

Untersuchungen zur Genexpression  
humaner Spongiosa-abgeleiteter Stromazellen  
nach Fragilitätsfraktur

**THIMO SCHAAF**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.** beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus der Klinik für Kleintiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Sabine Wenisch

**Untersuchungen zur Genexpression  
humaner Spongiosa-abgeleiteter Stromazellen  
nach Fragilitätsfraktur**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med.vet  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Thimo Schaaf**

Tierarzt aus Ludwigshafen am Rhein

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Sabine Wenisch
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Tag der Disputation: 04.11.2015

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Hockenheim, den 01.05.2015

Thimo Schaaf



Meiner Mutter, Oma und Opa

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XII</b>
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Osteoporose.....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Risikofaktoren und Klinik.....	4
<b>2.2</b>	<b>Pathophysiologie der Osteoporose .....</b>	<b>6</b>
2.2.1	Knochenremodellierung.....	6
2.2.2	Der Knochenabbau – Das RANK/RANKL/OPG-System .....	7
2.2.3	Die Knochenneubildung .....	9
2.2.3.1	Mesenchymale Stammzellen als Grundlage der Knochenneubildung .....	9
2.2.3.2	Die osteogene Differenzierung.....	11
2.2.3.3	Die Kopplung zwischen osteogener und adipogener Differenzierung.....	13
2.2.4	Veränderungen mesenchymaler Stromazellen bei Osteoporose.....	15
2.2.5	Die Rolle der extrazellulären Matrixproteine .....	16
2.2.6	Östrogen.....	18
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Probenmaterial .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>20</b>
3.2.1	Isolierung der mesenchymalen Stromazellen (MSC) aus Spongiosa .....	20
3.2.2	Vermehrung der mesenchymalen Stromazellen .....	21
3.2.3	Kryokonservierung der MSC.....	22
3.2.4	Auftauen der Stromazellen.....	22
3.2.5	Kultivierung der Stromazellen.....	23
3.2.6	Differenzierung der Stromazellen.....	24
3.2.6.1	Osteogene Differenzierung .....	24
3.2.6.2	Adipogene Differenzierung.....	25
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungen.....</b>	<b>25</b>
3.3.1	Isolation der RNA .....	25

3.3.2	Konzentrationsbestimmung mittels Biophotometer.....	26
3.3.3	DNase Behandlung .....	26
3.3.4	Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR).....	27
3.3.5	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion .....	29
3.3.6	Gelelektrophorese .....	30
3.3.7	Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) .....	31
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>37</b>
<b>3.7</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der Zell-Differenzierung .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen.....</b>	<b>42</b>
4.3.1	Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse .....	42
4.3.2	Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse.....	49
4.3.3	Ergebnisse der Korrelationsanalysen .....	60
4.3.3.1	Korrelationsanalysen der Genexpression undifferenzierter Stromazellen nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten – gruppeninterne Korrelationen .....	61
4.3.3.2	Korrelationsanalysen der Genexpression osteogen und adipogen differenzierter Stromazellen - gruppeninterne Korrelationen .....	62
4.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	64
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>RANKL .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2</b>	<b>OPG .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3</b>	<b>PPAR<math>\gamma</math> .....</b>	<b>70</b>
<b>5.4</b>	<b>Runx-2 .....</b>	<b>72</b>
<b>5.5</b>	<b>Osteopontin.....</b>	<b>75</b>
<b>5.6</b>	<b>Osteocalcin .....</b>	<b>76</b>
<b>5.7</b>	<b>BMP-2.....</b>	<b>77</b>

<b>5.8</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>103</b>

## I Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ MEM	<i><math>\alpha</math> Minimal Essential Medium</i>
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol/Liter
ACOG	<i>American Congress of Obstetricians and Gynecologists</i>
AK	Adipogene Kontrolle
aP2	Adipozyten Faktor 2
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMPR	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor</i>
BMU	<i>Bone Multicellular Unit</i>
C	Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>copy Desoxiribonuclein Acid</i>
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer-binding Proteins</i>
CFU-F	<i>Colony-forming Unit Fibroblast</i>
Cox	Coxarthrose-Gruppe
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEXA	<i>Dual Energy X-ray Absorptiometry</i>
Dkk-1	Dickkopf-1
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DVO	Dachverband Osteologie e.V.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
FBS	fötales bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ITS	Insulin – Transferrin – Selenium
kDA	kilo Dalton
LIP	<i>Liver-enriched Inhibitory Protein</i>
LRP	<i>Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
MCS-F	<i>Macrophage-Colony-Stimulating Factor</i>

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
mRNA	<i>messenger Ribonuclein Acid</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stromal Cells</i> , Mesenchymale Stromazellen
NFATc1	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 1</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	Nanometer
OC	Osteocalcin
OK	Osteogene Kontrolle
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
pmol	Pikomol
PPAR $\gamma$	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTH	Parathormon
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor-<math>\kappa</math>B Ligand</i>
RGD	steht für die Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RPM	Rotationen pro Minute
RT-qPCR	<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RUNX-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SHF	Schenkelhalsfraktur
SMAD	Akronym der Gennamen <i>small</i> und <i>mothers against decapentaplegic</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TRAF-6	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Assoziierter Faktor 6
TRIS	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
U	<i>Units</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Protein</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Welt Gesundheitsorganisation
Wnt	Akronym der Gennamen <i>wingless</i> und Int-3

## II Abbildungsverzeichnis

	<b>Seite</b>
Abbildung 1: Die Stadien der Differenzierung eines Osteoklasten aus einer hämatopoetischen Stammzelle	8
Abbildung 2: Multipotente Differenzierung mesenchymaler Stromazellen	10
Abbildung 3: Osteogene Differenzierung durch den Wnt-Signalweg	13
Abbildung 4: Isolation der Spongiosa aus den operativ entfernten Femurköpfen	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Stromazellen-Kultivierung	23
Abbildung 6: Adipogen differenzierte und undifferenzierte Stromazellen	40
Abbildung 7: Osteogen differenzierte und undifferenzierte Stromazellen	41
Abbildung 8: Ergebnis der Gelelektrophorese im Anschluss der GAPDH-RT-PCR	42
Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der relativen BMP-2 Expression undifferenzierter Zellen	43
Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der relativen Osteopontin Expression undifferenzierter Zellen	44
Abbildung 11: Vergleichende Darstellung der relativen Osteocalcin Expression undifferenzierter Zellen	45
Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der relativen PPAR $\gamma$ Expression undifferenzierter Zellen	46
Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der relativen RANKL Expression undifferenzierter Zellen	48
Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der PPAR $\gamma$ Expression adipogen und osteogen differenzierter sowie undifferenzierter Stromazellen	50
Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der RANKL-Expression adipogen differenzierter sowie undifferenzierter Stromazellen	52
Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der OPG-Expression osteogen und adipogen differenzierter Stromazellen, sowie undifferenzierter Zellen	53

Abbildung 17:	Vergleichende Darstellung der RUNX-2-Expression osteogen und adipogen differenzierter Stromazellen, sowie undifferenzierter Zellen	55
Abbildung 18	Vergleichende Darstellung der BMP-2-Expression osteogen und adipogen differenzierter Stromazellen, sowie undifferenzierter Zellen	57
Abbildung 19:	Vergleichende Darstellung der Osteopontin Expression osteogen differenzierter Stromazellen, sowie undifferenzierter Zellen jeweils von Coxarthrose- und Schenkelhalsfraktur-Patienten	59
Abbildung 20:	Korrelation zwischen BMP-2 und PPAR $\gamma$ bei undifferenzierten Stromazellen von Patienten mit einer Schenkelhalsfraktur nach einer Kultivierung von 7 Tagen	62
Abbildung 21:	Korrelation zwischen BMP-2 und OPG bei osteogen differenzierten Stromazellen isoliert aus Patienten mit einer Coxarthrose	63
Abbildung 22:	Korrelation zwischen RUNX-2 und RANKL bei osteogen differenzierten Stromazellen aus der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen	64
Abbildung 23:	Schematische Darstellung des RANKL-OPG-Mechanismus	69
Abbildung 24:	Einfluss von BMPs auf die Differenzierung mesenchymaler Stromazellen	81

## III Tabellenverzeichnis

	<b>Seite</b>
Tabelle 1: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums	24
Tabelle 2: Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums	25
Tabelle 3: Mastermix des DNase-Verdau	27
Tabelle 4: Mastermix RT-PCR	28
Tabelle 5: Nukleotidsequenz des verwendeten GAPDH-Primers	29
Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes	29
Tabelle 7: Zusammensetzung des qPCR-Mastermixes	31
Tabelle 8: Verwendete QuantiTect Primer Assays	33
Tabelle 9: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der BMP-2 Expression von Stromazellen isoliert aus der Hüftkopfspongiosa von Patienten mit Coxarthrosen und Schenkelhalsfraktur kultiviert über 21 Tage	43
Tabelle 10: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung der Osteopontin Expression von undifferenzierten Stromazellen	44
Tabelle 11: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung der Osteocalcin Expression von undifferenzierten Stromazellen	46
Tabelle 12: Geometrische Mittelwerte und Streufaktor der PPAR $\gamma$ Expression von undifferenzierten Stromazellen	47
Tabelle 13: Geometrische Mittelwerte und Streufaktor der RANKL Expression von undifferenzierten Stromazellen	48
Tabelle 14: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse	49
Tabelle 15: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der RANKL- und PPAR $\gamma$ Expression von adipogen differenzierten und undifferenzierten Stromazellen	51
Tabelle 16: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der PPAR $\gamma$ Expression von osteogen differenzierten und undifferenzierten Stromazellen	52
Tabelle 17: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der OPG Expression von osteogen und adipogen differenzierten sowie undifferenzierten Stromazellen	54

Tabelle 18:	Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung der RUNX-2- Expression von osteogen und adipogen differenzierten sowie undifferenzierten Stromazellen	56
Tabelle 19:	Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der BMP-2 Expression von osteogen und adipogen differenzierten sowie undifferenzierten Stromazellen	58
Tabelle 20:	Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der Osteopontin Expression von osteogen differenzierten und undifferenzierten Stromazellen	59
Tabelle 21:	Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse	60
Tabelle 22:	Korrelationen der Genexpression undifferenzierter Stromazellen jeweils innerhalb der Gruppen der Coxarthrose- und Schenkelhalsfraktur-Patienten zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten	61
Tabelle 23:	Korrelationen der Genexpression osteogen differenzierter Stromazellen jeweils innerhalb der Gruppe der Coxarthrose- und Schenkelhalsfraktur-Patienten	62

# 1 Einleitung

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine systemische Skeletterkrankung vornehmlich älterer Menschen, bei der es zu einem Verlust von Knochenmasse kommt. Mikroarchitektonische Veränderungen im Hartgewebe führen zu einer vermehrten Fragilität des Knochens, was das Risiko einer Fraktur durch bereits geringe Krafteinwirkung erhöht (DVO-Leitlinien 2014). Allein in Deutschland waren 2009 6,3 Millionen Menschen an Osteoporose erkrankt; fast jede fünfte Frau über 80 Jahren ist betroffen (Hadji et al. 2013, DVO-Leitlinien 2014). Aufgrund des demographischen Wandels, der mit einer immer älter werdenden Gesellschaft einhergeht, ist die Osteoporose von bedeutender klinischer Relevanz. Diese äußert sich neben dem gehäuftem Auftreten von Frakturen in einer verlangsamten Heilung des Knochens, verschlechterten Voraussetzungen zur Verankerung von Implantaten im erkrankten Hartgewebe sowie im vermehrten Auftreten von Implantatversagen (Strømsøe 2004).

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Genexpressionsmuster von humanen Spongiosa-abgeleiteten Stromazellen aus resezierten Femurköpfen von Schenkelhalsfrakturpatienten mit denen von coxarthrotischen Spendern (Kontrolle) zu vergleichen. Die aus den Femurköpfen der Frakturpatienten isolierten Stromazellen wurden als „osteoporotisch“ eingestuft, da die Fragilitätsfraktur des Schenkelhalses typischerweise im Rahmen der Osteoporose auftritt (Schuiling et al. 2011; Kanis et al. 2013; DVO-Leitlinien 2014). Für die Untersuchungen wurde Spongiosa von acht frakturierten und sechs arthrotischen Oberschenkelköpfen entnommen und daraus mesenchymale Stromazellen isoliert. Die Zellen jedes Spenders wurden zum einen im Standardmedium inkubiert, zum anderen osteogen und adipogen differenziert. Anschließend wurde die quantitative mRNA-Expression verschiedener Gene mittels RT-qPCR untersucht.

Dabei wurden osteogene Faktoren wie das *Bone Morphogenetic Protein 2* (BMP-2), der *Runt-related Transcription Factor 2* (RUNX-2), Osteopontin und Osteocalcin sowie der adipogene Transkriptionsfaktor *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma* (PPAR $\gamma$ ) berücksichtigt.

BMP-2 induziert die Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in Osteoblasten. Dies geschieht unter anderem über eine Aktivierung des osteogenen Schlüsseltranskriptionsfaktors RUNX-2 (Lee et al. 2000; Luu et al. 2007; Marie 2008; Carreira et al. 2014). Bei Osteopontin und Osteocalcin handelt es sich um extrazelluläre Matrixproteine, die die Hydroxylapatit-Kristallbildung regulieren und den Kontakt zwischen Osteoblasten bzw. Osteoklasten und der Knochenmatrix vermitteln (Lai et al. 2010; Sroga et al. 2011; Hunter 2013; Gao et al. 2013;

Neve et al. 2013). PPAR $\gamma$  ist der bisher einzige beschriebene Transkriptionsfaktor, der eine Differenzierung multipotenter Stromazellen in die adipogene Richtung herbeiführen kann (Tontonoz et al. 1994; Muruganandan et al. 2009).

Darüber hinaus wurden die mRNA-Level des *Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand* (RANKL) und von Osteoprotegerin (OPG) bestimmt. Diese vornehmlich von Osteoblasten gebildeten Zytokine beeinflussen die Knochenresorption: Während RANKL die Reifung von Osteoklasten stimuliert, fungiert OPG als Antagonist von RANKL und hemmt die Osteoklastenaktivität (Simonet et al. 1997; Horowitz et al. 2001; Boyce und Xing 2008).

Die mRNA-Expression der genannten Gene wurde vor dem Hintergrund folgender Fragestellung untersucht:

- Unterscheiden sich undifferenzierte humane Spongiosa-abgeleitete Stromazellen der Schenkelhalsfraktur-Patienten (Osteoporose) von den Stromazellen coxarthrotischer Spender (Kontrolle) bezüglich der vorliegenden ausgewählten Genexpression-Profile?
- Wie ändert sich die Genexpression der Stromazellen im Rahmen einer osteogenen und adipogenen Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Zellen und lassen sich Genexpressions-Unterschiede der Zellen zwischen den beiden untersuchten Patientengruppen feststellen?
- Bestehen Korrelationen der Expression zwischen bestimmten Genen bei undifferenzierten, osteogenen, und adipogen differenzierten Stromazellen?

Die Beantwortung dieser Fragen geschieht in der Absicht, grundlegende Veränderungen im Markerprofil der Stromazellen von Osteoporose-Erkrankten zu erfassen, um mehr über die Ursachen der systemischen Skeletterkrankung zu erfahren. Im weiteren Sinne sollen die Ergebnisse auch dazu beitragen, Werkstoffe für Knochenersatzmaterialien zu generieren, die aufgrund ihrer Eigenschaften optimal an den systemisch erkrankten Knochen von Osteoporose-Patienten angepasst sind. Dies setzt Kenntnisse über die Expressionsmuster der osteoblastären Präkursoren im systemisch erkrankten Hartgewebe voraus.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine systemische Erkrankung des Knochens. Dabei kommt es zu einem Verlust an Knochenmasse und mikroarchitektonischen Veränderungen, die den Knochen porös und somit anfällig für Frakturen machen (NIH *Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference 2001*). Am häufigsten treten diese Brüche an den Wirbelkörpern, dem Schenkelhals, dem distalen Radius und dem proximalen Humerus auf (Kanis et al. 2013). Sind bereits eine oder mehrere solcher Frakturen aufgetreten, spricht man von einer manifesten Osteoporose (DVO-Leitlinie 2014). Je nach Ursache ist zwischen der primären und sekundären Osteoporose zu unterscheiden (Foo et al. 2007).

Die primäre Osteoporose ist eine vor allem bei älteren Personen auftretende Erkrankung. Dabei ist auch hier eine Unterteilung sinnvoll. So führt ein sinkender Östrogen-Spiegel bei älteren postmenopausalen Frauen zu einem schnellen Verlust der Knochenmasse, vor allem des trabekulären Knochens (postmenopausale Osteoporose). Östrogen vermittelt eine osteoprotektive Wirkung und steuert Umbauprozesse im Knochengewebe (Khosla et al. 2012). Dies geschieht über zwei Rezeptor-Untereinheiten:  $\alpha$  und  $\beta$  (ER  $\alpha/\beta$ ) (Compston 2001; Lerner 2006; Krum und Brown 2008; Khosla et al. 2012). Dabei kommt ER  $\alpha$  vor allem in kortikalem Knochen vor, wohingegen in trabekulärem Knochen vornehmlich ER  $\beta$  exprimiert wird (Bord 2001). Es ist zu erwähnen, dass der letztgenannte Rezeptor nicht direkt für die Regulation des Knochenumbaus verantwortlich ist (Sims et al. 2002; Khosla et al. 2011), sondern vielmehr die Aktivität von ER  $\alpha$  beeinflusst. Denn Heterodimere bestehend aus ER  $\alpha/\beta$  haben eine geringere Sensitivität gegenüber Östrogen, als Homodimere aus ER  $\alpha$ , sodass davon auszugehen ist, dass ER  $\beta$  die Transkriptionsaktivität von ER  $\alpha$  senkt (Hall und McDonnell 1999; Khosla et al. 2011). Aus diesen beiden Tatsachen ergibt sich, dass trabekulärer Knochen eine niedrigere Sensitivität gegenüber Östrogen hat und somit eine höhere Konzentration benötigt wird, um die pathologischen Osteoporose-assoziierten Effekte vermitteln zu können (Khosla et al. 2011). Daher profitiert der spongiöse Knochen weniger von der Schutzfunktion des Östrogens.

Darüber hinaus tritt die vom Östrogenmangel eher unabhängige, so genannte senile Osteoporose auf. Diese ist geschlechtsunabhängig und betrifft sowohl den trabekulären, als auch den kortikalen Knochen (Luu et al. 2007). Hier spielen multifaktorielle Ursachen eine Rolle, darunter ein erniedrigter Parathormon-Spiegel, eine mangelnde Versorgung mit Kalzium und Vitamin D (auch durch mangelnde Absorption im Darm) und eine gestörte Mineralstoff-Sekretion der Niere (Luu et al. 2007). Außerdem wird eine adipogene Determinierung mesenchymaler Stromazellen, aus denen sich unter anderem Osteoblasten entwickeln, als Ursache für die Entstehung einer senilen Osteoporose diskutiert (Pino et al. 2012).

Die sekundäre Osteoporose kann bei jungen und älteren Personen auftreten. Hier liegt entweder eine Grunderkrankung wie z.B. Diabetes mellitus Typ I vor oder die Osteoporose ist durch die Einnahme von Medikamenten bedingt, beispielsweise durch Glukokortikoide (Lerner 2006).

Das diagnostische Mittel der Wahl zum Nachweis einer Osteoporose ist eine Knochendichtebestimmung mit der so genannten „Dual-Röntgen-Absorptiometrie“ (DEXA/DXA). Dabei gelten nach WHO-Definition alle Personen als erkrankt, deren Knochendichte mehr als das 2,5 fache unter der gesunder, junger Frauen liegt. (Standardabweichung/T-Wert  $\leq 2,5$ ). So ergeben sich laut der DVO 2014 für Deutschland Prävalenzen bei postmenopausalen Frauen von 15% bei den 50 bis 60-Jährigen bis hin zu 19% bei 80-Jährigen (DVO-Leitlinien 2014). Bei einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass es im Jahr 2010 insgesamt 349.560 osteoporotische Frakturen in Deutschland gab, und dass die Anzahl dieser Frakturen im Zeitraum von 2010 bis 2020 um 15,2% steigen wird (Gauthier et al. 2012). Insgesamt waren 2009 geschätzte 6.3 Millionen Menschen in Deutschland an Osteoporose erkrankt, darunter 1,1 Millionen Männer (Tang et al. 2009). Die Gesamtzahl osteoporotischer Frakturen in ganz Europa wurde für das Jahr 2006 auf 2,7 Millionen geschätzt (Kanis et al. 2013). Diese Zahlen zeigen, welche exponierte Stellung die Osteoporose in der heutigen Gesellschaft einnimmt.

### 2.1.1 Risikofaktoren und Klinik

Das Auftreten und die Schwere einer Osteoporose werden durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Frauen sind bei der primären Osteoporose überrepräsentiert. Sie haben im Vergleich zu gleichaltrigen Männern ein doppelt so hohes Risiko an einer Osteoporose zu erkranken.

ken (DVO-Leitlinie 2014). Dies hängt mit dem raschen Abfall der Sexualhormon-Konzentration (vor allem Östrogen) während der Menopause zusammen. Das Fehlen von Östrogen zieht einen Abbau von Knochen-Trabekeln nach sich. (Lerner 2006).

Auch das Alter spielt eine entscheidende Rolle. So verdoppelt sich alle 10 Lebensjahre die Wahrscheinlichkeit eines Bruches aufgrund einer Osteoporose (DVO-Leitlinie 2014). Eine genetische Komponente scheint ebenfalls einen, wenn auch nur „mäßigen“ Einfluss auf das Auftreten einer Osteoporose zu haben (DVO-Leitlinie 2014).

Darüber hinaus spielt auch das Thema Ernährung eine entscheidende Rolle. Allgemein ungünstig wirkt sich ein niedriges Körpergewicht aus (DVO-Leitlinie 2014, ACOG). Hier sind die genauen Mechanismen noch nicht endgültig geklärt, allerdings wird vermutet, dass sich sowohl mechanische Belastung, als auch von Fettzellen gebildete Faktoren (z.B. Insulin, Östrogen) positiv auf die Knochendichte auswirken (Reid 2002). Weiterhin spielen Kalzium und Vitamin D3 eine Schlüsselrolle im Knochenstoffwechsel und somit auch bei der Aufrechterhaltung der Knochendichte. So gelten 25-Hydroxy-Vitamin-D-Serum-Konzentrationen von unter 20 ng/ml Blutserum und eine tägliche Aufnahme von weniger als 500 mg Kalzium als Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen (DVO-Leitlinie 2014). Auch Rauchen und (übermäßiger) Alkoholkonsum wirken sich negativ auf den Knochen aus (DVO-Leitlinie 2014, ACOG).

Des Weiteren gibt es Zusammenhänge zwischen chronischen Vorerkrankungen wie z.B. Hyperparathyreoidismus und Hyperthyreose, da sich diese durch Veränderungen im Hormonhaushalt negativ auf die Knochendichte und somit begünstigend auf die Entstehung einer Osteoporose auswirken (Lerner 2006, DVO-Leitlinien 2014). Ähnliche Effekte zieht die Einnahme von Glukokortikoiden nach sich, die vor allem zu der Therapie zu einer schnellen Abnahme der Knochendichte führen können (Schuiling et al. 2011, DVO-Leitlinien 2014, ACOG).

Die Klinik der Osteoporose äußert sich im Auftreten von Frakturen (Schuiling et al. 2011; DVO-Leitlinie 2014). Die daraus entstehenden Schmerzen und eingeschränkten Bewegungsmöglichkeiten führen zur erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität. Bei Wirbelkörpern kommt es neben Brüchen auch häufig zu Verformungen, die zur Verminderung der Körpergröße führen können (Schuiling et al. 2011). Des Weiteren resultieren Frakturen in einer erhöhten Mortalität, vor allem während des ersten halben Jahres nach einem Bruch (Kanis et al. 2013, DVO-Leitlinie 2014). Gauthier et al. schätzten für das Jahr 2010 in Deutschland 13.439 Todesfälle, die durch osteoporotische Frakturen hervorgerufen wurden (Gauthier et al.

2012), wobei fast die Hälfte der Todesfälle nach einer Schenkelhalsfraktur festgestellt wurden (Kanis et al. 2013).

## 2.2 Pathophysiologie der Osteoporose

### 2.2.1 Knochenremodellierung

Bevor die pathophysiologischen Vorgänge bei der Osteoporose im Folgenden erläutert werden, soll zunächst der physiologische Prozess des Knochenumbaus („*bone remodeling*“) dargestellt werden.

Das Skelett ist einem ständigen Umbauprozess unterworfen. Dieser ist nötig, um Mikrofrakturen auszubessern, den Knochen neu auftretenden mechanischen Belastungen anzupassen oder einfach nur altes Knochengewebe zu ersetzen (Lerner 2006; Becker 2008; Schuiling et al. 2011). Dabei wird davon ausgegangen, dass in einem Jahr ca. 10% der gesamten Knochenmasse erneuert wird (Lerner 2006). Dies geschieht in so genannten „*Bone Multicellular Units*“ (BMU), die sich aus den Knochen-abbauenden Osteoklasten und den aufbauenden Osteoblasten zusammensetzen (Lerner 2006; Becker 2008).

Der Prozess beginnt mit einer Aktivierung von Osteoklasten durch Osteoblasten, Prä-Osteoblasten (Lerner 2006) oder durch Osteozyten (Xiong und O'Brien 2012). Nachdem die Osteoklasten eine Resorptionslakune („Howshipsche Lakune“) gebildet haben, verlassen sie diese, sorgen jedoch gleichzeitig für die Rekrutierung knochenbildender Osteoblasten. Dies geschieht über zwei Wege. Zum einen werden bei dem Auflösen der Knochenmatrix Wachstumsfaktoren frei, die die Proliferation und Aktivität von Osteoblasten steigern (Khosla et al. 2012). Dazu gehört z.B. der „*Transforming Growth Factor  $\beta$* “ (TGF-  $\beta$ ) (Tang et al. 2009). Zum anderen regulieren Osteoklasten Osteoblasten über direkten Zellkontakt (Khosla et al. 2012). Osteoblasten lagern sich daraufhin in der Resorptions-Lakune an und bilden eine Knochenmatrix aus, die dann mineralisiert wird (Vega et al. 2007). Dabei ist erwähnenswert, dass der Resorptionsvorgang wesentlich schneller abläuft (Wochen), als die Neubildung des Knochens (bis zu 4 Monate) (Becker 2008; Schuiling et al. 2011).

Aus diesen physiologischen Abläufen der Remodellierung lassen sich zwei grundlegende Mechanismen ableiten, die zum Auftreten einer Osteoporose führen. Entweder die Knochenre-

sorption übersteigt die Knochenneubildung, oder aber die Knochenneubildung liegt unterhalb des physiologischen Grenzwertes. Bei der postmenopausalen Osteoporose kommt es zu einer vermehrten Knochenremodellierung bei einer gleichzeitig verminderten Fähigkeit von Osteoblasten, neuen Knochen zu bilden (Lerner 2006).

## 2.2.2 Der Knochenabbau – Das RANK/RANKL/OPG-System

Die Intensität des Knochen-Abbauprozesses hängt von der Anzahl der Osteoklasten ab. Die Steuerung der Neubildung dieser Zellen wird durch zwei Schlüssel-Zytokine gesteuert: *Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand* (RANKL), dem dazu gehörenden *Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B* (RANK) und Osteoprotegerin (OPG) (Simonet et al. 1997; Horowitz et al. 2001; Boyce und Xing 2008).

RANKL ist ein 317 Aminosäuren langes Polypeptid, das zu der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren gehört (Horowitz et al. 2001; Silva und Branco 2011). Außer im Knochengewebe, wird es ebenfalls in der Lunge, den Brustdrüsen und in lymphatischen Organen exprimiert (Horowitz et al. 2001; Boyce und Xing 2008; Silva und Branco 2011). Während bis vor wenigen Jahren angenommen wurde, dass ausschließlich Osteoblasten für die Synthese des Zytokins verantwortlich sind (Vega et al. 2007; Becker 2008; Silva und Branco 2011), beschreiben Xiong und O'Brien, dass auch Osteozyten einen großen Anteil an der Produktion von RANKL haben und so die Knochenresorption beeinflussen. Darüber hinaus sezernieren Osteozyten nach Apoptose Signalmoleküle, die die Knochenresorption lokal induzieren (Xiong und O'Brien 2012).

Osteoklasten entstehen aus der mononukleären hämatopoetischen Zelllinie, aus der auch Makrophagen hervorgehen (Boyce und Xing 2008) (Abb.1). Dabei wird durch M-CSF („*Macrophage-Colony-Stimulating Factor*“) in einem ersten Schritt die Anzahl der Vorläuferzellen erhöht (Karsenty und Wagner 2002). Die eigentliche Differenzierung zu Osteoklasten erfolgt dann durch RANKL, welches in zwei unterschiedlichen Formen vorkommt – membrangebunden und gelöst (Silva und Branco 2011). Es gibt Hinweise, dass die gebundene Form wesentlich effizienter die Formation von Osteoklasten induziert (Nakashima et al. 2000). Auf der Zelloberfläche von Osteoklasten-Präkursoren bindet das an die Osteoblastenoberfläche gebundene RANKL an seinen Rezeptor RANK, welcher durch die Anwesenheit des M-CSF

vermehrt gebildet wird (Karsenty und Wagner 2002). RANK seinerseits ist an ein Adaptermolekül gekoppelt. Dieser Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Assoziierter Faktor 6 (TRAF6) sorgt für die Aktivierung des eigentlichen *Nuclear Factor-kappaB* (NF- $\kappa$ B), welcher in den Zellkern transloziert und dort die Transkriptionsfaktoren c-Fos und NFATc1 („*Nuclear Factor of Activated T-cells, Cytoplasmic 1*“) aktiviert (Boyce und Xing 2007). TRAF6 ist neben anderen Faktoren auch für die anschließende Fusion mehrerer Osteoklasten-Vorläuferzellen zu den typischen mehrkernigen reifen Osteoklasten verantwortlich (Cohen 2006).

Der natürliche Antagonist von RANKL ist das Osteoprotegerin (OPG). OPG, auch „*Osteoclastogenesis Inhibiting Factor*“ genannt, gehört zu der Gruppe der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Überfamilie 11B. Beim Menschen wurde das Gen für das 401 Aminosäuren große OPG auf Chromosom 8q23-24 gefunden. Neben Osteoblasten wird es auch in Leber-, Milz-, und Nierenzellen gebildet (Horowitz et al. 2001, Boyce und Xing 2008, Silva und Branco 2011). Dieses Zytokin ist im Gegensatz zu RANKL nicht membranständig, sondern löslich, wodurch es in der Lage ist sich an RANKL zu binden und es abzufangen, bevor dieses an RANK binden kann (Vega et al. 2007; Silva und Branco 2011). Die Osteoklasten-Reifung, die durch eine RANKL/RANK-Bindung induziert werden sollte, wird somit inhibiert. Wie wichtig OPG für den Knochenstoffwechsel ist, lässt sich z.B. auch bei einer Untersuchung durch Whyte et al., erkennen. Sie wiesen nach, dass bei der Erbkrankheit Osteodystrophia fibrosa („Paget-Syndrom“) eine Deletion des OPG-Gens vorliegt. Diese autosomal vererbte Krankheit ist durch eine Osteopenie und das vermehrte Auftreten von Frakturen gekennzeichnet (Whyte et al. 2002).

