



**Rolle von Adipokinen bei der Differenzierung von
mesenchymalen Stammzellen**

**Role of adipokines during differentiation
of mesenchymal stem cells**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)
des Fachbereichs Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Lali Tsiklauri

Gießen 2020

Diese Arbeit wurde an der Professur für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt und für den FB 11 von Prof. Dr. U. Müller-Ladner sowie für den FB 08 von Prof. Dr. M. Martin angeleitet.

Prüfungsausschuss:

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Martin
Lehrstuhl für Immunologie des Fachbereichs Biologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Müller-Ladner
Professur für Innere Medizin mit Schwerpunkt
Rheumatologie des Fachbereichs Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation:

Selbständigkeitserklärung

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 Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Lali Tsiklauri

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	I
II.	Summary.....	III
1	Einleitung	1
1.1	Arthrose	2
1.2	Osteoporose	2
1.3	Knochen.....	4
1.3.1	Struktur und Aufbau des Knochens.....	4
1.3.2	Knochenzellen	6
1.3.3	Knochenumbau.....	10
1.4	Mesenchymale Stammzellen – Quelle zur Regeneration von Knochengewebe	12
1.4.1	Mesenchymale Stammzellen und Osteoporose	16
1.5	Knochenmark	17
1.6	Fettgewebe.....	17
1.6.1	Adipozyten und adipogene Differenzierung	18
1.6.2	Adipokine	19
2	Zielsetzung	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Material.....	28
3.1.1	Zellen.....	28
3.1.2	Chemikalien.....	28
3.1.3	Plastikwaren und sonstige Materialien.....	30
3.1.4	Medien und Lösungen	31
3.1.5	Enzyme	32
3.1.6	Molekularbiologische und immunologische Kits.....	32
3.1.7	Oligonukleotide (Primer)	33
3.2	Methoden.....	34
3.2.1	Geräte und Software	34
3.2.2	Zellbiologische Methoden	35
3.2.3	Mineralisierungs-Assay	39
3.2.4	Oil Red O Färbung	40
3.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	40
3.2.6	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	45
3.2.7	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse.....	47

4.1	Osteogene Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Adipokinen in Standard-Zellkultur	47
4.1.1	Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von MMPs während der osteogenen Differenzierung.....	47
4.1.2	Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von TIMPs bei der osteogenen Differenzierung	48
4.1.3	Effekte von Visfatin auf die Matrix-Produktion während der osteogenen Differenzierung	50
4.1.4	Effekte von Adipokinen auf die Osteoblasten-spezifische Genexpression.....	52
4.1.5	Effekte von Adipokinen auf die Synthese von Entzündungsmediatoren bei der osteogenen Differenzierung.....	55
4.2	Osteogene Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Visfatin in Spongiosa-Transfer-Experimenten.....	59
4.2.1	Das osteogene Differenzierungspotential von MSCs auf Spongiosa unter Einfluss von Visfatin	59
4.2.2	Synthese von Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa.....	61
4.3	Adipogene Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Adipokinen in Standard-Zellkultur	65
4.3.1	Das adipogene Differenzierungspotential von MSCs	65
4.3.2	Effekte von Adipokinen auf die Genexpression adipogener Differenzierungsmarker.....	66
4.3.3	Effekte von Adipokinen auf die Gen- und Proteinexpression von MMPs.....	67
4.3.4	Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von TIMPs.....	71
4.3.5	Effekte von Adipokinen auf die Synthese von Entzündungsmediatoren bei der adipogenen Differenzierung	72
4.3.6	Einfluss der Inhibierung von MAP-Signalwegen und Visfatin während der adipogenen Differenzierung	75
4.4	Adipogene Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Visfatin in <i>in vitro</i> -Spongiosa-Transfer-Experimenten.....	84
4.4.1	Das adipogene Differenzierungspotential von MSCs auf Spongiosa unter Einfluss von Visfatin	85
4.4.2	Die Freisetzung von Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa	87
4.4.3	Effekte von Visfatin auf die Gen- und Proteinexpression von MMPs während der Adipogenese auf Spongiosa	91
5	Diskussion	94
5.1	Einfluss der Adipokine auf das Differenzierungspotential von MSCs	94
5.2	Einfluss der Adipokine auf die Synthese von Entzündungsmediatoren während der MSC-Differenzierung.....	100

5.3	Einfluss der Adipokine auf die Expression von MMPs während der MSC-Differenzierung.....	104
5.4	Einfluss der Spongiosa auf die MSC-Differenzierung unter Einfluss von Visfatin...	107
5.5	Einfluss der Inhibition von MAPK-Signalwegen auf die Visfatin-vermittelten Effekte während der adipogenen Differenzierung	112
6	Abkürzungsverzeichnis	116
7	Tabellenverzeichnis	118
8	Abbildungsverzeichnis	119
9	Literaturverzeichnis	122
10	Publikationen	136

I. Zusammenfassung

Im Rahmen der Osteoporose ist der altersbedingte Knochenverlust mit einer erhöhten Fettinfiltration im Knochenmark assoziiert. Das osteoporotisch veränderte Hartgewebe wird somit direkt von den Adipozyten des Knochenmarks begrenzt. Angesichts der hohen sekretorischen Aktivitäten der Adipozyten liegt die Hypothese nahe, dass adipozytäre Sekretionsfaktoren wie Adipokine (z.B. Visfatin, Leptin und Resistin) aufgrund ihrer immunmodulatorischen Funktionen die Differenzierung der im Knochenmark befindenden MSC beeinflussen und so zum fortschreitenden Knochenverlust im Rahmen der Osteoporose beitragen. MSCs als multipotente Zellen, die sowohl zu Adipozyten als auch für Knochenhomöostase relevanten Zellen wie Osteoblasten differenzieren können, stellen die Grundlage der Knochenbildung dar. Bei der Osteoporose ist das Differenzierungspotential der MSCs zu Lasten der osteogenen Differenzierungskapazität in Richtung adipogene Differenzierung verschoben. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle der Adipokine während der Osteogenese sowie Adipogenese in Standardkultur sowie auf aufgereinigten Spongiosafragmenten mit besonderem Fokus auf Matrixumbau zu analysieren.

Durch die Adipokine Leptin und Resistin konnten keine Effekte auf die untersuchten Parameter sowohl während der adipogenen als auch osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Die Stimulierung mit Visfatin führte dagegen zu einem signifikanten Expressionsanstieg von MMPs während der adipogenen Differenzierung [202], wobei das Transkriptionsprofil der TIMPs nicht beeinflusst wurde. Interessanterweise bewirkte Visfatin eine signifikante Reduktion der Expression von MMPs und TIMPs in osteogen differenzierten MSCs [202]. Die Visfatin-induzierte Dysregulation der MMP- und TIMP-Expression könnte zum gesteigerten Knochenabbau an den Knochen-Knochenmark-Grenzflächen, insbesondere bei geschwächter Knochenmatrix, wie z.B. bei der Osteoporose, beitragen. Des Weiteren resultierte die Stimulierung mit Visfatin in einer signifikant erhöhten Freisetzung von IL6, IL8 und MCP1 sowohl in osteogen als auch adipogen differenzierenden MSCs [202]. Durch die proinflammatorische Wirkung könnte Visfatin negativ auf die Knochenhomöostase wirken, da der osteoklastäre Knochenabbau durch Visfatin-induzierte proinflammatorische Proteine begünstigt würde.

Während Visfatin nicht die Expression von adipogenen Markergenen veränderte, konnte in osteogen differenzierten MSCs eine signifikante Induktion von ALP durch Visfatin an Tag 7 der Osteogenese nachgewiesen werden [202], was eine Visfatin-induzierte Verstärkung der

anorganischen Matrixproduktion zur Folge haben könnte. So konnte mittels Alizarin Rot S-Färbung eine verstärkte Mineralisierung durch Visfatin nach Induktion der osteogenen Differenzierung gezeigt werden [202]. Die organische Komponente der EZM, Kollagen Typ I, eines der zentralen Proteine der Knochenplastizität, wurde durch Visfatin an Tag 21 der Osteogenese herunterreguliert [202]. Dieser differenzielle Effekt von Visfatin auf zwei Komponenten der EZM könnte auf eine gestörte Matrixproduktion durch Visfatin hindeuten und zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit führen.

Die Differenzierungsexperimente in einem 3D-Kultumodell zeigten, dass generell die Expression der osteogenen sowie adipogenen Markergene im Vergleich zur Standardkultur geringer ausgeprägt war. Die Zugabe von Visfatin in 3D-Kultur führte im Vergleich zur Standardkultur zu einer Erhöhung von ALP erst nach 21 Tagen der Osteogenese. Das lässt sich auf eine verzögerte Differenzierung der MSCs in 3D-Kultur schließen. Es konnte eine Reduktion der Visfatin-vermittelten Expression von MMPs sowie der proinflammatorischen Zytokine in 3D-Kultur vs. Standardkultur während der Adipogenese festgestellt werden. Obwohl während der Osteogenese in 3D-Kultur keine Reduktion der Visfatin-induzierten Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Vergleich zu Standardkultur erkennbar war, deuten jedoch die während der Adipogenese in 3D-Kultur erzielten Daten auf einen positiven Einfluss der EZM hin.

Zur Identifizierung der Signalwege, die bei den Visfatin-vermittelten Effekten während der adipogenen Differenzierung involviert sind, erfolgte die Kostimulation mit Visfatin und Inhibitoren von p38-MAPK sowie ERK1/2. Während die Inhibierung von p38-MAPK lediglich zu einer Verringerung der MMP13-Expression führte und nicht von Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren, zeigte die Blockierung des ERK1/2-Signalwegs eine nahezu komplette Suppression von MMP13 sowie IL6, IL8 und MCP1. Somit scheint die Aktivierung dieser beiden Signalwege durch Visfatin während der adipogenen Differenzierung von MSCs naheliegend.

Insgesamt konnte ein Einfluss des Adipokins Visfatin sowohl bei der Adipogenese als auch der Osteogenese nachgewiesen werden. Während bei der Osteogenese die Visfatin-vermittelten Effekte zur Fragilität des Knochens beitragen könnten, würden Visfatin-induzierte MMPs bei der Adipogenese, zum Knochenabbau beitragen.

II. Summary

Age-related bone loss during osteoporosis is associated with increased fat infiltration into the bone marrow. Thus, bone marrow adipocytes are in a closed contact with altered osteoporotic bone tissue. Adipose tissue and adipocytes are metabolically highly active and express adipokines such as leptin, resistin and visfatin. These adipocyte-derived factors, due to their immunomodulatory functions might influence MSC differentiation and bone homeostasis. MSCs as multipotent cells, which can differentiate into adipocytes as well as bone tissue relevant cell types such as osteoblasts, represent the basis of bone formation. In osteoporosis, the differentiation potential of MSCs is shifted towards adipogenic differentiation at the expense of osteogenic differentiation. Therefore, the aim of the study was to analyze the role of central adipokines produced by adipocytes at the bone/bone marrow interface during osteogenic and adipogenic differentiation of MSCs under standard cell culture as well as on purified spongiosa fragments with a special focus on matrix remodeling.

The adipokines leptin and resistin showed no effects on the examined parameters during both the adipogenic and the osteogenic differentiation. Stimulation with visfatin led to a significant increased expression of MMPs during adipogenic differentiation [202]. The transcriptional profile of MMP-inhibitors, the TIMPs, was not affected by adipokines. In contrary, a reduction of TIMP expression by visfatin was observed in osteogenically differentiated MSCs [202]. Moreover, a significant reduction of both, MMP2 and 13, could be detected by visfatin after induction of osteogenesis [202]. These observed effects indicate detrimental effects of visfatin on bone metabolism. The visfatin-induced dysregulation of MMP and TIMP expression may interfere with bone remodeling processes and contribute to increased bone turnover at the bone/bone marrow interfaces. Furthermore, stimulation with Visfatin resulted in significantly increased levels of IL6, IL8 and MCP1 during both osteogenic as well as adipogenic differentiation [202]. The observed proinflammatory effect of visfatin may negatively impact bone homeostasis by promoting osteoclastic bone degradation through visfatin-induced proinflammatory proteins.

Regarding influence on the differentiation potential of MSCs, no effects of visfatin on adipogenic differentiation capacity could be demonstrated. However, during osteogenesis a significant elevated expression of ALP could be observed at day 7 after stimulation with visfatin [202]. This could result in a visfatin-induced enhancement of inorganic matrix production as evaluated by Alizarin Red S staining. Osteogenically differentiated cells showed an enhanced

mineralized nodule formation in the presence of visfatin [202]. In contrast to mineralization, the organic component of the ECM - Coll.I, responsible for the bone plasticity - was downregulated by visfatin at the last timepoint after induction of osteogenic differentiation [202]. This differential effect of visfatin on two components of ECM could contribute to an altered matrix production leading to increased bone fragility.

In general, weaker expression of osteogenic (ALP) and adipogenic (PPARG) marker genes could be observed during differentiation in 3D culture compared to standard cell culture. This indicates a reduced efficiency or delayed differentiation of MSCs in 3D culture. Regarding visfatin-mediated induction of MMPs and cytokines observed in adipogenically differentiated MSCs in 2D culture, an osteoprotective effect of ECM could be demonstrated. The visfatin-induced expression of MMPs as well as the release of proinflammatory cytokines were attenuated during adipogenesis on spongiosa compared to standard cell culture. Although no significant reduction of visfatin-induced release of inflammatory cytokines was observed during osteogenesis in 3D culture compared to standard culture, the data obtained during adipogenesis in 3D culture indicate a protective effect of the ECM.

To identify the signaling pathways involved in visfatin-mediated effects during adipogenic differentiation, cells were costimulated with visfatin and inhibitors of p38 MAPK and ERK1 / 2 signaling pathways. While inhibition of p38 MAPK caused only a reduction in MMP13 expression and did not affect the visfatin-induced release of proinflammatory mediators, the inhibition of the ERK1 / 2 signaling pathway suppressed the expression of MMP13 as well as IL6, IL8 and MCP1. Thus, the involvement of specifically ERK1 / 2 signalling in visfatin-mediated effects during adipogenic differentiation of MSCs seems to be important.

In summary, an influence of the adipokine Visfatin could be demonstrated in both, adipogenic and osteogenic differentiation of MSCs. While in osteogenesis the visfatin-mediated effects could contribute to increased bone fragility, during adipogenesis Visfatin-induced MMP expression might contribute to the elevated bone loss by directed contact of bone marrow adipocytes with the weakened, demineralized bone matrix in osteoporosis.

1 Einleitung

Die Osteoporose als systemische Erkrankung des Knochenstoffwechsels und die Arthrose als eine degenerative rheumatische Erkrankung gehören zu den häufigsten altersspezifischen Skeletterkrankungen des Menschen. Sie gelten als Hauptursache für Schmerzen und Funktionsstörungen des Skeletts im Alter. Die Osteoporose ist durch verminderte Knochenmasse und –qualität gekennzeichnet, woraus ein erhöhtes Fragilitätsrisiko resultiert. Im Gegensatz zur Osteoporose hat die Arthrose keinen systemischen Charakter und kann einzelne Gelenke betreffen. Neben der degenerativen Zerstörung des Gelenkknorpels sind auch angrenzende Areale, wie der subchondrale Knochen, die Menisci, der Bandapparat, das Synovium, die Gelenkkapsel und die periartikulären Muskeln betroffen [1].

Aktueller Gegenstand der Arthrose- sowie Osteoporose-Forschung sind unter anderem die mesenchymalen Stammzellen (MSC, engl. *mesenchymal stem cells*) des Knochenmarks. MSCs als eine multipotente Zellpopulation mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung spielen eine wesentliche Rolle im Zuge der Knochenhomöostase und generell der Geweberegeneration [2-4]. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Veränderungen der mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark möglicherweise Bestandteil der Pathophysiologie der Osteoporose und Arthrose.

Abhängig davon, welche Wachstums- und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, differenzieren sich die Stammzellen in einen bestimmten Zelltyp. Im Alter sowie unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei diabetischen Patienten und übergewichtigen Personen, kommt es zu einer Verlagerung des Gleichgewichts zu Gunsten der Adipozyten mit zunehmender Verfettung des Knochenmarks. Zudem ist ein erhöhter Fettgehalt des Knochenmarks bei Patienten mit Osteoporose festgestellt worden [5].

Das Fettgewebe ist außer seiner Speicher- und Füllfunktion auch als endokrines Gewebe aktiv: Insbesondere Fettzellen des viszeralen Typs sind metabolisch besonders aktiv und sezernieren proinflammatorische Zytokine, Hormone, verschiedene Komplement- und Wachstumsfaktoren, Fettsäuren und Adipokine. Leptin, Resistin und Visfatin gehören zu den meist untersuchten adipozytären Sekretionsfaktoren, die auch als Adipozytokine bezeichnet werden. Inwiefern die adipozytären Sekretionsfaktoren die Differenzierung der MSCs beeinflussen oder als Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose wirken, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt [6].

1.1 Arthrose

Die Arthrose (OA, engl. *osteoarthritis*) als eine primär degenerative Gelenkerkrankung gehört zu den häufigsten Formen der Arthritiden. OA zeichnet sich durch den Abbau der Knorpelmatrix und damit einhergehender Instabilität und im weiteren Verlauf der Erkrankung nahezu vollständiger Einschränkung des Gelenks aus. Die OA kann an jedem Gelenk auftreten. Knie, Hüften, Hände und die Wirbelsäule sind jedoch am häufigsten betroffen [7].

Die OA galt früher als eine altersspezifische und durch Abnutzung hervorgerufene Erkrankung des Gelenks. Aktuell weiß man, dass es sich hierbei um eine multifaktorielle Erkrankung handelt. Das Alter ist eines der stärksten Risikofaktoren für die Entwicklung der OA, aber auch die erhöhte mechanische Belastung, vorhergehende Verletzungen, Gelenkfehlstellungen sowie genetische Prädispositionen können die Progression der OA beeinflussen. Weitere Risikofaktoren stellen das weibliche Geschlecht sowie Übergewicht dar [8]. Weltweit erkranken ca. 10 % der Männer und 18 % der Frauen ab einem Alter von 60 Jahren an einer OA. Der veränderte Hormonhaushalt nach der Menopause kann ein Grund dafür sein, dass Frauen häufiger von der OA betroffen sind. Die Gewebeschädigung bei der OA beschränkt sich nicht ausschließlich auf den Knorpel, sondern ist auch mit den sklerotischen Veränderungen des subchondralen Knochens und einer primären Entzündung des Synoviums assoziiert [9]. Um die Destabilisierung des Gelenks zu verhindern, werden Osteophyten ausgebildet, was zu einer Gelenkflächenvergrößerung führt. Die Osteophytenposition ist meist für starke Bewegungseinschränkungen und den Schmerz verantwortlich [10, 11].

Über den Beginn und die initiale Pathophysiologie der OA wird zurzeit kontrovers diskutiert. Diesbezüglich gibt es unterschiedliche Theorien: außer im Knorpel wird der Ursprung im subchondralen Knochen und im Bandapparat vermutet [12, 13]. Eine weitere jüngere Hypothese beschreibt die altersassoziierten Veränderungen im Knochenmark als einen möglichen Prädiktor. Somit könnte die Knorpelhomöostase von innen heraus gesteuert bzw. beeinflusst werden [12].

1.2 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen und hat eine große klinische und gesundheitspolitische Bedeutung in der heutigen Gesellschaft. Die Prävalenz der Osteoporose bei Patienten ab einem Alter von 50 Jahren liegt in Deutschland bei 14 % [14].

Unterschieden nach Geschlecht beträgt die Prävalenz der Osteoporose 24 % für Frauen und 6 % für Männer [14].

Bei der Osteoporose handelt es sich um eine systemische Erkrankung des Knochenstoffwechsels, die durch einen Verlust an Knochenmasse und eine Veränderung der Mikroarchitektur des Knochens charakterisiert ist. In Folge dessen kommt es zu einer erhöhten Knochenfragilität und somit bei den Patienten zu einem erhöhten Frakturrisiko. Als verantwortlich für die osteoporotische Veränderung des Knochengewebes wird eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen osteoblastärem Knochenaufbau und osteoklastärer Resorption zugunsten des Knochenabbaus vermutet.

Die Einteilung der Osteoporose in primäre und sekundäre Osteoporose erfolgt je nach Ursache dieser Erkrankung. Den Hauptanteil mit circa 95 % bilden die primären Osteoporosen. Hierzu werden die idiopathische Osteoporose beim jungen Menschen, die postmenopausale Osteoporose (Typ I Osteoporose) und die senile Osteoporose (Typ II Osteoporose) gezählt. Hingegen sind sekundäre Osteoporosen als Folge anderer Primärerkrankung zu deuten. Sie sind häufig die Folge von medikamentöser Behandlung wie z.B. Langzeittherapien mit Steroiden [15].

Klinisch manifestiert sich die Osteoporose durch das Auftreten von Fragilitätsfrakturen; am häufigsten sind die Wirbelsäule, Hüfte und das Handgelenk [16] betroffen. Osteoporose-assoziierte Frakturen sind mit Schmerzen und erhöhten Mortalität / Immobilität insbesondere im ersten Jahr nach der Fraktur verbunden und verursachen erhebliche Einbuße an Lebensqualität. Circa 75 % der osteoporotischen Frakturen in den westlichen Ländern betreffen Frauen [17]. So stellt sich das weibliche Geschlecht als ein Risikofaktor der Osteoporose dar [18]. Sexualhormone wie Östrogen und Testosteron sind essenziell für die Aufrechterhaltung der Knochenmasse. Im Alter und in der Menopause auftretendes Defizit dieser Hormone führt zu einer Reduktion der Knochenmasse und somit zu einem erhöhten Risiko, eine Osteoporose zu entwickeln [15, 19, 20]. Das Alter ist demnach ein wesentlicher Risikofaktor. Mit fortschreitendem Alter (≥ 65 Jahre) erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, an Osteoporose zu erkranken. Zu den weiteren Risikofaktoren zählen genetische Prädispositionen, vorangegangene Frakturen, geringes Körpergewicht, körperliche Inaktivität und Fehlernährung. Nicht ausreichende Versorgung mit Kalzium, Vitamin D, B12, Phosphat und Folsäure beeinträchtigt die Aufrechterhaltung der Knochenmasse [18]. Zudem ist die negative Auswirkung bestimmter Arzneimittel und Erkrankungen auf den Knochenstoffwechsel bekannt. Vor allem eine längere Einnahme von Glucocorticoiden [18, 21] beeinflussen negativ

die Knochenhomöostase. Ebenso konnte der negative Einfluss von Alkohol- und Nikotinkonsum auf die Knochengesundheit mittels verschiedener Studien belegt werden [18, 22].

1.3 Knochen

Der Knochen ist ein hochspezialisiertes, mineralisiertes Bindegewebe, das vielfältige mechanische und metabolische Funktionen erfüllt [23]. Die Knochen des menschlichen Körpers, betrachtet man sie als Einheit, sind mit etwa 15 % des Körpergewichtes das größte Organ. Das knöcherne Skelett übernimmt eine Stützfunktion für den gesamten Körper und schützt die inneren Organe. Als größtes Mineraldepot des Organismus erfüllt der Knochen zudem wichtige metabolische Funktionen. Er ist direkt eingebunden in die Regulierung des Blutcalciumspiegels. Bei Bedarf von Calcium, Magnesium oder Phosphat können die Mineralstoffe aus den Knochen freigesetzt und dem Stoffwechsel zur Verfügung gestellt werden. Zudem dient der Knochen dem Ansatz von Bändern und Muskeln, ermöglicht somit die Bewegung und stellt sich als passiver Teil des Bewegungsapparates dar. In den Hohlräumen des spongiösen Knochens befindet sich das Knochenmark, das unter anderem an der Herstellung und Aufrechterhaltung des blutbildenden Systems und der Immunzellen beteiligt ist.

1.3.1 Struktur und Aufbau des Knochens

Aufgrund seiner Funktionen sind die mechanischen Anforderungen an Knochen außerordentlich hoch. Die besondere Bauweise und Zusammensetzung führt zu einer hohen Elastizität bei relativ geringem Gewicht, was eine hohe Belastbarkeit dieses hoch spezialisierten Bindegewebes gewährleistet [24].

Die Knochengrundsubstanz bilden anorganische mineralisierte (65 %) und organische (35 %) Matrix, bestehend aus Kollagen Typ I (Koll.I), nicht-kollagenen Proteinen sowie Proteoglykane, Osteopontin (OP) und Osteocalcin (OCN), die zusammen für die nötige Elastizität sorgen. Mineralisierte extrazelluläre Matrix (EZM) setzt sich aus Hydroxyl-Apatit-Kristallen, welche Calciumphosphat, Calciumkarbonat, Magnesiumphosphat und Alkalisalze

enthalten, zusammen und gibt dem Knochen gleichzeitig die Festigkeit, die für seine Funktion als Stützapparat benötigt wird.

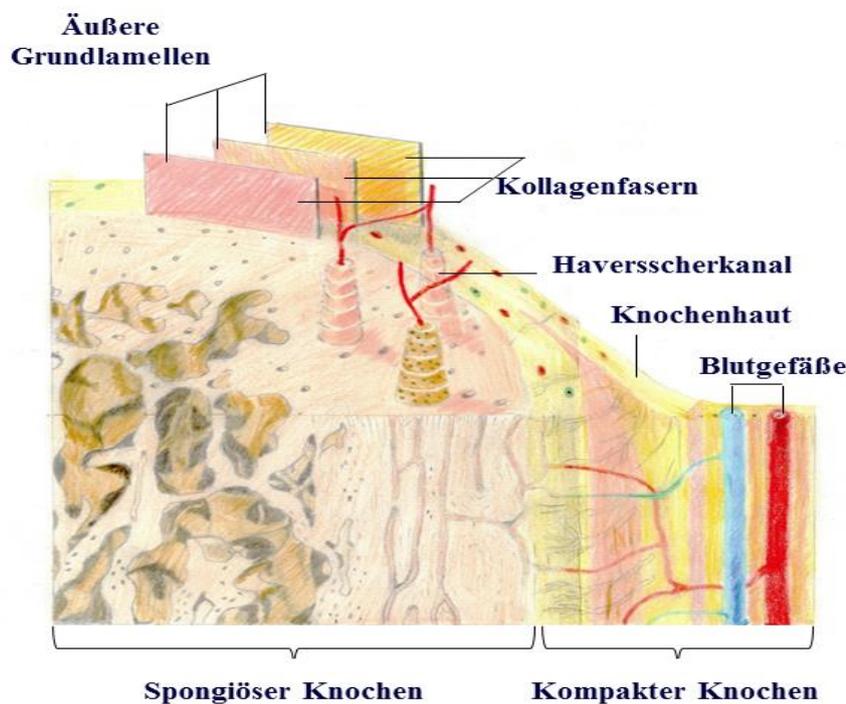


Abb. 1: **Aufbau des Lamellenknochens** (nach Wissenmedia GmbH, Gütersloh / München. Eigendarstellung).

Die Röhrenknochen des Erwachsenen sind Lamellenknochen und bestehen aus zwei Schichten: der äußeren, kompakten Schicht, der *Substantia compacta*, und einer inneren Schicht, die aus schwammartig angeordneten Knochenbälkchen, der *Substantia spongiosa* und dem Knochenmark besteht. Der äußere Knochen ist von dem dickeren Periost umhüllt. In Tripelhelices angeordnete Kollagen Typ I Fasern, die von Apatitkristallen umlagert werden, bilden mit den Havers-Kanälen zusammen die so genannten Osteone, welche die unterste Organisationsebene des Knochens darstellen. Havers-Kanäle enthalten Nervenzellen sowie Blutgefäße und stehen durch sogenannte Volkmann-Kanäle miteinander, dem Knochenmark und dem Periost in Verbindung. Somit wird der Austausch von endokrinen Faktoren und Signalmolekülen gewährleistet [25, 26].

Im Durchschnitt bestehen Osteone aus 6-7 Schichten. Diese sind ca. 4 mm lang und 200 mm breit. In der Kortikalis sind die Osteone konzentrisch parallel zur Längsachse der Diaphyse angeordnet, wobei in spongiösem Knochen eine regellose Anordnung dominiert. Durch die Ausrichtung an den Belastungslinien und den Verknüpfungen miteinander sorgen sie gleichzeitig für Elastizität und Stabilität während der Bewegung.

1.3.2 Knochenzellen

Im Wesentlichen zählt man zu den Knochenzellen folgenden Zelltypen: Osteoblasten, Osteozyten, ‚*Bone-Lining*‘-Zellen [26] und knochenabbauende Osteoklasten. Außer den genannten Zellen finden sich zahlreiche andere Zellentypen im Knochengewebe, wie Vorläuferzellen von Osteoblasten und Osteoklasten. Sie bilden zusammen mit dem Kapillarsystem, welches den Knochen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, die-sogenannte *basic multicellular unit* (BMU). Durch das Zusammenspiel dieser Zellen wird die Aufrechterhaltung der Knochenstruktur und Knochenmasse im Rahmen des Knochenumbaus gewährleistet.

Osteoblasten entstehen im Knochenmark aus nicht hämatopoetischen multipotenten Vorläuferzellen, den mesenchymalen Stammzellen. Osteoblasten sind einkernige, an der Matrixoberfläche epithelartig angeordnete Zellen und haben eine kubische bis prismatische Form. Sie besitzen zahlreiche Mitochondrien und Lysosomen, raues endoplasmatisches Retikulum, einen gut ausgebauten Golgi-Apparat und eine Vielzahl von Ribosomen, was auf hohe Stoffwechselaktivität dieser Zellen hindeutet [27]. Osteoblasten produzieren die Proteine, welche zusammen mit Wasser (10 %) die Knochengrundsubstanz, das Osteoid, bilden. Diese Zelltypen sind auch für die spätere Mineralisierung des Osteoids verantwortlich.

Die Differenzierung von Osteoblasten aus den MSCs wird durch den Transkriptionsregulator ‚*Runt-related transcription factor 2*‘ (Runx2) gesteuert [28, 29]. Neben der essentiellen Rolle von Runx2 in der Entwicklung von MSCs zu Osteoblasten, löst dieser Transkriptionsfaktor die Expression von osteogenen Markergenen aus und inhibiert gleichzeitig die Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten und Adipozyten. Osterix, ein Zinkfinger Transkriptionsfaktor, steuert die Reifung von Präosteoblasten zu Osteoblasten [30]. Im Laufe der Matrixbildung durch Osteoblasten variiert die Expression osteoblastärer Gene je nach Entwicklungsstand der Zelle und kann zur Beurteilung ihres Differenzierungsstatus genutzt werden. Osteoblastäre Differenzierung und Aktivität kann man in drei Phasen einteilen: Proliferation, Reifung der extrazellulären Matrix und Mineralisation. In der Proliferationsphase werden vornehmlich Zellwachstums- und Zellzyklusgene exprimiert. Proliferierende Osteoblasten exprimieren außerdem Kollagen-Gene zur Synthese des knochentypischen Kollagen Typ I, Fibronectin sowie TGFβ werden in dieser Phase auch vermehrt exprimiert. Die Matrixreifungsphase ist gekennzeichnet durch eine hohe Genexpression der alkalischen Phosphatase (ALP) und einem starken Anstieg der Genexpression von Osteocalcin. Während der Mineralisationsphase werden

Gene wie OCN, Osteopontin und *Bone Sialoprotein* (BSP) verstärkt exprimiert, wodurch die Mineralisierung organischer Matrix initiiert und reguliert wird [31, 32].

Neben dem Knochenaufbau sind die Osteoblasten aktiv in Umbauprozesse involviert. Sie stehen mit Osteoklasten in Verbindung und regulieren somit die osteoklastäre Knochenresorption [33, 34]. Osteoblasten verfügen über verschiedene Rezeptoren, unter anderem für Vitamin D, Östrogen und Parathormon, über die sie endokrin reguliert werden können. Zudem werden sie auch durch mechanische Stimuli in ihrer Differenzierung und Funktion beeinflusst [35, 36].

Osteoblasten haben eine durchschnittliche Lebensdauer von etwa drei Monaten. Anschließend gehen sie entweder in die Apoptose über oder werden in der Matrix eingemauert und entwickeln sich zu Osteozyten. Sie können aber auch abflachen und sich in ‚*Bone-Lining*‘-Zellen umwandeln [37, 38]. In der Matrix eingeschlossene **Osteozyten** können bis zu 25 Jahre alt werden und machen ca. 90-95 % der Knochenzellpopulationen aus [39]. Über die Kanälchen namens Kanalikuli erfolgt die Interaktion von Osteozyten miteinander und mit anderen Zellen. Über dieses riesige Netzwerk können Signalmoleküle ausgetauscht und mechanische Veränderungen oder Knochendefekte wahrgenommen werden. Folglich können die Osteozyten die Aktivierung von Reparatur-Vorgängen unter anderem über Osteoblasten und Osteoklasten in Gang setzen [39]. Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass die Osteozyten die wichtigsten Produzenten von ‚*receptor for activation of nuclear factor kappa B*‘-Ligand (RANKL) während des Knochenumbaus, des ‚Remodelings‘, unter physiologischen Bedingungen sind [40]. Die spezifische Deletion von RANKL in murinen Osteozyten *in vivo* führte zur Entwicklung eines osteopetrotischen Phänotyps [41, 42].

Osteozyten, obwohl sie oft auch als ruhende Osteoblasten bezeichnet werden, sind aktiv an der Regulation der Knochenformation beteiligt, indem sie die Proteine Sclerostin (kodiert durch das *SOST*-Gen) und Dickkopf-related protein 1 (DKK 1) sezernieren. Diese Moleküle sind Inhibitoren des Wnt/ β -Catenin- und/oder des BMP-Signalwegs, die bei der Differenzierung zu Osteoblasten aktiviert sind [43]. Somit agieren die Osteozyten über die Sekretion von SOST und DDK1 als negative Regulatoren der Knochensynthese. Die regulatorischen Mechanismen, verantwortlich für die Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten, konnten bisher noch nicht im Detail herausgefunden werden [44].

‚*Bone-Lining*‘-Zellen sind länglich geformte, flache Zellen, die den Knochen an den Stellen bedecken, an denen weder Resorption noch Knochenaufbau stattfindet. Bekanntlich entstehen

sie aus Osteoblasten und sind in der Lage, unter Einfluss des Parathormons oder unter Einwirkung mechanischer Kräfte wieder zu Osteoblasten reaktiviert zu werden [45-47]. ‚*Bone-Lining*‘-Zellen interagieren sowohl miteinander als auch mit Osteozyten und Osteoblasten über sogenannte ‚*gap junctions*‘ [46].

Die Funktion von ‚*Bone-Lining*‘-Zellen ist bisher wenig untersucht. Eine wichtige Aufgabe erfüllen ‚*Bone-Lining*‘-Zellen während des Knochenumbaus. Sie säubern die Resorptions-Lakunen und entfernen das von den Osteoklasten unverdaute, zurückgelassene, demineralisierte Kollagen [48]. Zudem können die ‚*Bone-Lining*‘-Zellen durch Expression von Osteoprotegerin (OPG) und RANKL die Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten beeinflussen [49, 50].

Osteoklasten sind mehrkernige, große Zellen, die sich innerhalb der Havers-Kanäle sowie an der Knochenoberfläche befinden. Osteoklasten entwickeln sich aus den mononukleären hämatopoetischen Stammzellen und sind mit Makrophagen und Monozyten verwandt. Die mehrkernigen Osteoklasten entstehen durch Fusionierung der einkernigen Monozyten zu mehrkernigen Vorläuferzellen. Dieser Prozess der Entstehung und Differenzierung der Osteoklasten wird als Osteoklastogenese bezeichnet [26] und durch osteoblastäre sowie von Stromazellen oder Lymphozyten sezernierte Faktoren gesteuert. Eine zentrale Rolle bei der Regulation der Bildung und Aktivierung von Osteoklasten übernehmen die Zytokine ‚*macrophage colony stimulating factor*‘ (MCSF) und RANKL.

Der erste Schritt der Differenzierung ist die Bindung von MCSF an seinen Rezeptor c-Fms [39]. MCSF fördert dabei die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen in Richtung der Monozyten- / Makrophagen-Linie, zu der die Osteoklasten gehören. Für den weiteren Verlauf der Osteoklastogenese ist die anschließende Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK (*Receptor Activator of NF- κ B*) erforderlich. RANKL, das zu der Superfamilie der Tumornekrosefaktoren (TNF) gehört, kann dabei sowohl als lösliches Molekül als auch in Membran-gebundener Form vorliegen [51] und wird z.B. von Osteoblasten, Osteozyten, B-Zellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. Die Bindung von RANKL an RANK, der auf der Membran der monozytären Osteoklastenvorläufer vorkommt, aktiviert verschiedene Schlüsseltranskriptionsfaktoren sowie osteoklastäre Enzyme, die gemeinsam die Differenzierung, Reifung und Aktivierung der Osteoklasten fördern [52, 53]. Hierzu zählen beispielsweise TRAP (*Tartrate resistant acid phosphatase*), der Kalzitininrezeptor, Cathepsin K oder DC-STAMP (*Dendritic cell-specific transmembrane protein*) [50]. Die letzteren sind essenziell für die Differenzierung, Reifung und Aktivierung der Osteoklasten [52, 53].

Die RANKL-RANK-Interaktion kann durch OPG verhindert werden. OPG, genauso wie RANKL, gehört zur TNF-Superfamilie und ist in der Lage, RANKL extrazellulär zu binden und 'abzufangen'. Somit trägt OPG ebenfalls eine wesentliche Rolle zur Regulierung der Osteoklastogenese bei. Das RANKL/OPG-Verhältnis gilt als kritischer Faktor in der Regulierung des Gleichgewichts zwischen Knochenformation und Knochenresorption. Sowohl RANKL als auch OPG werden primär von Zellen der Osteoblastenlinie oder von Stromazellen des Knochenmarks gebildet. Unter pathologischen Umständen sind aber auch T- und B-Lymphozyten zur Synthese von RANKL und OPG befähigt [54]. T-Lymphozyten besitzen einen gegenregulatorischen Mechanismus, um die übermäßige Aktivierung von Osteoklasten unter physiologischen Bedingungen zu verhindern. Sie sind in der Lage zeitgleich $\text{IFN}\gamma$ zu sezernieren, welches zur Inaktivierung von TRAF6 und letzten Endes zur Hemmung der Osteoklastogenese führt [55]. Viele inflammatorischen Zytokine, wie die Interleukine (IL)1, IL6, IL17 oder $\text{TNF}\alpha$ können über eine Regulation des RANKL-RANK Signalwegs die Osteoklastogenese indirekt fördern. Hingegen werden Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$, IL4/IL13, IL10 oder IL12 als Osteoklasten-hemmend diskutiert [56].

Erste medikamentöse Eingriffe in dieses System sind vorhanden: Das seit 2010 zugelassene Medikament Denosumab führt zu einer ausgeprägten Reduktion der Osteoklastenzahl [57]. Hierbei handelt es sich um monoklonale anti-RANKL-Antikörper, die mit hoher Spezifität und Affinität an RANKL binden und somit die Aktivierung von Osteoklasten unterbinden können.

Die Hauptaufgabe des Osteoklasts besteht in der Resorption der Knochensubstanz [27]. Dieser Vorgang bedarf der Adhäsion der Zelle an der Knochenoberfläche. Durch $\alpha\text{V}\beta 3$ -Integrine setzt sich der Osteoklast an der Trabekeloberfläche fest („*Sealing Zone*“) und formt einen abgeschlossenen Bereich, die Resorptionslakune. Nach der Adhäsion kommt es zur Polarisierung der Zellen. An ihrer zum Knochen zugewandten Seite wird der sogenannte Bürstensaum (*ruffled border*) ausgebildet. Diese aufgefaltete Basalmembran dient zur Vergrößerung der Kontaktfläche zum darunter liegenden Knochen, um Platz für Protonenpumpen oder Chloridkanäle zu schaffen, damit die verschiedenen Ionen und proteolytischen Enzyme freigesetzt oder die Abbauprodukte wieder von der Zelle aufgenommen werden können. Durch die Freisetzung von H^+ -Ionen über die ATPase-Protonenpumpe in die Resorptionslakune wird das saure Milieu geschaffen, das für die Demineralisierung des Knochengewebes sowie für die Auflösung des Hydroxylapatits und die Aktivierung von Proteinmatrix abbauenden Enzymen, wie z.B. Cathepsin K und TRAP, notwendig ist. Bei der Osteoporose sind die Osteoblasten weniger in der Lage, die entstandenen

Resorptionslakunen wieder aufzufüllen, sodass aus jedem Knochenumbau-Vorgang ein Knochenverlust resultiert [58].

1.3.3 Knochenumbau

Das Knochengewebe des menschlichen Körpers muss unterschiedlichen Belastungen standhalten können. Um den äußeren Anforderungen gerecht zu werden, weist der Knochen Eigenschaften wie Zug-, Druck- und Biegezugfestigkeit auf. Im Laufe der Zeit wird die Knochenstruktur an veränderte Belastungsanforderungen angepasst. Trotz seiner starren Beschaffenheit befindet sich der Knochen zeitlebens im Umbau. Im Rahmen des sogenannten Knochenumbaus wird altes Knochengewebe ersetzt, Mikrorisse und kleinere Beschädigungen werden repariert [59, 60]. Dieser Prozess erfordert ein gut reguliertes Nebeneinander von Knochensynthese und Knochenresorption.

Der Knochenumbau wird in spezialisierten, temporären anatomischen Strukturen, den sogenannten '*bone remodeling compartments*' (BRC) bewerkstelligt. Diese werden durch '*Bone-Lining*'-Zellen vom Knochenmark separiert und bilden mit den Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten sowie mit Immunzellen und im Knochen vorhandenen versorgenden Blutgefäßen zusammen ein sogenanntes '*basic multicellular unit*' (BMU) [61-63]. Jährlich werden drei bis vier Millionen BMUs zum Zwecke der Knochenerneuerung im gesunden Knochen eines Erwachsenen gebildet. Dabei werden die gealterten Osteoklasten sowie Osteoblasten durch neue ersetzt. Durch die Knochenumbau-Prozesse werden ca. 10 % der gesamten Knochenmasse pro Jahr erneuert [64]. Der Umbau wird in verschiedene Phasen unterteilt [65]. Vor dem Beginn der Knochenerneuerung befindet sich das Knochengewebe in einer Ruhephase, in der der Knochen durch die dachartig aufliegenden '*Bone-Lining*'-Zellen eingehüllt wird. Es wird angenommen, dass diese Zellen durch die Resorption initiierten Faktoren zur Expression der Kollagenasen angeregt werden. Dieses Enzym zerstört das Osteoid, das der mineralisierten Matrix aufliegt [66]. Anschließend, in der ersten Aktivierungsphase, bilden sich die '*Bone-Lining*'-Zellen zurück und es kommt zur Rekrutierung und Differenzierung der Osteoklastenvorläufer als Antwort auf die von MSC, Osteozyten und Osteoblasten vermittelten Signalwege. Bekanntlich erhöhen die beschädigten Osteozyten im Falle von Mikrorissen und Schädigungen ihre RANKL-Expression und tragen zur Aktivierung der Osteoklastogenese bei [39, 40].

