. Autologe Knochentransplantate stammen vom Patienten selbst, zum Beispiel aus dem Beckenkamm. Allogenes Knochenmaterial wurde von anderen Menschen gewonnen, während xenogenes Material von einer anderen Spezies, zum Beispiel vom Schwein oder Rind stammt. Zusätzlich gibt es noch synthetisches und alloplastisches Knochenersatzmaterial (Garcia et al., 2014). Der erste dokumentierte Einsatz von Knochentransplantaten wurde 1668 von dem niederländischen Chirurgen Job van Meekeren durchgeführt. Er ersetzte einen verletzten Schädelteil eines Soldaten mit dem Schädelknochen eines

Einleitung

Hundes (Meekeren, 1668). Die ersten Beschreibungen der Osteogenese und Frakturheilung durch Kallusbildung wurden von Antonius de Heyde und 60 Jahre später von Henri-Louis Duhamel du Monceau durchgeführt (Chase Samuel W.; Herndon, 1955; de Boer, 1988). 1867 zeigte Louis Ollier die Überlebensfähigkeit von Autografts in passender Umgebung durch Implantierung von Knochenfragmenten ohne Periost (Caton and Vialar, 2009; de Boer, 1988). 1893 beschrieben A. Barth und B. Curtis die Leitschienenfunktion des transplantierten Gewebes sowie die Bedeutung der Havers'schen Kanäle für das Einwachsen des Knochentransplantates (Barth, 1893; Curtis, 1893). Philipp von Walther führte 1820 in Deutschland die erste Implantation von autogenen Knochentransplantaten durch. Hierfür setzte er eine für eine Trepanation entfernte Knochenscheibe nach der Prozedur wieder ein. Ein Teil des wiedereingesetzten Knochens wurde nekrotisch, dennoch gelang ein kompletter knöcherner Verschluss des Schädels. (Walter, Ph., 1821). Indem er einen infizierten Oberarmknochen eines Kindes mit Teilen der Tibia an Rachitis erkrankter Kinder ersetzte, führte William Macewen 1880 die erste erfolgreiche Allograft-Implantation durch. Teile des eingesetzten Knochentransplantates entzündeten sich, es gelang aber trotzdem einen funktionsfähigen neuen Oberarmknochen wachsen zu lassen (Macewen, 1881). Die Verwendung erster synthetischer Knochenersatzmaterialien wurde ab 1951 beschrieben (Garcia et al., 2014). Nachdem in den folgenden Jahren viel über Ursachen der Regenerationsfähigkeit diskutiert wurde, beschrieb M. Urist 1953 die Theorie der Osteoinduktion. Er vermutete, dass eine chemische Komponente des implantierten Knochens für die Rekrutierung von osteogenen Zellen verantwortlich war (Brand, 2008). Tabelle 1 fasst die Geschichte der Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien nochmals zusammen.

Tabelle 1: Geschichte der Knochenersatzmaterialien.

Jahr	Autor	Entdeckung	Zitate
1668	Job van Mekeeren	Ersatz eines Schädelteils mit dem Schädelknochen eines Hundes	(Meekeren, 1668)
1682	Antonius de Heyde	Beschreibung der Osteogenese	(Chase Samuel W.; Herndon, 1955)
1739	Duhamel du Monceau	Osteogenese und Kallusbildung	(de Boer, 1988)
1867	Luis Ollier	Implantierung von Knochenfragmenten ohne Periost	(Caton and Vialar, 2009; de Boer, 1988)
1893	Arthur Barth B. Farquhar Curtis	Leitschienenfunktion des transplantierten Gewebes und Bedeutung der Havers'schen Kanäle	(Barth, 1893; Curtis, 1893)
1820	Phillipp von Walter	Implantation von autogenem Knochenersatzmaterial	(Walter, Ph., 1821)
1880	William Macewen	Allograft-Implantation	(Macewen, 1881)
1951	Ray RD	Verwendung von synthetischem Knochenersatzmaterial	(Garcia et al., 2014)
1953	Marshall Urist	Theorie der Osteoinduktion	(Brand, 2008)

1.5.2. Aktueller Stand

Autogene Knochen transplantation wird heutzutage hauptsächlich zur Verbesserung der Knochenheilung, zum Beispiel bei Pseudarthrosen oder zur Rekonstruktion kleiner Knochen defekte, verwendet (Garcia et al., 2014). Größere Knochen defekte können mittels allogenen Knochen material versorgt werden (de Boer, 1988). Um allogene Knochen transplantationate verwenden zu können, wird das Gewebe speziell behandelt,

Einleitung

unter anderem erfolgt eine Deproteinierung, um eine zelluläre und humorale Immunreaktion sowie die Übertragung von Infektionskrankheiten beim Empfänger zu vermeiden. Der historische Überblick unter 1.5.1 zeigt zwar, dass es auch ohne diese Behandlung gelingen kann, allogen Material zu verwenden, die Wahrscheinlichkeit des Gelingens wird aber durch die oben genannte Behandlung deutlich erhöht. Aufgrund der Dezellularisierung besitzen Allografts kein osteogenes Potential. Das osteoinduktive und osteokonduktive Potential hängt von der Art und Prozessierung des Allografts ab (Bauer and Muschler, 2000). Zusätzlich werden vermehrt synthetisch hergestellte Knochenersatzstoffe verwendet. Idealerweise sollten diese sowohl osteoinduktive als auch osteokonduktive Eigenschaften besitzen. Es wird vermutet, dass die osteoinduktiven Eigenschaften erst durch die Aufnahme von Wachstumsfaktoren wie BMPs aus dem Blut des Empfängers erlangt werden. Das synthetische Material besteht meistens aus anorganischen Ersatzstoffen, bestehend aus Calcium-Phosphat-Salzen wie Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat, angeboten als Keramiken, Zemente oder knetbare Pasten (Garcia et al., 2014). Zusätzlich gibt es organische Ersatzstoffe. Hier werden synthetische Polymere von den biologischen, allogenen bzw. xenogenen Ersatzstoffen unterschieden. Die Polymere sind abbaubar und bestehen zumeist aus aliphatischen Polyestern. Sie werden zum Beispiel als Schrauben oder Platten eingesetzt (Schieker et al., 2008).

1.6. Ziel der vorliegenden Arbeit

1.6.1. Vergleich des osteogenen und proliferativen Potentials von hMSCs aus autologen Knochentransplantaten des Beckenkamms und der proximalen Tibia

Die derzeit am häufigsten genutzte Entnahmestelle für autologe Knochentransplantate ist der Beckenkamm, welcher historisch bedingt, aber auch aufgrund des ausreichenden Vorhandenseins von hMSCs und der Möglichkeit zur Entnahme großer Mengen an Spongiosa als „Goldstandard“ bezeichnet wird (Egol et al., 2015; Sen and Miclau, 2007). Leider ist die Entnahme mit einem relativ hohen Risiko an Komorbiditäten und Komplikationen behaftet (Fernyhough et al., 1992; Kreibich et al., 1994; Kurz et al., 1989). Als alternative Entnahmestelle kommt unter anderem die proximale Tibia in Betracht (Cove and Keenan, 2009; Raikin and Brislin, 2005; Veis et al., 2009). Hier besteht neben einer leichteren operativen Erreichbarkeit der Entnahmestelle auch ein erheblich niedrigeres Komplikationsrisiko. Ein Mangel an

Material und Methoden

Evidenz zur osteogenen Potenz von an der proximalen Tibia gewonnenen hMSCs bremsst eine breitere klinische Nutzung dieser alternativen Entnahmestelle. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluß der Entnahmestelle auf das osteogene und proliferative Potential von hMSCs aus autologen Knochentransplantaten des Beckenkamms und der proximalen Tibia systematisch zu untersuchen.

1.6.2. Vergleich des osteogenen und proliferativen Potentials von hMSCs aus autologen Knochentransplantaten von jungen und älteren Patienten

Die Studienlage zum Einfluß des Patientenalters auf die proliferative Potenz und die osteogene Differenzierungskapazität von hMSCs des Beckenkamms ist heterogen und teilweise widersprüchlich (Bellantuono et al., 2009; Muschler et al., 2001; Nishida et al., 1999; Zaim et al., 2012). Vergleichende Analysen zum Einfluss des Patientenalters auf diese biologischen Eigenschaften von hMSCs der proximalen Tibia existieren bis dato nicht. Um Chancen und Limitationen der klinischen Verwendung von autologen Knochentransplantaten mit Entnahme an der proximalen Tibia im älteren Patienten besser einschätzen zu können, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine vergleichende Analyse des osteogenen und proliferativen Potentials von hMSCs aus autologen Knochentransplantaten von jungen und älteren Patienten erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1. Ethische Stellungnahme

Die Entnahme des Spendermaterials und Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Ethikantrag Nr. 238-15). Alle eingeschlossenen Spender waren mindestens 18 Jahre alt und stimmten der Teilnahme an dieser Studie schriftlich zu. Weiterhin wurden nur Teilnehmer eingeschlossen, welche negativ auf HIV (humanes Immundefizienzvirus), HBV (Hepatitis B Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) getestet worden waren. Die Knochenmaterialentnahme wurde jeweils von einem Facharzt der Orthopädie und Unfallchirurgie unter Einhaltung aktueller chirurgischer Standards während einer von dem Patienten unabhängig von dieser Studie benötigten Operation durchgeführt.

2.2. Herkunft der Primärzellen und Spender

Für die durchgeführten Experimente wurde Knochenspongiosa von insgesamt 53 Spendern aus dem Beckenkamm oder der proximalen Tibia gewonnen. Pro Entnahmestelle wurden die Spender entsprechend ihres Alters in jeweils eine sogenannte junge (18-49 Jahre) und ältere (≥ 50 Jahre) Gruppe unterteilt. Pro Gruppe wurden Zellen von mindestens 10 Spendern isoliert.

2.3. Operative Methoden

2.3.1. Beckenkamm

Um Knochenmaterial aus dem Beckenkamm zu gewinnen, kommen zwei potentielle Zugänge, ein anteriorer und ein posteriorer, in Betracht. Der Hautschnitt für den anterioren Zugang erfolgt 1-2 cm dorsal der Spina iliaca anterior superior. Dies ist nötig um den Nervus cutaneus femoralis lateralis zu schützen, der medial der Spina iliaca anterior superior verläuft. Beim posterioren Zugang erfolgt der Hautschnitt über bis leicht lateral des posterioren Beckenkamms. Damit verläuft er parallel zu den zu schonenden Nervi cunealis superiores. Nach dem Hautschnitt über dem Beckenkamm werden die Faszie und die abdominellen bzw. glutealen Muskeln teilweise durchtrennt, um den Zugang zum Knochen zu ermöglichen. Mittels eines Osteotoms wird die Kortikalis des Knochens gefenstert um Zugang zur Spongiosa zu erhalten. Die Entnahme der Knochenspongiosa erfolgt zum Beispiel mittels eines scharfen Löffels oder einem Meißel. Nach der Entnahme des Knochenmaterials wird die Wunde schichtweise verschlossen.

2.3.2. Proximale Tibia

Zur Knochenspanentnahme aus der Tibia wird eine Inzision über dem Gerdy'schen Tuberculum (Tuberositas tractus iliotibialis) durchgeführt. Der Kortex wird mittels Osteotom gefenstert und das herausgeschnittene Kortikalisstück in steriler Kochsalzlösung aufbewahrt. Hierbei muss ein Sicherheitsabstand zu den Gelenkflächen der Tibia gewährleistet sein. Die Spongiosaentnahme erfolgt mittels chirurgischen Küretten aus der Metaphyse der Tibia. Nach Abschluss der Entnahme wird das vorher gefensterte Kortikalisstück wieder in die Lücke eingesetzt und die Wunde mit zwei Schichten verschlossen.

2.4. Zellisolation und Zellkultur

Die Zellisolation aus der Knochenspongiosa erfolgte zunächst durch dreimaliges Waschen des gewonnenen Materials mit sterilem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Merck, Deutschland). Nach den Waschschrritten wurde das trabekuläre Knochenmaterial in 260 u/ml Kollagenase II (Kollagenase Typ 2 CLS 2, 260 u/mg, Worthington Biochemical, USA) aufgelöst in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (1x) + GlutaMAX-I, (Thermo Scientific, USA), dreimal für je 10 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank unter stetigem Schwenken enzymatisch verdaut. Eine anschließende Homogenisierung mittels Vortexer trennte das Spongiosamaterial weiter auf. Nach jedem Verdauungsschritt wurde die Kollagenase-Zell-Suspension mit den vorher bei den Waschschrritten gewonnenen Zellen wiedervereinigt. Um eine Verunreinigung der Zellsuspension mit Knochenfragmenten zu vermeiden, erfolgte eine Filterung mit einem 100 µm Zellsieb (Fisherbrand, USA).

Nach Abschluss der Verdauungsschritte wurde die Zellsuspension mit 500 g für 5 Minuten zentrifugiert um ein Zellpellet zu bilden. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in α MEM-Zellkulturmedium (α Minimum Essential Medium), bestehend aus MEM alpha Medium (1x) + GlutaMAX-I (α MEM, Thermo Fisher Scientific, USA) mit hitzeinaktiviertem 10% FBS (fetales Kälberserum, Thermo Fisher Scientific, USA) und 1% P/S (Penicillin/Streptomycin, Merck, Deutschland) resuspendiert und in eine T-75 Zellkulturflasche (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA) transferiert. Es erfolgte eine Inkubation der Zellkulturflasche über Nacht im Inkubationsschrank (immer bei 37 °C, 5% CO_2 , 21% O_2 und 95% Luftfeuchtigkeit). Am nächsten Tag wurden die adhärenierten Zellen mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen und Blutrückstände zu entfernen. Nach den Waschschrritten erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen mit dem α MEM-Zellkulturmedium. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich.

2.5. Erfassung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mittels 1x Trypsin/EDTA (Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure, Merck, Deutschland) abgelöst. Nach der kompletten Ablösung der Zellen wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von α MEM-Zellkulturmedium gestoppt, die Zellsuspension mehrfach durchmischt um die Zellen voneinander zu trennen und anschließend in ein Falcon-

Material und Methoden

Röhrchen transferiert. Die Erfassung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Nach der Ermittlung der Zellzahl wurde das Falcon-Röhrchen mit 500 µl für 5 Minuten zentrifugiert. Der das Trypsin enthaltende Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit αMEM-Zellkulturmedium resuspendiert und neu ausplattiert.

2.6. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese wie bereits unter 2.4 beschrieben geerntet und gezählt. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet mit einer Lösung bestehend aus 80% αMEM-Zellkulturmedium, 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Serva, Deutschland) und 10% FBS resuspendiert. Nach der Resuspension wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und diese in Trockeneis eingefroren. Nach dem kompletten Gefrieren der Zellsuspension wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt. Es erfolgte die Vermischung der Zellsuspension mit αMEM-Zellkulturmedium und die Überführung des kompletten Inhalts des Kryoröhrchens in eine T-75 Zellkulturflasche. Die Medien wurden gut vermischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Um das zellgiftige DMSO zu entfernen, wurde das Medium nach der Adhäsion der Zellen am nächsten Tag gewechselt.

2.7. Kumulative Populationsverdopplung

Zur Untersuchung der Proliferationsfähigkeit der isolierten Spenderzellen wurde eine kumulative Wachstumskurve erstellt. Hierfür wurden pro Spender 50.000 Zellen in ein T-25 Zellkulturfläschchen (Nunc, Thermo Fisher Scientific, USA) ausgesät und für 8 Wochen in einem Zellkulturschrank unter den bereits beschriebenen Bedingungen (siehe 2.3) expandiert. Die Zellen wurden wöchentlich gezählt (siehe 2.4) und erneut in einer Konzentration von 50.000 Zellen in einem neuen T-25 Fläschchen ausgesät. Die Populationsverdopplung (PD) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$PD = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2}$$

Dabei ist N_0 die Anzahl der ausgesäten Zellen und N die Anzahl der Zellen nach sieben Tagen Wachstum. Die wöchentlich erreichte Populationsverdopplung wurde über den gesamten Zeitraum kumuliert (cumPD).

2.8. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Eine weitere Untersuchung der Proliferationskapazität der isolierten Zellen erfolgte über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (Colony Forming Units (CFU)-Assay). Hierfür wurden 700 Zellen in eine 10 cm Zellkulturschale (Falcon Corning, USA) ausgesät und für 7 Tage in einem Zellkulturschrank inkubiert.

Im Anschluss wurden die gewachsenen Kolonien mit NBT/BCIP (Nitroblau-tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) gefärbt um die ALP-Aktivität der Zellen darzustellen und gleichzeitig die Kolonien zu markieren. ALP ist ein bekannter Marker für osteogene und mesenchymale Stammzellen (Golub et al., 1992; Sacchetti et al., 2007). Hierfür wurde das Zellkulturmedium aus der Schale entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 4% PFA (Paraformaldehyd in PBS) für 60 Sekunden bei Raumtemperatur fixiert. Als nächstes wurden die Zellen dreimal mit 1M Tris/HCl-Puffer gewaschen. Währenddessen wurde die 2xNTMT-Lösung, bestehend aus 6,25 ml 4 M NaCl, 25 ml 1 M TrisHCl (pH9,5), 12,5 ml 1 M MgCl₂, 2,5 ml 10% Tween-20 (Polysorbat 20) und 78 ml dH₂O, hergestellt. Die Zellen wurden zweimal für 5 Minuten mit 1xNTMT (2xNTMT 1:1 mit ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) verdünnt) inkubiert und zuletzt für 10 Minuten mit der Färbelösung, bestehend aus 2xNTMT, PVA (Polyvinylalkohol, Sigma-Aldrich, M_w 31.000-50.000, 98-99% hydrolysiert) und NBT/BCIP, bedeckt. Bei erfolgreicher Enzymreaktion färben sich die ALP-exprimierenden Zellen lila. Um die Färbereaktion zu beenden, wurden die Zellen zweimal mit ddH₂O gewaschen. Die Zellkulturschalen wurden bei Raumtemperatur getrocknet und die gefärbten Kolonien danach unter dem Stereomikroskop (Zeiss) durch Zählen aller Kolonien mit mehr als 8 Zellen quantifiziert.

2.9. Metabolische Aktivität

Zur Darstellung der metabolischen Zellaktivität wurde ein WST-Assay (wasserlösliches Tetrazoliumsalz-Test) durchgeführt. Hierfür wurden 5.000 Zellen/Well in eine 24-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 1 ml WST-Lösung, bestehend aus WST-1-Reagenz (Roche, Deutschland) mit α MEM-Zellkulturmedium im Verhältnis 1:10 vermischt, in jedes Well. Die Zellen wurden nun 4 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit fand ein Verstoffwechslungsprozess des Reagenzes durch die Zellen statt. Hierbei setzen die Zellen durch

Material und Methoden

mitochondriale Stoffwechselprozesse das oxidierte Tetrazolium-Salz in das reduzierte Formazan um. Dies führt zu einem dunkelroten Farbumschlag des Mediums, welcher photometrisch (Multiskan FC, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm gegen eine neutrale Kontrolle quantifiziert werden konnte.

2.10. Immunocytochemie

Um die Zelltypen, die sich in der Zellkultur befinden, zu bestimmen, wurden typische Zellmarker mittels Immunocytochemie überprüft. Es wurde erwartet, aufgrund der heterogenen Zellpopulation sowohl Marker der mesenchymalen Stammzellreihe als auch osteogene Marker vorzufinden (Aubin and Turksen, 1996; Boxall and Jones, 2012). Die in Tabelle 2 aufgeführten Marker wurden in einer Konzentration von 1:250 verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Zellmarker für die ICC

	Protein (Antikörper)	Gensymbol	Lokalisation
Mesenchymale Stammzellen	Endoglin (mouse anti-CD 105; SN6, abcam, England)	Eng	Zellmembran
	Ecto-5'-Nukleotidase (rabbit anti-CD 73; EPR6114, abcam, England))	Nt5e	Zellmembran
	Thymuszellen-Antigen 1, (goat anti-CD 90; K-16, Santa Cruz, USA)	Thy1	Zellmembran
Osteoblasten	Integrinbindenes Sialoprotein (rabbit anti-ibsp; AB1854, Millipore, Merck, Deutschland)	ibsp	Zellmembran und extrazellulär

Material und Methoden

Pro Spender wurden zwei verschiedene Antikörper-Mischungen verwendet. Eine Mischung bestand aus den mesenchymalen Zellmarkern anti-CD 105, anti-CD73 und anti-CD90, für die zweite wurde anti-CD 73 durch anti-IBSP ersetzt. Es wurden 10.000 Zellen auf mit Fibronektin (Merck, Deutschland) beschichtete Mikroskop-Objektträger gesät und für einen Tag im Zellkulturschrank inkubiert, um eine ausreichende Zelladhäsion zu ermöglichen. Nach der Fixierung mit 4% PFA (Paraformaldehyd) für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Objektträger für 60 Minuten in einer Blocklösung (Blocking Solution, BS), bestehend aus PBS, 0,1% Tween und 10% hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Antikörpermischungen, wie oben beschrieben, in einer 1:250-fachen Verdünnung mit der BS hergestellt. Nach einer Stunde wurden die Antikörpermischungen auf die Objektträger aufgegeben, mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Mikroskopobjektträger zweimal mit PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. In der Zwischenzeit wurden die sekundären Antikörper (donkey@mouse Alexa488, donkey@rabbit Alexa546, donkey@goat Alexa647; Thermo-Scientific, Deutschland) in einer 1:250-fachen Verdünnung in PBS vorbereitet und nach den Waschschritten auf die Objektträger aufgegeben und mit Parafilm abgedeckt. Daraufhin wurden sie für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Nach der Einwirkzeit wurden die Objektträger wieder mit PBS gewaschen und für eine Minute mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt. DAPI färbt den Zellkern und ist eine sehr zuverlässige Färbelösung, die auch gut zur Orientierung beim Mikroskopieren genutzt werden kann. Nach der DAPI-Färbung erfolgte ein letzter Waschschriff mit PBS, danach wurden die Zellen auf dem Objektträger durch ein Deckglas und ein adhäsives Einschlussmittel geschützt und für 24 Stunden getrocknet. Anschließend wurde die Zellfärbung mit einem Epi-Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver, Zeiss) dokumentiert.

2.11. Osteogene Differenzierung

2.11.1. Osteogene Differenzierung und Färbung

Um die Fähigkeit der Spenderzellen zur osteogenen Differenzierung zu untersuchen, wurden die Zellen mit osteogenem Medium für 7 beziehungsweise 14 Tage stimuliert. Hierbei sollten die Zellen bei einem erfolgreichen Verlauf der Differenzierung

Material und Methoden

extrazelluläre Matrix und Mineralien wie Calciumphosphat produzieren. Das osteogene Medium bestand aus 100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerolphosphat, 50 μ M Ascorbinsäure und DMEM mit 10% FBS und 1% Pen/Strep.

Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, geerntet, gezählt und anschließend pro Spender in zwei 6-Well-Platten (Thermo Fischer Scientific, USA) in einer Konzentration von 30.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Platten wurden bei Standardkulturbedingungen mit α MEM-Zellkulturmedium bis zu einer annähernd 90-100%-igen Konfluenz der Zellen inkubiert. Die osteogene Differenzierung wurde durch Zugabe des osteogenen Mediums in drei Wells pro Platte gestartet. Die anderen drei Wells pro Platte dienten als Kontrolle und wurden mit reinem DMEM-Zellkulturmedium ohne osteogene Zusätze befüllt. Mediumwechsel erfolgten 3, 7 und 10 Tage nach dem Start.

Nach 7 beziehungsweise 14 Tagen wurde jeweils eine Platte jedes Spenders mit Alizarin Rot (AR) gefärbt, um so den Erfolg der osteogenen Differenzierung darzustellen. Alizarin Rot ist ein Färbemittel, welches sich stark an 2-fach positive Ionen bindet.

Zur Herstellung der AR-Färbelösung wurden 500 mg Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, USA) mit 50 ml ddH₂O (zweifach destilliertes Wasser) vermischt und der pH-Wert mithilfe von 10% Ammoniumhydroxid auf einen Wert zwischen 4.1 bis 4.5 eingestellt. Vor dem Färbeschritt wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und danach für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% PFA fixiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit ddH₂O. Nun wurde die AR-Färbelösung sowohl in die Differenzierungs- als auch die Kontroll-Wells gegeben. Nach 20 Minuten Einwirkzeit erfolgten mindestens 4 Waschschriffe mit ddH₂O um das nicht gebundene AR zu entfernen. Nach den Waschschriffen wurden die 6-Well-Platten getrocknet und Mikroskopaufnahmen (Zeiss Axiovert 40 CLF) der nun angefärbten mineralisierten extrazellulären Calciumphosphatmatrix angefertigt.

2.11.2. Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung

Um den Erfolg der osteogenen Differenzierung objektiv messen zu können, musste das Ergebnis der Alizarin Rot-Färbung quantifiziert werden. Es wurde 10% Essigsäure (in ddH₂O) für 30 Minuten in jedes Well gegeben, um die mineralisierte Matrix aufzulösen. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden die Zellen mittels eines Zellkratzers

Material und Methoden

von der Plattenoberfläche abgelöst und die gesamte Essig-Zell-Lösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Der Gefäßinhalt wurde gemischt und die Gefäße anschließend für 10 Minuten in einem Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) auf 85 °C erhitzt um die Zellen zu zersetzen. Direkt im Anschluss folgte eine 5-minütige Abkühlung der Gefäße auf Eis. Anschließend wurden die Behältnisse für 15 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert, um die Zellfragmente von der restlichen Suspension zu trennen. Während der Zentrifugation wurden die Alizarin Rot Standards für die Quantifizierung vorbereitet. Die Verdünnungsreihe für die Standards wurde wie in Abbildung 5 dargestellt hergestellt.