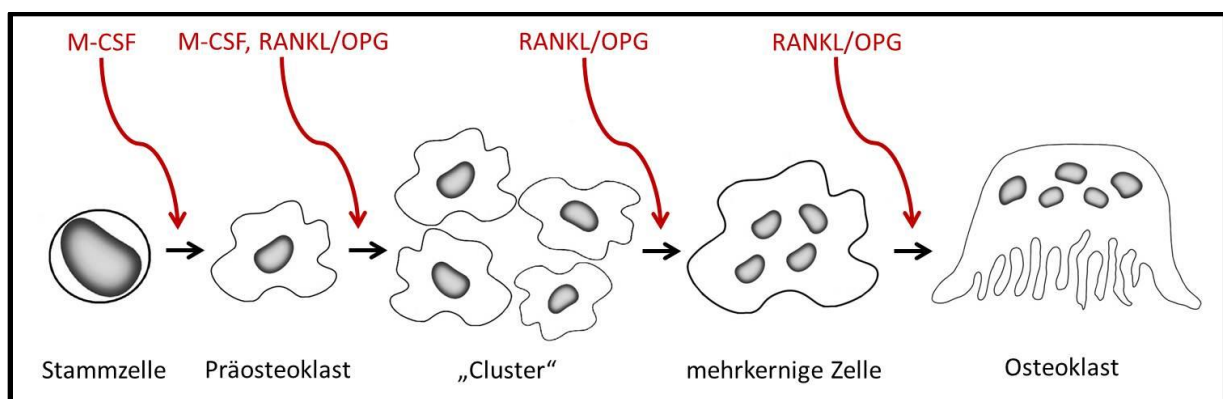


Abb. 1: Die Stadien der Differenzierung eines Osteoklasten aus einer hämatopoetischen Stammzelle (Boyle et al. 2003, modifiziert)

Aus den dargelegten Interaktionen von RANK/RANK und OPG wird ersichtlich, dass eine physiologische Knochendichte nur durch ein Gleichgewicht dieses Systems aufrechterhalten wird. Dieses Gleichgewicht wird durch eine Vielzahl von Zytokinen und Hormonen reguliert. So wird die OPG-Synthese durch Interleukin-1, TNF $\alpha$ , Vitamin D3 und Östrogen gesteigert. Dagegen senken Prostaglandin E<sub>2</sub>, Parathormon (PTH) und Glukokortikoide den OPG-Spiegel (Horowitz et al. 2001; Vega et al. 2007).

### 2.2.3 Die Knochenneubildung

#### 2.2.3.1 Mesenchymale Stromazellen als Grundlage der Knochenneubildung

Nicht nur die Anzahl knochenabbauender Zellen spielt für den Erhalt der physiologischen Knochendichte eine Rolle. Ebenso wichtig ist auch die Anzahl der knochenaufbauenden Osteoblasten, da diese entstandene Knochenschäden durch die Produktion von Knochenmatrix regenerieren. Hierbei spielen mesenchymale Stromazellen eine entscheidende Rolle, da sich aus ihnen Osteoblasten differenzieren (Caplan 1991). Bevor dieser Differenzierungsprozess näher erläutert wird, sollen zunächst allgemeine Aspekte zur Stromazellbiologie aufgezeigt werden.

Mesenchymale Stromazellen (*Mesenchymal Stromal Cells*, MSC) sind nicht-hämatopoetische, Plastik-adhärenente Zellen, die zur multipotenten Differenzierung im Stande sind (Pittenger 1999; Chamberlain et al. 2007; Uccelli et al. 2008). Diese Differenzierung erfolgt in Zellen mesodermalen Ursprungs, allem voran Osteozyten, Chondrozyten oder Adipozyten (Pittenger 1999) (Abb.2). Darüber hinaus wurden aber auch Differenzierungen in Zelllinien anderer Keimblätter beschrieben (Woodbury et al. 2000). Zu betonen ist jedoch, dass nicht jede mesenchymale Stromazelle zu dieser Multipotenz in der Lage ist. Vielmehr zeigten Pittenger et al., dass lediglich 30% der *in vitro* gezüchteten Klone einer mesenchymalen Stromazelle zur Differenzierung in Knochen-, Bindegewebs- und Fettzellen befähigt sind (Pittenger 1999). Des Weiteren sind mesenchymale Stromazellen zur Selbsterneuerung im Stande (Baksh et al. 2004; Uccelli et al. 2008).

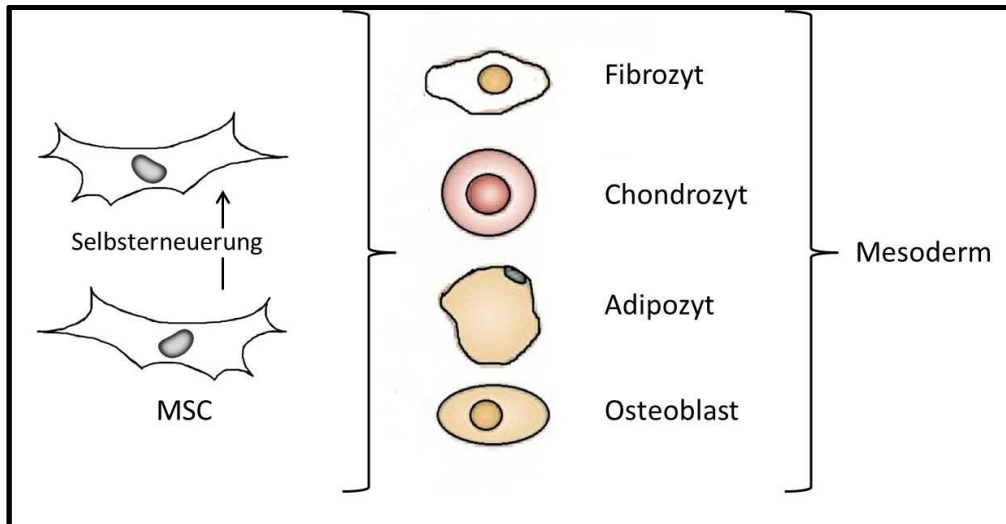


Abb. 2: Multipotente Differenzierung mesenchymaler Stromazellen. (Prall et al. 2013), modifiziert

Erstmals beschrieben wurde der Zelltyp der mesenchymalen Stromazelle von Friedenstein et al. (Friedenstein et al. 1968). Später wurde den Zellen aufgrund ihres spindelförmigen Aussehens und ihrer Fähigkeit zur Koloniebildung zunächst die Bezeichnung *Colony-Forming Unit Fibroblast* (CFU-F) gegeben (Friedenstein et al. 1974). Neben dieser typischen Morphologie werden jedoch auch große polygonale Formen beobachtet (Chamberlain et al. 2007). Auf molekularer Ebene lassen sich mesenchymale Stromazellen durch den Nachweis bestimmter Marker identifizieren, auch wenn es nicht „den einen klassischen Stammzell-Marker“ gibt (Chamberlain et al. 2007). So dürfen MSC keine Oberflächen-Antigene der hämatopoetischen Zelllinie wie CD45, CD34, CD14 oder CD11 aufweisen, sollen jedoch CD105, CD73, CD90, CD44 und STRO-1 positiv sein (Chamberlain et al. 2007; Uccelli et al. 2008). Es kann jedoch auch zu abweichenden Markerprofilen aufgrund von Spezies-Unterschieden, der Art des Gewebes oder der Art der Kulturbedingungen kommen (Uccelli et al. 2008).

Mesenchymale Stromazellen kommen in zahlreichen Geweben vor. Neben Knochen und Knochenmark, in denen sie vor allem entlang der Außenwand von Sinusoiden angelagert sind (Uccelli et al. 2008; Bianco et al. 2013), wurden sie bereits aus Fettgewebe (Zuk et al. 2002), Amnionflüssigkeit (Justesen et al. 2002; Anker et al. 2003) und Skelettmuskulatur (Baksh et al. 2004) isoliert. Das Vorkommen mesenchymaler Stromazellen im Blutstrom wird kontrovers diskutiert (Fernández et al. 1997; Fox et al. 2007). Generell ist der prozentuale Anteil der Stromazellen am gesamten Zellpool eines Gewebes sehr gering. So sind z.B. im Knochen-

mark lediglich 0,001 bis 0,01% der aspirierten Zellen auch tatsächlich mesenchymale Stammzellen (Pittenger 1999).

Ein weiteres Charakteristikum der Stromazellen ist ihre Fähigkeit zur Migration in geschädigte Gewebe. Genaue Mechanismen sind noch nicht bekannt, allerdings wird vermutet, dass Chemokine die Migration von mesenchymalen Stromazellen begünstigen. Außerdem sollen Integrine (z.B.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ) und Adhäsionsmoleküle (z.B. *Vascular Cell Adhesion Protein*, VCAM) beteiligt sein (Fox et al. 2007). Diese Eigenschaft wird bereits therapeutisch genutzt, indem mesenchymale Stromazellen bei bestimmten Krankheitsbildern intravenös verabreicht werden (Fox et al. 2007). Dabei kann sogar auf allogene Spender zurück gegriffen werden, ohne dass der Empfänger immunsupprimiert werden muss, denn mesenchymale Stromazellen sind nicht immunogen (Chamberlain et al. 2007). Vielmehr zeigen sie selbst immunmodulatorische Eigenschaften. So sind sie in der Lage die T-Zell Proliferation zu senken (Bartholomew et al. 2002; Di Nicola et al. 2002), ebenso wie die Aktivität von natürlichen Killerzellen (Spaggiari et al. 2006) und neutrophilen Granulozyten (Raffaghello et al. 2008). Somit können sie sogar als Therapie bei Autoimmun-Erkrankungen wie z.B. der *graft-versus-host disease* eingesetzt werden (Le Blanc et al. 2004).

Allerdings darf nicht unerwähnt bleiben, dass es Berichte über Tumorbildung nach der Applikation *in vitro* gezüchteter Stromazellen bei Nagern (Tolar et al. 2007), jedoch nicht bei Menschen (Uccelli et al. 2008) gibt.

#### 2.2.3.2 Die osteogene Differenzierung

Der Differenzierungsprozess von mesenchymalen Stromazellen in Osteoblasten wird über eine Vielzahl von Faktoren reguliert. Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei der Transkriptionsfaktor Runx-2 (*Runt-related Transcription Factor 2*) ein (Flores et al. 1992; Ducy et al. 1996; Karsenty und Wagner 2002; Cohen 2006; Marie 2008; Long 2011). Es steuert die Umwandlung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Prä-Osteoblasten sowie deren Weiterentwicklung in unreife Osteoblasten. Im Gegensatz dazu inhibiert er die Reifung späterer Entwicklungsstadien (Polak-Jonkisz und Zwolinska 1998). Eine Aktivierung von Runx-2 erfolgt z.B. durch Wachstumsfaktoren wie den zur TGF $\beta$ -Superfamilie gehörenden „*Bone Morphogenetic Proteins*“ (BMP) (Lee et al. 2000). Insgesamt wurden bisher über 20 BMPs beschrieben, von denen BMP-2, 6 und 9 das höchste osteogene Potenzial *in vitro* und *in vivo* haben (Luu et al. 2007; Carreira et al. 2014). Neben den osteoinduktiven Eigenschaften konnten auch Effekte

von BMPs in anderen Geweben wie z.B. Knorpel (BMP-8) oder im Verlauf der Eizell-Produktion nachgewiesen werden (Carreira et al. 2014). Im Rahmen der osteogenen Differenzierung bindet BMP-2 an spezifische Typ I und II Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren (Cohen 2006), was dann zu einer Phosphorylierung von bestimmten Signaltransduktions-Proteinen namens SMAD (Akronym aus den Gennamen für *small* von *Caenorhabditis elegans* und *Mothers Against Decapentaplegic* von *Drosophila melanogaster*) führt (Cohen 2006; Long 2011). SMAD-1, SMAD-5 und SMAD-8 bilden einen Komplex mit dem Co-SMAD-4 und dringen in den Zellkern ein, wo sie die Expression des Transkriptionsfaktors Runx2 erhöhen (Long 2011). Dieser regt nun einen weiteren essentiellen Faktor für die Osteoblasten-Differenzierung an: Osterix ist ein Zinkfinger-Protein und vollendet die Differenzierung des Prä-Osteoblasten zum reifen Osteoblasten (Cohen 2006); seine Deletion in Mäuseembryonen führt zu einem kompletten Mangel der knochenbildenden Zellen (Nakashima et al. 2002). Doch nicht nur BMPs steigern die Aktivität des Runx2. Auch Hormone wie das 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 (Viereck et al. 2002), oder mechanische Belastung (Marie 2008) sind dazu in der Lage.

Eine weitere, von Runx-2 unabhängige Differenzierungskaskade stellt der Wnt- $\beta$ -Catenin Signalweg dar (Karsenty und Wagner 2002; Cohen 2006; Baron und Kneissel 2013) (Abb.3). Wnt-Glykoproteine (zusammengesetzt aus den Gennamen „*wingless*“ und „*Int-3*“) binden an einen Komplex bestehend aus dem „*Frizzled*“-Rezeptor und dem Korezeptor „*Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6*“ (LRP 5/6). Die Folge ist ein intrazytoplasmatischer Anstieg der  $\beta$ -Catenin-Konzentration.  $\beta$ -Catenin dringt nun in den Zellkern ein und führt zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die eine Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen zu Osteoblasten herbeiführen (Abb.3) (Long 2011; Baron und Kneissel 2013). Reguliert wird dieses System durch Osteozyten. Sie bilden Antagonisten wie z.B. Sklerostin oder Dickkopf-1 (Dkk-1). Diese binden an der Zelloberfläche an bestimmte Domänen des LRP5 oder LRP6 (Ellies et al. 2006; Baron und Bourhis et al. 2011; Kneissel 2013). Dadurch wird die Signalkaskade blockiert und die osteoblastäre Differenzierung supprimiert. Parathormon hingegen verringert die Bildung der Wnt-Antagonisten Sklerostin und Dickkopf-1 (Maeda et al. 2013).

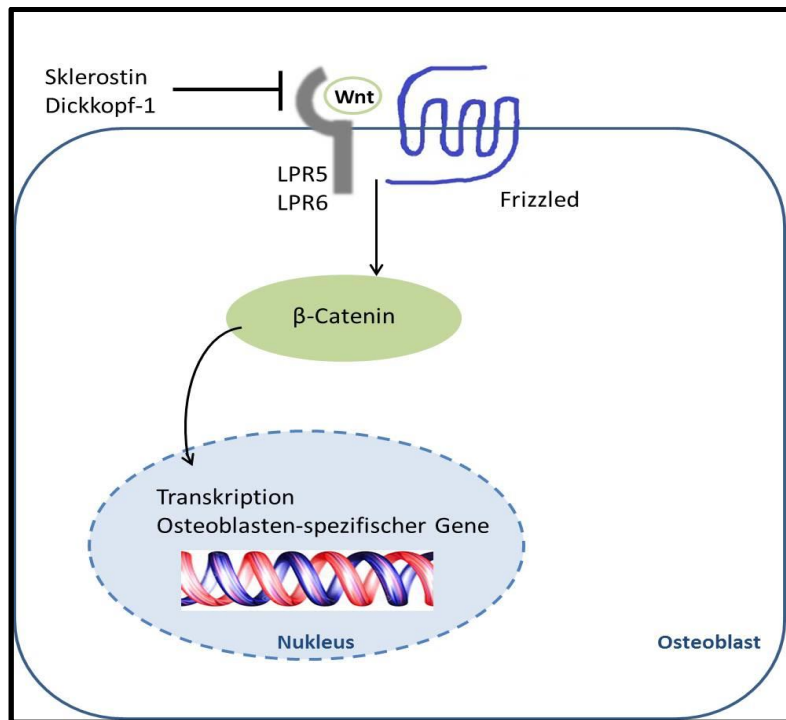


Abb. 3: Osteogene Differenzierung durch den Wnt-Signalweg. Wnt-Glykoproteine binden an einen Rezeptorkomplex aus Frizzled und LRP5/LRP6. Es kommt zu einem Anstieg von  $\beta$ -Catenin, welches in den Zellkern eintritt und dort die Transkription Osteoblasten-spezifischer Genen stimuliert. (Ross et al. 1993), modifiziert

### 2.2.3.3 Die Kopplung zwischen osteogener und adipogener Differenzierung

Aufgrund ihrer Multipotenz können sich mesenchymale Stromazellen auch zu Adipozyten differenzieren. Der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von Fettzellen ist der „Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$ “ (PPAR $\gamma$ ). Er ist der einzige bislang identifizierte Faktor, der die adipogene Differenzierung induziert. (Tontonoz et al. 1994; Muruganandan et al. 2009). PPAR $\gamma$  gehört zu einer Gruppe von Hormon-Zellkern-Rezeptoren und kommt in den Isoformen PPAR $\gamma$ 1 und -2 vor, wobei letztere im Fettgewebe vorherrscht (Muruganandan et al. 2009). Daneben existiert eine weitere für die adipogene Differenzierung wichtige Proteingruppe: CCAAT/Enhancer-binding Proteins (C/EBP). Nach der Bindung eines Liganden nimmt die zytoplasmatische Konzentration von C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  stark zu (Lewiecki 2011), was zur Stimulierung von PPAR $\gamma$  führt (Wu et al. 1995; Farmer 2006; Ali et al. 2013). Als weiterer essentieller Transkriptionsfaktor der adipogenen Stromazelldifferenzierung konnte C/EBP $\alpha$  identifiziert werden, der allerdings in PPAR $\gamma$ -defizienten Zellen nicht

die Anhäufung von Fettvakuolen vermitteln kann (Rosen et al. 2002). Möglicherweise besteht seine funktionelle Rolle darin, die PPAR $\gamma$  Konzentration aufrecht zu erhalten (Rosen et al. 2002).

Die Verflechtungen zwischen osteogener und adipogener Differenzierung sind vielschichtig. Zum einen wurde *in vitro* gezeigt, dass sich bereits ausdifferenzierte Osteoblasten durch Überführung in ein adipogenes Zellkultur-Medium zu Adipozyten differenzieren (Song 2004). Der umgekehrte Fall ist ebenfalls beschrieben (Lecka-Czernik et al. 1999).

Auch auf molekularer Ebene ist eine enge Beziehung zwischen Osteoblasten und Adipozyten feststellbar. Generell lässt sich festhalten, dass sich Transkriptionsfaktoren der adipogenen und osteogenen Differenzierung gegenseitig hemmen. So konnte bereits 1999 gezeigt werden, dass der adipogene Schlüsseltranskriptionsfaktor PPAR $\gamma$  eine hemmende Wirkung auf osteogene Transkriptionsfaktoren besitzt (Lecka-Czernik et al. 1999). Dieser Effekt beruht auf einer direkten Interaktion zwischen PPAR $\gamma$  und Runx-2 (Jeon 2003; Liu et al. 2010). So verringert PPAR $\gamma$  nicht nur die Menge von Runx-2, sondern hemmt auch dessen Transkriptions-Aktivität. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch BMPs eine Rolle in der frühen Phase der Adipozyten-Bildung spielen. Dabei scheint auch die Bindung von BMP an unterschiedliche Rezeptoren die Art der Differenzierung zu steuern (Muruganandan et al. 2009) (Abb.24). So kommt der BMP-Rezeptor I in den Subtypen IA und IB vor (BMPR-IA, BMPR-IB) (Chen et al. 1998). Während die Bindung von BMP-2 an BMPR-IA zur adipogenen Differenzierung führt, induziert die Bindung an BMPR-IB die osteogene Differenzierungskaskade (Chen et al. 1998).

Darüber hinaus gibt es noch weitere Gemeinsamkeiten zwischen den adipogenen und osteogenen-Signalwegen. So konnte gezeigt werden, dass es bei einem *knock-out* des ebenfalls für die osteogene Differenzierung essentiellen Smad-4 Gens zu einer deutlich verminderten adipogenen Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen kommt (Huang et al. 2009), was für eine zumindest in Teilen übereinstimmende Signaltransduktion im Rahmen beider Differenzierungen spricht. Dementgegen hemmt der osteogene Wnt-Signalweg die Adipozytenbildung. Hierbei sorgt der Anstieg der  $\beta$ -Catenin-Konzentration zu einer Hemmung von PPAR $\gamma$  (Ross et al. 2000; Bennett et al. 2002).

#### 2.2.4 Veränderungen mesenchymaler Stromazellen im Rahmen der Osteoporose

Ob und in welchem Umfang Veränderungen mesenchymaler Stromazellen zu der Entstehung einer Osteoporose beitragen, ist schon seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Zahlreiche Studien liefern hierbei zum Teil konträre Ergebnisse. Dennoch lassen sich aus Untersuchungen osteoporotischer Stromazellen folgende Aussagen zusammenfassen.

So ist die Proliferationskapazität mesenchymaler Stromazellen von osteoporotischen Spendern verringert, wie durch Berechnungen der Verdopplungszeiten *in vitro* (Rodríguez et al. 1999), und durch Änderungen der genetischen Expressionsmuster (Benisch et al. 2012; Pino et al. 2012) gezeigt werden konnte. Da die eingeschränkte Proliferationskapazität mit einem verringerten Potenzial zur Knochenneubildung gleich gesetzt wird, wird diese Defizienz der Stromazelle als möglicher Pathomechanismus der Osteoporose angesehen. Allerdings gibt es auch Studien, die diese Abnahme der Proliferationskapazität nicht bestätigen (Stenderup et al. 2001).

Des Weiteren zeigen mesenchymale Stromazellen von Osteoporose-Patienten Anzeichen von vorzeitiger Seneszenz. Bestimmte Veränderungen der Zellen sind mit fortgeschrittenem Alter physiologisch. Dazu zählt z.B. die intrazelluläre Zunahme der  $\beta$ -Galaktosidase Konzentration (Zhou et al. 2008). Benisch et. al haben gezeigt, dass neben dieser auch die Genexpression anderer Seneszenz-Marker bei osteoporotischen Stromazellen hochreguliert wird. Allerdings unterschieden sich die Genexpressionsmuster von Osteoporose-Kranken und gleichaltrigen gesunden Spendern deutlich, sodass von einer vom normalen Alterungsprozess abgekoppelten Seneszenz bei osteoporotischen Stromazellen ausgegangen wird. Die Arbeitsgruppe konnte unter anderem zeigen, dass p21 – ein für den Zellzyklus-Arrest verantwortliches Protein – zwar bei Stromazellen osteoporotischer Spender erhöht ist, allerdings nicht bei denen gleichaltriger gesunder Patienten. Darüber hinaus ist auch eine Erhöhung von Seneszenzmarkern festzustellen, die direkt die osteogene Differenzierung beeinflussen. So wird in osteoporotischen Stromazellen das Mab-21-like 2 Gen wesentlich höher exprimiert als in Zellen der Kontrollgruppe. Dieses Gen antagonisiert die Wirkungen von BMP-4 (Benisch et al. 2012).

Schon früh fiel bei Untersuchungen des Knochenmarks auf, dass dieses im Unterschied zu gleichaltrigen, gesunden Menschen bei Osteoporose-Patienten mehr Fett enthält (Meunier et al. 1971). Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass dieses Phänomen auf ein verändertes

Differenzierungspotenzial der mesenchymalen Stromazellen zurückzuführen ist. Setzt man osteoporotische und gesunde Stromazellen *in vitro* einem Medium aus, das sie zur osteogenen Differenzierung stimuliert, reagieren nur die gesunden Zellen auf diesen Reiz (Rodríguez et al. 1999). Darüber hinaus zeigen Stromazellen osteoporotischer Spender eine verstärkte Präferenz zur adipogenen Differenzierung (Dodds et al. 1995). Letztendlich konnten Pino et al. darlegen, dass bei osteoporotischen Stromazellen das Gleichgewicht zwischen der adipogenen und osteogenen Differenzierung gestört ist. Stromazellen von Osteoporose-Patienten exprimieren weniger Osterix und LRP6, was auf Veränderungen des BMP-, respektive Wnt-Signalwegs hindeutet (Pino et al. 2012). Auch die für den Nachweis einer stattfindenden osteogenen Differenzierung wichtigen Marker alkalische Phosphatase und Kollagen Typ-I sind bei osteoporotischen Stromazellen im geringeren Maße vorhanden, als dies bei Zellen gesunder Spender der Fall ist (Rodríguez et al. 1999; Rodríguez et al. 2000; Pino et al. 2012). Außerdem konnte eine Studie zeigen, dass es in osteoporotischen Stromazellen zu einem Anstieg von Sklerostin kommt, das die osteogene Differenzierung über den Wnt-Signalweg aktiv hemmt (Benisch et al. 2012) und somit indirekt die Adipogenese stimuliert.

Alle diese molekularen und zellbiologischen Mechanismen können für die Pathophysiologie der Osteoporose verantwortlich sein. Allerdings darf nicht unerwähnt bleiben, dass es auch Zweifel an diesen Ergebnissen gibt. Justesen et al. konnten keinen Unterschied zwischen MSC gesunder Spender und Osteoporose-Patienten feststellen. Weder sank die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung, noch nahm die adipogene Differenzierung zu (Justesen et al. 2002).

### 2.2.5 Die Rolle der extrazellulären Matrixproteine

Knochen besteht aus zwei Bestandteilen. Zum einen aus der anorganischen Komponente. Hierbei handelt es sich insbesondere um Hydroxylapatit, der mit 70 bis 90% den Hauptanteil des Knochens ausmacht. Zum anderen aus der organischen Komponente. Dazu zählen extrazelluläre Matrixproteine, unter denen das Kollagen Typ-I den größten Anteil ausmacht (Young 2003; Sroga und Vashishth 2012). Darüber hinaus gibt es noch 180 bis 200 weitere Proteine in der Knochenmatrix, die sowohl Auswirkungen auf die Struktur und Mechanik des Knochens, als auch auf die Funktion der Knochenzellen haben (Sroga und Vashishth 2012).

Das am häufigsten vorkommende nicht-kollagene Matrixprotein ist das Osteocalcin. Dieses Vitamin-K abhängige Protein besteht aus 49 Aminosäuren und wird von Osteoblasten synthetisiert (Lian und Gundberg 1988; Polak-Jonkisz und Zwolinska 1998; Neve et al. 2013). Die Steuerung der Synthese erfolgt über den Transkriptionsfaktor Runx-2 (Meunier et al. 1971), wobei die Menge des gebildeten Osteocalcins von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst wird. Generell sinkt die Konzentration mit steigendem Lebensalter, wobei Männer einen leicht höheren Wert aufweisen. Ein Stimulus durch Vitamin D3 führt zu einer vermehrten Bildung, wohingegen Parathormon die Synthese verringert (Lian und Gundberg 1988; Polak-Jonkisz und Zwolinska 1998).

Die genauen Aufgaben von Osteocalcin sind bis heute noch nicht abschließend geklärt. Allerdings scheint eine Funktion in der Regulation der Knochen-Remodellierung durch Effekte auf Osteoblasten zu liegen (Neve et al. 2013). Osteocalcin verbessert demnach die Adhäsion von Osteoblasten an den Oberflächen von Hydroxylapatit und Biozementen (Lai et al. 2010; Gao et al. 2013; Neve et al. 2013). Eine weitere Aufgabe scheint in der Kontrolle des Hydroxylapatit-Kristallwachstums zu liegen. Je nach Konzentration nimmt Osteocalcin Einfluss auf die Größe der Kristalle (Sroga et al. 2011). Interessanter Weise konnten Ducy et al. jedoch zeigen, dass die Knochendichte und -mineralisierung in Osteocalcin-*knock out*-Mäusen normal im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen war (Ducy et al. 1996). Allerdings kam es zu Veränderungen bei der Knochenremodellierung, was sich in einer dickeren Kortikalis der Knochen äußerte. Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Osteocalcin die Reifung von Osteoklasten begünstigt (Ishida und Amano 2004), sowie deren Aktivität steigert (Chenu et al. 1994). Des Weiteren wird Osteocalcin als Marker für Knochenumbau-Prozesse angesehen, weshalb es auch zur Diagnose der Osteoporose herangezogen wird. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass an postmenopausaler Osteoporose erkrankte Frauen einen Anstieg der Osteocalcin-Serumkonzentration bei gleichzeitiger Abnahme der Knochendichte aufweisen (Lian und Gundberg 1988; Polak-Jonkisz und Zwolinska 1998; Atalay et al. 2012).

Mit einem Anteil von bis 2% (Sroga und Vashishth 2012) gehört Osteopontin ebenfalls zu den am häufigsten vorkommenden nicht-kollagenen extrazellulären Matrixproteinen. Dabei kommt dieses etwa 34 kDa große Glykoprotein nicht nur im Knochen vor, sondern findet sich in einer Vielzahl von Geweben, wie z.B. Niere, Gehirn oder Gallenblase (Sodek et al. 2000; Hunter 2013). Gebildet wird Osteopontin im Knochengewebe sowohl von Osteoblasten jeder Differenzierungsstufe, als auch von Osteozyten und Osteoklasten (Sodek et al. 1995; Dodds et al. 1995). Im Gegensatz zu Osteocalcin liegt Osteopontin nicht homogen verteilt im Knochen vor, sondern tritt gehäuft in bestimmten, nur mikroskopisch zu erkennenden Strukturen auf.

Dabei handelt es sich zum einen um die so genannten „Zementlinien“ und zum anderen um die „*laminae limitantes*“ (McKee und Nanci 1996). Zementlinien sind Übergänge in der Knochenmatrix, die entstehen, nachdem es zu Resorptionsvorgängen oder zu einem vorübergehenden Stillstand der Knochenmatrix-Produktion gekommen ist. *Laminae limitantes* markieren Übergänge zwischen Knochenmatrix und Knochenzellen, wie sie z.B. entlang einer Osteozyten-Lakune (McKee und Nanci 1996). Im Falle der Zementlinien dient Osteopontin als Vermittler der Osteoblasten-Adhäsion (Sodek et al. 2000). Außerdem interagiert das Protein, das über die RGD-Sequenz (RGD steht für die Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure) verfügt mit dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, welches bei Osteoklasten dominiert. Dies führt zu deren Aktivierung und somit zu einer gesteigerten Knochenresorption (Flores et al. 1992, Ross et al. 1993, Gerstenfeld 1999).