In der folgenden Resorptionsphase beginnen die gebildeten Osteoklasten alte Knochenmatrix abzubauen. Dabei werden Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGFI, TGF β und PDGF freigesetzt, über welche die Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten erfolgt [66-70]. Dieser Vorgang wird als Umkehrungsphase bezeichnet, bei der durch den allmählichen Differenzierungsvorgang der Osteoblasten die Knochenneusynthese eingeleitet wird. In der nächsten Aufbauphase bilden die reifen Osteoblasten zunächst das Osteoid durch Freisetzung von Kollagen Typ I alpha 1 (Koll.Ia1) und 2 (Koll.Ia2), BSP, Osteopontin sowie das Calciumbindende Protein OCN [71, 72]. Die Proteine Kollagen Typ I alpha 1 und 2 bilden in einem Verhältnis von 2:1 eine Tripelhelix, das Kollagen Typ I, das sich zu Kollagenfasern zusammenlagert [73]. Das neu gebildete Osteoid wird in der abschließenden Mineralisierungsphase durch die Anlagerung von Hydroxylapatit-Kristallen ausgehärtet. Nach der Beendigung der Mineralisierungsphase differenzieren sich die Osteoblasten entweder zu Osteozyten, die in die mineralisierte Matrix eingebettet werden, oder sie gehen in die Apoptose. Der neu gebildete Knochen wird wieder durch die 'Bone-Lining'-Zellen bedeckt und vom Knochenmark separiert. Die ca. 3 Monate andauernde Neusynthese des Knochengewebes benötigt dabei viel mehr Zeit [74] als der osteoklastäre Knochenabbau, der in einem Osteon von Beginn bis Ende ca. 2-3 Wochen in Anspruch nimmt [74].

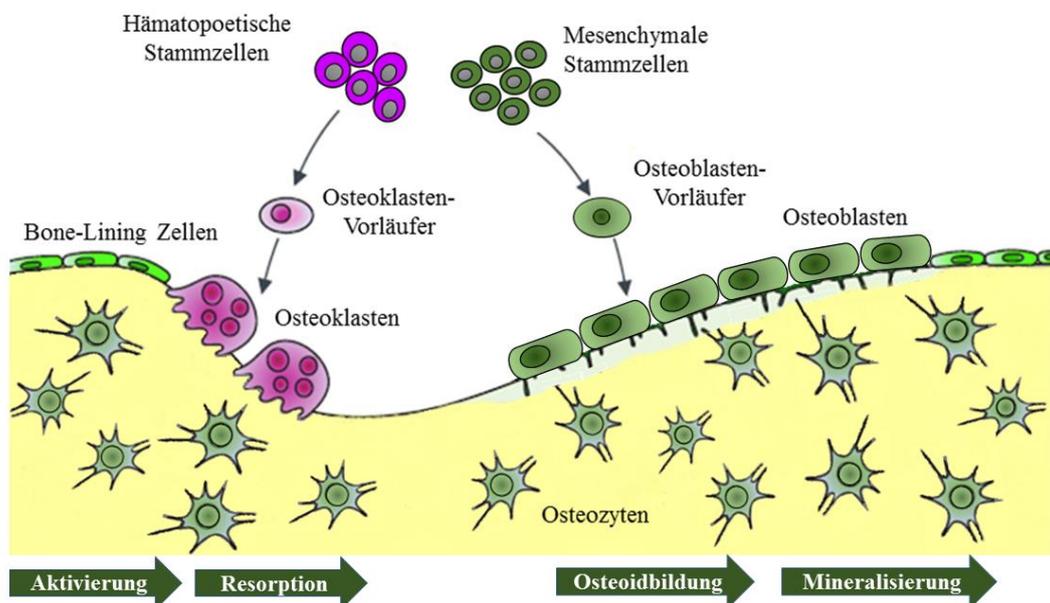


Abb.2: **Knochenumbau innerhalb einer BMU** (modifiziert nach Long 2012; Eigene Darstellung): Die aus den hämatopoetischen Stammzellen entwickelten Osteoklasten sind für die Knochenresorption verantwortlich. Nach Beendigung der Resorptionsvorgänge durch Osteoklasten erfolgt die Knochenformation durch Osteoblasten, die sich aus mesenchymalen Stammzellen differenzieren. Das neu gebildete Osteoid wird ebenfalls durch Osteoblasten mineralisiert. Am Ende des Knochenumbaus werden in der Knochenmatrix eingebettete Osteoblasten zu Osteozyten. Die neu synthetisierte Knochenoberfläche wird wieder durch die ‚Bone-Lining‘-Zellen bedeckt.

Abgesehen von der pränatalen Entwicklung bis zur Kindheit, in der ausschließlich die Ossifikation stattfindet, ist im Laufe der Alterung oder bei Knochendefekten das Verhältnis von Knochenabbau zu Knochenaufbau im Gleichgewicht, es liegt eine Homöostase vor. Neben den knochenbildenden Osteoblasten, den knochenresorbierenden Osteoklasten sowie den in der Matrix verankerten Osteozyten und ihre sezernierten Produkte, spielen viele verschiedene Faktoren beim Knochenumbau eine Rolle. Während z.B. systemische Faktoren, wie Sexualhormone und Wachstumsfaktoren eher die Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten begünstigen, wirken die lokalen Faktoren, wie inflammatorische Zytokine, positiv auf die Osteoklasten-Differenzierung und deren Aktivierung. Gerät das Verhältnis zwischen Knochenaufbau und -resorption aus dem Gleichgewicht, kann das Krankheiten wie die Osteoporose oder Osteopetrose zur Folge haben.

1.4 Mesenchymale Stammzellen – Quelle zur Regeneration von Knochengewebe

Mesenchymale Stammzellen entwickeln sich aus dem Mesoderm [2] und sind unter anderem auch im Knochenmark vorzufinden. MSCs sind multipotente Zellen und zeichnen sich durch hohes Selbsterneuerungspotential und Differenzierungsfähigkeit in verschiedenen Gewebetypen aus. Im Vergleich zu pluripotenten embryonalen Stammzellen können sie nur in eine begrenzte Anzahl an Zelltypen, wie Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten, differenzieren [3, 75-79]. Allerdings wird die Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen in nicht aus dem Mesenchym stammende Zelltypen kontrovers diskutiert und konnte bisher nur in *in vitro* Studien nachgewiesen werden. Verschiedene Studien brachten Hinweise auf ein gewisses Entwicklungspotential von MSCs, in Richtung neuroektodermale Zellen des Gehirns [80-83] sowie Hepatozyten [84-87] zu differenzieren.

Mesenchymalen Stammzellen als nicht-hämatopoetische Zellen mit multipler Differenzierungsfähigkeit im Knochenmark wurden zuerst von Friedenstein *et al.* 1974 [88] beschrieben. Die Studien um Friedenstein *et al.* zeigten, dass nach Knochenmarktransplantation die im Knochenmark vorliegenden Zellen ein osteogenes Differenzierungspotential aufwiesen und anders als hämatopoetische Stammzellen in Zellkulturgefäßen adhärent wuchsen. Zu der Zeit bezeichnete man diese Knochenmarkszellen als Osteogene [89] oder Stroma-Stammzellen [90]. Der Begriff mesenchymale Stammzellen wurde erst später von Caplan *et al.* 1991 [2] verwendet. Aktuell wird die Bezeichnung ‚Stromazellen‘ im Zusammenhang von MSCs sehr

häufig gebraucht, da es sich bei den isolierten MSC-Kulturen nicht um eine reine Zellpopulation handelt, sondern sich heterogen zusammensetzt.

MSCs sind fast in allen Geweben vorzufinden. Für experimentelle Ansätze werden sie meist vom Knochenmark (BM-MSCs – *bone marrow derived MSC*), Fettgewebe (AD-MSCs – *adipose tissue derived MSC*) oder aus Nabelschnurblut (CB-MSCs – *cord blood derived MSC*) gewonnen. Der prozentuale Anteil der MSCs im Knochenmark ist relativ gering, so stellen sie in einem Knochenmarks-Aspirat etwa 0,001 bis 0,01 % aller Zellen dar [91]. Höhere Anzahlen an regenerativen MSCs (ca. 5 % aller Zellen) können aus dem Fettgewebe gewonnen werden [92].

Morphologisch weisen die MSCs *in vitro* eine Heterogenität auf. Eine MSC-Population setzt sich aus fibroblastoiden, spindelförmigen Zellen und weniger schnell differenzierenden, größeren Zellen [93] zusammen. Im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen zeigen MSCs ein adhärentes Wachstum und schnelle Expansionsfähigkeit *in vitro*. Durch Zellteilung bilden MSCs identische Vorläuferzellen mit dem gleichen Selbsterneuerungs- und Differenzierungsverhalten. Neben der symmetrischen Zellteilung haben die MSCs auch die Fähigkeit, sich asymmetrisch zu teilen. Nach der asymmetrischen Zellteilung entstehen statt zwei identischer Stammzellen nur eine Stammzelle und eine differenzierte Vorläuferzelle, was die Bildung einer gemischten Zellpopulation zur Folge hat [94]. Im Zuge der Transdifferenzierung, die für die MSCs ebenfalls beschrieben wurde, können die bereits differenzierten Zellen wieder zu multipotenten Vorläufern zurück, oder in eine andere Linie (z.B. adipogene oder osteogene Linie) differenzieren [95]. Die Entwicklung der Osteoblasten aus hypotropen Chondrozyten im Rahmen der endchondralen Ossifikation oder bei der Entwicklung von OA kann als Beispiel der Transdifferenzierung genannt werden [96]. Obwohl die MSCs ein starkes Erneuerungspotential besitzen, ist ihre Expansionsfähigkeit in Kultur jedoch begrenzt. Mit steigenden Zellteilungszyklen wird ihre Differenzierungsfähigkeit aufgrund der auftretenden zellulären Seneszenz beeinträchtigt [97]. Obwohl der Status der Telomerase in humanen MSCs kontrovers diskutiert wird, konnte die Telomerase-Aktivität das Hauptmerkmal für die sogenannte ‚Stemness‘ in den meisten Untersuchungen mit humanen MSCs nicht festgestellt werden [98, 99]. Im Zuge der Proliferation von MSCs kommt es zum Verlust der Telomere und die Seneszenz der Zellen tritt in Kultur bei *in vitro* Experimenten ein. Die Abwesenheit der Telomeraseaktivität ist allerdings umstritten. Einige Studien zeigten, dass die Teilungsfähigkeit der MSCs durch die ektopische Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase verlängert werden kann [100, 101].

Aufgrund der Heterogenität und Ähnlichkeit mit anderen fibroblastoiden Zellen wurden bestimmte Kriterien von der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) definiert, die die MSCs erfüllen sollten: Neben adhärentem Wachstums- und trilinearem Differenzierungspotential werden die MSCs über die Expression von Oberflächenantigenen charakterisiert [3, 78, 102]. MSCs exprimieren Oberflächenmarker, wie *Cluster of Differentiation* (CD) 105, CD90 (Thy-1), CD73, CD44 und CD 71 [78, 79, 102]. Dazu müssen sie negativ für Oberflächenantigene der hämatopoetischen Linie CD45, CD34, CD14 und CD11 seien. MSCs sind auch durch das Fehlen von Endothelmarkern, wie z.B. CD35, und dem *major histocompatibility complex* (MHC) gekennzeichnet [75, 76, 103].

Mesenchymale Stammzellen besitzen die Fähigkeit zum Ort einer Gewebeschädigung zu migrieren [78]. Dabei können die MSCs die Endothelschranken überwinden und in die Blutbahn gelangen. Die genauen Mechanismen hierfür sind nicht vollständig bekannt. Ähnliche Expressionsprofile von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen sowie verschiedenen Rezeptoren, die beim Migrationsverhalten der Leukozyten von Bedeutung sind, konnten auch bei MSCs detektiert werden [78]. Die freigesetzten Zytokine dienen zur Rekrutierung weiterer MSCs an dem Ort des Geschehens und wirken Angiogenese-fördernd [104, 105]. Die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren Regulatoren *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMP), insbesondere MMP1 und -14, sowie TIMP2, spielen eine entscheidende Rolle bei der Überwindung der endothelialen Barriere [106]. Darüber hinaus konnten anti-immunogene Eigenschaften von MSCs nachgewiesen werden. Das heißt, sie lösen keine Immunantwort bei allogenen Zelltransfer aus [3, 78, 79]. Außer dass die MSCs nur gering von T- und B-Lymphozyten erkannt werden, wirken die MSCs antientzündlich auf Lymphozyten sowie auf natürliche Killerzellen und so die Immunantwort unterdrücken können [107, 108].

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihrer Multipotenz haben die MSCs wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung und Regeneration von verschiedenen Geweben. MSCs stellen somit eine vielversprechende Ressource für Zelltherapieansätze dar. Die aktuell untersuchten Therapieansätze basieren auf verschiedenen Eigenschaften von MSCs. In einigen zurzeit laufenden Studien wird ihr Erneuerungs- und Differenzierungspotential genutzt, um die Einsatzmöglichkeiten von MSCs in der regenerativen Medizin zu evaluieren. Vor allem zielen die Zelltherapieansätze mit MSCs auf die Behandlung von Knorpel- und Knochendefekten sowie z.B. die Unterstützung der Regeneration der Leber [109] und des Herzens [110-113]. Die Studien im transgenen Mausmodell sowie erste klinische Beobachtungen beim Menschen zeigten, dass die MSC-Transplantation zur Verbesserung des Krankheitsbildes der

Osteogenesis Imperfecta (OI) sowohl bei Tieren als auch bei Menschen führte [114]. Bei der OI handelt es sich um eine autosomal dominante, vererbte Erkrankung mit fehlerhafter Kollagen Typ I Synthese. Charakteristisch für OI sind die extreme Knochenbrüchigkeit, Knochendeformation und Wachstumsstörungen. Auch in einem osteoporotischen Tiermodell konnte gezeigt werden, dass durch die allogene Knochenmarktransplantation die Knochendichte wieder erhöht werden konnte [115]. In der Literatur wird auch vom positiven Einfluss der MSC-Gabe bei der Regeneration des Herzmuskelgewebes nach einem Herzinfarkt berichtet [110-113]. Die Entwicklung von Kardiomyozyten aus MSCs *in vivo* konnte jedoch nicht in ausreichender Zahl nachgewiesen werden. Daher vermutet man, dass die positiven Effekte von MSCs bei der Regeneration des geschädigten Herzgewebes möglicherweise nicht über ihre Differenzierung in gewebetypische Zellen, sondern über den parakrinen Weg vermittelt werden. Durch die Freisetzung von verschiedenen Angiogenese-fördernden Zytokinen und anti-apoptischen Faktoren können die MSCs positiv in regenerative Prozesse eingreifen [33, 104, 105].

Darüber hinaus sind die MSCs besonders aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften bei der Behandlung des sogenannten ‚*Graft versus Host Disease*‘ (GvHD) von großem Interesse. Bei der Transplantation von allogenen hämatopoetischen Stammzellen kommt es zu einer Reaktion gegen die Antigene der immunkompetenten Zellen des Donors, was lebensbedrohlich sein kann. Die Studien um Le Blanc *et al.* zeigten, dass die Anwendung von MSCs den schweren Verlauf von GvHD positiv beeinflussen kann [116-120].

Eine Gefahr, nämlich der mögliche Einfluss auf Tumorentwicklung und Wachstum, welche die Stammzell-Therapie beherbergt, wird kontrovers diskutiert. Möglicherweise ist dieser karzinogene Effekt von MSCs auf ihre immunsuppressiven Eigenschaften zurückzuführen. Bislang konnte allerdings keine eindeutig zuzuordnende Tumorentwicklung nach einer Stammzell-Transplantation nachgewiesen werden. Obwohl Rosland *et al.* in Langzeitkulturen mit MSCs eine spontane maligne Transformation beobachten konnten, wird heutzutage dennoch angenommen, dass MSCs sicher *in vitro* expandiert und für therapeutische Zwecke eingesetzt werden können [79, 121].

1.4.1 Mesenchymale Stammzellen und Osteoporose

Mesenchymale Stammzellen sind befähigt, sich zu knochenaufbauenden Zellen zu entwickeln und stellen somit eine primäre Ressource für die Regeneration von Knochengewebe dar. Daher werden die MSCs intensiv in Rahmen der Osteoporose untersucht. Ob die Veränderungen in den MSCs zur Entwicklung der Osteoporose beitragen, wird kontrovers diskutiert [110-113, 122-124]. Zudem geht im Alter und auch der bei der Osteoporose auftretende Knochenmasseverlust mit einer erhöhten Fettinfiltration im Knochenmark einher. Interaktionen zwischen Knochenmarkfett und Knochenzellen im Zuge einer Osteoporose sind bisher nicht ausreichend untersucht und weitere Studien werden benötigt.

Die mit dem fortschreitenden Knochenverlust assoziierte Akkumulation von Fettgewebe im Knochenmark gibt einen Hinweis auf die Verschiebung der Differenzierung im Knochenmark befindlicher lokaler MSCs zugunsten der adipogenen Differenzierung [119, 125, 126]. Die Arbeitsgruppe um Rodriguez *et al.* zeigte ein vermindertes osteogenes Differenzierungspotential von MSCs osteoporotischer Spender [124], wobei ihr adipogenes Differenzierungspotential deutlich gesteigert war [127]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die MSCs der osteoporotischen Spender deutlich weniger Kollagen Typ I bilden als die von nicht-osteoporotischen Patienten und somit zu einer gestörten Mineralisierung des Knochens führten [127]. Hingegen konnten Justesen *et. al* und Stenderup *et al.* keine Unterschiede bezüglich ihres Differenzierungs- und Mineralisierungsverhalten bei MSCs von Osteoporose-Patienten vs. gesunden Spendern nachweisen [122]. Ein gesteigertes adipogenes Differenzierungspotential von MSCs konnte auch im Osteoporose-Tiermodell beobachtet werden. Ovariectomierte Ratten [128] sowie SAMP6-Mäuse [129] zeigten eine verstärkte Knochenmark-Verfettung, assoziiert mit verminderter Knochenmasse und -qualität. Die verringerte Proliferation von MSCs osteoporotischer Spender konnte in weiteren Studien nachgewiesen werden [4, 123, 124]. Ein verändertes Proliferations- sowie Differenzierungsverhalten von MSCs, insbesondere das dominantere adipogene Differenzierungspotential, könnte daher im Rahmen der Osteoporose ein Indiz für die zugrunde liegende Pathophysiologie sein.

1.5 Knochenmark

Das Knochenmark umfasst das gesamte Weichgewebe, mit dem die Innenräume des Knochens gefüllt sind, dar. Das Knochenmark setzt sich aus dem rote Blutzellen bildenden Knochenmark und dem gelben Fettmark zusammen. Bei Neugeborenen finden sich in fast allen Knochen rotes Knochenmark, das allmählich während des Wachstums durch das gelbe Fettmark ersetzt wird. Dieser Prozess beginnt im Alter von 3-4 Jahren und ist im Alter von 25 Jahren weitgehend abgeschlossen. Bei Erwachsenen ist das rote Knochenmark nur noch in Rippen, Becken, Sternum, Schädel, Wirbelkörper und proximalen Femur vorzufinden. Das Gesamtvolumen des roten Knochenmarks hängt vom Alter, Geschlecht und der Art der pathologischen Prozesse ab. So beträgt das Gesamtgewicht des Knochenmarks in erwachsenen Menschen ca. 2-3 kg und besteht zu 10-15 % aus Zellen der erythropoetischen Linie, zu 30-45 % der myeloischen Linie und zu 40-60 % aus Fettzellen [130]. Mit zunehmendem Alter findet neben dem Rückgang des hämatopoetischen Marks [131] eine Zunahme des Fettmarkanteils statt, wodurch die Knochenverluste ausgefüllt werden. Bei Anämie, nach Blutverlust oder Chemotherapie sowie bei Leistungssportlern, kann das hämatopoetische Knochenmark mobilisiert werden, indem das Fettmark zu rotem Knochenmark umgebildet wird.

Die Hauptfunktion des Knochenmarks ist die Hämatopoese, zusätzlich agiert das Knochenmark auch als Blutdepot und kann im Falle eines Blutverlusts den gestiegenen Blutbedarf bis zu einem gewissen Maß decken. Das Knochenmark beherbergt die mesenchymalen Stammzellen und trägt somit zur Knochenneubildung und Knochenhomöostase bei. Des Weiteren ist das Knochenmark in verschiedenen immunologischen Prozessen sowie in den Mineral- und Energiestoffwechsel involviert.

1.6 Fettgewebe

Adipositas, gekennzeichnet durch extremes Wachstum des Fettgewebes, stellt neben der Osteoporose zunehmend ein gesellschaftliches Gesundheitsrisiko dar. Vor allem das stark ausgeprägte viszerale Fettgewebe gilt als starker Risikofaktor für die Entstehung z.B. kardiovaskulärer Erkrankungen oder Diabetes. Das Fettgewebe als eine Sonderform des retikulären Bindegewebes nimmt ca. 25 % der gesamten Körpermasse einer normalgewichtigen erwachsenen Person ein [132]. Man unterscheidet zwei Typen von Fettgewebe: Das hauptsächlich bei Neugeborenen vorkommende braune Fettgewebe, das mit zunehmendem

Alter an Bedeutung verliert und das weiße Fettgewebe. Dem braunen Fettgewebe wird eine wichtige Rolle bei der zitterfreien Thermogenese zugeschrieben. Während mit zunehmendem Alter das braune Fettgewebe abgebaut wird und weitgehend verschwindet, kommt es zu einer erhöhten Einlagerung von weißem Fettgewebe. Das weiße Fettgewebe ist stark vaskularisiert und setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen: Neben den reifen Fettzellen, den Adipozyten, finden sich im Fettgewebe Makrophagen, Fibroblasten, Mastzellen, Perizyten, mikrovaskuläre Endothelzellen und mesenchymale Vorläuferzellen. Je nach Lokalisation unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Fettgewebetypen. Dabei handelt es sich um viszerales Fettgewebe, subkutanes und muskuläres Fettgewebe, die unterschiedliche metabolische Aktivitäten und Funktionen aufweisen. Während muskuläres Fett intramuskulär liegt, befindet sich das subkutane Fett unmittelbar unter der Haut. Das metabolisch hoch aktive viszerale Fettgewebe liegt im abdominalen Bereich und umschließt die inneren Organe.

Die Rolle von Fettgewebe im Rahmen der Osteoporose wird kontrovers diskutiert. Lange Zeit wurde angenommen, dass das Fettgewebe stimulierend auf die osteoblastäre Proliferation wirkt und somit osteoprotektiven Einfluss ausübt [133]. Die aktuellen Studien zeigen aber, dass sich insbesondere das viszerale Fett negativ auf den Knochenstoffwechsel auswirkt und die Entwicklung einer Osteoporose begünstigen kann [134]. Anfänglich wurde die Hauptfunktion vom Fettgewebe als thermisch-mechanischer Isolator oder auch Speicherorgan betrachtet. Heutzutage wird das Fettgewebe als ein großes endokrines und immunologisches Organ angesehen. Insbesondere das viszerale Fettgewebe ist metabolisch hoch aktiv und sezerniert eine Vielzahl an proinflammatorischen Proteinen wie IL6, IL8, TNF α aber auch die Adipokine. Die adipozytären Sekretionsprodukte tragen bei Adipositas zu einem gewissen niedrig gradigen Entzündungszustand bei. Die chronisch erhöhten Entzündungsmediatoren bringen das RANKL/RANK/OPG System aus der Balance und führen somit zu einer gesteigerten Knochenresorption.

1.6.1 Adipozyten und adipogene Differenzierung

Der reife Adipozyt ist eine große Zelle mit einem Zelldurchmesser von bis zu 120 μm . Weitere Zellen der adipogenen Linie sind Adipoblasten, Präadipozyten und unreife Adipozyten. Reife Adipozyten besitzen ein zentrales Lipidtröpfchen (*droplet*), eine mit Triglyceriden gefüllte Fettvakuole, die 95 % der Gesamtzelle ausmacht. Die restlichen 5 %, stellt das metabolisch aktive Zytoplasma dar, in dem unter anderen auch Adipokine synthetisiert werden.

Genauso wie die Osteoblasten entwickeln sich die Adipozyten auch aus den mesenchymalen Stammzellen. Der Mechanismus der Zelldifferenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu reifen Adipozyten ist nicht vollständig verstanden. Während reife Adipozyten ausdifferenziert und nicht mehr zur Zellteilung befähigt sind, können mesenchymale Stammzellen und Adipozyten-Vorläuferzellen, die sogenannten Präadipozyten, weiterhin proliferieren und differenzieren – abhängig vom lokalen Mikromilieu. Die Adipogenese kann durch verschiedene Faktoren sowohl endokrin als auch parakrin stimuliert oder supprimiert werden [135]. Im Zuge der Adipogenese sind die Mitglieder zweier Familien von Transkriptionsfaktoren, die CCAAT/vermehrten Bindungsproteine (C/EBP) und die Peroxisom-Proliferations-aktivierten Rezeptoren Subtyp γ (PPAR γ /PPARG) [136], von essenzieller Bedeutung. Die Induktion der Adipogenese ist mit einer Expression von C/EBP β assoziiert, welcher die Induktion des Transkriptionsfaktors PPARG einleitet. Ebenfalls für die Induktion der Adipogenese ist die Expression des Transkriptionsfaktors C/EBP α erforderlich. PPARG ist ein früher Marker der Adipogenese und induziert die Expression von Proteinen wie LPL und *adipocyte fatty acid protein* (aP2), welche für die Aufrechterhaltung der Adipogenese wichtig sind [137-139]. Weiterhin ist *Insulin-like growth factor 1* (IGF1) ein essenzieller Regulator der Adipogenese und spielt mit Insulin zusammen eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung der MSCs [140]. Neben der Vielzahl sezernierter Wachstumsfaktoren und Hormonen wurde die Beteiligung der spezifischen Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen an der adipogenen Differenzierung beschrieben [141, 142].

In welche Richtung die mesenchymalen Stammzellen differenzieren, entscheidet das Verhältnis der adipogenen bzw. osteogenen Differenzierungs-induzierenden Faktoren. Die Expression der Faktoren, welche die Adipogenese initiieren, ist mit der Suppression der osteogenen Induktor Gene verbunden und umgekehrt [143]. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Verlagerung der Balance zu Gunsten der Adipozyten mit verstärkter Verfettung des Knochenmarks. Inwiefern das Gesamtkörperfett und der Fettgehalt des Knochenmarks in Zusammenhang stehen und die Entwicklung einer Osteoporose beeinflussen, ist bisher nicht eindeutig geklärt [6].

1.6.2 Adipokine

Nach der Entdeckung von Leptin und weiterer adipozytärer Sekretionsfaktoren, rückte das Fettgewebe als parakrines, autokrines und immunmodulatorisches Organ immer mehr in den

Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Zu den vom Fettgewebe sezernierten Faktoren gehören unter anderem Adipokine, auch Adipozytokine genannt. Ursprünglich umfasste der Begriff Adipokin ausschließlich von Adipozyten freigesetzte bioaktive Proteine, wohingegen die Bezeichnung Adipozytokin umfassender ist und alle vom Fettgewebe sezernierten bioaktiven Substanzen einschließt. Zu den Adipokinen gehören unter anderem Leptin, Adiponektin, Chemerin, Visfatin, Resistin, Lipocalin 2 und Omentin. Heutzutage weißt man, dass außer Adipozyten auch andere Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, Osteoblasten und Chondrozyten zur Synthese dieser Adipokine befähigt sind. Einige der Adipokine spielen nicht nur eine Rolle bei metabolischen Erkrankungen, wie z.B. Typ 2 Diabetes, sondern auch bei chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen mit Einfluss auf die Knochenhomöostase.

1.6.2.1 Leptin

Leptin ist ein im Jahr 1994 entdecktes Peptidhormon, das viele verschiedene Funktionen im Organismus ausübt. Das Molekulargewicht von Leptin beträgt 16 kDa und wird vom sogenannten ‚*obese*‘-Gen (*ob/ob*) kodiert. Es wird vornehmlich von Adipozyten produziert und daher als Adipozytokin klassifiziert. Allerdings sind auch andere Zelltypen zur Synthese von Leptin befähigt. Zudem weist Leptin IL6-familienähnliche Strukturen und funktionelle Eigenschaften auf. Der vom griechischen Wort ‚*eptos*‘ (mager, dünn) abgeleitete Name von Leptin deutet auf seine zuerst entdeckte Funktion, nämlich auf die Hemmung der Nahrungsaufnahme hin. Das vom Fettgewebe gebildete Leptin wird ins Blut abgegeben und wirkt über die Leptinrezeptoren in hypothalamischen Kernen hemmend auf die Sekretion von Neuropeptid Y (NPY), dessen physiologische Funktion die Stimulation der Nahrungsaufnahme ist [144]. Die Leptinkonzentration im Serum korreliert positiv mit der Menge an vorhandenem Fettgewebe [145].

Bei der Entdeckung des Leptins spielte ein Experiment mit übergewichtigen (*ob/ob*) Mäusen eine Rolle, die aufgrund einer Mutation kein funktionelles Leptin produzieren konnten, [146, 147]. Die Mäuse wiesen eine erhebliche Fettleibigkeit auf. Leptin erreicht seine biologische Effektivität über die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren (OB-R), die aus alternativem Splicing aus einem *db*-Gen-Transkript entstehen. Der Leptinrezeptor existiert in 6 verschiedenen alternativen Splice-Varianten. Jede Isoform besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer variablen intrazellulären Domäne. Die Isoformen werden in 3 Klassen eingeordnet: kurz, lang und sezerniert. Nur die lange Isoform

des Leptinrezeptors wurde als funktioneller Rezeptor beschrieben. Er besitzt eine hoch konservierte intrazelluläre Domäne und weitere zur Signalweiterleitung in die Zielzelle erforderlichen Motive [148, 149]. Die Bindung von Leptin an Leptinrezeptoren führt zur Homodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten und initiiert damit die Signaltransduktion [150, 151]. Letztere erfolgt über verschiedene Kinase-vermittelte Signalwege. Vor allem wird sie über *Signal-transducer-and-activator-of-transcription-3* (STAT-3), Phosphoinositol-3-Kinase (Pi3K), p38- und andere Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK) vermittelt [152]. Leptinrezeptoren werden im peripheren Gewebe stark exprimiert, woraus man schließen kann, dass Leptin direkten Einfluss auf physiologische Vorgänge unabhängig vom zentralen Nervensystem nehmen kann [153-155].

Außer der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushalts ist Leptin in viele metabolische, neuroendokrine, reproduktive und hämatopoetische Prozesse involviert [156, 157]. Immunmodulatorische Funktionen von Leptin sind ebenfalls gut beschrieben. Der Einfluss von Leptin konnte auf Zellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems nachgewiesen werden [152]. Vor allem zeichnen sich Monozyten und Makrophagen durch eine besonders hohe Leptinrezeptor-Dichte aus [158, 159]. Patienten mit Leptinrezeptor-Defekten sind adipös und haben ein defizitäres Immunsystem. Die Lymphozyten dieser Patienten weisen reduzierte Proliferationsraten sowie die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen auf [160, 161].

Die Zugabe von Leptin *in vitro* bewirkte eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und die Synthese proinflammatorischer Zytokine in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie in humanen Monozyten und Makrophagen [162-165]. Der Einfluss von Leptin in inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. experimenteller Arthritis sowie im Kolitismodell, konnte nachgewiesen werden. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen ist der Leptinspiegel bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) sowohl lokal im Gelenk in der Synovialflüssigkeit als auch in Serum erhöht. Im Kolitismodell konnte gezeigt werden, dass eine Leptindefizienz die Mäuse weitgehend vor der Entwicklung einer Kolitis schützt. Zusätzliche Supplementierung von Leptin führte jedoch zur Induktion von Entzündungen bei diesen Tieren [146, 166].

Über die Rolle von Leptin bei der Knorpel- sowie Knochenhomöostase wird kontrovers diskutiert: es konnte sowohl katabole als auch anabole Eigenschaften von Leptin in verschiedenen Studien gezeigt werden [167-169]. Chondrozyten und Osteoblasten sind in der

Lage, sowohl Leptin als auch Leptinrezeptoren zu exprimieren. Während im gesunden Knorpel die Chondrozyten geringe Mengen an Leptin produzieren, konnte im arthrotischen Knorpel und in Osteophyten eine verstärkte Synthese von Leptin durch Chondrozyten bzw. Osteoblasten beobachtet werden. Die Stimulierung von Chondrozyten mit Leptin führte zu einer verstärkten Proliferation und Induktion der Expression von IGF1 und TGF β , was wiederum mit einer wachsenden Proteoglykan-Synthese assoziiert war. Somit übte Leptin einen protektiven Effekt im Kontext von Arthrose aus [168]. Andererseits beschrieben Otero *et al.* 2005 einen katabolen Effekt von Leptin auf den Gelenkknorpel, indem das Protein synergistisch mit IFN γ die Stickoxidsynthese in Chondrozyten induziert [167, 169].

Ausschlaggebend bei der Diskussion um die Rolle von Leptin im Knochenstoffwechsel waren die Beobachtungen, dass adipöse Frauen nach der Menopause weit weniger an Osteoporose erkrankten als normal- bzw. untergewichtige Frauen. Verschiedene klinische Studien zeigten eine positive Korrelation zwischen Körpergewicht und Knochenmineraldichte. Die Frage, ob Leptin direkt in den Knochenstoffwechsel eingreift oder indirekt über eine erhöhte mechanische Belastung, lässt sich aus klinischen Studien allein nicht beantworten.

Die Beobachtungen an den (ob/ob) als auch Leptinrezeptor-defizienten (db/db) Mäusen zeigten, dass zwei Wirkungsweisen von Leptin denkbar wären. Leptin-defiziente sowie Leptinrezeptor-defiziente Mäuse waren massiv adipös und wiesen eine erhöhte Knochenmineraldichte auf [147]. Die Injektion von Leptin in den dritten Ventrikel von ob/ob-Mäusen und Wildtyp-Mäusen führte in den Experimenten zu einem massiven Knochenverlust. Es legt nahe, dass Leptin indirekt, über das ZNS, Einfluss auf die osteoblastäre Aktivität nimmt und somit katabolisch wirkt [147]. Einige Studien beschrieben jedoch einen anabolen Einfluss von Leptin auf den Knochenstoffwechsel, da Leptin-stimulierte Osteoblasten *in vitro* eine gesteigerte Mineralisierungsaktivität zeigten [170]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass in Anwesenheit von Leptin das osteogene Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen reduziert und zu Gunsten der adipogenen Differenzierung verschoben war [171].

Somit ist die Rolle von Leptin in der Knochenhomöostase nicht eindeutig geklärt. Im Rahmen dieses Projekts sollte daher der Einfluss von Leptin während der adipogenen sowie osteogenen Differenzierung von MSCs mit dem Fokus auf den Knochenumbau untersucht werden.

1.6.2.2 Resistin

Resistin ist ein 12,5 kDa großes Protein und gehört zur RELM (*resistin-like molecules*) Familie. Den Namen Resistin erhielt das Adipokin aufgrund des Zusammenhangs von Resistin mit Insulinresistenz [172]. Anfänglich wurde angenommen, dass Resistin hauptsächlich von Adipozyten produziert wird, da die Entdeckung von Resistin im Mausmodell mit seiner Beteiligung an der adipogenen Differenzierung verbunden war. In erwachsenen Menschen wird Resistin aber kaum von Adipozyten, sondern hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sezerniert, was auf seine Rolle in Entzündungsprozessen hindeutet [173]. Im Serum kommt Resistin in zwei komplexen Isoformen als Hexamer, oder Dimer vor [172]. Der Resistin-Serumspiegel beim gesunden Menschen beträgt etwa 7 bis 22 ng/ml. Bei Patienten mit Diabetes oder Adipositas ist er jedoch deutlich erhöht. Auch ist die Resistin-Konzentration in der Synovialflüssigkeit sowie im Serum von RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten erhöht [174]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Resistin durch entzündungsfördernde Zytokine hochreguliert wird. Zudem induziert Resistin die Produktion von TNF α , IL6, IL12, IL1 β und wirkt auch selbststimulierend. Im murinen Versuchsmodell konnte durch lokale Injektion von Resistin in den Gelenkspalt eine Synovitis induziert werden [175, 176]. Mu *et al.* zeigten die angiogene Wirkung von Resistin auf Endothelzellen [177]. Dies alles lässt darauf schließen, dass Resistin ein proinflammatorisches Potenzial besitzt [178]. Höhere Konzentrationen von Resistin konnten auch im Knochenmark nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Rolle von Resistin im Knochenstoffwechsel hindeutet. Die Knochenzellen sind zudem zur Expression von Resistin befähigt und reagieren proliferativ auf die Stimulierung mit Resistin. Gleichzeitig reguliert Resistin die Anzahl an differenzierten Osteoklasten. Aufgrund der immunmodulatorischen Funktionen und dem beschriebenen Einfluss im Knochenumbau wurde Resistin in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.6.2.3 Visfatin

Visfatin ist ein im Jahr 1994 entdecktes Zytokin mit der zuerst beschriebenen Funktion als Wachstumsfaktor für nicht aktivierte B-Zellen. Daher wird Visfatin auch als PBEF (*pre-B cell colony-enhancing factor*) bezeichnet [179]. Aufgrund seiner enzymatischen Funktion als Nikotinamid-Phosphoribosyltransferase, ist Visfatin ebenfalls unter dem Namen Nampt bekannt. Nampt ist bei Säugetieren ein Schlüsselenzym bei der Nicotinamidadenindinukleotid-(NAD) Biosynthese, während es in niederen Eukaryonten, wie Hefezellen und wirbellosen

Tieren fehlt. NAD ist in vielen wichtigen intrazellulären Prozessen, wie dem Energiestoffwechsel, der Mitochondrienfunktion, der Calcium-Homöostase, der Genexpression, der Immunfunktion und der Alterung sowie dem Zelltod [180] involviert. Die katalytische Funktion von Visfatin wird durch seine homodimere Struktur vermittelt. Das Protein Visfatin setzt sich aus 491 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 55 kDa. Man unterscheidet zwischen zwei strukturellen Untereinheiten, den 19 β -Faltblatt- und 13 α -Helix-Strukturen, welche zusammen das aktive Zentrum dieses Coenzym bilden [181, 182]. Eine Zeit lang wurde angenommen, dass Visfatin hauptsächlich in viszeralem Fett gebildet wird. Heutzutage ist jedoch bekannt, dass Visfatin als Protein nicht ausschließlich im Fettgewebe, sondern auch in verschiedenen Organen exprimiert wird. Im peripheren Blut konnte in Granulozyten und Monozyten die höchste Visfatin-Expression nachgewiesen werden [183].

Revollo *et al.* beschrieben eine intra- und eine extrazelluläre Form von Visfatin bei Säugetieren [184]. Die höchste Expression von intrazellulärem Visfatin wurde in braunem Fettgewebe, Leber und Niere nachgewiesen. Im weißen Fettgewebe sowie in Lunge, Milz, Hoden und Muskulatur war die Visfatin-Expression dagegen niedrig. Nahezu keine Expression von extrazellulärem Visfatin konnte im Gehirn und in der Bauchspeicheldrüse gemessen werden. Die extrazelluläre Form wird fast ausschließlich in differenzierten Adipozyten des weißen Fettgewebes freigesetzt [184]. In diese Studien wurden jedoch keine vergleichenden Expressionsanalysen von subkutanen und viszeralen Fettgeweben hinsichtlich der Visfatin-Expression durchgeführt.

Über den Mechanismus, wie Visfatin sezerniert wird, ist wenig bekannt. Anfänglich wurde vermutet, dass die Sekretion über Zellyse oder Zelltod vermittelt wird, was aber durch Ravolo *et al.* widerlegt werden konnte [185]. Kover *et al.* zeigten, dass die Freisetzung von Visfatin, ähnlich wie die Insulinsekretion, Glukose und eine Membran-Depolarisation benötigt [186]. Die Visfatin-Expression wird durch pathophysiologische Zustände verstärkt. Zum Beispiel sind bei der RA erhöhte Visfatin-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit als auch in Serum nachweisbar [174, 187]. Zudem konnte eine positive Korrelation zwischen Visfatinspiegel und dem Schweregrad des Krankheitsverlaufs der RA durch Brentano *et al.* gezeigt werden [188].

Über Visfatin-vermittelte Signalwege wird derzeit kontrovers diskutiert. Bisher ist kein spezifischer Rezeptor für Visfatin bekannt [189]. Fukuhara *et al.* beschrieben Insulin-mimetische Wirkungen von Visfatin sowie die Bindung an Insulinrezeptoren mit Insulin-ähnlicher Aktivierung des Insulinrezeptor-Substrats 1 und 2 (IRS-1/IRS-2) [190]. Außerdem

stellten sie fest, dass Visfatin positiv mit dem viszeralen Fett korrelierte und leiteten daher den Name Visfatin ab. Aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Folge-Studien und der durch das ‘*Committee for Research Integrity of Osaka University Graduate School of Medicine*’ aufgedeckten Mängel bei der Untersuchung der Visfatin-Insulin-Rezeptor-Interaktion musste diese Studie allerdings zurückgezogen werden. Der Name Visfatin bleibt aktuell jedoch bestehen. Zudem beschrieben im Jahr 2010 Brown *et al.*, dass Visfatin den Insulinrezeptor und dessen Signalkaskade der MAP-Kinasen ERK1 und -2, nicht jedoch die MAP-Kinase p38 aktiviert [191]. Meier *et al.* konnten zudem eine Visfatin-induzierte Aktivierung der p38 MAP-Kinase in synovialen Fibroblasten von RA Patienten (RASf) zeigen [192]. Ein Insulin-mimetischer Effekt durch die Aktivierung des Insulinrezeptors ist nach aktueller Datenlage dagegen nicht belegbar. Eine neue, vielversprechende Theorie beschreibt einen indirekten, über seine enzymatische Funktion vermittelten Einfluss von Visfatin auf die Glukosehomöostase [193].

Neben der Rolle in der Glukosehomöostase und seiner enzymatischen Funktion, wird dem Visfatin auch eine immunmodulatorische Funktion zugeschrieben. Durch die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen (APC) sowie durch die erhöhte Expression kostimulierender Oberflächenmoleküle und den proliferativen Effekt auf B-Lymphozyten wirkt Visfatin immunregulierend [179, 194]. Visfatin ist in der Lage, die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL1, IL6, TNF) in Monozyten sowie in Chondrozyten und RASf zu induzieren [178, 192, 195]. Zudem wirkt Visfatin antiapoptotisch, indem es Tumorzellen, Fibroblasten und Neutrophile vor Apoptose schützt [196]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird Visfatin ein destruktiver Einfluss im Kontext der chronisch-entzündlichen Erkrankungen sowie bei Tumoren zugesprochen. Auf welchen pathophysiologischen Mechanismen diese Wirkung beruht, ist nicht vollständig verstanden und stellt sich als Gegenstand aktueller Studien dar.

Auch in nicht chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie der OA, spielt Visfatin eine Rolle: die Expression von Visfatin konnte in Osteophyten als auch durch Chondrozyten im OA-Knorpel nachgewiesen werden [195, 197]. Visfatin zeigte einen katabolen Effekt auf OA-Chondrozyten und induzierte die Expression von MMP3, MMP13 sowie von ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase*) 4 und 5.