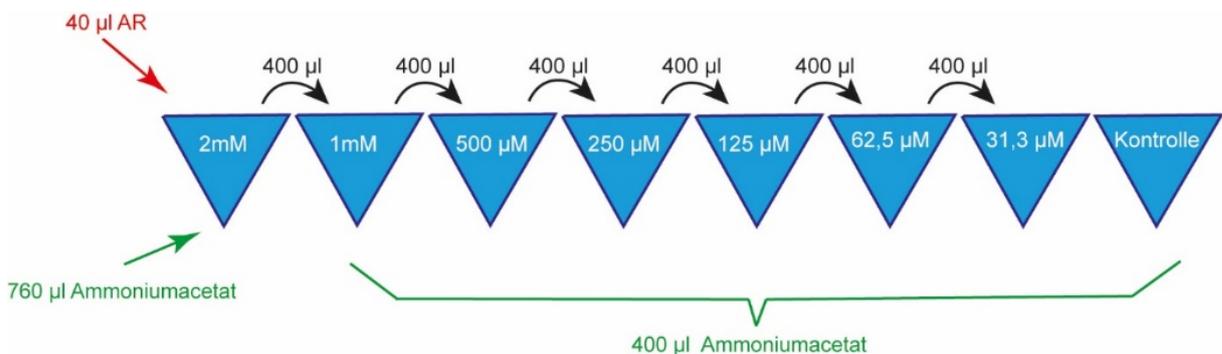


Abbildung 5: Verdünnungsreihe für Alizarin Rot (AR) Standards.

In ein Eppendorf-Gefäß werden 760 µl Ammoniumacetat und 40 µl AR gegeben, dies entspricht einer Konzentration von 2 mM AR. Für die weiteren Verdünnungen werden in 6 weitere Eppendorf-Gefäße jeweils 400 µl Ammoniumacetat vorgelegt und jeweils 400 µl der vorherigen Verdünnung hinzugegeben. So ergibt sich eine jeweils um die Hälfte erniedrigte Konzentration. Als Kontrolle diente ein Eppendorf-Gefäß mit 400 µl reinem Ammoniumacetat ohne AR.

Nach dem Ende der Zentrifugation wurden 375 µl des Überstandes aus jedem Gefäß in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Der pH-Wert wurde mittels Zugabe von 150 µl 10% Ammoniumhydroxid auf einen Wert zwischen 4,0 und 4,5 neutralisiert. Der korrekte pH-Wert wurde mittels pH-Teststreifen kontrolliert. Der Standard und die Proben wurden jeweils in Triplikaten zu je 100 µl in eine 96-Well-Platte überführt und die optische Dichte bei 405 nm mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Multiskan FC, Thermo Fischer Scientific, USA) gemessen und mit der Standardkurve verglichen.

2.12. Chondrogene Differenzierung

Um die chondrogene Differenzierung durchzuführen, wurden die Spenderzellen zunächst für vier Tage unter hypoxischen (2% O₂) Inkubatorbedingungen

Material und Methoden

präkonditioniert. Anschließend wurden jeweils $4,5 \cdot 10^5$ Zellen in v-förmige 96-Well-Platten überführt und für 28 Tage mit einem speziellen Differenzierungsmedium, bestehend aus DMEM - high glucose, $10 \mu\text{M}$ Dexamethason, 1 nM Natrium-Pyruvat, $0,195 \text{ mM}$ L-Ascorbinsäure und 1% Insulin Transferrin Selen (alles Sigma Aldrich), welches zusätzlich mit 10 ng/ml TGF β 1 und 100 ng/ml BMP2 (beides R&D Systems, USA) versetzt wurde, inkubiert. In den v-förmigen Aushöhlungen der Platte sedimentieren die Zellen in einem Pellett ohne an der Plattenwand zu adhären. Der Erfolg der chondrogenen Differenzierung wurde durch die Färbung mit Safranin-Orange überprüft. Hierbei erfolgt eine Anfärbung der in Knorpelgewebe vorhandenen Proteoglykane. Die photographische Dokumentation erfolgte mit der AxioCam ICc3 Farbkamera und dem Axiovert 40 CFL Mikroskop (Carl Zeiss). Die Proteoglykan-Bildung und somit der Erfolg der chondrogenen Differenzierung wurde manuell von drei unabhängigen Untersuchern in 25%-Schritten bewertet.

2.13. Adipogene Differenzierung

Zum Beweis der adipogenen Differenzierungsfähigkeit der osteogenen Vorläuferzellen wurden jeweils $8 \cdot 10^3$ Zellen/cm 2 in 6-Well-Platten ausgesät und in Induktionsmedium für 5 Tage inkubiert. Dieses besteht aus DMEM-high glucose mit 10% FBS, $1 \mu\text{M}$ Dexamethason, $0,2 \text{ mM}$ Indometacin, $0,1 \text{ mg/ml}$ Insulin und 1 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (alles von Sigma-Aldrich, USA). Nach der Induktion erfolgte eine 2-tägige Inkubation in Konservierungsmedium, bestehend aus DMEM-high glucose mit 10% FBS und $0,1 \text{ mg/ml}$ Insulin. Dieser Zyklus wurde für insgesamt 21 Tage wiederholt. Der Erfolg der adipogenen Differenzierung wurde mittels BODIPY-Färbung (Thermo Fisher Scientific, USA) überprüft. Hierbei werden die gebildeten Fettvakuolen angefärbt. Dies ermöglichte die Quantifizierung mittels ImageJ (Schindelin et al., 2012) über den Vergleich der Intensitäts-Schwellenwerte der einzelnen Vakuolen durch eine Extraktion des grünen Farbkanals aus den farbigen Mikroskopbildern. Die Vakuolenfläche errechnete sich über einen Schwellenwert, der zuvor manuell eingestellt worden war, entsprechend dem von Krug et. al verwendeten Protokoll (Krug et al., 2016). Es erfolgte der Vergleich von differenzierten Zellen und nichtdifferenzierten Kontrollen des gleichen Spenders. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis der Fläche mit Fettvakuolen im Vergleich zum Gesamtausmaß der Zelle angegeben.

2.14. RNA-Extrahierung

Für die qPCR-Analyse der einzelnen Spender, musste die RNA aus den Spenderzellen gewonnen werden. Hierfür wurden 50.000 Zellen pro Spender in T-25 Zellkulturflaschen ausgesät, mit Ausnahme der Kontrollen ebenfalls mit dem osteogenen Medium inkubiert und an Tag 0, 7 und 14 der osteogenen Differenzierung geerntet. Die Kontrollflaschen wurden mit reinem DMEM-Zellkulturmedium befüllt.

Um die RNA aus den Zellen zu extrahieren wurde nach Absaugen des Mediums 1 ml Quiazol Lyseflüssigkeit (Qiagen, Deutschland) in die T-25 Zellkulturflaschen gefüllt. Der Zellteppich wurde mithilfe eines Zellkratzers von der Oberfläche abgelöst. Die Zell-Quiazol-Lösung wurde sodann in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert, gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um ein Aufspalten der Zellen zu ermöglichen. Danach erfolgte die Zugabe von Chloroform (1/5 des Initialvolumens) in das Gefäß. Nach erneuter Inkubation wurden die Gefäße für 15 Minuten bei 4 °C mit 14.000 g zentrifugiert. Durch die Zugabe von Chloroform und die Zentrifugation erfolgt die Trennung des Homogenats in eine wässrige und eine organische Phase. Die RNA befindet sich in der wässrigen Phase. 350 µl der wässrigen Phase wurden in ein neues Gefäß überführt. Im nächsten Schritt wurde dieselbe Menge RNase-freien Ethanol zu dem Homogenat gegeben, um eine Präzipitation der RNA zu erreichen. Die weiteren Schritte wurden mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Deutschland) entsprechend des beigelegten Handbuches durchgeführt.

Die extrahierte RNA-Menge und deren Qualität wurde mittels eines Nanodrop-Spektrometers (Thermo Fischer Scientific, USA) gemessen. Hierbei erfolgt die Messung und der Vergleich der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm. Bis zur Weiterverarbeitung der RNA in cDNA (komplementäre DNA) wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

2.15. cDNA und qPCR

2.15.1. cDNA Synthese

Für die Untersuchung von Markergenen mittels qPCR musste die zuvor gewonnene RNA zu cDNA (Komplementär-DNA) synthetisiert werden. Dies geschah unter Benutzung des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Deutschland). Zunächst erfolgte die Vorbereitung eines Matrizen-Primermixes in einem sterilen

Material und Methoden

PCR-Gefäß auf Eis, welcher 300 ng RNA als Matrize und 60 µM Random Hexamer Primer enthielt und mit sterilem Wasser auf ein Endvolumen von 13 µl aufgefüllt wurde. Zusätzlich wurde ein sogenannter Mastermix aus den in Tabelle 3 aufgeführten Reagenzien hergestellt.

Insgesamt betrug das Endvolumen nach Zugabe des Mastermixes zu dem Matrizenmix 20 µl. Im nächsten Schritt wurde die cDNA-Synthese durchgeführt. Hierbei erfolgte die Inkubation des Matrizenmixes für 10 Minuten bei 25 °C und danach für 60 min bei 50 °C. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte durch Erhitzen des Mixes auf 85 °C für 5 Minuten. Bis zur Durchführung der qPCR wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Für den Mastermix verwendete Reagenzien

Komponente	Finale Konzentration
Transkriptor Reverse Transkriptase Reaktionspuffer	8 mM MgCl ₂
Protector RNase Inhibitor	20 U
Deoxynukleotid Mix	Je 1 mM pro Deoxynukleotid
Transkriptor Reverse Transkriptase	10 U

2.15.2. qPCR

Mittels qPCR (quantitative Polymerase-Kettenreaktion) sollte die Expression von Genen verschiedener Stadien der Zelldifferenzierung von der Stammzelle zum adulten Osteoblasten gezeigt werden. Hierfür erfolgte eine Vervielfältigung von für spezielle Gene spezifischen Nukleinsäuren, um diese mittels Fluoreszenz-Analyse messen und quantifizieren zu können. Die Gene sind unter Angabe der Probe sowie der Primersequenzen in Tabelle 4 aufgeführt. Die Gene *DLX5* (Homeoboxprotein DLX-5; Hs.PT.58.45646524), *OPN* (Osteopontin; Hs.PT.58.19252426), *RUNX2* (runt-related transcription factor 2, Hs.PT.56a.19568141), *OSX* (Osterix, Hs.PT.58.14481920) und *OCN* (Osteocalcin, Hs.PT.56a.39318706.g) markieren spezifische Wegpunkte der Differenzierung osteogener Vorläuferzellen zu Osteoblasten und wurden gegen das Housekeeping-Gen *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase;

Material und Methoden

Hs9999909_m1) normalisiert (Harada and Rodan, 2003; Kulterer et al., 2007). Die verwendeten Primer und der Mastermix wurden von idt technologies (Integrated DNA technologies, Belgien) bezogen. Es wurden sogenannte TaqMan-Sonden mit FAM (6-Carboxyfluorescein) als Reporter-Fluoreszenzfarbstoff verwendet.

Tabelle 4: Primersequenzen

Name	Probe	Primer 1	Primer 2
SPP1	/56_FAM/ACCTGACAT/Z EN/CCAGTACCCTGATG CT/3IABkFQ/	TTCAACTCCTCGC TTTCCAT	CCCCACAGTAGA CACATATGATG
IBSP	/56_FAM/AGTGTGGTA/Z EN/TTCTCAGCCTCAGA GTCT/3IABkFQ/	CATAGCCCAGTGT TG TAGCA	ATGGAGATGACA GTT CAGAAGAG
BGLAP	/56_FAM/AGTCCAGCA/ ZEN/AAGGTGCAGCCT/ 3IABkFQ/	CGCCTGGGTCTC TTC ACT	CTCACACTCCTCG CCCTAT
MID1	/56_FAM/ACTGCTGCT/Z EN/TCTCTCTGCCAATG A/3IABkFQ/	CTGACCCACTTTC TCCTATTCC	CTAAACTCATCCA AACCTGTCAAC
DLX5	/56_FAM/TCTTTCTCT/Z EN/GGCTGGTTGGTGG C/3IABkFQ/	GTTTACGAACTTT CTTTGGTTTGC	CTTATGCCGACTA TAGCTACGC
RUNX2	/56_FAM/AACCCAGAA/Z EN/GGCACAGACAGAA GC/3IABkFQ/	AGGCGGTCAGAG AACAAAC	CTTCACAAATCCT CCCCAAGT

Der Reaktionsmix bestand aus den in Tabelle 5 aufgeführten Reagenzien (alle idt technologies). Die qPCR wurde mit dem Lightcycler 96 von Roche (Roche Diagnostics, Germany) unter Verwendung des in Tabelle 6 im Detail aufgeführten Programms durchgeführt.

Tabelle 5: Reagenzien des qPCR-Reaktionsmixes

Komponente	Endkonzentration/Menge	Volumen pro 20 µl Reaktion
PrimeTime Gene Expressions Master Mix (2x)	1x	10 µl
PrimeTime qPCR Assay	1x	1 µl
DNA Matrize	10ng	1 µl
Nukleasefreies Wasser		8 µl

Tabelle 6: qPCR-Programm

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit (Min:Sek)
Polymerase Aktivierung	1	98°C	3:00
Amplifikation	45		
Denaturation		95°C	0:05
Primerhybridisierung/Elongation		60°C	0:30

2.16. Statistische Auswertung

Für jedes durchgeführte Experiment wurden verschiedene Spender jeder Gruppe miteinander verglichen. Alle Zellkulturexperimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Für die statistischen Analysen wurden entweder ein Zweistichproben t-test, Wilcoxon Paarvergleichstest, Spearman- oder Pearson-Korrelationstest (zwei Gruppen) oder ein ANOVA-Test (4 Gruppen) durchgeführt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Es erfolgt immer die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung.

3. Ergebnisse

3.1. Die entnommenen Spenderzellen entsprechen den Kriterien für humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Von der International Society for Cellular Therapy wurde im Jahr 2006 ein Positionspapier veröffentlicht, in dem die Minimal-Kriterien zur Definition von multipotenten Stromazellen festgelegt wurden (Aubin, 1998; Dominici et al., 2006). Diese sind:

- Die Fähigkeit zur Adhärenz auf Plastik
- Expression eines spezifischen Profils an Oberflächenantigenen
- Die Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung

Zunächst wurde untersucht, ob die aus der Spongiosa gewonnenen Zellen diese Kriterien erfüllen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkultur-Flaschen aus Plastik. Entsprechend besaßen alle kultivierten Zellen die Fähigkeit auf Plastik zu adhären. Anschließend wurde eine immunozytochemische Färbung gegen die MSC-Marker CD73, CD90 und CD105 sowie gegen den Osteoblastenmarker IBSP durchgeführt.

Sowohl die Zellen der jüngeren, als auch die der älteren Spender zeigten, unabhängig von der Entnahmestelle, eine positive Expression der von Dominici et al. geforderten Oberflächenantigene (Abbildung 6).

Ergebnisse

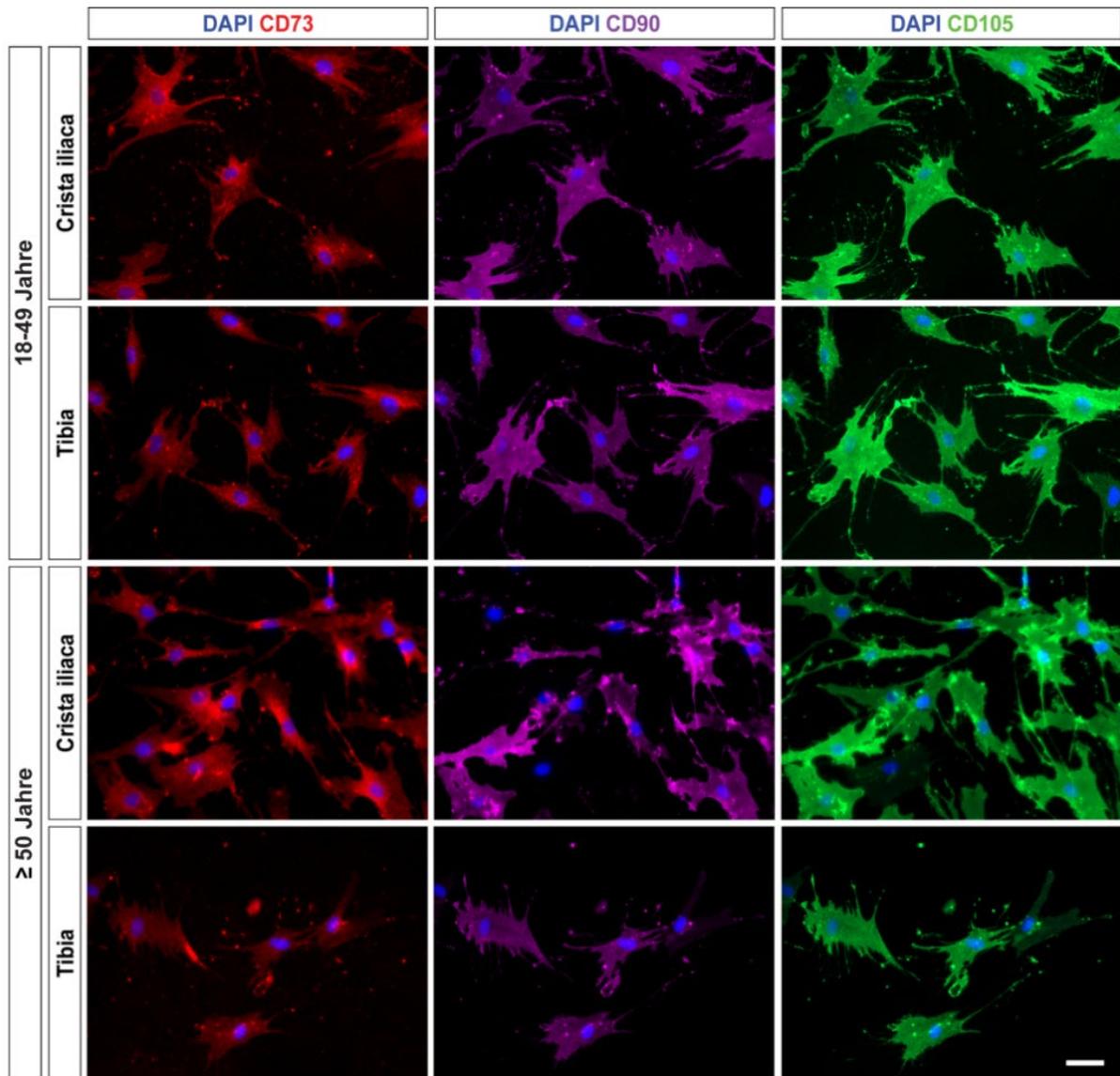


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung gegen CD73, CD90 und CD105.

Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Spenderzellen, die die Expression der geforderten Oberflächenantigene zeigen. Dargestellt sind die MSC-Marker CD73 (rot), CD90 (lila) und CD105 (grün) sowohl bei älteren als auch bei jüngeren Patienten beider Entnahmestellen. Maßstab: 50 μm (übernommen und angepasst aus Prall et al., 2018).

Zusätzlich wurden die Zellen gegen eine Kombination aus den MSC-Markern CD90 und CD105 sowie dem osteogenen Marker IBSP gefärbt. Dies sollte das Vorhandensein osteogener Vorläuferzellen zeigen. (Abbildung 7).

Ergebnisse

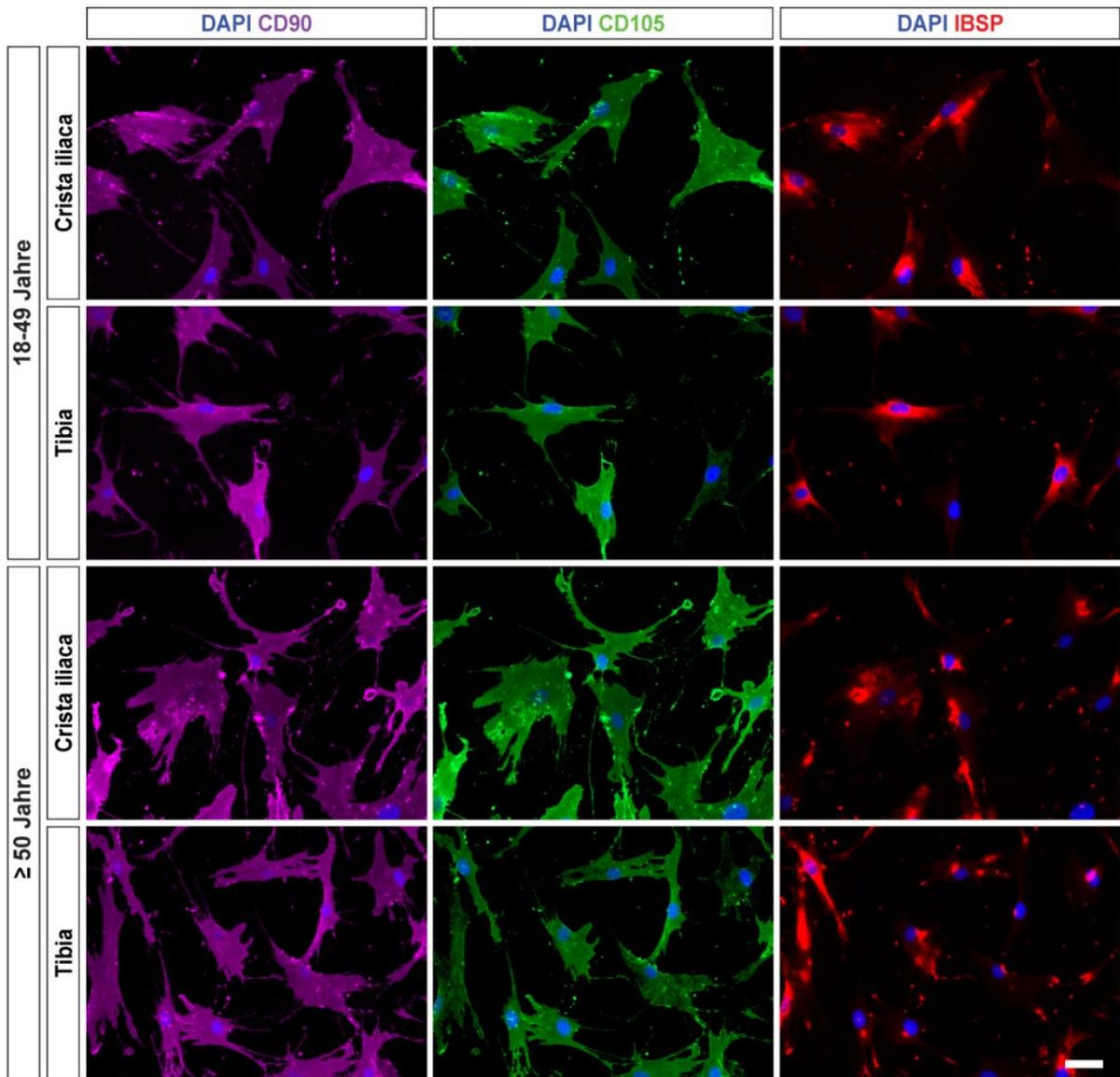


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung gegen IBSP, CD90 und CD105.

Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch gegen die Oberflächenantigene CD90 (lila), CD105 (grün) und IBSP (rot) gefärbter osteogener Vorläuferzellen von Spendern beider Entnahmestellen und Altersgruppen. Maßstab: 50 μm (übernommen und angepasst aus Prall et al., 2018).

3.2. Die Proliferationskapazität der osteogenen Vorläuferzellen war unabhängig von Entnahmestelle und Spenderalter vergleichbar

3.2.1. Pro Gramm Gewebe wurde aus jeder Entnahmestelle eine vergleichbare Anzahl adhärenter Zellen gewonnen

Vor jeder Zellisolation wurde das Gewicht der gewonnenen Knochenspongiosa für jeden Spender ermittelt. Nach 14 Tagen, vor dem Start der Versuche, erfolgte die

Ergebnisse

Bestimmung der Zellzahl. Vergleich man die Anzahl adhärenter Zellen pro Gramm gewonnener Spongiosa, zeigte sich, dass aus dem Beckenkamm im Mittel $4,1 \cdot 10^5 \pm 4,0 \cdot 10^5$ Zellen/Gramm (jüngere Gruppe: $3,4 \cdot 10^5 \pm 4,8 \cdot 10^5$ Zellen/Gramm, ältere Gruppe: $4,8 \cdot 10^5 \pm 3,4 \cdot 10^5$ Zellen/Gramm) gewonnen werden konnten (Abbildung 8). Aus der Tibia ließen sich im Vergleich $3,0 \cdot 10^5 \pm 2,9 \cdot 10^5$ Zellen/Gramm (jüngere Gruppe: $3,3 \cdot 10^5 \pm 3,5 \cdot 10^5$ Zellen/Gramm, ältere Gruppe: $2,6 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$ Zellen) isolieren (Abbildung 8). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren statistisch nicht signifikant (ANOVA Kruskal-Wallis-Test, $n = 10$ (Crista iliaca jung), 9 (Crista iliaca alt), 8 (Tibia jung und alt), $p > 0,05$).

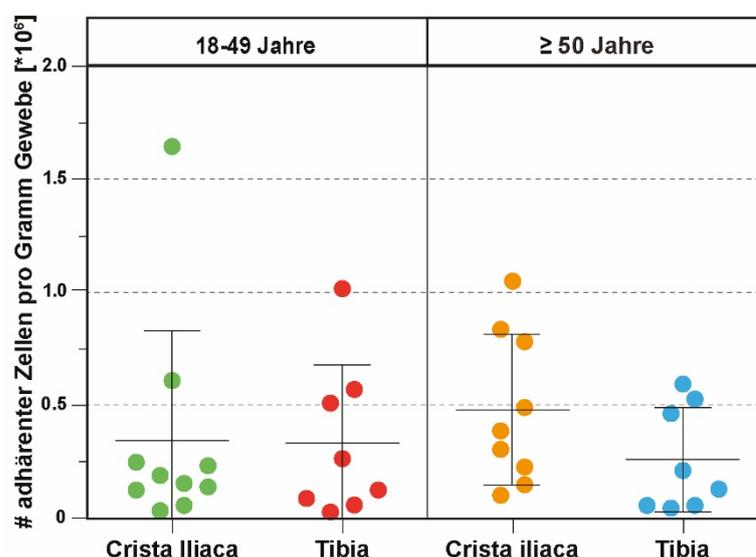


Abbildung 8: Anzahl der ädherierten Zellen pro Gramm entnommener Spongiosa.

Die Anzahl der adhärenter Zellen pro Gramm entnommener Spongiosa war in den jüngeren Gruppen beider Entnahmestellen gleichwertig. Aus der Tibia-Spongiosa der älteren Spender adhärenter weniger Zellen als aus der Beckenkamm-Spongiosa derselben Altersgruppe, die Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (Übernommen und angepasst aus Prall et al., 2018).