Die Rolle von Osteopontin bei der Mineralisation der Knochenmatrix ist nicht genau geklärt. Fest steht, dass die Carboxyl- und Phosphatgruppen des Glykoproteins mit Hydroxylapatit interagieren (Hunter 2013). Während man deshalb früher annahm, dass Osteopontin die Mineralisation des Knochens fördert, wurde in späteren Studien das Gegenteil gezeigt. So wiesen einige Studien nach, dass Osteopontin *knock out*-Mäuse ein normal ausgebildetes Skelett besitzen (Rittling et al. 1998) und sogar eine vermehrte Mineralisation des Knochens zeigen (Boskey et al. 2002). Osteopontin verhindert also vielmehr die Ausbildung von Hydroxylapatit-Kristallen, wobei mit seiner steigenden Phosphorylierung die Hemmung der Kristallbildung zunimmt (Pampena et al. 2004; Hunter 2013). Daher wird heute angenommen, dass die Funktion von Osteopontin in der Kontrolle des Kristall-Wachstums während der Mineralisation des Knochens liegt (Hunter 2013).

### 2.2.6 Östrogen

Östrogen spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Knochenstoffwechsels. Dabei kommen dem Sexualhormon im Wesentlichen drei Aufgaben zu: 1. Inhibierung der *Bone Multicellular Units* und konsekutive Verlangsamung der Knochenremodellierung, 2. Induktion der Apoptose von Osteoklasten und 3. die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen in Osteoblasten bei gleichzeitiger Suppression der Apoptose (Khosla et al. 2012). Daraus lässt sich folgern, dass der postmenopausale Abfall der Östrogenkonzentration mit dem Ver-

lust der osteoprotektiven Hormonwirkung einhergeht. In diesem Sinne wurde bereits vor über 70 Jahren der Zusammenhang zwischen einem sinkenden Östrogenspiegel und dem postmenopausalen osteoporotischen Knochenverlust nachgewiesen. (Albright 1941 zitiert in Khosla et al. 2012).

ER  $\alpha$  (Laudes 2011) wird von Osteoklasten exprimiert (Hoyland et al. 1997), was auf direkte Effekte des Östrogens auf Osteoklasten schließen lässt. So wird die durch RANKL stimulierte Osteoklasten-Differenzierung durch Östrogen gehemmt (Shevde et al. 2000). Außerdem führt eine Deletion des ER  $\alpha$ -Gens zu einer verminderten Knochenmasse, da sich die Überlebensdauer der Osteoklasten verlängert (Imai et al. 2009). Dies hängt damit zusammen, dass Östrogen über den ER  $\alpha$  das Apoptose induzierende Protein FasL aktiviert (Nakamura et al. 2007). Sinkt der Östrogenspiegel, steigt somit die Überlebenszeit der Osteoklasten und daher auch die Knochenresorptionsrate. Darüber hinaus beeinflusst Östrogen auch auf indirekte Weise die Osteoklasten-Funktion (Compston 2001). So steigert Östrogen die Freisetzung des RANKL-Antagonisten OPG in Osteoblasten (Hofbauer et al. 1999). Dahingegen bleibt die direkte Transkription von RANKL von einem Östrogenabfall unbeeinflusst (Lerner 2006).

Die Einflüsse von Östrogen auf Osteoblasten sind ähnlich vielschichtig wie die auf Osteoklasten. So vermindert Östrogen die Apoptose der Osteoblasten und verlängert somit deren Lebensdauer (Kousteni et al. 2001). Darüber hinaus beeinflusst Östrogen auch die Differenzierung mesenchymaler Stromazellen. *In vitro* Untersuchungen an Mäusezellen haben ergeben, dass Östrogen die Differenzierung in Richtung Osteoblasten fördert, wenn auch nur bis zu einem frühen Stadium der Differenzierungs-Kaskade (Okazaki 2002). Ein Mangel an Östrogen senkt die Expression von osteogenen Transkriptionsfaktoren wie Runx-2 und Osterix, genauso wie die Konzentration des für die osteogene Differenzierung wichtigen Signaltransduktion-Proteins  $\beta$ -Catenin (Foo et al. 2007). Gleichzeitig hemmen physiologische Östrogenspiegel die adipogene Differenzierung (Okazaki 2002), was sich *in vitro* in erniedrigten PPAR $\gamma$ -Spiegeln zeigt (Zhao et al. 2011).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Probenmaterial

Für diese Arbeit wurden Stromazellen aus Spongiosa von insgesamt 14 Personen gewonnen, die sich entweder in der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH – Standort Gießen, oder der Asklepios Klinik Lich GmbH einer totalen Femurkopf-Resektion unterziehen mussten. Dabei wurde bei sechs der Patienten im Vorfeld eine Coxarthrose (n=6) diagnostiziert, wohingegen acht Patienten eine Schenkelhalsfraktur (n=8) erlitten. Da keine knochengesunden Spender zur Verfügung standen, diente die Gruppe der Coxarthrose-Patienten als Kontrollgruppe. Dies geschah in Anlehnung an das Studiendesign von Abdallah et al. (2005), D'Amelio et al. (2011) und Zupan et al. (2012).

Die Patienten waren zum Operationszeitpunkt zwischen 59 und 90 Jahren alt, wobei das mittlere Alter bei 75,3 ( $\pm 9,5$ ) Jahren lag. Von den insgesamt 14 Patienten waren sechs Männer (mittleres Alter 76,5 ( $\pm 11,8$ ) Jahre) und acht Frauen (mittleres Alter 76,1 ( $\pm 9,2$ ) Jahre). Das mittlere Alter der Coxarthrose-Patienten lag bei 69,1 ( $\pm 6,1$ ) Jahren, wohingegen die Patienten, die unter einer Fragilitätsfraktur litten im Mittel 80,7 ( $\pm 7,2$ ) Jahre alt waren.

Die Untersuchungen wurden durch die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt.

### 3.2 Zellkultur

#### 3.2.1 Isolierung der mesenchymalen Stromazellen (MSC) aus Spongiosa

Um mesenchymale Stromazellen zu gewinnen, wurde so schnell wie möglich Spongiosa aus den resezierten Femurköpfen isoliert. Dazu wurde zunächst der proximale Teil des Oberschenkelkopfes mittels einer oszillierender Säge (Hebu medical) abgetrennt (Abb. 4a) und für spätere Untersuchungen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Von dem verbleibenden Knochen wurden 3 bis 5 mm dicke Scheiben abgesägt und anschließend die Kompakta mittels einer Knochenzange entfernt (Abb. 4b). Die Spongiosa wurde hiernach in kleinere, etwa 1 x 1 cm große Stücke

zerteilt und in mehrere Petrischalen überführt (Abb 4c). Die Inkubation erfolgte in 15 ml  $\alpha$  *Minimal Essential Medium* ( $\alpha$ MEM, Gibco life technologies) mit 20% fötalem bovines Serum (FBS) (Biochrom) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (Gibco life technologies) (im Folgenden als Expansionsmedium bezeichnet) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Um Blutzellen und Fett aus der Spongiosa zu entfernen, wurde diese alle 3 Tage mit warmer phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) (Gibco life technologies) gewaschen und das Expansionsmedium wurde gewechselt. Dieser Vorgang wurde so lange fortgesetzt, bis die Zellen eine etwa 80 prozentige Konfluenz erreichten. Daraufhin wurden die Spongiosa-Stücke mit einer Pinzette entfernt. Die Zellen befanden sich nunmehr *per definitionem* in Passage null.

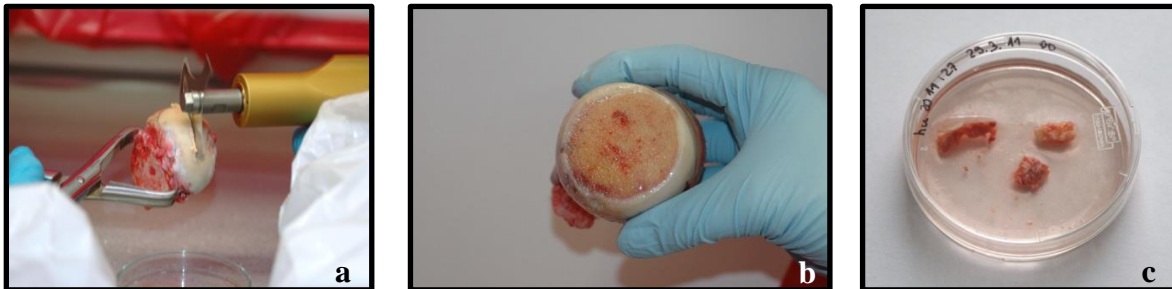


Abb. 4: Isolation der Spongiosa aus den operativ entfernten Femurköpfen. Zersägen des Femurkopfes (a), freiliegende Spongiosa (b), Isolierung der Stromazellen aus der Spongiosa (c)

### 3.2.2 Vermehrung der mesenchymalen Stromazellen

Nachdem die mesenchymalen Stromazellen in den Petrischalen eine 80 prozentige Konfluenz erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Expansionsmedium abgesaugt und die Zellen mit angewärmtem PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 7 ml TrypLE (Gibco) in die Zellkulturschalen gegeben und diese bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach einer mikroskopischen Kontrolle, ob sich die Zellen von dem Boden der Petrischale gelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Expansionsmedium gestoppt. Nach Überführung der Suspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) wurden die Zellen bei 800 Rotationen pro Minute (RPM) für 5 Minuten

zentrifugiert. Anschließend wurde der über dem Zellpellet entstandene Überstand mit einer Glaspipette angesaugt und das Pellet mit 1ml Expansionsmedium resuspendiert. Nach Ermittlung der Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer wurden je 500.000 Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (Greiner bio-one) ausplattiert und mit 13 ml Expansionsmedium inkubiert.

### 3.2.3 Kryokonservierung der Stromazellen

Nachdem die Zellen eine ca. 80 prozentige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie zur längeren Lagerung einer Kryokonservierung unterzogen. Dazu wurden die mesenchymalen Stromazellen mittels TrypLE wie oben beschrieben abgelöst. Es folgte die Ermittlung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer. Anschließend wurden 1 000 000 Zellen in 1 ml *freezing* Medium gelöst und in ein 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Um eine kontinuierliche Temperaturabnahme um 1° C zu gewährleisten, wurde das Kryoröhrchen über Nacht bei -80° C in den *Freezing Container „Mr. Frosty“* (Nalgene) gelagert. Ab dem nächsten Tag wurden die Stromazellen dann bei -196° C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Alle eingefrorenen Zellen befanden sich in Passage eins.

### 3.2.4 Auftauen der Stromazellen

Um die Stromazellen aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank genommen und für 30 Sekunden in ein 37° C warmes Wasserbad gegeben. Anschließend wurde der Auftauprozess bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Zellen wurden nach dem vollständigen Auftauen in ein mit 5 ml Expansionsmedium gefülltes 15 ml Falcon überführt und bei 800 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand über dem gewonnenen Zellpellet abpipettiert und die Zellen in 1 ml Expansionsmedium resuspendiert. Um eine Vermehrung der Zellen zu erreichen wurden erneut 500 000 Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert. Bei diesen Zellen handelt es sich um die zweite Passage.

### 3.2.5 Kultivierung der Stromazellen

Die Kultivierung der Zellen jedes Spenders fand auf drei unterschiedliche Arten statt (Abb. 5):

- 1) Die Zellen wurden lediglich in Basismedium ( $\alpha$ MEM, 10% FBS, 1% P/S) inkubiert, um sie in einem undifferenzierten Zustand zu belassen. Dazu wurden je  $2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$  in 6 Wells einer 24er-Well-Platte (Sarstedt AG & Co) ausplattiert. Um einen möglichen zeitlichen Verlauf der Genexpression nachweisen zu können, wurden die Zellen für 0, 7, 14 und 21 Tage inkubiert.
- 2) Die Zellen wurden osteogen differenziert. Auch hier wurden in 6 Wells je  $2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$  ausgesät. Die Kultivierung erstreckte sich über 21 Tage. Als Kontrolle dienten Zellen, die lediglich dem Basismedium ausgesetzt waren.
- 3) Die Zellen wurden für 14 Tage adipogen differenziert. Die Zellzahl pro Well lag ebenfalls bei je  $2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$ . Auch hier wurden Zellen als Kontrolle mit Basismedium inkubiert.

Die Zusammensetzung der jeweiligen Differenzierungsmedien ist den Kapiteln 3.2.6.1 und 3.2.6.2 zu entnehmen.

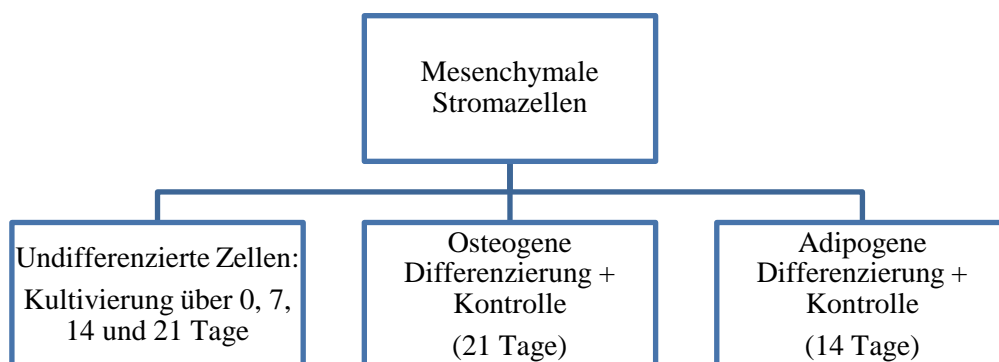


Abb. 5: Schematische Darstellung der Stromazellen-Kultivierung

### 3.2.6 Differenzierung der Stromazellen

Im Rahmen der Arbeit erfolgte sowohl eine osteogene, als auch eine adipogene Differenzierung der Stromazellen. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$  in 24-Well Zellkulturplatten ausplattiert. Um eine Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen herbeizuführen, wurden dem Basismedium ( $\alpha$ MEM, 10% FBS, 1% P/S) verschiedene Zusätze beigefügt. Für beide Ansätze wurden als Negativkontrolle die Zellen lediglich mit Basismedium inkubiert.

#### 3.2.6.1 Osteogene Differenzierung

Das osteogene Medium (Tabelle 1) setzte sich aus  $\alpha$ MEM, 10% FBS, 1% P/S, 0,06 mM Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich), 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat (Sigma-Aldrich) und 0,1  $\mu$ M Dexamethason (Sigma-Aldrich) zusammen. Die Differenzierung erfolgte über 21 Tage. Das Medium wurde zwei Mal wöchentlich gewechselt.

<b>Osteogenes Differenzierungsmedium</b>
$\alpha$ -MEM
10% Kälberserum (FBS)
1% Penicillin/Streptomycin
0,1 $\mu$ M Dexamethason
10 mM $\beta$ -Glycerolphosphat
0,06 mM Ascorbinsäure

*Tabelle 1: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums*

### 3.2.6.2 Adipogene Differenzierung

Das adipogene Medium (Tabelle 2) bestand aus Basismedium, dem 0,2 mM Indomethacin (Sigma-Aldrich), 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Sigma-Aldrich), 5µg/ml Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) (Sigma-Aldrich) und 1µM Dexamethason zugesetzt wurden. Hier erstreckte sich die Differenzierungsdauer über 14 Tage; das Medium wurde ebenfalls zwei Mal wöchentlich gewechselt.

<b>Adipogenes Differenzierungsmedium</b>
α-MEM
10% Kälberserum (FBS)
1% Penicillin/Streptomycin
1 µM Dexamethason
0,2 mM Indomethacin
0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)
5µg/ml Insulin-Transferrin-Sodium-Lösung (ITS)

*Tabelle 2: Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums*

## 3.3 Molekularbiologische Untersuchungen

### 3.3.1 Isolation der RNA

Für die Extraktion der RNA wurde das peqGOLD TriFast™ (peqlab) Reagenz genutzt. Um eine möglichst große Menge RNA zu erhalten, wurde das Zelllysats aus drei Wells einer 24er Well Platte gepoolt. Dazu wurden je 333µl des Reagenz zusammen mit 5µl Glykogen (Roche) in ein Well gegeben und bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Nach der Überführung des Zelllysats in ein *Tube* wurden 200µl Chloroform dazu gegeben und dieses für 10

Minuten auf einen Rüttler verbracht. Bei der anschließenden Zentrifugation (16000 RPM für 5 Minuten) kommt es zu einer Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues *Tube* überführt und erneut mit 200µl Chloroform zentrifugiert. Zu der neuerlich abgenommenen oberen Phase wurden 500µl Isorpropanol gegeben, was zu einer Präzipitation der RNA führt. Durch Zentrifugation bei 18000 RPM für 10 Minuten bildet sich ein Pellet, welches 2-mal in 70 prozentigem Ethanol gewaschen wurde. Die Lösung der RNA erfolgte in RNase-freiem Wasser (Braun).

### 3.3.2 Konzentrationsbestimmung mittels Biophotometer

Um sowohl Aussagen über die Konzentration, als auch die Reinheit der gewonnen RNA treffen zu können, wurde jede Probe einer biophotometrischen Messung unterzogen. Dazu wurden zunächst 69 µl Tris-HCl in eine lichtdurchlässige Photometerküvette gegeben. Diese wurde mit dem BioPhotometer (Eppendorf) gemessen und der Wert als Referenz-Wert festgelegt. Nun wurde 1 µl der RNA-Probe dazugegeben und bei einer Extinktion von 260 nm die Konzentration der RNA bestimmt. Durch die Berechnung des Extinktionsverhältnisses von 260 nm zu 280 nm ( $E_{260}/E_{280}$ ) ließ sich eine mögliche Verunreinigung der Probe (mit z.B. Proteinen) feststellen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden nur RNA-Proben benutzt, deren  $E_{260}/E_{280}$ -Koeffizient zwischen 1,6 und 2,1 lag. Außerdem wurde die Konzentration der RNA durch Verdünnung in RNase-freiem Wasser auf 100 µg/ml eingestellt.

### 3.3.3 DNase Behandlung

Bevor die mRNA-Probe mittels Reverser Transkriptions – PCR in *copyDNA* (cDNA) umgeschrieben wurde, musste sie einer Behandlung mit DNaseI (Roche) unterzogen werden. Dies geschah, um eine Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA zu verhindern. Tabelle 3 zeigt die Mastermix-Zusammensetzung für den DNase-Verdau:

<b>Kit/ Hersteller</b>	<b>Reagenz</b>	<b>1 x Ansatz</b>
GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems®)	25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl
Roche	10 x DNase I incubation buffer	2,4 µl
Roche	10 U/µl DNase I, RNase frei	2,4 µl
Roche	40 U/µl RNase Inhibitor	0,6 µl

Tabelle 3: Mastermix des DNase-Verdaus

Zu den 7,8µl DNase-Mastermix wurden 16,2µl der auf 100ng/µl eingestellten mRNA gegeben. Hierauf wurde der Ansatz im Thermocycler „DNA-Engine“ (Bio-Rad) nach folgendem Programm inkubiert:

1. 25 Minuten bei 37°C
2. 5 Minuten bei 75°C
3. Abkühlen auf 4°C

Die Probe wurde innerhalb der nächsten 30 Minuten weiterverarbeitet, damit ihre Stabilität gesichert war.

### 3.3.4 Reverse Transkriptions - PCR (RT-PCR)

Nach der erfolgten DNase-Behandlung wurde die RNA mittels reverser Transkription (GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems®)) in cDNA umgeschrieben. Die Zusammensetzung des RT-PCR-Mastermixes ist in Tabelle 4 dargestellt:

Kit	Reagenz	1 x Ansatz
GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems®)	25 mM MgCl <sub>2</sub>	24,0 µl
	10 x PCR GOLD Puffer	12,0 µl
	Nukleotide MIX (dNTP)	48,0 µl
	50 µM Random Hexamers	6,0 µl
	20 U/µl RNase- Inhibitor	6,0 µl
	50 U µl Reverse Transkriptase	6,0 µl

Tabelle 4: Mastermix RT-PCR

Pro Probe wurden zu 102µl RT-PCR-Mix 18µl der mit DNase behandelten mRNA gegeben. Außerdem wurde parallel ein Mix angesetzt, in dem die Reverse Transkriptase durch steriles *Aqua ad iniectabilia* (Braun) ersetzt wurde ((-)RT – Kontrolle), um das Ergebnis der vorangegangenen DNase-Behandlung zu überprüfen. Je Probe wurden hier zu 8,5 µl (-)RT-Mix 1,5µl mRNA hinzu gegeben. Bei der nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte es so nicht zur Bildung eines falschpositiven Produktes kommen, da sowohl cDNA, als auch genomische DNA fehlen. In der Gelelektrophorese war keine Bande erkennbar. Sollte allerdings doch ein Signal detektiert werden, so war entweder die Probe mit genomischer DNA verunreinigt, oder der DNase Verdau war zu ineffizient und musste wiederholt werden.

Die Inkubation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Protokoll:

1. 8 Minuten bei 21°C
2. 15 Minuten bei 42°C
3. 5 Minuten bei 99°C
4. 5 Minuten bei 5°C
5. Abkühlung auf 4°C

Wurden die Proben nicht unmittelbar weiter verwendet, erfolgte die Lagerung bei -20°C.

### 3.3.5 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Um den Erfolg der cDNA-Synthese und der (-)RT-Kontrolle zu überprüfen, wurde eine qualitative (PCR) mit dem Primer für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Eurofin) durchgeführt. Der genutzte Primer weist folgende Eigenschaften auf:

Primer	Nukleotidsequenz	Produktgröße
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	Forward: 5'-CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC-3'	82 bp
	Reverse: 5'-GTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'	

Tabelle 5: Nukleotidsequenz des verwendeten GAPDH-Primers

Zur Durchführung der PCR wurden je 10µl des Mastermixes zu 2,5µl der synthetisierten cDNA, bzw. der (-)RT-Kontrolle gegeben. Um die Reinheit des Mastermixes zu kontrollieren, wurde eine *no-template-control* (NTC) mit inkubiert. Diese NTC enthält anstelle der cDNA, bzw. der -RT-Kontrolle 2,5 µl steriles *Aqua ad iniectabilia*.

Die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes ist in Tabelle 6 aufgeführt:

Kit/ Hersteller	Reagenz	1 x Ansatz
GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems®)	25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl
	10 x PCR GOLD Puffer	1 µl
Eurofins MWG Operon	10 pmol/µl Primer Gapdh forward	0,25 µl
Eurofins MWG Operon	10 pmol/µl Primer Gapdh reverse	0,25 µl
	Aqua bidest	7,93 µl
Roche	AmpliTaq GOLD	0,0625 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes

Die Inkubation im Thermocycler erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. 5 Minuten bei 95 °C
  2. 30 Sekunden bei 94 °C
  3. 30 Sekunden bei 60 °C
  4. 30 Sekunden bei 72 °C
  5. 1 Minute bei 72 °C
  6. Abkühlen auf 4 °C
- } 35 Zyklen Wiederholung

### 3.3.6 Gelelektrophorese

Nach der qualitativen PCR wurden die Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und einer visuellen Kontrolle unterzogen. Hierzu wurde zunächst ein 2%iges Agarosegel hergestellt, indem 1g Agar-Agar (Roth) gemeinsam mit 50 ml TAE-Puffer kurz in der Mikrowelle aufgeköcht wurde. Anschließend wurden 5µl des Farbstoffs Gel Green<sup>Tm</sup> (Biotium) in die Agarose-Lösung gegeben und das noch flüssige Gel in einen Gelträger gegossen. Nach der Aushärtung wurde das Gel in die Laufkammer (Biometra) mit 10x TAE-Puffer gegeben. Die Proben wurden mit 5µl einer Lösung aus 30% Glycerin, 0,1% Orange G und sterilem Aqua bidest vermischt und in die Vertiefungen des Gels überführt. Außerdem wurde in eine Gelvertiefung ein Marker (Quantitas Marker 50bp – 2kb, Biozym) geben, um die detektierte Produktgröße ablesen zu können. Die Auftrennung erfolgte bei 160V für 20 Minuten (PowerPac Basic<sup>TM</sup>, Bio-Rad). Anschließend wurden die Banden mittels des Transilluminators UVsolo (Biometra) sichtbar gemacht und fotografiert.

Waren in jeder PCR-Probe Banden vorhanden, in der (-)RT-Kontrolle jedoch keine Banden detektierbar, wurde die cDNA für weitere Untersuchungen verwendet.

Der für dieses Verfahren genutzte TAE-Puffer setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

TAE-Puffer: 10 x Puffer: 145, 2 g TRIS (Carl Roth)  
 11, 1 g EDTA (Carl Roth)  
 3 Liter Aqua bidest  
 pH 8 eingestellt mit Essigsäure (Merck)

### 3.3.7 Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Um eine Aussage über das quantitative Vorkommen eines Gens treffen zu können, musste mit der cDNA eine quantitative RT-PCR durchgeführt werden. Diese auch als „Real-Time-PCR“ bezeichnete Methode basiert auf der Detektierung von Fluoreszenzsignalen. Dazu wird dem Mastermix der Farbstoff SYBR Green I zugefügt. Dieser Farbstoff lagert sich während der Amplifikation in den entstehenden DNA-Doppelstrang ein und wird durch Licht angeregt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt nach jedem abgeschlossenen Zyklus. Eine Quantifizierung ist möglich, weil die Zunahme der DNA-Doppelstränge proportional zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals ist.

Für die Durchführung der Genexpressionsanalyse wurde das QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) zusammen mit den QuantiTect Primer Assays (Qiagen) verwendet. Bei dem QuantiFast SYBR Green PCR Kit handelt es sich um einen vorgefertigten Mix, der sowohl Nukleotide, Polymerase, als auch SYBR Green enthält. Die verwendeten Primer dieser Untersuchung wurden von Qiagen designt und als spezifisch charakterisiert. Für jedes untersuchte Gen wurde ein Mastermix hergestellt. Die Zusammensetzung des Mastermixes für eine Reaktion gibt Tabelle 7 wieder:

Mastermixkomponente	Ansatz pro Reaktion
QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
Primer (1 µM)	2 µl
RNase freies Wasser	6 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung des qPCR-Mastermixes

Zu den insgesamt 18 µl Mastermix wurden 2 µl cDNA gegeben. Um eventuelle Pipettiergenauigkeiten zu erfassen, wurde jede Genexpression im Dreifach-Ansatz bestimmt. Das heißt, dass jede cDNA Probe in 3 Wells pipettiert wurde (Triplett). Neben den untersuchten Genen wurde mit jeder cDNA Probe die Expression zweier so genannter „*housekeeping genes*“ gemessen. In dieser Arbeit wurden dafür die Gene GAPDH sowie das für die 18S Ribosomen-Untereinheit codierende RRN18S (18S) verwendet. Diese Gene unterscheiden sich von den untersuchten Zielgenen dahingehend, dass sie keiner Regulation unterworfen sind. Somit lässt sich aus dem Verhältnis von nicht-regulierten *housekeeping genes* zu regulierten Zielgenen die relative Menge der zu untersuchenden Gene bestimmen. Die Spezifität der einzelnen nachgewiesenen Amplifikate wurde anhand einer Schmelzkurvenanalyse getestet.

Auch hier wurde wiederum der angesetzte Mastermix auf dessen Reinheit überprüft, indem anstatt cDNA RNase freies Wasser in ein Triplett gegeben wurde.

Die RT-qPCR wurde mit dem CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio - Rad) durchgeführt und die 96-Well-PCR Platten nach folgendem Protokoll inkubiert:

1. 5 Minuten bei 95°C
  2. 10 Sekunden bei 95°C
  3. 30 Sekunden bei 60°C
  4. Schmelzkurve: Schrittweise Erhöhung der Temperatur von 60°C auf 95°C in 0,5°C - Schritten
- } Wiederholung für 39 Zyklen

Für diese Arbeit wurden folgende QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen genutzt:

Primer	RefSeq	Katalognummer	Produktgröße
18S	NM_180473	QT00199367	149bp
GAPDH	NM_002046	QT01192646	119bp
RUNX-2	NM_004348	QT00020517	101bp
PPAR $\gamma$	NM_005037	QT00029841	113bp
BMP-2	NM_001200	QT00012544	148bp
Osteocalcin (BGALP)	NM_199173	QT00232771	90bp
Osteopontin (SPP-1)	NM_000582	QT01008798	115bp
Osteoprotegerin (OPG)	NM_002546	QT00014294	107bp
RANKL	NM_003701	QT00215614	91bp

Tabelle 8: Verwendete QuantiTect Primer Assays

### 3.4 Statistische Auswertung

Die in der RT-qPCR ermittelten Ct-Werte wurden mittels der CFX Manager Software 2.1 von Bio-Rad bearbeitet. Es wurde die relative normalisierte Expression der Gene bestimmt ( $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode). Konnte keine Genexpression festgestellt werden, wurde für die weiteren Berechnungen ein Wert eingesetzt, der der Hälfte der minimalen Nachweisgrenze entspricht ( $\frac{\text{niedrigste detektierte Genexpression}}{2}$ ). Die anschließende statistische Bearbeitung wurde durch die Arbeitsgruppe Biomathematik des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Hierbei wurde der Datensatz in zwei Teilversuche gegliedert. Der erste Teilversuch umfasst die Betrachtung der Genexpression undifferenzierter Stromazellen von Coxarthrose- bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten (0, 7, 14, 21

Tage). Teilversuch zwei untersucht das Genexpressionsprofil beider Gruppen im Hinblick auf unterschiedliche Differenzierungen (osteogen und adipogen). Dabei wurde bei den adipogen differenzierten Zellen auf die Untersuchung von Osteopontin und Osteocalcin verzichtet.

Bei beiden Teilversuchen wiesen einige Daten keine Normal-, sondern eine rechtsschiefe Verteilung auf. Um dennoch statistische Zusammenhänge detektieren zu können, wurden diese Werte logarithmisch transformiert. Dies geschah in Teilversuch eins und zwei mit den Genexpressionen von BMP-2, PPAR $\gamma$ , RANKL und OPG. Zur Beschreibung dieser Daten wurde der geometrische Mittelwert sowie der Streufaktor errechnet. Bei den normalverteilten Werten wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung bestimmt. Anschließend wurden mit dem Programm BMDP 8.1 (Dixon, 1993) Varianzanalysen durchgeführt. Im Fall des Teilversuchs eins handelt es sich um eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Gruppe, Zeit). In Teilversuch zwei kam ein weiterer Faktor hinzu, sodass hier die dreifaktorielle Varianzanalyse zum Einsatz kam (Gruppe, Differenzierungsart, Differenzierungszustand). Zusätzlich wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt, um innerhalb der Teilversuche mögliche Korrelationen zwischen den einzelnen Genen nachzuweisen. Auch hierfür wurde das Programm BMDP 8.1 verwendet.

Für alle errechneten Werte wurde ein p-Wert  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen. p-Werte  $\leq 0,01$  waren statistisch hoch signifikant. War der p-Wert  $\leq 0,001$  war das Ergebnis höchst signifikant.