Über die Rolle von Visfatin in der Knochenhomöostase gibt es widersprüchliche Ansichten und die Aufklärung bedarf weiterer Untersuchungen. Xi *et al.* zeigten, dass die Bindung von Visfatin an Insulinrezeptoren von Osteoblasten stimulierend auf die Proliferation dieser Zellen

wirkte und auch die Expression von Kollagen Typ I verstärkte [198]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Visfatin während der osteogenen Differenzierung stark exprimiert wird [199]. Ein erhöhter Level von Visfatin konnte in Tumorzellen gemessen werden, wodurch der erhöhte NAD-Bedarf der metabolisch hochaktiven Krebszellen gedeckt wurde. Van Rhee *et al.* zeigten eine positive Korrelation des erhöhten Visfatinspiegels mit gesteigerter osteoklastärer Aktivität im Knochengewebe von Patienten mit multiplen Myelom [200]. Die Behandlung mit dem Visfatin-Inhibitor Apo866 führte zur Apoptose der multiplen Myelom-Zellen, inhibierte die Fusion der Osteoklasten-Vorläufer und die resorptive Aktivität der reifen Osteoklasten [200]. Andere Studien hingegen demonstrierten einen supprimierenden Effekt von Visfatin auf die Osteoklasten-Formation [201].

Im Rahmen des Transregio 79 (TRR79) wurde in Kooperation die Adipokin-Expression in der Spongiosa aus osteoporotischem Knochen nach Fragilitätsfraktur im Vergleich zu OA-Knochen verglichen. Parallel wurden die Proben mittels Mikro-Computertomografie (μ CT) untersucht, um den Osteoporose-Status des Gewebes zu ermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass Adipokine differenziell in durch Fragilitätsfrakturen gekennzeichnetem Knochen vs. OA-Knochen reguliert werden [202]. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde der Einfluss von Visfatin, Resistin und Leptin während der osteogenen und adipogenen Differenzierung in diesem Verbundprojekt und in der vorgelegten Arbeit untersucht.

2 Zielsetzung

Der altersbedingte Knochenverlust bei Osteoporose korreliert mit der erhöhten Fettinfiltration im Knochenmark, was eine Folge der Verschiebung des Differenzierungspotentials von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in Richtung adipogene Differenzierung ist. Über die Interaktionen zwischen Fett- und Knochengewebe ist nicht viel bekannt. Früher wurde angenommen, dass Übergewicht vor Osteoporose schützen würde. Diese Annahme wird zunehmend durch aktuelle Studien widerlegt. Die adipozytären Sekretionsprodukte, Adipokine, werden differenziell in osteoporotischen Knochen exprimiert, was auf ihre mögliche Rolle bei dem Knochenumbau hinweist. Es ist jedoch unklar, welche Rolle diese Botenstoffe bei der Differenzierung von MSCs und im Zuge des veränderten altersbedingten Knochenumbaus spielen.

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Adipokinen während der adipogenen und osteogenen Differenzierung der MSCs mit dem Fokus auf Matrixumbau und Entzündung zu untersuchen. Dabei wurde auf folgende Aspekte geachtet:

- Einfluss von Adipokinen auf das Differenzierungspotential von MSCs
- Analyse der Adipokineffekte während der adipogenen sowie osteogenen MSC-Differenzierung auf die Expression von Matrix-degradierenden Enzymen (MMPs) und ihren Inhibitoren (TIMPs)
- Effekte von Adipokinen auf das Differenzierungspotential von MSC unter Standard-Zellkulturbedingungen im Vergleich zur autologen Spongiosa
- Wirkung von Adipokinen während der adipogenen sowie osteogenen MSC-Differenzierung auf die Expression von Matrix-degradierenden Enzymen (MMPs) und ihren Inhibitoren (TIMPs) in Gegenwart autologer Spongiosafragmente
- Analyse der involvierten Signalwege in den identifizierten Visfatin-vermittelten Effekten

Durch die Experimente sollten neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der MSC-Differenzierung hinsichtlich der Entwicklung der Osteoporose mit Hauptaugenmerk auf die Adipokine gewonnen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Tab.1 Verwendete Zellen

Bezeichnung	Hersteller
Primäre humane MSCs von Patienten mit OA	Aus humanen Hüftköpfen nach Gelenkersatzoperationen gewonnen
Normale humane MSCs (gesund)	Lonza, Allendale, USA

3.1.2 Chemikalien

Tab.2 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Alizarin-Rot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
a MEM Glutamax	Gibco, Carlsbad, CA, USA
5x AMV-Puffer	Promega, Mannheim
Antibiotikum/ Antimykotikum	PAA GE Healthcare, Chicago
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Glycerolphosphat	Merck, Darmstadt
β -Mercapto-Ethanol	Merck-Schüchhardt, Hohenbrunn
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe

Tab.2 Fortsetzung

Bezeichnung	Hersteller
FCS (fötale Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gel-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	GE Healthcare, Chicago
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IST (Insulin-Transferrin-Sodium)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MEM (<i>Modified Eagles Medium</i>), HEPES, GlutaMax™ (Gibco®)	Life Technologies, Darmstadt
MSCGM human Mesenchymal Stem Cell Growth BulletKit™ Medium	Lonza, Basel, Switzerland
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-EDTA	Roth, Karlsruhe
Natrium-Fluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	GE Healthcare, Chicago
PCR-Nucleotidmix	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicilin/ Streptomycin	GE Healthcare, Chicago
physiologische NaCl-Lösung, 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<i>Random primer</i> p(DN)6 (2 µg/µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase-freies destilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Applied Biosystems, Darmstadt
RNasin (RNase-Inhibitor)	Promega, Mannheim
Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
SDS (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)	Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe

Alle nichtgenannten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen.

3.1.3 Plastikwaren und sonstige Materialien

Tab.3 Verwendete Plastikwaren und sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
15 und 50 ml Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
25 und 75 cm ² -Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
5100 <i>Cryo 1°C Freezing Container</i>	Nalgene/ Fisher Scientific, Schwerte
6-/ 12-/ 24-Lochplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Adhäsions-Objektträger Superfrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Amersham Hyperfilm TM ECL	GE Healthcare, München
Einfrierröhrchen (Cryo.s TM)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Erlenmeyerkolben (nicht adhäsiv)	Corning, Amsterdam, Niederlande
<i>Extra thick Blotting Paper</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Immobilon Transfer Membran	Millipore, Bedford, USA
Lab Tek <i>Chamber slides</i> (Kammer-Objektträger, 4-/ 8-Kammern)	Nalge Nunc International, Langenselbold
<i>LightCycler</i> Kapillaren (20 µl)	Roche Diagnostics, Mannheim

3.1.4 Medien und Lösungen

Tab.4 Verwendete Medien und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile
Adipogenes Differenzierungsmedium	a-MEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 0,2 mM Indomethacin, 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin, 5 µg/ml Insulin-Transferrin-Sodium 1 µM Dexamethason; je frisch angesetzt
Alizarin-Rot-Lösung	0,25 g Alizarin-Rot in 12,5 ml dH ₂ O lösen, mit 1 M HCL pH 4,2 einstellen
Einfriermedium	FCS, 10 % DMSO, Lagerung 1 Woche 4°C
Eosin-Lösung	1 % Eosin, dH ₂ O; filtrieren, dunkel lagern; vor Gebrauch einige Tropfen 96 %ige Essigsäure zugeben
Hämatoxylin-Lösung	0,1 % Hämatoxylin, 0,2 g/l Natriumjodat, 50 g/l Kaliumaluminium-sulfat; vollständig in dH ₂ O lösen; 50 g/l Chloralhydrat, 1 g/l Zitronensäure; filtrieren, dunkel lagern
MSC-Medium	a-MEM, 20 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin
Osteogenes Differenzierungsmedium	a-MEM, 10 mM β-Glycerolphosphat, 0,06 mM Ascorbinsäure, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 0,01µM Dexamethason; je frisch angesetzt
Oil Red O Stammlösung	100 ml 99 %iges Isopropanol (auf 60 °C erwärmt) 0,5 g Oil Red O
Oil Red O Gebrauchslösung	30 ml Stammlösung + 20 ml Aqua dest
RNA-Lysepuffer	RLT-Puffer aus RNeasy Midi Kit; Qiagen, Hilden, Zugabe von 10 µl β-Mercapto-Ethanol pro 1 ml des Puffers

3.1.5 Enzyme

Tab. 5 Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	GE Healthcare, Chicago
<i>AMV Reverse Transcriptase</i>	Promega, Mannheim
DNase 1	Fermentase, St Leon-Rot
RNase A	Fermentas, St Leon-Rot
Trypsin (5 g/l) / EDTA (2 g/l)	GE Healthcare, Chicago

Tab.6 Verwendete Proteine

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
humanes Leptin	10 ng/ml	BioVendor, Heidelberg
humanes Resistin Dimer	20 ng/ml	PeptoTech, Rocky Hill, USA
humanes Visfatin	100 ng/ml	BioVendor, Heidelberg

3.1.6 Molekularbiologische und immunologische Kits

Tab.7 Verwendete molekularbiologische und immunologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix</i>	Thermo Scientific, Schwerte
<i>Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human CXCL1/Gro-alpha Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human IL-6 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Rneasy Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Rnase-free Dnase Set</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Taq PCR Master Mix Kit</i>	QIAGEN, Hilden

3.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Primer, bezogen von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, wurden mit entionisiertem dH₂O gelöst und jeweils eine Arbeitskonzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Tab.8a Oligonukleotide (selbst entworfen)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	MgCl ₂ (mM)	T _m (°C)
18s fw 18s rev	CGGCTACCACATCCAAGGAA GCTGGAATTACCGCGGCTGC	3,0	50-65
ALP fw ALP rev	CAAGCACTCCCCTTCATCT GTTGTTCTGTTCAGCTCGT	3,5	57
OCN fw OCN rev	CTTCTTTCTCTTCCCCTTG CCACAGATTCTCTTCTGGA	4,0	55
OPG fw OPG rev	AGATGTCCAGATGGGTTCTT TGAGTTAGCAGGAGACCAAA	6,0	57
RunX2 fw RunX2 rev	TCACAAATCCTCCCCAAGTA GGCGGTCAGAGAACAACATA	3,5	57

Tab.8b Oligonukleotide (bezogen von der Firma Qiagen)

Bezeichnung	Qiagen ID	MgCl ₂ (mM)	T _m (°C)
Leptin	QT00030261	3,0	60
MMP2	QT00088396	3,0	55
MMP13	QT00001764	3,0	49
TIMP1	QT00084168	3,5	55
TIMP2	QT00017759	3,5	53
Koll. I	QT00037793	3,0	55
PPARG	QT00029841	3,5	55

3.2 Methoden

3.2.1 Geräte und Software

Tab.9 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Kombiniertes Einbettssystem EG 1150 (Paraffinausgießstation und Kühlplatte)	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DMI 6000 B (Mikroskop)	Leica Microsystems, Wetzlar
LEICA DFC 295 (polychrome Kamera)	Leica Microsystems, Wetzlar
LEICA DFC 345 FX (monochrome Kamera)	Leica Microsystems, Wetzlar
Sunrise ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Nano-Drop	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Light Cycler 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
LC Carousel Centrifuge 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg
Optimax X-Ray Film Prozessor	Protec Medizintechnik GmbH & CoKG, Steinheim
Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories, München

Tab.10 Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Leica Application Suite V4.0.0	Leica Microsystems, Wetzlar
Light Cycler Software 3.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Magellan 5	Tecan, Crailsheim

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Gewebeentnahme

Die Entnahme der humanen Knochengewebe erfolgte im Rahmen von Gelenkersatzoperationen in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie des Markuskrankenhauses in Frankfurt. Die Einverständniserklärung, um das Gewebe zu Forschungszwecken verwenden zu dürfen, wurde seitens der Patienten nach Aufklärung unterschrieben. Die Genehmigung zur Verwendung des Patientenmaterials lag für diese Arbeit durch die Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Gießen (74/05) vor.

Die Gewebe stammten von Patienten mit einer Coxarthrose. Patienten mit Diabetes, Nierenerkrankungen oder mit anderen, Erkrankungen, die mit der Knochenhomöostase interferierenden, wurden von der Studie ausgeschlossen. Ebenfalls war die Einnahme von Medikamenten, wie z.B. Glucocorticoiden, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen könnten, ein Ausschlusskriterium.

3.2.2.2 Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Für die Isolation der primär humanen mesenchymalen Stammzellen (phMSCs) wurden Hüftköpfe aus Hüftgelenkersatzoperationen verwendet. Diese wurden mittels einer Säge zerteilt, um aus dem spongiösen Knochen ca. 2 cm Stücke herauszutrennen. Dabei wurde die äußere, harte Schicht der Knochen, die Kortikalis, entfernt, um eine Kontamination mit anderen Zellen zu vermeiden. Die entnommenen Knochenstücke wurden in eine 75 cm²-Zellkulturflasche gegeben und mit 12 ml MSC-Medium überschichtet. Innerhalb von 7 bis 10 Tagen wuchsen die humanen phMSCs aus den Knochenstücken heraus. Die Kultivierung der MSCs erfolgte bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 10 %. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt, wobei die Zellen vorher mit PBS gewaschen wurden, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen entweder passagiert oder für spätere Experimente eingefroren.

3.2.2.3 Kultivierung von gesunden humanen mesenchymalen Stammzellen

Die gesunden humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) wurden bei der Firma Lonza (Basel, Schweiz) erworben. Bei Lieferung lagen die Zellen in Passage 2 eingefroren vor. Die hMSCs wurden entweder direkt im flüssigen Stickstoff bis zur weiteren Verwendung überführt oder aufgetaut und in Kultur genommen. Das Wachstumsmedium (MSCG-Medium) wurde ebenfalls von der Firma Lonza bereitgestellt und entsprechend Herstellerangaben vorbereitet. Die Kultivierung von hMSCs erfolgte bei 37°C, 10 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium gewechselt.

3.2.2.4 Passagieren von MSCs

Vor dem Passagieren der hMSCs/phMSCs wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 5-8 min mit 3 ml Trypsin/EDTA oder Accutase bei 37°C zum Ablösen der Zellen. Die Reaktion wurde mit 10 ml vorgewärmtem MSC-Medium gestoppt. Anschließend folgte die Zentrifugation für 10 min bei 300 xg. Das Zellpellet wurde in MSC-Expansionsmedium aufgenommen und die benötigte Zellzahl in Zellkulturgefäße ausgesät. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.2.5 Kryokonservierung von MSCs

Für die langfristige Lagerung wurden die hMSCs/phMSCs in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei einer Konfluenz von ca. 90 % abgelöst und bei 300 xg für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 4 ml vorgekühltem Einfriermedium (siehe Tab. 4) resuspendiert, je 2 ml in 2 Einfrierröhrchen gegeben und diese in eine Einfrierbox überführt, um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten. Nachdem die Zellen über einen Tag bei -80°C gekühlt wurden, folgte die Überführung in flüssigen Stickstoff (-196°C) für die Langzeitlagerung.

3.2.2.6 Auftauen von MSCs

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtes MSC-Medium gegeben und bei 300 xg für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in zwei ml Medium resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche, in der zuvor 10 ml MSC-Medium vorgelegt wurden, überführt. Um verbliebenes DMSO zu entfernen, wurde nach ca. 24 h ein Mediumwechsel vorgenommen.

3.2.2.7 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zählkammer besteht aus vier Quadraten, welche nacheinander ausgezählt werden und anschließend der Mittelwert gebildet wurde. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl aus den 4 Quadraten} \times 10^4$$

3.2.2.8 Osteogene Differenzierung von MSCs

Für die osteogene Differenzierung wurden 4 x 10⁴ hMSCs bzw. phMSCs pro 9,6 cm² in Zellkulturplatten zur RNA-Isolation und Proteinmessungen im Überstand ausgesät. Zusätzlich wurden Zellen auf 8- bzw. 4-Kammer-Objekträgern für zytochemische Färbungen in entsprechendem Kulturmedium ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht adhärent wurden, wurde das Wachstumsmedium durch osteogenes Differenzierungsmedium ersetzt (1,5 ml). Die Zellen befanden sich in Passage 3 zu Beginn des Experiments. Die osteogene Differenzierung erfolgte über 21 Tage unter konstanter Zugabe der Adipokine. Medienwechsel sowie die Zugabe der Stimulanzen erfolgten alle 2-3 Tage. Eine unstimulierte Kontrolle wurde stets mitgeführt. Die Abnahme der Zellkulturüberstände (ZKÜ) sowie die Herstellung der RNA-Lysate wurden am Tag 2, 7, 14 und 21 nach Beginn der Differenzierung durchgeführt. Die Lagerung von ZKÜ bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C. Die RNA-Lysate wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2.9 Adipogene Differenzierung von MSCs

Für die adipogene Differenzierung wurden die hMSCs/phMSCs mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro $9,6 \text{ cm}^2$ in Zellkulturplatten ausgesät und 1,5 ml Medium hinzugegeben. Die Adhäsion fand im Wachstumsmedium über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium durch adipogenes Differenzierungsmedium ersetzt. Die Zellen befanden sich in Passage 3 zu Beginn des Experiments. Die adipogene Differenzierung erfolgte über 21 Tage unter konstanter Zugabe der Adipokine. Medienwechsel sowie die Zugabe der Stimulanzen fanden alle 2-3 Tage statt. Als Kontrolle dienten die in adipogenem Differenzierungsmedium kultivierten hMSCs/phMSCs ohne Zugabe der Adipokine. Die Abnahme der ZKÜ sowie Zellyse zur Isolation von RNA wurden am Tag 2, 7, 14 und 21 nach der Induktion der Adipogenese durchgeführt. Die Lagerung von ZKÜ bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20°C . Die RNA-Lysate wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2.10 Kostimulation von MSCs während der adipogenen Differenzierung

Die MSCs wurden wie im Abschnitt 3.2.1.9 in Zellkulturplatten ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht adhären wurden, wurde die adipogene Differenzierung induziert. Parallel zur Supplementierung von Visfatin erfolgte die Kostimulation mit den Inhibitoren von Visfatin (APO866), p38-MAPK (SB203580) bzw. ERK1/2 (SCH772984). Die Behandlung mit Visfatin- und ERK1/2-Inhibitoren erfolgte durchgehend über 21 Tage, während der p38-MAPK-Inhibitor zwei Tage vor dem jeweiligen Analysezeitpunkt zugegeben wurde, um den einen gegebenenfalls toxischen Effekt von SB203580 zu vermeiden. Medienwechsel sowie die Zugabe der jeweiligen Stimulanzen erfolgte alle 2-3 Tage. Die Abnahme der ZKÜ sowie die Zellyse fanden wie bereits beschrieben am Tag 2, 7, 14 und 21 statt. Die Komponenten sowie die Bedingungen der Stimulierung sind in Tab.11 aufgeführt.

Tab.11 Schema der Stimulierung von hMSCs/phMSCs mit Visfatin, Apo866, SCH772984 und SB203580 während der adipogenen Differenzierung

Bezeichnung	Medium: Adipogenes Differenzierungsmedium (ADM)
Negativ-Kontrolle (NK)	ADM
NK-APO	ADM + APO866 (5 μ M)
NK-SB	ADM + SB203580 (3 μ M)
NK-SCH	ADM + SCH772984 (1 μ g)
Visfatin	ADM + 100 ng/ml Visfatin
Visfatin-APO	ADM + Visfatin (100 ng/ μ l) + APO866 (5 μ M)
Visfatin-SB	ADM + Visfatin (100 ng/ μ l) + SB203580 (3 μ M)
Visfatin-SCH	ADM + Visfatin (100 ng/ μ l) + SCH772984 (1 μ g)

3.2.2.11 Präparation der Knochengewebe für die Spongiosa-Transfer-Experimente

1-2 mm große Spongiosafragmente wurden nach einem Protokoll von Busse et al. aus den humanen Hüftköpfen präpariert und für 6-8 Stunden in 10 % Wasserstoffperoxid bei 4°C unter Rühren inkubiert [203]. Danach erfolgte die Entfernung des aufgeweichten Gewebes aus den Spongiosaräumen unter starkem Wasserdruck (Munddusche). Um die Spongiosafragmente zu sterilisieren, erfolgte anschließend die Inkubation für 2 Stunden in Ethanol. Zur Entfernung der Ethanolreste wurden die Spongiosafragmente über die Nacht in basales Medium gelegt. Vor dem Aussäen der Zellen wurde das Medium entfernt und die Spongiosafragmente für ca. 30 min im Brutschrank getrocknet, um das Aufsaugen der Zellsuspension zu gewährleisten. 10 μ l Zellsuspension mit 60.000 Zellen wurden direkt auf die Spongiosafragmente pipettiert. Nach 20-30 Minuten Inkubation erfolgte die Zugaben von 500 μ l Medium. Am nächsten Tag startete die Induktion der osteogenen oder adipogenen Differenzierung.

3.2.3 Mineralisierungs-Assay

Um den Einfluss der Stimulanzien auf die extrazelluläre Matrixproduktion bei der osteogenen Differenzierung zu analysieren, wurde ein Mineralisierungs-Assay nach Gregory *et al.*

durchgeführt [204]. Nach der Beendigung der osteogenen Differenzierung wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 % Formaldehyd fixiert. Nach 10 min wurde das Formaldehyd gewechselt und die Inkubation für 1 h bei RT fortgesetzt. Nach dem Fixieren wurden die Zellen mit destilliertem Wasser (dH₂O) gewaschen und anschließend für einen Stunde bei RT in Alizarin-Rot-Lösung zum Färben der durch die entstandenen Osteoblasten gebildete anorganische Matrix inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit dH₂O erfolgte die Inkubation in 200 µl 10 %iger Essigsäure, um die Alizarin-Rot-Färbung zu lösen. Anschließend wurde die Matrix vollständig vom Boden abgeschabt und mit dem Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde für 10 min bei 85°C inkubiert und dann sofort für 5 min auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation wurden 125 µl des Überstands entnommen und mit 50 µl 10 %igem Natriumhydroxid zum Neutralisieren gemischt. Es erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) am Nano-Drop bei 530 nm. Die OD repräsentiert die Menge des in der gebildeten Matrix eingelagerten Farbstoffs.

3.2.4 Oil Red O Färbung

Zum Nachweis der Fettvakuolen in den adipogen differenzierten Kulturen wurde eine Oil Red O Färbung verwendet. Am Tag 21 nach der Induktion der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen zunächst 2x für fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für zehn Minuten bei RT mit vierprozentigem Paraformaldehyd fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 3x für jeweils fünf Minuten mit dH₂O gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation in frisch filtrierter Oil Red Gebrauchslösung nach Herstellerangaben für 15 min im Dunkeln. Um den restlichen Farbstoff zu entfernen, wurden die Zellen 3x mit dH₂O gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit Hämatoxylin nach Mayer für 15 Sekunden. Nach mehrmaligem Waschen mit dH₂O wurden die Objektträger mit Eindeckmedium und einem Deckglas zur späteren lichtmikroskopischen Auswertung gelagert.

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

3.2.5.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA der osteogen oder adipogen differenzierten hMSCs/phMSCs wurde unter Verwendung des RNeasy Mini-Kits (Quiagen) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die

Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Zur Zellyse wurde pro Zellkulturwell jeweils 700 µl RLT-Lysepuffer, versetzt mit 0,1 % β -Mercaptoethanol, zugegeben. Danach folgte die vollständige Ablösung der Zellen mittels Zellschaber. Anschließend wurde das Lysat mit 700 µl 70 % Ethanol vermischt und die enthaltene RNA mit Hilfe von RNeasy Mini columns gereinigt und mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Nano-Drops Spektralphotometers. Die isolierte RNA wurde entweder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert oder direkt mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben.

3.2.5.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten RNA sowie DNA wurde photometrisch (Nanodrop Lite Spektrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durch das Messen der Absorption bei 260 nm bestimmt. Das Verhältnis von OD260/OD280 und OD260/OD230 gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäuren. Bei reinen DNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8, bei reinen RNA-Lösungen bei 2,0.

3.2.5.3 Reverse Transkription

Für die Genexpressionsanalysen mittels Standard-PCR oder Real-Time-PCR musste die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt werden. Die Zusammensetzung eines 50 µl Reaktionsansatzes sah wie folgt aus:

AMV Puffer (5x)	10 µl
dNTP-Mix (10 mM)	5 µl
AMV Polymerase (10 U/µl)	2 µl
RNase Inhibitor (RNasin) (40 U/µl)	1 µl
Hexamer Primer (2 µg/µl)	1 µl
RNA 100-1000 ng	
ddH ₂ O ad 50 µl	

Zunächst wurde die RNA mit ddH₂O auf ein Reaktionsvolumen von 31 µl aufgefüllt und 1 µl RNase Inhibitor hinzugefügt. Der Ansatz wurde für zwei Minuten bei 70°C im Thermocycler erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die restlichen Reagenzien wurden zuvor

zusammengegeben und in einem Volumen von insgesamt 18 µl zu der jeweiligen Probe pipettiert. Die reverse Transkription wurde in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) unter folgendem Programm durchgeführt:

25 °C, 10 min
 37 °C, 30 min
 42 °C, 30 min
 70 °C, 10 min

Bis zur Verwendung der cDNA wurde diese bei -20°C gelagert.

3.2.5.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) wird zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eine hitzestabile Polymerase verwendet. Die Zusammensetzung eines 20 µl PCR-Ansatzes mit Taq-Polymerase sowie das verwendete Programm sind unten dargestellt:

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes:

Taq PCR Master Mix (2x) 10 µl
 Primer (10 µM) 0,5 µl
 DNA variable
 ddH₂O ad 20 µl

Amplifikationsprogramm:

Initiale Denaturierung 94°C 5 min 1x
 Denaturierung 94°C 15-30 s
 Primerbindung 48-63°C 15-60 s
 Elongation 72°C variable
 Finale Elongation 72°C 10 min 1x
 4°C ∞ 1x

} 30-35x

Bei einer PCR-Reaktion muss die Primerbindungstemperatur je nach Schmelztemperatur der Primer angepasst werden, wohingegen die Elongations-Dauer von der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhängt. Die PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) durchgeführt.

3.2.5.5 Real-Time-PCR

Die Genexpressionsanalysen wurden mittels einer semi-quantitativen Real-Time-PCR durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem *LightCycler* (Roche Diagnostics) unter Verwendung des *Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix* (Thermo Scientific) durchgeführt.

Bei der Real-Time-PCR wird durch die Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffs an die neu entstehenden DNA-Doppelstränge die Amplifikationsreaktion während einer PCR-Reaktion in Echtzeit (*real-time*) dargestellt. Nach jeder Elongationsphase nimmt das Fluoreszenzsignal proportional zur Anzahl der neu gebildeten DNA-Kopien zu. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität in der Kapillare kann die relative Fragmentemenge berechnet werden. Bis zum Erreichen einer Plateauphase steigt die Fluoreszenzintensität von Zyklus zu Zyklus mit zunehmender Menge an DNA an. Die Messungen wurden mit den Ergebnissen des konstitutiv und ubiquitär exprimierten Referenzgen (*housekeeping gene*) 18S normalisiert. Entsprechend wurde eine semi-quantitative Messung im Verhältnis zum Referenzgen durchgeführt, da die absolute DNA-Menge nicht bestimmt wurde. Die x-fache Expressionsänderung der untersuchten Gene in behandelten vs. unbehandelten Proben wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt. Hierbei diente die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ zur Berechnung der x-fachen Änderungen der Genexpression. Dabei wurde festgelegt, dass eine Änderung der Genexpression ab dem Faktor von mindestens 2 als reproduzierbar betrachtet wird. Alle Werte unterhalb von Faktor 2 könnten auf die experimentellen Schwankungen der Methode zurückzuführen sein. Um eine valide Aussage über die Expression eines Genes treffen zu können, müssen die Primer unter optimalen Bedingungen verwendet werden. Hierfür sind sowohl die Primerbindungstemperatur als auch die $MgCl_2$ -Konzentration von Bedeutung (siehe Effizienztestung). Bei dem Design eines Primer-Paares für das Referenzgen 18S wurde darauf geachtet, dass es ein breites Temperaturoptimum aufweist und bei allen PCR-Läufen parallel mitgeführt werden kann.

Die Zusammensetzung eines Mastermixes sowie das verwendete Programm für die Real-Time-PCR Reaktion sind unten aufgeführt:

Komponenten:	Volumen:
SYBR Green (mit 3 mM $MgCl_2$)	10 μ l
Primer <i>forward</i> (10 mM)	0,5 μ l
Primer <i>reverse</i> (10 mM)	0,5 μ l
Oder Qiagen Primer-Mix (10x)	2 μ l
$MgCl_2$ (25 mM $MgCl_2$)	0 – 1,2 μ l
ddH ₂ O	auf 20 μ l auffüllen
cDNA	2 μ l

Zunächst wurden 18 μ l des Mastermixes pro *LightCycler*-Kapillare vorgelegt und anschließend 2 μ l der cDNA hinzugefügt. Für die Negativkontrolle wurden anstelle der cDNA 2 μ l

nukleasefreies Wasser (Ambion®) zugegeben. Nachdem die Kapillaren verschlossen wurden, erfolgte der Transfer in das *LightCycler*-Karussell. Die Proben wurden kurz in einer speziellen *LightCycler*-Zentrifuge zentrifugiert. Das Karussell wurde anschließend in den *LightCycler* eingesetzt und der Lauf unter Verwendung eines entsprechenden Programms gestartet:

Real-time-PCR-Programm:

95°C 10 min	Initiale Denaturierung 1 Zyklus
95°C 10 s	Denaturierung
x°C 25 s (variable)	Primerbindung 35-55 Zyklen
72°C 30 s	Elongation/Fluoreszenz-Messung

Am Ende der Reaktion wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Primer-Spezifität zu ermitteln. Hierfür wurden die Proben von 50°C auf 99°C mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/s kontinuierlich erhitzt. Dadurch werden die DNA-Doppelstränge aufgeschmolzen, der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt und das gemessene Fluoreszenzsignal nimmt ab einer bestimmten Temperatur verstärkt ab. Da jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelztemperatur aufweist, kann man anhand der entstandenen Schmelzkurve das spezifische Produkt von Primer-Dimeren oder unspezifischen PCR-Produkten, die zu einem unspezifischen Peak führen, unterscheiden. Liegt ein unspezifisches Produkt vor, kann die Quantifizierung nicht zuverlässig durchgeführt werden. Zum Schluss eines Laufs wird die Temperatur auf 40°C reduziert und das Programm beendet.

3.2.5.6 Effizienzoptimierung der Primer für die semi-quantitative Real-Time-PCR

Für eine valide Quantifizierung ist die Optimierung der Primer hinsichtlich der Primerbindungstemperatur sowie der MgCl₂ Konzentration erforderlich. MgCl₂ ist einerseits ein wichtiger Co-Faktor der Taq-Polymerase, andererseits sorgt es für die Stabilisierung der Primer / DNA-Bindung. Die Effizienz-Analyse wurde nach Herstellerangaben (Roche) im PCR *LightCycler* durchgeführt. Da sich bei einer effizienten Amplifikation die Produktmenge pro Zyklus verdoppelt, was einer Effizienz von 2 entspricht, sollte die PCR-Effizienz bei $2 \pm 0,05$ liegen, um optimale Bedingungen für die Durchführung der relativen Quantifizierung zu erreichen. Für die Ermittlung der PCR-Effizienz wurden verschiedene Konzentrationen von

MgCl₂ (3,0 mM, 3,5 mM, 4,0 mM, 4,5 mM) bei unterschiedlichen Temperaturen getestet und eine Standardkurve anhand der Verdünnungsreihe der cDNA (1:5, 1:15, 1:45 und 1:135) erstellt. Die Software des *LightCyclers*[®] errechnet daraus eine Steigung (Slope), was die Bestimmung der PCR-Effizienz mit Hilfe folgender Formel $E=10^{(-1/slope)}$ ermöglicht.

3.2.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels einer Agarose-Gelelektrophorese kann die erfolgreiche Amplifizierung eines PCR-Produkts überprüft werden. Hierbei wurden die DNA-Fragmente anhand ihrer molekularen Größe in einem 1-2 %igen Agarosegel getrennt. Für die Herstellung eines 1-2 %igen (w/v) Agarosegels wurde die Agarose mit TBE-Puffer gemischt und in einer Mikrowelle aufgekocht. Das Gel wurde unter Verwendung eines entsprechenden Kamms (10 oder 16 Geltaschen) in einen Gelträger gegossen. 10 µl der DNA-Proben wurden mit 2 µl 6-fach Ladepuffer (peqGOLD 100 bp DNA-Ladder Kit) versetzt und in die Vertiefungen des Gels gegeben. Zusätzlich wurde eine peqGOLD 100 bp DNA-Ladder im Gel zugegeben, um die PCR-Produktgröße ermitteln zu können. Die Auftrennung des Gels erfolgte bei 80 V für eine Stunde. Anschließend wurde das Gel für ca. 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) zum Nachweis der DNA-Banden inkubiert. Im Anschluss konnten die DNA-Banden unter UV-Licht (UV-Spektrometer) sichtbar gemacht werden.

3.2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zum Nachweis der Zytokinexpression sowie von MMP13 in den ZKÜ wurden ELISA-Untersuchungen (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) nach Herstellerangaben durchgeführt. Je nach ELISA wurden die Proben entsprechend verdünnt eingesetzt.

3.2.7 Statistische Auswertung

Ein Teil der im Folgenden dargestellten Ergebnisse konnte bereits publiziert werden [202]. Für die Publikation wurde nach Beratung durch das Institut für Medizinische Informatik, Bereich Medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Gießen eine explorative, multiparameter Datenanalyse zur Analyse der Adipokin-vermittelten Effekte durchgeführt und für alle

Mittelwerte und berechneten 95 % Konfidenzintervalle wurde eine Bonferroni-Korrektur angeschlossen [202]. In der vorgelegten Arbeit wurde jedoch zur vereinfachten Darstellung entsprechend der Normalverteilung und Anzahl der Stichproben der Student-t-Test bzw. die Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 6 und Microsoft Excel. Zur Darstellung der Werte wurden die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardfehler aus den biologischen Replikaten berechnet. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)).

4 Ergebnisse

4.1 Osteogene Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Adipokinen in Standard-Zellkultur

4.1.1 Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von MMPs während der osteogenen Differenzierung

Um den Effekt von Adipokinen bei der osteogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs zu untersuchen wurden die Zellen über 21 Tagen in osteogenem Induktionsmedium kultiviert. Die Adipokin-induzierte Expression von MMPs bei der osteogenen Differenzierung wurde an Tag 2, 7, 14 und 21 für MMP2 und MMP13 nach Induktion der osteogenen Differenzierung unter Zugabe der Adipokinen mittels Real-Time-PCR durchgeführt.

Während die Adipokine Resistin und Leptin zu keinen signifikanten Veränderungen der Genexpression von MMP2 und MMP13 im Verlauf der osteogenen Differenzierung führten, konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression von MMP2 und MMP13 (Abb. 3) durch Visfatin nach 21 Tagen der Osteogenese nachgewiesen werden. Während der frühen Zeitpunkte der osteogenen Differenzierung war zwar eine Erhöhung der Genexpression von MMP13 durch Visfatin zu beobachten, die jedoch keine Signifikanz erreichte. Dagegen wurden signifikant reduzierte Transkriptionslevel von MMP2 um den Faktor von 0,4 und MMP13 um den Faktor 0,3 durch Visfatin an Tag 21 nach Induktion der osteogenen Differenzierung detektiert [202]. Hierbei reagierten die hMSCs und phMSCs gesunder bzw. Spendern mit OA nicht unterschiedlich hinsichtlich der Genexpression von MMPs. Daher sind die Daten für hMSCs und phMSCs in Abb. 3 zusammengefasst dargestellt.

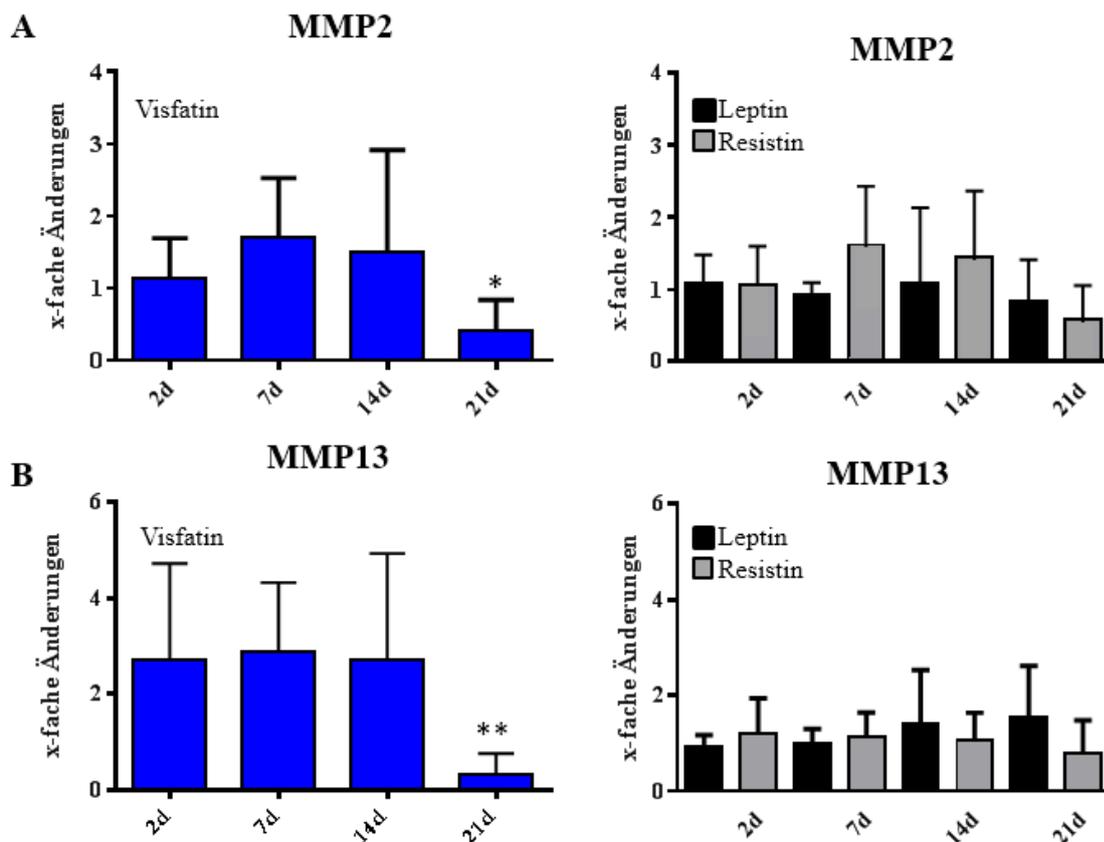


Abb. 3: Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von MMPs im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSCs sowie phMSCs. A Expression des MMP2-Gens nach Zugabe von Visfatin, Resistin oder Leptin (je n=7). B Genexpression von MMP13 nach Stimulation mit Visfatin, Leptin und Resistin (je n=7). Die Graphen geben die x-fache Expressionsänderung der untersuchten Gene in hMSCs/phMSCs zusammengefasst an. Die jeweiligen unstimulierten Kontrollen dienten als Basis und wurden auf 1 gesetzt. Während sich die Genexpression von MMP2 und MMP13 zu keinem der Analysezeitpunkte durch die Adipokine Resistin und Leptin signifikant veränderte, konnte eine signifikante Reduktion von MMP2 und MMP13 durch Visfatin nach 21d der Osteogenese nachgewiesen werden. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

4.1.2 Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von TIMPs bei der osteogenen Differenzierung

Die Genexpressionsanalysen von TIMPs nach der Induktion der osteogenen Differenzierung unter Zugabe von Adipokinen zeigten, dass Resistin und Leptin nicht zu einem signifikant veränderten Expressionsprofil von TIMP1 und TIMP2-Gene in hMSCs oder phMSCs führten (Abb. 4). Interessanterweise reagierten hMSCs mit einer signifikant verminderten Genexpression von TIMP1 an Tag 21 der Osteogenese auf die Visfatin-Stimulierung (Abb.

4A), während in primär isolierten phMSCs keine differenzielle Expression von TIMP1-Gen durch Visfatin im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen zu beobachten war (Daten nicht dargestellt, [202]). Im Gegensatz dazu konnte die Visfatin-vermittelte Reduktion der TIMP2-Expression an Tag 21 der Osteogenese sowohl in hMSCs als auch in phMSCs detektiert werden (Abb. 4B, [202]). Die Ergebnisse sind entsprechend für hMSCs und phMSCs in Abb. 4B zusammengefasst dargestellt. Zu den früheren Zeitpunkten der Differenzierung konnte keine Änderung der TIMP-Genexpression durch Visfatin beobachtet werden.

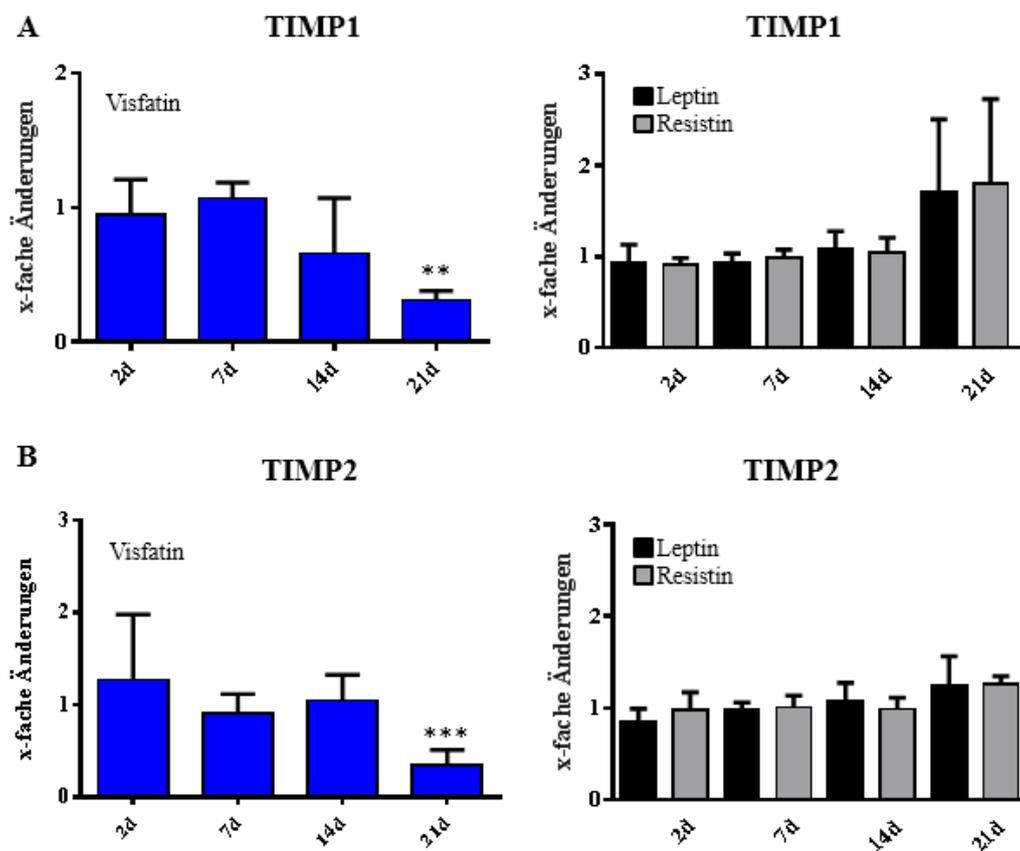


Abb. 4: Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von TIMPs im Verlauf der osteogenen Differenzierung. A TIMP1-Genexpression nach der Supplementierung von Visfatin, Resistin und Leptin (je n=3) in hMSCs. B Expression von TIMP2-Gen nach der Stimulation mit Visfatin, Leptin und Resistin zusammengefasst für hMSCs/phMSCs (je n=6). Die Graphen geben die x-fache Expressionsänderung der untersuchten Gene an. Adipokine Resistin und Leptin zeigten keinen Einfluss auf die Genexpression von TIMP1, während Visfatin zu einer signifikanten Herunterregulation von TIMP1 lediglich in hMSCs während der osteogenen Differenzierung führte. Dagegen war die mRNA-Expression von TIMP2 sowohl in hMSCs als auch in phMSCs durch Visfatin signifikant verringert. Keine signifikante Änderung der TIMP2- Genexpression konnte durch Resistin und Leptin in hMSCs bzw. in phMSCs beobachtet werden. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)

4.1.3 Effekte von Visfatin auf die Matrix-Produktion während der osteogenen Differenzierung

Im Verlauf der osteogenen Differenzierung konnte bereits optisch eine verstärkte Matrix-Mineralisierung durch Visfatin beobachtet werden. Um dies zu bestätigen, wurde die gebildete mineralisierte Matrix nach Beendigung der Differenzierung (21d), die unter permanenter Zugabe von Visfatin erfolgte, mit Alizarin-Rot angefärbt und anschließend fotografisch dokumentiert. Dies ist in Abb. 5A beispielhaft eine der drei verschiedenen Zellpopulationen der phMSCs dargestellt, die für die Quantifizierung eingesetzt wurden. Optisch ließen sich bereits deutliche Unterschiede in der Stärke der Mineralisierung zwischen Visfatin-stimulierten und unstimulierten Proben feststellen. Die Quantifizierung der Mineralisierung erfolgte modifiziert nach Gregory *et al.*, indem die Menge des an die Matrix gebundenen Alizarin-Rot photometrisch quantifiziert wurde [204]. Entsprechend der optischen Beobachtungen ergab die Quantifizierung eine signifikante Verstärkung der Mineralisierung durch Visfatin ($82 \% \pm 28 \%$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bzw. über 21d kultivierten basalen phMSCs (ohne osteogenes Induktionsmedium) [202].