3.2.2. Die Zellen aus beiden Entnahmestellen zeigten eine vergleichbare Proliferationskapazität

Zur Beurteilung der Proliferations- und damit Regenerationskapazität der Spenderzellen wurde das Zellwachstum über einen Zeitraum von 8 Wochen bestimmt. Die Zellen aus dem Beckenkamm erreichten insgesamt eine kumulative Populationsverdopplung (cumPD) von $16,2 \pm 4,0$, die Zellen der Tibia zeigten eine

Ergebnisse

cumPD von $17,2 \pm 2,9$ (Abbildung 9A). Im Mittel benötigten die Zellen des Beckenkamms für eine Populationsverdoppelung (Populationsverdopplungszeit, PDT) $3,9 \pm 1,4$ Tage und die aus der Tibia isolierten Zellen $3,6 \pm 0,8$ Tage (Abbildung 9B). Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren jeweils statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $n = 25$ (Crista iliaca), $n = 21$ (Tibia), $p > 0,05$).

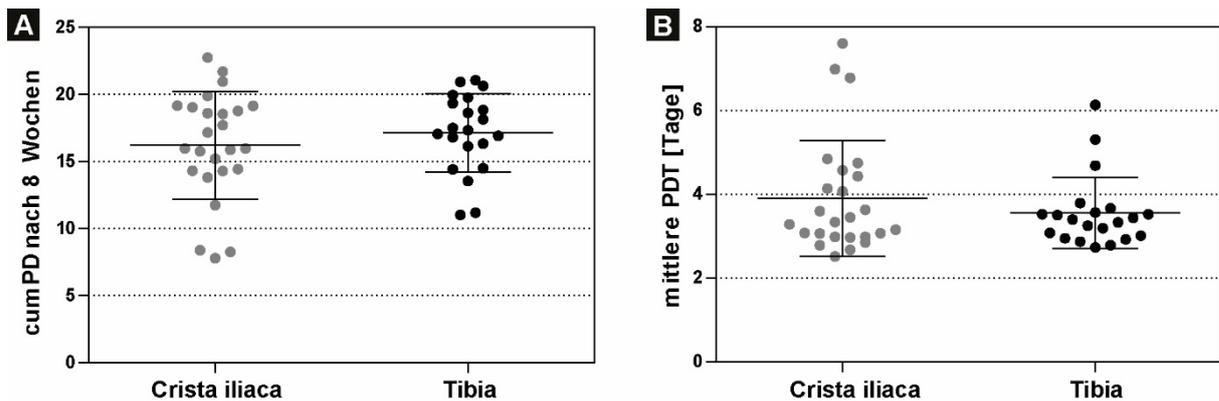


Abbildung 9: CumPD und mittlere PDT nach 8 Wochen für beide Entnahmestellen.

Die kumulative Populationsverdopplung (cumPD) nach 8 Wochen war für beide Entnahmestellen gleichwertig (A), ebenso die mittlere Populationsverdopplungszeit (PDT, B). Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen zeigten die Zellen gewonnen aus dem Beckenkamm älterer Spender eine erhöhte Variabilität der Populationsverdoppelungen, während die isolierten Zellen junger Spender homogenere Ergebnisse erzielten. So erreichten die Zellen aus dem Beckenkamm junger Spender eine cumPD zwischen minimal 14,3 und maximal 19,9 (Mittelwert $17,6 \pm 1,9$, Abbildung 10A, Abbildung 11A), während die Zellen älterer Spender eine größere Streubreite von minimal 7,8 und maximal 22,7 (Mittelwert $14,8 \pm 5,2$) aufwiesen (Abbildung 10B, Abbildung 11A). Im Unterschied war die Streubreite für Zellen aus der Tibia für beide Altersgruppen vergleichbarer. So erreichten die Zellen älterer Spender eine cumPD von minimal 11,0 und maximal 21,1 (Mittelwert $17,4 \pm 3,1$), was sich von den minimal 11,2 und maximal 20,7 (Mittelwert $17,0 \pm 2,8$), die Zellen junger Spender erreichten, nur geringgradig unterschied (Abbildung 10C und D, Abbildung 11A). Zwischen den Altersgruppen beider Entnahmestellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (ANOVA Kruskal-Wallis-Test, $n = 13$

Ergebnisse

(Beckenkamm jung), n = 12 (Beckenkamm alt), n = 11 (Tibia jung), n = 10 (Tibia alt),
 $p > 0,05$).

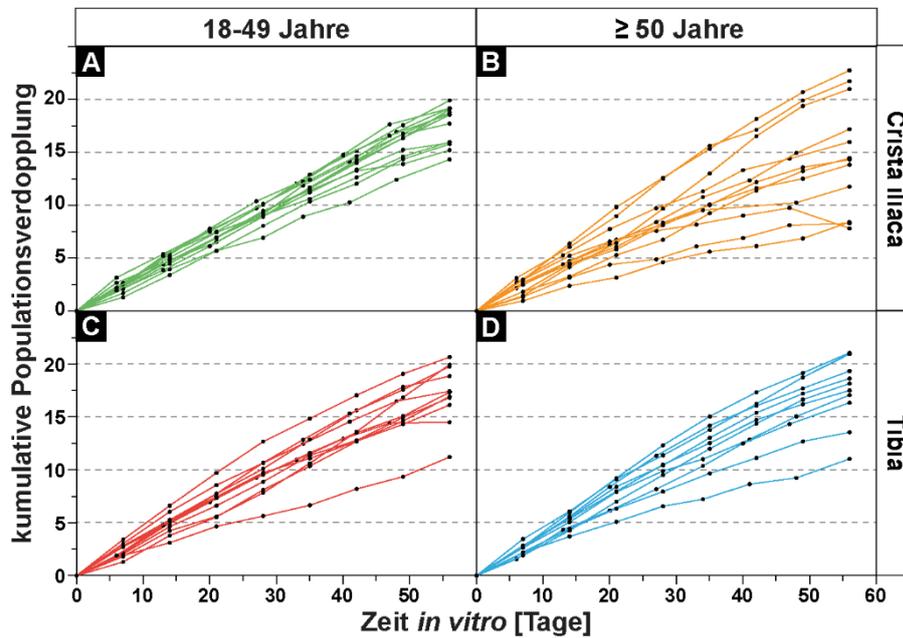


Abbildung 10: Kumulative Populationsverdopplung nach 56 Tagen.

Die kumulative Populationsverdopplung nach 56 Tagen für beide Entnahmestellen und Altersgruppen. (A) und (B) zeigen die Wachstumskurven der aus dem Beckenkamm gewonnenen Zellen junger und älterer Spender, (C) und (D) die Wachstumskurven der Zellen aus der Tibia. Die Wachstumskurven der älteren Spender zeigen eine erhöhte Variabilität der erreichten Populationsverdopplungen als die der jüngeren Spender. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Jede Linie repräsentiert einen Spender. (Übernommen und angepasst aus Prall et al., 2018).

Ergebnisse

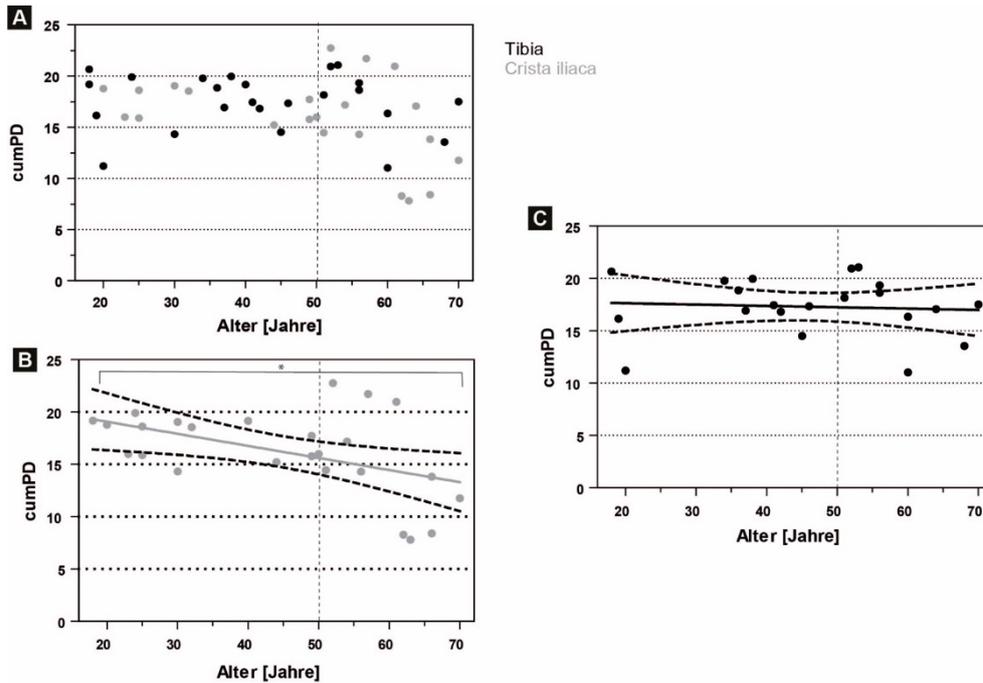


Abbildung 12: Korrelation der kumulativen Populationsverdopplung der einzelnen Spender mit deren Alter.

(A) Kumulative Populationsverdopplung (cumPD) der Zellen aller Spender in Abhängigkeit vom Alter. (B) Darstellung der cumPD von Zellen aus der Crista iliaca in Korrelation zum Alter der Patienten. (C) Darstellung der cumPD von Zellen aus der proximalen Tibia in Korrelation zum Alter der Patienten. Es zeigte sich eine signifikant sinkende cumPD bei den aus dem Beckenkamm gewonnenen Zellen. (Signifikanzniveau: * = 0,016). Jeder Punkt entspricht einem Spender.

Ebenso lies sich eine größere Variabilität der älteren Gruppen im Bezug auf die Populationsverdopplungszeit (PDT) beobachten (Abbildung 13A). Die Spenderzellen aus dem Beckenkamm zeigten einen signifikanten Anstieg der mittleren PDT mit steigendem Alter (Spearman-Test $r = 0,475$, $n = 25$, $p = 0,016$, Abbildung 13B), während dieser Anstieg bei Zellen aus der Tibia mit steigendem Alter geringer ausfiel (Abbildung 13C, Spearman-Test $r = 0,194$, $n = 21$, $p > 0,05$).

Ergebnisse

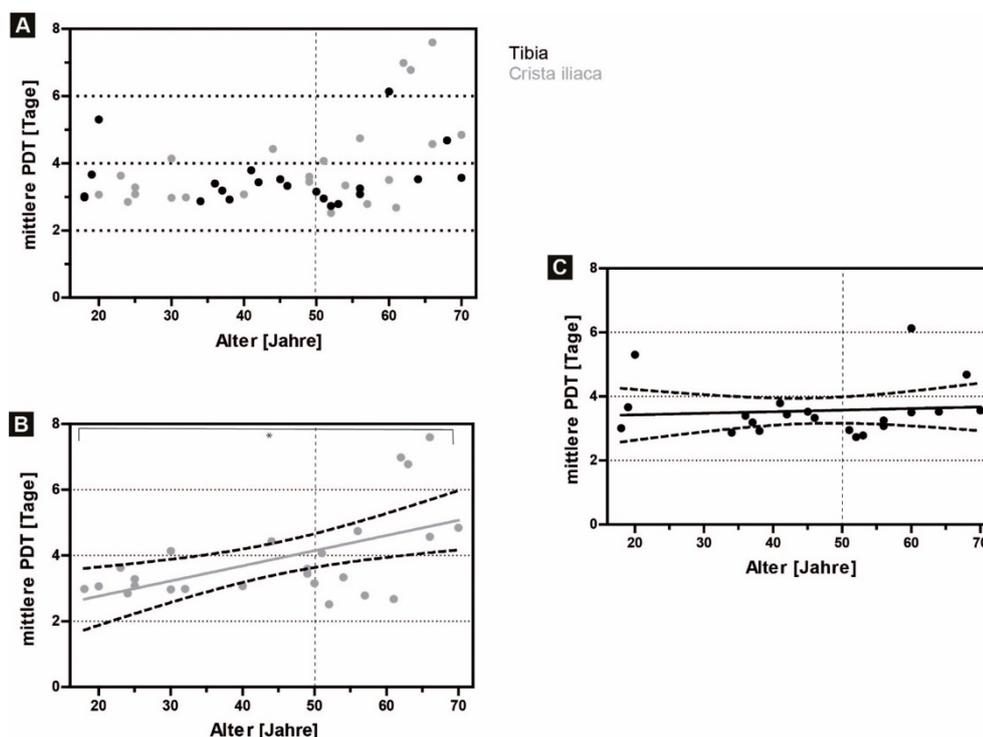


Abbildung 13: Korrelation der benötigten mittleren PDT nach Alter und Entnahmestelle der Spender.

(A) Populationsverdopplungszeit (PDT) der Zellen aller Spender beider Entnahmestellen in Abhängigkeit vom Alter. (B) Darstellung der cumPDT von Zellen aus der Crista iliaca in Korrelation zum Alter der Patienten. (C) Darstellung der cumPDT von Zellen aus der proximalen Tibia in Korrelation zum Alter der Patienten. Es zeigte sich eine signifikant steigende PDT bei den aus dem Beckenkamm gewonnenen Zellen. (Signifikanzniveau: * = 0,016). Jeder Punkt entspricht einem Spender.

3.2.3. Die Anzahl neugebildeter Kolonien war bei allen Spenderzellen vergleichbar

Als ein weiterer Parameter zur Quantifizierung der Proliferationskapazität wurde ein CFU-Assay (Colony-forming-Units-Assay) durchgeführt. Hierbei wird erfasst, wie viele Kolonien mit mehr als 8 Zellen sich aus einer bestimmten Anzahl von ausgesäten Zellen innerhalb der ersten Woche der Kultivierung entwickeln. Zusätzlich wurde untersucht, wie viele dieser Kolonien, als Hinweis auf das Vorhandensein osteogener Zellen, eine ALP-positive Aktivität aufweisen. Die CFU-Effizienz gibt an, wie viel Prozent der eingesetzten Zellen in der Lage waren, zu adhären und Kolonien zu bilden.

Beim Vergleich der beiden Entnahmestellen zeigten die Zellen aus der Tibia eine CFU-Effizienz von $14,0 \pm 7,4\%$ mit $75,3 \pm 10,6\%$ ALP-positiven Kolonien, die Zellen aus dem Beckenkamm erreichten eine CFU-Effizienz von $10,6 \pm 6,1\%$ mit

Ergebnisse

77,5 ± 11,3% ALP-positiven Kolonien (Abbildung 14). Die Unterschiede zwischen den Entnahmestellen waren nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, n = 18 (Beckenkamm und Tibia), p > 0,05).

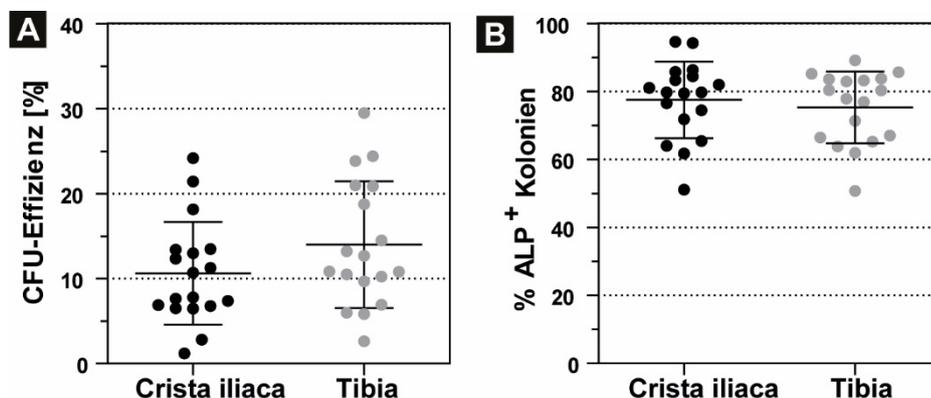


Abbildung 14: CFU-Effizienz und Anzahl ALP-positiver Kolonien für Beckenkamm und Tibia.

Dargestellt sind die CFU-Effizienz, d.h. das Verhältnis der Zahl der eingesetzten Zellen zur Zahl der neu gebildeten Kolonien für beide Entnahmestellen (A) und der Anteil an ALP-positiven Kolonien, d.h. das Verhältnis der Zahl der ALP-positiven Kolonien zur Gesamtzahl der neu gebildeten Kolonien in Prozent (B) für die beiden Entnahmestellen. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. Die Unterschiede waren jeweils nicht statistisch signifikant. (CFU = Colony forming Units; ALP = Alkalische Phosphatase)

Beim Vergleich der beiden Altersgruppen zeigte sich für die Zellen aus der Tibia eine vergleichbare CFU-Effizienz mit $13,8 \pm 6,4\%$ für die jüngeren Spender und $14,2 \pm 8,7\%$ für die ältere Spender. Bei den Zellen aus dem Beckenkamm zeigten sich größere Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen mit $13,0 \pm 6,1\%$ für die jüngeren und $8,2 \pm 5,2\%$ für die älteren Spender, ohne dass die Unterschiede zwischen den Gruppen jedoch statistisch signifikant gewesen wären (Abbildung 15A, ANOVA Kruskal-Wallis-Test, n = 9 (alle Gruppen), p > 0,05).

Die Zellen aus der Tibia erreichten bei den jüngeren Spendern eine Rate an ALP-positiven Kolonien von $74,4 \pm 12,2\%$ und bei den älteren Spendern $76,1 \pm 9,3\%$. Die Zellen aus der Cristia iliaca zeigten bei den jüngeren Spendern eine Rate von $71,9 \pm 10,2\%$, und die der älteren Spender von $83,1 \pm 9,9\%$ (Abbildung 15B). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant (ANOVA Kruskal-Wallis-Test, n = 9 (alle Gruppen), p > 0,05)

Ergebnisse

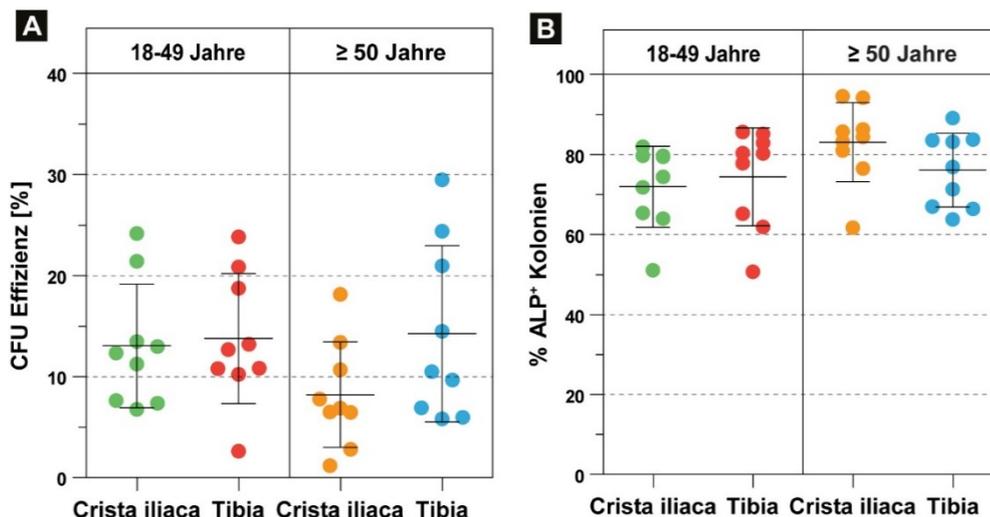


Abbildung 15: CFU-Effizienz und Anzahl ALP-positiver Kolonien für beide Entnahmestellen und Altersgruppen.

(A) Darstellung der CFU-Effizienz, d.h. das Verhältnis der Zahl der eingesetzten Zellen zur Zahl der neu gebildeten Kolonien, für jeweils beide Altersgruppen der Entnahmestellen in Prozent. (B). Darstellung der Rate an ALP-positiven Kolonien für beide Entnahmestellen und beide Altersgruppen in Prozent. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. (Übernommen und angepasst aus Prall et al. 2018). (CFU = Colony forming Units; ALP = Alkalische Phosphatase)

Vergleicht man die altersbezogene CFU-Effizienz beider Entnahmestellen zeigt sich über alle Altersklassen hinweg eine große Varianz der Ergebnisse (Abbildung 16A). Die CFU-Effizienz der Zellen des Beckenkamms bleibt mit steigendem Alter gleich (Pearson-Test $r = -0,018$, $n = 18$, $p > 0,05$, Abbildung 16B), die CFU-Effizienz der Tibia-Zellen sinkt leicht, aber nicht signifikant (Pearson-Test $r = -0,170$, $n = 17$, $p > 0,05$, Abbildung 16C).

Ergebnisse

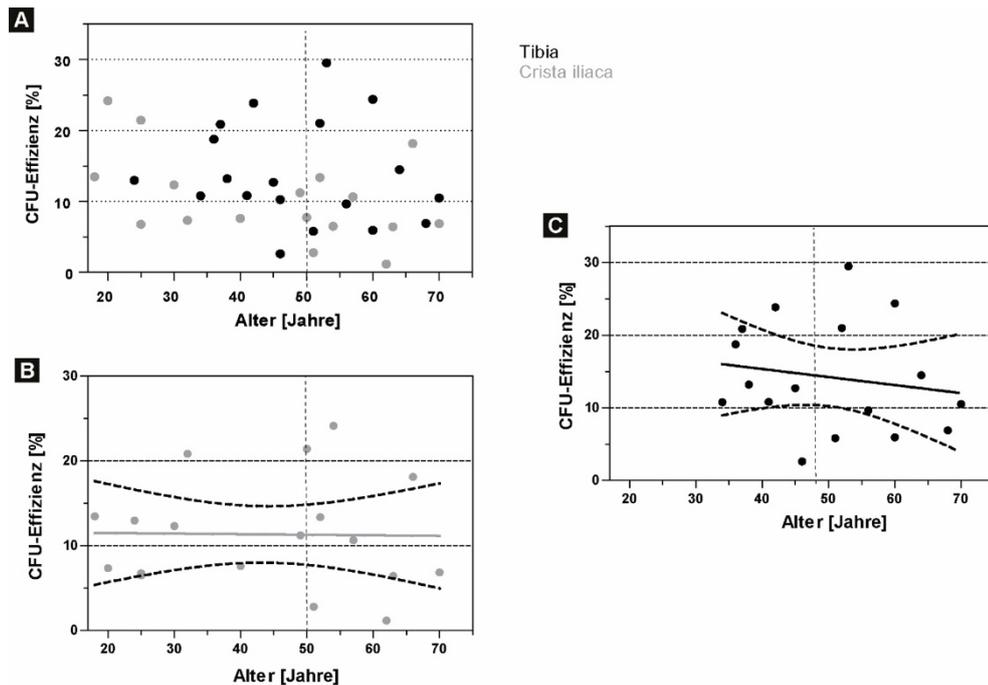


Abbildung 16: Korrelation der erreichten CFU-Effizienz nach Alter der Spender und Entnahmestelle.

(A) Darstellung der CFU-Effizienz, d.h. das Verhältnis der Zahl der eingesetzten Zellen zur Zahl der neu gebildeten Kolonien, aller Spender in Abhängigkeit vom Alter. (B) Darstellung der CFU-Effizienz von Zellen aus der Crista iliaca in Korrelation zum Alter der Patienten. (C) Darstellung der CFU-Effizienz von Zellen aus der proximalen Tibia in Korrelation zum Alter der Patienten. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede. (CFU = Colony forming Units).

Die Zellen aller Spender zeigten eine hohe Rate an ALP-positiven Kolonien, auch mit steigendem Alter (Abbildung 17A). Für die Zellen aus der Crista iliaca zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Rate an ALP-positiven Kolonien mit steigendem Alter (Pearson-Test $r = 0,600$, $n = 18$, $p = 0,009$, Abbildung 17B), während sich für die Zellen aus der Tibia ein diskreter, statistisch nicht signifikanter Abfall zeigte (Pearson-Test $r = -0,071$, $n = 17$, $p > 0,05$, Abbildung 17C).

Ergebnisse

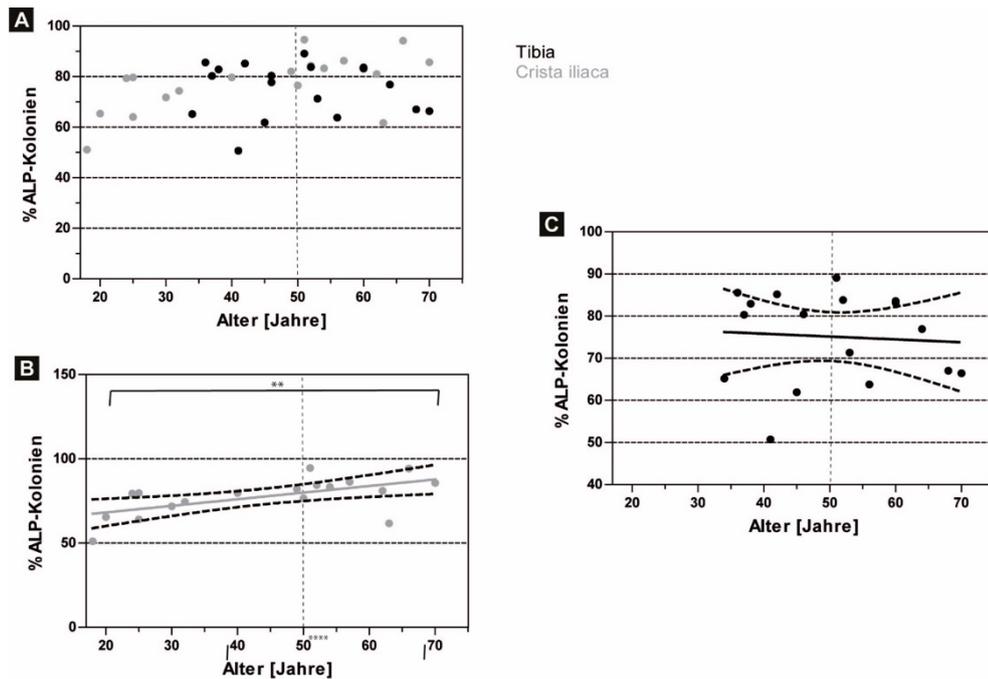


Abbildung 17: Korrelation des Anteils der ALP-positiven Kolonien nach Alter der Spender und Entnahmestelle.