### 3.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav „Systec DE65“	Systec GmbH, Wettenberg, D
Sterilisator „Heraeus Function line“	Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Eismaschine SPR 80 L	NordCap GmbH & Co. KG, Bremen, D
Hebu Oszillosäge „GOLD Plus Autopsie“	Hebu medical, Tuttlingen, D
Kühl-Gefriergerät -20°C	Privileg, Stuttgart, D
Gefrierschrank -80°C Heraeus Herafreez	Thermo Fisher Scientific, Schwer- te, D
„Finnpipette F2“ 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Pipetten “Research” 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifugen “Mikro 20”, “Mikro 220R”	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge „Megafuge 11R Heraeus“	Thermo Fisher Scientific, Schwer- te, D
Wasserbad	Gesellschaft für Laborgeräte, Burgwedel, D
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
Waage „PB3002-S Delta Range	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D
Feinwaage „Discovery“	Ohaus, Nänikon, CH
„DNA Engine Peltier Thermal Cycler“	Bio-Rad, München, D
Real Time Cycler: „Real Time System CFC 96“ mit “C1000 Touch Thermal Cycler”	Bio-Rad, München, D
Gelelektrophorese-Kammer	Biometra, Göttingen, D
PowerPac™ Basic	Bio-Rad, München, D
Transiluminator UVsolo	Biometra, Göttingen, D
Brutschrank “Heracell 150i”	Thermo Fisher Scientific, Schwer- te, D
Sterilbank Zellkultur “MSC advantage”	Thermo Fisher Scientific, Schwer- te, D
Pipettus	Hirschmann, Eberstadt, D

Cryo-Einfriergerät "Mr. Frosty"

Neubauer Zählkammer

Stickstofftank Thermolyne

Nalgene über Sigma Aldrich,  
Steinheim, D

Paul Marienfeld GmbH & Co KG,  
Lauda-Königshofen, D

Thermo Fisher Scientific, Schwer-  
te, D

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Zellkulturschale 35x10mm	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
TC Platte „24-Well Standard“	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
15 ml, 50 ml Falcon	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
1,7 ml Cryo tubes	Sorenson BioScience, Salt Lake City, Utah, USA
1,5ml Tubes	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
2ml Tubes	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
650µl Microtubes	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
500µl PCR-Tubes	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Spritze 5ml	Braun, Melsungen, D
Pipettenspitzen: 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, D
Minisart <sup>®</sup> plus Spritzenvorsatzfilter	Satorius, Göttingen, D
Photometer-Küvetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
„Hard-Shell PCR Plates 96-Well“	Bio-Rad, München, D
“Microseal B Film PCR Sealer”	Bio-Rad, München, D

### 3.7 Chemikalien und Reagenzien

In der Zellkultur

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco® life technologies, Darmstadt, D
Alpha Minimal Essential Medium ( $\alpha$ MEM)	Gibco® life technologies, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Gibco® life technologies, Darmstadt, D
Fötales bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin D
Dexamethason-Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Indomethacin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
„TrypLE™ Express Enzyme“	Gibco® life technologies, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, D

Molekularbiologische Untersuchungen

## Chemikalien und Reagenzien

## Hersteller

peqGOLD TriFast™ Reagent	PEQLAB, Erlangen, D
Glykogen	Roche, Mannheim, D
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol 100%, unvergällt	Carl Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
DNase I	Roche, Mannheim, D
DNase Incubation Buffer	Roche, Mannheim, D
GeneAmp® Gold RNA PCR Core Kit	Life technologies - Invitrogen, Darmstadt, D
AmpliTaq GOLD	Roche, Mannheim, D
Agar- Agar	Carl Roth, Karlsruhe, D
Gel Green™ Nucleic acid stain	Biotium, über VWR, Darmstadt, D
Orange G	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missou- ri, USA
Quantitas DNA Marker 50 bp- 2 kb	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, D
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, D
Aqua ad iniectabilia	Braun AG, Melsungen, D

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Zell-Differenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochen-abgeleitete humane mesenchymale Stromazellen, aus der Hüftkopf-Spongiosa von Coxarthrose-Patienten und von Patienten, die eine Fragilitätsfraktur des Schenkelhalses erlitten hatten, isoliert und mittels unterschiedlicher Kulturmedien für 21 Tage osteogen und für 14 Tage adipogen differenziert. Im Anschluss wurden die Expressionen der folgenden Gene quantitativ ermittelt: BMP-2, RUNX-2, PPAR $\gamma$ , RANKL, OPG, OP, OC.

Als Kontrolle dienten Zellen, die im Standardmedium ( $\alpha$ -MEM, 10% FBS, 1% P/S) über die gleiche Dauer kultiviert wurden.

Die im Rahmen der Differenzierungen beobachteten morphologischen Veränderungen werden im Folgenden kurz dargelegt:

Bei der adipogenen Differenzierung veränderten die sonst spindelförmigen Stromazellen ihr Aussehen. Neben einer polygonalen bis rundlichen Form kam es außerdem zu einer deutlichen Ansammlung von *intra*zytoplasmatischen Fettvakuolen. Abbildung 6 zeigt undifferenzierte und differenzierte Zellen nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen.

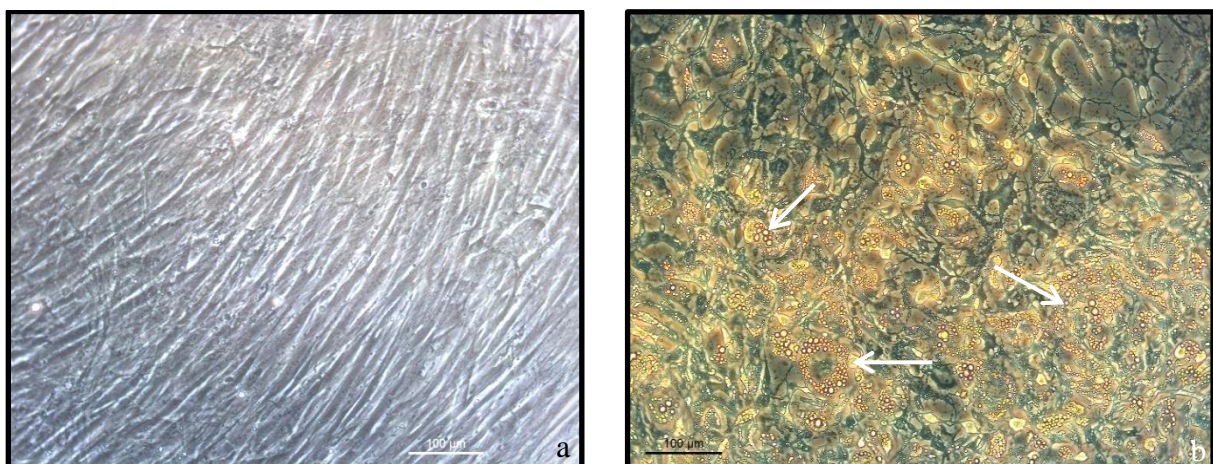


Abb. 6: Undifferenzierte (a) und adipogen differenzierte Stromazellen (b). Die intrazytoplasmatischen Fettvakuolen sind deutlich zu erkennen (Pfeile). 10x-Vergrößerung

Auch im Falle der osteogenen Differenzierung ließen sich deutliche morphologische Veränderungen erkennen. Die Zellen nahmen hier eine rundliche bis kubische Gestalt an. Des Weiteren fanden sich in der extrazellulären Matrix Präzipitate, die für eine beginnende Mineralisierung der Matrix sprechen. Folgende Abbildung zeigt undifferenzierte und osteogen differenzierte Stromazellen nach 21 Tagen Kultivierung.

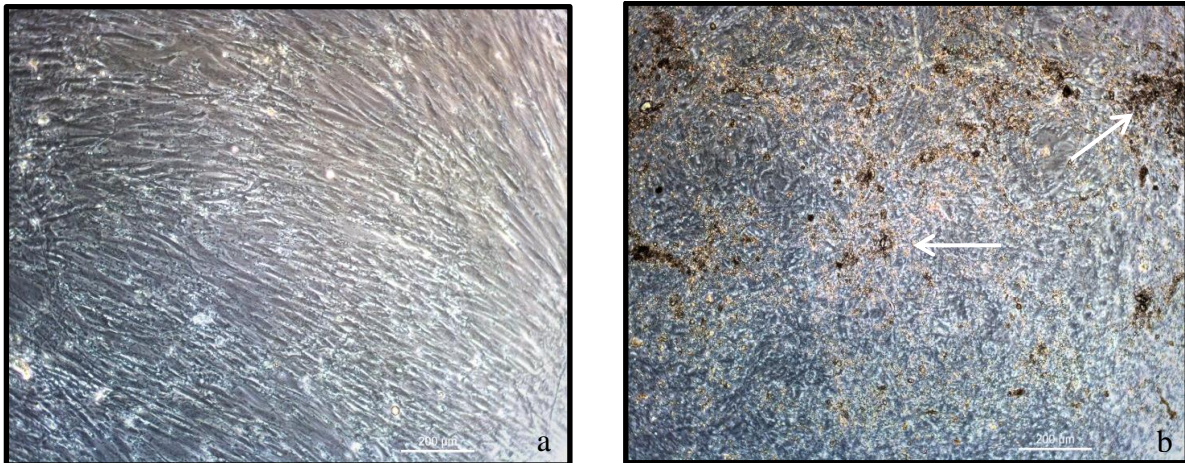


Abb. 7: Undifferenzierte (a) und osteogen differenzierte Stromazellen (b). Bei den osteogen differenzierten Zellen fällt eine deutliche Ausfällung eines extrazellulären Präzipitats auf (Pfeile).

#### 4.2 Ergebnisse der Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Um den Erfolg der DNase-Behandlung und die Reinheit der eingesetzten cDNA Proben zu überprüfen, wurde eine RT-PCR mit dem Ziel-Gen GAPDH durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Für die weitere RT-qPCR wurden nur Proben verwendet, die eine GAPDH-spezifische Bande zeigten und deren (-)RT-Ansatz keine Bande aufwies (siehe Abb. 8).

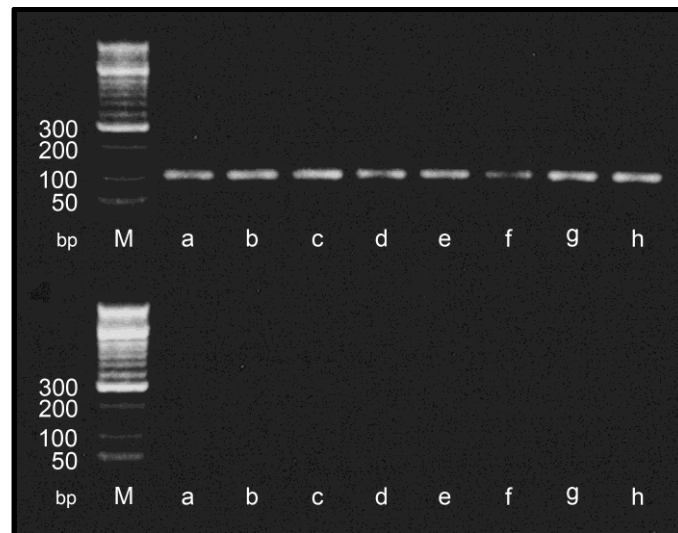


Abb. 8: Ergebnis der Gelelektrophorese im Anschluss der GAPDH-RT-PCR.

Oben: Proben des (+)RT-Ansatzes; unten: Proben des (-)RT-Ansatzes. M: Marker; a – h: PCR-Produkte; bp: Basenpaare

### 4.3 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Im Folgenden sind die Genexpressionsmuster undifferenzierter Stromazellen dargelegt. Die Zellernte erfolgte nach 0, 7, 14 und 21 Tagen, um Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Genexpression machen zu können.

#### 4.3.1 Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse

Bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse der Genexpression undifferenzierter Stromazellen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. So war die **BMP-2** Expression in der Coxarthrose-Gruppe signifikant höher als in der Gruppe der Schenkelhalsbrüche ( $p = 0,0321$ ). Ebenso bestand eine signifikante Wechselwirkung zwischen den Gruppen und der Kultivierungszeit. Während in der Gruppe der Coxarthrosen die BMP-2 Genexpression bis zum Tag 14 ansteigt und anschließend deutlich abfällt, war in der Gruppe der Schenkelhalsbrüche ein kontinuierlicher und geringgradiger Abfall der Genexpression während der gesamten Kultivierungszeit zu verzeichnen. Der zeitliche Verlauf der BMP-2 Expression ist in Abbildung 9

dargestellt. Dabei wurden die Werte aufgrund der rechtsschiefen Verteilung logarithmiert. Zu sehen sind hier der geometrische Mittelwert und die aus dem Streufaktor ermittelten Fehlerindikatoren (vgl. Tabelle 9).

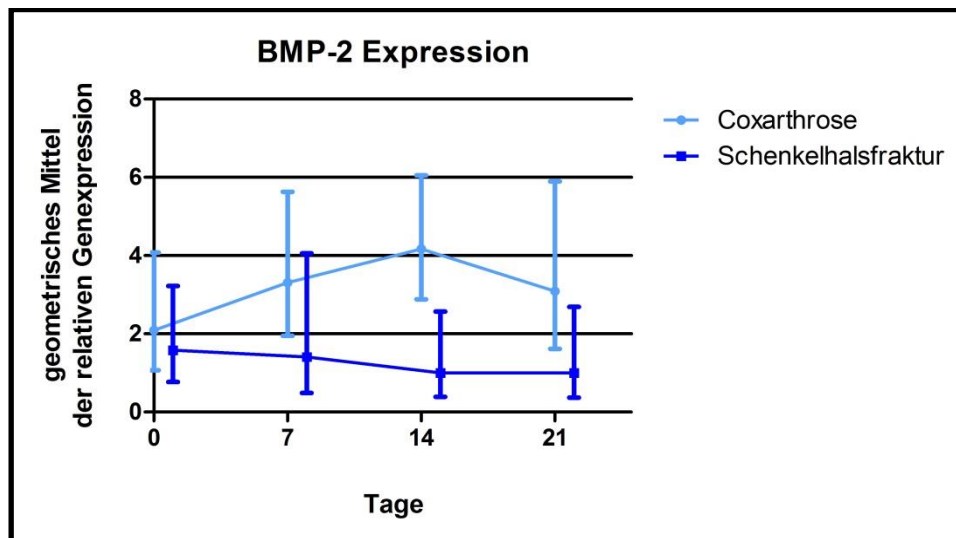


Abb. 9: Vergleichende Darstellung der relativen BMP-2 Expression undifferenzierter Zellen (Coxarthrose versus Schenkelhalsfraktur) über eine Kultivierungszeit von 21 Tagen. In der Gruppe der Coxarthrose-Patienten kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Genexpression der mesenchymalen Stromazellen, wohingegen das Niveau in der Gruppe der Schenkelhalsfraktur signifikant erniedrigt ist und über den Kultivierungszeitraum leicht abfällt. Um eine Überlappung der Fehlerbalken zu vermeiden, wurden die Graphen leicht versetzt angeordnet.  $p = 0,0321$

BMP-2 Kultivierungszeit in Tagen	Coxarthrose		Schenkelhalsfraktur	
	geo. Mittelwert	Streufaktor	geo. Mittelwert	Streufaktor
0	2,09	1,95	1,58	2,04
7	3,31	1,7	1,41	2,88
14	4,17	1,45	1	2,57
21	3,09	1,91	1	2,69

Tabelle 9: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der BMP-2 Expression von Stromazellen isoliert aus der Hüftkopfspongiosa von Patienten mit Coxarthrosen und Schenkelhalsfraktur kultiviert über 21 Tage.

Auch im Fall des **Osteopontins (OP)** lag ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Patienten-Gruppen vor. So war die Genexpression in der Gruppe der Fragilitätsfrakturen deutlich erhöht ( $p = 0,0256$ ). Bei OP sind arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung dargestellt (Abb. 10, Tabelle 10)

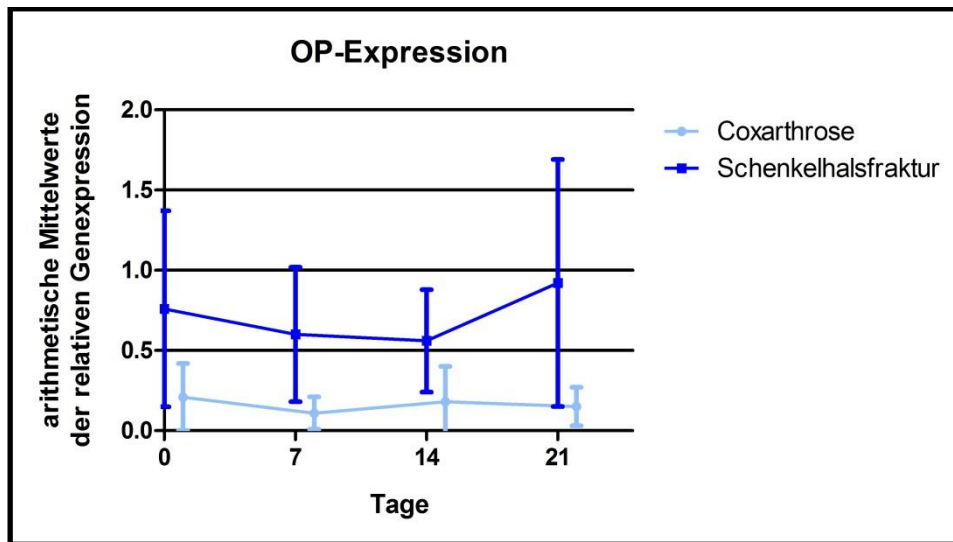


Abb. 10: Vergleichende Darstellung der relativen OP Expression undifferenzierter Zellen (Coxarthrose versus Schenkelhalsfraktur) über eine Kultivierungszeit von 21 Tagen. Es wird deutlich, dass die Genexpression in der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen signifikant höher ist als in der Gruppe der Coxarthrose-Patienten. Um eine Überlappung der Fehlerbalken zu vermeiden, wurden die Graphen leicht versetzt angeordnet.  $p = 0,0256$

OP Kultivierungszeit in Tagen	Coxarthrose		Schenkelhalsfraktur	
	arith. Mittelwert	Standardabweichung	arith. Mittelwert	Standardabweichung
0	0,21	0,21	0,76	0,61
7	0,11	0,10	0,60	0,42
14	0,18	0,22	0,56	0,33
21	0,15	0,12	0,92	0,77

Tabelle 10: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der OP Expression von Stromazellen isoliert aus der Hüftkopfspongiosa von Patienten mit Coxarthrosen und Schenkelhalsfrakturen. Die Kultivierung erfolgte über 21 Tage.

Es konnten jedoch nicht nur Unterschiede der Genexpression mit Blick auf die Patientengruppen (Coxarthrose *versus* Fragilitätsfraktur) nachgewiesen werden, sondern es zeigte sich auch ein Einfluss der Kultivierungszeit. So war im Falle von **Osteocalcin (OC)** ( $p = 0,0221$ ) ein genereller Abfall der Genexpression über den Kultivierungszeitraum – sowohl bei Zellen der Coxarthrose-Gruppe als auch bei Zellen aus der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen – zu verzeichnen. Dies ist in Abb. 11 und Tabelle 11 dargestellt.

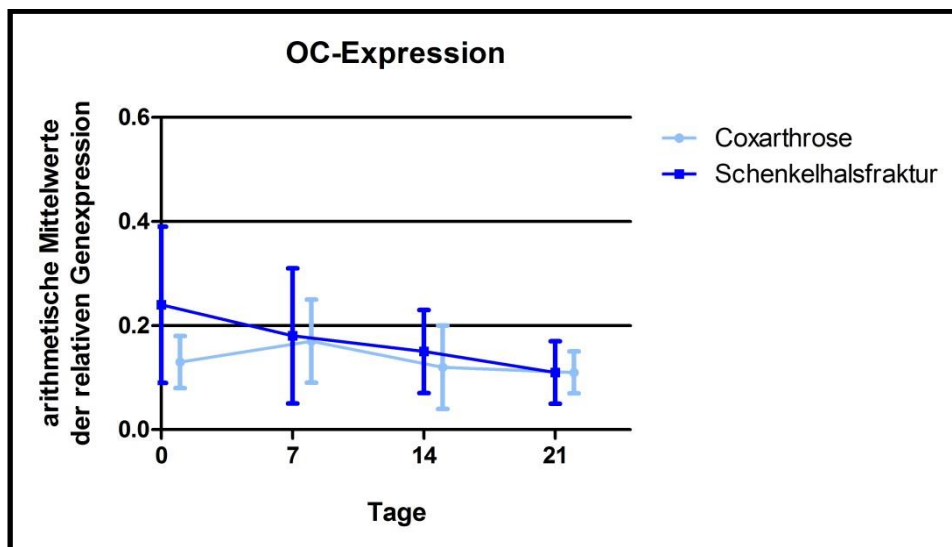


Abb. 11: Vergleichende Darstellung der relativen OC-Expression undifferenzierter Zellen (Coxarthrose versus Schenkelhalsfraktur) über eine Kultivierungszeit von 21 Tagen. Sowohl bei Zellen der der Coxarthrose-Gruppe als auch bei Zellen aus der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen ist eine kontinuierliche Abnahme der OC-Expression zu erkennen. Die Graphen verlaufen annähernd deckungsgleich, was auf die annähernd übereinstimmenden OP Expressionsmuster in beiden Patientengruppen hinweist. Um eine Überlappung der Fehlerbalken zu vermeiden, wurden die Graphen leicht versetzt angeordnet.  $p = 0,0221$

OC	Coxarthrose		Schenkelhalsfraktur	
	arith. Mittelwert	Standardabweichung	arith. Mittelwert	Standardabweichung
Kultivierungszeit in Tagen				
0	0,13	0,05	0,24	0,15
7	0,17	0,08	0,18	0,13
14	0,12	0,08	0,15	0,08
21	0,12	0,04	0,11	0,06

Tabelle 11: Arithmetischer Mittelwerte und Standardabweichung der OC-Expression von Stromazellen isoliert aus der Hüftkopfspongiosa von Patienten mit Coxarthrosen und Schenkelhalsfrakturen. Die Kultivierung erfolgte über 21 Tage.

Auch bei **PPAR $\gamma$**  wirkte sich die Kultivierungszeit auf die Genaktivität aus. Im Unterschied zur OC-Expression kam es jedoch bei PPAR $\gamma$  zu einem deutlichen Abfall am 14. Kultivierungstag, der in der Gruppe der Coxarthrosen besonders deutlich war. Auch die Mittelwerte der Genexpression von Zellen beider Gruppen, die über 21 Tage kultiviert wurden sind niedriger als diejenigen, die bereits nach 0 oder 7 Tagen geerntet wurden. Bei PPAR $\gamma$  zeigte sich also eine Abnahme der Genexpression vor allem gegen Ende des Kultivierungszeitraums. (siehe Abb. 12 und Tabelle 12)

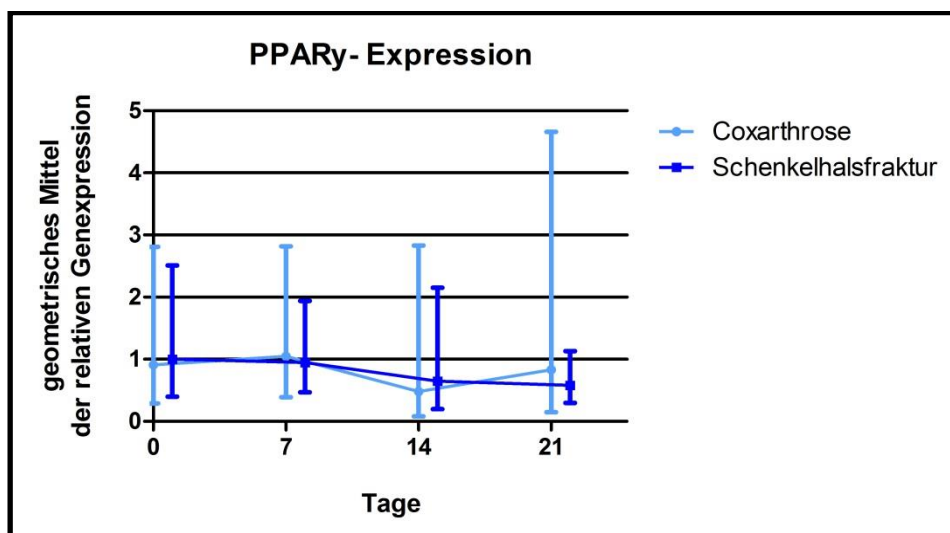


Abb. 12: Vergleichende Darstellung der relativen PPAR $\gamma$ -Expression undifferenzierter Zellen (Coxarthrose versus Schenkelhalsfraktur) über eine Kultivierungszeit von 21 Tagen. Bei beiden Gruppen fällt eine Abnahme der Genexpression gegen Ende des Kultivierungszeitraums auf. Diese ist nach 14 Tagen besonders deutlich. Um eine Überlappung der Fehlerbalken zu vermeiden, wurden die Graphen leicht versetzt angeordnet.  $p = 0,0340$

PPAR $\gamma$	Coxarthrose		Schenkelhalsfraktur	
	geo. Mittelwert	Streufaktor	geo. Mittelwert	Streufaktor
Kultivierungszeit in Tagen				
0	0,91	3,09	1	2,51
7	1,05	2,69	0,95	2,04
14	0,48	5,89	0,65	3,31
21	0,83	5,62	0,58	1,95

*Tabelle 12: Geometrische Mittelwerte und Streufaktor der PPAR $\gamma$  Expression von Stromazellen isoliert aus der Hüftkopfspongiosa von Patienten mit Coxarthrosen und Schenkelhalsfrakturen. Die Kultivierung erfolgte über 21 Tage.*

Bei Betrachtung der Expressionsmuster von **RUNX-2** und **OPG** waren hingegen weder Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, noch in Bezug auf den zeitlichen Verlauf festzustellen.

Dies war auch bei **RANKL** der Fall, allerdings lag der p-Wert bei vergleichender Betrachtung der Gruppen nur knapp unter der festgelegten Signifikanzgrenze ( $p = 0,0539$ ). Deshalb und aufgrund der Tatsache, dass es sich bei RANKL um ein Schlüsselgen in der Osteoporose-Pathogenese handelt, wird auf die festgestellte Tendenz näher eingegangen (Abb. 13, Tabelle 13). Während die RANKL-Expression bei Zellen der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen ein sehr niedriges Niveau aufwies, war die Expression bei Zellen der Gruppe der Coxarthrosen deutlich höher und stieg auch über die Zeit an. Dies äußerte sich auch in der festgestellten Wechselwirkung zwischen Gruppe und Kultivierungszeit ( $p = 0,0262$ ). Das bedeutet, dass die Kultivierungszeit bei Zellen isoliert aus Hüftköpfen nach vorangegangener Fragilitätsfraktur keine Auswirkung auf die Expression von RANKL hatte, es aber bei Zellen von Patienten mit Coxarthrose zu einer deutlichen Zunahme der Genexpression im gleichen Kultivierungszeitraum kam.

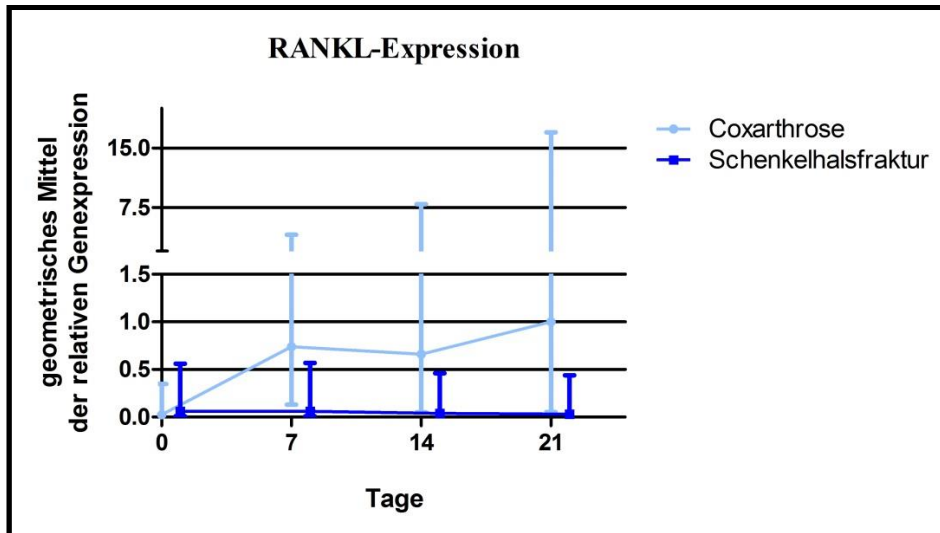


Abb. 13: Vergleichende Darstellung der relativen RANKL- Expression undifferenzierter Zellen (Coxarthrose versus Schenkelhalsfraktur) über eine Kultivierungszeit von 21 Tagen. Während die Expression von RANKL in Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe über die gesamte Kultivierungszeit auf einem sehr niedrigen Niveau bleibt, kommt es in der Coxarthrose-Gruppe zu einem deutlichen Anstieg. Um eine Überlappung der Fehlerbalken zu vermeiden, wurden die Graphen leicht versetzt angeordnet.  $p = 0,0539$

RANKL	Coxarthrose		Schenkelhalsfraktur	
	geo. Mittelwert	Streufaktor	geo. Mittelwert	Streufaktor
Kultivierungszeit in Tagen				
0	0,027	16,98	0,06	9,33
7	0,74	5,5	0,06	9,55
14	0,66	12,02	0,04	11,48
21	1	16,98	0,03	14,79

Tabelle 13: Geometrischer Mittelwerte und Streufaktor der RANKL-Expression von Stromazellen isoliert aus der Hüftkopfspongiosa von Patienten mit Coxarthrosen und Schenkelhalsfrakturen. Die Kultivierung erfolgte über 21 Tage.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zusammenfassend dargestellt. Dabei werden sowohl die p-Werte der untersuchten Haupteffekte (Patientengruppe und Kultivierungszeit), als auch der möglichen Wechselwirkung aufgeführt.

Gen	Haupteffekte (p-Wert)		Wechselwirkung (p-Wert) Gruppe x Zeit
	Gruppe	Zeit	
BMP-2	<b>0,0321</b>	0,6082	<b>0,0142</b>
RUNX-2	0,6026	0,3662	0,1898
PPAR $\gamma$	0,9678	<b>0,0340</b>	0,4747
RANKL	0,0539	0,1304	<b>0,0262</b>
OPG	0,7906	0,9901	0,9825
OP	<b>0,0256</b>	0,1088	0,1356
OC	0,3746	<b>0,0221</b>	0,1835

Tabelle 14: Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse. p-Werte, die unter der festgelegten Signifikanzgrenze von 0,05 lagen, sind fett markiert.