Die Genexpressionsanalyse von Kollagen Typ I, der Hauptkomponente organischer Extrazellulärmatrix, zeigte im Gegensatz zur anorganischen Matrixmineralisierung eine signifikante Herunterregulation durch Visfatin in phMSCs am Tag 21 nach Differenzierungsbeginn (Abb. 5B [202]).

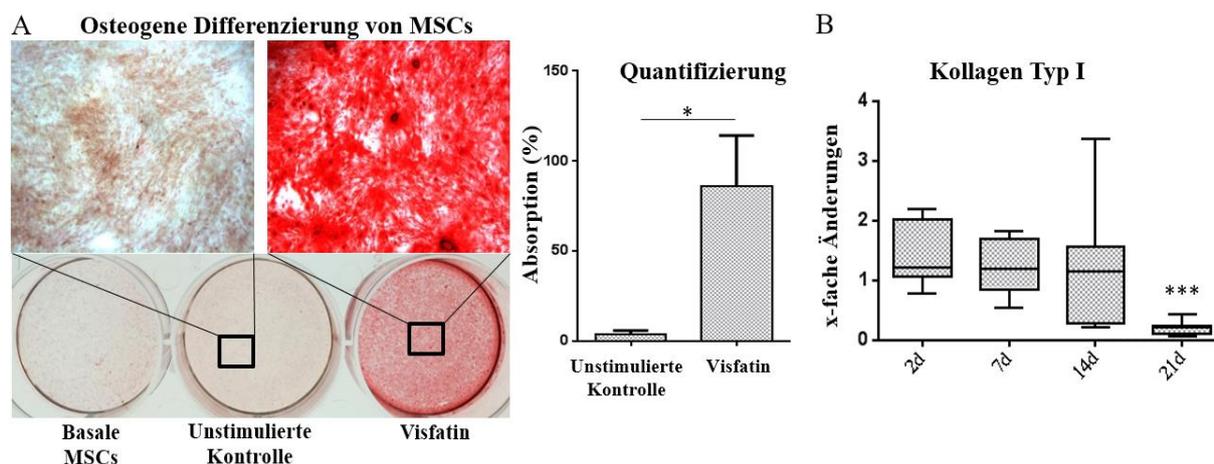


Abb. 5: **Einfluss von Visfatin auf die Matrix-Synthese während der osteogenen Differenzierung der hMSCs und phMSCs.** A Alizarin-Rot-Färbung am Tag 21 nach der Induktion von Osteogenese mit bzw. ohne Visfatin in phMSCs (n=3 [202]). B x-fache Änderung der Genexpression von Kollagen Typ I nach der Stimulierung mit Visfatin im Verlauf der osteogenen Differenzierung der hMSCs bzw. phMSCs (n=7). Während der osteogenen Differenzierung konnte die verstärkte Bildung der anorganischen Matrix durch Visfatin beobachtet werden, während sich die Genexpression von Kollagen Typ I nach 21d der Osteogenese durch Visfatin reduzierte. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)

Durch die Adipokine Resistin und Leptin konnte keine signifikante Regulation von Kollagen Typ I in hMSCs oder phMSCs nachgewiesen werden (Abb. 5B). Hierbei reagierten die hMSCs und phMSCs gesunder bzw. Spendern mit OA nicht unterschiedlich hinsichtlich der Kollagen Typ I Genexpression. Daher sind die Daten für hMSCs und phMSCs in Abb. 5B und 6 zusammengefasst dargestellt.

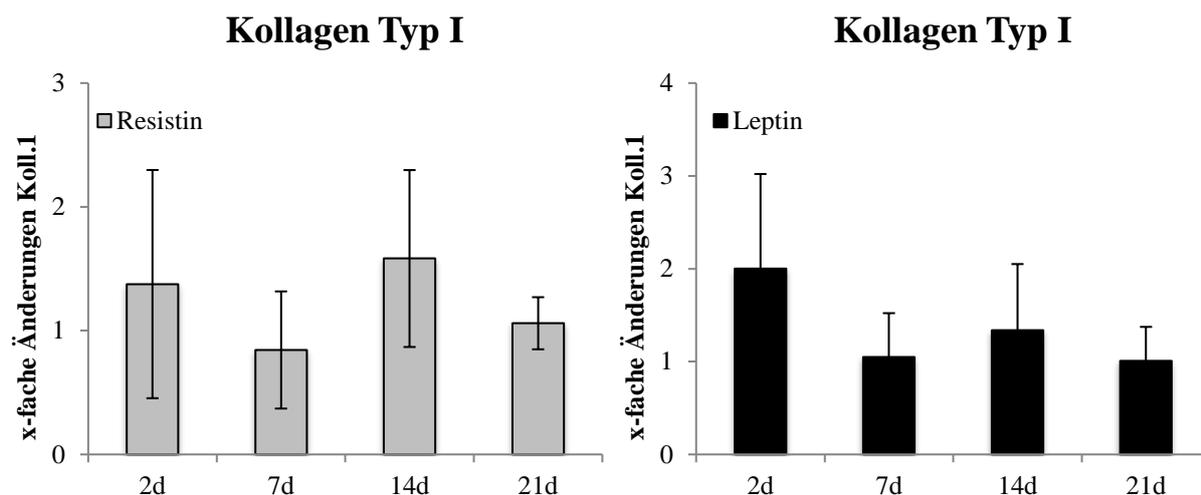


Abb. 6: Einfluss von Leptin und Resistin auf die Genexpression von Kollagen Typ I im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSCs bzw. phMSCs (n=7). Die Graphen stellen die x-fache Genexpressionsänderungen von Kollagen Typ I dar. Die Genexpression wurde auf 18s normalisiert und die unstimulierte Kontrolle auf 1 gesetzt. Es konnte keine signifikante Genexpressionsänderung von Kollagen Typ I durch Resistin und Leptin während der osteogenen Differenzierung beobachtet werden.

4.1.4 Effekte von Adipokinen auf die Osteoblasten-spezifische Genexpression

Während der osteogenen Differenzierung konnte ein verstärkter Effekt von Visfatin auf die anorganische Matrixproduktion beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob die Visfatin-induzierte Matrixmineralisierung durch die Regulation von osteoblastären Markergenen im Verlauf der osteogenen Differenzierung vermittelt wird, wurde die Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen, wie dem Transkriptionsfaktor Runx2, OCN, OPG und ALP, mittels Real-Time-PCR untersucht. Es konnten keine signifikanten Genexpressionsänderungen von OCN, OPG und Runx2 in hMSCs bzw. phMSCs durch Visfatin festgestellt werden (Abb. 7A). Hinsichtlich der Genexpression von ALP konnte eine signifikante Induktion an Tag 7 nach dem Beginn der Osteogenese durch Visfatin sowohl in hMSCs als auch in phMSCs beobachtet werden (Abb. 7B, [202]). Möglicherweise lässt sich durch die Visfatin-induzierte Erhöhung der ALP-Genexpression, der die Mineralisierung verstärkende Effekt von Visfatin erklären.

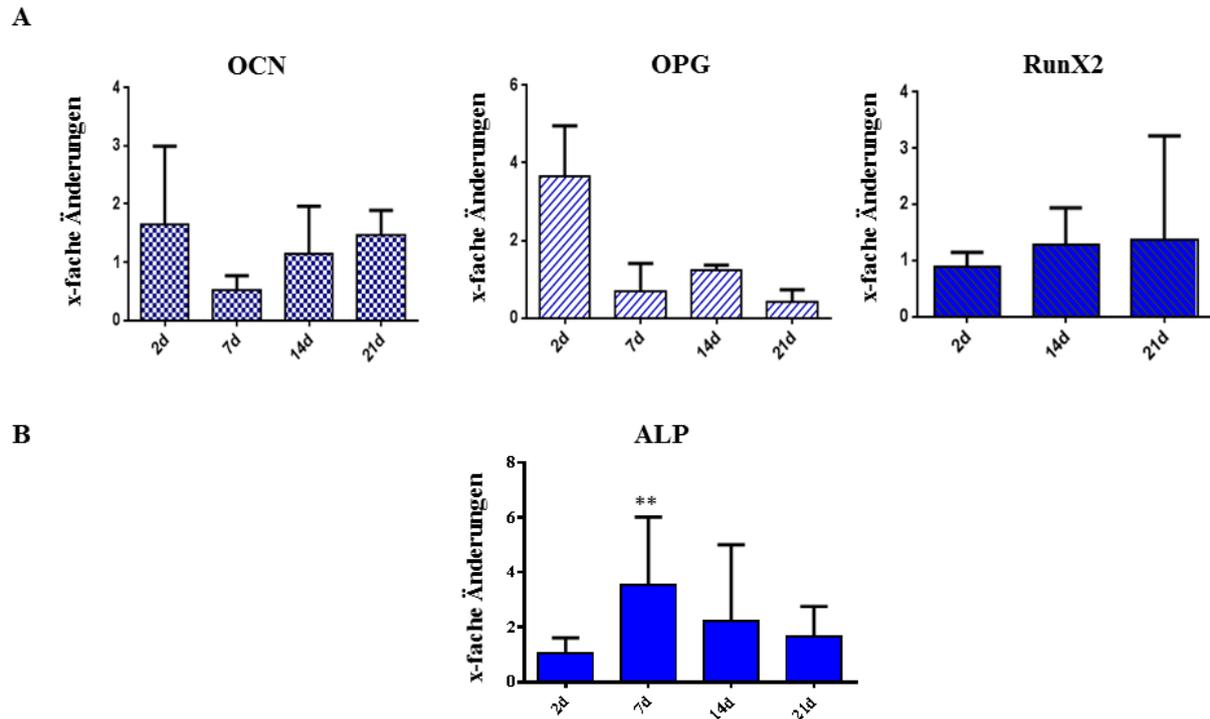


Abb. 7: Einfluss von Visfatin auf die Expression von osteoblastären Markergenen in hMSCs bzw. phMSCs. A Genexpression von Runx2 (n=6), OCN (n=4), und OPG (n=2) während der Osteogenese unter Einfluss von Visfatin. B Visfatin-vermittelte ALP-Genexpression im Verlauf der osteogenen Differenzierung (n=6). Die Graphen stellen die x-fache Genexpressionsänderung von osteoblastären Markergenen dar. Die Genexpression wurde auf 18s normalisiert und die unstimulierte Kontrolle auf 1 gesetzt. Visfatin führte zu keiner signifikanten Genexpressionsänderung von OCN, OPG und Runx2. Die mRNA-Expression von ALP zeigte sich dagegen signifikant erhöht durch Visfatin am Tag 7 nach Differenzierungsbeginn. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,01$ (**).

Bei Stimulierung mit Resistin und Leptin zeigten sich die osteoblastären Gene im Verlauf der Differenzierung physiologisch nicht signifikant verändert in hMSCs bzw. phMSCs exprimiert. Die Daten sind daher für hMSCs/phMSCs zusammengefasst in Abb. 8 dargestellt.

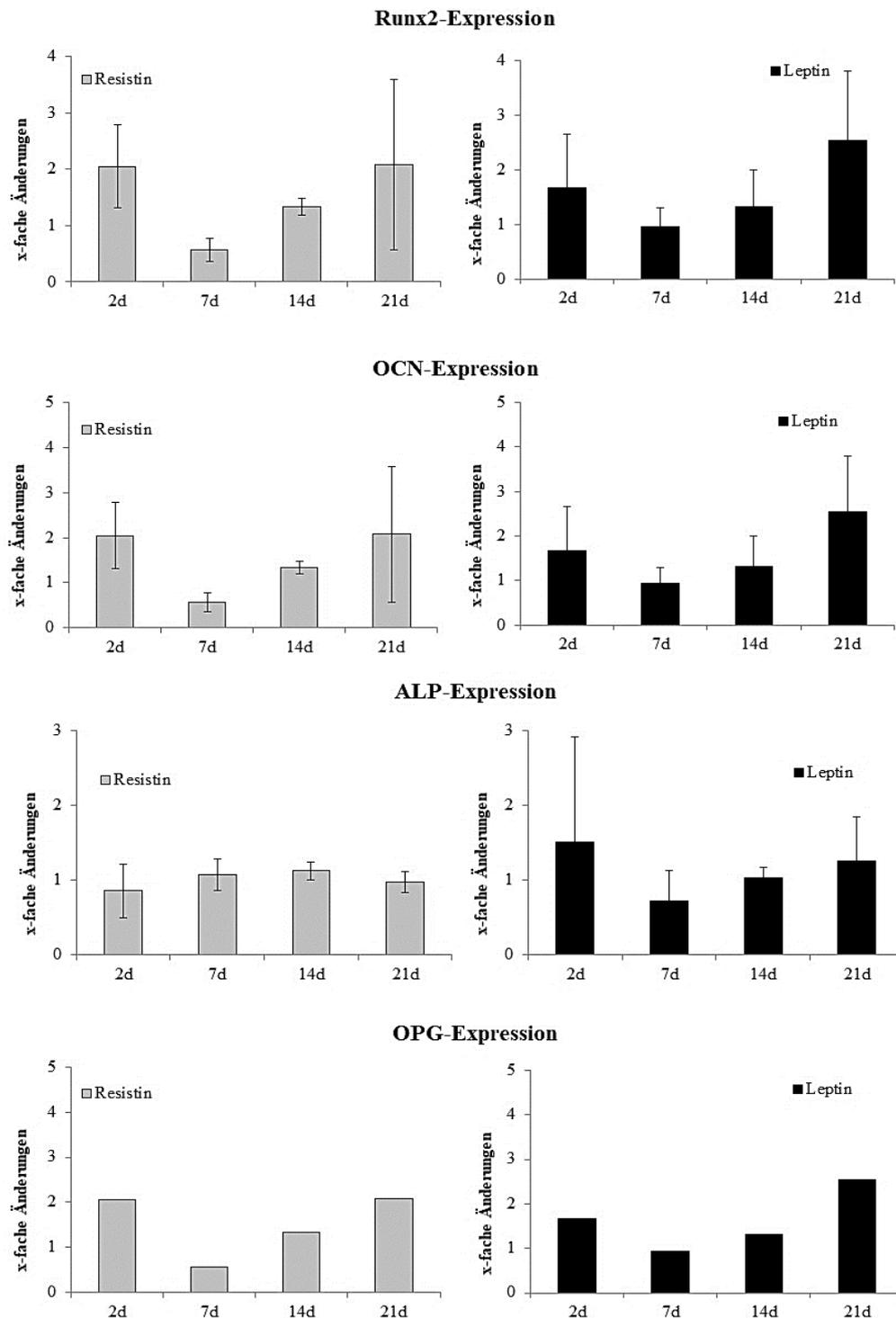


Abb. 8: Einfluss von Leptin und Resistin auf die Genexpression von osteoblastären Markergenen: Runx2 (n=6), OCN (n=4), ALP (n=6) und OPG (n=2) im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSCs bzw. phMSCs. Die Graphen stellen die x-fache Genexpressionsänderungen dar. Genexpression wurde auf 18s normalisiert und die unstimulierte Kontrolle auf 1 gesetzt. Es konnte keine signifikante Expressionsänderung der osteoblastären Markergene durch Resistin und Leptin in osteogen differenzierten hMSCs und phMSCs nachgewiesen werden.

4.1.5 Effekte von Adipokinen auf die Synthese von Entzündungsmediatoren bei der osteogenen Differenzierung

4.1.5.1 Visfatin-induzierte Synthese von Entzündungsmediatoren bei der osteogenen Differenzierung

Für die Untersuchung der Wirkung von Visfatin auf die Abgabe von Entzündungsmediatoren während der osteogenen Differenzierung wurden hMSCs sowie phMSCs über 21 Tage unter Zugabe von Visfatin osteogen differenziert. Die Zellkulturüberstände wurden hinsichtlich des Gehalts an Entzündungsmediatoren mittels ELISA untersucht. Die Induktion des Zytokins IL6 sowie der Chemokine IL8 und MCP1 durch Visfatin wurde mit den Überständen unstimulierter Zellen verglichen. Die Analysen zeigten starke individuelle Unterschiede bereits in der Basisproduktion der untersuchten Entzündungsmediatoren bei den jeweiligen Proben verschiedener Patienten. Sowohl kommerziell erworbene hMSCs als auch primär isolierte phMSCs reagierten mit einem vergleichbaren Expressionsanstieg von Entzündungsmediatoren auf die Visfatin-Stimulierung. Trotz der populationsabhängigen Variabilität resultierte die Stimulierung mit Visfatin in einer signifikanten Erhöhung der IL6- sowie IL8-Abgabe zu allen analysierten Zeitpunkten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle [202]. Hinsichtlich der Sekretion von MCP1 konnten signifikanten Unterschiede nach 7d und 14d beobachtet werden, während an Tag 2 und 21 die Induktion von MCP1 durch Visfatin keine statistische Signifikanz erreichte [202]. Die Visfatin-induzierten Änderungen der absoluten Konzentrationen von IL6, IL8 und MCP1 während der osteogenen Differenzierung von hMSCs sowie phMSCs sind in Tab. 12 zusammengefasst und in Abb. 9 graphisch dargestellt.

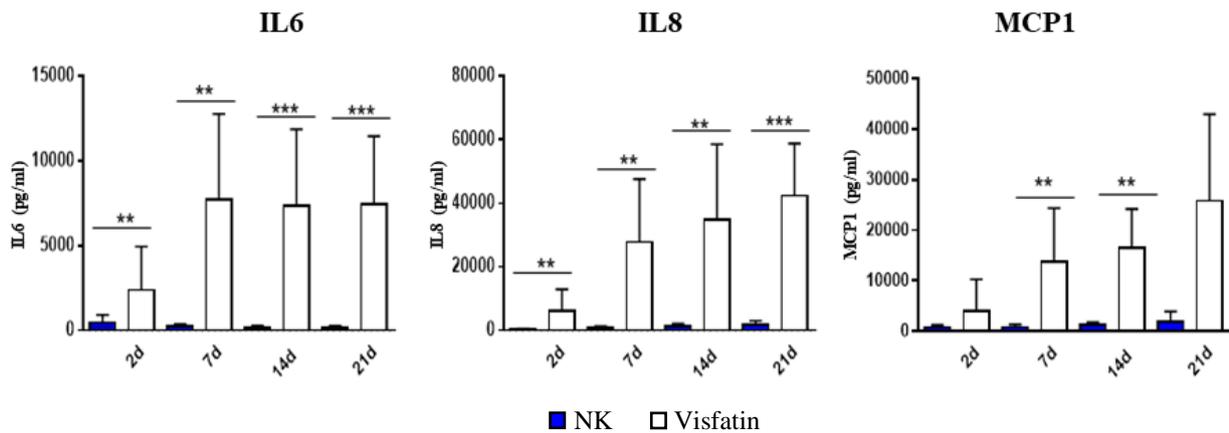


Abb. 9: Einfluss von Visfatin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der osteogenen Differenzierung. Visfatin-induzierte Freisetzung von IL6 (n=11), IL8 (n=11) und MCP1 (n=9) im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle (NK). hMSCs und phMSCs wurden bei der Darstellung zusammengefasst. Anhand der Graphen ist eine signifikante und teils zeitabhängige Induktion von Entzündungsmediatoren durch Visfatin im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu erkennen. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

Tab.12 Synthese von IL6, MCP1 und IL8 in Zellkulturüberständen von Visfatin-stimulierten und unstimulierten hMSCs/phMSCs im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Gruppe	IL6 (pg/ml)	MCP1 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)
2d_NK	481,8 ± 434,0	764,2 ± 462,5	314,6 ± 356,4
2d_Visfatin	2370,0 ± 2581,9	3946,1 ± 6371,2	6961,5 ± 7792,6
7d_NK	225,9 ± 152,6	800,1 ± 530,6	698,6 ± 680,3
7d_Visfatin	7701,0 ± 5076,0	13716,0 ± 10666,0	25279,2 ± 22827,2
14d_NK	180,2 ± 123,0	1234,1 ± 570,7	1379,6 ± 965,4
14d_Visfatin	7324,3 ± 4543,4	16599,0 ± 7645,6	36077,1 ± 27830,5
21d_NK	167,9 ± 106,3	1785,0 ± 2138,3	2025,7 ± 1180,9
21d_Visfatin	7437,0 ± 4027,8	25800,1 ± 17181,3	44103,5 ± 15561,2

4.1.5.2 Effekte von Resistin auf die Synthese von Entzündungsmediatoren bei der osteogenen Differenzierung

Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL6, IL8 und MCP1 durch Resistin-stimulierte Zellen wurde mittels ELISA analysiert. Die Resistin-induzierten Konzentrationen des Zytokins IL6 sowie der Chemokine IL8 und MCP1 wurde mit unstimulierten Zellen verglichen. Die Stimulierung mit Resistin veränderte die Sekretion von IL6 und MCP1 zu keiner der analysierten Zeitpunkte der Osteogenese signifikant. Bei IL8 konnte nur eine leichte, aber weder physiologisch relevante noch statistisch signifikante Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach 14d und 21d beobachtet werden. Die Resistin-induzierten Änderungen der absoluten Konzentrationen von IL6, IL8 und MCP1 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle während der Osteogenese sind für hMSCs sowie phMSCs zusammengefasst in Abb. 10 graphisch dargestellt. Sowohl kommerziell erworbene hMSCs als auch primär isolierte phMSCs reagierten mit einer vergleichbaren Freisetzung von Entzündungsmediatoren auf die Resistin-Stimulierung.

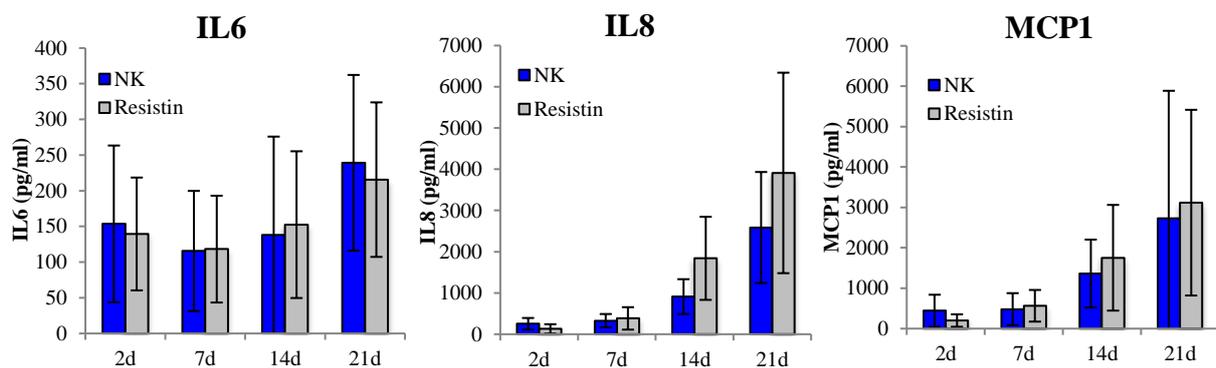


Abb. 10: **Einfluss von Resistin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der osteogenen Differenzierung.** Resistin-induzierte Expression von IL6, IL8 und MCP1 (je n=6) in hMSCs bzw. phMSCs wurde zusammengefasst dargestellt. Es konnte eine leichte, allerdings nicht signifikante Induktion der Freisetzung von IL8 und MCP1 nach 14d und 21d der osteogenen Differenzierung durch Resistin im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle (NK) nachgewiesen werden, während hinsichtlich der Resistin-induzierten IL6-Sekretion keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden konnte.

4.1.5.3 Effekte von Leptin auf die Synthese von Entzündungsmediatoren bei der osteogenen Differenzierung

Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL6, IL8 und MCP1 wurde auch nach Leptin-Stimulierung osteogen differenzierender Zellen mittels ELISA überprüft. Es erfolgte der Vergleich der Expression von IL6, IL8 und MCP1 zwischen unstimulierten und Leptin-stimulierten Zellen. Nach der Stimulierung mit Leptin kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Reduktion von IL6 nach 21d der Differenzierung. IL8 zeigte sich ebenfalls nicht signifikant vermindert am Tag 21 der osteogenen Differenzierung, während am Tag 7 und 14 eine nicht signifikante Induktion durch Leptin beobachtet wurde. Hinsichtlich der MCP1-Sekretion lässt sich ein minimaler, statistisch und physiologisch nicht relevanter Anstieg der Sekretion an Tag 7 und 14 feststellen, während nach 2d und 21d keine deutliche Veränderung der MCP1-Sekretion beobachtet werden konnte. Die Leptin-induzierte Änderungen der absoluten Konzentrationen von IL6, IL8 und MCP1 im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollen während der osteogenen Differenzierung von hMSCs sowie phMSCs sind in Abb. 11 graphisch dargestellt. Da kein Unterschied hinsichtlich des Expressionsprofils von proinflammatorischen Proteinen durch Stimulierung mit Leptin nach der Induktion der Osteogenese in hMSCs sowie phMSCs bestand, wurden die Daten zusammengefasst dargestellt.

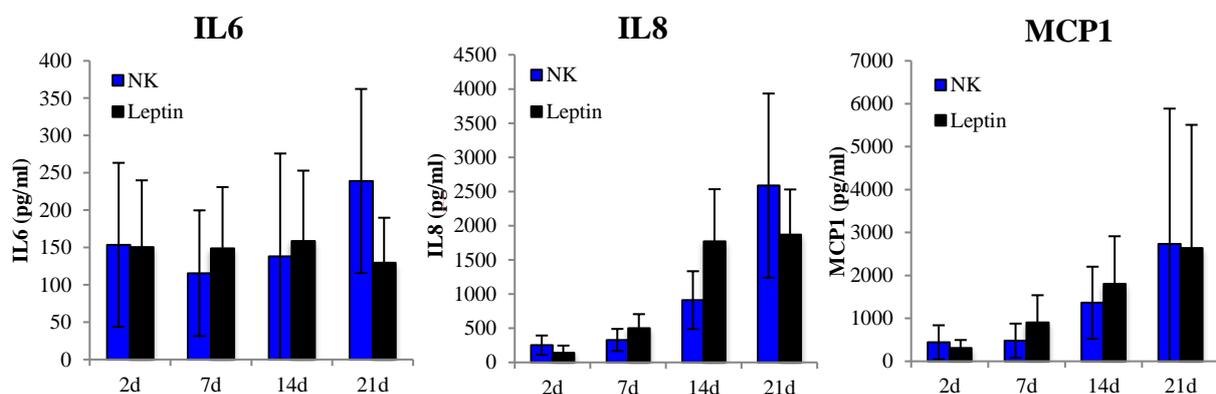


Abb. 11: Einfluss von Leptin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSCs und phMSCs. Leptin-induzierte Expression von IL6, IL8 und MCP1 im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle (NK, je n=6). Die Stimulierung mit Leptin führte zu keiner physiologisch relevanten Veränderung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren.

4.2 Osteogene Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Visfatin in Spongiosa-Transfer-Experimenten

Um den Einfluss der EZM hinsichtlich der Visfatin-vermittelten Effekte im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSCs sowie phMSCs zu untersuchen, wurden die Zellen auf gereinigten humanen Spongiosafragmenten kultiviert und über 21d osteogen differenziert. Unter Standard-Zellkulturbedingungen zeigte nur das Adipokin Visfatin einen Einfluss während der osteogenen Differenzierung auf die untersuchten Parameter. Deshalb und aufgrund der limitierten Menge primären humanen Knochens für die Spongiosa-Transfer-Experimente wurden lediglich Stimulierungen mit Visfatin durchgeführt. Hierfür wurde das Knochengewebe von humanen Hüftköpfen nach Busse *et al.* [203], wie in den Methoden beschrieben gereinigt und anschließend sterilisiert. Aufgrund der variablen Porosität konnten nicht alle Spongiosafragmente eines Knochens gleich gut aufgearbeitet werden. Pro Ansatz standen 7-8 Spongiosafragmente zur Verfügung, die mit jeweils 60.000 Zellen (autolog) besiedelt wurden. Anschließend erfolgte die osteogene Differenzierung über 21d. Parallel zur Differenzierung auf der humanen autologen Spongiosa (aSP) erfolgte die Osteogenese in Standard-Kultur auf Polystyrol (PS) beschichteten Platten, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb gleicher Zellpopulationen zu gewährleisten. Aufgrund der Differenzierung in dreidimensionalen Strukturen und der Limitierung der Probengröße, war die RNA-Ausbeute limitiert und die Genexpressionsanalysen für MMPs und TIMPs konnten nicht durchgeführt werden. Der Effekt der Spongiosa auf das Differenzierungspotential und die Induktion proentzündlicher Effekte wurde über ALP-Messungen sowie über die Veränderungen der Zytokin- und Chemokinmengen auf Proteinebene untersucht.

4.2.1 Das osteogene Differenzierungspotential von MSCs auf Spongiosa unter Einfluss von Visfatin

Unter Standard-Zellkulturbedingungen konnte eine signifikante Genexpressionsänderung von ALP durch Visfatin nach 7d der Induktion der osteogenen Differenzierung mittels Real-Time-PCR nachgewiesen werden. Dieser Unterschied konnte hingegen nicht mehr während der Osteogenese auf Spongiosa detektiert werden. Die Transkriptionslevels von ALP der beiden Versuchsansätze sind graphisch in Abb. 12 für hMSCs und phMSCs zusammengefasst dargestellt. Interessanterweise blieb die ALP-Genexpression während der frühen Zeitpunkte

der Differenzierung konstant und stieg bei Kultur auf Spongiosa erst an Tag 21 der Differenzierung an.

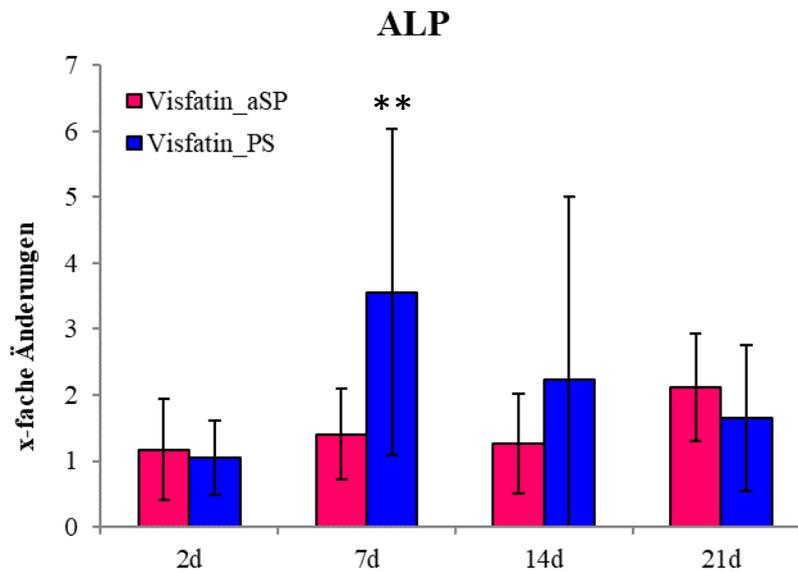


Abb. 12: Einfluss von Visfatin auf die Genexpression von ALP während der osteogenen Differenzierung unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS) sowie auf Spongiosa (aSP, n=7). Im Gegensatz zur Visfatin-vermittelten Induktion der ALP-Genexpression nach 7d der Osteogenese in Standard-Zellkultur, konnte kein signifikanter Expressionsanstieg des ALP-Gens nach 7d durch Visfatin in 3D-Kultur beobachtet werden. Bei Kultur auf Spongiosa stieg die Visfatin-vermittelte ALP-Genexpression erst an Tag 21 der Differenzierung an. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,01$ (**).

Bezüglich der basalen Genexpression von ALP zeigte sich eine hohe populationsabhängige Variabilität. Es war erkennbar, dass die Transkriptionslevel von ALP während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa im Vergleich zur Standard-Kultur deutlich niedriger waren (Abb. 13). Dies könnte auf eine verzögerte Kinetik der Differenzierung auf Spongiosa hindeuten.

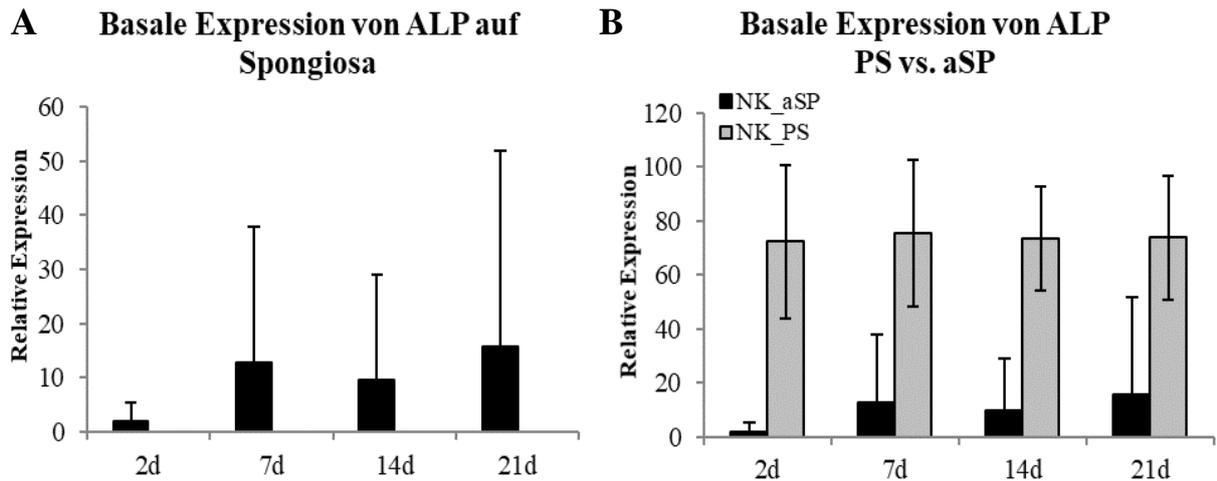


Abb. 13: **Vergleich der ALP-Genexpression zwischen Standard- und 3D-Kultur während der osteogenen Differenzierung.** A Basale ALP-Genexpression auf Spongiosa. B Vergleich der basalen ALP-Genexpression während der Osteogenese auf Spongiosa (aSP) und Standard-Zellkultur (PS). Die Geneexpression wurde auf das *Hause keeping gene* 18s normalisiert (n=7). Während des gesamten Zeitverlaufs der Differenzierung war die basale ALP-Expression in 3D-Kultur im Vergleich zur Standard-Kultur deutlich niedriger.

4.2.2 Synthese von Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa

Zur Analyse der Visfatin-induzierten Freisetzung von Entzündungsmediatoren während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa im Vergleich zu Polystyrol-beschichteten Zellkulturplatten wurden die beiden Ansätze parallel durchgeführt. Die Differenzierung erfolgte in unterschiedlichen Zellkulturformaten aufgrund der zwei- bzw. dreidimensionalen Kultur der Zellen. Auch die eingesetzte Ausgangszellzahl sowie die Volumina des osteogenen Induktionsmediums unterschieden sich in den Ansätzen. Um die Vergleichbarkeit zu verbessern, wurde das Verhältnis zwischen eingesetzter Ausgangszellzahl und Mediumvolumen-Verhältnis in beiden Ansätzen gleich gehalten oder, wenn nicht anders möglich, durch die entsprechende Verdünnung der Proben normalisiert. Die Abgabe der Entzündungsmediatoren in den ZKÜ der hMSCs/phMSCs wurde mittels ELISA analysiert.

In Abbildung 14 ist die Visfatin-induzierte Abgabe von IL6 durch osteogen differenzierte MSCs auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zu Plastik (PS) dargestellt. Die Stimulierung mit Visfatin führte tendenziell zu einer gesteigerten Freisetzung von IL6 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (NK) während des gesamten Zeitverlaufs der osteogenen Differenzierung in 3D-Kultur (Abb. 14A). Jedoch zeigten sich Unterschiede nur nach 14d und

21d als statistisch signifikant. Vergleicht man die Expressionsprofile von IL6 auf Spongiosa bzw. Plastik kultivierten Zellen nach der Stimulierung mit Visfatin, lassen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 14B). Hinsichtlich der basalen Expressionslevel von IL6 während der Osteogenese in 3D- vs. Standard-Kultur konnte eine erhöhte Freisetzung von IL6 durch die in 3D-Kultur osteogen differenzierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 14C). Zu den späteren Zeitpunkten der Osteogenese, an 14d und 21d, zeigten die Differenzen statistische Signifikanz.

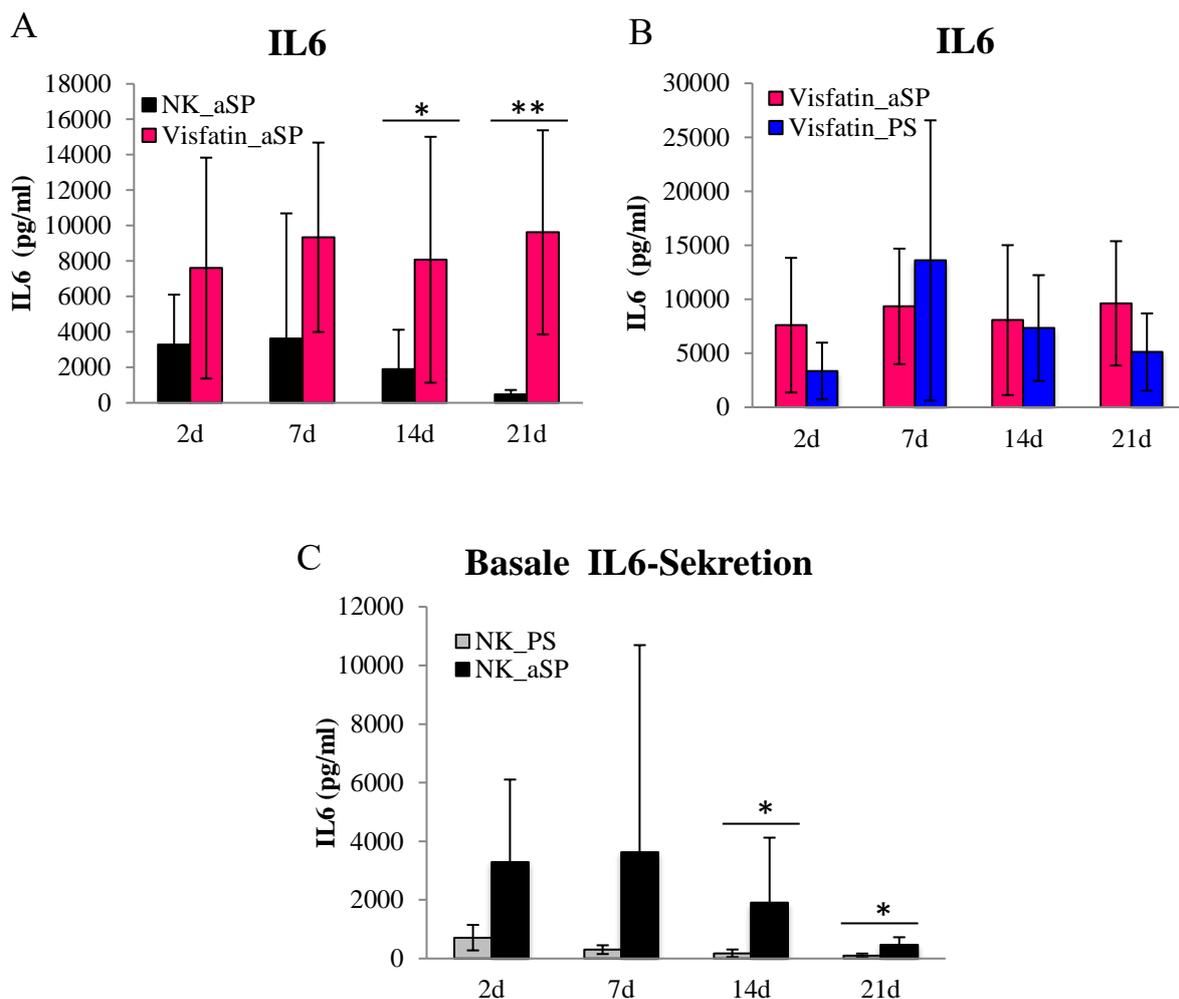


Abb. 14: **Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von IL6 während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Standard-Zellkultur (n=7).** A IL6-Freisetzung nach der Stimulierung mit Visfatin während der Osteogenese auf Spongiosa. B Vergleich der Visfatin-vermittelten Freisetzung von IL6 in 3D- und Standard-Kultur. C Basale Expression von IL6 in 3D- und Standard-Kultur. Die Stimulierung mit Visfatin führte zu einer Induktion von IL6 sowohl in 3D- als auch in Standard-Kultur während der Osteogenese. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Visfatin-induzierten IL6-Expression in beiden Ansätzen festgestellt werden, während die basale IL6-Expression in 3D-Kultur deutlich erhöht war. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Ein ähnliches Bild wie bei IL6-Sekretion konnte auch für die IL8-Expression beobachtet werden. Visfatin führte zu einer erhöhten Freisetzung von IL8 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle während des gesamten Zeitverlaufs der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nur nach 2d, 14d und 21d nachgewiesen werden (Abb. 15A). Die Visfatin-induzierte IL8-Sekretion fiel nur leicht höher während der Osteogenese auf Spongiosa als in Standard-Zellkultur aus. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 15B). Ebenfalls ließen sich deutlich höhere, aber nicht signifikante basale Sekretionslevel von IL8 in 3D-Kultur im Vergleich zur Standard-Zellkultur im Verlauf der Osteogenese nachweisen (Abb. 15C).