(A) Darstellung des Verhältnisses der Zahl der ALP-positiven Kolonien zur Gesamtzahl der neu gebildeten Kolonien aller Spender in Abhängigkeit vom Alter. (B) Darstellung der Anzahl ALP-positiver Kolonien aus der Crista iliaca in Korrelation zum Alter der Patienten. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der ALP-positiven Kolonien mit zunehmendem Alter. (Signifikanzniveau: ** = $p \leq 0,01$) (C) Darstellung der ALP-positiven Kolonien aus der proximalen Tibia in Korrelation zum Alter der Patienten. Es kommt zu keiner signifikanten Abnahme der Anzahl an ALP-positiven Kolonien mit steigendem Alter. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (ALP = Alkalische Phosphatase)

3.3. Die metabolische Aktivität der Spenderzellen war für die Zellen aus beiden Entnahmestellen beider Altersgruppen vergleichbar

Mit dem WST-Assay wurde die metabolische Aktivität der entnommenen Spenderzellen quantifiziert. Im Vergleich der beiden Entnahmestellen zeigte sich eine gleichwertige metabolische Zellaktivität mit einer mittleren optischen Dichte (OD) von $0,2 \pm 0,1$ für Zellen aus dem Beckenkamm und $0,2 \pm 0,1$ für die aus der Tibia (Abbildung 18) (Mann-Whitney U-Test, $n = 18$ (Crista iliaca und Tibia), $p > 0,05$).

Ergebnisse

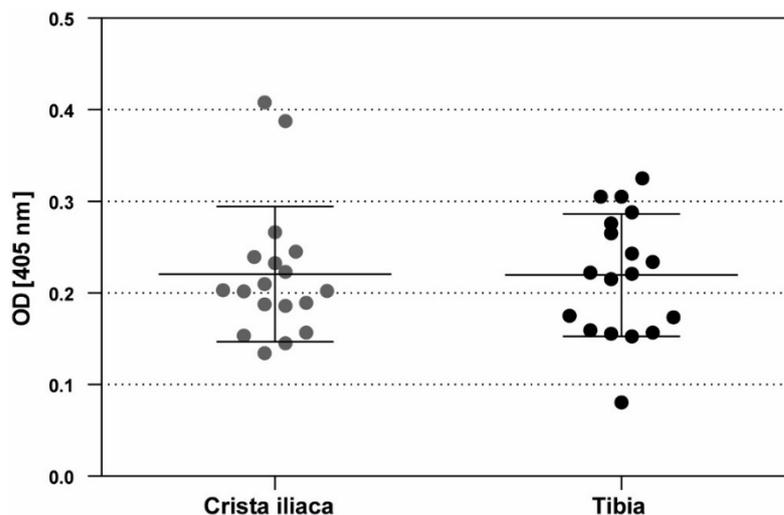


Abbildung 18: Metabolische Aktivität von Zellen aus beiden Entnahmestellen.

Die optische Dichte (OD in nm) als Ausdruck der metabolischen Zellaktivität zeigte keine Unterschiede zwischen den Zellen aus dem Beckenkamm und der Tibia. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

Beim Vergleich der altersentsprechenden Gruppen der beiden Entnahmestellen zeigten sich in der jüngeren Gruppe für Zellen aus der Tibia eine metabolische Aktivität mit einer OD von $0,2 \pm 0,1$ und für Zellen aus der Crista iliaca eine OD von $0,2 \pm 0,1$. In der älteren Gruppe zeigte sich eine OD von $0,2 \pm 0,1$ für Zellen aus der Tibia gegenüber einer OD von $0,2 \pm 0,1$ für Zellen aus der Crista iliaca (Abbildung 19).

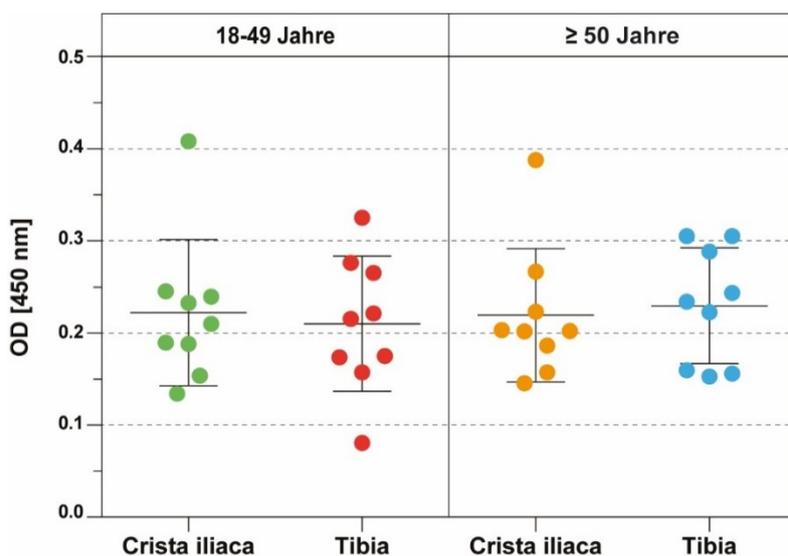


Abbildung 19: Darstellung der optischen Dichte (OD) als Ausdruck der metabolischen Aktivität der Zellen, aufgeteilt nach Entnahmestellen und Altersgruppen.

Zwischen den Gruppen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (Übernommen und angepasst aus Prall et al. 2018).

Ergebnisse

Weder für die Zellen aus der Crista iliaca, noch für die aus der Tibia ergaben sich im Vergleich der einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede (ANOVA Kruskal-Wallis-Test, $n = 9$ (alle Gruppen), $p > 0,05$).

Korreliert man die OD der Zellen aller Spender mit dem Alter der Spender zeigt sich eine vergleichbare Variabilität unabhängig vom Alter (Abbildung 20A). Im Vergleich der beiden Entnahmestellen zeigt sich bei den Zellen sowohl aus dem Beckenkamm (Pearson-Test $r = 0,014$, $n = 18$, $p > 0,05$, Abbildung 20B), als auch für die Zellen aus der Tibia eine vergleichbare metabolische Aktivität über alle Altersklassen hinweg (Pearson-Test $r = 0,104$, $n = 18$, $p > 0,05$, Abbildung 20C).

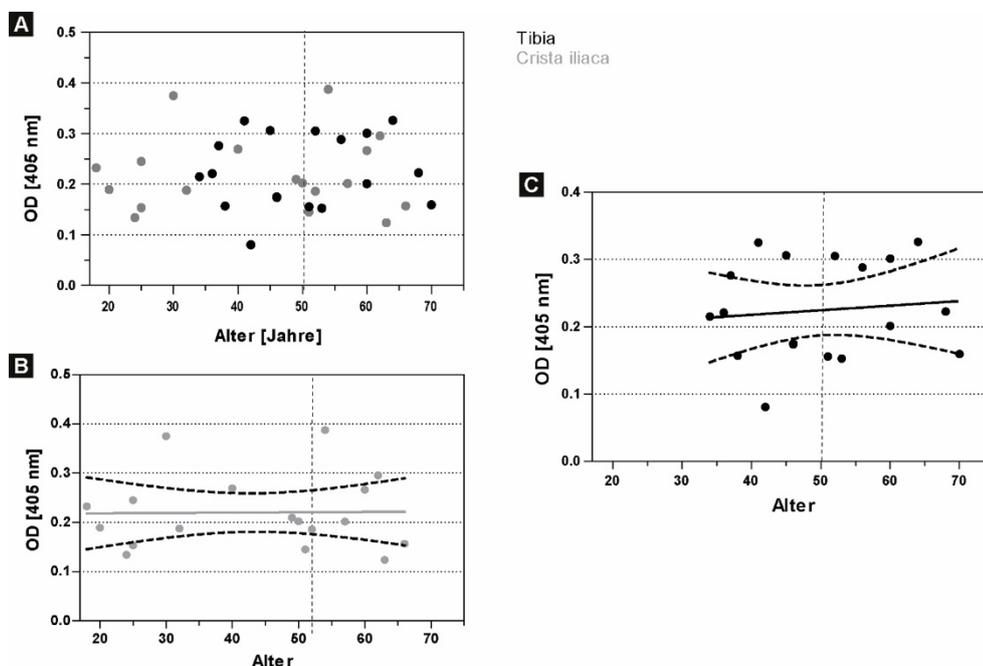


Abbildung 20: Altersbezogene Korrelation der metabolischen Aktivität.

(A) zeigt die gemessene optische Dichte (OD) als Ausdruck der metabolischen Zellaktivität jedes einzelnen Spenders. (B) Die aus dem Beckenkamm isolierten Zellen zeigen eine gleichbleibende metabolische Aktivität mit steigendem Alter. (C) Die aus der Tibia isolierten Zellen zeigen eine mit dem Alter leicht, aber nicht statistisch signifikant, ansteigende metabolische Aktivität. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

3.4. Die Spenderzellen aus beiden Entnahmestellen zeigten die Fähigkeit sowohl zur osteogenen, adipogenen als auch zur chondrogenen Differenzierung

Um zusätzlich zur Plastikadhärenz der Zellen und dem Vorhandensein sowohl osteogener als auch mesenchymaler Stammzellmarker (siehe 3.3) die Multipotenz der

Ergebnisse

gewonnenen Zellen zu untersuchen, wurden neben der osteogenen Differenzierung zusätzlich eine adipogene und chondrogene Differenzierung durchgeführt. Exemplarische histologische Aufnahmen für die einzelnen Spender finden sich im Anhang (Anhang 1, Anhang 2, Anhang 3).

3.4.1. Die Quantifizierung der adipogenen Differenzierung der Spenderzellen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Entnahmestellen

Die adipogene Differenzierung erfolgte über 21 Tage. Bei den Zellen aller Spender gelang eine adipogene Differenzierung. Die Anfärbung der Zellen erfolgte mittels BODIPY-Färbung. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten alle Gruppen im mikroskopischen Vergleich einen höheren Anteil an gefärbten Zellen. (Abbildung 21). In der quantitativen Analyse wurde die relative Vakuolenbildung als Ausdruck des Verhältnisses zwischen der Fläche der Lipidvakuolen im Vergleich zur gesamten Fläche der Zelle gemessen.

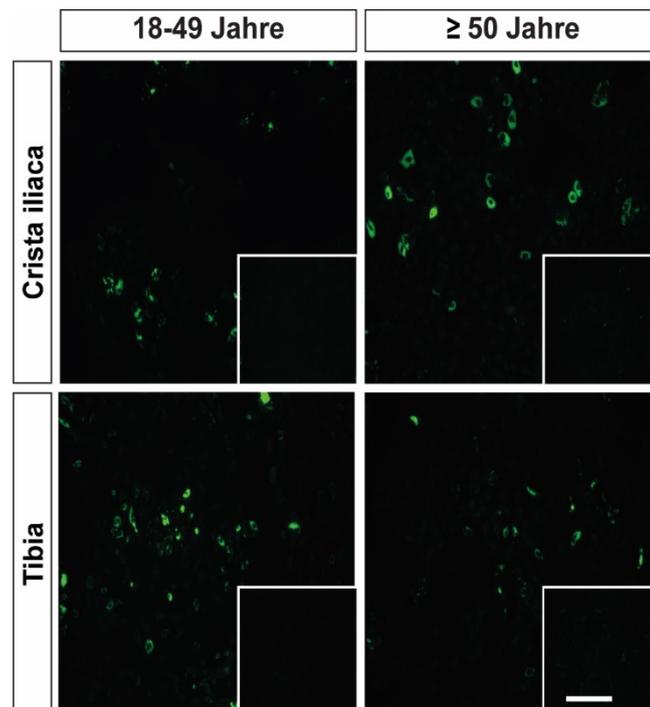


Abbildung 21: Exemplarischer Vergleich differenzierter mit undifferenzierten Zellen nach BODIPY-Färbung.

Die BODIPY-Färbung nach dem Ende der adipogenen Differenzierung nach 21 Tagen zeigte für alle Gruppen eine deutliche Bildung von Lipidvakuolen. Die Ausschnitte in den Bildecken zeigen die undifferenzierten Kontrollen, bei denen sich keine Lipidvakuolen nachweisen ließen. Maßstab 100 µm.

Ergebnisse

Im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollen zeigten die Zellen, bei denen eine adipogene Stimulation durchgeführt wurde, eine relative Lipidvakuolenbildung von $2,2 \pm 1,3\%$. Der minimalste Wert der relativen Vakuolenbildung der gemessen wurde war $0,3\%$ und der maximale $5,3\%$. Die nicht-differenzierten Kontrollen zeigten im Mittel eine relative Vakuolenbildung von $0,1 \pm 0,1\%$. Die stimulierten Zellen erreichten eine signifikant höhere relative Vakuolenbildung verglichen mit den nicht stimulierten Zellen (Abbildung 22, Mann-Whitney-U-Test, $n = 60$ (beide Gruppen), $p \leq 0.0001$).

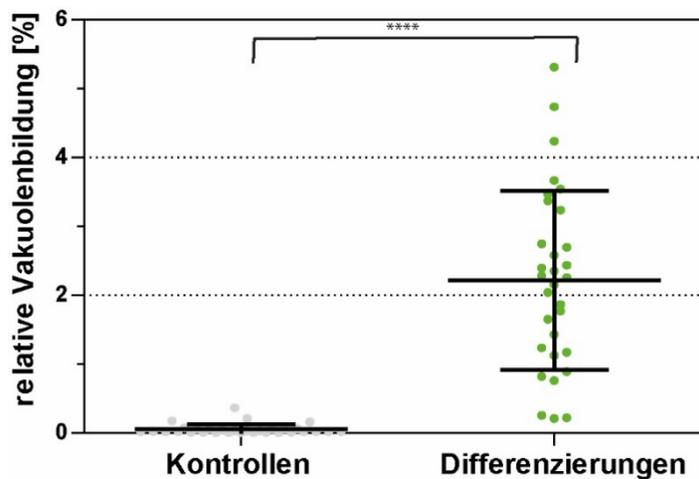


Abbildung 22: Vergleich der adipogen differenzierten Zellen mit den undifferenzierten Kontrollen.

Die relative Vakuolenbildung ergibt sich aus dem Verhältnis der Fläche der Lipidvakuolen im Vergleich zur gesamten Fläche der Zelle. Es zeigte sich eine statistisch signifikant erhöhte Bildung von Lipidvakuolen nach adipogener Differenzierung im Vergleich mit undifferenzierten Kontrollen. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (Signifikanzniveau: ****) $p \leq 0.0001$).

Betrachtet man die unterschiedlichen Entnahmestellen, zeigte sich für die Zellen aus der Tibia eine relative Vakuolenbildung von $1,8 \pm 1,4\%$ und für die Zellen aus dem Beckenkamm von $2,6 \pm 1,2\%$ (Abbildung 23, Mann-Whitney-U-Test, $n = 16$ (Tibia), 14 (Iliac Crest), $p > 0,05$).

Ergebnisse

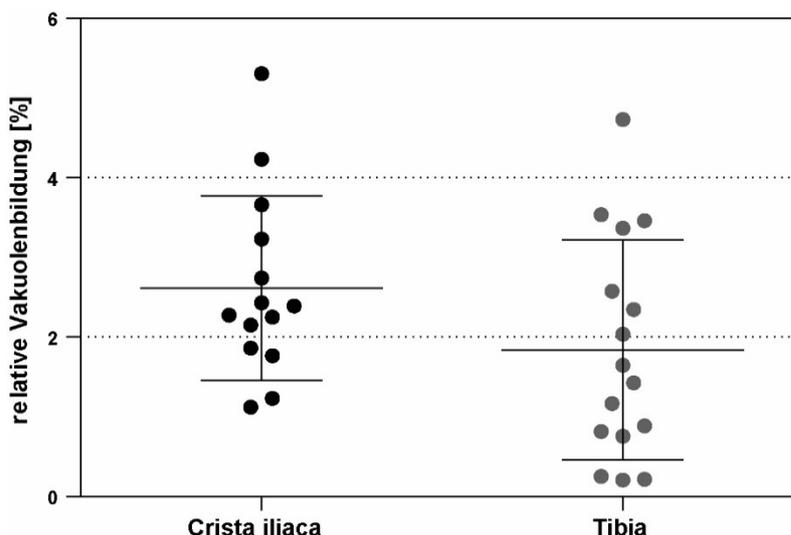


Abbildung 23: Vergleich der beiden Entnahmestellen nach Abschluss der adipogenen Differenzierung.

Die relative Vakuolenbildung ergibt sich aus dem Verhältnis der Fläche der Lipidvakuolen im Vergleich zur gesamten Fläche der Zelle. Zwischen den beiden Entnahmestellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der relativen Vakuolenbildung. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

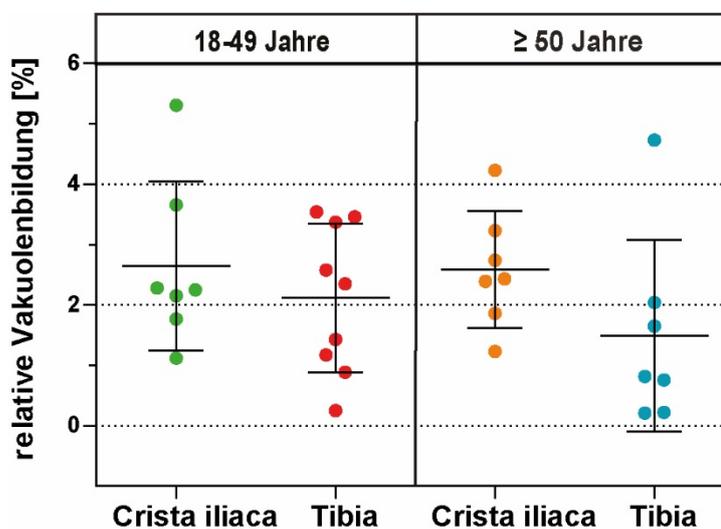


Abbildung 24: Vergleich der altersbezogenen Unterschiede der adipogenen Differenzierung.

Dargestellt ist die relative Vakuolenbildung für beide Entnahmestellen, aufgeteilt nach den Altersgruppen. Die relative Vakuolenbildung ergibt sich aus dem Verhältnis der Fläche der Lipidvakuolen im Vergleich zur gesamten Fläche der Zelle. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (Übernommen und angepasst aus Prall et al. 2018).

Die Betrachtung der altersbezogenen Unterschiede der beiden Entnahmestellen zeigte eine relative Vakuolenbildung von $2,7 \pm 1,4\%$ für die Zellen der jüngeren Gruppe

Ergebnisse

gewonnen aus dem Beckenkamm, sowie $2,1 \pm 1,2\%$ für die Zellen der jüngeren Gruppe aus der Tibia. Bei den älteren Spendern ergaben sich $2,6 \pm 1,0\%$ (Beckenkamm) bzw. $1,5 \pm 1,6\%$ (Tibia) relativer Fettbereich. Die Unterschiede waren nicht signifikant (Abbildung 24, Kruskal-Wallis-Test, $n = 9$ (Tibia jung), 7 (Tibia alt, Beckenkamm jung und alt), $p > 0,05$).

Korreliert man die relative Vakuolenbildung mit dem Alter der Spender zeigte sich eine vergleichbare Variabilität in allen Altersgruppen (Abbildung 25A). Auch die Analyse nach Entnahmestelle zeigte sowohl für die Zellen aus dem Beckenkamm (Pearson-Test $r = -0,198$, $n = 14$, $p > 0,05$, Abbildung 25B) als auch bei denen aus der Tibia (Pearson-Test $r = -0,388$, $n = 16$, $p > 0,05$, Abbildung 25C) eine Abnahme des relativen Fettbereichs mit zunehmendem Alter, welche allerdings statistisch nicht signifikant war.

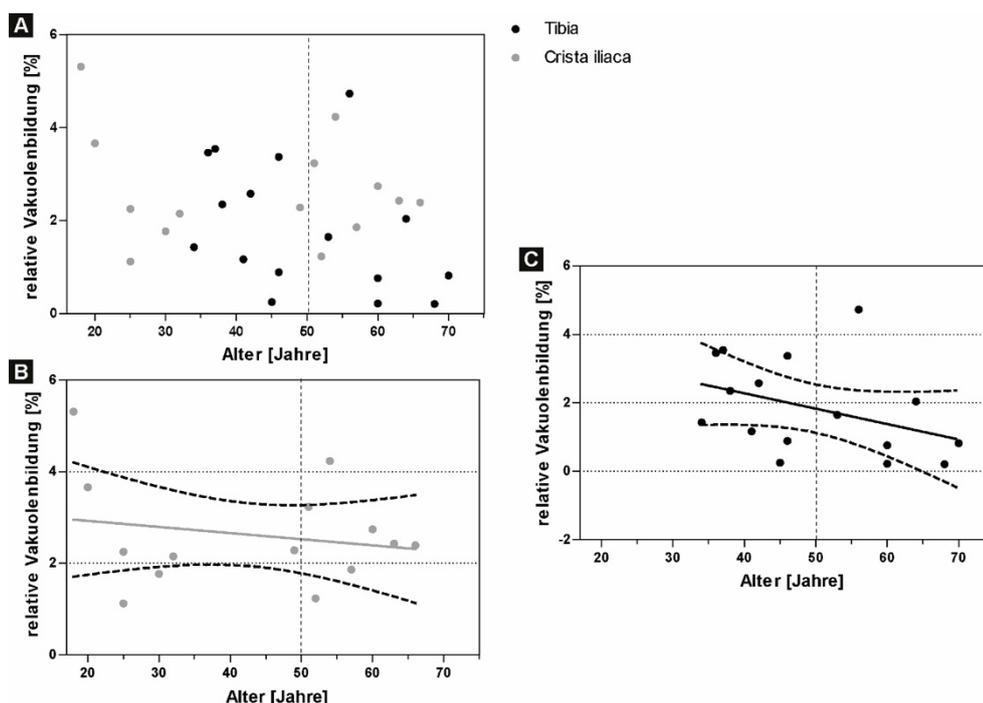


Abbildung 25: Altersbezogene Korrelation der Vakuolenbildung nach adipogener Differenzierung.

Die relative Vakuolenbildung ergibt sich aus dem Verhältnis der Fläche der Lipidvakuolen im Vergleich zur gesamten Fläche der Zelle. (A) Es zeigte sich eine vergleichbare Variabilität der relativen Vakuolenbildung über alle Altersgruppen hinweg. (B) Der relative Fettbereich der Beckenkammzellen sank mit zunehmendem Alter. (C) Der relative Fettbereich der Tibiazellen sank mit steigendem Alter. Die Abnahme der relativen Vakuolenbildung mit zunehmendem Alter war in keiner Gruppe statistisch signifikant. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

3.4.2. Die chondrogene Differenzierung der Spenderzellen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Entnahmestellen

Die chondrogene Differenzierung wurde über 28 Tage durchgeführt. Die Färbung mit Safranin-Orange zeigte in der qualitativen mikroskopischen Analyse eine gute Differenzierung aller Gruppen im Vergleich mit den Kontrollen (Abbildung 26).

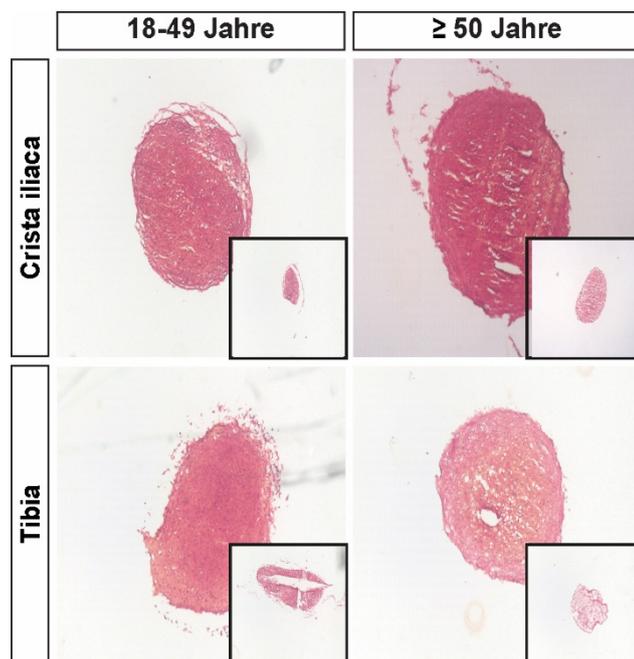


Abbildung 26: Exemplarischer Vergleich differenzierter mit undifferenzierten Zellen nach Safranin-Orange-Färbung nach 28 Tagen chondrogener Differenzierung.

Im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollen (Kästen rechts unten) zeigte sich eine deutliche Proteoglykan-Bildung in allen Gruppen.

In der quantitativen optischen Analyse, durchgeführt durch drei unabhängige Untersucher, die den Differenzierungserfolg in 25%-Schritten bewerteten, zeigte sich eine signifikant höhere Differenzierung der Zellen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abbildung 27, Mann-Whitney-U-Test, $n = 60$ (beide Gruppen), $p < 0.0001$). Im Mittel fand sich ein differenzierter Bereich im Vergleich zur gesamten Fläche der Zelle von $87,1 \pm 24,0\%$ pro Pellet verglichen mit $5,0 \pm 10,2\%$ in den Kontrollen. Drei Spender zeigten eine geringe Differenzierung von 25%. Dies waren nicht die gleichen drei

Ergebnisse

Spender, die bei der adipogenen Differenzierung eine geringere Fettverteilung aufwiesen.

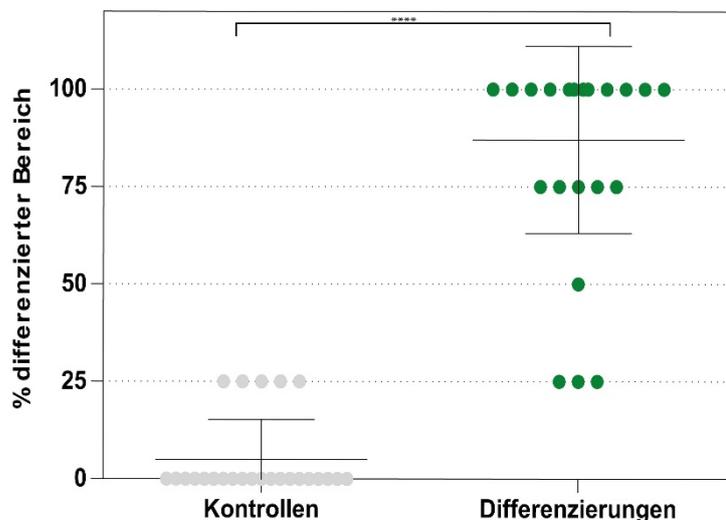


Abbildung 27: Vergleich der undifferenzierten Kontrollen mit den differenzierten Zellen nach chondrogener Differenzierung.