#### 4.3.2 Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse

Im Rahmen der dreifaktoriellen Varianzanalyse wurde überprüft, ob die Gruppe (Coxarthrose *versus* Schenkelhalsbruch), die Differenzierungsart (adipogen *versus* osteogen) oder der Differenzierungszustand (differenziert *versus* undifferenzierte Kontrollen) einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression hatte. Nicht berücksichtigt wurde bei dieser Analyse der zeitliche Verlauf der Genexpression. Die Zellen der adipogenen Differenzierung sowie deren Kontrollen wurden nach 14 Tagen geerntet; osteogen differenzierte Zellen und deren Kontrollen nach 21 Tagen.

Es zeigte sich, dass sowohl die adipogene, als auch die osteogene Differenzierung einen höchst signifikanten ( $p \leq 0,0001$ ) Anstieg der **PPAR $\gamma$** -Expression im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollen zur Folge hatte. Des Weiteren war die Expression bei den adipogen differenzierten Zellen höher als bei den osteogen differenzierten Stromazellen, sodass ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Differenzierungsarten nachgewiesen werden konnte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Patientengruppen lag nicht vor. Dies ist in Abbildung 14 und Tabelle 15 dargestellt.

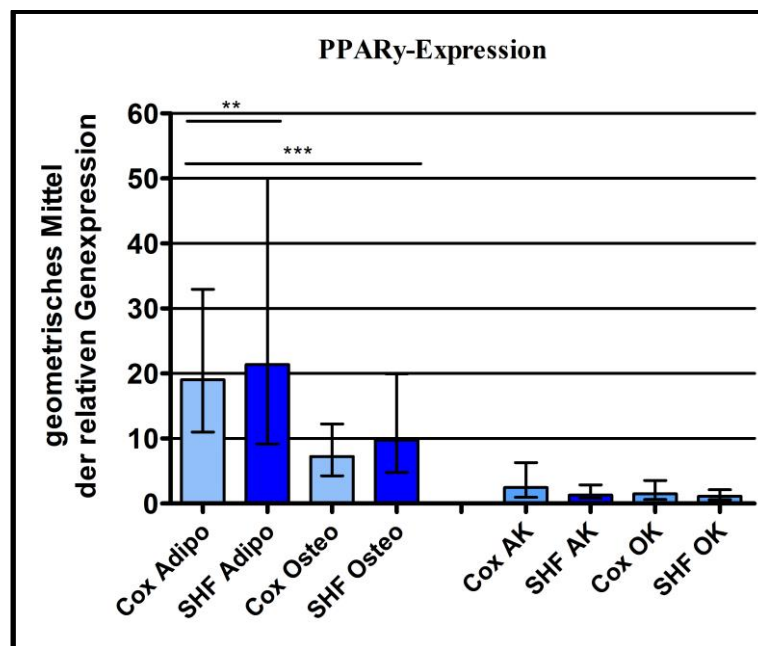


Abb. 14: Vergleichende Darstellung der PPAR $\gamma$ -Expression adipogen und osteogen differenzierter Stromazellen, sowie undifferenzierte Zellen von Coxarthrose- (hellblau) bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten (dunkelblau). Die PPAR $\gamma$ -Expression steigt höchst signifikant sowohl im Rahmen der adipogenen, als auch der osteogenen Differenzierung. Der Anstieg bei der adipogenen Differenzierung war jedoch deutlich höher als bei der osteogenen Differenzierung, sodass ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Differenzierungsarten bestand. Ein Unterschied zwischen den untersuchten Patientengruppen konnte nicht nachgewiesen werden.

**Cox Adipo:** Adipogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox AK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **SHF Adipo:** Adipogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF AK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe; **Cox Osteo:** osteogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox OK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **SHF Osteo:** Osteogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF OK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe

PPAR $\gamma$	Coxarthrose		Schenkelhalsfraktur	
	geo. Mittelwert	Streufaktor	geo. Mittelwert	Streufaktor
adipogen differenzierte Zellen	19,05	1,73	21,38	2,34
adipogene Kontrolle	2,45	2,57	1,28	2,24
osteogen differenzierte Zellen	7,24	1,69	9,77	2,04
osteogene Kontrolle	1,48	2,4	1,12	1,9

*Tabelle 15: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der PPAR $\gamma$ -Expression von adipogen und osteogen differenzierten und undifferenzierten Stromazellen, die aus der Spongiosa von Coxarthrose-, bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten gewonnen wurden.*

Auch im Fall von **RANKL** kam es im Rahmen der adipogenen Differenzierung zu einem höchst signifikanten Anstieg der Gen-Expression im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen. Ein Unterschied zwischen Coxarthrose- und Schenkelhalsfraktur-Gruppe konnte hier ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 15, Tabelle 16).

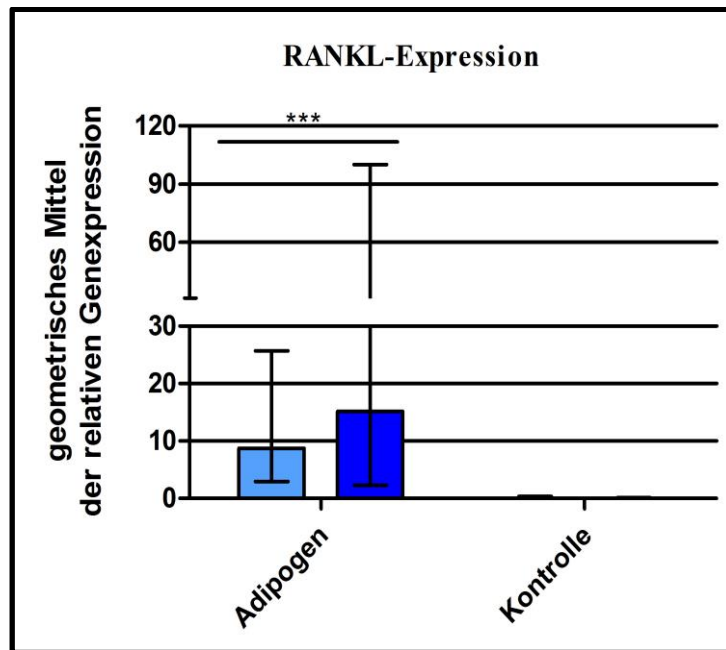


Abb. 15: Vergleichende Darstellung der RANKL-Expression adipogen differenzierter sowie undifferenzierter Stromazellen von Coxarthrose- (hellblau) und Schenkelhalsfraktur-Patienten (dunkelblau). Es konnte ein höchst signifikanter Anstieg der RANKL-Expression im Rahmen der adipogenen Differenzierung festgestellt werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Patientengruppen lag nicht vor. **Adipogen:** adipogen differenzierte Zellen; **Kontrolle:** als Kontrolle dienende undifferenzierte Zellen

RANKL	Coxarthrose		Schenkelhalsbruch	
	geo. Mittelwert	Streufaktor	geo. Mittelwert	Streufaktor
adipogen differenzierte Zellen	8,71	2,95	15,14	6,61
adipogene Kontrolle	0,02	17,38	0,02	7,59

Tabelle 16: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der RANKL-Expression adipogen differenzierter sowie undifferenzierter Stromazellen, die aus der Spongiosa von Coxarthrose- bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten gewonnen wurden

Da RANKL und OPG auf funktioneller Ebene eng interagieren, wurde ebenfalls überprüft, ob eine adipogene oder osteogene Differenzierung der Stromazellen gleichermaßen zu einer Änderung der **OPG**-Expression führt. Es stellte sich heraus, dass die jeweiligen Differenzierungsprozesse eine Abnahme der OPG-Expression nach sich zogen, unabhängig von der Patientengruppe und der Differenzierungsart (Abb.16, Tabelle 17).

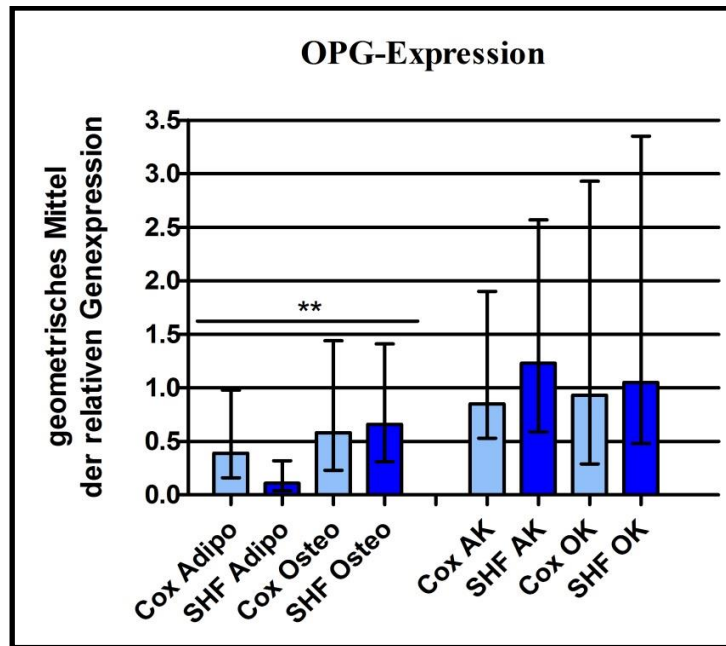


Abb. 16: Vergleichende Darstellung der OPG-Expression osteogen und adipogen differenzierter Stromazellen, sowie undifferenzierte Zellen von Coxarthrose- (hellblau) bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten (dunkelblau). Die Differenzierung der Zellen führte zu einem hoch signifikanten Abfall der OPG-Expression. Diese war unabhängig von der Differenzierungsart und der Patientengruppe zu beobachten.

**Cox Adipo:** Adipogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox AK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **SHF Adipo:** Adipogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF AK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe; **Cox Osteo:** osteogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox OK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **SHF Osteo:** Osteogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF OK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe

OPG	Coxarthrose		Schenkelhalsbruch	
	geo. Mittelwert	Streufaktor	geo. Mittelwert	Streufaktor
adipogen differenzierte Zellen	0,39	2,51	0,11	2,95
adipogene Kontrolle	0,85	2,24	1,23	2,09
osteogen differenzierte Zellen	0,58	2,51	0,66	2,14
osteogene Kontrolle	0,93	3,16	1,05	2,19

*Tabelle 17: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der OPG- Expression von osteogen und adipogen differenzierten, sowie undifferenzierten Stromazellen, die aus der Spongiosa von Coxarthrose-, bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten gewonnen wurden.*

Auch die Genexpression von **RUNX-2** (Abb. 17, Tabelle 18) stieg signifikant im Rahmen der adipogenen und osteogenen Differenzierung. Hierbei ist hervor zu heben, dass die RUNX-2 Expression adipogen differenzierter Zellen deutlich höher war, als die der osteogen differenzierten Zellen. Es bestand somit nicht nur ein signifikanter Unterschied zwischen differenzierten und undifferenzierten Zellen, sondern auch ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Differenzierungsarten.

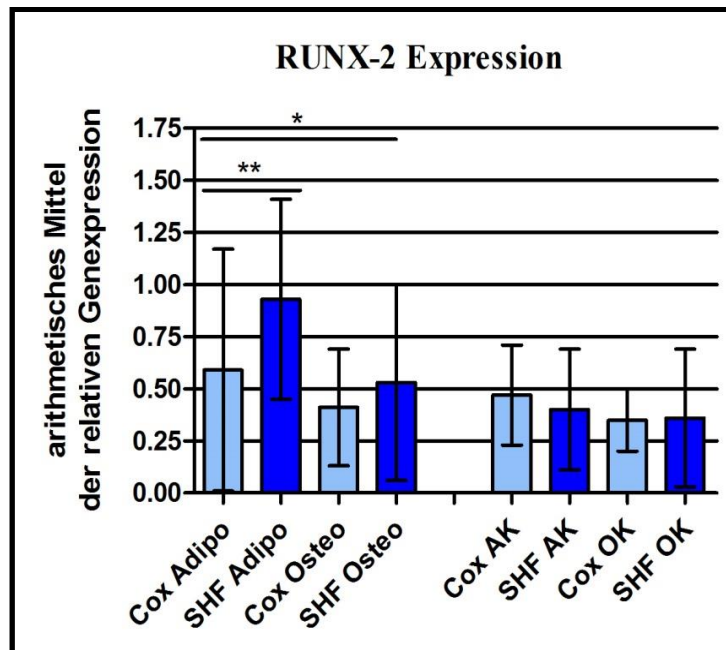


Abb. 17: Vergleichende Darstellung der RUNX-2-Expression osteogen und adipogen differenzierter Stromazellen, sowie undifferenzierte Zellen von Coxarthrose- (hellblau) bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten (dunkelblau). Die Runx-2 Expression steigt signifikant sowohl im Rahmen der adipogenen, als auch der osteogenen Differenzierung. Der Anstieg bei der adipogenen Differenzierung war jedoch deutlich höher als bei der osteogenen Differenzierung, sodass ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Differenzierungsarten bestand.

**Cox Adipo:** Adipogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox AK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **SHF Adipo:** Adipogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF AK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe; **Cox Osteo:** osteogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox OK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **SHF Osteo:** Osteogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF OK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe

RUNX-2	Coxarthrose		Schenkelhalsbruch	
	arith. Mittelwert	Standardabweichung	arith. Mittelwert	Standardabweichung
adipogen differenzierte Zellen	0,59	0,58	0,93	0,48
adipogene Kontrolle	0,47	0,24	0,4	0,29
osteogen differenzierte Zellen	0,41	0,28	0,53	0,47
osteogene Kontrolle	0,35	0,15	0,36	0,33

*Tabelle 18: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung der RUNX-2 Expression von osteogen und adipogen differenzierten sowie undifferenzierten Stromazellen, die aus der Spongiosa von Coxarthrose-, bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten gewonnen wurden.*

Des Weiteren konnte bezüglich des **BMP-2** eine (Abb.18, Tabelle 19) signifikante Wechselwirkung zwischen der Gruppe und der Differenzierung der Zellen in die adipogene und osteogene Richtung festgestellt werden. Dies ist in Abb. 18 dargestellt. Osteogen und adipogen differenzierte Stromazellen von Patienten mit einer Coxarthrose (hellblaue Balken) kennzeichnet eine niedrigere BMP-2 Expression als die undifferenzierten Zellen dieser Patientengruppe. Dagegen führten die osteogene und adipogene Differenzierungen von Zellen aus frakturierten Oberschenkelköpfen (dunkelblaue Balken) zu einem deutlichen Anstieg der BMP-2 Expression.

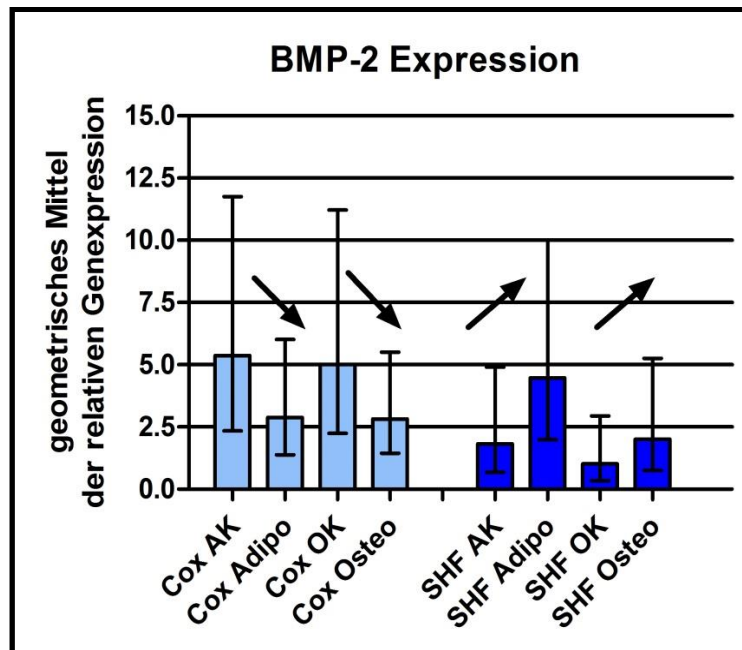


Abb. 18: Vergleichende Darstellung der BMP-2-Expression osteogen und adipogen differenzierter Stromazellen, sowie undifferenzierte Zellen von Coxarthrose- (hellblau) bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten (dunkelblau). Auffallend sind die unterschiedlichen Auswirkungen der adipogenen und osteogenen Differenzierungen auf die Genexpression in den jeweiligen Patientengruppen. Während es bei Zellen der Coxarthrose-Patienten zu einem Absinken der BMP-2-Konzentration im Rahmen des Differenzierungsvorgangs kam, stieg die Genexpression in Zellen der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen an.

**Cox AK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe; **Cox Adipo:** Adipogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox OK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox Osteo:** osteogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **SHF AK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF Adipo:** Adipogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF OK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF Osteo:** Osteogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe

BMP-2	Coxarthrose		Schenkelhalsbruch	
	geo. Mittelwert	Streufaktor	geo. Mittelwert	Streufaktor
adipogen differenzierte Zellen	2,88	2,09	4,47	2,24
adipogene Kontrolle	5,37	2,29	1,82	2,69
osteogen differenzierte Zellen	2,82	1,95	2	2,63
osteogene Kontrolle	5,01	2,24	1,02	2,88

*Tabelle 19: Geometrische Mittelwerte und Streufaktoren der BMP-2- Expression von osteogen und adipogen differenzierten sowie undifferenzierten Stromazellen, die aus der Spongiosa von Coxarthrose-, bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten gewonnen wurden.*

Ein deutlicher Unterschied in Bezug auf die Patientengruppen wurde im Falle von **OP** (Abb.19, Tabelle 20) ermittelt. Dessen Expression war nach osteogener Differenzierung der Zellen in der Gruppe der Schenkelhalsbrüche signifikant höher als in der Gruppe der Coxarthrosen. Außerdem fiel auf, dass die Genexpression der nicht differenzierten Kontrolle der Schenkelhalsfraktur-Gruppe höher war, als die Expression in den Zellen der osteogen differenzierten Zellen der Coxarthrose-Patienten. Damit weisen diese Ergebnisse große Übereinstimmungen mit den bereits dargestellten Ergebnissen undifferenzierter Zellen auf (siehe Abb. 10). Auch dort lag die Genexpression von OP in der Gruppe der Schenkelhalsbrüche deutlich über der, der Coxarthrosen.

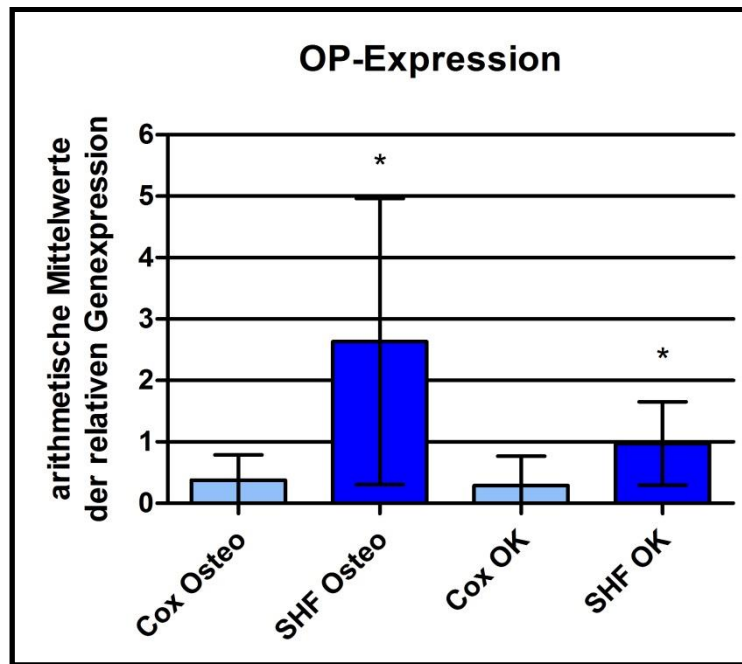


Abb. 19: Vergleichende Darstellung der OP-Expression osteogen differenzierter Stromazellen sowie undifferenzierte Zellen jeweils von Coxarthrose- (hellblau) bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten (dunkelblau). Die Expression von OP war bei den differenzierten Zellen in der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen signifikant erhöht. Außerdem lag die Expression der als Kontrolle dienenden undifferenzierten Zellen der Schenkelhalsfraktur-Patienten noch über derjenigen der differenzierten Zellen der Patienten mit Coxarthrose.

**Cox Osteo:** osteogen differenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **Cox OK:** undifferenzierte Zellen der Coxarthrose-Gruppe, **SHF Osteo:** Osteogen differenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, **SHF OK:** undifferenzierte Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe

OP	Coxarthrose		Schenkelhalsbruch	
	arith. Mittelwert	Standardabweichung	arith. Mittelwert	Standardabweichung
osteogen differenzierte Zellen	0,38	0,42	2,63	2,33
osteogene Kontrolle	0,29	0,48	0,97	0,99

Tabelle 20: Arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen der OP-Expression von osteogen differenzierten und undifferenzierten Stromazellen, die aus der Spongiosa von Coxarthrose-, bzw. Schenkelhalsfraktur-Patienten gewonnen wurden.

Tabelle 21 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse. Dargestellt sind die p-Werte der untersuchten Haupteffekte Patientengruppe, Differenzierungsart und Differenzierungszustand.

Gen	Haupteffekte (p-Wert)		
	Gruppe	Differenzierungsart	Differenzierungszustand
BMP-2	0,0889	0.1099	0.8293
RUNX-2	0.5777	<b>0.0054</b>	<b>0.0225</b>
PPAR $\gamma$	0.6848	<b>0.0049</b>	<b>&lt; 0,001</b>
RANKL	0.8553	0.2926	<b>&lt; 0,001</b>
OPG	0.5714	0.0619	<b>0.0013</b>
OP	<b>0.0285</b>	0.0908	0.1242
OC	0.6537	0.7423	0.3034

Tabelle 21: Ergebnisse der dreifaktoriellen Varianzanalyse. p-Werte, die unter der festgelegten Signifikanzgrenze von 0,05 lagen, sind fett dargestellt.

#### 4.3.3 Ergebnisse der Korrelationsanalysen

Die Expressionsmuster aller untersuchten Gene wurden auf mögliche Korrelationen hin untersucht. Diese Betrachtung bezog sich auf die mögliche „Gruppen-interne“ Korrelationen der Gen Expressionen (jeweils für die Gruppe der Coxarthrosen und die Gruppe der Schenkelhalsbrüche). Darüber hinaus berücksichtigten die Korrelationsanalysen die unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkte der undifferenzierten Zellen (0, 7, 14, 21 Tage) sowie die Differenzierungsart (adipogen *versus* osteogen) und den Differenzierungszustand (differenzierte Zellen *versus* undifferenzierte Zellen). Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 und 23 zusammengefasst. Es wurden alle Korrelationen berücksichtigt, die einen Koeffizienten von  $\geq 0,7$  bzw.  $\leq -0,7$  und einen p-Wert von  $\leq 0,05$  aufwiesen.

#### 4.3.3.1 Korrelationsanalysen der Genexpression undifferenzierter Stromazellen nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten – gruppeninterne Korrelationen

undifferenzierte Zellen	Kultivierungszeitpunkt in Tagen	Korrelierte Genexpression	Korrelationskoeffizient R	Signifikanz (p-Wert)
<b>Coxarthrose</b>	0	PPAR $\gamma$ / OPG	-0,881	0,021
	7	BMP-2 / RUNX-2	-0,891	0,017
	14	RANKL / OPG	-0,772	0,072
	21	OP / RUNX-2	0,928	0,008
<b>Schenkelhalsfraktur</b>	0	PPAR $\gamma$ / BMP-2	0,823	0,012
	7	PPAR $\gamma$ / BMP-2	0,829	0,011
	7	OC / RUNX-2	0,955	< 0,001
	14	OC / RUNX-2	0,744	0,034
	14	RUNX-2 / RANKL	0,920	0,001

Tabelle 22: Korrelationen der Genexpression undifferenzierter Stromazellen jeweils innerhalb der Gruppen der Coxarthrose- und Schenkelhalsfraktur-Patienten zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten

Es ließ sich zum einen eine sehr deutliche positive Korrelation zwischen **RUNX-2 und OP** in der Gruppe der *Coxarthrosen* zum 21. Kultivierungstag zeigen. Darüber hinaus waren in dieser Gruppe ausschließlich signifikante negative Korrelationen zu finden. So wiesen sowohl **RANKL**, als auch **PPAR $\gamma$**  eine negative Korrelation zu **OPG** zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung auf. Während dies bei **RANKL** am 14. Tag der Kultivierung der Fall war, zeigte sich die Korrelation zwischen **PPAR $\gamma$**  und **OPG** bereits direkt am Tag der Zellaussaat. Auch zwischen **BMP-2 und RUNX-2** wurde am 7. Tag der Kultivierung eine negative Korrelation festgestellt.

In der Gruppe der *Schenkelhalsbrüche* konnten im Gegensatz zu den *Coxarthrosen* auch Korrelationen über einen längeren Kultivierungszeitraum beobachtet werden. So war zwischen **RUNX-2 und OC** sowohl nach einer Kultivierung von 7 Tagen, als auch nach 14 Tagen eine positive Korrelation nachweisbar. Vergleichbares gilt für **PPAR $\gamma$  und BMP-2**. Hier zeigten sich positive Korrelationen zu Beginn und nach 7 Tagen Inkubation in Standardmedium. Die

entsprechende Regressionsgerade ist in Abb. 20 dargestellt. Auch konnte bei den für 14 Tage im Standardmedium kultivierten Zellen eine deutliche Korrelation zwischen **RUNX-2** und **RANKL** gezeigt werden.

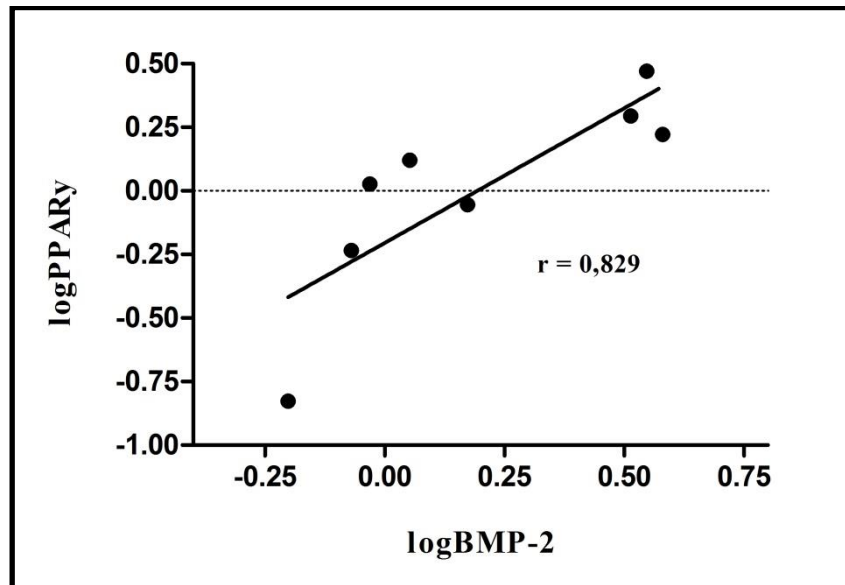


Abb. 20: Korrelation zwischen BMP-2 und PPAR $\gamma$  bei undifferenzierten Stromazellen von Patienten mit einer Schenkelhalsfraktur nach einer Kultivierung von 7 Tagen. Mit steigender BMP-2-Expression wird auch PPAR $\gamma$  höher exprimiert.  $n = 8$ ;  $r = 0,829$ ;  $p = 0,011$

#### 4.3.3.2 Korrelationsanalysen der Genexpression osteogen und adipogen differenzierter Stromazellen - gruppeninterne Korrelationen

osteogen differenzierte Zellen	Korrelierte Genexpression	Korrelationskoeffizient R	Signifikanz (p-Wert)
Coxarthrose	BMP-2 / OPG	-0,917	0,010
Schenkelhalsfraktur	RUNX-2 / BMP-2	0,846	0,008
	RUNX-2 / OC	0,867	0,005
	RUNX-2 / RANKL	0,719	0,045

Tabelle 23: Korrelationen der Genexpression osteogen differenzierter Stromazellen jeweils innerhalb der Gruppe der Coxarthrose- und Schenkelhalsfraktur-Patienten.

Bei den osteogen differenzierten Zellen aus der Gruppe der Coxarthrose ergab sich eine sehr deutliche negative Korrelation zwischen **BMP-2** und **OPG**. Demzufolge nimmt die Genexpression von OPG ab, wenn die BMP-2 Expression erhöht ist. Dies ist in Abb. 21 dargestellt.

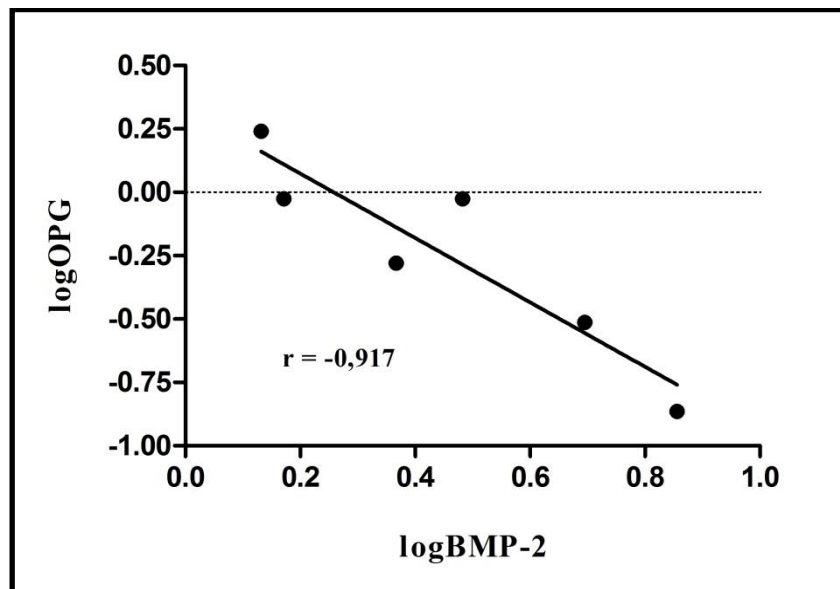


Abb. 21: Korrelation zwischen BMP-2 und OPG bei osteogen differenzierten Stromazellen isoliert aus Patienten mit einer Coxarthrose. Steigt die Expression von BMP-2, nimmt die Genexpression von OPG ab.  $n = 6$   $r = -0,917$ ;  $p = 0,010$

Des Weiteren wiesen die undifferenzierten Zellen, die über 21 Tage kultiviert wurden (osteogene Kontrolle, OK), aus der Gruppe der *Coxarthrosen* eine negative Korrelation zwischen **PPAR $\gamma$**  und **OPG** auf.