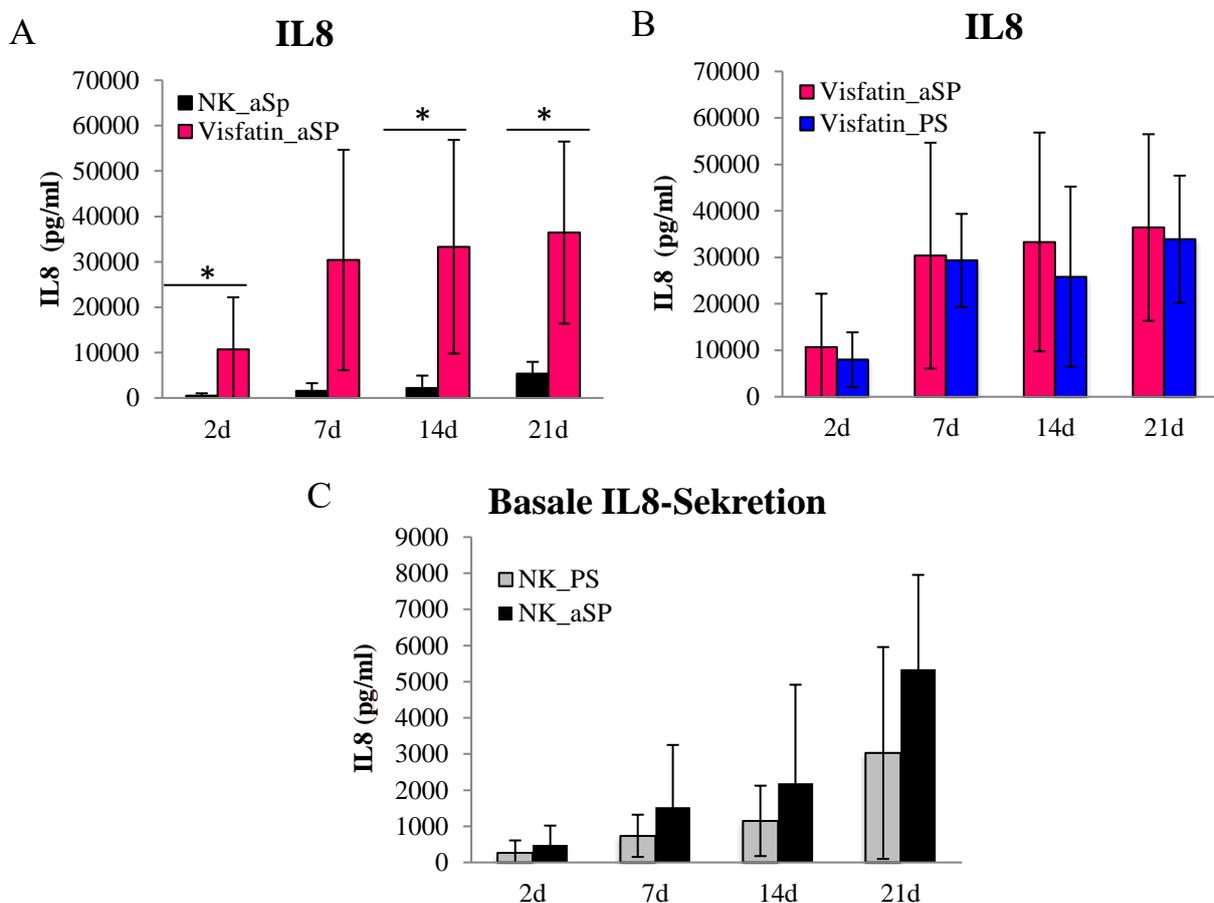


Abb. 15: Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von IL8 während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Standard-Zellkultur (n=7). A IL8-Freisetzung nach der Stimulierung mit Visfatin während der Osteogenese auf Spongiosa. B Vergleich der Visfatin-vermittelten Freisetzung von IL8 in 3D- und Standard-Kultur. C Basale Expression von IL8 in 3D- und Standard-Kultur. Die Stimulierung mit Visfatin führte zu einer Induktion von IL8 sowohl in 3D- als auch in Standard-Kultur während der Osteogenese. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Visfatin-induzierten IL8-Expression in beiden Ansätzen festgestellt werden, während die basale IL8-Expression in 3D-Kultur sichtbar, aber nicht signifikant erhöht war. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*).

Nach der Stimulierung mit Visfatin konnte eine signifikant erhöhte Freisetzung von MCP1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle an Tag 14 und 21 nach Induktion der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa beobachtet werden (Abb. 16A). Der Vergleich der Visfatin-vermittelten MCP1-Expression während der Osteogenese in 3D- und Standard-Kultur zeigte leicht aber nicht signifikant veränderten Sekretionsprofile: während zum Beginn der Osteogenese (2d und 7d) die Visfatin-vermittelte Abgabe von MCP1 in Standard-Kultur etwas höher als in 3D-Kultur war, fiel der Unterschied nach 14d und 21d auf Spongiosa höher aus (Abb. 16B). Hinsichtlich des basalen Expressionsprofils von MCP1 konnten signifikant höhere Level an Tag 14 und 21 während der Osteogenese auf Spongiosa im Vergleich zur Standard-Zellkultur gemessen werden (Abb. 16C).

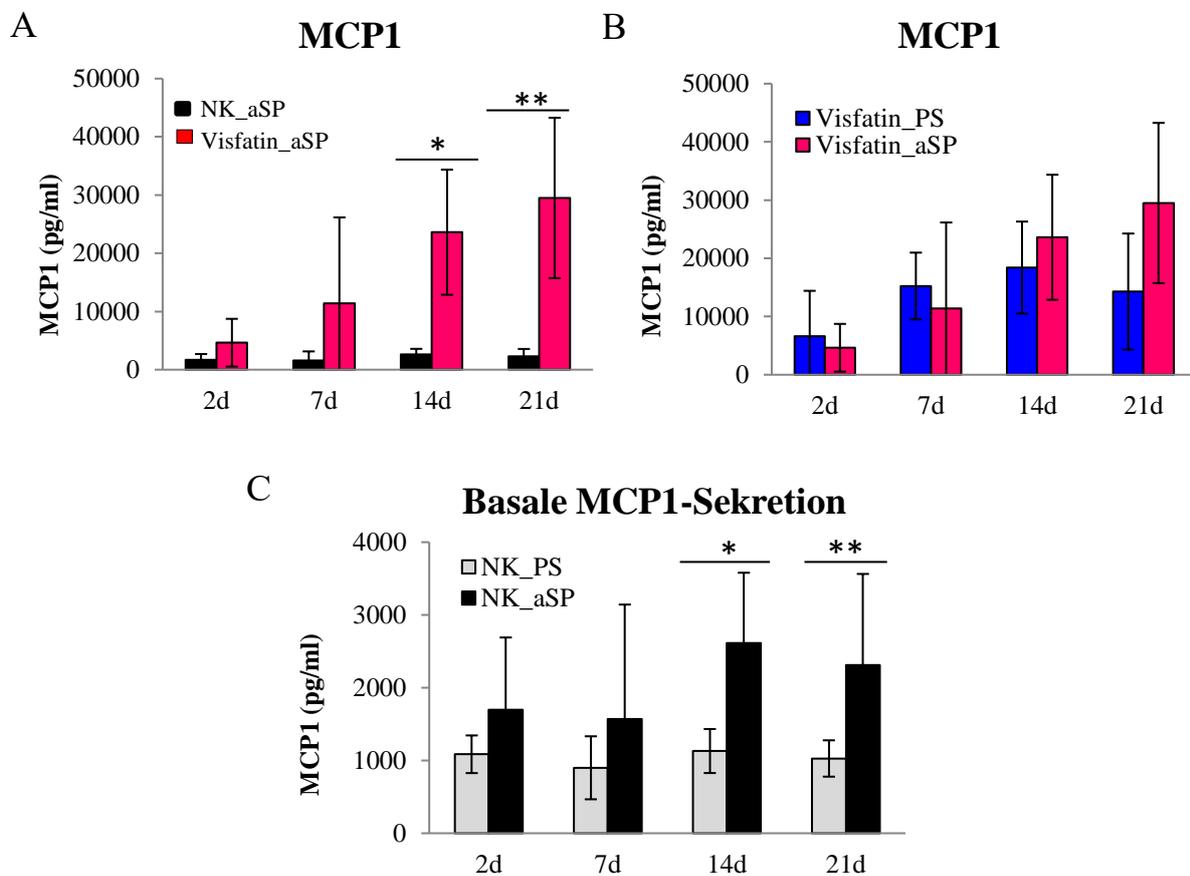


Abb. 16: **Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von MCP1 während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Standard-Zellkultur (n=5).** A Visfatin-induzierte Abgabe von MCP1 in 3D-Kultur. B Vergleich der Visfatin-vermittelten Abgabe von MCP1 in 3D- und Standard-Kultur. C Basale Expression von MCP1 in 3D- und Standard-Kultur. Visfatin führte zu einer Induktion von MCP1 sowohl in 3D- als auch in Standard-Kultur während der Osteogenese. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Visfatin-induzierten MCP1-Expression in beiden Ansätzen festgestellt werden, während die basale MCP1-Expression in 3D-Kultur deutlich höher ausfiel. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

4.3 Adipogene Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Adipokinen in Standard-Zellkultur

4.3.1 Das adipogene Differenzierungspotential von MSCs

Um den Einfluss von Adipokinen bei der adipogenen Differenzierung von MSCs zu untersuchen, wurden hMSCs/phMSCs über 21 Tagen im adipogenen Induktionsmedium kultiviert. Die Genexpressionsanalysen erfolgten am Tag 2, 7, 14 und 21 nach der Induktion der Differenzierung. Die erfolgreiche adipogene Differenzierung wurde mittels Oil Red O Färbung am Ende der Differenzierung (21d) bestätigt (Abb. 17). Die adipogen differenzierten hMSCs zeigen die Einlagerung der Fettvakuolen (Abb. 17A), die mittels Oil Red O rot angefärbt werden (Abb. 17B). Hingegen weisen die undifferenzierten hMSCs keine rot angefärbten Fettvakuolen im Zytoplasma auf (Abb. 17C, [202]).

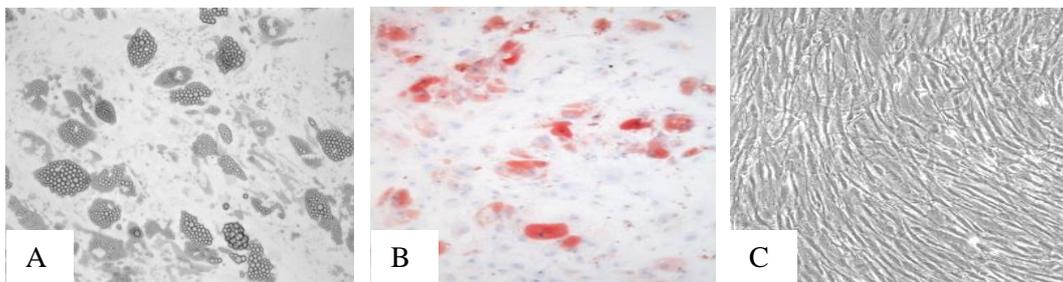


Abb. 17: **Adipogene Differenzierung von hMSCs.** (A) Adipogen differenzierte hMSCs am Tag 21; Phasenkontrast. (B) Adipogen differenzierte hMSCs am Tag 21 nach Oil Red O Färbung im Hellfeld. (C) Basale hMSCs, die über 21d kultiviert wurden, Phasenkontrast [202].

Die Genexpressionsanalysen von Leptin, einem Adipozyten-typischen Markergen zeigten, dass die basale Genexpression von Leptin kontinuierlich während der adipogenen Differenzierung anstieg, wohingegen die mRNA-Expression des adipogenen Transkriptionsmarkers PPARG zwar durch die Differenzierung zu allen Zeitpunkten induziert wurde, sich jedoch nicht im Laufe der Differenzierung steigerte (Abb. 18).

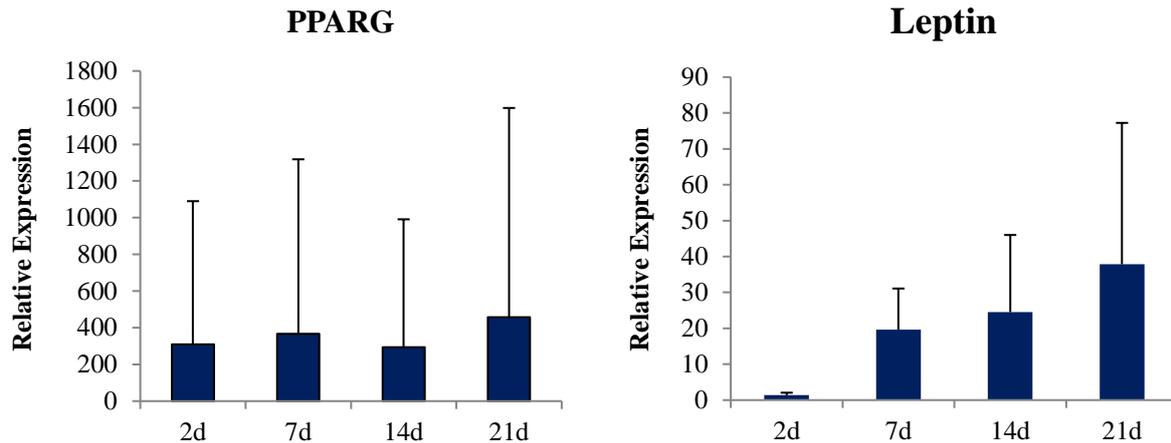


Abb. 18: **Basale Genexpression von Leptin (n=4) und PPARG bei der adipogenen Differenzierung (n=7).** Während die basale Genexpression von Leptin kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der adipogenen Differenzierung der hMSCs/phMSCs anstieg, erhöhte sich die mRNA-Expression des adipogenen Transkriptionsmarkers PPARG im Verlauf der Differenzierung nicht deutlich.

4.3.2 Effekte von Adipokinen auf die Genexpression adipogener Differenzierungsmarker

Nach der adipogenen Differenzierung wurden Genexpressionsanalysen mittels Real-Time-PCR durchgeführt. Reagierten die primär isolierten phMSCs genauso wie die kommerziell erworbenen hMSCs nach Stimulierung mit Adipokinen, wurden die Ergebnisse für hMSCs/phMSCs zusammengefasst dargestellt. Im Falle der unterschiedlichen Reaktionen sind die Daten separat dargestellt.

Um den Einfluss der Adipokine Leptin, Resistin und Visfatin auf das adipogene Differenzierungspotential von hMSCs/phMSCs zu analysieren, wurde die Genexpression von Leptin und PPARG untersucht (Abb. 19). Bei keinem der untersuchten Gene konnte eine signifikante Änderung der Genexpression um mindestens den Faktor zwei der untersuchten Zeitpunkte detektiert werden. Es konnte keine signifikante Änderung der PPARG-Genexpression nach der Stimulierung mit Resistin, Visfatin und Leptin in den adipogen differenzierten Zellen festgestellt werden (Abb. 19A). Die Expression von Leptin blieb sowohl nach der Supplementierung von Visfatin als auch von Leptin selbst nicht signifikant verändert (Abb. 19B). Lediglich nach Visfatin-Stimulierung konnte am Tag 2 eine nicht signifikante Regulation mit dem Faktor 2,4 bei Leptin beobachtet werden (Abb. 19B). Insgesamt nahmen

die untersuchten Adipokine keinen Effekt auf das adipogene Differenzierungsprofil der hMSCs/phMSCs.

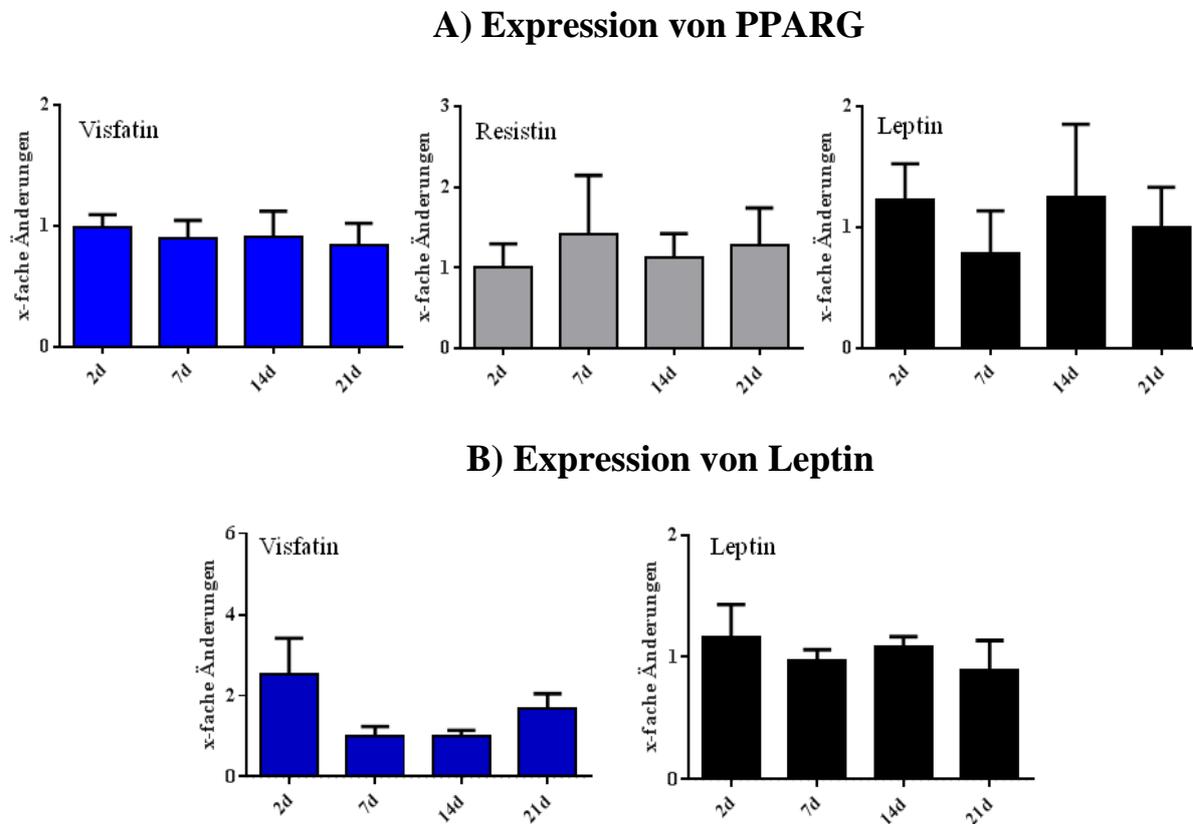


Abb. 19: **Einfluss von Adipokinen auf das adipogene Differenzierungspotential von hMSCs/phMSCs.** A PPARG-Genexpression nach der Supplementierung von Visfatin (n=7), Resistin (n=4) und Leptin (n=4). B Genexpression von Leptin nach der Stimulation mit Visfatin (n=6) und Leptin (n=4) im Laufe der Adipogenese. Die Graphen stellen die x-fache Genexpressionsänderungen dar. Genexpression wurde auf 18s normalisiert. Die jeweilige unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde für alle Parameter auf 1 gesetzt. Adipokine nahmen keinen Einfluss auf die Expression von PPARG und Leptin.

4.3.3 Effekte von Adipokinen auf die Gen- und Proteinexpression von MMPs

Zur Analyse der Rolle von Adipokinen in der Expression von Matrix-abbauenden Enzymen wie MMPs wurden die Genexpressionsanalysen einer Kollagenase, MMP13, und einer Gelatinase, MMP2, mittels Real-Time-PCR sowie die Proteinexpression von MMP13 in den Zellkulturüberständen mittels ELISA überprüft. Während die Adipokine Resistin und Leptin zu keiner signifikant veränderten Genexpression von MMP2 oder MMP13 im Verlauf der adipogenen Differenzierung führten, konnte eine signifikante Erhöhung die Genexpression von

MMP2 (Abb. 20) und MMP13 (Abb. 21) durch Visfatin detektiert werden. Die Genexpression von MMP2 war signifikant um den Faktor 2,8 nach 14d, und um den Faktor 5,0 nach 21d durch Visfatin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in primär isolierten phMSCs erhöht (Abb. 20A, [202]). Bei den kommerziell erworbenen hMSCs konnte keine Induktion von MMP2 durch Visfatin beobachtet werden.

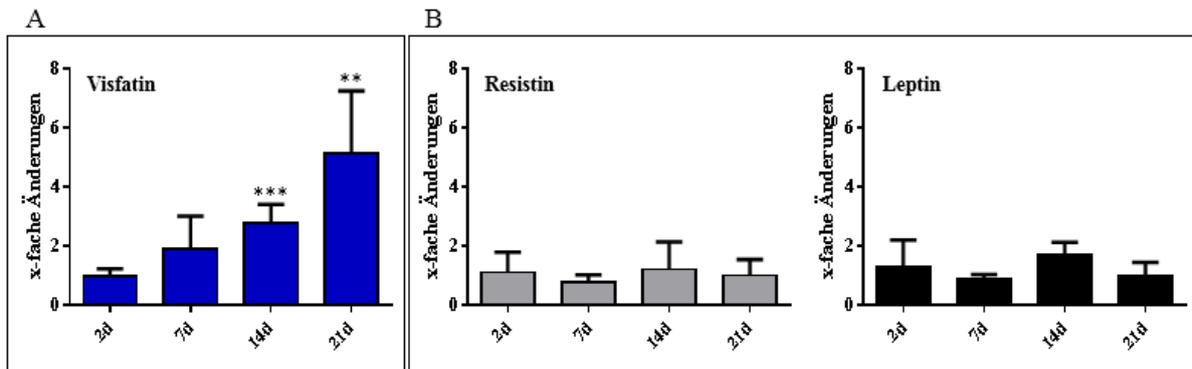


Abb. 20: **Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von MMP2 im Verlauf der adipogenen Differenzierung der phMSCs.** A MMP2-Genexpression nach Supplementierung von Visfatin (n=6). B Genexpression von MMP2 nach der Stimulation mit Leptin und Resistin (je n=3). Die Graphen geben die x-fache Expressionsänderung des untersuchten Gens an. Die jeweilige unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde auf 1 gesetzt. Die Adipokine Leptin und Resistin veränderten die MMP2- Genexpression nicht, während ein signifikanter Genexpressionsanstieg von MMP2 durch Visfatin nach 14d und 21d der adipogenen Differenzierung nachgewiesen werden konnte. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***)).

Der Visfatin-induzierte signifikante Expressionsanstieg von MMP13 mRNA konnte nach 7d, 14d und 21d (7d: 41-fach, 14d: 55-fach, 21d: 81-fach; n=12) nach der Induktion der Adipogenese sowohl in hMSCs als auch in phMSCs nachgewiesen werden (Abb. 21A). Hingegen war die MMP13-Genexpression am Tag 2 nicht signifikant durch Visfatin verändert (1,1-fach) [202]. Stimulation mit Leptin und Resistin führte nicht zu einer signifikant veränderten Genexpression von MMP13 (Abb. 21B).

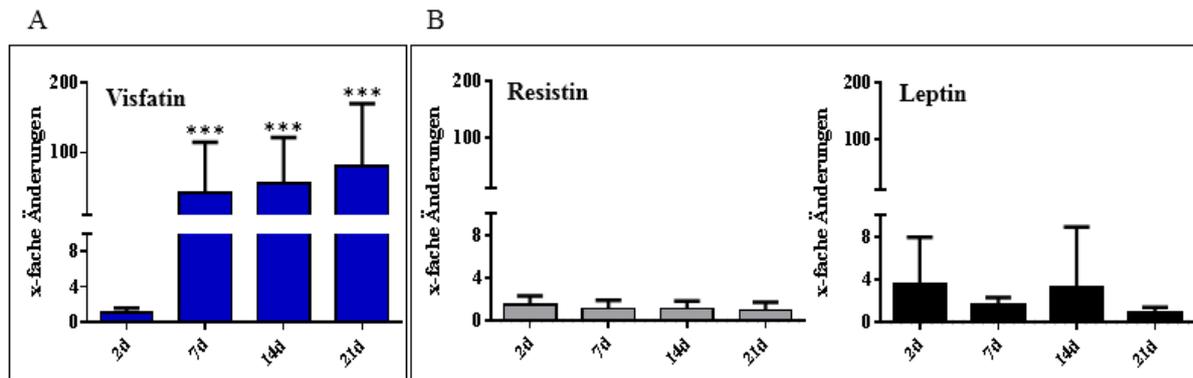


Abb. 21: **Einfluss von Adipokinen auf die mRNA Expression von MMP13 im Verlauf der adipogenen Differenzierung der hMSCs/phMSCs.** A MMP13-Genexpression nach der Supplementierung von Visfatin (n=6). B Genexpression von MMP13 nach der Stimulation mit Leptin und Resistin (je n=3). Die Graphen geben die x-fache Expressionsänderung des untersuchten Gens an. Die jeweilige unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde auf 1 gesetzt. Visfatin führte zu einem signifikanten Expressionsanstieg von MMP13 mRNA in adipogen differenzierenden hMSCs/phMSCs, während Resistin und Leptin die MMP13-Genexpression nicht signifikant veränderten. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,001$ (***)

Um die erhöhte Expressionsrate von MMP13 auf Proteinebene zu verifizieren, wurde die MMP13 Proteinexpression in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen (Abb. 22). Entsprechend zu den Real-Time-PCR Daten zeigte sich die MMP13 Proteinexpression signifikant durch Visfatin nach 7d, 14d und 21d im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erhöht. Zum Beginn der adipogenen Differenzierung (2d) führte Visfatin zu keiner signifikanten Erhöhung von MMP13 [202]. Die hMSCs und phMSCs reagierten identisch hinsichtlich der MMP13-Expression. Daher sind die Daten graphisch in Abb. 21 und 22 sowie in Tab.13 zusammengefasst dargestellt.

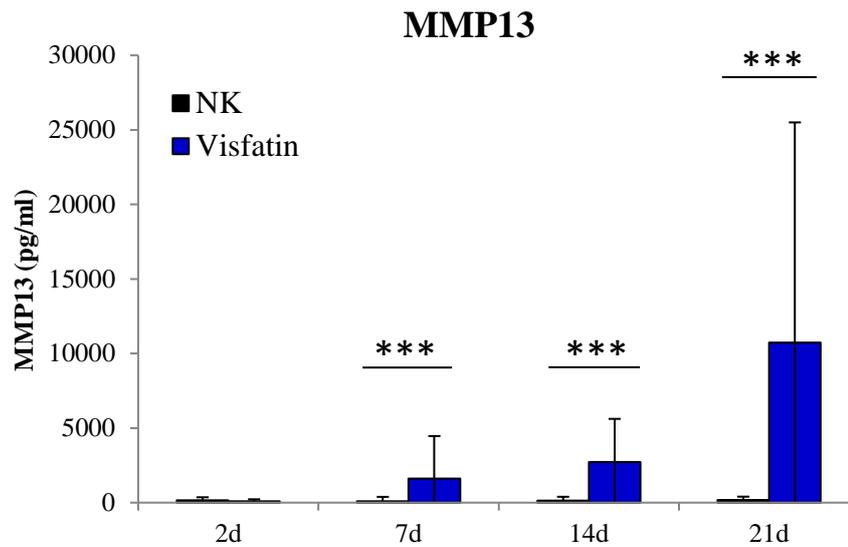


Abb. 22: Einfluss von Visfatin auf die Proteinexpression von MMP13 im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs. Die durch Visfatin induzierte MMP13-Proteinexpression im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle (NK, n=12) wurde mittels ELISA in den Zellkulturüberständen untersucht. ab 7d des Zeitverlaufs der adipogenen Differenzierung konnte eine signifikant erhöhte MMP13-Proteinexpression durch Visfatin in adipogen differenzierenden hMSCs/phMSCs beobachtet werden. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,001$ (***)).

Tab.13 Synthese von MMP13 in Zellkulturüberständen von Visfatin-stimulierten und unstimulierten hMSCs/phMSCs im Verlauf der adipogenen Differenzierung

Gruppe	MMP13 (pg/ml)
2d_NK	146,7 ± 214,57
2d_Visfatin	90,7 ± 133,43
7d_NK	100,7 ± 82,57
7d_Visfatin	1609 ± 2857,8
14d_NK	145,3 ± 71,19
14d_Visfatin	2734 ± 2884,7
21d_NK	179,9 ± 64,04
21d_Visfatin	10725 ± 14266

4.3.4 Effekte von Adipokinen auf die Genexpression von TIMPs

Die Stimulierung der hMSCs sowie von phMSCs mit Adipokinen während der adipogenen Differenzierung führte im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle zu keiner Veränderung der Genexpression von TIMP1 und TIMP2. In Abb. 23 sind die x-fachen Expressionsänderungen dieser Gene durch die Adipokine Resistin, Leptin und Visfatin dargestellt. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

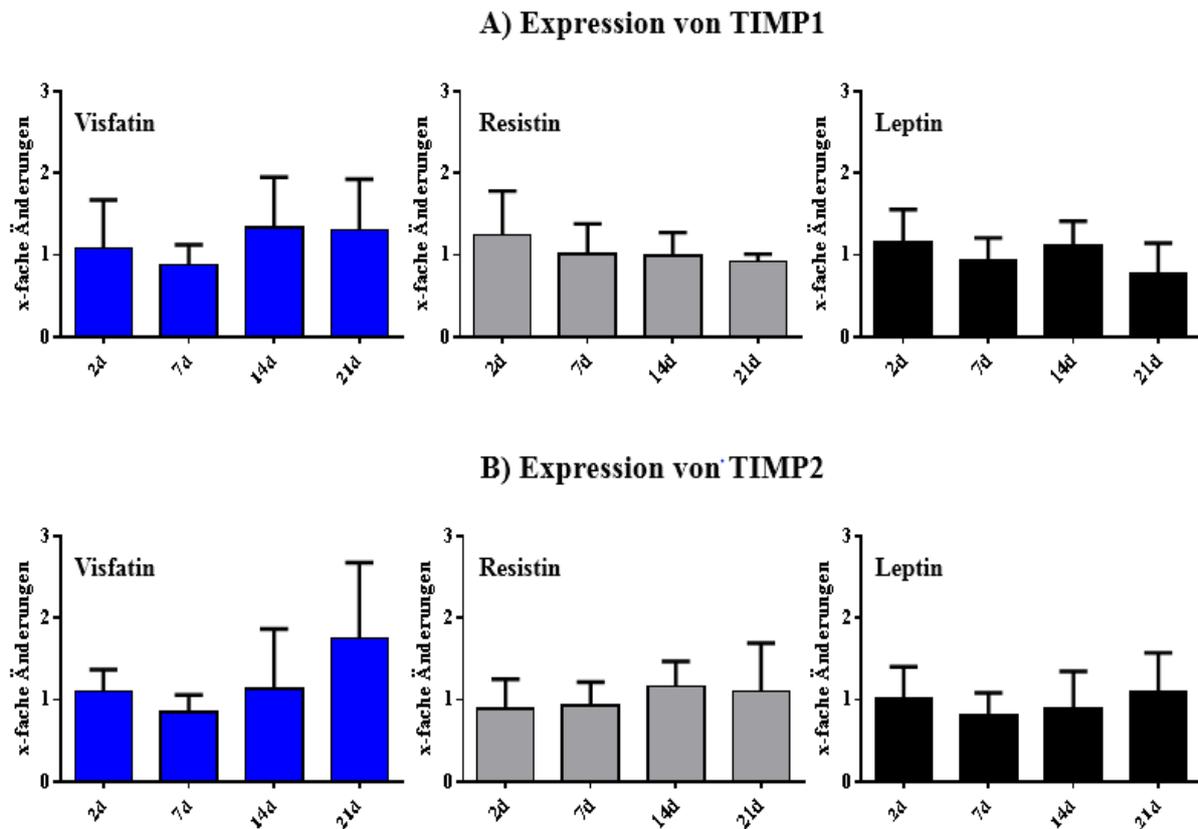


Abb. 23: Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von TIMPs im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs. A Genexpression von TIMP1 nach der Supplementierung von Visfatin, Resistin und Leptin (je n=6). B Genexpression von TIMP2 nach der Stimulation mit Visfatin, Leptin und Resistin (je n=6). Die Graphen geben die x-fache Expressionsänderung der untersuchten Gene an. Die Genexpression wurde auf 18s normalisiert und die unstimulierte Kontrolle auf 1 gesetzt. Es konnten keine Expressionsänderungen von TIMP1 und -2 durch die Adipokine während der Adipogenese nachgewiesen werden.

4.3.5 Effekte von Adipokinen auf die Synthese von Entzündungsmediatoren bei der adipogenen Differenzierung

4.3.5.1 Effekte von Visfatin auf die Synthese von Entzündungsmediatoren bei der adipogenen Differenzierung

Für die Untersuchung des Einflusses von Visfatin auf Entzündungsmediatoren während der adipogenen Differenzierung wurden die hMSCs sowie phMSCs in Richtung Adipozyten differenziert und permanent über 21d mit Visfatin stimuliert. Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL6, IL8 und MCP1 in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA analysiert. Bereits in der Basisproduktion der untersuchten Entzündungsmediatoren zeigten die Analysen starke populationsabhängige und somit von Patienten abhängige Unterschiede. Durch die Stimulierung mit Visfatin kam es im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer signifikanten Erhöhung der IL6-, IL8- und MCP1-Abgabe zu allen analysierten Zeitpunkten mit Ausnahme von MCP1 an Tag 2 [202]. Die Visfatin-induzierten Änderungen der absoluten Konzentrationen von IL6, IL8 und MCP1 von adipogen differenzierten hMSCs und phMSCs sind in Tab. 14 zusammengefasst und in Abb. 24 graphisch dargestellt.

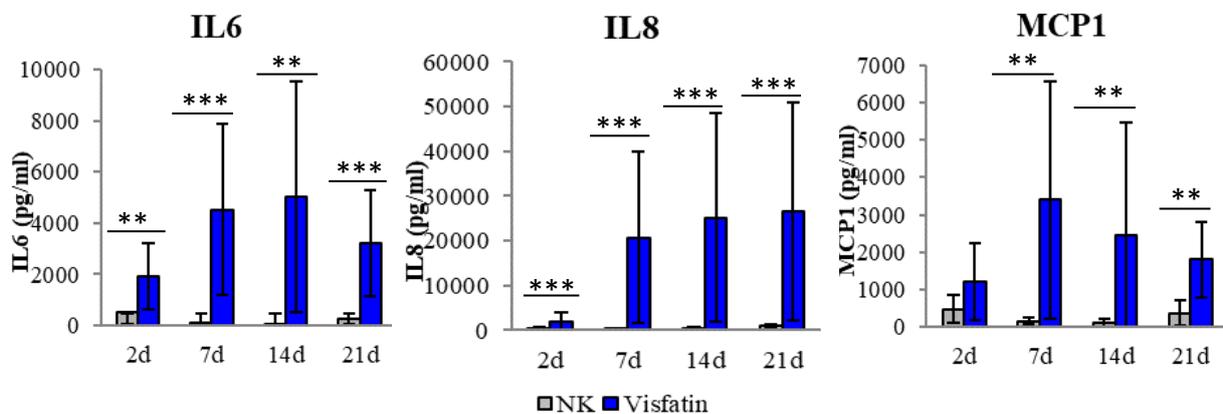


Abb. 24: Einfluss von Visfatin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs. Visfatin-induzierte Expression von IL6 (n=12), IL8 (n=12) und MCP1 (n=9). Durch die Stimulierung mit Visfatin kam es zu einer signifikanten Erhöhung der IL6-, IL8- und MCP1-Abgabe im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (NK) zu allen analysierten Zeitpunkten mit Ausnahme von MCP1 an Tag 2. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

Tab.14 Synthese von IL6, MCP1 und IL8 in Zellkulturüberständen von Visfatin-stimulierten und unstimulierten hMSCs/phMSCs im Verlauf der adipogenen Differenzierung

Gruppe	IL6 (pg/ml)	MCP1 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)
2d_NK	514,6 ± 395,4	483,0 ± 386,6	403,4 ± 417,8
2d_Visfatin	1915,4 ± 1279,8	1218,0 ± 1025,2	1975,4 ± 1898,5
7d_NK	87,4 ± 73,6	200,0 ± 109,06	302,5 ± 246,5
7d_Visfatin	4532,7 ± 3337,8	3398,0 ± 3161,3	20750,3 ± 19255,3
14d_NK	68,3 ± 89,8	196,0 ± 185,5	365,9 ± 381,5
14d_Visfatin	5015,8 ± 4505,8	2440,0 ± 3010,6	25209,8 ± 23401,2
21d_NK	270,3 ± 485,5	301,0 ± 288,2	978,8 ± 1052,2
21d_Visfatin	3227,2 ± 2079,7	1812,0 ± 1009,8	26512,1 ± 24431,1

4.3.5.2 Effekte von Resistin auf die Abgabe von Entzündungsmediatoren bei der adipogenen Differenzierung

Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL6, IL8 und MCP1 in den Zellkulturüberständen der Resistin-stimulierten Zellen wurde mittels ELISA analysiert und mit unstimulierten Kontrollen verglichen (Abb. 25). Durch die Stimulierung mit Resistin kam es zu einer nicht signifikanten Reduktion von IL6 über den gesamten Zeitverlauf der Differenzierung. IL8 war nach 14d und 21d reduziert, während nach 2d und 7d keine Expressionsänderung zu beobachten war. Hinsichtlich der MCP1-Produktion konnte eine nicht signifikante Induktion durch Resistin zu allen analysierten Zeitpunkten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Da die Simulierung von hMSCs sowie von phMSCs mit Resistin zur vergleichbaren Abgabe der Entzündungsmediatoren führte, wurden die Daten zusammengefasst. Die Resistin-induzierten Änderungen der absoluten Konzentrationen von IL6, IL8 und MCP1 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle sind in Abb. 25 graphisch dargestellt.

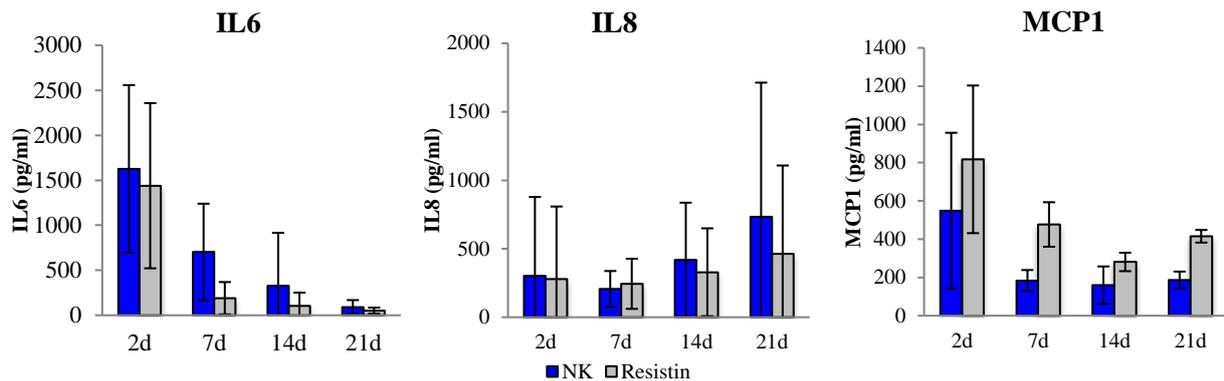


Abb. 25: Einfluss von Resistin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs. Resistin-induzierte Effekte auf IL6, IL8 und MCP1 im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle (NK, je n=6). Es konnte keine signifikante Expressionsänderung von Entzündungsmediatoren durch Resistin beobachtet werden.

4.3.5.3 Effekte von Leptin auf die Abgabe von Entzündungsmediatoren bei der adipogenen Differenzierung

Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren IL6, IL8 und MCP1 in den Zellkulturüberständen nach der Stimulierung mit Leptin wurde mittels ELISA analysiert und mit den unstimulierten Kontrollen verglichen. Nach der Stimulierung mit Leptin kam es zu einer nicht signifikanten Reduktion von IL6 über den gesamten Zeitverlauf der Differenzierung und von IL8 nach 14d und 21d. MCP1 zeigte sich ähnlich wie für Resistin nicht durch Leptin-Stimulierung differenziell exprimiert. Abb. 26 stellt die Leptin-induzierten Änderungen der absoluten Konzentrationen von IL6, IL8 und MCP1 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle sowohl von adipogen differenzierten hMSCs als auch von phMSCs dar.

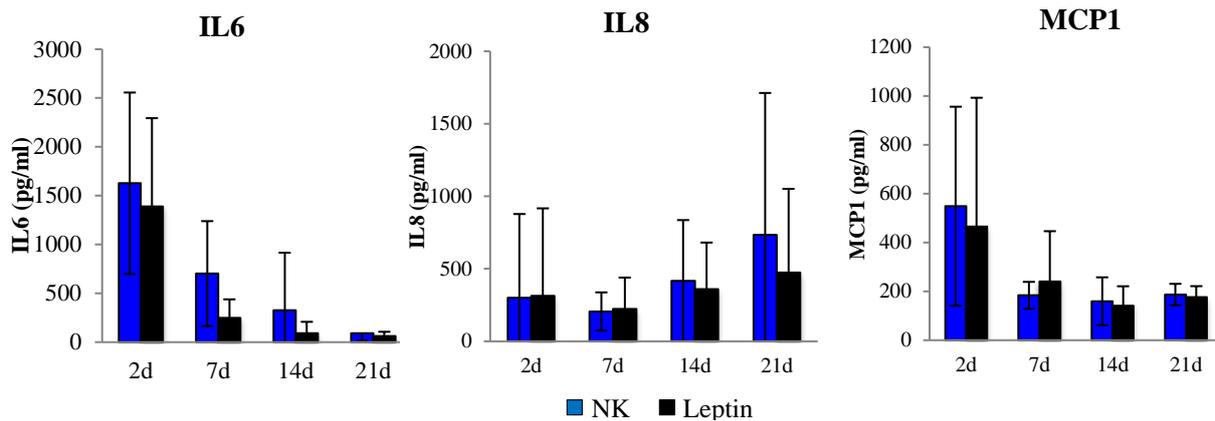


Abb. 26: Einfluss von Leptin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs. Leptin-induzierte Expression von IL6, IL8 und MCP1 im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle (NK, je n=6). Es konnte keine signifikante Expressionsänderung von Entzündungsmediatoren durch Leptin beobachtet werden.

4.3.6 Einfluss der Inhibierung von MAP-Signalwegen und Visfatin während der adipogenen Differenzierung

Wie in Kapitel 4.3.3 und 4.3.5 dargestellt, wird die MMP-Expression sowie die Expression von Entzündungsmediatoren durch Visfatin hochreguliert. Da in der Literatur beschrieben wurde, dass Visfatin seine Funktionen über die Aktivierung von p38-MAPK sowie ERK1/2-Signalwege vermittelt [191, 192], wurde die Beteiligung dieser Signalwege in den Visfatin-vermittelten Effekten im Verlauf der adipogenen Differenzierung untersucht. Zur Vermeidung der toxischen Effekte der langzeitigen Stimulierung mit p38-MAPK-Inhibitor, erfolgte die Zugabe des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 (SB) zwei Tage vor der Zellernte zu dem jeweiligen Analysezeitpunkt der Differenzierung, während die Supplementierung vom ERK-1/2-Inhibitor SCH772984 (SCH) zu jedem Medienwechsel (alle 2 bis 3 Tagen) über das gesamte Differenzierungsexperiment erfolgte. Zur Verifizierung der Visfatin-vermittelten Effekte wurde der Visfatin-Inhibitor Apo688 eingesetzt, welcher wie der ERK-1/2-Inhibitor zu jedem Medienwechsel über das gesamte Differenzierungsexperiment hinzugegeben wurde. Der Einfluss der Inhibitoren wurde sowohl bezüglich der Visfatin-vermittelten Veränderung der MMP13-Expression als auch bezüglich der Induktion der Entzündungsmediatoren IL6, IL8 und MCP1 analysiert. Die langfristige Stimulierung der hMSCs/phMSCs mit Apo688 allein führte zur Induktion vom Zelltod zu den späteren Zeitpunkten der Differenzierung. Interessanterweise hob die Visfatin-Supplementierung den apoptotischen Effekt des Apo-Inhibitors allein auf.