Der differenzierte Bereich wurde im Vergleich zur gesamten Fläche der beurteilten Zelle angegeben und in 25%-Schritten durch drei unabhängige Untersucher in einer optischen Analyse ermittelt. Die chondrogen differenzierten Zellen bildeten einen statistisch signifikant höheren Anteil an Proteoglykan als die undifferenzierten Kontrollen. (Signifikanzniveau: ****) $p \leq 0.0001$). Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

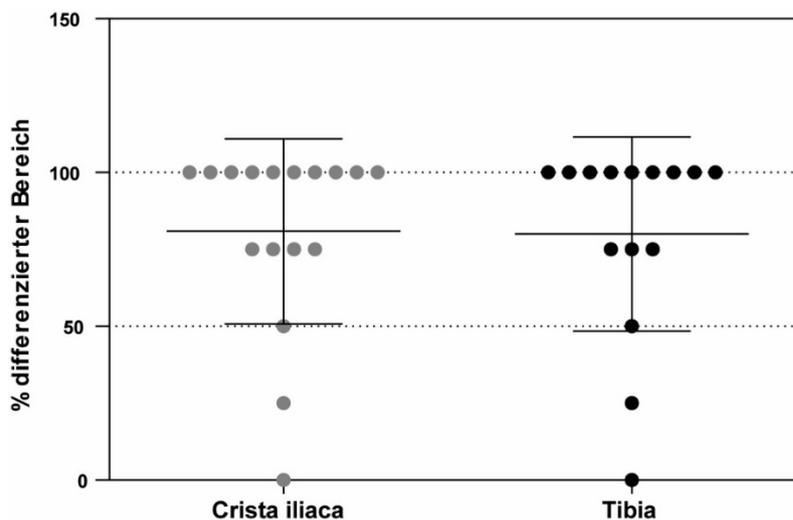


Abbildung 28: Vergleich der chondrogenen Differenzierung beider Entnahmestellen.

Der differenzierte Bereich wurde im Vergleich zur gesamten Fläche der beurteilten Zelle angegeben und in 25%-Schritten durch drei unabhängige Untersucher in einer optischen Analyse ermittelt. Der erreichte Grad der chondrogenen Differenzierung unterschied sich zwischen den beiden Entnahmestellen nicht. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

Ergebnisse

Beim Vergleich der beiden Entnahmestellen ergab sich für die Crista iliaca ein differenzierter Bereich von $80,9 \pm 30,0\%$ und für die Tibia ein differenzierter Bereich von $80,0 \pm 31,6\%$ (Abbildung 28). Die Unterschiede zwischen Beckenkamm und Tibia waren statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $n = 17$ (Crista iliaca) und $n = 15$ (Tibia), $p > 0,05$).

Bei der Analyse nach dem Alter der Spender zeigte sich in der jüngeren Gruppe ein chondrogen differenzierter Bereich von $80,6 \pm 34,9\%$ für Zellen aus dem Beckenkamm, und von $75,0 \pm 35,4\%$ für Zellen aus der Tibia. Die Zellen der älteren Gruppen erreichten mit $81,3 \pm 25,9\%$ (Beckenkamm) und $85,7 \pm 28,4\%$ (Tibia) einen minimal höheren differenzierten Bereich (Abbildung 29). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch ebenfalls nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $n = 9$ (Beckenkamm jung), 8 (Tibia jung, Beckenkamm alt), 7 (Tibia alt), $p > 0,05$).

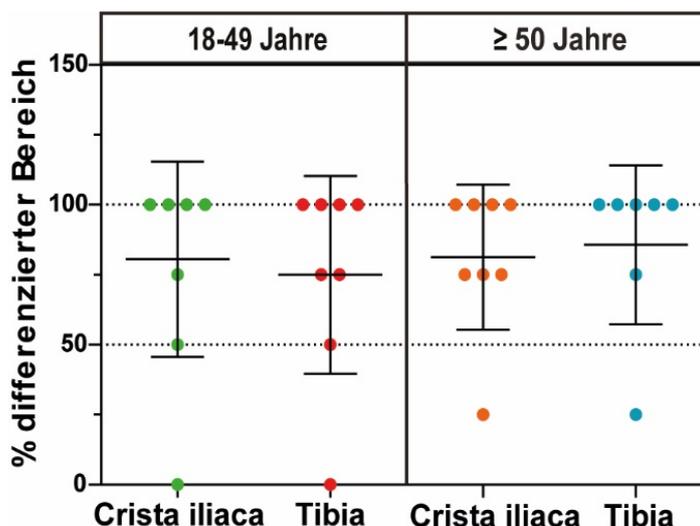


Abbildung 29: Vergleich des Erfolgs der chondrogenen Differenzierung zwischen den verschiedenen Entnahmestellen und Altersgruppen.

Der differenzierte Bereich wurde im Vergleich zur gesamten Fläche der beurteilten Zelle angegeben und in 25%-Schritten durch drei unabhängige Untersucher in einer optischen Analyse ermittelt. Der Vergleich der verschiedenen Altersgruppen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede für den Grad der erreichten chondrogenen Differenzierung. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (Übernommen und angepasst aus Prall et al. 2018).

Die Korrelation des differenzierten Bereichs mit dem Alter ergab eine gute Differenzierung in allen Altersgruppen (Abbildung 30A), und tendentiell eine Zunahme

Ergebnisse

der Differenzierung mit steigendem Alter für Tibia und Beckenkamm (Abbildung 30B (Spearman-Test $r = 0,121$, $n = 17$, $p > 0,05$) und C (Spearman-Test $r = 0,236$, $n = 16$, $p > 0,05$)).

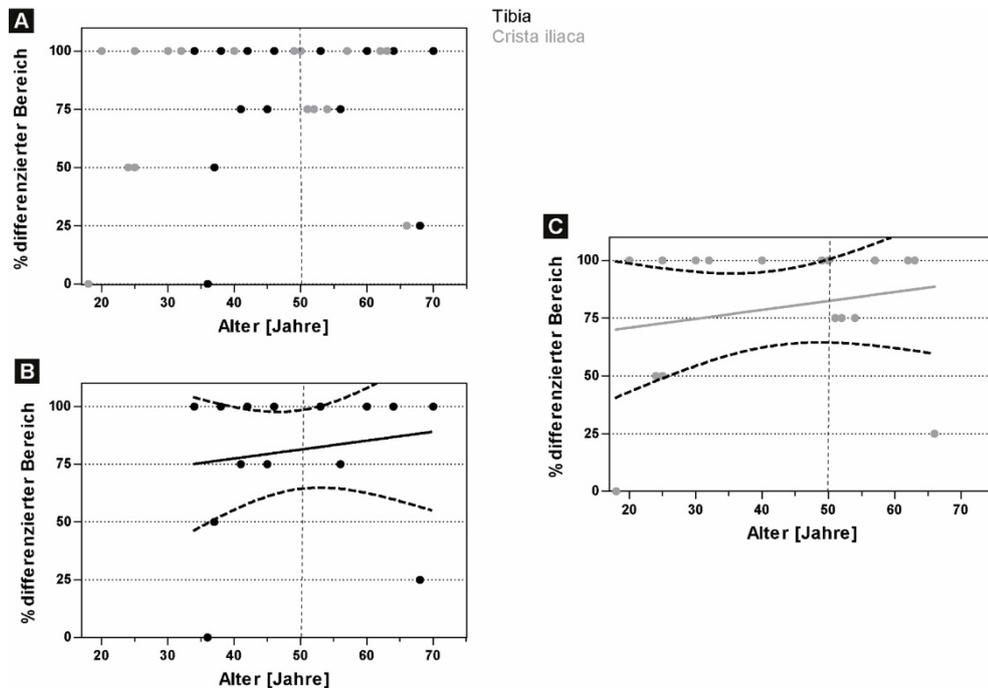


Abbildung 30: Altersbezogene Korrelation des differenzierten Bereichs nach chondrogener Differenzierung.

Der differenzierte Bereich wurde im Vergleich zur gesamten Fläche der beurteilten Zelle angegeben und in 25%-Schritten durch drei unabhängige Untersucher in einer optischen Analyse ermittelt. (A) Die meisten Zellen aus beiden Entnahmestellen zeigen eine gute Differenzierung, unabhängig vom Alter. (B) Für die Zellen aus dem Beckenkamm zeigte sich mit steigendem Alter ein zunehmender Grad der Differenzierung, ebenso wie für die Zellen aus der Tibia (C). Der Anstieg war jeweils statistisch nicht signifikant. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

3.4.3. Die osteogene Differenzierung zeigte über alle Gruppen hinweg keinen signifikanten Unterschied

Mit der osteogenen Differenzierung wird die Fähigkeit der osteogenen Vorläuferzellen untersucht extrazelluläre Matrix zu bilden (Jaiswal et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die osteogene Differenzierung der Zellen für 14 Tage induziert und die Bildung von extrazellulärer Matrix nach diesem Zeitraum mittels Alizarin Rot-Färbung quantifiziert. In der qualitativen Analyse der histologischen Schnitte ließen sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Zellen jüngerer und älterer Spender aus dem Beckenkamm im Hinblick auf die Bildung der Calciummatrix feststellen. Für die

Ergebnisse

Zellen aus der Tibia schienen die von jüngeren Spendern ein tendentiell geringeres Level der Matrixbildung aufzuweisen als die der älteren Spender. Die undifferenzierten Kontrollen aller Altersgruppen und Entnahmestellen bildeten jeweils keine extrazelluläre Matrix und konnten auch nicht durch Alizarin Rot angefärbt werden (Abbildung 31).

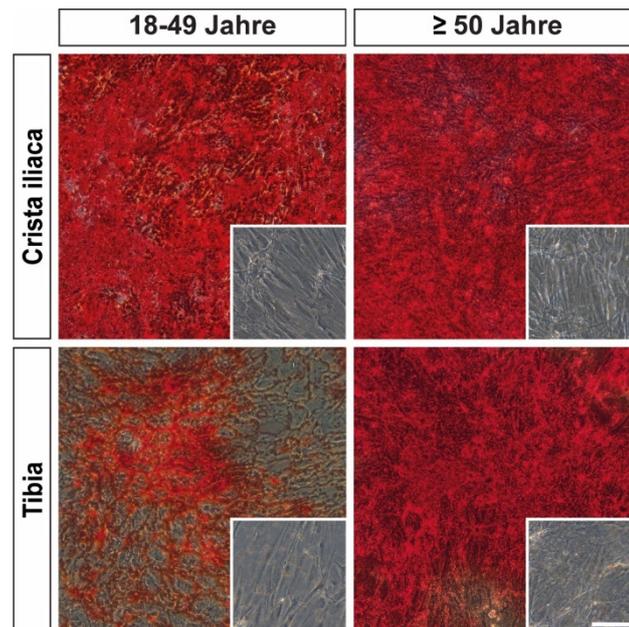


Abbildung 31: Exemplarischer Vergleich osteogen differenzierter Zellen mit undifferenzierten Kontrollen nach Alizarin Rot Färbung.

Im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollen (kleine Kästen rechts unten) zeigten alle Gruppen nach 14 Tagen osteogener Differenzierung eine deutliche Bildung von extrazellulärem Calcium und eine Anfärbbarkeit mit Alizarin Rot. Maßstab: 100 μ m, (Übernommen und angepasst aus Prall et al. 2018).

Die quantitative Analyse erfolgte mittels Anfärbung mit Alizarin Rot und Messung der optischen Dichte 14 Tage nach der Induktion der Differenzierung. Für die meisten Spender ließ sich ein Anstieg der calciumphosphathaltigen extrazellulären Matrixbildung zwischen dem 7. und 14. Tag der osteogenen Differenzierung beobachten. 4 Spender zeigten eine Abnahme der Matrixbildung zwischen Tag 7 und Tag 14 (Abbildung 32A). Betrachtet man die Matrixbildung der einzelnen Gruppen der beiden Entnahmestellen an den Tagen 7 und 14, zeigte sich in allen Gruppen ein Anstieg der Matrixbildung im Verlauf der osteogenen Differenzierung. Die gemessene optische Dichte der jüngeren Beckenkammgruppe stieg von $0,6 \pm 0,9$ mM an Tag 7 auf $1,5 \pm 1,0$ mM an Tag 14. Der Anstieg war statistisch nicht signifikant (Wilcoxon

Ergebnisse

Paarvergleichstest, $n = 9$, $p > 0,05$). Demgegenüber stieg die Intensität der Alizarin Rot Färbung bei der jüngeren Tibiagruppe von $0,3 \pm 0,5$ mM an Tag 7 auf $1,2 \pm 1,4$ mM an Tag 14. Aufgrund der hohen Variabilität der Anstiege an Tag 14 war auch hier der Unterschied statistisch nicht signifikant (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 9$, $p > 0,05$). Anders verhielt es sich mit den Zellen der älteren Gruppe. Hier stieg die optische Dichte der Beckenkammzellen von $0,3 \pm 0,4$ mM an Tag 7 auf $1,5 \pm 1,2$ mM an Tag 14, was einen statistisch signifikanten Unterschied ausmachte (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 9$, $p = 0,0039$). Für die Tibia erreichten die Zellen an Tag 7 eine optische Dichte von $0,4 \pm 0,4$ mM, diese war an Tag 14 auf $2,2 \pm 1,1$ mM angestiegen. Auch dieser Anstieg war statistisch signifikant (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 8$, $p = 0,0156$). Beim Vergleich der optischen Dichte der einzelnen Gruppen an Tag 14, ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA Kruskal-Wallis Test, $n = 9$ (Beckenkamm jung und alt, Tibia jung), $n = 8$ (Tibia alt), $p > 0,05$, Abbildung 32B).

Bei der Aufschlüsselung der Zellen aller Spender nach dem Alter ließ sich eine große Variabilität der extrazellulär gebildeten Matrix, gemessen mittels optischer Dichte, beobachten (Abbildung 33A). Für die Zellen aus dem Beckenkamm ließ sich eine diskrete Abnahme der Matrixbildung mit steigendem Alter (Abbildung 33B, Pearson-Test $r = -0,050$, $n = 18$ $p > 0,05$) beobachten, während die Zellen aus der Tibia eine tendentiell gesteigerte Matrixbildung mit zunehmendem Alter zeigten, ohne dass es statistisch signifikant war (Pearson-Test $r = -0,053$, $n = 17$, $p > 0,05$).

Ergebnisse

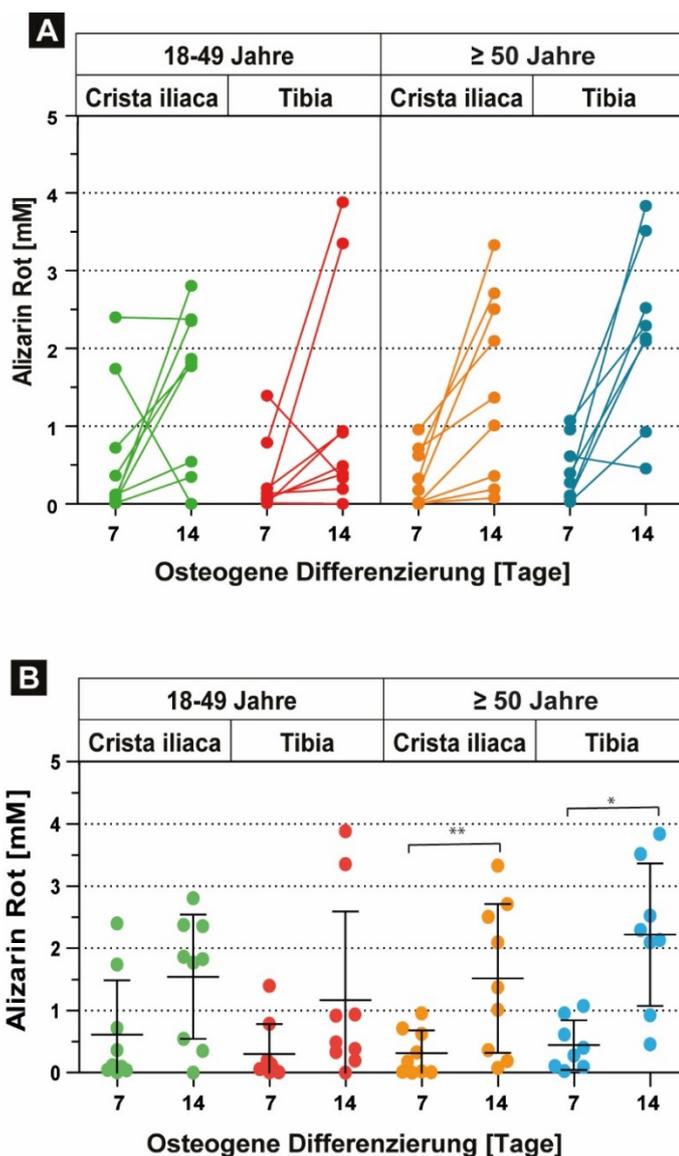


Abbildung 32: Quantitative Darstellung des Erfolgs der osteogenen Differenzierung nach Alizarin Rot Färbung.

Nach der osteogenen Differenzierung der Spenderzellen erfolgte die Färbung mit Alizarin Rot um die Entwicklung der Matrixbildung darzustellen. Die Färbung erfolgte nach 7 und 14 Tagen. (A) Darstellung der einzelnen Spender und der Verlauf der Matrixbildung zwischen Tag 7 und Tag 14. Bis auf wenige Ausnahmen zeigt sich bei allen Spendern eine Zunahme der Matrixbildung. Die zusammengehörigen Werte jeweils eines Spenders an Tag 7 und 14 wurden mit einer Linie verbunden, um den Anstieg oder die Abnahme der optischen Dichte darzustellen. (B) Nach 14 Tagen zeigte sich insgesamt in allen Gruppen ein Anstieg der Matrixbildung im Vergleich zu der Färbung nach 7 Tagen. Der Verlauf der osteogenen Differenzierung zwischen Tag 7 und 14 ergab in der älteren Gruppe sowohl des Beckenkamms als auch der Tibia einen statistisch signifikanten Anstieg der gemessenen optischen Dichte, während die Anstiege der jüngeren Gruppe nicht signifikant waren (Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$). Ein Vergleich der einzelnen Gruppen an Tag 14 ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (Übernommen und angepasst aus Prall et al. 2018).

Ergebnisse

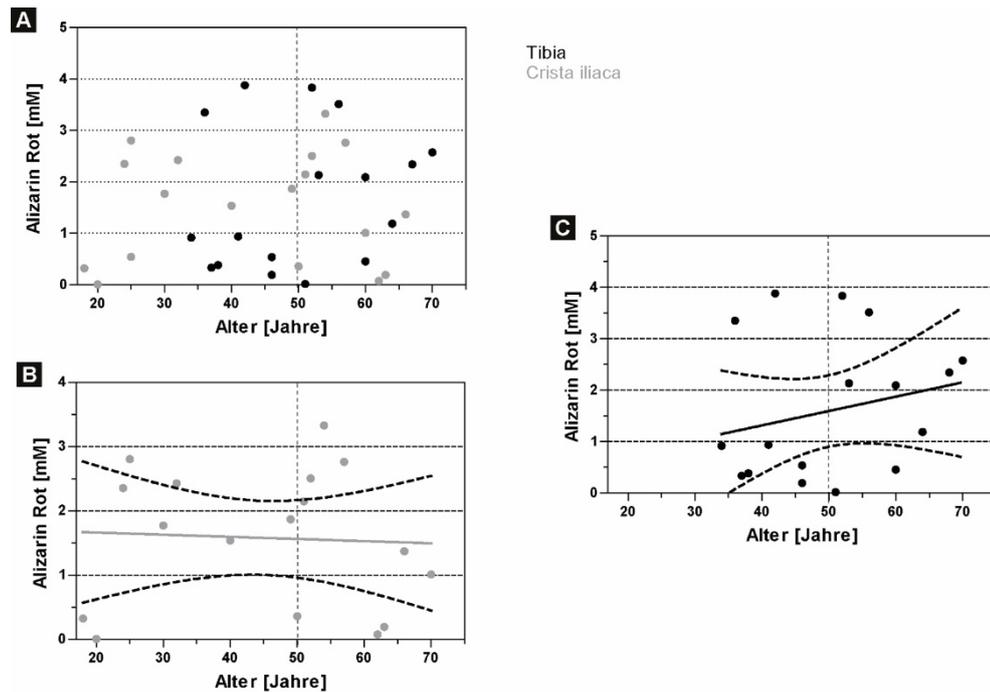


Abbildung 33: Altersbezogene Matrixbildung der osteogenen Differenzierung.

(A) Der Erfolg der Alizarin Rot Färbung als Ausdruck der Matrixbildung nach osteogener Differenzierung über 14 Tage zeigte für beide Entnahmestellen eine große Variabilität in allen Altersgruppen. (B) Die Zellen des Beckenkamms zeigten mit zunehmendem Alter eine minimale, statistisch nicht signifikante Abnahme der Matrixbildung. (C) Die Zellen der Tibia zeigten eine zunehmende Differenzierung mit steigendem Alter. Der Anstieg war statistisch nicht signifikant. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender.

3.4.4. In der qPCR zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die Hochregulierung der Expression osteoblastenspezifischer Gene

Es wurden die Transkriptionsfaktoren *DLX5*, *RUNX2* und *OSX* sowie die extrazellulären Moleküle *ALPL*, *SPP1* und *OCN* untersucht.

Für *DLX5* zeigte sich im Verlauf der osteogenen Differenzierung in allen Gruppen eine Zunahme der Expression im Vergleich mit Tag 0 zwischen Tag 7 und Tag 14 (Abbildung 34A). In der jüngeren Beckenkammgruppe zeigte sich an Tag 7 eine $1,4 \pm 0,9$ -fach erhöhte Expression, welche an Tag 14 auf das $1,6 \pm 0,7$ -fache anstieg. In der jüngeren Tibiagruppe erhöhte sich die Expression vom $1,3 \pm 0,9$ -fachen an Tag 7 auf das $1,7 \pm 0,8$ -fache an Tag 14. In den älteren Gruppen zeigte sich für den Beckenkamm eine $0,9 \pm 0,7$ -fache Expression an Tag 7 sowie eine $1,9 \pm 1,3$ -fache Expression an Tag 14. Der Anstieg in der älteren Tibiagruppe zeigte sich geringer mit einer $0,9 \pm 0,5$ -fachen Expression an Tag 7 und einem Anstieg auf das $1,4 \pm 0,8$ -fache an Tag 14. Nur in der Gruppe der älteren Beckenkammspender zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Expression zwischen Tag 7 und Tag 14 (Wilcoxon

Ergebnisse

Paarvergleichstest, $n = 7$, $p = 0,0313$). In den restlichen Gruppen zeigten sich für den Anstieg zwischen Tag 7 und 14 keine signifikanten Unterschiede (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 8$ (Tibia jung und alt, Crista iliaca jung), $p > 0,05$). Auch für den Vergleich der einzelnen Entnahmestellen an Tag 14 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (ANOVA-Kruskal-Wallis Test, $n = 8$ (Tibia jung und alt, Crista iliaca jung), $n = 7$ (Crista iliaca alt), $p > 0,05$).

Der Transkriptionsfaktor *RUNX2* zeigte nur für die Zellen der jüngeren Beckenkammgruppe keinen Anstieg der Expression zwischen Tag 7 und 14 (Abbildung 34B). Hier zeigte sich eine $2,2 \pm 1,2$ -fache Expression an Tag 7, welche auf eine $2,0 \pm 0,9$ -fache Expression an Tag 14 absank. In der jüngeren Tibiagruppe stieg die Expression vom $1,7 \pm 1,2$ -fachen an Tag 7 auf das $3,1 \pm 1,9$ -fache an Tag 14. Die ältere Beckenkammgruppe zeigte einen Anstieg der Expression vom $4,2 \pm 3,5$ -fachen an Tag 7 auf das $5,4 \pm 5,3$ -fache an Tag 14. Die Expression der älteren Tibiagruppe stieg vom $2,0 \pm 1,1$ -fachen auf das $2,7 \pm 1,7$ -fache an Tag 14 an. Nur in der jüngeren Tibiagruppe war der Anstieg der Expression zwischen Tag 7 und Tag 14 statistisch signifikant (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 8$, $p = 0,0391$). In den anderen drei Gruppen kam es nicht zu einer signifikanten Veränderung der Expression (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 8$ (Crista iliaca jung, Tibia alt), $n = 6$ (Crista illiaca alt), $p > 0,05$). Der Vergleich der erreichten Expression von *RUNX2* aller Gruppen an Tag 14 ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA-Kruskal-Wallis-Test, $n = 8$ (Tibia alt, jung, Crista iliaca jung), $n = 6$ (Crista iliaca alt), $p > 0,05$).

Im Gegensatz zu den zuvor genannten Transkriptionsfaktoren zeigte *OSX* keinen Anstieg der Exprimierung (Abbildung 34C). In der jüngeren Tibiagruppe wurde an Tag 7 eine $0,5 \pm 0,2$ -fache Exprimierung gemessen, welche an Tag 14 marginal auf das $0,5 \pm 0,2$ -fache angestiegen war. In der jüngeren Beckenkammgruppe zeigte sich an Tag 7 eine $1,1 \pm 1,0$ und an an Tag 14 eine $1,1 \pm 1,4$ -fache Exprimierung. In der älteren Tibiagruppe sank die Exprimierung von *OSX* vom $0,7 \pm 0,5$ -fachen an Tag 7 auf das $0,6 \pm 0,6$ -fache an Tag 14. Die Exprimierung in der älteren Beckenkammgruppe stieg vom $1,0 \pm 0,7$ -fachen auf das $1,4 \pm 1,4$ -fache an Tag 14. In keiner Gruppe gab es einen statistisch signifikanten Anstieg zwischen Tag 7 und Tag 14 (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 8$ (Tibia jung, Beckenkamm jung), $n = 7$ (Tibia alt), $n = 6$ (Beckenkamm alt), $p > 0,05$). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen an Tag 14 waren ebenfalls nicht signifikant. (ANOVA Kruskal-Wallis-Test, $n = 8$ (Tibia jung, Beckenkamm jung), $n = 7$ (Tibia alt), $n = 6$ (Beckenkamm alt), $p > 0,05$).