Bei Zellen aus der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen wies **RUNX-2** zahlreiche Korrelationen mit anderen Genen auf. Zum einen zeigte sich eine positive Abhängigkeit dieses Gens mit **BMP-2** im Rahmen der osteogenen Differenzierung. Gleiches konnte für **OC** festgestellt werden. Weiterhin war bei den osteogen differenzierten Zellen dieser Gruppe eine positive Korrelation zwischen RUNX-2 und **RANKL** zu verzeichnen, was in Abb. 22 zu sehen ist.

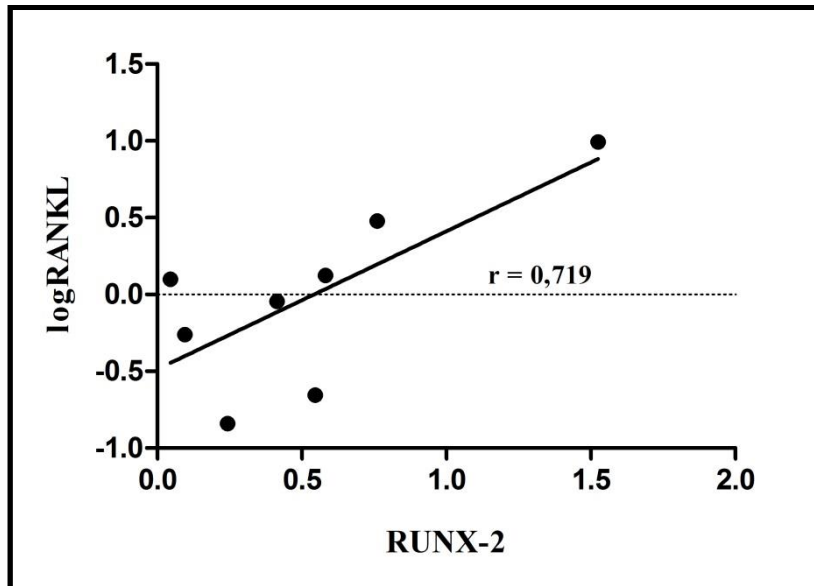


Abb. 22: Korrelation zwischen RUNX-2 und RANKL bei osteogen differenzierten Stromazellen aus der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen. Steigt im Rahmen der osteogenen Differenzierung die Expression von RUNX-2, so steigt bei diesen Zellen auch die Expression von RANKL.  $n = 8$ ;  $r = 0,719$ ;  $p = 0,045$

#### 4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

**Abschließend und zusammenfassend sind die folgenden Ergebnisse hervorzuheben:**

- **Undifferenzierte Stromazellen:** Hier zeigten sich Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Die Genexpressionsmuster von OP, RANKL und BMP-2 waren in der Gruppe der Coxarthrose-Patienten deutlich erhöht. In Bezug auf OC und PPAR $\gamma$  konnten keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich hier eine Abnahme der Genexpression im Verlauf der Kultivierungszeit. Des Weiteren konnte eine deutliche positive Korrelation zwischen BMP-2 und PPAR $\gamma$  bei den von Schenkelhalsfraktur-Patienten gewonnenen Zellen beobachtet werden.
- **Differenzierte Stromazellen:** Im Rahmen von adipogenen und osteogenen Differenzierungsprozessen ließen sich ebenfalls Genexpressions-Änderungen nachweisen. Diese waren einerseits von Patientengruppen unabhängig (Anstieg von PPAR $\gamma$  und RANKL bei der adipogenen Differenzierung, Abfall von OPG bei adipogener und osteogener Differenzierung). Andererseits konnten deutliche Unterschiede der Genexpression bei den unterschiedlichen Patientengruppen gezeigt werden. So kam es zu einem Anstieg der Genexpression von BMP-2 bei adipogener, bzw. osteogener Differenzierung in der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen, wohingegen die Expression bei den Zellen von Coxarthrose-Patienten absank. Auch OP wird bei osteogener Differenzierung in Zellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten höher exprimiert als in der Coxarthrose-Gruppe. Die Korrelationsanalyse brachte hier einen deutlichen Zusammenhang zwischen RANKL und RUNX-2 bei osteogen differenzierten Zellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten zum Vorschein.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Genexpressionsmuster Spongiosa-abgeleiteter mesenchymaler Stromazellen von Coxarthrose- und Schenkelhalsfraktur-Patienten miteinander zu vergleichen, um Rückschlüsse auf Genexpressionsmuster im Rahmen der senilen Osteoporose ableiten zu können. Durch Knochenfragilität bedingte Schenkelhalsfrakturen sind typische Folgeerscheinungen der Osteoporose. Daher wurden die Stromazellen dieser Patientengruppe als „osteoporotisch“ eingestuft. Die Zellen von Patienten, die sich aufgrund einer Coxarthrose einer Oberschenkelkopfresektion unterziehen mussten, dienten als „Kontrollzellpopulation“. Dieses Studiendesign wurde in Anlehnung an bereits publizierte Studien mit Blick auf die zellulären Ursachen der Osteoporose gewählt (Abdallah et al. 2005; D'Amelio et al. 2011; Zupan et al. 2012).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen des SFB/TRR79 durchgeführt, dessen Zielsetzung es ist, für den osteoporotisch erkrankten Knochen des Menschen Knochenersatzmaterialien und Implantate zu generieren, die ein optimales Einwachsverhalten aufweisen. Dafür bedarf es Erkenntnisse über die regenerative Kapazität und die in den Knochenstoffwechsel involvierten Moleküle der mesenchymalen Stromazellen, die als Osteoblastenpräkursoren fungieren.

### 5.1 RANKL

Der zur Tumor-Nekrose-Faktor-Familie gehörende „*Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand*“ (RANKL) spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Osteoklasten. Auf der Oberfläche von hämatopoetischen Osteoklasten-Präkursoren bindet er an seinen Rezeptor RANK, was zu einer Differenzierung zu reifen Osteoklasten führt (Simonet et al. 1997; Horowitz et al. 2001; Boyce und Xing 2008) (Abb.1, Abb. 23). Da somit eine hohe RANKL-Expression mit einer vermehrten Anzahl von Osteoklasten einhergeht, nimmt dieses Zytokin eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Osteoporose ein (Simonet et al. 1997; Horowitz et al. 2001; Boyce und Xing 2008).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch keine erhöhte RANKL-Expression in den undifferenzierten Zellen der Patientengruppe mit Schenkelhalsfrakturen gefunden. Vielmehr

war die Expression in den Zellen der Coxarthrose-Patienten (wenn auch knapp statistisch nicht signifikant) erhöht und stieg über den Kultivierungszeitraum an.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über die Expressionsmuster von RANKL im Knochengewebe im Rahmen der Osteoporose. Während Abdallah et al. (2005) keinen Expressionsunterschiede in Knochenbiopsien von Coxarthrose- und Osteoporose-Patienten feststellen konnten, kommt der Großteil der Autoren zu dem Ergebnis, dass eine erhöhte RANKL-Konzentration in Knochenmark-abgeleiteten Stromazellen (Eghbali-Fatourehchi et al. 2003), Knochenmark (D'Amelio et al. 2011) und biopsierten Knochengewebe (Zupan et al. 2012) von osteoporotischen Patienten auftritt. In dieser Untersuchung konnte dies nicht bestätigt werden. Der Grund dafür kann in den unterschiedlichen Ausgangsgeweben bzw. Zellpopulationen liegen. So beziehen sich die Ergebnisse von Eghbali-Fatourehchi et al. (2003) auf die Expressionsmuster von Knochenmark-abgeleiteten Stromazellen von Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose, deren Pathophysiologie sich von der senilen Osteoporose unterscheidet (Marcus 2014). In anderen Studien wurde dagegen biopsiertes Knochengewebe oder Knochenmark auf die Expression von RANKL untersucht (D'Amelio et al. 2011; Zupan et al. 2012) und nicht, wie in dieser Arbeit, Spongiosa-abgeleitete mesenchymalen Stromazellen.

Wie lässt sich auf der anderen Seite die hohe Expression von RANKL der Stammzellen der Coxarthrose-Gruppe erklären? Auch wenn für die vorliegenden Untersuchungen die Zellen der Coxarthrose-Patienten in Übereinstimmung mit anderen Studien (Abdallah et al. 2005; D'Amelio et al. 2011; Zupan et al. 2012) als Kontrolle definiert wurden, so ist dennoch davon auszugehen, dass sich die Genexpressionsmuster dieser Zellen von denen unterscheiden, die aus knochengesundem Gewebe isoliert werden. So konnten Fazzalari et al. zeigen, dass RANKL im subchondralen arthrotischen Knochen vermehrt vorkommt (Fazzalari et al. 2001). Eine andere Studie verweist darüber hinaus auf eine erhöhte RANKL-Expression in isolierten Osteoblasten des arthrotischen Knochens (Kwan Tat et al. 2008). Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass bereits Osteoblasten-Präkursoren des arthrotischen Knochens durch eine gesteigerte RANKL-Expression charakterisiert sein können.

Auch bei den differenzierten Zellen ließ sich eine Änderung der Genexpression feststellen. So stieg die RANKL-Expression im Rahmen der adipogenen Differenzierung höchst signifikant an, sowohl in den Zellen der Gruppe der Coxarthrose-Patienten, als auch in Zellen von Patienten mit Schenkelhalsfrakturen. Ein Gruppenunterschied konnte nicht gezeigt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Adipozyten die Knochenresorption durch eine gesteigerte Ex-

pression von RANKL fördert. Dieser Befund deckt sich mit aktuellen Publikationen (Mori et al. 2014; Takeshita et al. 2014). Demnach aktivieren die in den adipogenen Differenzierungsprozess implementierten Transkriptionsfaktoren C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  die Transkription von RANKL (Takeshita et al. 2014). Da es sich um Faktoren handelt, die früh im Rahmen der adipogenen Differenzierung exprimiert werden, ist es wahrscheinlich, dass nicht reife Adipozyten, sondern vielmehr Prä-Adipozyten für den RANKL-Anstieg verantwortlich sind (Takeshita et al. 2014). Die durch Adipozyten vermittelte erhöhte RANKL-Expression unterstützt die Annahme, dass die altersabhängige Zunahme von Fettgewebe im Knochenmark aktiv in den Knochenstoffwechsel eingreift. Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Lebensalter (etwa ab der 3. Lebensdekade) der Anteil von Fettgewebe im Knochenmark steigt (Kaneko et al. 2000; Fazzalari et al. 2001; Carvallo et al. 2008; Toth et al. 2009). Da sich die Vorläuferzellen offensichtlich vermehrt zu Adipozyten anstatt zu Osteoblasten differenzieren, wird dies als die maßgebliche Ursache des altersbedingten Knochenverlustes gesehen (Duque 2008). Außerdem sezernieren Adipozyten Faktoren wie Leptin, Adiponektin oder auch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6, die die Differenzierung der Präkursoren in Osteoblasten vermindern (Fazzalari et al. 2001).

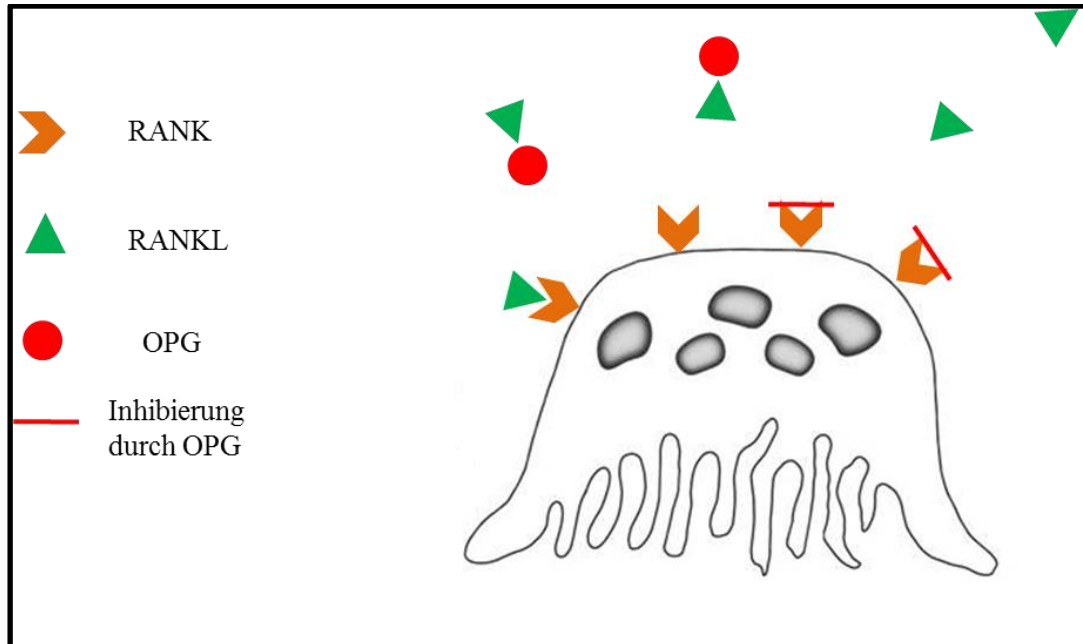


Abb. 23: Schematische Darstellung des RANKL-OPG-Mechanismus, modifiziert nach Kearns et al. 2007. Durch die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK kommt es zur Aktivierung von Osteoklasten. OPG fungiert als Decoy-Rezeptor und fängt RANKL ab, bevor es an RANK binden kann. Die Aktivierung wird inhibiert.

## 5.2 OPG

Auch OPG ist in den Knochenstoffwechsel eingebunden. Dieses lösliche Zytokin wird vornehmlich in Osteoblasten und mesenchymalen Stromazellen gebildet (Horowitz et al. 2001, Boyce und Xing 2008). Das zur Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor Überfamilie gehörende OPG ist im Sinne eines *decoy*-Rezeptors in der Lage RANKL abzufangen und somit die Osteoklasten-Genese zu regulieren (Horowitz et al. 2001, Vega et al. 2007, Silva und Branco 2011).

Betrachtet man die Werte der OPG-Expression der differenzierten Zellen (siehe Abb. 16) so ist ein hoch signifikanter Abfall im Rahmen der adipogenen und osteogenen Differenzierung im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen festzustellen. Dieser Effekt war unabhängig von der Patientengruppe zu beobachten.

OPG interagiert im Knochenstoffwechsel auf funktioneller Ebene sehr eng mit RANKL. Es handelt sich um seinen natürlichen Antagonisten und beide Zytokine werden gegensätzlich reguliert. Das heißt, dass im Falle einer hohen OPG-Expression die RANKL-Expression gering ist und umgekehrt (Boskey et al. 1993; Fantner et al. 2007; Boyce und Xing 2008). Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wider. So war bei den undifferenzierten Zellen der Coxarthrose-Gruppe nach einer 14-tägigen Kultivierung eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen OPG und RANKL zu beobachten.

Des Weiteren kam es im Rahmen der adipogenen und osteogenen Differenzierungen der Zellen zu einem Abfall der OPG-Expression. Dieser war, wenn auch nicht statistisch signifikant, bei der adipogenen Differenzierung stärker ausgeprägt als bei der osteogenen Differenzierung. Mit Blick auf die Ergebnisse der RANKL-Expression (siehe Kapitel 5.1) stellt man fest, dass hier im Rahmen der adipogenen Differenzierung ein höchst signifikanter Anstieg der Expression stattfand. Zusammenfassend geben diese Ergebnisse einen weiteren Hinweis darauf, dass mit zunehmendem Lebensalter die im Knochenmark dominierenden Adipozyten durch ihre Sekretionsmuster von RANKL und OPG den Knochenmetabolismus beeinflussen können. Das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau verschiebt sich zugunsten des Abbaus (durch hohe RANKL-Werte und niedrige OPG-Werte). So könnte die Osteoklastengenese aktiviert werden. Dieser Effekt mag in der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen eine noch größere Rolle spielen, da die Expressionslevel des OPG in der Fraktur-Gruppe – wenn auch statistisch nicht signifikant – niedriger als in der Coxarthrose-Gruppe waren.

### 5.3 PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  ist der entscheidende Transkriptionsfaktor bei der Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in Adipozyten. Dabei stimulieren sowohl C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$ , als auch BMP-2 die Gen-Expression. (Tontonoz et al. 1994; Wu et al. 1995; Chen et al. 1998; Huang et al. 2009; Farmer 2006; Muruganandan et al. 2009; Ali et al. 2013)

Bei undifferenzierten Zellen konnte ein signifikanter Abfall der Genexpression von PPAR $\gamma$  ab dem 14. Kultivierungstag beobachtet werden. Bei den adipogen und osteogen differenzierten Zellen kam es während der Kultivierungsperiode zu einem höchst signifikanten Anstieg der Expression. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen lag nicht vor.

Der fehlende Gruppenunterschied bei den undifferenzierten Zellen steht im Gegensatz zu Veröffentlichungen von Rodríguez et al. (1999) und Pino et al. (2012). Demnach kommt es im Rahmen einer Osteoporose zum Anstieg adipogener Marker wie PPAR $\gamma$  in Knochenmark-isolierten Stromazellen (Rodríguez et al. 1999; Pino et al. 2012). Diese greifen aktiv den Knochenstoffwechsel ein und hemmen die Osteoblastengnese durch direkte Interaktion mit RUNX-2 (Jeon 2003; Liu et al. 2010).

Dass die undifferenzierten Zellen des fragilen Knochens der Patientengruppe mit Schenkelhalsfrakturen keine erhöhten PPAR $\gamma$  Werte besitzen, könnte an der Herkunft der Zellen liegen. Während für die vorliegende Untersuchung die Vorläuferzellen aus der Spongiosa isoliert wurden, verwendeten Rodríguez et al. (Rodríguez et al. 1999) und Pino et al. (Pino et al. 2012) aus Knochenmark-isolierte Zellen. Möglicherweise übt das Knochenmarkfettgewebe auch direkte Effekte auf die Zellen aus, von denen die in der Spongiosa lokalisierten Zellen eher unbeeinflusst bleiben. So können z.B. Fettsäuren, die im Knochenmark-Fettgewebe gebildet werden und als Ligand von PPAR $\gamma$  fungieren einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von Stromazellen im Knochenmark nehmen (Ishida und Amano 2004; Moerman et al. 2004). Die Abnahme der Genexpression von PPAR $\gamma$  über den Kultivierungszeitraum lässt sich ähnlich wie bei den festgestellten Expressionsmustern von Osteocalcin über *in vitro* Effekte erklären. So halten unterschiedliche Wachstumsfaktoren in der natürlichen Umgebung der Vorläuferzellen (Rittling et al. 1998) die PPAR $\gamma$  Expression aufrecht. In Folge des Fehlens dieser Faktoren *in vitro* könnte es zu einer Abnahme der Expression unter Zellkulturbedingungen kommen.

Auch bei der adipogenen Differenzierung der Stromazellen ließ sich kein Gruppenunterschied hinsichtlich der PPAR $\gamma$  Expression feststellen. Hierdurch wird das Ergebnis der Untersuchung undifferenzierter Stromazellen bekräftigt. So liegt auch bei den adipogen differenzierten Zellen kein Anzeichen für eine adipogene Determinierung vor, was sich wiederum durch die

oben bereits erwähnten Unterschiede in Bezug auf den Entnahmeort des Ausgangsgewebes erklären lässt. Dennoch zeigte sich bei beiden Gruppen ein höchst signifikanter Anstieg der PPAR $\gamma$ -Expression im Rahmen der adipogenen Differenzierung, was die zentrale Rolle von PPAR $\gamma$  im Fettstoffwechsel erneut belegt (Chen et al. 1998; Muruganandan et al. 2009; Huang et al. 2009).

Ein signifikanter Anstieg der Expression konnte allerdings bei der osteogenen Differenzierung festgestellt werden. Die Expressionssteigerung war hier jedoch niedriger als im Fall der adipogenen Differenzierung, sodass ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Differenzierungsarten besteht. Diese Zunahme von PPAR $\gamma$  unter osteogenen Bedingungen liegt höchst wahrscheinlich an der gemeinsamen Schnittstelle der Signalkaskaden, die der adipogenen und osteogenen Differenzierung zugrunde liegt: Wie im Kapitel 2.2.3.3 aufgeführt, kann durch die Bindung von BMPs an die BMP-Rezeptor-Untereinheit IA auch die adipogene Differenzierung eingeleitet werden (Chen et al. 1998; Itoh et al. 2001; Muruganandan et al. 2009) (Abb. 24).

Dennoch war das Ergebnis überraschend, da PPAR $\gamma$  die Expression von RUNX-2 vermindert (Lecka-Czernik et al. 1999; Bruderer et al. 2014) und es trotz der hohen PPAR $\gamma$  Expression zu einer osteogenen Differenzierung der Zellen kam. Möglicherweise haben andere Signalwege, wie z.B. der Wnt-Signalweg die osteogene Differenzierung induziert. Hier könnte der ebenfalls bereits beschriebene Mechanismus der Hemmung adipogener Faktoren durch den intrazytoplasmatischen Anstieg von  $\beta$ -Catenin eine Rolle spielen (Bain et al. 2003).

Mit Blick auf das Ergebnis der osteogenen Differenzierung, lag die Expression von PPAR $\gamma$  in den Zellen der Fraktur-Gruppe (wenn auch statistisch nicht signifikant) über der der Coxarthrose-Gruppe. An dieser Stelle könnte dies erstmalig auf eine adipogene Determinierung hinweisen: Stromazellen von osteoporotischen Patienten exprimieren trotz des osteogenen Stimulus vermehrt den adipogenen Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$ . Dennoch gilt auch an dieser Stelle, dass sich die Vorläuferzellen trotz der erhöhten Expression von PPAR $\gamma$  aufgrund der hohen Runx-2 Expression (siehe Abb. 17) osteogen differenzierten. Welche intrazellulären Signalwege dafür verantwortlich sind, kann aus den vorliegenden Untersuchungen nicht geschlossen werden.

Schließlich konnten im Rahmen dieser Arbeit positive Korrelationen zwischen PPAR $\gamma$  und BMP-2 in undifferenzierten Zellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht im weiteren Sinne im Einklang mit der von Pino et al. (2012) aufgestellten These der adipogenen Determinierung von mesenchymalen Stromazellen im Rahmen der Osteoporose. Möglicherweise präferieren diese Zellen die Bindung von BMP-2 an die

Rezeptor-Untereinheit IA, was die adipogene Determinierung induziert. Ob diese Hypothese zutrifft und möglicherweise eine Hochregulierung des BMPR-IA vorliegt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Auch konnte eine sehr deutliche negative Korrelation zwischen PPAR $\gamma$  und OPG bei undifferenzierten Zellen der Coxarthrosen an Tag 0 der Kultivierung festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den in Kapitel 5.1 diskutierten Einflüssen der adipogenen Differenzierung von Stromazellen auf die Knochenresorption. Adipogen stimulierte Zellen beider Patienten-Gruppen exprimierten im hohen Maße RANKL. Da die Transkription von RANKL und OPG im allgemeinen gegensätzlich reguliert ist (Boyce und Xing 2008; Silva und Branco 2011), nimmt die OPG Expression konsekutiv ab. Auch wenn kein statistisch signifikanter Nachweis über einen gleichzeitigen RANKL-Anstieg vorliegt, legt die negative Korrelation zwischen PPAR $\gamma$  und OPG Expression doch die Vermutung nahe, dass es auch in den undifferenzierten Zellen durch einen erhöhten PPAR $\gamma$ -Spiegel zu einer Aktivierung von RANKL und letztlich zur Herunterregulation von OPG kommt.

#### **5.4 Runx-2**

Bei Runx-2 handelt es sich um den zentralen Transkriptionsfaktor bei der Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoblasten. So reguliert er die Expression Osteoblastenspezifischer Marker wie Osteocalcin und Osteopontin. Seine Expression kann beispielsweise durch BMP-2 oder 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 aktiviert werden, (Flores et al. 1992; Ducy et al. 1996; Polak-Jonkisz und Zwolinska 1998; Karsenty und Wagner 2002; Cohen 2006; Marie 2008; Long 2011).

Im Rahmen der Differenzierungen nahm die Expression von Runx-2 signifikant gegenüber den als Kontrolle dienenden undifferenzierten Zellen zu. Allerdings war dieser Anstieg unter adipogenen Bedingungen signifikant höher als unter osteogenen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Patienten-Gruppen waren nicht zu beobachten.

Der signifikante Anstieg der Runx-2 Expression im Rahmen der osteogenen Differenzierung ist auf die wichtige Funktion des Transkriptionsfaktors bei der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Osteoblasten zurück zu führen. Hier spielt der Transkriptionsfaktor vor allem in frühen Stadien der Osteoblasten-Entwicklung die entscheidende Rolle (Flores et al. 1992; Ducy et al. 1996; Polak-Jonkisz Und Zwolinska 1998).

Die erhöhte Expression von Runx-2 der adipogen differenzierten Zellen spricht für Effekte von Transkriptionsfaktoren, die sowohl den osteogenen als auch den adipogenen Signalweg beeinflussen. Hierzu zählen die *CCAAT/enhancer-binding proteins* (C/EBP) (Hata et al. 2005), denen zunächst nur die Rolle im Rahmen der adipogenen Differenzierung zugeschrieben wurde. So steigern sie die Expression von PPAR $\gamma$ , dem Master-Transkriptionsfaktor der adipogenen Differenzierung (Morrison und Farmer 2000; Farmer 2006; Tang und Lane 2012; Ali et al. 2013).

Die Effekte der C/EBPs bleiben jedoch nicht auf den adipogenen Differenzierungsweg beschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass sich in der Promotor-Region des Runx-2-Gens eine Bindungsstelle für C/EBPs befindet (Tou et al. 2003). Weiterführende Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass eine Isoform von C/EBP $\beta$  – das so genannte *liver-enriched inhibitory protein* (LIP) – an diesen Promotor binden kann und somit als Co-Aktivatoren von Runx-2 fungiert und die Osteoblastengenesen positiv beeinflusst (Hata et al. 2005). Außerdem beschrieben Gutierrez et al. (2002) eine gesteigerte Osteocalcin Expression durch Interaktion von C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  durch Interaktion mit Runx-2. Daher könnte die adipogene Differenzierung über den C/EBP-Signalweg die Runx-2 Expression aktiviert haben. Aus welchem Grund es im Endeffekt dennoch zu einer Bildung von Adipozyten trotz der gesteigerten Runx-2 Expression kommt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Möglicherweise sind bisher noch nicht beschriebene kompetitive Mechanismen auf molekularbiologischer Ebene dafür verantwortlich. Weiterhin ergaben die statistischen Analysen Korrelationen zwischen Runx-2 und Genen der osteogenen Differenzierung. Zum einen bestanden statistisch signifikant positive Korrelationen zu Osteocalcin. Diese konnten in der Schenkelhalsfraktur-Gruppe sowohl bei undifferenzierten Zellen nach 7 und 14 Tagen Kultivierungszeit, als auch bei osteogen differenzierten Zellen festgestellt werden. Ähnliches galt auch für Osteopontin. Hier war bei undifferenzierten Zellen von Coxarthrose-Patienten ebenfalls eine hohe Korrelation zu Runx-2 festzustellen. Osteocalcin und Osteopontin sind Gene, deren Expression durch Runx-2 gesteuert wird, denn in den Promotor-Regionen beider Gene finden sich Bindungsstellen für Runx-2 (Sodek et al. 1995; Polak-Jonkisz Und Zwolinska 1998; Hunter 2013). Diese Erkenntnis bezieht sich auf ausdifferenzierte Osteoblasten. In Übereinstimmung mit Benisch et al. (2012) zeigen die vorliegenden Ergebnisse jedoch, dass Runx-2 bereits in undifferenzierten Stromazellen exprimiert wird. Dies verweist auf funktionelle Aktivität dieses Transkriptionsfaktors in den multipotenten Präkursoren. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass mesenchymale Stromazellen trotz ihrer Multipotenz bereits eine gewisse Determinierung je nach Lokalisation ihres Entnahmeortes aufweisen. So differenzieren sich aus Knochenmark isolierte Vorläuferzellen bes-

ser in Osteoblasten als diejenigen, die aus Fettgewebe isoliert wurden (Rittling et al. 1998; Pampena et al. 2004). Da es sich bei den in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Stromazellen um Spongiosa-abgeleitete Zellen handelt, mag ihre Herkunft ihrer osteogenen Prägung und damit der positiven Korrelation von Runx-2 mit Osteopontin und Osteocalcin zu Grunde liegen.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis war die positive Korrelation zwischen Runx-2 und RANKL. Diese betraf die undifferenzierten und osteogen differenzierten Zellen der Schenkelhalsfraktur-Patienten. So ist auf Basis dieser Ergebnisse zu schlussfolgern, dass die osteogene Differenzierung von Vorläuferzellen mit einer gleichzeitigen Aktivierung der Knochenresorption verknüpft ist. Da diese Korrelation lediglich bei den Zellen aus frakturierten Knochen feststellbar war, könnte dies einen möglichen Pathomechanismus im Rahmen der Osteoporose widerspiegeln. Unterstützt wird diese Vermutung durch Publikationen, die sowohl eine Runx-2-Bindungsstelle in der Promotor-Region des RANKL-Gens (Kitazawa et al. 1999; Bruderer et al. 2014) aufzeigen, als auch die Hochregulierung von RANKL bei RUNX-2-überexprimierenden Mäusen beschrieben (Geoffroy et al. 2002).

Des Weiteren war bei undifferenzierten Zellen der Coxarthrose-Gruppe eine negative Korrelation zwischen Runx-2 und BMP-2 zu erkennen: So waren im Fall einer hohen Runx-2 Expression die Expressionswerte von BMP-2 erniedrigt.

BMP-2 ist zusammen mit BMP-6 und BMP-9 einer der potentesten Stimulatoren der Osteoblastengnese (Luu et al. 2007; Carreira et al. 2014). Bindet dieser zur TGF- $\beta$  Superfamilie gehörende Differenzierungsfaktor an seinen BMP-IB-Rezeptor, kommt es durch die Vermittlung von SMAD-4, -5 und -8 zu einer Steigerung der RUNX-2 Expression (Cohen 2006; Long 2011). Die negative Korrelation kann auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen Runx-2 und BMP-2 hinweisen: bei hohen Runx-2-Expressionen wird die Expression von BMP-2 herunter reguliert. Wie oben bereits erwähnt, weisen multipotente Stromazellen je nach Ursprungsgewebe, aus dem sie isoliert wurden eine gewisse Determinierung auf. Im Fall der Spongiosa-abgeleiteten Stromazellen mag daher bereits eine osteogene Determinierung und basale Runx-2 Expression vorliegen, was eine Herunterregulation der BMP-2 Expression zur Folge hat. Die festgestellte signifikante positive Korrelation zwischen Runx-2 und BMP-2 im Falle der osteogenen Differenzierung von Zellen aus der Schenkelhalsfraktur-Gruppe, spricht für die Effekte osteogener Stimuli auf die BMP-2 Expression dieser Zellen.