Zudem reagierten die verschiedenen Zellpopulationen unterschiedlich stark apoptotisch auf die Stimulierung mit Apo866. Da die Zelldichte jedoch für eine erfolgreiche adipogene Differenzierung ausschlaggebend ist, könnte das Differenzierungsverhalten der Zellen durch die Apo-induzierte Zellreduktion unter Langzeitstimulierung beeinflusst werden und dadurch den Einfluss auf die gemessenen Parameter nehmen. Daher wurden die Visfatin-stimulierten bzw. Visfatin/Apo-kostimulierten Proben hinsichtlich der Expression von proinflammatorischen Molekülen miteinander verglichen, jedoch nicht im Vergleich zu einem der anderen Inhibitoren bzw. mit dem apoptotisch wirkenden Apo-Inhibitor allein.

4.3.6.1 Effekte der Kostimulation von Visfatin mit Apo866, SB203580 und SCH772984 auf Abgabe der Entzündungsmediatoren

Der Einfluss der p38-MAPK- und ERK1/2-Inhibitoren auf die Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren wurden in Kostimulierungsexperimenten mit Visfatin und Apo866 bzw. SB203580 und SCH772984 durchgeführt. Die Messung von IL6, IL8 und MCP1 erfolgte mittels ELISA. Die Änderungen der Visfatin-induzierten absoluten Konzentrationen von IL6, IL8 und MCP1 durch Inhibitoren Apo866 und SB203580 in adipogen differenzierten hMSCs und phMSCs sind in Tab. 15 zusammengefasst und in Abb. 27 graphisch dargestellt. Die Stimulation mit Apo866 in Kombination mit Visfatin führte zu einer signifikanten Reduktion der Visfatin-induzierten IL6- und IL8-Sekretion sowohl nach 2d und 7d als auch nach 14d und 21d der adipogenen Differenzierung (Abb. 27 A, B). Die Visfatin-vermittelte MCP1-Sekretion durch Apo war zu frühen Zeitpunkten (d2, d7) kaum nachweisbar. Allerdings war die MCP1-Produktion im Vergleich zu Visfatin-stimulierten Proben durch den Visfatin-Inhibitor am Tag 14 signifikant reduziert und an d21 sichtbar (Abb. 27 C).

Unter Stimulierung mit p38-MAPK-Inhibitor SB203580 konnte keine Zellzahlreduktion während der adipogenen Differenzierung beobachtet werden. Daher lagen keine Hinweise vor, die auf toxische Effekte des p38-MAPK-Inhibitors hindeuten würden. Die Kostimulation mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB203580 resultierte nicht in signifikanten oder physiologisch relevanten Konzentrationsänderungen von Entzündungsmediatoren im Vergleich zu Proben die allein mit Visfatin behandelt wurden (Abb. 27 A, B, C; rechte Seite).

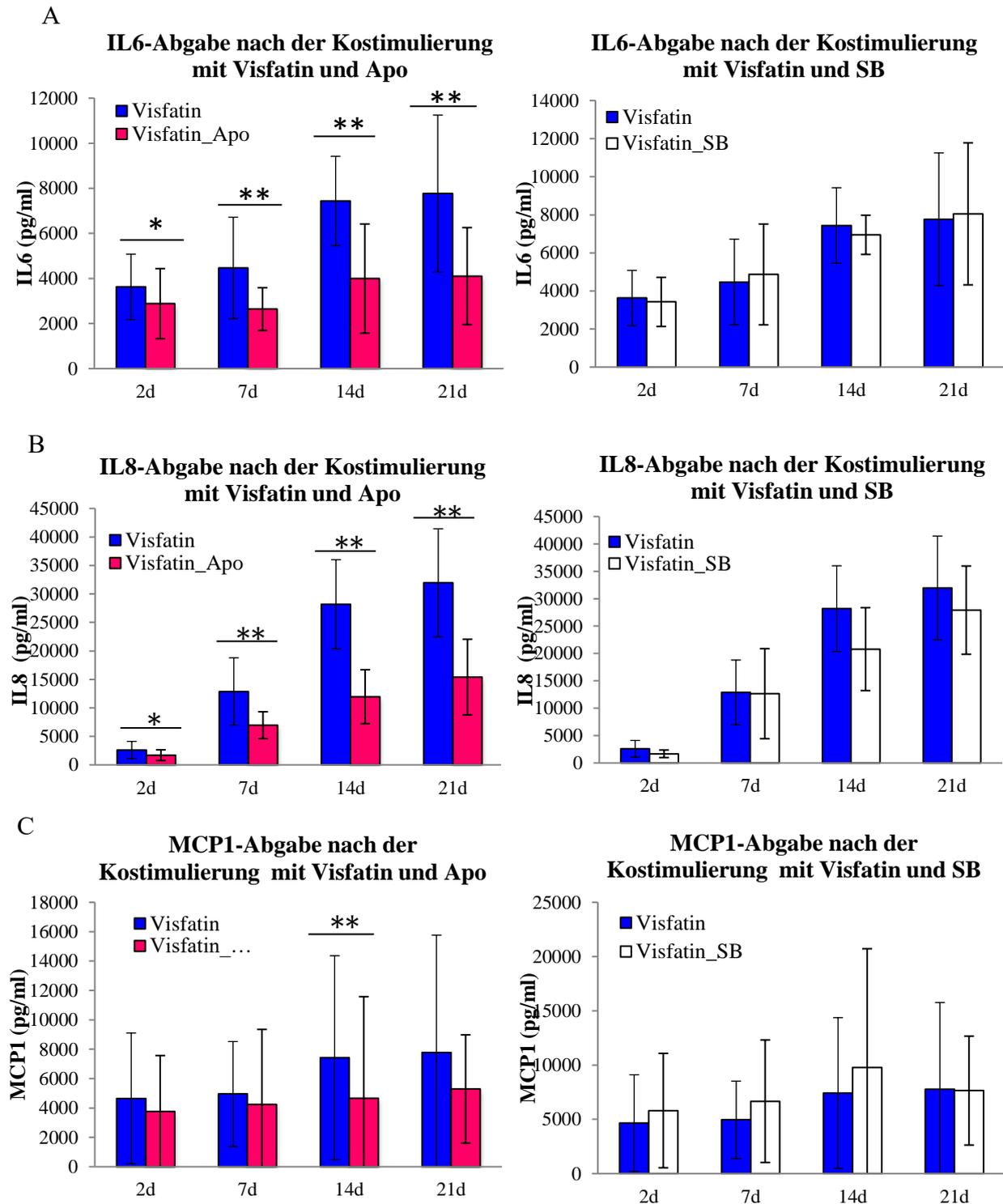


Abb. 27: Einfluss von Inhibitoren SB203580 und Apo866 auf die Visfatin-induzierte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs. Expression von IL6 (A), IL8 (B) und MCP1 (C, je n=8) nach der Kostimulation von Visfatin in Kombination mit Apo688 und SB203580. Während Kostimulation mit Apo866 in einer Erniedrigung der Visfatin-induzierten Expression von Entzündungsmediatoren resultierte, führte die Zugabe des p38-MAPK-Inhibitors nicht zu einer Expressionsänderung der Entzündungsmediatoren. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Tab.15 Synthese der Entzündungsmediatoren durch adipogen differenzierte Zellen nach der Kostimulation mit Visfatin und Inhibitoren

Gruppe	IL6 (pg/ml)	MCP1 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)
2d_Visfatin	3628,8 ± 1451,7	4650,2 ± 4450,9	2595,6 ± 1522,5
2d_Visfatin-Apo	2882,6 ± 1552,7	3761,6 ± 3807,0	1693,6 ± 935,9
2d_Visfatin-SB	3425,6 ± 1288,4	5806,5 ± 5271,1	1677,7 ± 688,6
7d_Visfatin	4466,5 ± 2252,1	4953,7 ± 3566,6	12876,4 ± 5914,2
7d_Visfatin-Apo	2643,4 ± 948,9	4233,5 ± 5114,6	6962,6 ± 2354,5
7d_Visfatin-SB	4868,9 ± 2646,8	6664,3 ± 5644,4	12658,5 ± 8226,3
14d_Visfatin	7439,2 ± 1983,6	7422,3 ± 6941,1	28186,9 ± 7828,5
14d_Visfatin-Apo	3994,5 ± 2423,6	4665,8 ± 6910,2	11961,8 ± 4738,1
14d_Visfatin-SB	6949,9 ± 1028,5	9770,6 ± 10943,9	20790,2 ± 7568,2
21d_Visfatin	7768,0 ± 3482,1	7774,5 ± 7986,1	31964,0 ± 9477,8
21d_Visfatin-Apo	4105,2 ± 2152,3	5291,3 ± 3683,8	15407,8 ± 6633,0
21d_Visfatin-SB	8048,1 ± 3731,4	7644,1 ± 5017,8	27913,6 ± 8052,5

Die Inhibierung des ERK1/2-Signalwegs führte zu einer nahezu vollständigen Suppression der Visfatin-induzierten proinflammatorischen Proteine zu allen Analysezeitpunkten (Abb. 28). Aufgrund der geringeren Fallzahlen und der hohen Patienten-abhängigen Variabilität konnten jedoch nicht zu jedem Zeitpunkt Signifikanzen erreicht werden. Die Visfatin-vermittelte Abgabe von IL6 war am 2d und 7d und für IL8 am 14d der adipogenen Differenzierung signifikant durch den ERK-Inhibitor erniedrigt. Eine signifikante Reduktion von MCP1 durch die Blockierung von ERK1/2 konnte nach 21d der Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 28). Die absoluten Konzentrationen der Entzündungsmediatoren während der Kostimulationsexperimente mit ERK-Inhibitor sind für hMSCs und phMSCs zusammengefasst in der Tab.16 dargestellt.

Abgabe der Entzündungsmediatoren nach Kostimulation mit Visfatin und ERK-Inhibitor

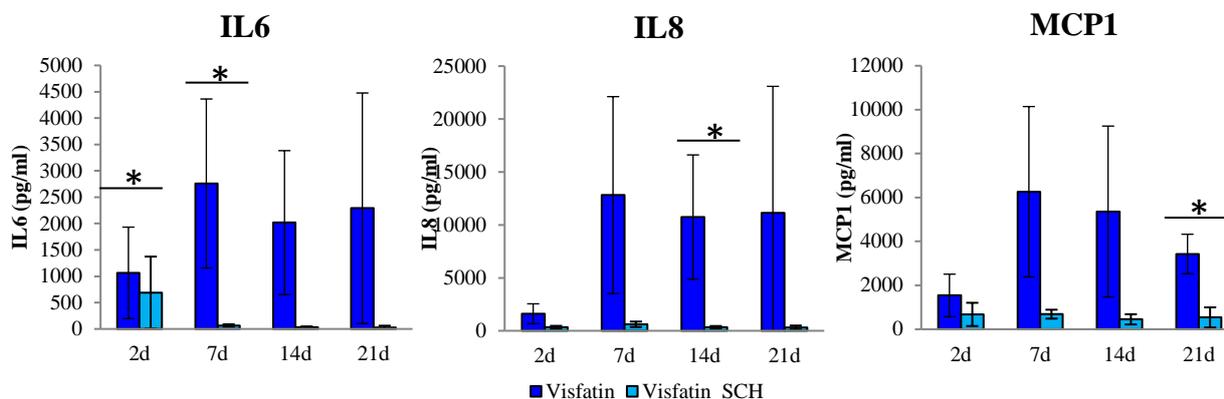


Abb. 28: Einfluss der Inhibierung von ERK1/2-Signalweg auf die Ausschüttung von Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs (je n=4). Die Inhibierung des ERK1/2-Signalwegs führte zu einer nahezu vollständigen Suppression der Visfatin-induzierten proinflammatorischen Proteine während des gesamten Zeitverlaufs der adipogenen Differenzierung. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*).

Tab.16 Synthese der Entzündungsmediatoren durch adipogen differenzierte Zellen nach der Kostimulation mit Visfatin und ERK1/2-Inhibitor

Gruppe	IL6 (pg/ml)	IL8 (pg/ml)	MCP1 (pg/ml)
2d_Visfatin	1063,9 ± 868,0	2266,7 ± 1397,4	3614,4 ± 3899,1
2d_Visfatin-SCH	691,1 ± 681,8	332,9 ± 132,8	675,2 ± 529,5
7d_Visfatin	2759,2 ± 1604,5	12857,4 ± 6770,9	5390,6 ± 3551,6
7d_Visfatin-SCH	66,6 ± 23,1	613,9 ± 255,1	686,3 ± 203,7
14d_Visfatin	2018,0 ± 1364,0	22372,6 ± 11052,5	6736,2 ± 5984,6
14d_Visfatin-SCH	33,6 ± 14,6	338,4 ± 111,2	452,1 ± 233,2
21d_Visfatin	2290,6 ± 2187,0	25026,9 ± 14177,8	6325,8 ± 6736,8
21d_Visfatin-SCH	27,7 ± 34,1	306,8 ± 187,7	539,4 ± 458,1

4.3.6.2 Effekte von Kostimulation von Visfatin mit Apo866, SB203580 und SCH772984 auf mRNA- und Proteinexpression von MMP13

Der Effekt der Inhibierung von Visfatin-, p38-MAPK- sowie ERK1/2-abhängigen Signalwegen auf die Visfatin-induzierte MMP13-Expression wurde auf mRNA sowie Proteinebene in Kostimulierungsexperimenten mit Visfatin und Apo688, SB203580 und SCH772984 während der adipogenen Differenzierung analysiert. Unter Stimulierung mit dem Apo866-Inhibitor wurde die Induktion von Zelltod zu den späten Zeitpunkten der Differenzierung wie bereits unter 4.3.6.1 beschrieben beobachtet. Um den möglichen Einfluss der Apo-induzierten apoptotischen Effekte auf die MMP13-Genexpression zu veranschaulichen, sind in Abb. 29 sowohl die auf unstimulierte Kontrolle bzw. nur mit Apo-stimulierter Kontrolle normalisierten x-fachen Genexpressionsänderungen von MMP13 (Abb. 29A) als auch die Δ Ct-Werte von Visfatin- bzw. Visfatin/Apo-stimulierten Proben dargestellt (Abb. 29B).

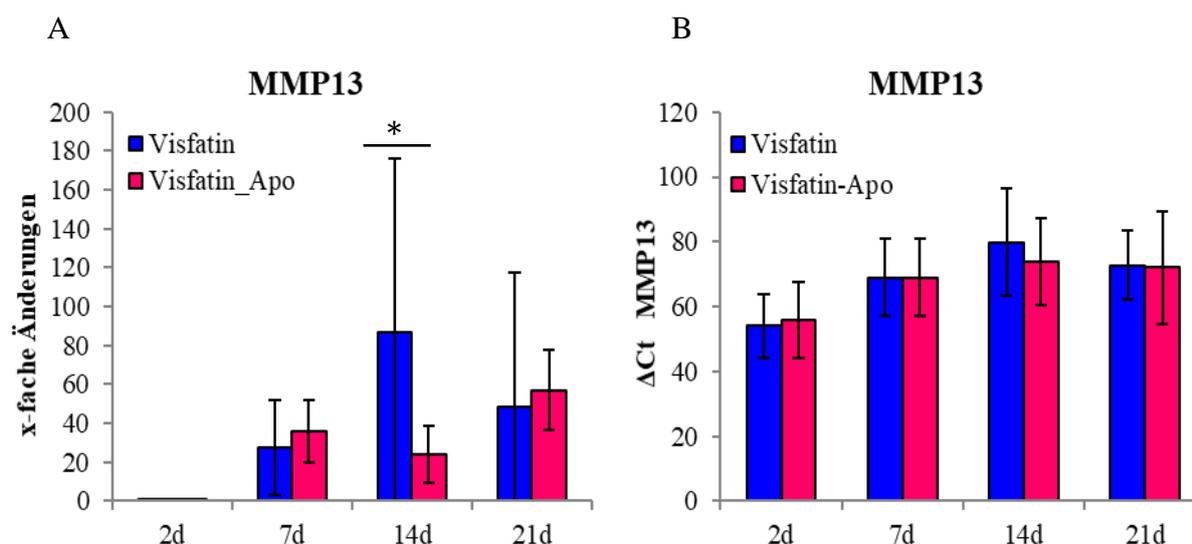


Abb. 29: Einfluss von Apo866 auf die Visfatin-induzierte mRNA-Expression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung der hMSCs/phMSCs. A x-fache Genexpressionsänderungen von MMP13 in adipogen differenzierenden hMSCs/phMSCs nach Stimulierung mit Visfatin bzw. Visfatin/Apo. B Δ Ct-Werte von MMP13 nach der Stimulierung mit Visfatin bzw. Visfatin/Apo. Bei den Genexpressionsanalysen diente 18s als *House keeping gene* für die Normalisierung. Der Graph A gibt die x-fachen Änderungen der Genexpression an. Die unstimulierten bzw. mit Apo stimulierten Kontrollen dienten als Basis und wurden auf 1 gesetzt. Anhand der x-fachen Genexpressionsänderungen und Δ Ct-Werte konnte eine Reduktion der Visfatin-induzierten MMP13-Expression durch Apo nur nach 14d der Adipogenese beobachtet werden, während an allen anderen drei Analysezeitpunkten kein signifikanter Effekt von Apo ersichtlich wurde. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*).

Eine signifikante Reduktion der Visfatin-induzierten MMP13-Genexpression durch Apo war nur am Tag 14 der Adipogenese auf mRNA-Ebene detektierbar (Abb. 29), was trotz der populationsabhängigen Variabilität in beiden Abbildungen ersichtlich wird. An allen anderen drei Analysezeitpunkten konnte kein signifikanter Effekt von Apo auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Die x-fachen Genexpressionsänderungen, in denen nicht die Apo-induzierten Effekte ausgeschlossen sind, zeigten zwar eine nicht signifikante, aber leicht erhöhte MMP13-Expression durch Apo866, während in den ∇ Ct-Werten diese Effekte nicht zu beobachten waren. Allerdings war auf Proteinebene eine signifikante Reduktion von MMP13 durch den Apo-Inhibitor sowohl nach 14d als auch 21d erkennbar (Abb. 30).

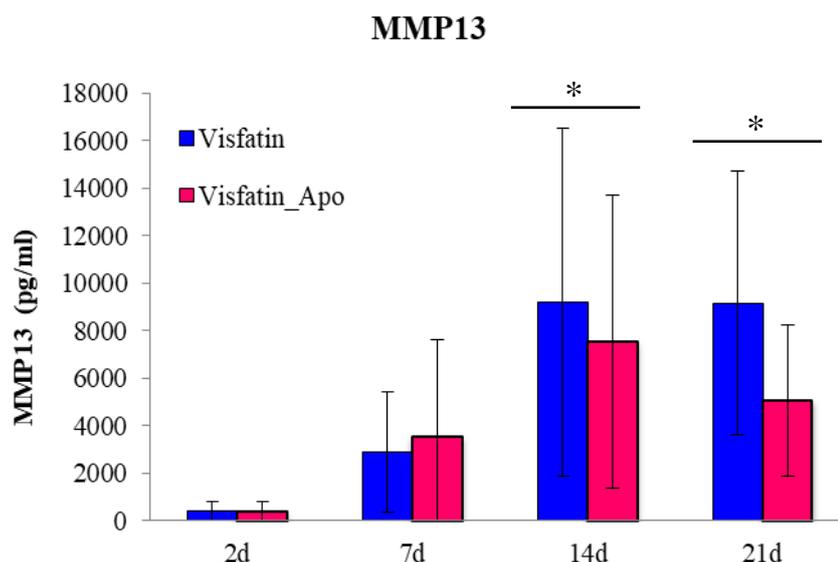


Abb. 30: Einfluss von Apo866 auf die Visfatin-induzierte Protein-Expression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung der hMSCs/phMSCs. Es konnte eine signifikante Reduktion der Visfatin-induzierten MMP13-Expression durch Apo866 sowohl nach 14d als auch 21d der adipogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*).

Die Reduktion der Visfatin-vermittelten MMP13 mRNA-Expression nach der Kostimulation mit SB203580 war zu 14d und 21d ersichtlich, aber eine statistische Signifikanz konnte nur für den Zeitpunkt 14d aufgrund der hohen Patienten-abhängigen Variabilität erreicht werden (Abb. 31A). Auf Proteinlevel zeigte sich die Visfatin-induzierte MMP13-Expression signifikant reduziert nach 7d, 14d und 21d nach Induktion der Adipogenese in Folge der Kostimulation mit p38-MAPK-Inhibitor (Abb. 31B).

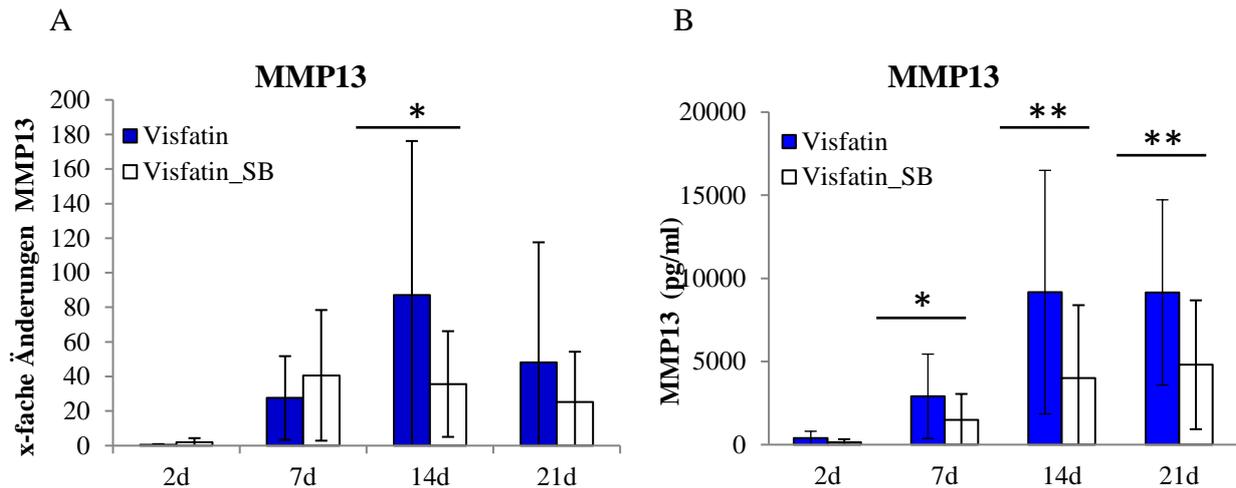


Abb. 31: Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors auf die Visfatin-induzierte Expression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs. A Visfatin-vermittelte MMP13 mRNA-Expression. B Visfatin-vermittelten MMP13 Proteinexpression. Durch die Kostimulation mit p38-MAPK-Inhibitor konnte eine Reduktion der Visfatin-induzierten MMP13-Expression sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene mit Ausnahme der Zeitpunkte 2d und 7d beobachtet werden. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Die Stimulierung mit einem ERK1/2-Inhibitor führte zu einer nahezu kompletten Suppression der Visfatin-induzierten MMP13-Proteinexpression während der adipogenen Differenzierung. Der inhibierende Effekt des ERK1/2-Inhibitors auf die Visfatin-induzierte MMP13-Produktion war nach 7d, 14d und 21d der Adipogenese signifikant (Abb. 32).

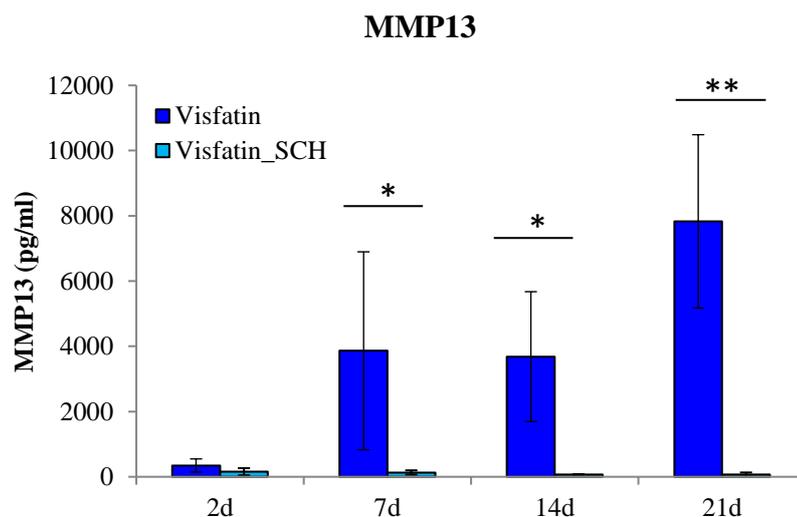


Abb. 32: Einfluss eines ERK1/2-Inhibitors auf die Visfatin-induzierte Proteinexpression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs. Die Inhibierung des ERK1/2-Signalwegs führte zu einer Suppression der Visfatin-vermittelten MMP13-Expression während des gesamten Zeitverlaufs der adipogenen Differenzierung. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

4.3.6.3 Effekte der Kostimulation von Visfatin mit Apo866 auf die Expression von adipogenen Markergenen

Um den Einfluss des Visfatin-Inhibitors auf das adipogene Differenzierungsverhalten von hMSCs/phMSCs zu analysieren, wurde die Expression von Leptin und PPARG nach dem Kostimulierungsexperiment mit Visfatin und Apo untersucht. Die Kostimulation mit Visfatin in Kombination mit Apo-Inhibitor führte während der adipogenen Differenzierung zu keiner signifikanten Änderung der Visfatin-vermittelten Expression des adipogenen Transkriptionsmarkers PPARG um mindestens den Faktor 2. Bezüglich der Genexpression von Leptin zeigte sich erneut eine starke Heterogenität. Während die Leptin-Genexpression nach zwei Tagen der Adipogenese durch Visfatin nicht signifikant hochreguliert war, reduzierte die Zugabe von Apo866 die Expression dieses Genes. Zu den späteren Zeitpunkten der adipogenen Differenzierung konnte ein gegensätzlicher Effekt beobachtet werden: Die Visfatin-induzierte Leptinexpression verringerte sich an 14d und 21d nach der Induktion der Adipogenese, während die Kostimulation mit Apo wieder zu einem Expressionsanstieg von Leptin führte (Abb. 33). Allerdings konnten mit der bisher verwendeten geringeren Fallzahl und der hohen populationsabhängigen Variabilität und der limitierten Effektgröße keine Signifikanzen erreicht werden.

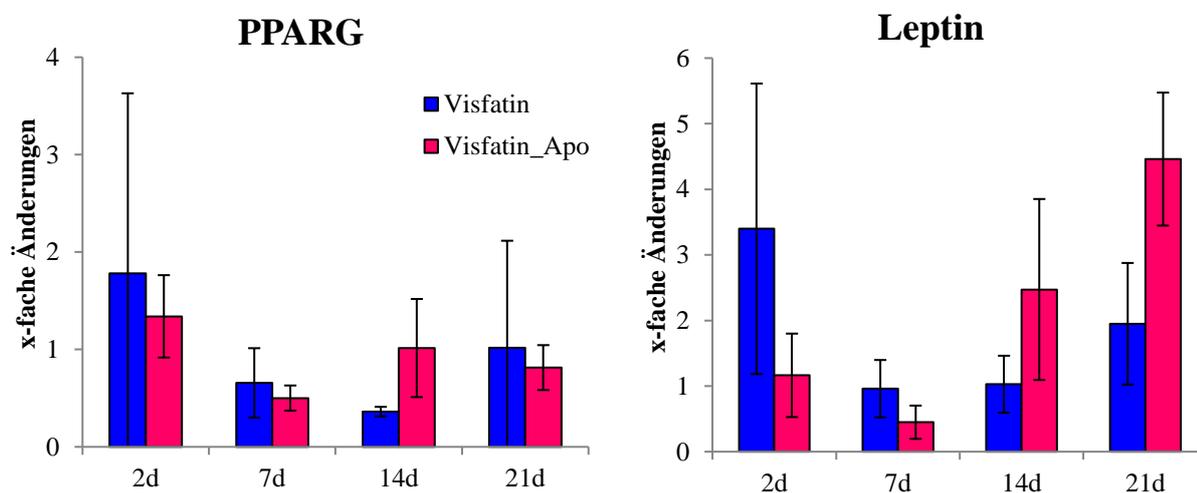


Abb. 33: Einfluss von Apo auf die Visfatin-induzierte Genexpression von Leptin und PPARG während der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs (n=4). Bei den Genexpressionsanalysen diente 18s als *Housekeeping* Gen für die Normalisierung. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Visfatin-induzierte PPARG-Genexpression zeigte sich nicht durch Apo866 beeinflusst. Hinsichtlich der Visfatin-induzierten Leptin-Genexpression konnte zu den frühen Zeitpunkten der Adipogenese eine Herunterregulation durch Visfatin-Inhibitor beobachtet werden, während nach 14d und 21d eine nicht signifikante Erhöhung durch Apo688 festzustellen war.

Abb. 34 stellt im Gegensatz zu Abb. 33 die basale Expression von Leptin und PPARG ohne Stimulierung mit Visfatin in Anwesenheit bzw. Abwesenheit des Apo-Inhibitors dar. Die basale Expression von PPARG erhöhte sich wie erwartet über den Beobachtungszeitraum. Es konnte keine signifikante Genexpressionsänderung von PPARG nach der Stimulierung mit dem Apo-Inhibitor allein (in Abwesenheit von Visfatin) verzeichnet werden. Hinsichtlich der Leptin-Genexpression konnte ebenfalls ein stetiger Expressionsanstieg im Verlauf der Differenzierung nachgewiesen werden, während die Zugabe des Apo-Inhibitors zu einer nicht signifikanten reduzierten Expression des Leptin-Gens führte (Abb. 34; 7d, 14d und 21d). Hierbei ist jedoch der bereits beschriebene apoptotische Effekt des Apo-Inhibitors allein bei den späteren Zeitpunkten (14d, 21d) nicht auszuschließen.

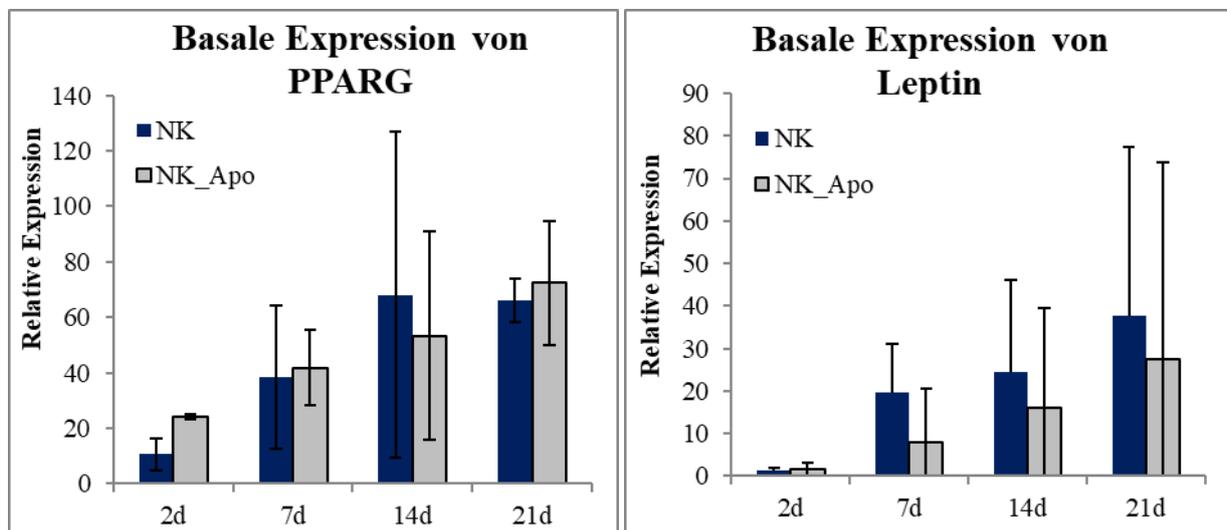


Abb. 34: Einfluss von Apo auf das basale Genexpressionslevel von Leptin und PPARG während der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs (n=3). Während die PPARG-Genexpression durch Apo688 tendenziell nicht verändert wurde, konnte eine nicht signifikante Reduktion der Leptin-genexpression nach Stimulierung mit Apo866 in adipogen differenzierenden hMSCs/MSCs nachgewiesen werden.

4.4 Adipogene Differenzierung von MSCs unter Einfluss von Visfatin in *in vitro*-Spongiosa-Transfer-Experimenten

Die adipogene Differenzierung wurde auf gereinigten humanen Spongiosafragmenten im 3D-Kulturmodell durchgeführt, um den *in-vivo*-Bedingungen möglichst nah zu kommen und den Einfluss der EZM während der adipogenen Differenzierung auf die Visfatin-vermittelten Effekte zu untersuchen. Unter Standard-Zellkultur-Bedingungen nahm während der

adipogenen Differenzierung lediglich das Adipokin Visfatin einen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Deshalb wurde bei den Spongiosa-Transfer-Experimenten nur die Stimulierung mit Visfatin durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Porosität der Knochenfragmente konnten jedoch nicht alle Spongiosafragmente gleichförmig isoliert und aufgereinigt werden. Pro Ansatz konnten insgesamt ca. 7-8 Spongiosastücke mit 60.000 Zellen (autolog) besiedelt und die adipogene Differenzierung induziert werden. Die Besiedelung der Spongiosa-Zwischenräume konnte nicht überprüft werden, da die experimentellen Ansätze vollständig zur RNA-Gewinnung eingesetzt wurden und für eine Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie nicht genug Material für weitere Analysen zur Verfügung stand. Die adipogene Differenzierung auf Spongiosa (aSP) wurde parallel zur Adipogenese in Standard-Kultur sowie auf Polystyrol (PS) beschichteten Platten durchgeführt und unter Verwendung der gleicher Zellpopulationen unter Normalisierung auf die jeweils unstimulierten Kontrollen miteinander verglichen.

4.4.1 Das adipogene Differenzierungspotential von MSCs auf Spongiosa unter Einfluss von Visfatin

Unter Standard-Zellkulturbedingungen konnten keine signifikanten und physiologisch relevanten Genexpressionsänderung von PPARG durch Visfatin bei der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs nachgewiesen werden. Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch während der Adipogenese auf Spongiosa ab. Die Stimulierung mit Visfatin führte zu keiner Regulation der PPARG-Expression um mindestens den Regulationsfaktor 2 im Vergleich zu unstimulierter Kontrolle in der 3D-Kultur. Die Transkriptionsspiegel von PPARG sind für beide Versuchsansätze zusammen graphisch in Abb. 35 dargestellt.

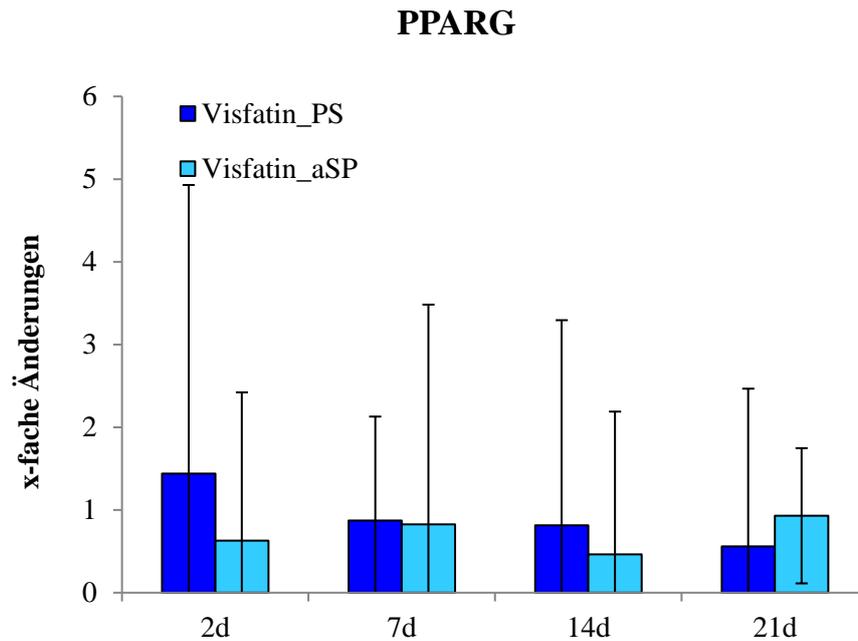


Abb. 35: Einfluss von Visfatin auf die Genexpression von PPARG während der adipogenen Differenzierung unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS) sowie auf Spongiosa (aSP, n=4). Bei den Genexpressionsanalysen diente 18s als *Housekeeping* Gen für die Normalisierung. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Die Visfatin-induzierte PPARG-Genexpression unterschied sich nicht signifikant während der adipogenen Differenzierung in Standard- und 3D-Kultur.

Die basale Genexpression von PPARG ohne Stimulierung mit Visfatin zeigte einen kontinuierlichen Expressionsanstieg nach Differenzierungsbeginn in beiden Ansätzen (Abb. 36), wobei die Transkriptionslevel während der Adipogenese auf primärer humaner Spongiosa geringer ausfielen als in Standard-Kultur.

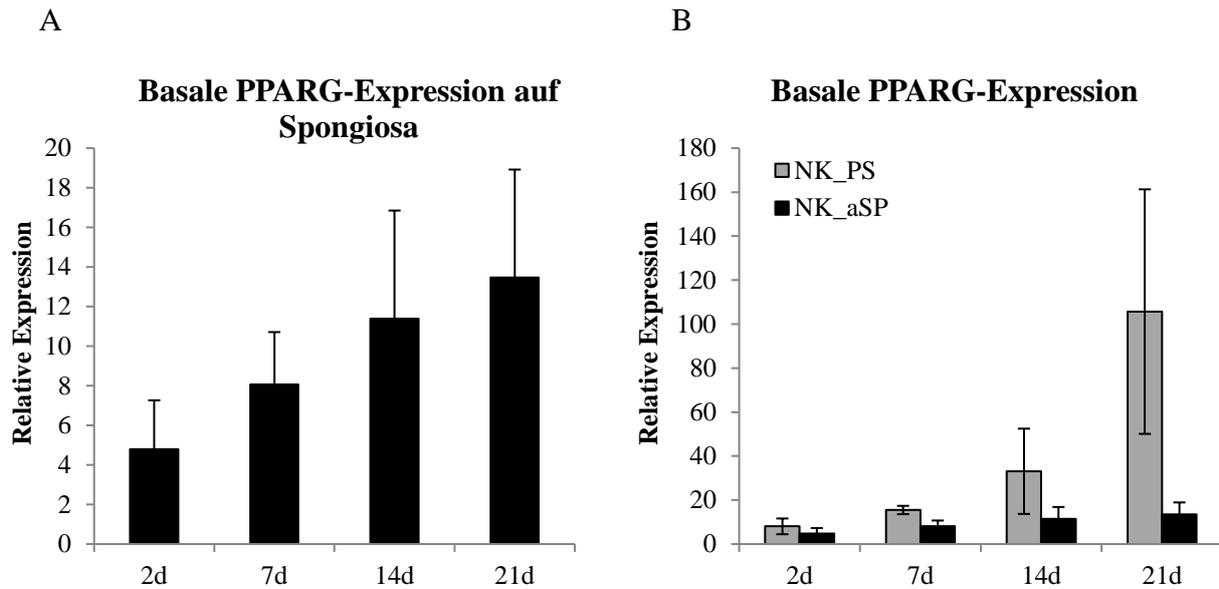


Abb. 36: Vergleich der Genexpression von PPARG während der adipogenen Differenzierung in Standardkultur und auf Spongiosa. A Basale PPARG-Genexpression auf Spongiosa. B Vergleich der basalen mRNA-Expression von PPARG während der Adipogenese auf Spongiosa (aSP) und unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS). Die Geneexpression wurde auf das *Hause keeping gene*, 18s, normalisiert (n=4). Die Transkriptionslevel von PPARG fielen während der Adipogenese auf humaner Spongiosa geringer aus als in Standard-Kultur aus.

4.4.2 Die Freisetzung von Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa

Zur Überprüfung, ob sich die Visfatin-induzierte Freisetzung von Entzündungsmediatoren während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa im Vergleich zu Polystyrol-beschichteten Zellkulturplatten unterscheidet, wurden die Differenzierungsexperimente in beiden Ansätzen parallel durchgeführt. Allerdings erfolgte die Differenzierung in unterschiedlichen Zellkulturformaten. Wegen der unterschiedlichen Kulturformate unterschieden sich auch die Ausgangszellzahl sowie die Volumina des adipogenen Induktionsmediums in beiden Ansätzen. Um die Vergleichbarkeit zu verbessern, wurde das Zellzahl-Medium-Verhältnis bei der Zellaussaat in beiden Ansätzen übereinstimmend festgelegt.

Abb. 37 stellt die Sekretion von IL6 nach Visfatin-Stimulierung während der Adipogenese auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zu Plastik (PS) dar. Die signifikante Visfatin-induzierte Freisetzung von IL6 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (NK) war zu allen

Analysezeitpunkten der Adipogenese auf Spongiosa zu beobachten (Abb. 37A). Werden die Expressionsprofile von IL6 auf Spongiosa und auf Plastik kultivierter Zellen unter Stimulierung mit Visfatin verglichen, zeigt sich eine schwächere Visfatin-vermittelte Produktion von IL6 auf Spongiosa gegenüber den auf Plastik kultivierten Zellen (Abb. 37B). Insbesondere ab Tag 7 sind die Unterschiede deutlich und an Tag 14 und 21 signifikant. Hinsichtlich der basalen Expressionslevel von IL6 ohne Zugabe von Visfatin ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Spongiosa und Standard-Zellkultur feststellen (Abb. 37C). Es zeigte sich jedoch eine leichte Erhöhung insbesondere an 2d und 21d während der Adipogenese.