Ergebnisse

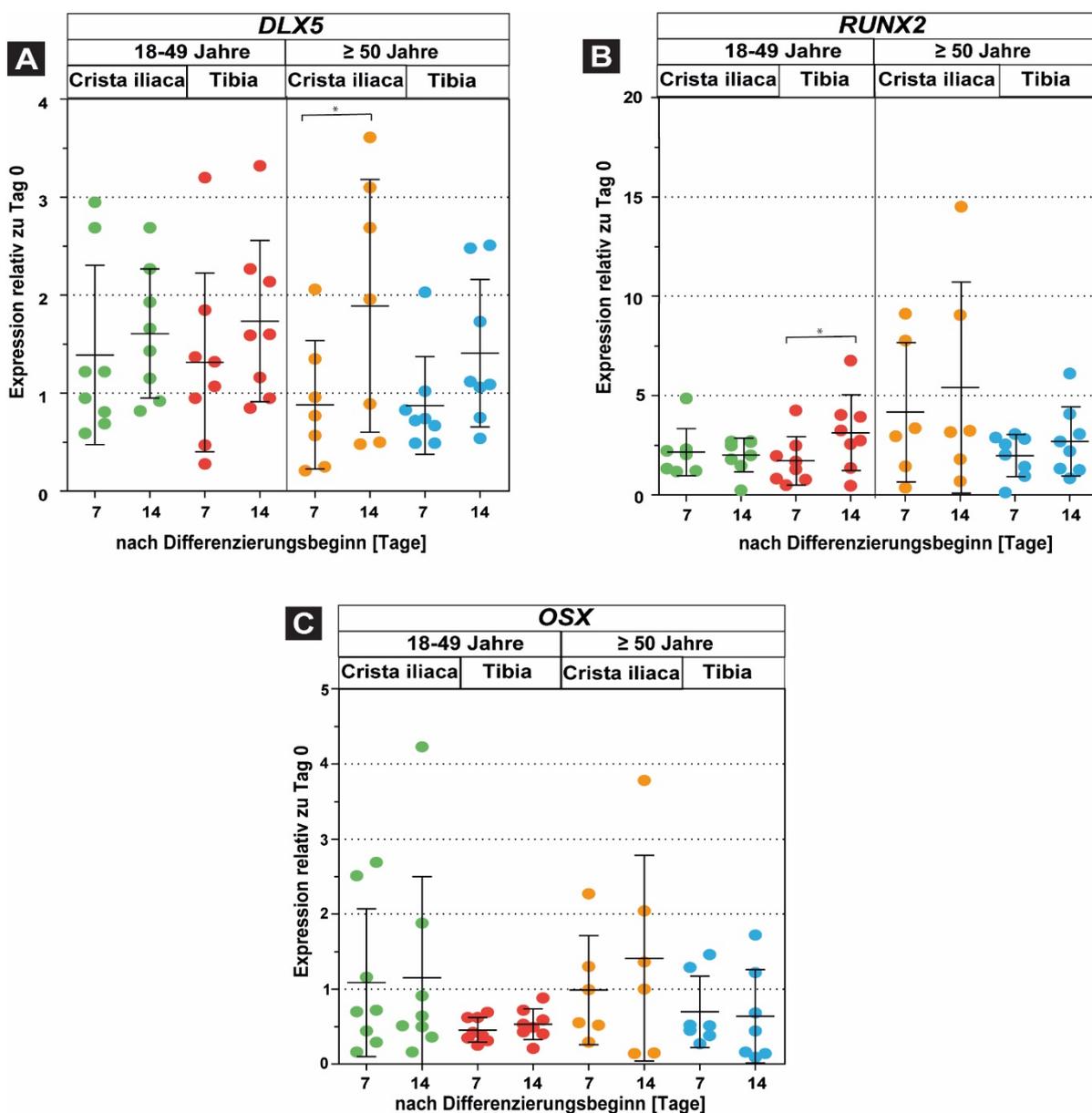


Abbildung 34: Expression der osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktoren *DLX5*, *RUNX2* und *OSX* während und nach osteogener Differenzierung mittels qPCR.

(A) Im Vergleich zum Beginn der osteogenen Differenzierung zeigte sich zwischen Tag 7 und Tag 14 in allen Gruppen eine zunehmende Expression von *DLX5*, welche allerdings nur in der älteren Beckenkammgruppe statistisch signifikant war. (B) Bis auf die jüngere Gruppe der Beckenkammspender zeigte sich auch für *RUNX2* eine zunehmende Expression zwischen Tag 7 und Tag 14 der osteogenen Differenzierung. Der Anstieg der Expression in der jüngeren Tibiagruppe war statistisch signifikant. (C) Es kam in keiner Gruppe zu einer deutlichen Expression von *OSX*. Die Unterschiede in der Expression aller Gruppen an Tag 14 war für alle Transkriptionsfaktoren jeweils nicht statistisch signifikant. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$). (Übernommen und angepasst aus Prall et al. 2018).

Ergebnisse

Eine donorspezifische Aufschlüsselung zeigte bei den meisten Spendern eine zunehmende Expression von *DLX5* und *RUNX2* im Verlauf der osteogenen Differenzierung (Abbildung 35A und B). *OSX* zeigte bei den meisten Spendern keine Hochregulation der Expression (Abbildung 35C).

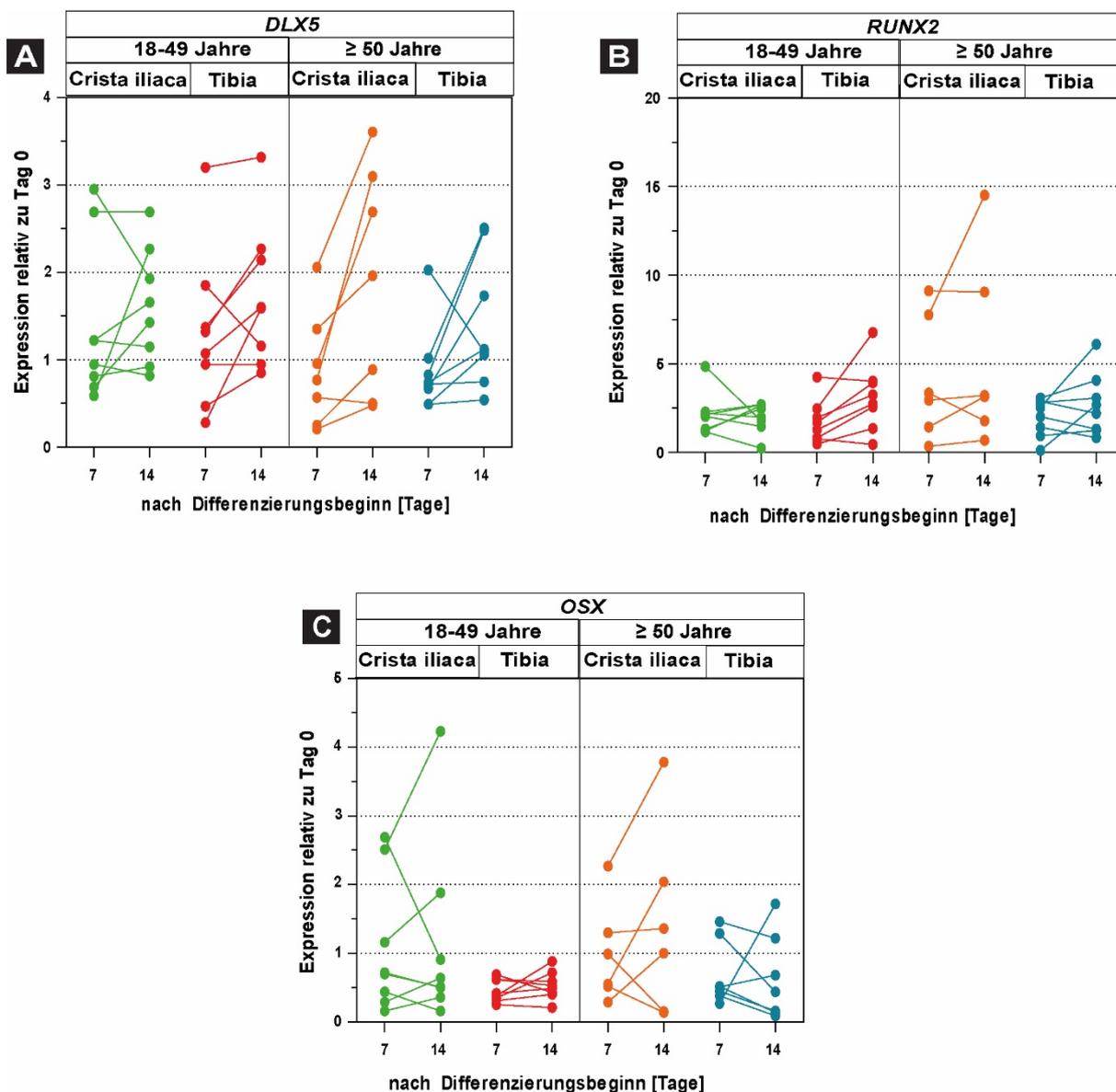


Abbildung 35: Spenderspezifische Expression der osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktoren *DLX5*, *RUNX2* und *OSX* während und nach osteogener Differenzierung mittels qPCR.

Dargestellt ist die Entwicklung der Expression zwischen Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zum Beginn der Differenzierung. (A) und (B) zwischen Tag 7 und Tag 14 kam es bei den meisten Spendern in allen Gruppen im Vergleich zum Start der osteogenen Differenzierung zu einer Zunahme der Expression von *DLX5* und *RUNX2*. (C) *OSX* zeigte bei den meisten Spendern keine deutliche Hochregulation der Expression. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender, die zusammengehörigen Werte jeweils eines Spenders an Tag 7 und 14 wurden mit einer Linie verbunden um den Anstieg oder die Abnahme der Expression darzustellen.

Ergebnisse

Über alle Gruppen hinweg kam es nur zu einer geringen Expression von ALPL im Verlauf der osteogenen Differenzierung (Abbildung 36A). In der jüngeren Beckenkammgruppe verringerte sich die Expression von dem $1,8 \pm 1,0$ -fachen an Tag 7 auf das $1,5 \pm 1,2$ -fache an Tag 14. Auch in der jüngeren Tibiagruppe kam es zu einer Abnahme der Expression vom $2,5 \pm 2,1$ -fachen an Tag 7 auf das $1,9 \pm 1,3$ -fache an Tag 14. Ebenso sank die Expression in der älteren Tibiagruppe vom $2,8 \pm 2,4$ -fachen an Tag 7 auf das $1,3 \pm 0,9$ -fache an Tag 14. Nur in der älteren Beckenkammgruppe kam es zu einem Anstieg der Expression von dem $1,1 \pm 0,9$ -fachen an Tag 7 auf das $1,9 \pm 2,1$ -fache an Tag 14. In keiner Gruppe kam es zu einer statistisch signifikanten Änderung der Expression zwischen Tag 7 und Tag 14 (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 6$ (Beckenkamm alt), $n = 8$ (Beckenkamm jung, Tibia jung und alt), $p > 0,05$).

SPP1 zeigte eine deutliche Expression nach 7 und 14 Tagen in allen Gruppen. (Abbildung 36B). In beiden Beckenkammgruppen zeigte sich eine leichte Abnahme der Expression zwischen Tag 7 und 14. In der jüngeren Gruppe fiel die Expression vom $14,1 \pm 8,4$ -fachen auf das $12,1 \pm 15,9$ -fache ab, in der älteren Gruppe kam es zu einer Abnahme vom $13,5 \pm 12,4$ -fachen auf das $12,2 \pm 9,5$ -fache. In der jüngeren Tibiagruppe stieg die Expression von dem $7,9 \pm 4,7$ -fachen an Tag 7 auf das $10,0 \pm 7,0$ -fache an Tag 14, ebenso stieg in der älteren Tibiagruppe die Expression vom $7,6 \pm 8,4$ -fachen auf das $9,0 \pm 10,6$ -fache. In keiner Gruppe gab es signifikante Unterschiede zwischen der Änderung der Expression an Tag 7 und 14 (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 7$ (Beckenkamm alt), $n = 8$ (Beckenkamm jung, Tibia jung und alt), $p > 0,05$).

Für OCN zeigte sich in keiner Gruppe eine Steigerung der Expression (Abbildung 36C). In der jüngeren Tibiagruppe zeigte sich mit dem $0,3 \pm 0,5$ -fachen der Expression an Tag 7 und dem $0,3 \pm 0,6$ -fachen an Tag 14 ein gleichbleibender Wert, ebensowenig kam es in der älteren Tibiagruppe zu einer Veränderung der Expression. Diese betrug hier an Tag 7 das $0,2 \pm 0,2$ -fache und an Tag 14 das $0,2 \pm 0,1$ -fache. In der jüngeren Beckenkammgruppe zeigte sich an Tag 7 das $0,2 \pm 0,1$ -fache der Expression und an Tag 14 das $0,1 \pm 0,2$ -fache. Nur in der älteren Beckenkammgruppe stieg die Expression vom $0,2 \pm 0,1$ -fachen an Tag 7 auf das $0,4 \pm 0,2$ -fache an Tag 14. Es kam in keiner Gruppe zu einer statistisch signifikanten Änderung der Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung (Wilcoxon Paarvergleichstest, $n = 6$ (Beckenkamm alt), $n = 7$ (Tibia jung), $n = 8$ (Beckenkamm jung, Tibia alt), $p > 0,05$).

Ergebnisse

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen an Tag 14 waren jeweils nicht signifikant. (ANOVA Kruskal-Wallis-Test, $n = 6$ (Beckenkamm alt), $n = 7$ (Tibia jung), $n = 8$ (Beckenkamm jung, Tibia alt), $p > 0,05$).

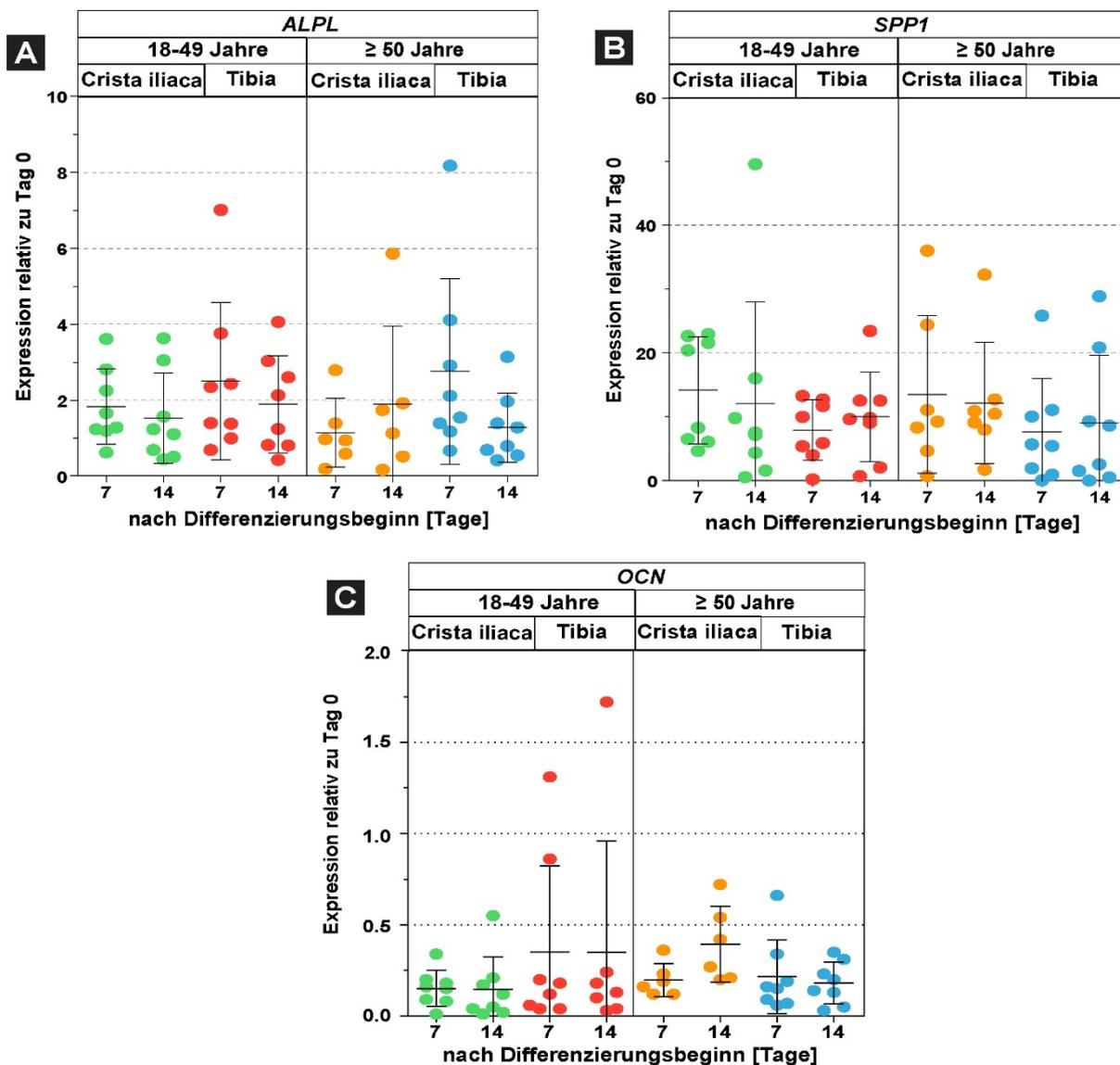


Abbildung 36: Expression der osteoblastenspezifischen extrazellulären Genmarker *ALPL*, *SPP1* und *OCN* während und nach der osteogenen Differenzierung mittels qPCR.

(A) Im Verlauf der osteogenen Differenzierung kam es in allen Gruppen im Vergleich zu Beginn der osteogenen Differenzierung zu einer Expression von *ALPL*. Ein Anstieg der Expression zwischen Tag 7 und Tag 14 war nur in der Gruppe der älteren Beckenkammspender zu beobachten. (B) Auch für *SPP1* kam es im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu einer deutlichen Expression des Gens. In den Tibiagruppen konnte ein Anstieg zwischen Tag 7 und Tag 14 beobachtet werden, während in den Beckenkammgruppen eine Abnahme zu verzeichnen war. (C) Für *OCN* zeigte sich in keiner Gruppe eine nennenswerte Hochregulierung der Expression. Die Anstiege bzw. Abnahmen der Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung waren jeweils statistisch nicht signifikant. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender. (Übernommen und angepasst aus Prall et al. 2018).

Ergebnisse

Zur besseren Übersicht wurde die Expression der einzelnen Marker spenderspezifisch aufgeschlüsselt. Zwischen Tag 7 und Tag 14 zeigte sich bei den jungen Spenderzellen eine ausgeglichene Expression von *ALPL*, bei den Zellen der alten Gruppe kam es jeweils bei mehreren Spendern zu einem starken Rückgang der Expression (Abbildung 37A). In allen Gruppen wurde eine erhöhte Expression von *SPP1* erreicht, auch wenn es bei einzelnen Spendern zum Rückgang der Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung kam (Abbildung 37B). Die Expression von *OCN* war bei den meisten Spendern nur gering und konnte während der Differenzierung auch nicht gesteigert werden. Die alte Beckenkammgruppe zeigte bei den meisten Spendern eine zumindest geringe Zunahme der Expression von *OCN*. Nur zwei Spender der jungen Tibiagruppe zeigten von vornherein eine höhere Expression von *OCN* und auch eine deutliche Steigerung im Verlauf der osteogenen Differenzierung. (Abbildung 37C).

Ergebnisse

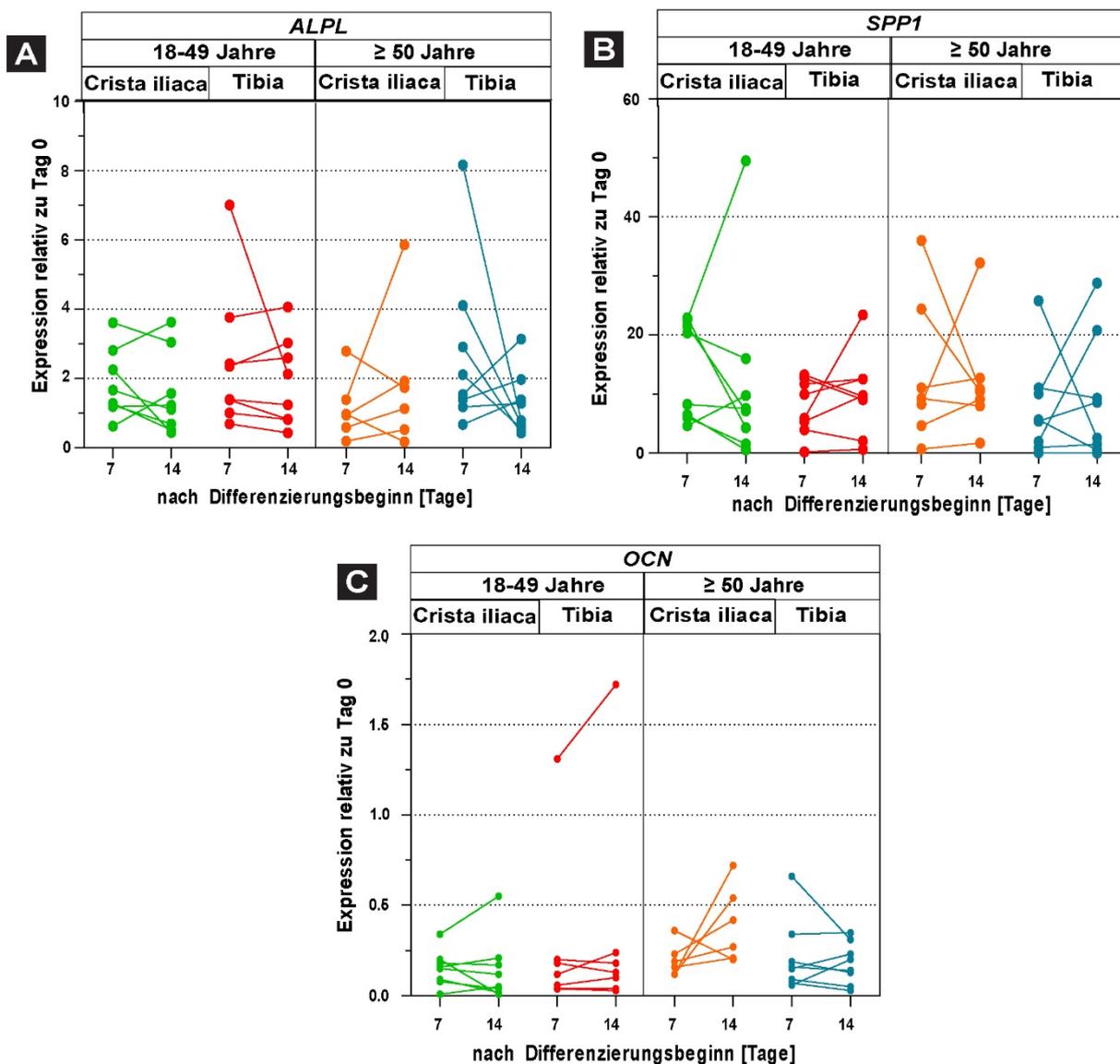


Abbildung 37: Spenderspezifische Expression der osteoblastenspezifischen extrazellulären Genmarker *ALPL*, *SPP1* und *OCN* während und nach der osteogenen Differenzierung.

Dargestellt ist die Entwicklung der Expression zwischen Tag 7 und 14 der osteogenen Differenzierung im Vergleich zum Beginn der Differenzierung. (A) In jeder Gruppe gab es Spender mit einer Zu- aber auch einer Abnahme der Expression von *ALPL*. (B) *SPP1* zeigte insgesamt eine erhöhte Expression, auch hier zeigte sich in allen Gruppen sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme im Verlauf der osteogenen Differenzierung. (C) *OCN* wurde insgesamt nur sehr gering exprimiert und gerade in den jungen Gruppen stieg die Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung auch nicht deutlich an. Die Zellen der älteren Beckenkammspender zeigten einen teilweise deutlichen Anstieg der Expression nach 14 Tagen, während die Zellen der älteren Tibiaspender ein eher ausgeglichenes Verhältnis zwischen Zu- und Abnahme der Expression zeigten. Jeder Punkt repräsentiert einen Spender, die zusammengehörigen Werte jeweils eines Spenders an Tag 7 und 14 wurden mit einer Linie verbunden um den Anstieg oder die Abnahme der Expression darzustellen.