## 5.5 Osteopontin

Osteopontin gehört mit einem Anteil von bis zu 2% zu den am häufigsten vorkommenden nicht-kollagenen Matrixproteinen des Knochengewebes (Sroga und Vashishth 2012). Es findet sich vor allem an Zell-Matrix- (Laminae limitantes) und Matrix-Matrix-Übergängen (Zementlinien) (McKee und Nanci 1996; Gerstenfeld 1999; Sroga und Vashishth 2012). Die Aufgaben von Osteopontin sind zum einen die Steuerung des Mineralisationsprozesses der Knochenmatrix (Hunter 2013), zum anderen vermittelt es über seine RGD-Sequenz die Bindung von Zellen an der Knochenoberfläche (Gerstenfeld 1999; Uede 2011; Sroga und Vashishth 2012).

Sowohl in undifferenzierten als auch osteogen differenzierten Zellen, die aus Hüftköpfen von Patienten mit einer Schenkelhalsfraktur isoliert wurden, war eine signifikant erhöhte Osteopontin-Expression zu beobachten. Dabei lag die Expression bei den als Kontrolle dienenden undifferenzierten Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe sogar noch über den Expressionswerten der osteogen differenzierten Zellen von Patienten mit Coxarthrose.

Diese Ergebnisse scheinen auf den ersten Blick überraschend. Osteopontin wird aufgrund seiner Eigenschaften auch als „Kleber“ bezeichnet, der die mineralisierten Kollagenfibrillen des Knochens zusammenhält (Fantner et al. 2007; Sroga und Vashishth 2012). Daher wäre zunächst eine hohe Expression in den Zellen des coxarthrotischen, im weiteren Sinne des „gesunden“ Knochens zu erwarten gewesen.

Es gibt jedoch zwei mögliche Erklärungen für die hohe Genexpression von Osteopontin der undifferenzierten und osteogen differenzierten Zellen der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen.

Osteopontin vermittelt über sein RGD-Motiv die Bindung von Osteoklasten an der mineralisierten Oberfläche des Knochens (Gerstenfeld 1999; Sodek et al. 2000; Sroga und Vashishth 2012). So könnten hohe Osteopontin Konzentrationen, im Rahmen der postmenopausalen Osteoporose die osteoklastäre Knochenresorption begünstigen, indem sie die Adhäsionskapazitäten der Osteoklasten am Knochen steigern. Aufgrund des Durchschnittsalters der Schenkelhalsfraktur-Gruppe ( $80,7 \pm 7,2$  Jahre) liegt bei den Patienten zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit eine senile (= low-turnover) Osteoporose vor, dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich die Zusammensetzung der Knochenmatrix beim Übergang der postmenopausalen in die senile Osteoporose nur unwesentlich ändert.

Ein weiterer möglicher Auslöser für die Hochregulation von Osteopontin ist in der Fraktur des Oberschenkelhalses an sich zu sehen. Kommt es im Rahmen der Frakturheilung während der initialen inflammatorischen Phase zu einer Rekrutierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zum Ort des Frakturgeschehens (Kaneko et al. 2000; Fazzalari et al. 2001; Toth et al. 2009),

bedienen sich die Vorläuferzellen eines ähnlichen Mechanismus wie Leukozyten, die an den Ort einer Entzündung migrieren (Fox et al. 2007). Entscheidend für die Anlagerung der Stromazellen an den Ort des Defektes sind Integrine. Ein Merkmal von mesenchymalen Stromazellen ist das Vorkommen der Integrine  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_3$  (Pittenger 1999; Fox et al. 2007). Osteopontin ist in Lage über seine RGD-Sequenz unter anderem diese Integrine zu binden (Hu et al. 1995; Rittling und Denhardt 1999; Uede 2011). Es ist daher sehr wahrscheinlich anzunehmen, dass das Frakturgeschehen eine erhöhte Expression von Osteopontin in den mesenchymalen Stromazellen induziert, um eine bessere Adhäsion dieser Zellen zu gewährleisten, die sich in der Folge zu Osteoblasten differenzieren, um neues Knochengewebe zu bilden.

## 5.6 Osteocalcin

Osteocalcin nimmt als das am häufigsten vorkommende extrazelluläre Matrixprotein eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel ein. Es vermittelt die Adhäsion von Osteoblasten an Hydroxylapatit, kontrolliert dessen Kristallwachstum und wirkt stimulierend auf die Osteoklasten-Genese (Lian und Gundberg 1988; Chenu et al. 1994; Rammelt et al. 2005; Sroga und Vashishth 2012; Neve et al. 2013)

Bei den undifferenzierten Zellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Osteocalcin-Genexpression zwischen den beiden Patientengruppen festgestellt werden.

Wie diese Ergebnisse zeigen, sind bereits multipotente mesenchymale Stromazellen zu einer Expression von Osteocalcin befähigt. Bisherige Arbeiten postulieren dagegen, dass die Bildung des extrazellulären Matrixproteins „ausschließlich“ in Osteoblasten (Morrison und Farmer 2000; Sroga und Vashishth 2012), bzw. in geringerem Anteil auch in Osteozyten erfolgt (Rosen et al. 2002). Ob Osteocalcin in den Vorläuferzellen auch auf Protein-Ebene synthetisiert wird, muss durch ergänzende Methoden (Western-Blot) gezeigt werden.

Offensichtlich sind die undifferenzierten Vorläuferzellen des fragilen Knochens unbeeinflusst von Änderungen der Osteocalcin-Genexpression. Dies ist überraschend, denn Osteocalcin spielt durchaus eine wichtige Rolle in der Pathologie der Osteoporose. So konnte gezeigt werden, dass die Osteocalcin-Konzentration im jungen Knochen um das 20-fache höher ist als im Knochen von älteren Personen (Sroga et al. 2011).

Die Abnahme der Genexpression über den Kultivierungszeitraum von 21 Tagen könnte auf *in vitro*-Effekten beruhen. Mesenchymale Stromazellen sind in ihrer natürlichen Umgebung von

anderen Zellen, Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixproteinen umgeben. Das Zusammenwirken all dieser Faktoren bezeichnet man als die „Nische“, in der sich die Vorläuferzellen aufhalten. Diese Nische kontrolliert durch eine Vielzahl von Faktoren (darunter BMPs, MAP-Kinasen, *Platelet Derived Growth Factor* {PDGF}, Wnt 3a, u.a.) die Differenzierungsfähigkeit und Selbsterneuerungskapazität von mesenchymalen Stromazellen (Rittling et al. 1998). Da diese Einflüsse im Sinne positiver Stimuli auf die Osteocalcin-Expression bei der *in vitro* Kultivierung der Zellen fehlen, könnte diese artifizielle Mikroumgebung für das langsame Absinken der Expression verantwortlich sein.

## 5.7 BMP-2

BMP-2 ist ein Gen mit ausgeprägter Kapazität zur Osteoinduktivität. Es fördert über die SMAD-Moleküle die Transkription von RUNX-2 und induziert so die Differenzierung von Osteoblasten aus mesenchymalen Stromazellen (Lee et al. 2000; Luu et al. 2007; Marie 2008; Carreira et al. 2014). Die Wirkung von BMP-2 wird über zwei Rezeptor-Subtypen vermittelt: BMPR-IA und BMPR-IB, wobei nur letzterer die osteogene Differenzierung der Zellen induziert. Bindet BMP-2 an den Rezeptor Subtyp IA findet eine adipogene Differenzierung der Zelle statt (Chen et al. 1998; Itoh et al. 2001; Muruganandan et al. 2009) (Abb. 24)

In der Gruppe der Coxarthrose zeigte sich bei den undifferenzierten Zellen eine signifikant höhere BMP-2-Expression, die im Verlauf der Kultivierung sogar noch anstieg, als in der Gruppe der Schenkelhalsfrakturen. Hier kam es hingegen zu einem leichten Abfall der Expression während des Kultivierungszeitraums. Die niedrige Expression dieses Gens in Stromazellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten spricht mit Blick auf die osteoinduktive Potenz von BMP-2 für eine verminderte Fähigkeit der Stromazellen sich in Osteoblasten zu differenzieren. Wie andere Publikationen belegen, kommt es im Rahmen der Osteoporose zur Veränderung der Genexpressionsmuster von mesenchymalen Stromazellen (Zhou et al. 2008; Benisch et al. 2012; Pino et al. 2012). Pino et al. zeigten, dass auch die Expression von Osterix, einem RUNX-2 nachgeschaltetem Transkriptionsfaktor, in osteoporotischen Stromazellen erniedrigt ist (Pino et al. 2012). Da BMP-2 am Beginn dieser Signalkaskade steht (Marie 2008; Long 2011), könnten erniedrigte BMP-2 *Level* ursächlich für die verminderte Differenzierungskapazität von Stromazellen in Osteoblasten im Rahmen der Osteoporose sein.

Die vergleichende Betrachtung der BMP-2 Expression differenzierter Zellen der Coxarthrose-Gruppe und der Schenkelhalsfraktur-Gruppe offenbart gegensätzliche Expressionsmuster:

während die Expression bei Zellen der Coxarthrose-Patienten sowohl bei adipogener, als auch bei osteogener Differenzierung absanken, nahmen sie bei den Zellen aus frakturiertem Knochen im Rahmen beider Differenzierungen zu.

Die hohe BMP-2 Expression bei adipogen und osteogen differenzierten Zellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten mag darauf hinweisen, dass es sich bei diesem Faktor um einen zentralen Regulator beider Differenzierungsprozesse handelt. Wie zunächst jedoch die Namensgebung impliziert, standen zunächst die osteoinduktiven Eigenschaften dieser Proteingruppe zu Beginn ihrer Entdeckung im Vordergrund (Rosen und Thies 1992). Erst später konnte durch den Nachweis unterschiedlicher BMP-Rezeptor-Untereinheiten gezeigt werden, dass BMP-2 auch eine Rolle in der adipogenen Differenzierung spielt (Chen et al. 1998). So wird ein für die Adipogenese wichtiger Faktor – die Lysyl Oxidase – direkt durch BMP-2 gesteuert (Huang et al. 2009). Erstaunlicher Weise sind auch die nachgeschalteten Signalmoleküle bei der durch BMPs angeregten adipogenen und osteogenen Differenzierung identisch (Muruganandan et al. 2009), woraus sich die Frage ergibt, welche Mechanismen für eine endgültige Festlegung der Differenzierungsrichtung verantwortlich sind (siehe Abb. 24)

Eine Möglichkeit kann in der Konzentration von BMP-2 liegen. Demnach fördern hohe BMP-2 Spiegel die osteogene, niedrige BMP-2 Konzentrationen dagegen die adipogene Differenzierung (Wang et al. 1993; Muruganandan et al. 2009). Dies steht jedoch im Gegensatz zu den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse, da auf mRNA-Ebene die Expression des BMP-2 in den adipogen differenzierten Zellen der Fraktur-Gruppe höher war, als in den osteogen differenzierten Zellen.

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Differenzierungsrichtung ist in einem vom BMP-Signalweg unabhängigen Mechanismus zu sehen: dem Wnt-Signalweg. Bindet ein Wnt-Molekül an seinen Rezeptor kommt es zu einem intrazytoplasmatischen Anstieg von  $\beta$ -Catenin (Long 2011; Baron und Kneissel 2013).  $\beta$ -Catenin scheint einen entscheidenden Einfluss auf die endgültige Differenzierung der multipotenten Vorläuferzellen zu haben. Es ist in der Lage, die Expression des für die adipogene Differenzierung notwendigen „Adipozyten Faktor 2“ (aP2) zu senken, was wiederum die osteogene Differenzierung der Zellen favorisiert (Bain et al. 2003).

Auch mag die Hochregulierung der BMP-2 Expression in differenzierten Zellen der Schenkelhalsfraktur-Gruppe im Frakturgeschehen als solchem begründet sein. So kommt es während der initialen Phase nach einer Fraktur zur Inflammation, in deren Verlauf mesenchymale Stromazellen zum Ort des Zusammenhangverlustes rekrutiert und anschließend lokale Wachstumsfaktoren hochreguliert werden (Kaneko et al. 2000; Fazzalari et al. 2001; Toth et al.

2009). Auch wenn eine derartige Hochregulation bei den undifferenzierten Zellen mit Blick auf BMP-2 nicht nachweisbar war, könnte es sein, dass die Zellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten „sensibilisiert“ für Differenzierungsstimuli sind und daher mit einer vermehrten Expression von BMP-2 im Rahmen der Differenzierung reagieren.

Die niedrigen Expressionslevel bei den differenzierten Zellen von coxarthrotischen Patienten sind überraschend, da auch hier aufgrund der wichtigen Rolle von BMP-2 im Differenzierungsprozess der Stromazellen von hohen Expressionswerten auszugehen war (Marie 2008; Long 2011). Eine mögliche Ursache hierfür kann der zeitliche Verlauf der BMP-2 Expression während der osteogenen und adipogenen Differenzierungsprozesse sein. In einer aktuellen Studie beschreiben Twine et al. (2014), dass im Rahmen der osteogenen Differenzierung von Stromazellen ein zeitlich fein abgestimmtes Muster hinsichtlich der Expression von unterschiedlichen osteogenen Markermolekülen vorherrscht. Dabei zeigte sich, dass viele dieser Faktoren nur über einen sehr kurzen Zeitraum von ein bis drei Tagen einen *Peak* in der Expression aufwiesen. BMP-2 steht am Anfang des Differenzierungsprozesses (Marie 2008; Muruganandan et al. 2009; Long 2011). Daher ist es möglich, dass BMP-2 nach 14 Tagen (adipogene Differenzierung), bzw. 21 Tagen (osteogene Differenzierung) Kultivierungszeit seinen Peak schon überschritten hatte und im Signalweg nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren bereits aktiviert wurden. Diese Vermutung bestätigen auch Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit. So zeigte sich dass, Runx-2, welches in der Signalkaskade auf BMP-2 folgt (Marie 2008; Muruganandan et al. 2009; Long 2011) eine erhöhte Expression im Rahmen der osteogenen Differenzierung aufwies, während die Zellen zum gleichen Zeitpunkt niedrige BMP-2 Werte besaßen. (Vgl. Abb. 17 und 18)

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen weiterhin die statistisch signifikante negative Korrelation zwischen BMP-2 und OPG bei osteogen differenzierten Zellen der Coxarthrose-Gruppe. Diese Korrelation mag die komplexen Interaktionen der bei der Differenzierung ablaufenden Signalwege widerspiegeln. So könnte die osteogene Differenzierung durch die festgestellten hohen BMP-2 Expressionen initiiert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führte die osteogene Differenzierung zu einer Zunahme der PPAR $\gamma$ -Expression (vgl. Abb. 14), wahrscheinlich über die Stimulierung dieses Gens durch BMP-2 (Muruganandan et al. 2009; Ali et al. 2013). In Übereinstimmung mit aktueller Literatur (Mori et al. 2014; Takeshita et al. 2014) konnte die vorliegende Untersuchung zeigen, dass eine gesteigerte PPAR $\gamma$  Expression zu einer erhöhten RANKL Expression führen kann (vgl. Kapitel 5.1). RANKL und OPG wiederum sind genau gegensätzlich reguliert, das heißt bei hohen RANKL Expressionen sinkt die Expression von OPG (Boskey et al. 1993; Fantner et al. 2007; Boyce und Xing 2008). Aus

diesem komplexen Zusammenhang erklärt sich die negative Korrelation zwischen BMP-2 und OPG.

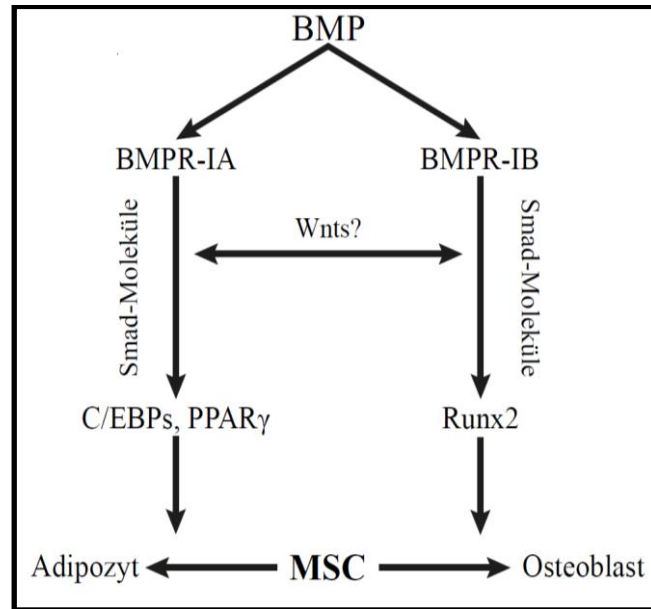


Abb. 24: Einfluss von BMPs auf die Differenzierung mesenchymaler Stromazellen, in Anlehnung an Muruganandan (2009)

## 5.8 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte Genexpressionsmuster humaner Spongiosa-abgeleiteter mesenchymaler Stromazellen von Schenkelhalsfraktur- und Coxarthrose-Patienten miteinander zu vergleichen, um aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf Genexpression osteoporotischer Stromazellen des Menschen ziehen zu können, und im weiteren Sinne daraus Erkenntnisse für die Generierung geeigneter Knochenersatzmaterialien für den systemisch erkrankten Knochen abzuleiten. An dieser Stelle werden noch einmal die wichtigsten Ergebnisse hervorgehoben.

- 1) Die Expression von Osteopontin war in den Zellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten erhöht. Durch die Fähigkeit dieses extrazellulären Matrixproteins, sowohl mesenchymale Stromazellen, als auch Osteoblasten an der Knochenoberfläche zu „binden“, ist davon auszugehen, dass eine Hochregulierung des Gens für den initialen Versuch spricht, die knöcherne Konsolidierung der Fraktur einzuleiten. Vor diesem Hintergrund könnte eine Beschichtung von Werkstoffen für den Knochenersatz mit Osteopontin die Rekrutierung von Osteoblasten und deren Präkursoren zu der Knochen-Implantat Grenze verbessern, was das Einwachsverhalten des Werkstoffes steigern könnte.
- 2) Adipogene Faktoren spielen eine entscheidende Rolle für den Knochenstoffwechsel. Zwar konnte im Gegensatz zu anderen Studien (Benisch et al. 2012; Pino et al. 2012) kein Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen bezüglich der Genexpression von PPAR $\gamma$  bei undifferenzierten Stromazellen nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich eine mögliche adipogene Determinierung der Zellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten bei der osteogenen Differenzierung, da hier die PPAR $\gamma$  Expression auffällig über der der Coxarthrose-Gruppe lag. Dies könnte sich auf die Knochenresorption auswirken, denn die adipogene Differenzierung der Zellen führt zu einem höchst signifikanten Anstieg der RANKL- sowie zur erniedrigten OPG-Expression.
- 3) Die osteogene Differenzierung von Stromazellen der Frakturpatienten mag zu einer Aktivierung der Knochenresorption führen. Dies belegt die positive Korrelation zwischen RUNX-2 und RANKL in Zellen dieser Spendergruppe. Dies weist auf einen möglichen Pathomechanismus bei der Entstehung der Osteoporose hin.

- 4) Die Funktion von BMP-2 beschränkt sich nicht auf die Regulierung der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stromazellen. Vielmehr spielt es eine ebenso wichtige Rolle im Rahmen der adipogenen Differenzierung. Dies zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen durch die positive Korrelation zwischen PPAR $\gamma$  und BMP-2 sowie durch den Anstieg des Faktors bei der adipogenen Differenzierung.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Erkenntnisse über die Genexpressionsmuster von humanen Stromazellen im Rahmen der Osteoporose zu gewinnen.

So wurde die Expression ausgewählter Gene humaner Spongiosa-abgeleiteter mesenchymaler Stromazellen von Patienten mit einer Fragilitätsfraktur des Oberschenkelhalses untersucht. Da die Fragilitätsfraktur das typische klinische Erscheinungsbild der Osteoporose repräsentiert, wurden die Stromazellen der Frakturpatienten als osteoporotisch eingestuft. Als Kontrollen dienten Stromazellen von Patienten mit einer Coxarthrose.

Von je acht Schenkelhalsfraktur- und sechs Coxarthrose-Patienten wurden Spongiosafragmente aus den zentralen Regionen der resezierten Oberschenkelköpfe entnommen. Die Spongiosaprobe wurden in die Zellkultur überführt und daraus die multipotenten Stromazellen isoliert. Diese wurden anschließend sowohl über Zeiträume von 0, 7, 14 und 21 Tage im Standardmedium kultiviert, als auch osteogen und adipogen differenziert. Anschließend wurde aus der extrahierten RNA die relative Gen-Expression von osteogenen (BMP-2, Runx-2, Osteopontin, Osteocalcin), adipogenen (PPAR $\gamma$ ) und knochenresorptiven Faktoren (RANKL, OPG) mittel RT-qPCR bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten für **Osteopontin** einen signifikanten Anstieg der Genexpression bei undifferenzierten und osteogen differenzierten Zellen der Schenkelhalsfraktur-Patienten. Dieser Anstieg gibt einen möglichen Hinweis auf ein Regenerationsbestreben im Rahmen der initialen Frakturheilung, da das Matrixprotein vor allem die Adhäsion von Osteoblasten und deren Vorläuferzellen an die Knochenoberfläche vermittelt.

Wenn auch kein Gruppenunterschied zwischen der **Osteocalcin**-Expression der Stromazellen von Coxarthrose- und Frakturpatienten bestand, so konnte dennoch der grundlegende Nachweis erbracht werden, dass bereits undifferenzierte Stromazellen dieses extrazelluläre Matrixprotein exprimieren.

Ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Gruppen konnte bei der **Runx-2** Expression festgestellt werden. Allerdings kam es im Laufe der adipogenen Differenzierung zu einem Anstieg, was auf eine Interaktion osteogener und adipogener Differenzierungskaskaden hindeuten könnte.

Darüber hinaus wurde die ambivalente Funktion von **BMP-2** im Rahmen der Differenzierung mesenchymaler Stromazellen deutlich. Zum einen konnte eine signifikant niedrigere Expression in undifferenzierten Zellen von Schenkelhalsfraktur-Patienten nachgewiesen werden, was auf eine verminderte osteogene Differenzierungskapazität dieser Zellen hindeuten könnte. Zum anderen konnte die enge Verknüpfung des Differenzierungsfaktors mit der adipogenen Differenzierung gezeigt werden. So stieg die Expression des Gens bei dieser Differenzierungsrichtung an. Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen BMP-2 und PPAR $\gamma$  ermittelt werden.

Die Untersuchung der PPAR $\gamma$  Expression nahm einen wichtigen Stellenwert mit Blick auf die Pathogenese der Osteoporose ein. Die adipogene Determinierung der Stromazellen konnte in der vorliegenden Arbeit nur bedingt nachvollzogen werden. So zeigten sich weder bei den undifferenzierten, noch bei den adipogen differenzierten Zellen Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen. Zellen aus der Frakturgruppe wiesen jedoch eine erhöhte Genexpression von PPAR $\gamma$  im Rahmen der osteogenen Differenzierung auf.

Mit Blick auf die zugrundeliegenden Mechanismen der Osteoporose war die wohl wichtigste Erkenntnis, dass es im Rahmen der adipogenen Differenzierung zu einem höchst signifikanten Anstieg der **RANKL** Expression kam. Dies deutet darauf hin, dass eine im Alter auftretende Verfettung des Knochenmarks aktiv die Knochenresorption begünstigt. Außerdem konnte in der Fraktur-Gruppe eine positive Korrelation zwischen Runx-2 und RANKL bei osteogen differenzierten Zellen festgestellt werden, was zu der Annahme führt, dass die osteogene Differenzierung von Stromazellen osteoporotischer Spender mit einem Abbau des Knochengewebes einhergehen könnte.

Die Rolle von **OPG** als gegensätzlich regulierter Antagonist von RANKL wurde durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

## 7 Summary

The aim of the present study was to investigate gene expression pattern of human spongiosa-derived osteoporotic mesenchymal stromal cells.

The fragility fracture of the femoral neck is the typical clinical sign of osteoporosis, so cells isolated from these patients were considered as osteoporotic cells. In contrast, cells from patients with hip osteoarthritis were defined as control group.

Cancellous bone fragments were isolated from the center of the femoral head of eight osteoporotic and six osteoarthritic patients. Of these samples multipotent stromal cells were isolated under cell culture conditions. Then the cells were cultured both in standard medium for a period of 0, 7, 14 and 21 days and in osteogenic and adipogenic differentiation medium. Subsequently RNA was isolated and the expression of osteogenic (BMP-2, Runx-2, Osteopontin, Osteocalcin), adipogenic (PPAR $\gamma$ ) and bone resorption factors (RANKL, OPG) was measured via RT-qPCR.

The expression of **osteopontin** was significantly higher in osteoporotic cells cultured in standard and osteogenic medium than in cells of the control group. This increase might be a part of the initial fracture healing process, because this matrix protein mediates the adhesion of osteoblasts and their precursors at the bone surface.

Although no difference between the osteoporotic and the osteoarthritic group was detected, this study showed, that undifferentiated multipotent stromal cells isolated from cancellous bone are competent to produce **osteocalcin**.

There were also no significant differences in the expression of **Runx-2** between the two investigated groups at any time point. However, the expression increased under adipogenic culture conditions. This might indicate an interaction between the osteogenic and adipogenic differentiation cascade.

Furthermore the ambivalent function of **BMP-2** during the differentiation process of mesenchymal stromal cells became explicit. In undifferentiated cells of the fracture group the expression of BMP-2 was significantly decreased, which indicates a diminished osteogenic differentiation capacity of these cells. Because of an increased expression of this gene during the adipogenic differentiation, this study could also show the link between BMP-2 and the differentiation of stromal cells into adipocytes. Moreover, a positive correlation between BMP-2 and PPAR $\gamma$  could be determined.

The investigation of the **PPAR $\gamma$**  expression was an important part of this study, because many authors claim that an adipogenic determination of stromal cells might be a part of the pathogenesis of osteoporosis. This adipogenic determination could only in part be comprehended in this study. There was neither difference between the osteoporotic and the osteoarthritic group in the expression of **PPAR $\gamma$**  in undifferentiated cells, nor in cells that were cultured in adipogenic medium. However cells from fracture patients showed an increased expression when they were cultured under osteogenic conditions.

In view of the underlying mechanisms of the emergence of osteoporosis, the most important finding of this study was that adipogenic differentiation of stromal cells led to a high significant increase of **RANKL** expression. This indicates that the increasing adiposity of bone marrow in elderly persons might actively promote bone resorption. Moreover a positive correlation between **RANKL** and **Runx-2** in cells from fracture patients cultured in osteogenic medium was detected. This leads to the assumption, that osteogenic differentiated cells of osteoporosis patients might degrade bone tissue.

The role of **OPG** as a contrary regulated antagonist of **RANKL** could be proofed in this study.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abdallah, Basem M.; Stilgren, Lis S.; Nissen, Nis; Kassem, Moustapha; Jørgensen, Hans R I; Abrahamsen, Bo (2005):** Increased RANKL/OPG mRNA ratio in iliac bone biopsies from women with hip fractures. In: *Calcif. Tissue Int.* 76 (2), S. 90–97.
- Albright, Fuller (1941):** Postmenopausal Osteoporosisits Clinical Features. In: *Jama* 116 (22), S. 2465.
- Ali, Aus Tariq; Hochfeld, Warren E.; Myburgh, Renier; Pepper, Michael S. (2013):** Adipocyte and adipogenesis. In: *European Journal of Cell Biology* 92 (6-7), S. 229–236.
- Almeida, Maria; Martin-Millan, Marta; Ambrogini, Elena; Bradsher, Robert; Han, Li; Chen, Xiao-Dong et al. (2010):** Estrogens attenuate oxidative stress and the differentiation and apoptosis of osteoblasts by DNA-binding-independent actions of the ERalpha. In: *J. Bone Miner. Res.* 25 (4), S. 769–781.
- Anker, Pieterella S.; Scherjon, Sicco A.; Kleijburg-van der Keur, Carin; Noort, Willy A.; Claas, Frans H. J.; Willemze, Roelof et al. (2003):** Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. In: *Blood* 102 (4), S. 1548–1549.
- Arnhold, S.; Glüer, S.; Hartmann, K.; Raabe, O.; Addicks, K.; Wenisch, S.; Hoopmann, M. (2011):** Amniotic-Fluid Stem Cells: Growth Dynamics and Differentiation Potential after a CD-117-Based Selection Procedure. In: *Stem Cells International* 2011 (4), S. 1–12.
- Atalay, Sacide; Elci, Abdullah; Kayadibi, Huseyin; Onder, Can B.; Aka, Nurettin (2012):** Diagnostic Utility of Osteocalcin, Undercarboxylated Osteocalcin, and Alkaline Phosphatase for Osteoporosis in Premenopausal and Postmenopausal Women. In: *Ann Lab Med* 32 (1), S. 23.
- Bain, Gerard; Müller, Thomas; Wang, Xin; Papkoff, Jackie (2003):** Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. In: *Biochemical and biophysical research communications* 301 (1), S. 84–91.
- Baksh, D.; Song, L.; Tuan, R. S. (2004):** Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. In: *J. Cell. Mol. Med.* 8 (3), S. 301–316.

- Baron, Roland; Kneissel, Michaela (2013):** WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. In: *Nat Med* 19 (2), S. 179–192.
- Bartholomew, Amelia; Sturgeon, Cord; Siatskas, Mandy; Ferrer, Karen; McIntosh, Kevin; Patil, Sheila et al. (2002):** Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. In: *Exp. Hematol.* 30 (1), S. 42–48.
- Becker, Carolyn (2008):** Pathophysiology and clinical manifestations of osteoporosis. In: *Clin Cornerstone* 9 (2), S. 42–7.
- Benisch, Peggy; Schilling, Tatjana; Klein-Hitpass, Ludger; Frey, Sönke P.; Seefried, Lothar; Raaijmakers, Nadja et al. (2012):** The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors. In: *PLoS ONE* 7 (9), S. e45142.
- Bennett, Christina N.; Ross, Sarah E.; Longo, Kenneth A.; Bajnok, Laszlo; Hemati, Nahid; Johnson, Kirk W. et al. (2002):** Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. In: *J. Biol. Chem.* 277 (34), S. 30998–31004.
- Bianco, Paolo; Cao, Xu; Frenette, Paul S.; Mao, Jeremy J.; Robey, Pamela G.; Simmons, Paul J.; Wang, Cun-Yu (2013):** The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. In: *Nat Med* 19 (1), S. 35–42.
- Bord, S. (2001):** Estrogen Receptors and Are Differentially Expressed in Developing Human Bone. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (5), S. 2309–2314.
- Boskey, A. L.; Maresca, M.; Ullrich, W.; Doty, S. B.; Butler, W. T.; Prince, C. W. (1993):** Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. In: *Bone Miner* 22 (2), S. 147–159.
- Boskey, A. L.; Spevak, L.; Paschalis, E.; Doty, S. B.; McKee, M. D. (2002):** Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. In: *Calcif. Tissue Int.* 71 (2), S. 145–154.
- Bourhis, Eric; Wang, Weiru; Tam, Christine; Hwang, Jiyoung; Zhang, Yingnan; Spittler, Didier et al. (2011):** Wnt antagonists bind through a short peptide to the first  $\beta$ -propeller domain of LRP5/6. In: *Structure* 19 (10), S. 1433–1442.
- Boyce, Brendan F.; Xing, Lianping (2007):** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. In: *Arthritis Res. Ther.* 9 Suppl 1, S. S1.
- Boyce, Brendan F.; Xing, Lianping (2008):** Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 473 (2), S. 139–146.
- Boyle, William J.; Simonet, W. Scott; Lacey, David L. (2003):** Osteoclast differentiation and activation. In: *Nature* 423 (6937), S. 337–342.