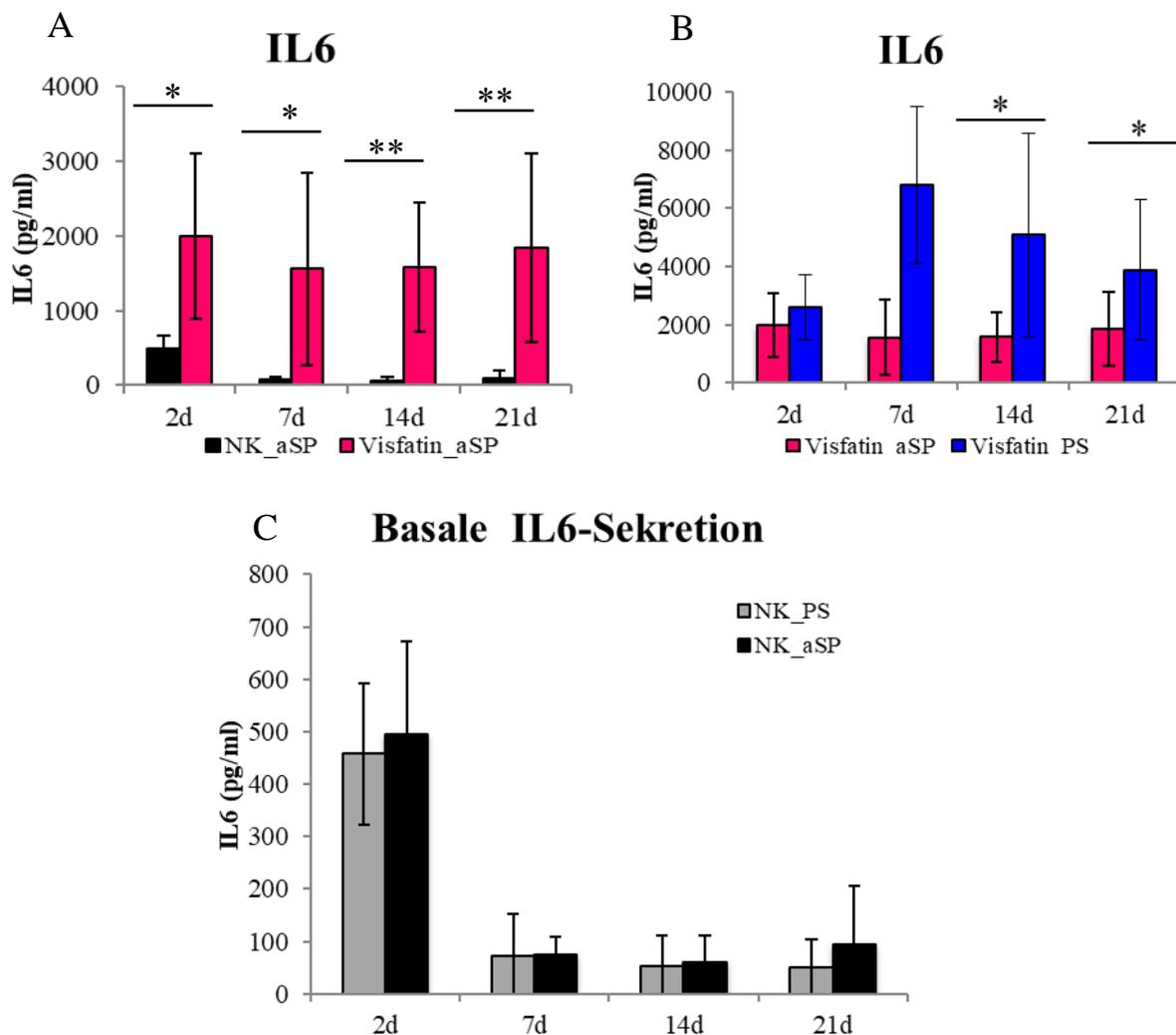


Abb. 37: **Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von IL6 während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Adipogenese unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS), (n=7).** A Visfatin-induzierte IL6-Sekretion in 3D-Kultur. B Vergleich der Visfatin-induzierten IL6-Sekretion in 3D- und Standard-Kultur. C Basale IL6-Sekretion in 3D- und Standard-Kultur. Die signifikante Visfatin-induzierte Freisetzung von IL6 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (NK) war zu allen Analysezeitpunkten der Adipogenese auf Spongiosa zu beobachten, fiel jedoch schwächer gegenüber den auf Plastik kultivierten Zellen aus. Die basale IL6-Sekretion unterschied sich nicht signifikant in beiden Ansätzen. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Ein ähnliches Bild wie bei der IL6-Sekretion ergab sich auch für IL8 (Abb. 38). Während eine signifikante Induktion von IL8 durch Visfatin zu allen Analysezeitpunkten der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa nachgewiesen werden konnte (Abb. 38A), zeigte sich diese deutlich schwächer als in der Standard-Zellkultur (Abb. 38B). Bezüglich der basalen Expression von IL8 konnten ebenfalls keine signifikanten Änderungen zwischen Spongiosa und Standardkultur auf PS detektiert werden (Abb. 38C).

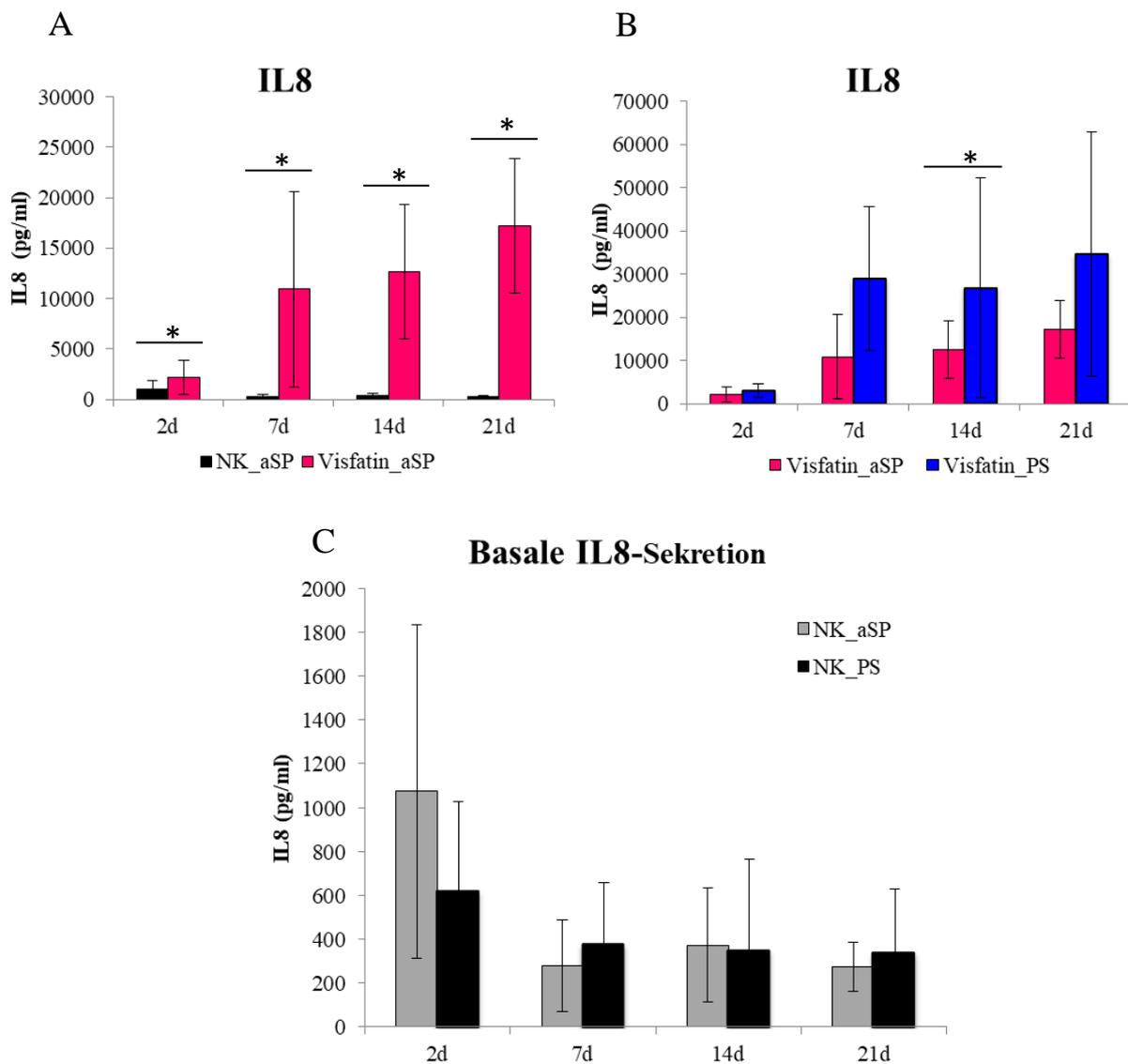


Abb. 38: **Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von IL8 während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Adipogenese unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS), (n=7).** A Visfatin-induzierte IL8-Sekretion in 3D-Kultur. B Vergleich der Visfatin-induzierten IL6-Sekretion in 3D- und Standard-Kultur. C Basale IL8-Sekretion in 3D- und Standard-Kultur. Die signifikante Visfatin-induzierte Freisetzung von IL8 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (NK) war zu allen Analysezeitpunkten der Adipogenese auf Spongiosa zu beobachten, fiel jedoch schwächer gegenüber den auf Plastik kultivierten Zellen aus. Die basale IL8-Sekretion unterschied sich nicht signifikant in beiden Ansätzen. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*).

Nach der Stimulierung mit Visfatin konnte ebenfalls eine gesteigerte Freisetzung von MCP1 bei der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa gegenüber der unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 39A). Die Visfatin-vermittelte Induktion von MCP1 war an Tag 7 und 21 signifikant. Die Visfatin-induziertem MCP1 in 3D-Kultur war deutlich geringer als in Standard-Zellkultur (Abb. 39B), während das basale Expressionslevel von MCP1 in beiden Ansätzen trotz einer leichten Reduktion auf Spongiosa an Tag 2 nicht signifikant verändert war (Abb. 39C).

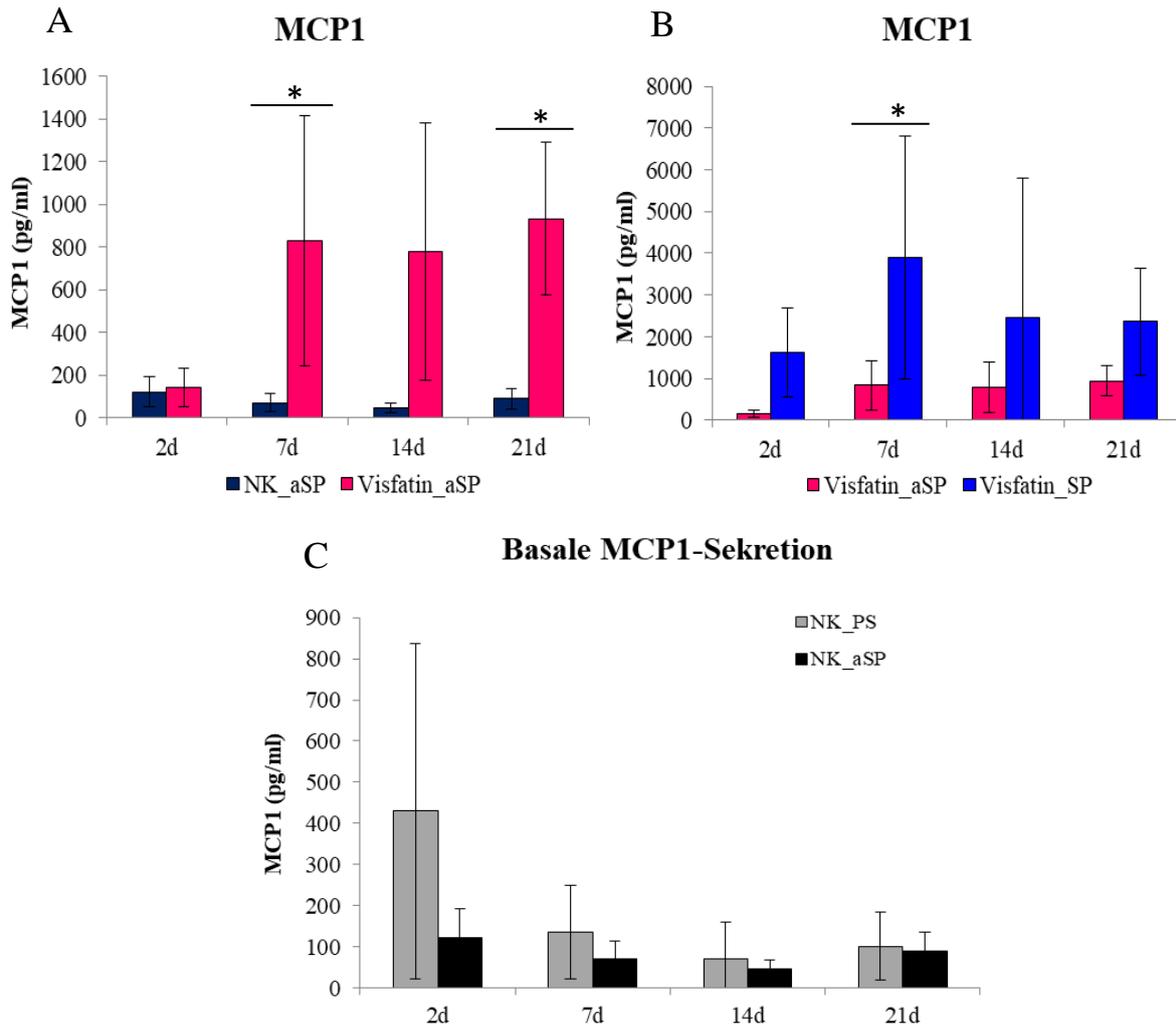


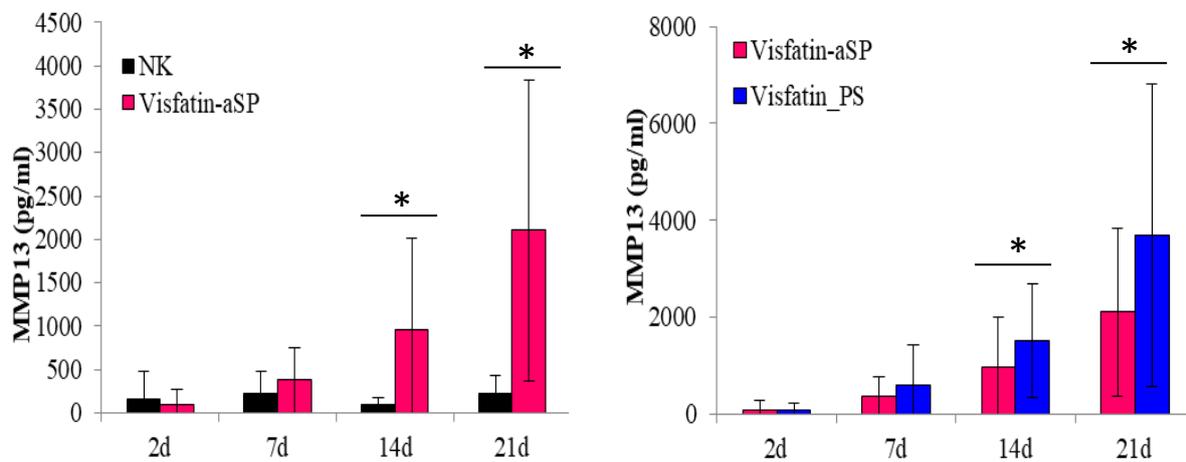
Abb. 39: **Basales und Visfatin-induziertes MCP1 während der Adipogenese auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Standard-Kultur (PS, n=5).** A Visfatin-induziertes MCP1 in 3D-Kultur. B Vergleich des Visfatin-induzierten MCP1 in 3D- und Standard-Kultur. C Basale MCP1-Sekretion in 3D- und Standard-Kultur. Die signifikante Visfatin-induzierte Freisetzung von MCP1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle war zu allen Analysezeitpunkten der Adipogenese auf Spongiosa zu beobachten, fiel jedoch schwächer als in der Standard-Kultur aus. Die basale MCP1-Sekretion unterschied sich nicht signifikant in beiden Ansätzen. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*).

4.4.3 Effekte von Visfatin auf die Gen- und Proteinexpression von MMPs während der Adipogenese auf Spongiosa

Während der adipogenen Differenzierung in Standard-Zellkultur konnte eine signifikante Induktion von MMP2 und MMP13 durch Visfatin nachgewiesen werden. Zur Überprüfung, ob sich die Visfatin-induzierte Expression der MMPs während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa im Vergleich zu Polystyrol-beschichteten Zellkulturplatten unterscheidet, wurden die Differenzierungsexperimente in beiden Ansätzen parallel durchgeführt. Zur Lyse wurden ausschließlich auf Knochenmatrix kultivierte Zellen verwendet. Die Expression von MMPs wurde mittels Real-Time-PCR auf mRNA-Ebene analysiert. Ebenfalls erfolgte die Untersuchung der MMP13-Abgabe in ZKÜ mittels ELISA.

Die Stimulierung mit Visfatin führte zu einer signifikanten Erhöhung der MMP13-Genexpression im Verlauf der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa. Eine signifikant erhöhte MMP13-Expression war an Tag 14 und 21 sowohl auf Protein- (Abb. 40A) als auch auf mRNA-Ebene (Abb. 40B) zu beobachten, während am Tag 7 nach Beginn der Differenzierung ein nicht signifikanter Expressionsanstieg von MMP13 nachweisbar war. Nach 2d der adipogenen Differenzierung in 3D-Kultur zeigte sich die Visfatin-induzierte MMP13-Proteinexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle reduziert. Wurden die Expressionsprofile von MMP13 auf Spongiosa und Plastik kultivierten Zellen unter Stimulierung mit Visfatin verglichen, zeigte sich eine schwächere Visfatin-vermittelte Produktion von MMP13 auf Spongiosa gegenüber den auf Plastik kultivierten Zellen (Abb. 40A und B). Diese Differenzen stellten sich an Tag 14 und 21 als signifikant heraus.

A) MMP13-Proteinexpression bei der Adipogenese auf Spongiosa und in Standard-Kultur



B) MMP13-Genexpression bei der Adipogenese auf Spongiosa und in Standard-Kultur

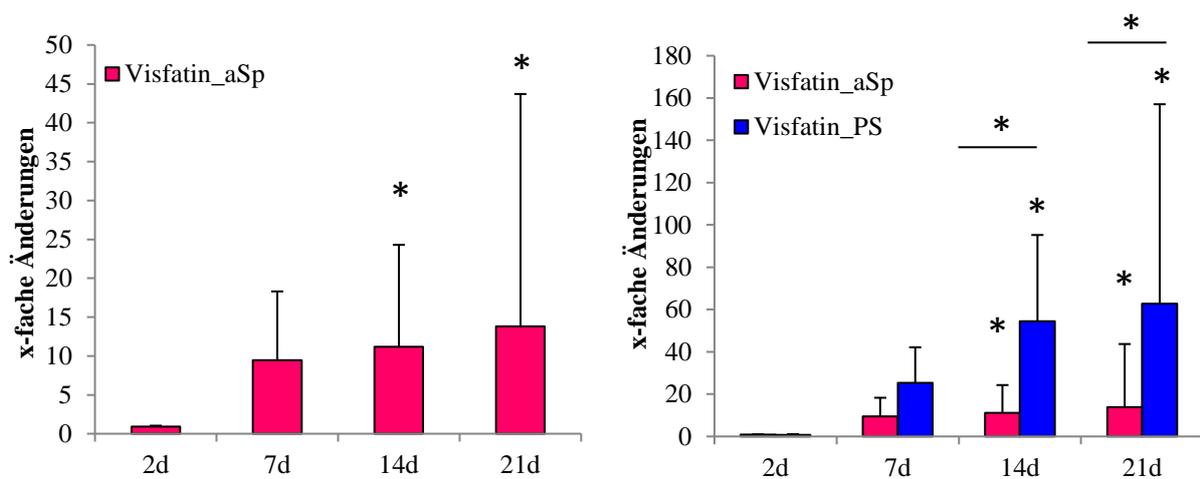


Abb. 40: Visfatin-induzierte mRNA- und Proteinexpression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung in Standard-Kultur (PS) und auf Spongiosa (aSp). A Vergleich der MMP13-Proteinexpression während der Adipogenese auf Spongiosa über 21d (n=7). B Vergleich der Visfatin-induzierten MMP13-Genexpression in Standard- und 3D-Kultur (n=7). Bei den Genexpressionsanalysen diente 18s als *House keeping gene* für die Normalisierung. Es sind die x-fachen Änderungen der Genexpression dargestellt. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Die signifikante Visfatin-induzierte Freisetzung von MMP13 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle war nahezu für alle Analysezeitpunkte mit Ausnahme am 2d der Adipogenese auf Spongiosa festzustellen, fiel jedoch schwächer aus als in Standard-Kultur. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*).

Bei dem Vergleich der Transkriptionslevel von MMP2 während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa und in Standard-Kultur war festzustellen, dass im Gegensatz zur Standard-Kultur die auf Spongiosa kultivierte Zellen nicht mit einer veränderten Genexpression von MMP2 auf die Visfatin-Stimulierung reagierten. In Abb. 41 sind die Visfatin-induzierte Genexpressionsänderungen von MMP2 während der adipogenen Differenzierung auf Plastik und Spongiosa visualisiert.

MMP2-Expression

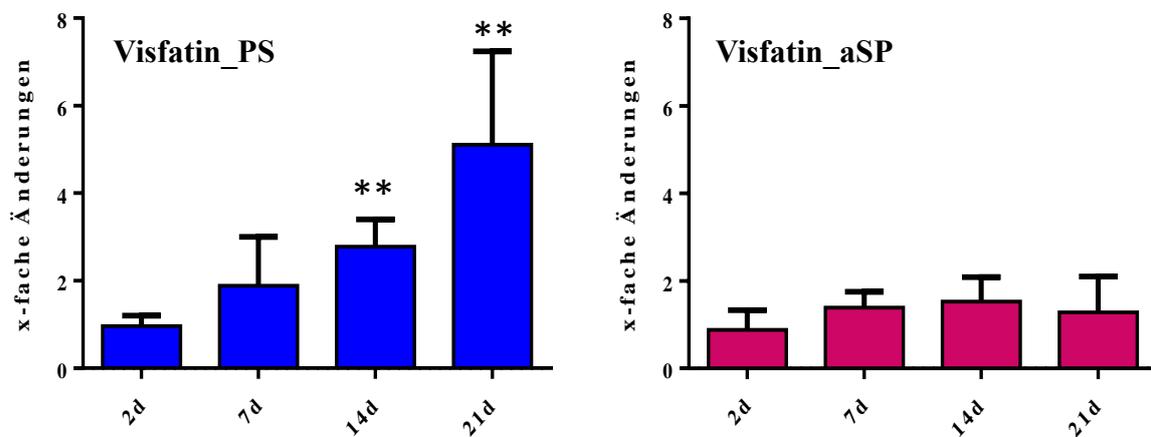


Abb. 41: **Visfatin-induzierte mRNA-Expression von MMP2 während der adipogenen Differenzierung in Standard-Kultur (PS) und auf Spongiosa (aSP, n=7).** Bei den Genexpressionsanalysen diente 18s als *Housekeeping* Gen für die Normalisierung. Die Graphen stellen die x-fachen Änderungen der Genexpression dar. Die unstimulierte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. Im Gegensatz zur Standard-Kultur führte die Stimulierung mit Visfatin nicht zu einer Induktion der MMP2-Genexpression während der Adipogenese in 3D-kultur. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt dargestellt: $p < 0,01$ (**).

5 Diskussion

Die Osteoporose ist eine primär nicht-entzündliche Erkrankung des Knochenstoffwechsels. Das Ausmaß dieser Erkrankung ist besonders an trabekulärem Knochen zu sehen [205]. Ursprünglich galt die Osteoporose als eine mit dem höheren Alter einhergehende Knochenerkrankung mit verminderter Knochenmasse und -qualität. Mittlerweile spricht man von einer multifaktoriellen Erkrankung, deren Ausprägung neben dem Alter auch durch das Geschlecht, Übergewicht, endokrinen sowie parakrinen und autokrinen Faktoren beeinflusst wird. In diesem komplexen Prozess spielen nicht nur die Zell-Zell-Interaktionen zwischen Osteoblasten und Osteoklasten eine entscheidende Rolle. Die Wechselwirkungen der Osteoblasten-Vorläuferzellen – den mesenchymalen Stammzellen – mit Adipozyten und mit den adipozytären Sekretionsprodukten können ebenfalls für die Knochenhomöostase ausschlaggebend sein. Hierbei ist seit Jahren bekannt, dass bei der Osteoporose der fortschreitende Knochenverlust mit einer erhöhten Fettinfiltration im Knochenmark einhergeht. Die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Adipozyten und Osteoblasten ist Gegenstand intensiver Forschung.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von adipozytären Sekretionsfaktoren – Adipokinen – während der adipogenen sowie osteogenen Differenzierung von MSCs zu untersuchen.

Zunächst sollte der Einfluss von Adipokinen auf das Differenzierungspotential von MSCs analysiert, aber auch die Effekte hinsichtlich des Extrazellulär-Matrixumbaus anhand der Expressionsanalysen von MMPs und deren Inhibitoren, den TIMPs, sowie die Abgabe der Entzündungsmediatoren mit matrixdegradierendem Profil unter Stimulierung mit Adipokinen während der MSC-Differenzierung untersucht werden.

5.1 Einfluss der Adipokine auf das Differenzierungspotential von MSCs

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten primären humanen mesenchymalen Stammzellen wurden direkt aus Knochenfragmenten humaner Hüftköpfe gewonnen. Die MSCs sind nicht differenziert und können sich zu Adipozyten, Osteoblasten, Chondrozyten sowie Myoblasten entwickeln. Sie werden in der Literatur häufig als MSCs, oder mesenchymale Stromazellen bezeichnet. Im eigentlichen Sinne handelt es sich hierbei nicht um eine reine

Stammzell-Population. In dieser Arbeit wird zur Beschreibung dieser Zellpopulation der Begriff MSCs verwendet. Diese Zellen können in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Hormonstatus, zugrundeliegender Erkrankung und anderer Faktoren der Patienten individuell unterschiedlich sein. Dementsprechend kann in den Studien mit primären MSCs eine erhöhte Varianz der Ergebnisse auftreten. Aufgrund eines hohen Zelldurchsatzes und des limitierten Materials wurde auf eine Sortierung der Zellen in dieser Arbeit verzichtet. Der wesentliche Vorteil der verwendeten Zellen ist jedoch, dass sie einen realistischen Einblick in die Physiologie bzw. Pathophysiologie während der osteogenen sowie adipogenen Differenzierung gewähren können.

Im Rahmen der adipogenen Differenzierung vom MSCs zu vollständig ausgereiften adulten Adipozyten vollzieht eine Zelle einen intensiven morphologischen Wandel. Im Verlauf der Differenzierung kommt es zur vermehrten Einlagerung von Lipidtröpfchen im Zytoplasma. Da mit den morphologischen Veränderungen der Zellen ihre rezeptiven und sekretorischen Funktionen verändert werden, wurden die Genexpressionsmessungen zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung durchgeführt. In Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades produzieren Adipozyten in unterschiedlichem Maße verschiedene endokrin wirksame Substanzen [206]. Hierfür wurden Expressionsanalysen von PPARG und Leptin als adipozytenspezifische Markergene zur Beurteilung des Einflusses von Adipokinen auf das adipogene Differenzierungsprofil der MSCs herangezogen. Zu keiner der analysierten Zeitpunkte konnte eine signifikante Expressionsänderung von PPARG und Leptin durch die hier untersuchten Adipokine in unseren Experimenten festgestellt werden.

Leptin ist ein hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, von Adipozyten sezerniertes Protein, das die Reproduktion, den Appetit und den Energiestoffwechsel reguliert. Neue Erkenntnisse deuten zudem auf die kritische Rolle von Leptin im Skelettstoffwechsel hin, indem ein sympathisches neuronales Signal im Hypothalamus weitergeleitet und dadurch die katabolische Wirkung von Leptin auf Knochenstoffwechsel ausgeübt wird [171, 207]. Die Wirkung von Leptin wird über die Leptinrezeptoren vermittelt, die nicht nur im Hypothalamus gefunden werden, sondern auch in vielen anderen Gewebetypen vorkommen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass auch die MSCs die Leptinrezeptoren exprimieren und das Fehlen dieser Rezeptoren zur Verschiebung des Differenzierungspotentials der MSCs zugunsten der osteogenen Differenzierung führte [208]. In der vorliegenden Arbeit konnte kein direkter Einfluss von Leptin anhand der Expression von untersuchten adipogenen Markergenen wie PPARG und Leptin selbst nach der Induktion der adipogenen Differenzierung festgestellt

werden. Während der Differenzierung der MSCs entsteht ein heterogenes Kultur-System, das sowohl nicht differenzierte MSCs als auch die differenzierenden Zellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung enthält. In der oben genannten Studie konnten die Adipogenese-fördernden Effekte von Leptin in den MSC-Kulturen beobachtet werden, während in der vorliegenden Arbeit die Stimulierung der Zellen parallel zu dem stimulierenden Einfluss des Differenzierungsmediums erfolgte. Vermutlich kommt es hier zu einer Verschleierung der Leptin-induzierenden Effekte unter stimulierendem Einfluss differenzierungsmodulierender Substanzen in dem heterogenen Kultur-System, welches während der Differenzierung entsteht.

Den MMPs, vor allem dem in dieser Promotionsarbeit untersuchten MMP13, kommt eine essenzielle Bedeutung bei der Regulation der Adipogenese und generell bei der Entwicklung von Fettgewebe zu [209]. In einer *in vitro* Studie als auch in einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von MMP13 die Einlagerung von Fettgewebe und die adipogene Differenzierung von 3T3-L1 Zellen durch die Suppression der PPARG-Expression verhindert [209]. Trotz der in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Visfatin-induzierten Expression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung von MSCs, zeigte sich die Expression von Leptin und PPARG nicht durch die Stimulierung mit Visfatin beeinflusst. Allerdings wurden in dieser Promotionsarbeit primäre humane MSCs bzw. kommerziell erworbene MSCs von Donoren verwendet, während die oben genannte Studie unter Einsatz einer murinen 3T3-L1 Zelllinie durchgeführt wurde und die Übertragbarkeit auf das humane System nicht als gleichmäßig bewertet werden kann. Außerdem bleibt zu klären, ob und wie die Aktivität des durch Visfatin induzierten MMP13 in der vorliegenden *in vitro* Studie während der adipogenen Differenzierung beeinflusst wird.

Ähnlich wie bei der adipogenen Differenzierung konnte keine Wirkung von Leptin auf die osteogene Differenzierung in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Im Vergleich zu anderen Adipokinen, die nur endokrin in die Knochenhomöostase eingreifen können, beeinflusst Leptin den Knochenstoffwechsel durch zwei Mechanismen: peripher scheint Leptin vorwiegend anabolisch zu wirken, während über das zentrale Nervensystem katabolische Eigenschaften von Leptin zum Tragen kommen. Leptin- (ob/ob) und Leptinrezeptor-defiziente (db/db) Mäuse entwickelten Adipositas und wiesen eine erhöhte Knochenmasse auf [171, 210]. Die Infusion von Leptin in den dritten Ventrikel von ob/ob-Mäusen und Wildtyp-Mäusen führte in den Experimenten zu einer massiv verminderten Knochenmasse. Dabei ließ sich im Serum der Versuchstiere kein Leptin nachweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass Leptin die Osteoblasten offensichtlich lokal in ihrer Funktion beeinflusst. In unseren Experimenten

erfolgte zwar die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten, jedoch handelt es sich wie bei der adipogenen Differenzierung um ein heterogenes Kultursystem, das sowohl nicht differenzierte Zellen als auch unterschiedliche Stadien differenzierender Zellen enthält. Es könnte sein, dass die differenzierungsmodulierenden Effekte von Leptin aufgrund der Heterogenität des Kultursystems im Vergleich zu einem homogenen Kulturmodell verdeckt werden. Außerdem wäre es möglich, dass Leptin *in vivo* die Osteoblasten ohne direkten Kontakt, wahrscheinlich über den im Hypothalamus beginnenden Regelkreis, regulieren kann. Die aus dem Hypothalamus nachfolgend geschalteten Mechanismen, die auf die Osteoblasten wirken könnten, sind derzeit noch unbekannt. Zahlreiche endokrine Wirkungen von Leptin, wie z.B. auf die Fertilität, auf das „*gonadotropin-releasing hormone*“ (GnRH) und das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH), könnten indirekte Effekte auslösen, die nicht in dieser *in vitro* Studie dargestellt und untersucht werden konnten. Möglich ist ebenfalls eine Regulation des Knochenstoffwechsels durch Leptin-vermittelte Modulation der Osteoklasten-Schiene, die in dieser Arbeit nicht analysiert wurde. Van der Velde und Kollegen stellten fest, dass in Leptin-defizienten Mäusen die Anzahl der Osteoklasten im peripheren Blut erhöht war, während die kortikalen Knochenparameter altersabhängig abnahmen [211]. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Knochenbildung durch Leptin erhöht und die Knochenresorption verringert werden kann. Im Gegensatz zu den in dieser Promotionsarbeit erzielten Ergebnissen hinsichtlich der Stimulierung mit Leptin während der MSC-Differenzierung, konnten Thomas *et al.* *in vitro* zeigen, dass die Knochenmarkstromazellen auf die Zugabe von Leptin dosis- und zeitabhängig mit einer Zunahme der mRNA-Expression von ALP, Kollagen Typ I und Osteocalcin reagierten [212]. Außerdem konnte auch eine verstärkte Mineralisierung durch Leptin in denselben Studien beobachtet werden. Ähnliche Effekte, vermittelt durch Leptin während der MSC-Differenzierung konnten in der vorliegenden Promotionsarbeit nicht reproduziert werden. Jedoch wurden in der oben genannten Studie immortalisierte MSC-Zelllinien verwendet und andere Zeitpunkte der Differenzierung analysiert, was durchaus zu diesen differenziellen Ergebnissen geführt haben könnte. Außerdem unterschieden sich die verwendeten Stimulierungskonzentrationen von Leptin. Während in der vorliegenden Arbeit Stimulationen mit 10 ng/ml Leptin erfolgte, führten Thomas *et al.* die Beobachtungen unter steigenden Leptinkonzentrationen durch. Die induzierenden Effekte auf die osteoblastenspezifischen Gene kamen durch die Stimulation mit 60 ng/ml Leptin zustande, was die in dieser Arbeit verwendete Stimulierungskonzentration deutlich übersteigt. Niedrigere Konzentrationen von Leptin, ähnlich wie in unseren Experimenten, führten nicht zu einer signifikanten Expressionsänderung dieser Gene. Über die Serumkonzentrationen von Leptin

sowie die Leptinkonzentrationen im Knochenmark osteoporotischer Patienten ist wenig bekannt. In einer Studie wurden die Serumkonzentrationen von Leptin der normal- und übergewichtigen adipösen Menschen miteinander verglichen. Während in adipösen Patienten die Serumleptinkonzentrationen im Bereich von 28-77 ng/ml lag, wiesen die normalgewichtigen Individuen deutlich niedrige Serumleptinwerte (7-19 ng/ml) auf [213]. So scheint, dass die hohen Konzentrationen von Leptin wie 60 ng/ml tatsächlich in den adipösen Patienten erreicht werden können. Da die Osteoporose-Patienten nicht zugleich adipös sein müssen, scheint diese Stimulierungskonzentration nur für eine bestimmte Personengruppe relevant. Zwar gibt es einen positiven Zusammenhang zwischen Körper- und Knochenmasse [133]. Ob hierfür tatsächlich die Fettmasse verantwortlich ist, oder doch die Muskelmasse eine entscheidende Rolle spielt, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Heutzutage werden die von Adipozyten produzierten proinflammatorischen Zytokine als pathogenetische Bindeglieder zwischen Adipositas und ihren metabolischen Folgen verstanden. Zudem ist bekannt, dass systemisch Leptin einen katabolischen Effekt auf die Knochendichte ausübt. Die Injektion von Leptin in die Gehirne der adipösen Leptin-defizienten Tieren bewirkte eine schnelle Abnahme der Knochendichte [147]. Da Übergewicht und Adipositas mit hohem Leptinspiegel und mit der Entwicklung von Leptinresistenz assoziiert ist, kann vermutet werden, dass hierbei nicht nur eine sättigungs-hemmende Wirkung von Leptin, sondern auch diesen hemmender Einfluss auf Knochenabbau durch Leptiresistenz vermindert wird. So könnte der positive Zusammenhang zwischen Knochendichte und Fettgewebssmasse durch eine Leptinresistenz erklärt werden.

Die Expressionslevel von Resistin sind im Knochenmark im Vergleich zu anderen Geweben höher, was auf eine mögliche Rolle von Resistin im Knochenstoffwechsel hinweist [214]. Im Rahmen der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Wenisch an der Universität Gießen konnten wir zeigen, dass im Knochengewebe von Osteoporose-Patienten ein signifikant erniedrigter Expressionslevel von Resistin im Vergleich zu OA-Knochen nachweisbar ist [202]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde Resistin in die vorliegende Arbeit eingebunden, um eine mögliche Rolle von Resistin in der Knochenhomöostase hinsichtlich der Modulierung der MSC-Differenzierung zu untersuchen. In der Literatur wird berichtet, dass Resistin die Proliferation von Osteoblasten auf PKC- und PKA-abhängige Wege stimulieren kann [214]. Geringfügige stimulierende Effekte von Resistin auf die Kollagen Typ I Expression durch murine Osteoblasten konnte bereits nachgewiesen werden [214]. In der vorliegenden Promotionsarbeit konnte jedoch keine erhöhte Expression von osteogenen Markergenen während der osteogenen MSC-Differenzierung durch Resistin detektiert werden. Ein möglicher

Grund für diese differenziellen Ergebnisse könnte wiederum die Verschleierung schwacher Effekte durch das heterogene Kultursystem sein. Auch die in der Literatur verwendeten murinen Kulturmodelle könnten einen Unterschied zu den humanen Systemen ausmachen. Möglicherweise beeinflusst Resistin den Knochenstoffwechsel ebenfalls indirekt durch die Modulierung der Osteoklastogenese. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Resistin die Proliferation von Osteoklasten stark induziert und hierbei den NF- κ B-Promotor aktiviert [214]. Die beobachtete erniedrigte Expression von Resistin in OP-Knochen könnte zu einer fehlerhaften Regulation des Knochenumbaus durch die gestörten Interaktionen zwischen Osteoblasten und Osteoklasten im Rahmen der senilen Osteoporose beitragen. Aufgrund der in dieser Promotionsarbeit gefundenen fehlenden Beeinflussung der adipozytären Markergene durch Leptin und Resistin ist jedoch davon auszugehen, dass eine relevante Änderung des Differenzierungsverhaltens durch diese Adipokine in den hier verwendeten Konzentrationen nicht stattfindet.

Im Gegensatz zu Leptin und Resistin konnte eine zeitabhängige Induktion der mRNA-Expression von ALP (7d) durch Visfatin in den osteogen differenzierten Zellen in dieser Promotionsarbeit beobachtet werden. Visfatin verstärkte ebenfalls die anorganische Matrixproduktion. Dies deckt sich mit Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Stimulierung mit Visfatin zu einer gesteigerten Mineralisierungsaktivität der humanen Osteoblasten führte und die Behandlung von den mesenchymalen Vorläuferzellen mit einem Visfatin-Inhibitor die Reduktion von ALP-Expression und Calciumphosphat-Deposition bewirkte [198, 215]. Dieselben Studien haben gezeigt, dass Visfatin die Kollagen Typ I in Osteoblasten induziert. Diese Erkenntnis konnte in unseren Experimenten allerdings nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Reduktion von Koll.I durch Visfatin zum späten Zeitpunkt der osteogenen Differenzierung (21d) nachgewiesen werden. Ein Grund für diesen differenziellen Einfluss von Visfatin auf die Kollagen Typ I Expression könnte erneut im heterogenen Kulturmodell liegen, da es sich während der osteogenen Differenzierung nicht nur um ausdifferenzierte Osteoblasten handelt. Andererseits könnten auch die im Differenzierungsmedium vorhandenen osteogenen Wachstumsfaktoren sowie die Stimulation mit Visfatin über den gesamten Differenzierungszeitraum zu den unterschiedlichen Effekten geführt haben. Eine ähnliche induzierende Wirkung auf die anorganische Matrixproduktion konnte auch durch IL6 in *in vitro* Studien beobachtet werden [216]. Es bleibt daher zu klären, ob sich die verstärkte Mineralisierung während der osteogenen Differenzierung als ein direkter Einfluss von Visfatin darstellt, oder ein sekundärer Effekt der Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren, wie z.B. IL6 ist. Weiterhin konnten destruktive Effekte

von IL6 auf die Knochenhomöostase in einem murinen OP-Modell beobachtet werden. In diesem Glucocorticoid-induzierten OP-Modell waren die erhöhten IL6-Werte mit einem gesteigerten Knochenverlust in behandelten Tieren assoziiert [217].

Das zum Nachweis der Calciumphosphate verwendete Alizarin rot S-Färbung stellt ein direktes Nachweisverfahren der Calciumionen dar. Somit bietet diese Methode keinen sicheren Nachweis von Hydroxylapatit, sondern detektiert lediglich Bestandteile davon. Daher kann es keine eindeutige Aussage über die Ähnlichkeit der gebildeten Matrix mit Knochenmatrix getroffen werden. Obwohl eine Beurteilung der Qualität der gebildeten Matrix nicht möglich ist, kann dieses Nachweisverfahren zur Beurteilung der erfolgreichen osteogenen Differenzierung verwendet werden. Betrachtet man die Visfatin-vermittelte verstärkte Einlagerung von Calciumphosphaten und die gleichzeitige Reduktion von Kollagen Typ I, welches für die Knochenplastizität verantwortlich ist, liegt ein dysregulierender Einfluss von Visfatin in der Extrazellulärmatrixproduktion nahe. Somit könnte Visfatin zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit beitragen [218]. Daher könnten die beobachteten Visfatin-vermittelten Effekte bei der Matrixbildung insgesamt eher als osteodestruktiv bewertet werden.

5.2 Einfluss der Adipokine auf die Synthese von Entzündungsmediatoren während der MSC-Differenzierung

Adipokine sind für ihre immunmodulatorischen Funktionen bekannt. Zur Untersuchung der Rolle der ausgewählten Adipokine Resistin, Leptin und Visfatin bei der Freisetzung von Entzündungsmediatoren während der Differenzierung von MSCs erfolgten die Messungen von IL6, IL8 und MCP1. Das Fettgewebe als endokrines Organ ist unter anderem auch zur Synthese von inflammatorischen Adipozytokinen befähigt. Zu diesen Adipozytokinen zählen inzwischen auch IL6, TNF α , IL8 und MCP1. Zudem beeinflussen sich viele inflammatorische Zytokine gegenseitig positiv und rufen die Einwanderung von ebenfalls Zytokin-produzierenden Entzündungszellen hervor. Auf diesem Weg wird der Entzündungsprozess im Fettgewebe vorangetrieben. Entsprechend kann der Beitrag der Adipozyten zum entzündlichen Milieu hoch sein [219]. Des Weiteren sind Adipozyten selbst zur Synthese proentzündlicher Moleküle wie IL6, TNF α , MCP1 befähigt. Dies spiegelt sich darin wieder, dass der Plasmaspiegel dieser Entzündungsmediatoren positiv mit Gewichtszunahme korreliert ist. Diesen Adipozytokinen wird auch eine essenzielle Rolle bei der Entwicklung von Insulinresistenz zugeschrieben. Die Messungen von IL6, IL8 und MCP1 ergaben in der vorliegenden Arbeit, dass die Adipozyten-

induzierte Sekretion von Entzündungsmediatoren im Laufe der Differenzierung von MSCs zu Adipozyten ohne zusätzliche Stimulierung nicht anstieg. Im Gegensatz dazu reduzierte sich der basale Expressionslevel von IL6, IL8 und MCP1 allmählich im Verlauf der adipogenen sowohl osteogenen Differenzierung von d2 bis d21. Eine Erklärung hierfür könnte der Einfluss der Differenzierungszusätze wie Indometacin sowie Dexamethason mit ihrer antientzündlichen Wirkung sein [220]. Die Funktionen des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason sind vielseitig. Es agiert sowohl als adipozytärer [221] als auch als osteoblastärer [222-225] Differenzierungsfaktor. Diese unterschiedlichen Effekte von Dexamethason können allerdings auf unterschiedliche Konzentration und Inkubationszeiten sowie auf die unterschiedlichen verwendeten Kulturmodelle der jeweiligen Publikationen zurückzuführen sein. Ähnliche herabsenkende Wirkungen von Dexamethason auf IL6-Sekretion konnten bereits in Präadipozyten gezeigt werden, die bei steigender Dexamethasonkonzentration zu reifen Adipozyten differenziert wurden [226]. Dieser inhibierende Effekt konnte mittels des Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten RU484 rückgängig gemacht werden. Auch in primär kultivierten Adipozyten senkte Dexamethason die IL6-Sekretion [227]. Ebenfalls eine reduzierte IL6-Sekretion konnte in anderen Zelltypen, wie z.B. Monozyten, durch das weniger potente Glukokortikoid Hydrocortison nachgewiesen werden [228].