4. Diskussion

Zur Heilung größerer Knochendefekte wird derzeit meist entweder eine allogene oder autologe Knochen transplantation durchgeführt. Zur Gewinnung von autologem Knochenmaterial gilt bis heute die Entnahme aus dem Beckenkamm als „Goldstandard“. Dies ist der Fall obwohl bekannt ist, dass die Entnahme an dieser Stelle ein hohes Risiko für Komplikationen, wie beispielsweise anhaltende Schmerzen oder Nervenschäden birgt (Ahlmann et al., 2002; Baumhauer et al., 2013). Entsprechend ist die Suche nach alternativen Entnahmestellen, an denen die Entnahme zu weniger Komplikationen führt, wichtig. Diverse Studien konnten die Vorteile der proximalen Tibia als Entnahmestelle im Hinblick auf die Entnahmemorbidity nachweisen (Alt et al., 1999; Chen et al., 2006; Myeroff and Archdeacon, 2011). Außerdem ist diese Entnahmestelle wesentlich einfacher zu erreichen. Bisher nicht beantwortet ist aber die Frage, ob die Qualität der gewonnenen Knochenspongiosa aus der proximalen Tibia mit der Qualität der Spongiosa aus dem Beckenkamm vergleichbar ist. Die transplantierte Spongiosa erfüllt nach der Transplantation mehrerer Aufgaben. Sie füllt den Knochendefekt aus und unterstützt die Knochenheilung durch die in der Spongiosa vorhandenen mesenchymalen Stamm- und osteogenen Vorläuferzellen, die sich zu Osteoblasten ausdifferenzieren können. Narbona-Carceles et al. konnten zeigen, dass aus der proximalen Tibia gewonnene Zellen einen ähnlichen Phänotypen sowie ein vergleichbares multilineares Differenzierungspotential besitzen, wie Zellen aus dem Beckenkamm (Narbona-Carceles et al., 2014). Über den Phänotyp hinaus sind aber die Fähigkeit zur Proliferation und die osteogene Differenzierung nach der autologen Transplantation wichtige Eigenschaften der Zellen. Bisher liegen keine Studien vor, die die Proliferation und die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung der Zellen aus den beiden Entnahmestellen vergleichen. In der hier vorgestellten Studie wurden 53 Spender eingeschlossen, um die Proliferationskapazität sowie die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung der Zellen aus dem Beckenkamm und der proximalen Tibia zu vergleichen. Zusätzlich wurden die altersbezogenen Unterschiede der Zellen beider Entnahmestellen untersucht, da einige Autoren einen Rückgang, sowohl der Zellzahl, als auch der Qualität der gewonnenen Zellen mit steigendem Alter angaben (Garvin et al., 2007; Muschler et al., 2001; Nishida et al., 1999).

4.1. Die Zellen wurden ausschließlich aus Knochenspongiosa gewonnen

Die in der vorliegenden Arbeit isolierten Zellen stammten aus Knochenspongiosa, die entweder aus dem Beckenkamm oder der proximalen Tibia von insgesamt 53 Spendern gewonnen wurde. Die Gewinnung erfolgte zunächst durch das Waschen der Spongiosa, um die Knochen trabekel danach mittels Kollagenase II zu verdauen und so weitere Knochenzellen aus dem Knochen zu lösen. Andere Studien, die hMSCs aus unterschiedlichen Entnahmestellen untersuchen, verwendeten meist Knochenmarksaspirate (Muschler et al., 2001; Narbona-Carceles et al., 2014; Zaim et al., 2012). Diese unterschiedliche Technik könnte zu einer andersartigen Zellzusammensetzung führen. Das Verfahren, die Zellen aus Spongiosa zu gewinnen, ist sicherlich näher an der Realität als Knochenmarksaspirate zu untersuchen.

4.2. Die Zellmenge, die Zellqualität und das Zellwachstum waren in beiden Gruppen vergleichbar

Basierend auf der ersten Zellzählung nach der Zellisolierung erfolgte anhand der Kenntnis der mittleren PDT und der Annahme eines linearen Zellwachstums eine Rückrechnung auf die ursprünglich isolierte Zellzahl. Diese wurde auf das Gewicht der gewonnenen Knochenspongiosa bezogen. Somit wurde die Zahl der vorhandenen adhären Zellen pro Gramm Gewebe berechnet.

Pro aus der Tibia gewonnenem Gramm Gewebe adhärten im Mittel ca. 300.000 Zellen (330.000 (jüngere Gruppe) bzw. 260.000 (ältere Gruppe)). Pro Gramm Gewebe aus dem Beckenkamm waren es im Mittel ca. 410.000 Zellen (340.000 in der jüngeren bzw. 480.000 Zellen in der älteren Gruppe). Dies war also für beide Entnahmestellen vergleichbar. Narbona-Carceles et al. gewannen eine höhere Anzahl an mononukleären Zellen aus Knochenmarksaspiraten. Allerdings fand sich nach Abschluß der Expansionsphase kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den kultivierten hMSCs des Beckenkamms und denen der Tibia (Narbona-Carceles et al., 2014). Auch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Zahl der adhären Zellen der jüngeren und der älteren Gruppen der Entnahmestellen. Dies unterscheidet sich von der Abnahme der Anzahl der gewonnenen mononukleären Zellen mit steigendem Alter, welche u.a. von Muscher et al. beschrieben wurde (Muschler et al., 2001).

Diskussion

Die Proliferationskapazität der Zellen wurde durch die Erfassung der kumulativen Populationsverdopplungen, der gebildeten Kolonien, sowie der metabolischen Aktivität der Zellen quantifiziert. Es erfolgte ein Vergleich der beiden Entnahmestellen sowie der unterschiedlichen Altersgruppen.

Nach der 8-wöchigen Expansion erreichten die Zellen gewonnen aus der Tibia und aus dem Beckenkamm vergleichbare, nicht signifikant unterschiedliche Werte für die kumulative Populationsverdopplung und die für eine Verdopplung benötigte Zeit.

Das Zellwachstum blieb über die gesamten 8 Wochen konstant. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Bruder et al., die zeigen konnten, dass Zellen aus dem Beckenkamm auch in höheren Passagen noch imstande sind sich zu teilen. Allerdings erreichten die Zellen in deren Untersuchung nach 8 Passagen eine kumulative Populationsverdopplung von etwa 28, was deutlich höher war, als in der hier durchgeführten Studie (Bruder, 1997). Dies könnte an der unterschiedlichen Art der Zellgewinnung liegen, da Bruder et al. Knochenmarksaspirate verwendeten, während in der vorliegenden Studie die Zellen im Rahmen offener Biopsien aus Spongiosa gewonnen wurden.

Betrachtet man die altersbezogenen Unterschiede, zeigte sich, dass die Zellen der älteren Spender eine niedrigere cumPD erreichten, sowie mehr Zeit für eine Populationsverdopplung benötigten. Dies bestätigt die Untersuchungen von Baxter et al., die ebenfalls eine erniedrigte Poliferationskapazität von Zellen älterer Spender feststellten (Baxter et al., 2004). Interessanterweise zeigte sich bei einer Aufschlüsselung der einzelnen Spender und Ergebnisse für die cumPD und PDT aus dem Beckenkamm jeweils ein signifikanter Abfall bzw. Anstieg mit steigendem Alter während dies für die Spender der Tibia nicht der Fall war. Im Vergleich des gesamten Kollektivs zeigten sich aber keine signifikanten Unterschiede. Dies könnte daran liegen, dass sich beim Gesamtkollektiv die hohen und niedrigen Ergebnisse ausglich, während dies bei der auf die Entnahmestellen bezogenen Analyse nicht der Fall war.

Die Bildung von Zellkolonien (CFUs) war in allen Gruppen vergleichbar, dies bestätigt Untersuchungen von Muschler et al., welche Knochenmarksaspirate untersuchten und trotz eines altersbezogenen Unterschieds bei weiblichen Spendern, insgesamt keinen altersbezogenen Unterschied bei der Bildung von Kolonien nachweisen konnten (Muschler et al., 2001). Interessanterweise kam es bei der Anzahl der gebildeten

Diskussion

ALP-positiven Kolonien der Zellen des Beckenkamms zu einer signifikanten Zunahme der Kolonien mit steigendem Alter bei der altersbezogenen Aufschlüsselung. Dies widerspricht Erkenntnissen von Nishida et al., die zeigen konnten, dass die Anzahl ALP-positiver Kolonien ab dem Alter von 10 Jahren stetig abnimmt (Nishida et al., 1999). Die Zellen der Tibia zeigten im altersbezogenen Vergleich einen nicht signifikanten Abfall der ALP-positiven Kolonien. Zwischen den Altersgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Entnahmestellen.

Die metabolische Aktivität der gewonnenen osteogenen Vorläuferzellen wird hauptsächlich über die Atmungskette der Mitochondrien abgebildet. Mit steigendem Alter kommt es zu einer zunehmenden Abnahme der Mitochondrienfunktion (Bobryshev et al., 2014). Dies wird durch Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA) sowie einen erhöhten Anteil von Sauerstoffradikalen („reactive oxygen species“, ROS) verursacht und wird unter anderem mit der Entstehung von Osteoporose in Verbindung gebracht (Lane et al., 2015). In unserer Studie kam es zu einer über alle Gruppen hinweg gleichwertigen metabolischen Aktivität im WST-Assay, welcher näherungsweise mit der mitochondrialen Funktion assoziiert ist. Es gab also keine Hinweise auf eine altersbedingte mitochondriale Dysfunktion. Dies kann an den unterschiedlichen Messverfahren zur Erfassung der metabolischen Aktivität liegen.

4.3. Die Spenderzellen erfüllten die minimalen Kriterien für hMSCs

Mit der Adhärenz der Zellen an Plastik erfüllten alle kultivierten Zellen das erste der von Dominici et al. definierten minimalen Kriterien für hMSCs. Diese sind: 1. Plastikadhärenz, 2. Expression spezifischer Oberflächenantigene, unter anderem CD105, CD90 und CD73, 3. Multipotentes Differenzierungspotential zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten (Dominici et al., 2006).

Die von uns isolierten osteogenen Vorläuferzellen exprimierten die Genmarker CD90, CD105 und CD73, was einem der minimalen Kriterien für humane mesenchymale Stammzellen, wie von Dominici et al. postuliert, entspricht (Dominici et al., 2006). Zusätzlich exprimierten die Zellen den osteoblastenspezifischen Marker IBSP, was durch das Vorhandensein einer heterogenen Gruppe aus osteogenen Zellen und Stammzellen in Knochenspongiosa und Knochenmark gut erklärbar ist und der Definition eines osteogenen Materials entspricht (Garcia et al., 2014). Allerdings zeigte

Diskussion

sich hier mikroskopisch eine leicht verminderte Expression von IBSP bei den Zellen älterer Spender.

4.4. Die Spenderzellen aller Gruppen waren zur chondrogenen, adipogenen und osteogenen Differenzierung fähig

Die Zellen beider Entnahmestellen zeigten eine vergleichbare Fähigkeit zur chondrogenen und adipogenen Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Kontrollen. Auch ein altersbezogener Unterschied konnte nicht festgestellt werden. Dies ist interessant, da das Knochenmark mit steigendem Alter zunehmend verfettet, was mit einem erhöhten Knochenfrakturrisiko und der verlangsamten Knochenheilung im Alter einhergeht (Justesen et al., 2001). In *in vitro* Studien wurde eine erhöhte Neigung der hMSCs zur adipogenen Differenzierung mit gleichzeitig erniedrigtem Hang zur osteogenen Differenzierung beobachtet (Bethel M. et. al, 2014; Kim et al., 2012; Rosen and Bouxsein, 2006). Dies konnte von uns nicht nachvollzogen werden.

Mit der Fähigkeit zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung bewiesen die Spenderzellen ihre Multilinearität und erfüllten damit die von Dominici et. al. definierten Kriterien für mesenchymale Stammzellen (Dominici et al., 2006).

Im Verlauf der osteogenen Differenzierung kam es zwischen Tag 7 und Tag 14 zu einer deutlich vermehrten Bildung von extrazellulärer, calciumhaltiger Matrix, was sich nach der Färbung mit Alizarin Rot gut darstellen und quantifizieren ließ. Dies entspricht dem natürlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung, bei der es auch erst in einem späteren Stadium der Osteoblastenentwicklung zur Mineralisierung und Sekretion der extrazellulären Matrix kommt (Aubin, 1998). Zwischen den beiden Entnahmestellen und auch den verschiedenen Altersgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, ähnlich wie auch bei Justesen et al., die keinen altersbezogenen Unterschied für die osteogene Differenzierung von hMSC-Aspiraten aus dem Beckenkamm nachweisen konnten (Justesen et al., 2002). Dies unterscheidet sich von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die eine Abnahme der Calciumbildung mit steigendem Alter feststellten (Kretlow et al., 2008; Zaim et al., 2012). Allerdings fanden sich bei Zaim et al. die größten Unterschiede in der Calciumablagerung und Anfärbbarkeit mit Alizarin Rot während des Übergangs vom Kindes- ins Erwachsenenalter. Bei Erwachsenen ließ sich dann kein signifikanter Unterschied mehr nachweisen. Somit bietet die proximale Tibia auch im höheren Alter eine potente

Diskussion

Quelle qualitativ guten Knochenersatzmaterials im Vergleich zum „Goldstandard“ der Crista iliaca. Klinisch wurde dies bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt (Alt et al., 2003; Mauffrey et al., 2012).

Zuletzt betrachteten wir die Expression verschiedenster Markergene während des Verlaufs der osteogenen Differenzierung. Wie bereits in der Einleitung erläutert, werden während der Entwicklung der humanen mesenchymalen Stammzellen zu reifen Osteoblasten zu definierten Zeitpunkten bestimmte Enzyme und Transkriptionsfaktoren exprimiert (Aubin, 1998). Wir untersuchten die Expression der osteoblastenspezifischen Markergene *DLX5*, *OSX*, *RUNX2*, *SPP1*, *OCN* und *ALPL*. Bis auf die Markergene *OSX* und *OCN* zeigten alle untersuchten Gene eine Hochregulierung im Rahmen des Verlaufs der osteogenen Differenzierung. *OSX* wird während der gesamten Entwicklung vom Pre-Osteoblasten zum reifen Osteoblasten exprimiert und ist ein Transkriptionsfaktor der späten Phase der Mineralisierung. Umso verwunderlicher war die in unserer Studie ausbleibende Hochregulierung des Markergens in der qPCR. Insbesondere zeigte sich ein fehlender Anstieg zwischen Tag 7 und Tag 14. In Zusammenschau mit den mikroskopischen Befunden der osteogenen Differenzierung, in denen sich eine deutliche Zunahme der extrazellulären, calciumhaltigen Matrix zwischen Tag 7 und Tag 14 zeigte, hätten wir auch in der qPCR einen deutlichen Anstieg der *OSX* Expression erwartet. In einigen Studien wird eine Dauer von 21 Tagen für die osteogene Differenzierung *in vitro* postuliert. Es könnte also sein, dass die Dauer von 14 Tagen wie in dieser Studie ein nicht ausreichend langer Zeitraum für die Expression von *OSX* darstellte, obwohl die Mineralisierung zu diesem Zeitpunkt schon weit fortgeschritten war (Colter et al., 2001; Pittenger et al., 2011). Nachdem *OSX* ein Transkriptionsfaktor ist, der im Zusammenspiel mit *RUNX2* und *DLX5* die Entwicklung der Osteoblasten und die Expression anderer knochenspezifischer Gene steuert (Hojo et al., 2016), besteht aber auch die Möglichkeit, dass diese geringe Expression des Gens ausreichend ist und keine Notwendigkeit für eine Hochregulierung der Expression besteht. Auch könnte die Expression von *OSX* in den ersten Tagen höher gewesen und bereits an Tag 7 auf dieses niedrige Plateauniveau zurückgegangen sein.

Die Expression von *OCN* fiel sogar noch geringer aus, als die Expression von *OSX*. Da *OCN* noch später als *OSX* exprimiert wird und während der Frühphase der osteogenen Differenzierung überhaupt nicht vorkommt, spricht auch dieses Ergebnis

Diskussion

für einen zu frühen Abbruch der osteogenen Differenzierung vor Expression des Markers durch die differenzierten Osteoblasten (Li et al., 2016).

Dies stellt eine Limitierung unserer Studie da, da bei einer längeren Dauer der osteogenen Differenzierung vielleicht doch Unterschiede zwischen den einzelnen Entnahmestellen und Altersgruppen festzustellen gewesen wären, zumal sich bei den Zellen des Beckenkamms eine mit dem Alter signifikant abnehmende Teilungsfähigkeit der Zellen zeigte. Dies hatte allerdings keinen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten CFUs sowie die metabolische Aktivität der Beckenkammzellen und zeigte sich auch nur in der altersspezifischen Einzelaufschlüsselung der Ergebnisse, während die gruppenspezifischen Vergleiche keine signifikanten Unterschiede erbrachten. Die Proliferationskapazität der Zellen aus der proximalen Tibia war in allen Altersgruppen gleich. In allen durchgeführten Experimenten zeigte sich in allen Gruppen eine große Varianz, vor allem bei der osteogenen Differenzierung, bei der es bei einigen Spendern zu einer nur geringen Bildung von extrazellulärer Matrix kam, während andere Spender der gleichen Gruppe deutlich mehr extrazelluläre Matrix bildeten. Diese Streuung ist wahrscheinlich Folge der großen Zahl an Spendern die in die vorliegende Studie eingeschlossen werden konnten.

Die große Anzahl an untersuchten Spendern ist gleichzeitig aber auch eine Stärke der Studie, da nur so die große Variabilität auch abgebildet werden konnte. Durch die verschiedenen Experimente konnten wir die Proliferations- und Differenzierungskapazität der gewonnenen Zellen von vielen Seiten beleuchten.

Basierend auf den vorgelegten Ergebnissen ist sowohl die proliferative als auch die osteogene Potenz der Zellen aus der proximalen Tibia mit denen aus dem Beckenkamm vergleichbar. Das Alter hatte keinen Einfluß auf diese Eigenschaften der Zellen. Grundsätzlich ist insgesamt die Verwendung von autologem Knochenersatzmaterial sowohl aus dem Beckenkamm als auch aus der proximalen Tibia in jedem Alter eine gute Methode um Knochendefekte und -frakturen zu behandeln.

5. Ausblick

Mit zunehmendem Alter der Bevölkerung und der damit einhergehenden Zunahme von altersbedingten Erkrankungen wie Osteoporose und dadurch bedingten Frakturen und degenerativen Zuständen wird auch die Nachfrage nach geeigneten Knochenersatzmaterialien in den nächsten Jahren steigen. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass die proliferative und osteogene Differenzierungskapazität von Zellen gewonnen aus Spongiosa der proximalen Tibia mit der aus dem Beckenkamm vergleichbar ist. Außerdem konnten wir nachweisen, dass diese Kapazität auch im Alter erhalten bleibt. Es ist bekannt, dass die Entnahmemorbidity an der proximalen Tibia, verglichen mit dem Beckenkamm, geringer ist. Die Untersuchung leistet einen Beitrag, die Entnahmestelle an der proximalen Tibia populärer zu machen.

Folgende Studien sollten weitere periphere Entnahmestellen wie den Radius, die Ulna oder den Calcaneus bezüglich der Proliferationsqualität und Fähigkeit der dort gewonnenen Zellen zur osteogenen Differenzierung untersuchen.

Unsere Ergebnisse sollten in nachfolgenden Studien reproduziert und validiert werden, gegebenenfalls auch mit einer längeren Dauer der osteogenen Differenzierung, um den Verlauf der Genexpression weiter zu verfolgen. Vor allem aber sollten die Ergebnisse unserer *in vitro*-Studie in klinischen Studien untersucht werden, um eine Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Outcome überprüfen zu können.

6. Literaturverzeichnis

- Aarden, E. M., Nijweide, P. J., Van Der Plas, A., Alblas, M. J., Mackie, E. J., Horton, M. A. and Helfrich, M. H.** (1996). Adhesive properties of isolated chick osteocytes in vitro. *Bone* **18**, 305–313.
- Ahlmann, E., Patzakis, M., Roidis, N., Shepherd, L. and Holtom, P.** (2002). Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J. Bone Joint Surg. Am.* **84-A**, 716–720.
- Alt, V., Nawab, A. and Seligson, D.** (1999). Bone grafting from the proximal tibia. *J. Trauma* **47**, 555–557.
- Alt, V., Meeder, P.-J., Seligson, D., Schad, A. and Atienza, C.** (2003). The proximal tibia metaphysis: a reliable donor site for bone grafting? *Clin. Orthop. Relat. Res.* 315–321.
- Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, a L. and Davino, N. a** (1996). Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **329**, 300–9.
- Aubin, J. E.** (1998). Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* **30–31**, 73–82.
- Aubin, J. E. and Bonnelye, E.** (2000). Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos. Int.* **11**, 905–913.
- Aubin, J. E. and Turksen, K.** (1996). Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microsc. Res. Tech.* **33**, 128–40.
- Banwart, J. C., Asher, M. A. and Hassanein, R. S.** (1995). Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **20**, 1055–60.
- Barnes, G. L., Kostenuik, P. J., Gerstenfeld, L. C. and Einhorn, T. A.** (1999). Growth factor regulation of fracture repair. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 1805–1815.
- Barth, A.** (1893). Ueber histologische Befunde nach Knochenimplantationen. *Arch. Klin. Chir.* **46:409**,.
- Bauer, T. W. and Muschler, G. F.** (2000). Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **371**, 10–27.

- Baumhauer, J., Pinzur, M. S., Donahue, R., Beasley, W. and Digiovanni, C.** (2013). Site Selection and Pain Outcome After Autologous Bone Graft Harvest. *Foot Ankle Int.* **35**, 104–7.
- Baumhauer, J., Pinzur, M. S., Donahue, R., Beasley, W. and Digiovanni, C.** (2014). Site selection and pain outcome after autologous bone graft harvest. *Foot Ankle Int.*
- Baxter, M. A., Wynn, R. F., Jowitt, S. N., Wraith, J. E., Fairbairn, L. J. and Bellantuono, I.** (2004). Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion. *Stem Cells* **22**, 675–682.
- Bellantuono, I., Aldahmash, A. and Kassem, M.** (2009). Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 364–70.
- Belthur, M. V., Conway, J. D., Jindal, G., Ranade, A. and Herzenberg, J. E.** (2008). Bone graft harvest using a new intramedullary system. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **466**, 2973–80.
- Bethel M. et. al** (2014). The Changing Balance Between Osteoblastogenesis and Adipogenesis in Aging and its Impact on Hematopoiesis. *Curr Osteoporos Rep.* **11**, 99–106.
- Blair, H. C., Teitelbaum, S. L., Ghiselli, R. and Gluck, S.** (1989). Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science (80-.)*. **245**, 855–857.
- Bobryshev, Y. V., Orekhov, A. N., Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A. and Revin, V. V.** (2014). Mitochondrial Aging and Age-Related Dysfunction of Mitochondria. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–7.
- Boxall, S. a and Jones, E.** (2012). Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int.* **2012**, 975871.
- Brand, R. A.** (2008). 50 years ago in CORR: Physiologic basis of bone-graft surgery Marshall R. Urist MD CORR 1953;1:207-216. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **466**, 2015–2016.
- Bruder, S.** (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. ...* **64**, 278–94.

- Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M. and Stoddart, M. J.** (2014). Role and regulation of runx2 in osteogenesis. *Eur. Cells Mater.* **28**, 269–286.
- Buenzli, P. R. and Sims, N. A.** (2015). Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone* **75**, 144–150.
- Caton, J. and Vialar, C. E. De** (2009). Léopold Ollier (1830-1900): père de la chirurgie orthopédique et réparatrice et de la chirurgie expérimentale The father of bone and joint and reconstructive surgery (1830 - 1900). **8**, 38–45.
- Chan, G. K. and Duque, G.** (2002). Age-Related Bone Loss: Old Bone, New Facts. *Gerontology* **48**, 62–71.
- Chase Samuel W.; Herndon, C. H.** (1955). THE FATE OF AUTOGENOUS AND HOMOGENOUS BONE GRAFTS: A Historical Review. *JBJS* **33**, 809–841.
- Chen, J. ., Singh, K. ., Mukherjee, B. . and Sodek, J.** (1993). Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: Evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. *Matrix* **13**, 113–123.
- Chen, Y.-C., Chen, C.-H., Chen, P.-L., Huang, I.-Y., Shen, Y.-S. and Chen, C.-M.** (2006). Donor site morbidity after harvesting of proximal tibia bone. *Head Neck* **28**, 496–500.
- Clarke, B.** (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3 Suppl 3**, 131–139.
- Colter, D. C., Sekiya, I. and Prockop, D. J.** (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7841–7845.
- Cove, R. and Keenan, J.** (2009). Tibial bone grafting for lateral tibial plateau fractures. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **91**, 268–9.
- Curtis, B. F.** (1893). Cases of bone implantation and transplantation for cyst of tibia, osteomyelitic cavities and ununited fractures. *Am. J. Med. Sci.* **106:30**,.
- de Boer, H. H.** (1988). The history of bone grafts. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 292–298.
- Delgado-Calle, J., Sañudo, C., Sánchez-Verde, L., García-Renedo, R. J., Arozamena, J. and Riancho, J. A.** (2011). Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone* **49**, 830–838.