- Bruderer, M.; Richards, R. G.; Alini, M.; Stoddart, M. J. (2014):** Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. In: *European cells & materials* 28, S. 269–286.
- Caplan, A. I. (1991):** Mesenchymal stem cells. In: *J. Orthop. Res.* 9 (5), S. 641–650.
- Carreira, A. C.; Lojudice, F. H.; Halcsik, E.; Navarro, R. D.; Sogayar, M. C.; Granjeiro, J. M. (2014):** Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives. In: *Journal of Dental Research* 93 (4), S. 335–345.
- Carvalho, Loreto; Henríquez, Berta; Paredes, Roberto; Olate, Juan; Onate, Sergio; van Wijnen, Andre J. et al. (2008):**  $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>-enhanced expression of the osteocalcin gene involves increased promoter occupancy of basal transcription regulators and gradual recruitment of the  $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> receptor-SRC-1 coactivator complex. In: *J. Cell. Physiol.* 214 (3), S. 740–749
- Chamberlain, Giselle; Fox, James; Ashton, Brian; Middleton, Jim (2007):** Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. In: *Stem Cells* 25 (11), S. 2739–2749.
- Chen, D.; Ji, X.; Harris, M. A.; Feng, J. Q.; Karsenty, G.; Celeste, A. J. et al. (1998):** Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. In: *J. Cell Biol.* 142 (1), S. 295–305.
- Chenu, C.; Colucci, S.; Grano, M.; Zigrino, P.; Barattolo, R.; Zambonin, G. et al. (1994):** Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. In: *J. Cell Biol.* 127 (4), S. 1149–1158.
- Cohen, M. Michael (2006):** The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. In: *Am. J. Med. Genet. A* 140 (23), S. 2646–2706.
- Compston, J. E. (2001):** Sex steroids and bone. In: *Physiol. Rev.* 81 (1), S. 419–447.
- D'Amelio, P.; Roato, I.; D'Amico, L.; Veneziano, L.; Suman, E.; Sassi, F. et al. (2011):** Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. In: *Osteoporos Int* 22 (11), S. 2869–2877.
- Di Nicola, Massimo; Carlo-Stella, Carmelo; Magni, Michele; Milanese, Marco; Longoni, Paolo D.; Matteucci, Paola et al. (2002):** Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. In: *Blood* 99 (10), S. 3838–3843.
- Dodds, Robert A.; Connor, Janice R.; James, Ian E.; Lee Rykaczewski, Elizabeth; Appelbaum, Edward; Dul, Edward; Gowen, Maxine (1995):** Human osteoclasts, not osteo-

blasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: An in vitro and ex vivo study of remodeling bone. In: *J Bone Miner Res* 10 (11), S. 1666–1680.

**Ducy, Patricia; Desbois, Christelle; Boyce, Brendan; Pinero, Gerald; Story, Beryl; Dunstan, Colin et al. (1996):** Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. In: *Nature* 382 (6590), S. 448–452.

**Duque, Gustavo (2008):** Bone and fat connection in aging bone. In: *Current Opinion in Rheumatology* 20 (4), S. 429–434.

**Ellies, Debra L.; Viviano, Beth; McCarthy, John; Rey, Jean-Philippe; Itasaki, Nobue; Saunders, Scott; Krumlauf, Robb (2006):** Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. In: *J. Bone Miner. Res.* 21 (11), S. 1738–1749.

**Fantner, Georg E.; Adams, Jonathan; Turner, Patricia; Thurner, Philipp J.; Fisher, Larry W.; Hansma, Paul K. (2007):** Nanoscale ion mediated networks in bone: osteopontin can repeatedly dissipate large amounts of energy. In: *Nano letters* 7 (8), S. 2491–2498.

**Farmer, Stephen R. (2006):** Transcriptional control of adipocyte formation. In: *Cell Metab.* 4 (4), S. 263–273.

**Fazzalari, N. L.; Kuliwaba, J. S.; Atkins, G. J.; Forwood, M. R.; Findlay, D. M. (2001):** The ratio of messenger RNA levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand to osteoprotegerin correlates with bone remodeling indices in normal human cancellous bone but not in osteoarthritis. In: *J. Bone Miner. Res.* 16 (6), S. 1015–1027.

**Fernández, M.; Simon, V.; Herrera, G.; Cao, C.; Del Favero, H.; Minguell, J. J. (1997):** Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. In: *Bone Marrow Transplant.* 20 (4), S. 265–271.

**Flores, M. E.; Norgård, M.; Heinegård, D.; Reinholt, F. P.; Andersson, G. (1992):** RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. In: *Exp. Cell Res.* 201 (2), S. 526–530.

**Foo, Clara; Frey, Soenke; Yang, Hong Hyun; Zellweger, Rene; Filgueira, Luis (2007):** Downregulation of beta-catenin and transdifferentiation of human osteoblasts to adipocytes under estrogen deficiency. In: *Gynecol. Endocrinol.* 23 (9), S. 535–540.

**Fox, James M.; Chamberlain, Giselle; Ashton, Brian A.; Middleton, Jim (2007):** Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. In: *Br. J. Haematol.* 137 (6), S. 491–502.

**Friedenstein, A. J.; Deriglasova, U. F.; Kulagina, N. N.; Panasuk, A. F.; Rudakowa, S. F.; Luriá, E. A.; Ruadkow, I. A. (1974):** Precursors for fibroblasts in different populations

of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. In: *Exp. Hematol.* 2 (2), S. 83–92.

**Friedenstein, A. J.; Petrakova, K. V.; Kurolesova, A. I.; Frolova, G. P. (1968):** Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. In: *Transplantation* 6 (2), S. 230–247.

**Gao, Yanhong; Huang, Enyi; Zhang, Hongmei; Wang, Jinhua; Wu, Ningning; Chen, Xian et al. (2013):** Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -Catenin and Estrogen Receptor Signaling Synergistically Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells. In: *PLoS ONE* 8 (12), S. e82436.

**Gauthier, A.; Kanis, J. A.; Jiang, Y.; Dreinhöfer, K.; Martin, M.; Compston, J. et al. (2012):** Burden of postmenopausal osteoporosis in Germany: estimations from a disease model. In: *Arch Osteoporos* 7 (1-2), S. 209–218.

**Geoffroy, Valérie; Kneissel, Michaela; Fournier, Brigitte; Boyde, Alan; Matthias, Patrick (2002):** High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. In: *Molecular and Cellular Biology* 22 (17), S. 6222–6233.

**Gerstenfeld, Louis C. (1999):** Osteopontin in Skeletal Tissue Homeostasis: An Emerging Picture of the Autocrine/Paracrine Functions of the Extracellular Matrix. In: *J Bone Miner Res* 14 (6), S. 850–855.

**Giner, Mercè; Montoya, M<sup>a</sup> José; Vázquez, M<sup>a</sup> Angeles; Miranda, Cristina; Pérez-Cano, Ramón (2013):** Differences in osteogenic and apoptotic genes between osteoporotic and osteoarthritic patients. In: *BMC Musculoskelet Disord* 14 (1), S. 41.

**Hadji, Peyman; Klein, Silvia; Gothe, Holger; Häussler, Bertram; Kless, Thomas; Schmidt, Torsten et al. (2013):** The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. In: *Dtsch Arztebl Int* 110 (4), S. 52–57.

**Hall, J. M.; McDonnell, D. P. (1999):** The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. In: *Endocrinology* 140 (12), S. 5566–5578.

**Hata, Kenji; Nishimura, Riko; Ueda, Mio; Ikeda, Fumiyo; Matsubara, Takuma; Ichida, Fumitaka et al. (2005):** A CCAAT/enhancer binding protein beta isoform, liver-enriched inhibitory protein, regulates commitment of osteoblasts and adipocytes. In: *Molecular and Cellular Biology* 25 (5), S. 1971–1979

- Hofbauer, L. C.; Khosla, S.; Dunstan, C. R.; Lacey, D. L.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L. (1999):** Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. In: *Endocrinology* 140 (9), S. 4367–4370.
- Horowitz, M. C.; Xi, Y.; Wilson, K.; Kacena, M. A. (2001):** Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 12 (1), S. 9–18.
- Hoyland, J. A.; Mee, A. P.; Baird, P.; Braidman, I. P.; Mawer, E. B.; Freemont, A. J. (1997):** Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using in situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction. In: *Bone* 20 (2), S. 87–92.
- Hu, D. D.; Lin, E. C.; Kovach, N. L.; Hoyer, J. R.; Smith, J. W. (1995):** A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (44), S. 26232–26238.
- Huang, H.; Song, T.-J.; Li, X.; Hu, L.; He, Q.; Liu, M. et al. (2009):** BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (31), S. 12670–12675.
- Hunter, Graeme K. (2013):** Role of Osteopontin in Modulation of Hydroxyapatite Formation. In: *Calcif. Tissue Int.*
- Imai, Yuuki; Youn, Ming-Young; Kondoh, Shino; Nakamura, Takashi; Kouzmenko, Alexander; Matsumoto, Takahiro et al. (2009):** Estrogens Maintain Bone Mass by Regulating Expression of Genes Controlling Function and Life Span in Mature Osteoclasts. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173, S. E31.
- Ishida, Masami; Amano, Shigeru (2004):** Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 22 (5), S. 415–429.
- Itoh, K.; Udagawa, N.; Katagiri, T.; Iemura, S.; Ueno, N.; Yasuda, H. et al. (2001):** Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. In: *Endocrinology* 142 (8), S. 3656–3662.
- Jeon, M. J. (2003):** Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- Inhibits the Runx2-mediated Transcription of Osteocalcin in Osteoblasts. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (26), S. 23270–23277.
- Justesen, J.; Stenderup, K.; Eriksen, E. F.; Kassem, M. (2002):** Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. In: *Calcif. Tissue Int.* 71 (1), S. 36–44.

- Kaerns, A.; Khosla S.; Kostenuik, P. (2008):** Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. In: *Endocr Rev* 29 (2)
- Kaneko, H.; Arakawa, T.; Mano, H.; Kaneda, T.; Ogasawara, A.; Nakagawa, M. et al. (2000):** Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. In: *Bone* 27 (4), S. 479–486.
- Kanis, J. A.; McCloskey, E. V.; Johansson, H.; Cooper, C.; Rizzoli, R.; Reginster, J.-Y (2013):** European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. In: *Osteoporos Int* 24 (1), S. 23–57.
- Karsenty, Gerard; Wagner, Erwin F. (2002):** Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. In: *Dev. Cell* 2 (4), S. 389–406.
- Kassem, M.; Ankersen, L.; Eriksen, E. F.; Clark, B. F.; Rattan, S. I. (1997):** Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. In: *Osteoporos Int* 7 (6), S. 514–524.
- Khosla, Sundeep; Melton, L. Joseph; Riggs, B. Lawrence (2011):** The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: Is a revision needed? In: *J Bone Miner Res* 26 (3), S. 441–451.
- Khosla, Sundeep; Oursler, Merry Jo; Monroe, David G. (2012):** Estrogen and the skeleton. In: *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23 (11), S. 576–581.
- Kitazawa, R.; Kimble, R. B.; Vannice, J. L.; Kung, V. T.; Pacifici, R. (1994):** Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. In: *J. Clin. Invest.* 94 (6), S. 2397–2406.
- Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Maeda, S. (1999):** Promoter structure of mouse RANKL/TRANSC/OPGL/ODF gene. In: *Biochimica et biophysica acta* 1445 (1), S. 134–141.
- Kousteni, S.; Bellido, T.; Plotkin, L. I.; O'Brien, C. A.; Bodenner, D. L.; Han, L. et al. (2001):** Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. In: *Cell* 104 (5), S. 719–730.
- Krum, Susan A.; Brown, Myles (2008):** Unraveling estrogen action in osteoporosis. In: *Cell Cycle* 7 (10), S. 1348–1352.
- Kwan Tat, Steeve; Padrines, Marc; Théoleyre, Sandrine; Heymann, Dominique; Fortun, Yannick (2004):** IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (1), S. 49–60.

- Kwan Tat, S.; Pelletier, J-P; Lajeunesse, D.; Fahmi, H.; Lavigne, M.; Martel-Pelletier, J. (2008):** The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells. In: *Clinical and experimental rheumatology* 26 (2), S. 295–304.
- Lai, Yanlai; Sun, Yun; Skinner, Charles M.; Son, Eugene L.; Lu, Zhongding; Tuan, Rocky S. et al. (2010):** Reconstitution of Marrow-Derived Extracellular Matrix Ex Vivo: A Robust Culture System for Expanding Large-Scale Highly Functional Human Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem Cells and Development* 19 (7), S. 1095–1107.
- Lamplot, Joseph D.; Qin, Jiaqiang; Nan, Guoxin; Wang, Jinhua; Liu, Xing; Yin, Liangjun et al. (2013):** BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. In: *Am J Stem Cells* 2 (1), S. 1–21.
- Laudes, Matthias (2011):** Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. In: *Journal of molecular endocrinology* 46 (2), S. R65-72.
- Le Blanc, Katarina; Rasmusson, Ida; Sundberg, Berit; Götherström, Cecilia; Hassan, Moustapha; Uzunel, Mehmet; Ringdén, Olle (2004):** Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. In: *Lancet* 363 (9419), S. 1439–1441.
- Lecka-Czernik, B.; Gubrij, I.; Moerman, E. J.; Kajkenova, O.; Lipschitz, D. A.; Manolagas, S. C.; Jilka, R. L. (1999):** Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2. In: *J. Cell. Biochem.* 74 (3), S. 357–371.
- Lee, K.-S; Kim, H.-J; Li, Q.-L; Chi, X.-Z; Ueta, C.; Komori, T. et al. (2000):** Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor beta 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (23), S. 8783–8792.
- Lerner, U.H (2006):** Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. In: *Journal of Dental Research* 85 (7), S. 584–595.
- Lewiecki, E. Michael (2011):** New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. In: *Nat Rev Rheumatol* 7 (11), S. 631–638.
- Lian, J. B.; Gundberg, C. M. (1988):** Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. In: *Clin. Orthop. Relat. Res.* (226), S. 267–291.

- Liu, Li-Fen; Shen, Wen-Jun; Zhang, Zhong Hua; Wang, Li Juan; Kraemer, Fredric B. (2010):** Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: Roles of PPAR $\gamma$  and adiponectin. In: *J. Cell. Physiol.* 225 (3), S. 837–845.
- Long, Fanxin (2011):** Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (1), S. 27–38.
- Luu, Hue H.; Song, Wen-Xin; Luo, Xiaoji; Manning, David; Luo, Jinyong; Deng, Zhong-Liang et al. (2007):** Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. In: *J. Orthop. Res.* 25 (5), S. 665–677.
- Maeda, Kazuhiro; Takahashi, Naoyuki; Kobayashi, Yasuhiro (2013):** Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. In: *J Mol Med* 91 (1), S. 15–23.
- Manolagas, S. C. (2010):** From Estrogen-Centric to Aging and Oxidative Stress: A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. In: *Endocrine Reviews* 31 (3), S. 266–300.
- Manolagas, S. C.; Almeida, M. (2007):** Gone with the Wnts: -Catenin, T-Cell Factor, Forkhead Box O, and Oxidative Stress in Age-Dependent Diseases of Bone, Lipid, and Glucose Metabolism. In: *Molecular Endocrinology* 21 (11), S. 2605–2614.
- Marcus, Robert:** Fundamentals of Osteoporosis
- Marie, Pierre J. (2008):** Transcription factors controlling osteoblastogenesis. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2), S. 98–105.
- McKee, M. D.; Nanci, A. (1996):** Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. In: *Connect. Tissue Res.* 35 (1-4), S. 197–205.
- Meunier, P.; Aaron, J.; Edouard, C.; Vignon, G. (1971):** Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. In: *Clin. Orthop. Relat. Res.* 80, S. 147–154.
- Moerman, Elena J.; Teng, Kui; Lipschitz, David A.; Lecka-Czernik, Beata (2004):** Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- $\gamma$ 2 transcription factor and TGF- $\beta$ /BMP signaling pathways. In: *Aging Cell* 3 (6), S. 379–389.
- Mori, Keisuke; Suzuki, Keiji; Hozumi, Akira; Goto, Hisataka; Tomita, Masato; Koseki, Hironobu et al. (2014):** Potentiation of osteoclastogenesis by adipogenic conversion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Biomed. Res.* 35 (2), S. 153–159.
- Morrison, R. F.; Farmer, S. R. (2000):** Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. In: *J. Nutr.* 130 (12), S. 3116S–3121S.

- Muruganandan, S.; Roman, A. A.; Sinal, C. J. (2009):** Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2), S. 236–253.
- Nakamura, Takashi; Imai, Yuuki; Matsumoto, Takahiro; Sato, Shingo; Takeuchi, Kazusane; Igarashi, Katsuhide et al. (2007):** Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. In: *Cell* 130 (5), S. 811–823.
- Nakashima, Kazuhisa; Zhou, Xin; Kunkel, Gary; Zhang, Zhaoping; Deng, Jian Min; Behringer, Richard R.; Crombrughe, Benoit de (2002):** The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. In: *Cell* 108 (1), S. 17–29.
- Nakashima, T.; Kobayashi, Y.; Yamasaki, S.; Kawakami, A.; Eguchi, K.; Sasaki, H.; Sakai, H. (2000):** Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275 (3), S. 768–775.
- Neve, Anna; Corrado, Addolorata; Cantatore, Francesco Paolo (2013):** Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. In: *J. Cell. Physiol.* 228 (6), S. 1149–1153.
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference (2001).** In: *South. Med. J.* 94 (6), S. 569–573.
- Okazaki, R. (2002):** Estrogen Promotes Early Osteoblast Differentiation and Inhibits Adipocyte Differentiation in Mouse Bone Marrow Stromal Cell Lines that Express Estrogen Receptor (ER) or. In: *Endocrinology* 143 (6), S. 2349–2356.
- Pampena, David A.; Robertson, Karen A.; Litvinova, Olga; Lajoie, Gilles; Goldberg, Harvey A.; Hunter, Graeme K. (2004):** Inhibition Of Hydroxyapatite Formation By Osteopontin Phosphopeptides. In: *Biochem. J.* 378 (3), S. 1083.
- Passeri, G.; Girasole, G.; Jilka, R. L.; Manolagas, S. C. (1993):** Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. In: *Endocrinology* 133 (2), S. 822–828.
- Pino, Ana María; Rosen, Clifford J.; Rodríguez, J. Pablo (2012):** In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. In: *Biol. Res.* 45 (3), S. 279–287.
- Pittenger, M. F. (1999):** Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. In: *Science* 284 (5411), S. 143–147.

- Polak-Jonkisz, Dorota; Zwolinska, Danuta (1998):** Osteocalcin as a biochemical marker of bone turnover. In: *Nephrology* 4 (5-6), S. 339–346.
- Prall, Wolf Christian; Haasters, Florian; Heggebö, Jostein; Polzer, Hans; Schwarz, Christina; Gassner, Christoph et al. (2013):** Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 440 (4), S. 617–622.
- Raffaghello, Lizzia; Bianchi, Giordano; Bertolotto, Maria; Montecucco, Fabrizio; Busca, Alessandro; Dallegri, Franco et al. (2008):** Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. In: *Stem Cells* 26 (1), S. 151–162.
- Rammelt, Stefan; Neumann, Mirjam; Hanisch, Uwe; Reinstorf, Antje; Pompe, Wolfgang; Zwipp, Hans; Biewener, Achim (2005):** Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 73 (3), S. 284–294
- Reid, I. R. (2002):** Relationships among body mass, its components, and bone. In: *Bone* 31 (5), S. 547–555.
- Rittling, S. R.; Matsumoto, H. N.; McKee, M. D.; Nanci, A.; An, X. R.; Novick, K. E. et al. (1998):** Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. In: *J. Bone Miner. Res.* 13 (7), S. 1101–1111.
- Rittling, S. R.; Denhardt, D. T. (1999):** Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. In: *Exp. Nephrol.* 7 (2), S. 103–113.
- Rodríguez, J. P.; Garat, S.; Gajardo, H.; Pino, A. M.; Seitz, G. (1999):** Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. In: *J. Cell. Biochem.* 75 (3), S. 414–423.
- Rodríguez, J. P.; Montecinos, L.; Ríos, S.; Reyes, P.; Martínez, J. (2000):** Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. In: *J. Cell. Biochem.* 79 (4), S. 557–565.
- Rosen, Clifford J.; Bouxsein, Mary L. (2006):** Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? In: *Nat Clin Pract Rheumatol* 2 (1), S. 35–43.
- Rosen, Evan D.; Hsu, Chung-Hsin; Wang, Xinzhong; Sakai, Shuichi; Freeman, Mason W.; Gonzalez, Frank J.; Spiegelman, Bruce M. (2002):** C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. In: *Genes Dev.* 16 (1), S. 22–26.

- Rosen, V.; Thies, R. S. (1992):** The BMP proteins in bone formation and repair. In: *Trends in genetics : TIG* 8 (3), S. 97–102.
- Ross, F. P.; Chappel, J.; Alvarez, J. I.; Sander, D.; Butler, W. T.; Farach-Carson, M. C. et al. (1993):** Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. In: *J. Biol. Chem.* 268 (13), S. 9901–9907.
- Ross, S. E.; Hemati, N.; Longo, K. A.; Bennett, C. N.; Lucas, P. C.; Erickson, R. L.; MacDougald, O. A. (2000):** Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. In: *Science* 289 (5481), S. 950–953.
- Schuling, Kerri Durnell; Robinia, Kristi; Nye, Rachel (2011):** Osteoporosis Update. In: *Journal of Midwifery & Women's Health* 56 (6), S. 615–627.
- Shevde, N. K.; Bendixen, A. C.; Dienger, K. M.; Pike, J. W. (2000):** Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (14), S. 7829–7834.
- Silva, I.; Branco, Jaime C. (2011):** Rank/Rankl/opg: literature review. In: *Acta Reumatol Port* 36 (3), S. 209–218.
- Simonet, W. S.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Kelley, M.; Chang, M. S.; Lüthy, R. et al. (1997):** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. In: *Cell* 89 (2), S. 309–319.
- Sims, N. A.; Dupont, S.; Krust, A.; Clement-Lacroix, P.; Minet, D.; Resche-Rigon, M. et al. (2002):** Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. In: *Bone* 30 (1), S. 18–25.
- Sodek, J.; Ganss, B.; McKee, M. D. (2000):** Osteopontin. In: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11 (3), S. 279–303.
- Sodek, Jaro; Chen, Jinkun; Nagata, Toshihiko; Kasugai, Shohei; Todescan, Reynaldo; Li, Ivan W. S.; Kim, Richard H. (1995):** Regulation of Osteopontin Expression in Osteoblasts. In: *Ann NY Acad Sci* 760 (1 Osteopontin), S. 223–241.
- Song, L. (2004):** Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. In: *The FASEB Journal*.
- Spaggiari, Grazia Maria; Capobianco, Andrea; Becchetti, Stelvio; Mingari, Maria Cristina; Moretta, Lorenzo (2006):** Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. In: *Blood* 107 (4), S. 1484–1490.

- Sroga, G. E.; Karim, L.; Colon, W.; Vashishth, D. (2011):** Biochemical Characterization of Major Bone-Matrix Proteins Using Nanoscale-Size Bone Samples and Proteomics Methodology. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (9), S. M110.006718.
- Sroga, Grażyna E.; Vashishth, Deepak (2012):** Effects of Bone Matrix Proteins on Fracture and Fragility in Osteoporosis. In: *Curr Osteoporos Rep* 10 (2), S. 141–150.
- Stenderup, K.; Justesen, J.; Eriksen, E. F.; Rattan, S. I.; Kassem, M. (2001):** Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. In: *J. Bone Miner. Res.* 16 (6), S. 1120–1129.
- Strømsøe, Knut (2004):** Fracture fixation problems in osteoporosis. In: *Injury* 35 (2), S. 107–113.
- Takehita, S.; Fumoto, T.; Naoe, Y.; Ikeda, K. (2014):** Age-related Marrow Adipogenesis Is Linked to Increased Expression of RANKL. In: *Journal of Biological Chemistry* 289 (24), S. 16699–16710.
- Tang, Qi Qun; Lane, M. Daniel (2012):** Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. In: *Annu. Rev. Biochem.* 81 (1), S. 715–736
- Tang, Yi; Wu, Xiangwei; Lei, Weiqi; Pang, Lijuan; Wan, Chao; Shi, Zhenqi et al. (2009):** TGF- $\beta$ 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. In: *Nat Med* 15 (7), S. 757–765.
- Tolar, Jakub; Nauta, Alma J.; Osborn, Mark J.; Panoskaltsis Mortari, Angela; McElmurry, Ron T.; Bell, Scott et al. (2007):** Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. In: *Stem Cells* 25 (2), S. 371–379.
- Toth, Jeffrey M.; Boden, Scott D.; Burkus, J. Kenneth; Badura, Jeffrey M.; Peckham, Steven M.; McKay, William F. (2009):** Short-term Osteoclastic Activity Induced by Locally High Concentrations of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in a Cancellous Bone Environment. In: *Spine* 34 (6), S. 539–550.
- Tou, Liqiang; Quibria, Naureen; Alexander, Joseph M. (2003):** Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. In: *Molecular and cellular endocrinology* 205 (1-2), S. 121–129.
- Tontonoz, P.; Hu, E.; Spiegelman, B. M. (1994):** Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. In: *Cell* 79 (7), S. 1147–1156.
- Tsiridis, Eleftherios; Upadhyay, Neil; Giannoudis, Peter (2007):** Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? In: *Injury* 38 Suppl 1, S. S11-25.

- Uccelli, Antonio; Moretta, Lorenzo; Pistoia, Vito (2008):** Mesenchymal stem cells in health and disease. In: *Nat Rev Immunol* 8 (9), S. 726–736.
- Uede, Toshimitsu (2011):** Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. In: *Pathology International* 61 (5), S. 265–280
- Vega, Damaris; Maalouf, Naim M.; Sakhaee, Khashayar (2007):** Clinical Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 (12), S. 4514–4521.
- Viereck, Volker; Siggelkow, Heide; Tauber, Simone; Raddatz, Dirk; Schutze, Norbert; Hüfner, Michael (2002):** Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. In: *J. Cell. Biochem.* 86 (2), S. 348–356.
- Wang, E. A.; Israel, D. I.; Kelly, S.; Luxenberg, D. P. (1993):** Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 9 (1), S. 57–71.
- Whyte, Michael P.; Obrecht, Sara E.; Finnegan, Patrick M.; Jones, Jonathan L.; Podgornik, Michelle N.; McAlister, William H.; Mumm, Steven (2002):** Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. In: *N. Engl. J. Med.* 347 (3), S. 175–184.
- Woodbury, D.; Schwarz, E. J.; Prockop, D. J.; Black, I. B. (2000):** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. In: *J. Neurosci. Res.* 61 (4), S. 364–370.
- Wu, Z.; Xie, Y.; Bucher, N. L.; Farmer, S. R. (1995):** Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. In: *Genes Dev.* 9 (19), S. 2350–2363.
- Xiong, Jinhu; O'Brien, Charles A. (2012):** Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. In: *J Bone Miner Res* 27 (3), S. 499–505.
- Young, Marian F. (2003):** Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. In: *Osteoporos Int* 14 Suppl 3, S. S35-42.
- Zhao, Jian-Wu; Gao, Zhong-Li; Mei, Hong; Li, Yu-Lin; Wang, Yan (2011):** Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells: The Potential Mechanism for Estrogen-Induced Preferential Osteoblast Versus Adipocyte Differentiation. In: *The American Journal of the Medical Sciences* 341 (6), S. 460–468.
- Zhou, Shuanhu; Greenberger, Joel S.; Epperly, Michael W.; Goff, Julie P.; Adler, Carolyn; LeBoff, Meryl S.; Glowacki, Julie (2008):** Age-related intrinsic changes in human

bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. In: *Aging Cell* 7 (3), S. 335–343.

**Zuk, Patricia A.; Zhu, Min; Ashjian, Peter; Ugarte, Daniel A. de; Huang, Jerry I.; Mizuno, Hiroshi et al. (2002):** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. In: *Mol. Biol. Cell* 13 (12), S. 4279–4295.

**Zupan, Janja; Komadina, Radko; Marc, Janja (2012):** The relationship between osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines differs in human osteoporotic and osteoarthritic bone tissues. In: *J. Biomed. Sci.* 19, S. 28.

## 9 Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Frau Prof. Dr. Sabine Wenisch für die Möglichkeit meine Promotion anfertigen zu dürfen, für die Vergabe dieses spannenden Themas und die uneingeschränkte Unterstützung während der letzten zwei Jahre.

Außerdem danke ich dem Sonderforschungsbereich/Transregio 79 und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Bereitstellung der Sachmittel.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Failing und seinem Team für die unkomplizierte und kompetente Unterstützung in statistischen Fragen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Alena Wagner und Bastian Krähling für die fachkundige Hilfe von Anfang an, ihr immer offenes Ohr und nicht zuletzt die lustige und schöne Zeit im (Trennwand-freien) Büro.

Außerdem danke ich Anne Hild für so manches (lange) kritische Gespräch, die Hilfe bei den Abbildungen und den Fenchel-Auflauf.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Dr. Daniela Fietz für ihre kompetenten Ratschläge in wissenschaftlichen Fragen, vor allem aber für ihre immer offene Tür, ihren Humor und die Fähigkeit mich stets neu zu motivieren. Mit und ohne Schoki.

Des Weiteren danke ich dem Rest der ganzen Anatomie-Gang für zwei tolle Jahre: Dani B, Nadine, Anika S., Manu, Caro, Anika G., Verena, Katja, Nina, Martina, Blakey, Jo und Peter.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Familie, besonders an meine Mutter und Großeltern, die mich auf jede erdenkliche Weise unterstützt haben, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre und denen ich so viel zu verdanken habe.

Last but not least möchte ich mich auch bei meiner „Gießener Familie“ bedanken, den tollsten Freunden, die man sich wünschen kann und die mir auf so viele Arten geholfen haben: Anna, Birthe, Helena, Henrik, Kathi, Lena, Martin, Till und Winnie.



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6404-4