- Denhart, D. and Guo, X.** (1993). Osteopontin : A protein with diverse functions. *FASEB* **7**, 1475–1482.
- Diab, T., Condon, K. W., Burr, D. B. and Vashishth, D.** (2006). Age-related change in the damage morphology of human cortical bone and its role in bone fragility. *Bone* **38**, 427–31.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. and Horwitz, E. M.** (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317.
- Doty, S. B.** (1981). Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif. Tissue Int.* **33**, 509–512.
- Dudley, H. R. and Spiro, D.** (1961). The Fine Structure of Bone Cells. *J Biophys Biochem Cytol* **11**, 627–649.
- Egol, K. A., Nauth, A., Lee, M., Pape, H., Watson, J. T. and Borrelli, J.** (2015). Bone Grafting : Sourcing , Timing , Strategies , and Alternatives. **29**, 10–14.
- Einhorn, T. A.** (1998). The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **355S**, S7–S21.
- Fernyhough, J. C., Schimandle, J. J., Weigel, M. C., Edwards, C. C. and Levine, A. M.** (1992). Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **17**, 1474–1480.
- Freemont, a J.** (1993). Basic bone cell biology. *Int. J. Exp. Pathol.* **74**, 411–416.
- Garcia, P. and Raschke, M.** (2014). Adjuvante Therapiemaßnahmen zur Unterstützung der Knochenbruchheilung – das „biologische Skalpell“. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* **9**, 35–50.
- Garcia, P., Franz, D. and Raschke, M.** (2014). Knochenersatzmaterialien - Grundlagen und klinischer Nutzen. *Z. Orthop. Unfall.* **152**, 152–160.
- Garvin, K., Feschuk, C., Sharp, J. G. and Berger, A.** (2007). Does the number or quality of pluripotent bone marrow stem cells decrease with age? *Clin. Orthop. Relat. Res.* **465**, 202–207.
- Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V. N., Komm,**

Literaturverzeichnis

- B. S., Javed, A., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., et al.** (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J. Biol. Chem.* **280**, 33132–33140.
- Golub, E. E., Harrison, G., Taylor, a G., Camper, S. and Shapiro, I. M.** (1992). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Bone Miner.* **17**, 273–278.
- Groot, G., Danes, J. and Blok, J.** (1986). Light and electron microscopic demonstration of osteocalcin antigenicity in embryonic and adult rat bone. *Bone* **7**, 379–385.
- Harada, S. and Rodan, G. a** (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423**, 349–355.
- Hock, J. M., Centrella, M. and Canalis, E.** (2018). Insulin-Like Growth Factor I Has Independent Effects on Bone Matrix Formation and Cell Replication. **122**, 254–260.
- Hojo, H., Ohba, S., He, X., Lai, L. P. and McMahon, A. P.** (2016). Sp7/Osterix Is Restricted to Bone-Forming Vertebrates where It Acts as a Dlx Co-factor in Osteoblast Specification. *Dev. Cell* **37**,.
- Hughes, C. W. and Revington, P. J.** (2002). The proximal tibia donor site in cleft alveolar bone grafting: experience of 75 consecutive cases. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **30**, 12–6; discussion 17.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, a I. and Bruder, S. P.** (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* **64**, 295–312.
- Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E. N., Mosekilde, L., Steiniche, T. and Kassem, M.** (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in. *Biogerontology* **i**, 165–171.
- Justesen, J., Stenderup, K., Eriksen, E. F. and Kassem, M.** (2002). Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif. Tissue Int.* **71**, 36–44.
- Kanczler, J. M. and Oreffo, R. O.** (2008). Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* **15**, 100–114.
- Kern, B., Shen, J., Starbuck, M. and Karsenty, G.** (2001). Cbfa1 Contributes to the

- Osteoblast-specific Expression of type I collagen Genes. *J. Biol. Chem.* **276**, 7101–7107.
- Kim, M. J., Kim, C. W., Choi, Y. S., Kim, M. H., Park, C. J. and Suh, Y.** (2012). Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mech. Ageing Dev.* **133**, 215–225.
- Kinaci, A., Neuhaus, V. and Ring, D. C.** (2014). Trends in bone graft use in the United States. *Orthopedics* **37**, e783-8.
- Knothe, M. L., Adamson, J. R., Tami, A. E. and Bauer, T. W.** (2004). The osteocyte. *Cell* **36**, 1–8.
- Kreibich, D. N., Scott, I. R., Wells, J. M. and Saleh, M.** (1994). Donor site morbidity at the iliac crest: comparison of percutaneous and open methods. *J. Bone Joint Surg. Br.* **76**, 847–8.
- Kretlow, J. D., Baggett, L. S., Jin, Y.-Q., Hong, T.-H., Zhou, G., Liu, W., Cao, Y., Mikos, A. G. and Zhang, W.** (2008). Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol.* **9**, 60.
- Krug, C., Beer, A., Saller, M. M., Aszodi, A., Holzbach, T., Giunta, R. E. and Volkmer, E.** (2016). [Isolation and Characterization of Multipotent Precursor Cells from Murine Adipose Tissue using a Clinically Approved Cell Separation System]. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.* **48**, 87–94.
- Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.-H. and Trajanoski, Z.** (2007). Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* **8**, 70.
- Kurz, L. T., Garfin, S. R. and Booth, R. E.** (1989). Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **14**, 1324–1331.
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Scully, G. E. S., Hsu, H., et al.** (1998). Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. **93**,

165–176.

Lane, R. K., Hilsabeck, T. and Rea, S. L. (2015). The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1847**, 1387–1400.

Li, Y., Charif, N., Mainard, D., Bensoussan, D., Stoltz, J. F. and de Isla, N. (2014). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed. Mater. Eng.*

Li, J., Zhang, H., Yang, C., Li, Y. and Dai, Z. (2016). An overview of osteocalcin progress. *J. Bone Miner. Metab.* **34**, 367–379.

Macewen, W. (1881). Observations concerning transplantation on bone. *Proc. R. Soc. London* **32:232**,.

Manolagas, S. C. (2000). Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis¹. *Endocr. Rev.* **21**, 115–137.

Manolagas, S. C., Bellido, T. and Jilka, R. L. (1995). New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: Roles of IL-6 and gp130. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**, 109–116.

Mauffrey, C., Bowles, R., Robinson, L., Seligson, D. and Gum, J. (2011). Bone graft harvest site options in orthopaedic trauma: a prospective in vivo quantification study. *Injury.*

Mauffrey, C., Madsen, M., Bowles, R. J. and Seligson, D. (2012). Bone graft harvest site options in orthopaedic trauma: a prospective in vivo quantification study. *Injury* **43**, 323–6.

Meekeren, J. van (1668). Heel en geneeskonstige aanmerkingen.

Mgeough, A. and Barker, B. (1993). Age-Related Changes in the Tensile Properties of Cortical Bone. **75**,.

Muschler, G. F., Nitto, H., Boehm, C. a. and Easley, K. a. (2001). Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Orthop. Res.* **19**, 117–125.

Myeroff, C. and Archdeacon, M. (2011). Autogenous bone graft: donor sites and techniques. *J. Bone Joint Surg. Am.* **93**, 2227–36.

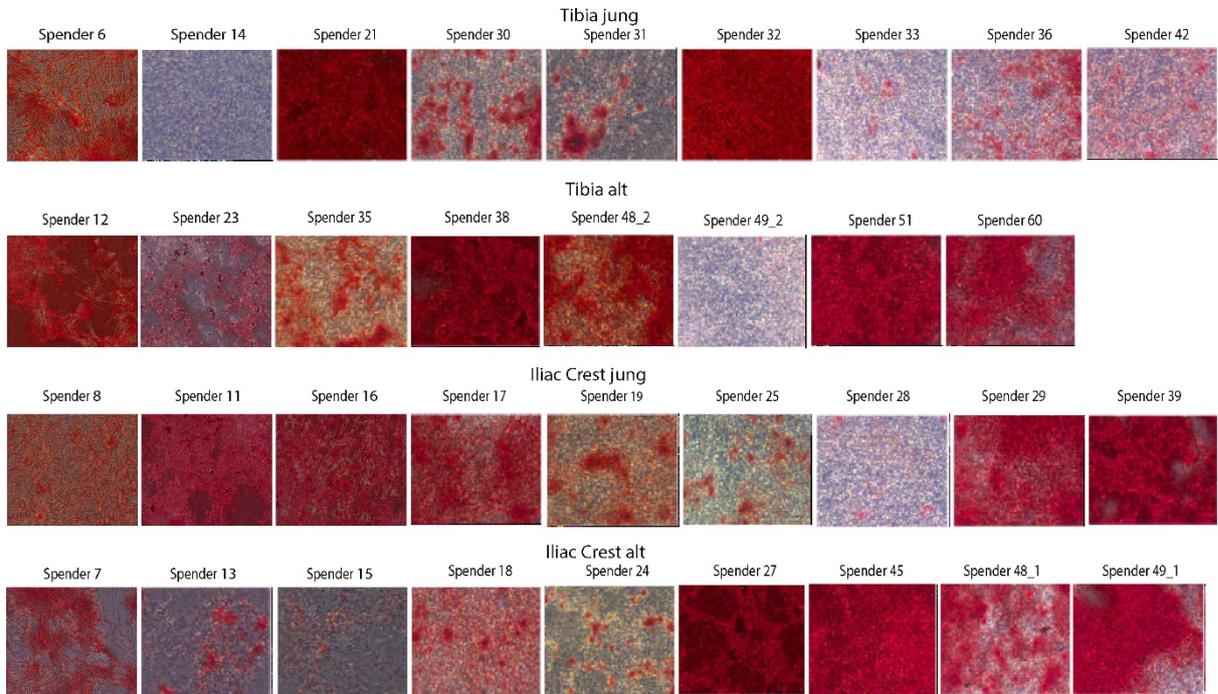
- Narbona-Carceles, J., Vaquero, J., B S, S. S.-S., Forriol, F. and Fernández-Santos, M. E.** (2014). Bone marrow mesenchymal stem cell aspirates from alternative sources Is the knee as good as the iliac crest? *Injury* **45 Suppl 4**, S42-7.
- Neman, J., Hambrecht, A., Cadry, C. and Jandial, R.** (2012). Stem cell-mediated osteogenesis: Therapeutic potential for bone tissue engineering. *Biol. Targets Ther.*
- Niethard, F. U., Pfeil, J. and Biberthaler, P.** (2017). Knochenheilung. In *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*. (ed. Niethard, F. U.), Pfeil, J.), and Biberthaler, P.), p. Georg Thieme Verlag.
- Nishida, S., Endo, N., Yamagiwa, H., Tanizawa, T. and Takahashi, H. E.** (1999). Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J. Bone Miner. Metab.* **17**, 171–7.
- Parfitt, A. M., Mathews, C. H. E., Villanueva, A. B., Kleerekoper, M., Frame, B. and Rao, D. S.** (1983). Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J. Clin. Invest.* **72**, 1396–1409.
- 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. and Marshak, D. R.** (2011). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **143**, 143–148.
- Prall, W. C., Saller, M. M., Scheumaier, A., Tuchsolski, T., Taha, S., Böcker, W. and Polzer, H.** (2018). Proliferative and osteogenic differentiation capacity of mesenchymal stromal cells: Influence of harvesting site and donor age. *Injury* **49**, 1504–1512.
- Raikin, S. M. and Brislin, K.** (2005). Local bone graft harvested from the distal tibia or calcaneus for surgery of the foot and ankle. *Foot Ankle Int.* **26**, 449–53.
- Roodman, G. D.** (1999). Cell biology of the osteoclast. *Exp. Hematol.* **27**, 1229–1241.
- Rosen, C. J. and Bouxsein, M. L.** (2006). Mechanisms of disease: Is osteoporosis the obesity of bone? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2**, 35–43.
- Rupp, M., et. al.** (2018). Osteozyten - Dirigenten des Knochenstoffwechsels. *Z. Orthop. Unfall.* **06**,.

- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., et al.** (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell* **131**, 324–336.
- Sandberg, M., Autio-Harminen, H. and Vuorio, E.** (1988). Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF-beta 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones. *Dev. Biol.* **130**, 324–34.
- Schieker, M. and Mutschler, W.** (2006). Die überbrückung von posttraumatischen knochendefekten: Bewährtes und neues. *Unfallchirurg* **109**, 715–732.
- Schieker, M., Heiss, C. and Mutschler, W.** (2008). Knochenersatzmaterialien. *Unfallchirurg* **111**, 613–620.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*.
- Sen, M. K. and Miclau, T.** (2007). Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* **38**, 2–7.
- Sinha, K. M. and Zhou, X.** (2013). Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J. Cell. Biochem.* **114**, 975–984.
- Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D. and Scutt, A.** (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 163–73.
- Takemoto, R. C., Fajardo, M., Kirsch, T. and Egol, K. A.** (2010). Quantitative assessment of the bone morphogenetic protein expression from alternate bone graft harvesting sites. *J. Orthop. Trauma*.
- Thies, R. S., Bauduy, M., Ashton, B. A., Kurtzberg, L., Wozney, J. M. and Rosen, V.** (1992). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* **130**, 1318–1324.
- Tomkinson, A., Reeve, J., Shaw, R. W. and Noble, B. S.** (1997). The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3128–3135.

- Veis, A., Kougias, K., Tsirlis, A., Parisis, N., Papadopoulou, C. and Romanos, G. E.** (2009). Evaluation of the osteogenic potential in experimental defects, with and without bone marrow, in the rabbit tibia: a pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **24**, 1054–60.
- Walter, Ph., V.** (1821). Wiedereinheilung der bei der Trapanation ausgebohrten Knochenscheibe. *J. der Chir. und Augen-heilkd.* **2:571**,.
- Wan, M. and Cao, X.** (2005). BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 651–657.
- Weinreb, M., Suponitzky, I. and Keila, S.** (1997). Systemic administration of an anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow. *Bone* **20**, 521–526.
- Welsch U.** (2018). *Histologie*.
- William J. Boyle, W. Scott Simonet and David L. Lacey** (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337–342.
- Wysokinski, D., Pawlowska, E. and Blasiak, J.** (2015). RUNX2: A Master Bone Growth Regulator That May Be Involved in the DNA Damage Response. *DNA Cell Biol.* **34**, 305–315.
- Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G. and Isik, S.** (2012). Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann. Hematol.* **91**, 1175–1186.
- Zhang, W., Ou, G., Hamrick, M., Hill, W., Borke, J., Wenger, K., Chutkan, N., Yu, J., Mi, Q.-S., Isales, C. M., et al.** (2008). Age-Related Changes in the Osteogenic Differentiation Potential of Mouse Bone Marrow Stromal Cells. *J. Bone Miner. Res.* **23**, 1118–1128.

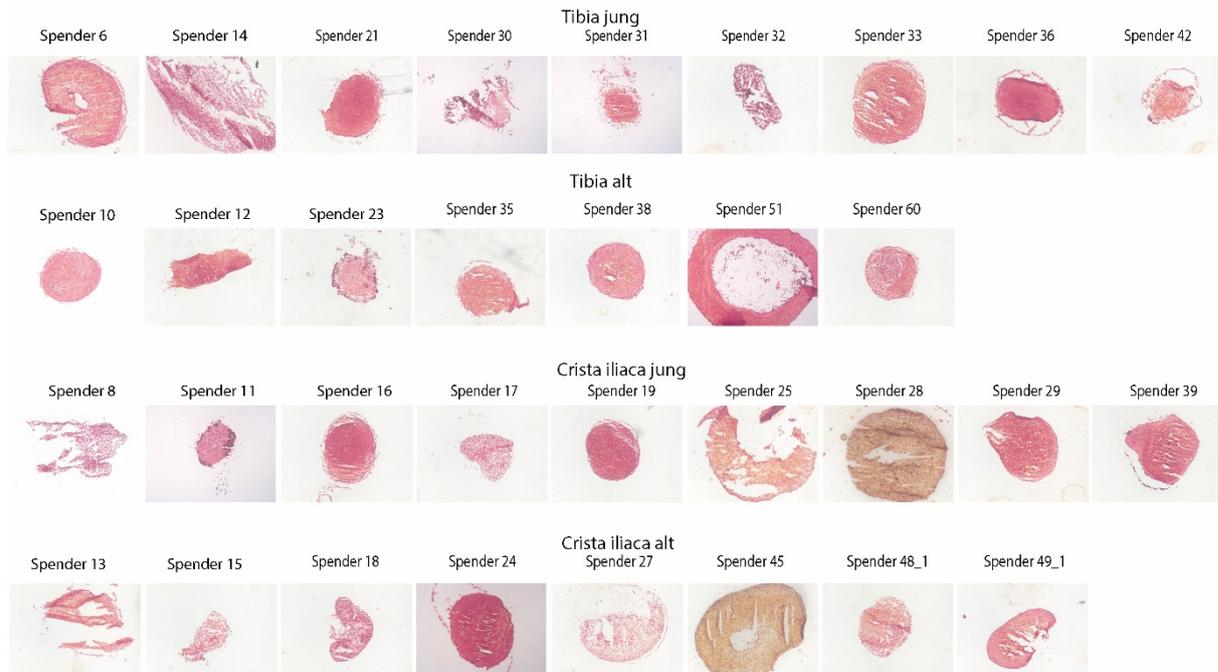
7. Anhang

Osteogene Differenzierung Alizarin Rot Färbung - Tag 14



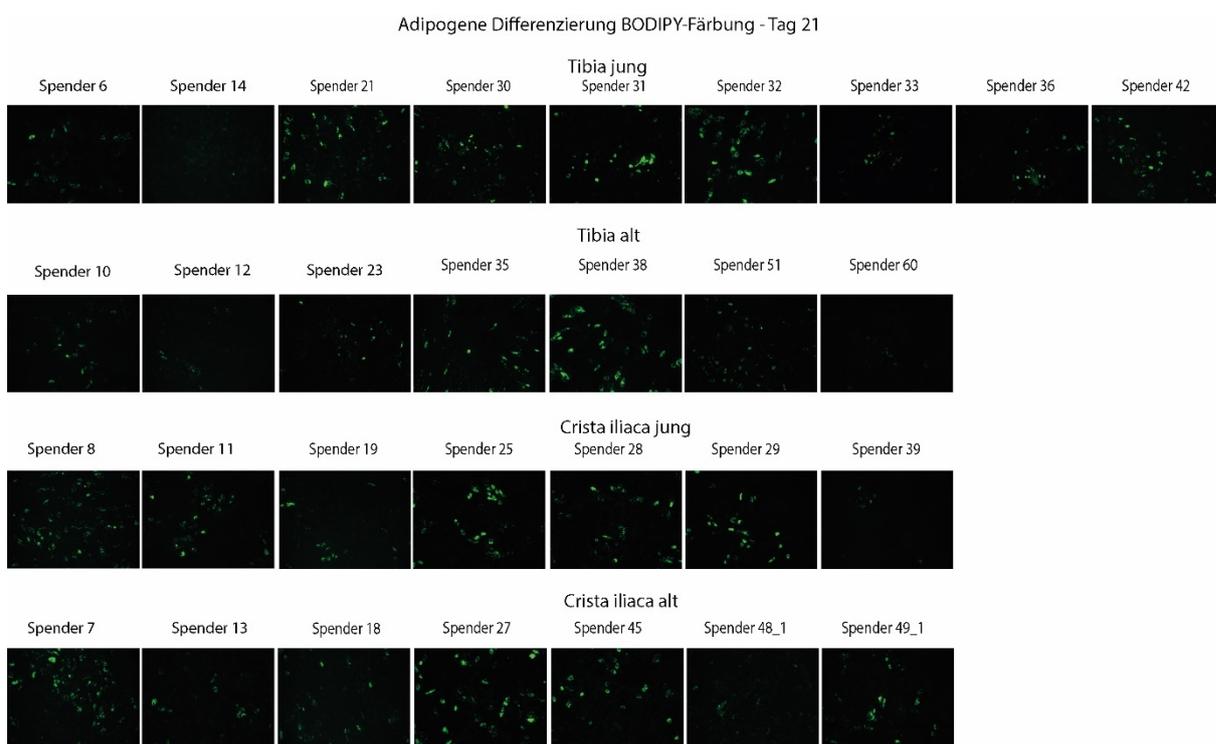
Anhang 1: Übersicht des Erfolgs der osteogenen Differenzierung nach Alizarin Rot Färbung der einzelnen Spender.

Chondrogene Differenzierung Safranin-Orange-Färbung - Tag 21



Anhang 2: Übersicht des Erfolgs der chondrogenen Differenzierung nach Safranin-Orange-Färbung der einzelnen Spender.

Anhang



Anhang 3: Übersicht des Erfolgs der adipogenen Differenzierung nach BODIPY-Färbung der einzelnen Spender.

8. Abkürzungsverzeichnis

ALP(L)	Alkaline Phosphatase
AR	Alizarin Rot
α MEM	α Minium Essential Medium
BMP	Bone morphogenetic proteins
BS	Blockadelösung
CATK	Cathepsin K
CD73	Ecto-5'-Nukleotidase
CD90	Thymuszellen-Antigen 1
CD105	Endoglin
cDNA	Komplementär-DNA
CFU	Koloniebildende Einheiten / Colony forming units
CSF-1	Koloniestimulierender Faktor 1
cumPD	Kumulative Populationsverdopplung
DAPI	4'-6'-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DLX5	Homoeobox Distal less Protein 5
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	6-Carboxyfluorescein
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus

Abkürzungsverzeichnis

hMSC	humane mesenchymale Stammzelle
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IBSP	Bone Sialoprotein
Ihh	Indian hedgehog
IL	Interleukin
mtDNA	Mitochondriale DNA
NBT/BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
OCN	Osteocalcin
OD	Optische Dichte
OPN/SPP1	Osteopontin
OSX	Osterix
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PD	Populationsverdopplung
PDT	Populationsverdopplungszeit
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVA	Polyvinylalkohol
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RANK	Receptor-activator of NF- κ B
RANKL	RANK-Ligand
ROS	Sauerstoffradikale
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
TGF-13	Transformierender Wachstumsfaktor 13
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor - β

Abkürzungsverzeichnis

TRAP	Tartratresistente saure Phosphatase
WST	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der mesenchymalen Stammzelle zum Osteoblasten durch Einfluss von RUNX2 und der Wnt-Signalkaskade.....	4
Abbildung 2: Osteoklasten in den von ihnen erschaffenen Knochenauhöhlungen.....	6
Abbildung 3: Bone Remodelling.....	9
Abbildung 4: Sekundäre Frakturheilung.....	11
Abbildung 5: Verdünnungsreihe für Alizarin Rot (AR) Standards.....	23
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung gegen CD73, CD90 und CD105.....	30
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung gegen IBSP, CD90 und CD105.....	31
Abbildung 8: Anzahl der ädherierten Zellen pro Gramm entnommener Spongiosa.....	32
Abbildung 9: CumPD und mittlere PDT nach 8 Wochen für beide Entnahmestellen.....	33
Abbildung 10: Kumulative Populationsverdopplung nach 56 Tagen.....	34
Abbildung 11: Kumulative Populationsverdopplung (cumPD) und mittlere Populations-verdopplungszeit (PDT) nach 8 Wochen für beide Entnahmestellen und Altersgruppen.....	35
Abbildung 12: Korrelation der kumulativen Populationsverdopplung der einzelnen Spender mit deren Alter.....	36
Abbildung 13: Korrelation der benötigten mittleren PDT nach Alter und Entnahmestelle der Spender.....	37
Abbildung 14: CFU-Effizienz und Anzahl ALP-positiver Kolonien für Beckenkamm und Tibia.....	38
Abbildung 15: CFU-Effizienz und Anzahl ALP-positiver Kolonien für beide Entnahmestellen und Altersgruppen.....	39
Abbildung 16: Korrelation der erreichten CFU-Effizienz nach Alter der Spender und Entnahmestelle.....	40
Abbildung 17: Korrelation des Anteils der ALP-positiven Kolonien nach Alter der Spender und Entnahmestelle.....	41
Abbildung 18: Metabolische Aktivität von Zellen aus beiden Entnahmestellen.....	42
Abbildung 19: Darstellung der optischen Dichte (OD) als Ausdruck der metabolischen Aktivität der Zellen, aufgeteilt nach Entnahmestellen und Altersgruppen.....	42
Abbildung 20: Altersbezogene Korrelation der metabolischen Aktivität.....	43
Abbildung 21: Exemplarischer Vergleich differenzierter mit undifferenzierten Zellen nach BODIPY-Färbung.....	44
Abbildung 22: Vergleich der adipogen differenzierten Zellen mit den undifferenzierten Kontrollen.....	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 23: Vergleich der beiden Entnahmestellen nach Abschluss der adipogenen Differenzierung.	46
Abbildung 24: Vergleich der altersbezogenen Unterschiede der adipogenen Differenzierung.	46
Abbildung 25: Altersbezogene Korrelation der Vakuolenbildung nach adipogener Differenzierung. ...	47
Abbildung 26: Exemplarischer Vergleich differenzierter mit undifferenzierten Zellen nach Safranin-Orange-Färbung nach 28 Tagen chondrogener Differenzierung.	48
Abbildung 27: Vergleich der undifferenzierten Kontrollen mit den differenzierten Zellen nach chondrogener Differenzierung.	49
Abbildung 28: Vergleich der chondrogenen Differenzierung beider Entnahmestellen.	49
Abbildung 29: Vergleich des Erfolgs der chondrogenen Differenzierung zwischen den verschiedenen Entnahmestellen und Altersgruppen.	50
Abbildung 30: Altersbezogene Korrelation des differenzierten Bereichs nach chondrogener Differenzierung.	51
Abbildung 31: Exemplarischer Vergleich osteogen differenzierter Zellen mit undifferenzierten Kontrollen nach Alizarin Rot Färbung.	52
Abbildung 32: Quantitative Darstellung des Erfolgs der osteogenen Differenzierung nach Alizarin Rot Färbung.	54
Abbildung 33: Altersbezogene Matrixbildung der osteogenen Differenzierung.	55
Abbildung 34: Expression der osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktoren <i>DLX5</i> , <i>RUNX2</i> und <i>OSX</i> während und nach osteogener Differenzierung mittels qPCR.	57
Abbildung 35: Spenderspezifische Expression der osteoblastenspezifischen Transkriptions-faktoren <i>DLX5</i> , <i>RUNX2</i> und <i>OSX</i> während und nach osteogener Differenzierung mittels qPCR.	58
Abbildung 36: Expression der osteoblastenspezifischen extrazellulären Genmarker <i>ALPL</i> , <i>SPP1</i> und <i>OCN</i> während und nach der osteogenen Differenzierung mittels qPCR.	60
Abbildung 37: Spenderspezifische Expression der osteoblastenspezifischen extrazellulären Genmarker <i>ALPL</i> , <i>SPP1</i> und <i>OCN</i> während und nach der osteogenen Differenzierung.	62

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geschichte der Knochenersatzmaterialien.	13
Tabelle 2: Verwendete Zellmarker für die ICC	20
Tabelle 3: Für den Mastermix verwendete Reagenzien.....	26
Tabelle 4: Für die qPCR verwendete Primersequenzen.....	27
Tabelle 5: Reagenzien für qPCR-Reaktionsmix.....	28
Tabelle 6: qPCR-Programm	28

11. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei folgenden Personen bedanken:

- Meinem Doktorvater **Priv.-Doz. Dr. med. Wolf Christian Prall** für die Bereitstellung des Themas, die immer gute Ansprechbarkeit und den fachlichen Rat.
- **Priv.-Doz. Attila Aszodi, PhD** für den Zugang zu den Gerätschaften und Materialien des Experimed-Labors der Klinik für Allgemeine-, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der LMU München, sowie die herzliche (Wieder)aufnahme ins Team.
- **Prof. Dr. med. Hans Polzer** für die Betreuung und Supervision meiner Arbeit.
- **Dr. rer. nat. Maximilian Saller** für die großartige fachliche und auch praktische intensive Betreuung und freundschaftliche Unterstützung über die gesamte Zeit.
- **Dem gesamten restlichen Team des Experimed-Labors**, das mich bei Fragen und bei der Einarbeitung in die Methoden immer unterstützt hat.
- **Meiner Familie und meinem Verlobten**, die mich immer unterstützt und motiviert haben.

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Vergleich des multipotenten sowie proliferativen Potentials humaner mesenchymaler Stammzellen aus Beckenkamm- und Tibiakopfspongiosa und ihre altersbezogenen Unterschiede“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde. Teile dieser Doktorarbeit wurden vorab in der Zeitschrift Injury (Volume 49, Issue 8, August 2018, Pages 1504-1512) publiziert (Prall et al., 2018).

Freising, den 05.05.2022

Anna Katharina Scheumaier