Trotz der inhibierenden Effekte der Differenzierungszusätze auf die basale Sekretion von proinflammatorischen Proteinen führte die Stimulierung mit Visfatin sowohl während der adipogenen als auch osteogenen Differenzierung zu einer signifikant verstärkten Sekretion der Entzündungsmediatoren IL6, IL8 und MCP1 zu allen vier Analysezeitpunkten in dieser Arbeit. Im Einklang mit dieser Promotionsarbeit konnte das proinflammatorische Potenzial von Visfatin in zahlreichen Studien unter Verwendung verschiedener Zellarten nachgewiesen werden. Beispielsweise konnten Laiguillon *et al.* zeigen [192, 194], dass Visfatin auf normale murine Chondrozyten proentzündlich wirkt, indem es die Expression von IL6 und MCP1 erhöht. Auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, aber auch auf synoviale Fibroblasten im Kontext chronisch-entzündlicher Gelenkerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, wirkte Visfatin induzierend auf die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren.

Im Rahmen des TRR79 in Kooperation mit der AG Wenisch konnte gezeigt werden, dass der Visfatinspiegel im osteoporotischen Knochen erhöht war [202]. Somit könnte Visfatin für ein entzündliches Milieu im Knochenmark sorgen und dadurch die Aktivierung der Knochenabbauenden Zellen, der Osteoklasten, positiv beeinflussen. Das in dieser Promotionsarbeit untersuchte Chemokin MCP1, das unter anderem auch in Fettgewebe gebildet wird, hat sowohl

lokale als auch systemische Effekte und kann durch seine chemoattraktive Wirkung die Einwanderung von Makrophagen ins Fettgewebe induzieren. Übergewicht ist daher mit einer erhöhten Fettgewebsinfiltration von Makrophagen assoziiert. Die in das Fettgewebe eingewanderten Makrophagen produzieren wiederum proentzündliche Zytokine wie IL6 und TNF α , weshalb es zu einem fortschreitenden inflammatorischen Prozess kommt. Aufgrund der Instabilität von TNF α wurde auf die Messung dieses Chemokins in dieser Promotionsarbeit verzichtet. Nichtsdestotrotz wäre in diesem Kontext interessant, den Einfluss von Visfatin auf die TNF α -Abgabe durch Adipozyten zu untersuchen. So wurde beschrieben, dass unter Stimulation mit TNF α Adipozyten ihre charakteristischen Merkmale verlieren, was die Adipozyten zur Zellteilung befähigt und letzten Endes zu einer Entdifferenzierung zu Präadipozyten führt [229]. Zudem wiesen einigen Studien auf Makrophagen-ähnliche Eigenschaften von Präadipozyten hin [230, 231]. Somit könnten durch eine TNF α -induzierte Entdifferenzierung der Adipozyten proinflammatorische Prozesse verstärkt werden. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte jedoch keine eindeutige Aussage hinsichtlich eines veränderten Differenzierungsgrades der Zellen in diesem heterogenen System mit Zellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung sowie teils undifferenzierten Zellen getroffen werden. Diese Heterogenität war in jeder durchgeführten Differenzierung etwas unterschiedlich. Mikroskopisch konnte zwar die Einlagerung mehrerer Lipidvakuolen in Zellen der Kultur beobachtet werden, die Mehrzahl der Zellen wiesen jedoch keine Lipidvakuole auf (Abb.17). Zudem entspricht diese Morphologie der Fettzellen nicht dem phänotypischen Stadium eines terminal differenzierten Adipozyts, sondern dem eines Präadipozyten mit multilokulärem Phänotyp. In den von hier durchgeführten Experimenten war das Aufkommen der vollständig ausgereiften Adipozyten mit einem monolokulären Phänotyp, der im Laufe der adipogenen Differenzierung entsteht, gering im Vergleich zum multilokulären Phänotyp.

In einigen humanen *in vitro* Studien sowie in Tierexperimenten konnten die induktiven Effekte der durch Visfatin induzierten proinflammatorischen Moleküle auf die Osteoklastogenese sowie auf die resorptive Aktivität der Osteoklasten beobachtet werden [232-234]. Zudem konnte ein direkter, stimulierender Einfluss von Visfatin auf die osteoklastäre Aktivität im Rahmen des multiplen Myeloms durch seine enzymatische Funktion nachgewiesen werden [200]. Bisher wurde Visfatin vorwiegend im Kontext von Krebserkrankungen sowie der chronisch-entzündlichen RA als mögliche Option für ein Ziel Molekül der Therapie in Betracht gezogen. Unter Verwendung eines Visfatin-Inhibitors, des APO866, konnte die Reduktion der Visfatin-induzierten erhöhten Expression von IL8 und MCP1 sowie MMP3 durch humane Fibroblasten nachgewiesen werden [235]. Die Behandlung mit APO866 in einem

experimentellen Arthritis-Mausmodell zeigte einen protektiven Effekt bezüglich der Entzündung sowie der Gelenkzerstörung. Im Vergleich zu unbehandelten Tieren wiesen die behandelten Mäuse signifikant geringere Schwellungen der Pfoten auf, zeigten deutlich weniger Leukozyteninfiltrate in den entzündeten Gelenken und hatten deutlich erniedrigte RA-Scores. Des Weiteren konnte ein reduzierter RANKL-Spiegel bei den APO866 behandelten Tieren nachgewiesen werden, was auf eine verringerte Knochenresorption hindeutet. In Kontext des multiplen Myeloms konnte ebenfalls ein positiver Einfluss von APO866 festgestellt werden. Hierbei zeigte APO866 einen inhibierenden Effekt auf den Osteoklastenvermittelten Knochenabbau [200]. Der therapeutische Einsatz eines Visfatin-Inhibitors in der Behandlung von Krebserkrankungen beruht vor allem auf seiner proliferationshemmenden Wirkung. In unseren Experimenten führte die Langzeitstimulierung mit APO866 zu einer Zellzahlreduktion ab dem Zeitpunkt ca. 10-12d während der adipogenen Differenzierung bei der verwendeten Konzentration von 5 μ M. Die Zugabe des rekombinanten Visfatins hob diesen Effekt jedoch vollständig auf. In der hier vorgestellten Promotionsarbeit konnten die Visfatin-induzierten matrix-degradierenden Effekte nur teilweise durch APO866 reduziert werden. Lediglich proinflammatorische Moleküle zeigten sich nach der Kostimulation mit APO866 reduziert, während die MMP13-Expression unverändert blieb. Anhand der hier erzielten Ergebnisse lässt sich nicht eindeutig klären, ob die Induktion von MMP13 direkt durch Visfatin ausgelöst wird oder einen sekundären Effekt durch Visfatin-induzierte Faktoren, wie z.B. Zytokine, darstellt. APO866 inhibiert die enzymatische Funktion von Visfatin, die hauptsächlich für seinen proentzündlichen Einfluss verantwortlich gemacht wird. Möglicherweise spielen hierbei die bisher unbekanntenen Wirkungsmechanismen von Visfatin, die nicht ausschließlich über seine enzymatische Funktion verlaufen, eine Rolle. Möglich wäre auch, dass die eingesetzte Stimulierungskonzentration des APO866-Inhibitors nicht zur Reduktion von MMP13 ausreicht. Aufgrund der apoptotischen Effekte des Inhibitors wurde eine niedrige Konzentration für die Stimulierungsexperimente gewählt. In diesem Zusammenhang bleibt zu klären, in wie weit Visfatin einen Anhaltspunkt für eine mögliche, effektive Therapie in Rahmen der Osteoporose durch Visfatin-Inhibition darstellt und müsste in weiteren Osteoporose-Modellen in *in vivo* verifiziert werden.

Ein proinflammatorisches Potential von Resistin und Leptin wurde bereits im Kontext verschiedener Erkrankungen beschrieben [236, 237]. Unter anderen ist im Serum von RA-Patienten der Leptinspiegel erhöht. Zudem zeichnen sich Monozyten und Makrophagen durch eine besonders hohe Leptinrezeptordichte aus [158, 159]. Patienten mit Leptinrezeptor-Defekten sind adipös und haben ein defizitäres Immunsystem – die Lymphozyten wiesen eine

reduzierte Proliferationsrate und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen auf [160, 161]. Diese Ergebnisse sprechen für eine proentzündliche Wirkung von Leptin. Allerdings konnte die proinflammatorische Wirkung nicht in allen Entzündungssituationen beobachtet werden [238, 239]. Harkins *et al.* zeigten, dass direkt aus dem Fettgewebe von ob/ob Mäusen isolierte Adipozyten ein höheres Grundexpressionslevel an IL6 im Vergleich zu Wildtyp-Adipozyten aufwiesen [240]. Eine ähnliche Tendenz konnte in unseren Experimenten auch beobachtet werden, da die Stimulation mit Leptin zu einer geringen, nicht signifikanten Reduktion der IL6-Expression führte. Auch im Falle von IL8 konnte eine nur leichte zeitabhängige Reduktion (14d und 21d) nach Leptin-Stimulierung nachgewiesen werden. Somit könnte ein antientzündlicher Effekt von Leptin vermutet werden. Aufgrund der geringen Effektstärken und hohen Variabilität ist eine physiologische Relevanz dieser Veränderungen jedoch nicht zu erwarten. Ebenfalls konnte kein proinflammatorischer Einfluss von Resistin während der adipogenen oder osteogenen Differenzierung in dieser Arbeit beobachtet werden. Eine Studie von Thommesen und Kollegen zeigte eine Induktion von IL6 in murinen Präosteoblasten (MC3T3-E1-Zellen) durch Resistin [214]. Diese Studie wurde jedoch an murinen Osteoblasten durchgeführt. Diese Effekte konnten in unseren Experimenten unter Verwendung von humanen MSCs nach der Induktion der Differenzierung durch verwendete Differenzierungszusätzen nicht reproduziert werden. Somit scheinen Resistin und Leptin im Vergleich zu Visfatin keine proinflammatorischen Effekte bei der Differenzierung von MSCs auszuüben.

5.3 Einfluss der Adipokine auf die Expression von MMPs während der MSC-Differenzierung

Bei der Osteoporose ist das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und –abbau zugunsten des Knochenabbaus verschoben. Neben Osteoklasten kommt den Knochenmatrix-abbauenden, proteolytischen Enzymen, wie MMPs und deren Inhibitoren, den TIMPs, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, eine entscheidende Bedeutung zu. Unter physiologischen Bedingungen halten sich MMPs und TIMPs die Waage, sodass die Knochenumbau-Prozesse im Gleichgewicht vorliegen und es weder zu einem nennenswerten Knochenverlust noch zu gesteigerter Knochenbildung kommt. Gerät das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs aus den Fugen, kommt es zu Störungen der Knochenstruktur, z.B. in Form einer Osteoporose mit gesteigertem Knochenverlust oder zu einer pathologischen Anhäufung von Knochenmasse, der

sogenannten Osteopetrose [241]. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Visfatin-induzierte Expression von MMPs während der adipogenen Differenzierung von MSCs lässt auf eine Rolle von Visfatin in den dysregulierten Matrixumbau-Prozessen schließen. Während Visfatin die MMP-Expression induzierte, waren keine Änderungen hinsichtlich der TIMP-Expression durch Visfatin nach der Induktion der adipogenen Differenzierung in dieser Arbeit nachweisbar. Im Gegensatz zur adipogenen Differenzierung führte die Stimulation mit Visfatin während der osteogenen Differenzierung zu einem leichten, aber nicht signifikanten Anstieg von MMPs zu den früheren Zeitpunkten der Differenzierung, während zu dem späten Zeitpunkt (21d) eine signifikante Reduktion zu erkennen war. Ebenfalls war die Expression der Gegenspieler der MMPs, den TIMPs, durch Visfatin reduziert. Aufgrund der adipogenen Determinierung der MSCs bei der Osteoporose und geringer Effektstärke im Vergleich zur Visfatin-induzierten MMP13-Expression in adipogen differenzierten Zellen, könnte die Visfatin-vermittelte Verringerung der MMP-Expression in osteogen differenzierten MSCs keine ausreichend balancierende Wirkung auf die MMP-Level in Knochenmark haben. Demnach würde der Effekt von Visfatin in einem gestörten Knochenumbau bzw. einem gesteigerten Knochenabbau im Kontext der Osteoporose resultieren. Abgesehen davon spielen die MMPs auch in knochenbauenden Prozessen eine Rolle. So konnten in den Knochenzellen kindlicher Wachstumsfugen gezeigt werden, dass sie im Zusammenspiel mit Wachstumsfaktoren für ein gerichtetes Knochenwachstum verantwortlich zu sein scheinen [242]. Holmbeck *et al.* zeigten, dass MT-MMP1 und MMP14 vermehrt in der Umgebung der Osteozyten exprimiert werden und möglicherweise an der Entwicklung der Knochenkanälchen, in denen die Zellausläufer von Osteozyten verankert werden, beteiligt sind [243]. So kann vermutet werden, dass die Erniedrigung der MMP-Level unter Normalwert ebenso keinen positiven Einfluss auf den Knochenmetabolismus ausüben dürfte.

Bei den MMPs handelt es sich um zinkabhängige proteolytisch aktive Endopeptidasen, welche durch den Abbau der EZM viele physiologische und pathologische Prozesse regulieren. Selbst die Aktivität der MMPs wird in unterschiedlicher Weise reguliert. Hierbei spielen neben TIMPs auch Zytokine sowie Wachstumsfaktoren eine Rolle. Ebenfalls können MMPs einander gegenseitig aktivieren. So werden MMP2 und MMP13 bekanntlich durch membranständiges MMP14 aktiviert, welches in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden ist. In der Regel wird die Aktivierung von MMPs durch die erhöhte Synthese von Zytokinen reguliert. In dieser Arbeit konnte nicht immer eine positive Korrelation zwischen MMP- und Zytokinsynthese nachgewiesen werden. Während der adipogenen Differenzierung konnte zwar sowohl eine erhöhte Zytokin- als auch MMP13-Expression nach Stimulierung mit Visfatin detektiert

werden, die Behandlung mit dem Visfatin-Inhibitor Apo866 führte jedoch zu einer Reduktion der Zytokinexpression, jedoch nicht der MMP13-Expression auf mRNA-Ebene und nur zeitabhängig auf Proteinebene. Auch während der Osteogenese verstärkte Visfatin die Abgabe von Zytokinen, wobei die MMP-Expression nicht in ähnlicher Weise beeinflusst worden war. Parallel zur Zunahme der MMP-Sekretion in adipogen differenzierten Zellen nach Visfatin-Stimulierung konnte kein begleitender Anstieg der TIMPs detektiert werden, was ein Ungleichgewicht und somit Matrix-degradierende Vorgänge zur Folge haben könnte.

MMP13 ist in der Lage sowohl Kollagen Typ I als auch II zu degradieren. Die Spaltungseffizienz von Kollagen Typ II durch MMP13 ist höher als von Kollagen Typ I. Somit könnte die Visfatin-induzierte MMP13-Expression während der adipogenen Differenzierung auch zur Pathogenese der Arthrose beitragen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie deutet auf eine Osteoklastogenese-fördernde Funktion von MMP13 im Rahmen des multiplen Myeloms hin. Es hat sich gezeigt, dass MMP13 die Fusionierung von Osteoklasten-Vorläufern verstärkt und zur Osteoklastogenese und somit zur Progression der Erkrankung beiträgt [244]. In einer anderen Studie wurde ein erhöhter Spiegel von Visfatin bei Patienten mit Multiplem Myelom nachgewiesen. Die Inhibierung der enzymatischen Funktion von Visfatin mittels APO866 verringerte die Aktivität der Osteoklasten sowie das Zellwachstum der Myelom Zellen. So könnte Visfatin per se durch seine Osteoklastogenese-fördernde Eigenschaften einen negativen Einfluss auf die Knochenhomöostase nehmen.

Übereinstimmend mit dieser Promotionsarbeit konnte die Visfatin-vermittelte MMP-Expression in verschiedene Studien bei Verwendung unterschiedlicher Zelltypen gezeigt werden. Unter anderen reagierten Chondrozyten mit einer gesteigerten MMP13-Expression auf die Stimulierung mit Visfatin [195]. Ebenfalls gibt es Studien, die eine Visfatin-induzierte Expression von MMP2 und 9 in Makrophagen sowie in Endothelzellen belegen und auf die Rolle von Visfatin in der Angiogenese hindeuten [245, 246]. Im Gegensatz zu Visfatin veränderten die Adipokine Leptin und Resistin die Expression von MMPs weder während der adipogenen noch bei osteogenen Differenzierung von MSCs. Mit der Rolle von Leptin in verschiedenen Zellen hinsichtlich der Expression von MMPs beschäftigten sich bereits einige Studien. In atherosklerotischen Endothelzellen konnte die Leptin-vermittelte, gesteigerte Expression von MMP2, MMP9, TIMP1 und TIMP2 nachgewiesen werden [247]. Des Weiteren zeigten Kume *et al.* (2002) eine durch Leptin erhöhte Expression von MMP2 und mutmaßten die Beteiligung von Leptin an der endochondralen Ossifikation durch die Regulation der Angiogenese [248]. Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lässt sich

schlussfolgern, dass Leptin lokal bei der Differenzierung von MSCs keinen oder einen eher geringen Einfluss auf die untersuchten Parameter ausübt und die Beteiligung von Leptin an der Regulation des Knochenstoffwechsels möglicherweise einen vorwiegend systemischen Charakter aufweist.

In der Literatur wird ebenfalls die Rolle von Resistin in der Angiogenese und der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben, da Resistin die Expression von VEGFR1 und 2 sowie MMP2 und 9 in Endothelzellen induziert [249]. Ebenso konnte eine verstärkte Resistin-vermittelte Expression von MMP2 und 9 in humanen Chondrozyten nachgewiesen werden [250]. In unseren Experimenten mit humanen MSCs, zeigte die Stimulierung mit 20 ng/ml Resistin keinen induzierenden Effekt auf MMPs, während in der oben genannten Studie Resistin in deutlich höheren Konzentrationen (100-250 ng/ml) eingesetzt wurde. Die unterschiedlichen Stimulierungskonzentrationen sowie die Verwendung verschiedener Zelltypen und Unterschiede in den Versuchsbedingungen können Ursache für die Diskrepanz dieser Daten sein. Eine weitere Studie stellte fest, dass die Resistinkonzentration mit einer erhöhten Expression von IL6, MMP1 und MMP3 in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthrose assoziiert war [251]. In der vorliegenden Arbeit konnte weder während der osteogenen noch adipogenen Differenzierung unter Verwendung von MSCs ein lokaler Einfluss von Resistin, ähnlich des Leptins, nachgewiesen werden. Das Transkriptionsprofil von MMPs sowie TIMPs war durch diese Adipokine nicht verändert und scheint somit im Gegensatz zu Visfatin keinen Effekt auszuüben.

5.4 Einfluss der Spongiosa auf die MSC-Differenzierung unter Einfluss von Visfatin

Um den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen und den Einfluss von EZM während der MSC-Differenzierung unter Berücksichtigung der Adipokin-vermittelten Effekte zu untersuchen, wurden die MSCs auf gereinigten, zellfreien Spongiosa-Fragmenten adipogen bzw. osteogen differenziert. Da durch die Adipokine Resistin und Leptin in Standard-Zellkultur-Experimenten kein oder nur ein geringer Einfluss auf die untersuchten Parameter während der MSC-Differenzierung nachweisbar war, wurden die Spongiosa-Transfer-Experimente lediglich unter Stimulierung mit Visfatin durchgeführt.

Die Aufreinigung der Spongiosa-Fragmente, die zuvor für die Zellisolation verwendet wurden und danach eingefroren waren, erfolgte nach einem durch Busse *et al.* etablierten Protokoll [203]. Die Autoren konnten keine Veränderungen des Mineralgehalts, der Osteoidmatrix und des Osteozyten-Netzwerks von einzelnen Spongiosa-Trabekeln nach H₂O₂-Behandlung feststellen. Inwieweit die Matrix-Zell-Interaktionen durch dieses Aufreinigungs-Verfahren beeinflusst werden können, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt ist, dass im Rahmen dieser Promotionsarbeit das Knochengewebe von Patienten mit Coxarthrose verwendet wurde. Teilweise wies das Knochengewebe für OA charakterisierte massive Verknöcherungen auf und die verwendeten Spongiosa-Fragmente hatten individuell unterschiedliche Porosität. Aufgrund dessen konnte das Weichgewebe nicht immer gleichmäßig aus den Spongiosazwischenräumen bei der Aufreinigung entfernt werden. Dies und die unterschiedliche Beschaffenheit der verwendeten Knochengewebe limitierte nicht nur die verfügbare Probenzahl, sondern könnte zusätzlich zu erhöhten Variabilitäten geführt und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflusst haben. Dies spiegelt sich in den vergleichweisen hohen Varianzen der Ergebnisse wider. Abgesehen davon ist aus der Implantat-Forschung bekannt, dass die Porendurchmesser einen deutlichen Einfluss auf die Durchbauung bei der Defektheilung von Knochen haben. Inwiefern die Zell-Matrix-Interaktion sowie das Einwachsen der Zellen durch die veränderte Knochenstruktur (OA-Gewebe) in Zellkultursystem beeinflusst werden kann, ist nicht bekannt [252]. Um die Einflüsse der veränderten Knochenstruktur des verwendeten OA-Gewebes in den Spongiosa-Transfer-Experimenten zu limitieren, wurden die Spongiosa-Fragmente, die OA-spezifische massive Verknöcherungen aufwiesen, nicht für die Versuche verwendet.

Eine weitere methodische Schwierigkeit war, dass es keine Möglichkeit gab, die Adhäsion bzw. das Einwachsen der Zellen in 3D-Kultur über den Differenzierungszeitraum zu beurteilen. Zur Extraktion der Nukleinsäuren wurden ausschließlich auf der Knochenmatrix adhärente Zellen verwendet, ausgewanderte Zellen wurden nicht lysiert, was zu einer verminderten RNA-Ausbeute führte. Entsprechend stand nur limitiert Material für Genexpressionsanalysen zur Verfügung. Besonders gering war die RNA-Ausbeute aus den Zellen, die auf Spongiosa osteogen differenziert wurden. Der Grund hierfür könnte die auftretende Mineralisierung oder auch die starke Bindungskapazität der Nukleinsäuren an die teilweise neu gebildete Matrix sein.

Die Protein-Freisetzung während der Differenzierung in 3D-Kultur wurde in den Zellkulturüberständen analysiert. Hierbei konnte jedoch nicht zwischen den Expressionsprofilen der auf der Knochenmatrix oder auf der Oberfläche der Zellkulturgefäße

kultivierten Zellen unterschieden werden. Daher können die Proteinexpressionsanalysen nicht zum Vergleich des Proliferations- bzw. Adhäsions-Verhalten der auf Knochenmatrix kultivierten Zellen herangezogen werden. Aufgrund der zwei- bzw. dreidimensionalen Kultur der Zellen erfolgte die Differenzierung von MSCs in unterschiedlichen Zellkulturformaten. Auch die eingesetzte Ausgangszellzahl sowie die Volumina des osteogenen bzw. adipogenen Induktionsmediums unterschieden sich in den Ansätzen. Um die Vergleichbarkeit zu verbessern, wurde das Verhältnis zwischen eingesetzter Ausgangszellzahl und Mediumvolumen in beiden Ansätzen gleich gehalten oder, wenn nicht anders möglich, durch die entsprechende Verdünnung der Proben normalisiert.

Hinsichtlich des Einsatzes von MSCs für *Tissue Engineering* sowie der Herstellung von Knochenersatzmaterialien sind die Zell-Matrix-Interaktionen von großer Bedeutung. Die autologe Knochentransplantation gilt heute immer noch als Goldstandard des Knochenersatzes kleiner Defekte, da sie für eine gute Defektheilung essenzielle osteoinduktive, osteokonduktive und osteogene Eigenschaften kombiniert [253]. Die autologe Spongiosaplastik ist allerdings mit einer gewissen lokalen Restriktion an der Entnahmestelle verbunden und die verfügbaren Mengen sind äußerst limitiert [254, 255]. Bei großen Knochendefekten, die nicht mit autologen Knochengewebe gefüllt werden können, kommen allogene Knochentransplantate zum Einsatz. Allogene Knochentransplantate bergen ebenfalls einige Risiken in sich: sie sind potenziell infektiös [256, 257], können die Toleranz des Immunsystems durchbrechen und abstoßende Reaktionen auslösen [258]. Die Aufbereitung und insbesondere die Sterilisation der Knochentransplantate führen zum Verlust wichtiger osteoinduktiver Eigenschaften [259, 260], die durch lokale Wachstumsfaktoren vermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte der autologe Spongiosa-Transfer im 3D-Zellkultursystem, die osteoinduktive Eigenschaft der eingesetzten Spongiosafragmente dürfte jedoch durch den Aufreinigungsprozess ebenfalls limitiert sein. Der positive Einfluss von 3D-Kultursystemen auf das osteogene Differenzierungspotential von MSCs auf verschiedenen Trägermaterialien konnte bereits gezeigt werden [261]. Im Vergleich zu Monolayer-Kultur zeigten die osteogen differenzierten MSCs in dreidimensionaler osteogener Kultur unter Verwendung von Trägermaterialien im Hinblick auf das osteogene Potenzial einen deutlichen Vorteil der dreidimensional eingebetteten Zellen. Somit stehen einige Ergebnisse dieser Arbeit im Widerspruch dazu. Die Genexpression von ALP zeigte sich während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosafragmenten im Vergleich zu Standard-Zellkultur deutlich erniedrigt. Ebenfalls war ein vermindertes adipogenes Differenzierungspotential von auf Knochenmatrix kultivierten MSCs zu beobachten, da die Expression des adipogenen Transkriptionsmarkers PPAR γ in 3D-

Kultursystem deutlich erniedrigt war. In den Arbeiten von Fischbach *et al.* konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu Standard-Zellkultur in 3D-kultivierten 3T3-L1 Präadipozyten bessere morpho-funktionelle Eigenschaften besaßen [262]. Wie die adipogene Differenzierung durch die Knochenmatrix beeinflusst wird, ist bisher nicht im Detail untersucht worden. Aufgrund ihrer starren Beschaffenheit dürfte die Knochenmatrix keine Adipogenese-fördernde Eigenschaften besitzen.

Unterschiedliche Trägermaterialien besitzen unterschiedliche osteoinduktive Eigenschaften, die oft auf ihre Zusammensetzung sowie Oberflächenbeschaffenheit zurückzuführen sind. Diese Eigenschaften sind entscheidend für Zell-Matrix-Interaktionen. So konnte gezeigt werden, dass z.B. die demineralisierte Knochenmatrix bessere osteoinduktive Eigenschaften entfaltet und die Knochenneubildung induziert als die mineralisierte, allogene Knochenmatrix. Durch die Demineralisierung werden die osteoinduktiven Proteine (BMP, IGF1, TGF β , FGF), die in mineral-organischen Komplexen gebunden bzw. mit dem Knochenkollagen assoziiert sind, freigesetzt und können unter anderem auch die osteogene Differenzierung von MSCs positiv beeinflussen [263-265]. So lässt sich vermuten, dass in der hier dargestellten Arbeit verwendete mineralisierte Knochenmatrix über limitierte osteoinduktive Eigenschaften verfügt.

Alliot-Licht *et al.* berichteten, dass Osteoblasten die Bestandteile von Hydroxylapatit, wie Kalziumphosphatpartikel, phagozytierten und zur gestörten intrazellulären Kalziumphosphathomöostase führten. Dies hatte die Hemmung der DNA-Synthese und Zellwachstums sowie eine erniedrigte ALP-Expression zur Folge [266], was in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden konnte. Ebenfalls ließ sich die in 2D-Kultur am Tag 7 nachgewiesene Visfatin-induzierte ALP-Expression während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa nicht deutlich feststellen, bzw. war lediglich ein leichter Anstieg am späteren Zeitpunkt der Differenzierung (21d) zu beobachten. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine veränderte Zeitkinetik, bzw. verzögerte osteogene Differenzierung von MSCs.

Hinsichtlich der Visfatin-induzierten Expression von Entzündungsmediatoren während der osteogenen Differenzierung ließen sich keine signifikanten Differenzen zwischen den 2D- und 3D-Kulturen feststellen, während das basale Expressionslevel der Zytokine deutlich in 3D-Kultur der osteogen differenzierten Zellen erhöht war. Dies könnte durch eine Stressreaktion der Zellen in 3D-Kultursystem erklärbar sein. Das zur Isolation verwendete Auswachsen der Zellen erfolgte auf Polystyrol-beschichteten Oberflächen der Zellkulturgefäße, wobei es sich

um etablierte 2D-Kulturprotokolle handelt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wäre daher bereits nach Isolation eine 3D-Kulturmethode zum Expandieren der Zellen denkbar, da Zellentwicklung bereits durch den Kultivierungsansatz beeinflusst werden kann [267, 268]. Möglicherweise reagieren Osteoblasten sensibler auf veränderte Kulturbedingungen als Adipozyten. Die adipogen differenzierten Zellen reagierten nicht mit signifikant verändertem basalen Expressionsspiegeln von Entzündungsmediatoren, wohingegen die Visfatin-vermittelte Zytokinexpression sich während der Adipogenese auf aufgereinigtem spongiösem Knochen signifikant herabgesetzt im Vergleich zur Standard-Zellkultur zeigte.

Die EZM, die von Osteoblasten und Bindegewebszellen selbst synthetisiert wird und sich aus unterschiedlichen Proteinen zusammensetzt, unter anderem den Kollagenen, kann den Phänotyp der darin befindlichen Zellen durch das Zusammenspiel von Oberflächenrezeptoren, zu denen auch Integrine gehören, mit Kollagen Typ I beeinflussen sowie zu unterschiedlichen Proliferationsraten und Differenzierungen der Zellen führen [269, 270]. So zeigte die Arbeitsgruppe um Salasnyk, dass durch Adhäsion der hMSCs an Vitronektin und Kollagen Typ I die osteogene Differenzierung der Zellen gefördert werden kann [271]. Kollagen Typ I an sich, als Hauptbestandteil der Knochenmatrix, gilt als starker Stimulus der osteogenen Differenzierung [272]. Andererseits können die Zellen selbst Aufbau und Funktion der EZM verändern. Durch die Integrin-vermittelte Rezeptorbindung können die Osteoblasten an Kollagen Typ I binden und sowohl die Anordnung als auch die Kontraktionen der Kollagen Typ I Fibrillen beeinflussen. Takeuchi *et al.* stellten fest, dass weniger alkalische Phosphatase synthetisiert wird, wenn der Integrin-Rezeptor $\alpha 1$ der Osteoblasten blockiert wird [273]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Knochenmatrix von Arthrose-Patienten stellt ein Trägermaterial dar, in dem die Matrixproteine nicht frei liegen, sondern das Osteoid mineralisiert vorliegt. Wie diese Tatsache die Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst, bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenfalls ist nicht klar, wie in arthrotischem Knochen die Kollagenmatrix verändert ist und welche Auswirkung dies auf die Funktionen der Osteoblasten, die sensibel auf die äußeren Einflüsse reagieren, haben könnte. Gesundes Knochenmaterial ist jedoch nur schwer in ausreichender Menge verfügbar.

Generell konnte in dieser Arbeit ein positiver Effekt von EZM (in Form aufgereinigter humaner Spongiosa) nachgewiesen werden. In Gegenwart der EZM konnten die Visfatin-induzierte osteodestruktiven Effekte abgeschwächt werden. Sowohl die proentzündlichen Zytokine als auch die MMPs wiesen deutlich erniedrigte Expressionslevel nach Visfatin-Stimulierung während der adipogenen Differenzierung in 3D-Kultur im Vergleich zu Standard-Kultur auf.

Hierbei könnten Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Interaktionen von Bedeutung sein, die in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurden. Interessant wäre zu verifizieren, ob und wie sich die Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Interaktionen auf das Differenzierungsverhalten von MSCs unter Einfluss von Visfatin auswirken würde.

Die MSCs exprimieren verschiedene Integrinuntereinheiten [77] und können durch die Interaktion mit Matrix-Proteinen die zelluläre Funktionen, wie Selbsterneuerung, Migration, Differenzierung und Geweberegeneration regulieren [274]. Integrin-vermittelte Matrix-Zell-Interaktionen sind auch für andere Zelltypen beschrieben. Integrine scheinen auch in der Regulation von MMPs involviert zu sein. So konnte bei Chondrozyten gezeigt werden, dass die Überexpression von Integrin $10\beta 1$ zur Verringerung der MMP13-Expression führte [275]. Eine Interaktion der Metalloproteasen mit dem Integrin $\alpha\beta 3$ konnte ebenfalls in Melanomzellen beschrieben werden [276]. Brooks *et al.* zeigten, dass die MMP2 auf der Oberfläche invasiver Zellen lokalisiert ist und durch die Interaktion des MMP2 mit Integrienen den EZM-Abbau und somit die Invasion der Zellen ermöglicht [276]. Die Evaluierung der Bedeutung der Integrine bei den Wechselwirkungen zwischen EZM und Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt, da sie nicht im Fokus der Untersuchungen standen.

5.5 Einfluss der Inhibition von MAPK-Signalwegen auf die Visfatin-vermittelten Effekte während der adipogenen Differenzierung

In dieser Promotionsarbeit konnte eine proinflammatorische Wirkung von Visfatin sowohl während der osteogenen als auch adipogenen Differenzierung der MSCs nachgewiesen werden. Zudem führte die Stimulation mit Visfatin zur verstärkten Expression von MMP13, die jedoch nur bei der adipogenen Differenzierung der MSCs ersichtlich war. Zur Untersuchung der Induktion der p38-MAPK- und ERK1/2-Signalwege durch Visfatin erfolgte die Zugabe der Inhibitoren von p38-MAPK (SB) und ERK1/2 (SCH) gepulst bzw. über den gesamten Zeitraum der adipogenen Differenzierung. Erstaunlicherweise führte die Inhibierung von p38-MAKP zwar zu einer Reduktion der MMP13 Expression, beeinflusste jedoch nicht die Ausschüttung von IL6, IL8 und MCP1. Die p38-MAPK gehört zu den Stress-aktivierten Kinasen, die vor allem durch inflammatorische Zytokine und verschiedene physikalische und chemische Stressfaktoren aktiviert werden. Im Gegensatz zu in dieser Arbeit erzielte Ergebnisse konnten Meier *et al.* zeigen, dass die Visfatin-induzierte Abgabe der Entzündungsmediatoren durch

RASF nach der Inhibierung von p38-MAPK nach Inkubation für 6h und 15h herabgesetzt werden konnte [192]. In den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten erfolgte die Stimulierung mit p38 Inhibitor lediglich für 48h vor der Ernte der Zellen zu dem jeweiligen Analysezeitpunkt, um die toxische Wirkung des Inhibitors zu minimieren. Aus demselben Grund sowie zur Vermeidung der Blockierung von unspezifischen Signalwegen, wurde zur Stimulierung eine niedrige Konzentration (3 μM) gewählt. Um zu analysieren, ob die Stimulierungsdauer sowie die gewählte niedrigere Konzentration von p38-MAPK-Inhibitor für die fehlende Beeinflussung der Zytokinexpression während der adipogenen Differenzierung verantwortlich gemacht werden könnten, wurde sowohl eine höhere Konzentration von SB203580 (10 μM) getestet, als auch die Stimulierungsdauer verlängert, indem die Behandlung der MSCs durchgehend repräsentativ für eine Zellpopulation ($n=1$, Daten nicht gezeigt) erfolgte. Die erhobenen Daten zeigten keine veränderte Expression der Entzündungsmediatoren nach der Kostimulierung mit Visfatin/SB203580 im Vergleich zu nur mit Visfatin-stimulierten Proben und auch keine toxischen Effekte. Somit konnte die Stimulierungsdauer oder die Stimulierungskonzentration als ein Grund für die fehlende Modifizierung der Visfatin-induzierten Langzeiteffekte durch SB203580 nicht bestätigt werden. Denkbar wäre, dass diese zwei Prozesse, die Visfatin-vermittelte Zytokin- und MMP13-Expression, während der adipogenen Differenzierung voneinander getrennt über verschiedene Signalwege modifiziert werden. Im Gegensatz zum p38-MAPK Inhibitor konnte durch Supplementierung des ERK1/2-Inhibitors sowohl die Visfatin-induzierte Expression von proinflammatorischen Zytokinen als auch von MMP13 während der adipogenen Differenzierung supprimiert werden. Somit scheint der ERK1/2 Signalweg eine zentrale Rolle in den Visfatin-vermittelten destruktiven Effekten zu spielen. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnte die Aktivierung der MAP-Signalwege durch Visfatin unter Verwendung verschiedener Zelltypen in mehreren Studien nachgewiesen werden. Eine kürzlich veröffentlichte epigenetische Studie beschrieb die Beteiligung der p38-MAPK, ERK1/2 und JNK Signalwege in der Visfatin-induzierten Freisetzung von IL6 und TNF α durch OASF [277]. Außerdem stellten die Autoren fest, dass die Visfatin-induzierte Aktivierung der oben genannten Signalwege und die Induktion der IL6- sowie TNF α -Synthese durch Visfatin mit der Inhibierung von der microRNA miR-199a-5p assoziiert war. Durch die Blockierung dieser Signalwege konnte die Inhibierung von miR-199a-5p teilweise aufgehoben werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass erhöhte Expressionslevel von Visfatin in Kontext von multiplem Myelom die Proliferation der Krebszellen durch die Aktivierung des ERK-Signalwegs induziert [278]. Die Rolle dieser Kinase in der Tumorgenese ist bereits bekannt. Bei konstitutiver Aktivierung des ERK-

Signalwegs kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum kommen. Ebenfalls wird die erhöhte Aktivität des ERK-Signalwegs mit der gesteigerten Invasionsfähigkeit und Metastasenbildung von Tumoren in Verbindung gebracht. Die proliferationshemmende Wirkung von ERK-Inhibitoren stellt die Grundlage dafür dar, dass sie in einigen etablierten Differenzierungsprotokollen als Zusatz des adipogenen Differenzierungsmediums verwendet werden. Die ERK-Inhibitoren hemmen hierbei die Proliferation der Stammzellen und wirken induzierend auf die Differenzierung [279]. Im Verlauf der Differenzierung der MSCs ist die Rolle der MAP-Signalwege jedoch nicht vollständig geklärt. Die aktuelle Datenlage liefert kontroverse Ergebnisse bezüglich der Rolle von ERK bei der osteogenen bzw. adipogenen Differenzierung. So zeigen einige Studien, dass der ERK-Signalweg für das Wachstum und die Differenzierung der Osteoblasten verantwortlich ist [280] und die Blockierung dieser Kinase hingegen die Differenzierung der MSCs auf Kosten der osteogenen Differenzierung in Richtung Adipozyten inhibiert [281].

In Zusammenschau der oben beschriebenen Studien könnte die Visfatin-vermittelte Aktivierung der ERK1/2-Signalwege mit einer Inhibierung der adipogenen Differenzierung einhergehen. In der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch anhand der Expression von PPARG und Leptin nicht festgestellt werden. Andererseits könnte durch die Hemmung von ERK1/2 die adipogene Differenzierung vorangetrieben werden. In unseren Experimenten konnten wir jedoch mikroskopisch keine verstärkte Einlagerung von Fettvakuolen bzw. eine Ausprägung des adipogenen Phänotyps unter Zugabe von ERK-Inhibitoren beobachten. Allerdings bleibt zu klären, ob die durch ERK1/2-Inhibitoren bedingten möglichen Veränderungen der Differenzierungskapazität von MSCs im Zusammenhang mit der Reduktion der Visfatin-induzierten Expression von Entzündungsmediatoren und MMP13 durch ERK1/2-Inhibitor steht.

In verschiedenen Studien wird die differenzielle Wirkung von p38-MAKP- und ERK-Signalwegen während der Differenzierung von MSCs beschrieben. So zeigte sich, dass die Stimulierung mit ERK-Inhibitoren die osteogene Differenzierungskapazität erhöhte, während die chondrogene Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen der Zahnpulpa herabgesetzt wurde [281]. Die Blockade von p38-MAPK verstärkte die chondrogene Differenzierung der aus Zahnpulpa isolierten MSCs, wohingegen die osteogene Differenzierungskapazität dieser Zellen durch p38-Blockade herunterreguliert war [282, 283].

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Reduktion der Expression von Entzündungsmediatoren sowie von MMP13 während der adipogenen Differenzierung durch die Inhibitoren von p38-MAKP und ERK1/2 Signalwegen die Beteiligung dieser Kinasen an den Visfatin-induzierten osteodestruktiven Effekten während der Adipogenese zeigt.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAMTs	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
ddH ₂ O	RNase-freies destilliertes Wasser
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DKK	Dickkopf
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
<i>et al.</i>	<i>alteri</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum
h	Stunde
HE	Hämatoxylin und Eosin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
hMSC	Kommerziell erworbene MSCs
Koll.I	Kollagen Typ I
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter

MMP	Matrix-Metalloproteinase
MSC	mesenchymale Stromazellen
NaCl	Natriumchlorid
OA	Arthrose (<i>Osteoarthritis</i>)
OD	Optische Dichte
OCN	Osteocalcin
OP	Osteoporose
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
phMSCs	Primär isolierte mesenchymale Stromazellen
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPARG	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
PsA	Psoriasis-Arthritis
p38-MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SOST	Sclerostin
Tab.	Tabelle
TGF	Tumor-Wachstumsfaktor
TIMP	<i>Tissue inhibitors of matrix metalloproteases</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	<i>Tartrat-resistant acid phosphatase</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
VEGF	Vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel

7 Tabellenverzeichnis

Tab.1 Verwendete Zellen

Tab.2 Verwendete Chemikalien

Tab.3 Verwendete Plastikwaren und sonstige Materialien

Tab.4 Verwendete Medien und Lösungen

Tab. 5 Verwendete Enzyme

Tab.6 Verwendete Proteine

Tab.7 Verwendete molekularbiologische und immunologische Kits

Tab.8a Oligonukleotide (selbst designet)

Tab.8b Oligonukleotide (bezogen von der Firma Qiagen)

Tab.9 Verwendete Geräte

Tab.10 Verwendete Software

Tab.11 Schema der Stimulierung von hMSCs/phMSCs mit Visfatin, Apo866, SCH772984 und SB203580 während der adipogenen Differenzierung

Tab.12 Synthese von IL6, MCP1 und IL8 in Zellkulturüberständen von Visfatin-stimulierten und unstimulierten hMSCs/phMSCs im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Tab.13 Synthese von MMP13 in Zellkulturüberständen von Visfatin-stimulierten und unstimulierten hMSCs/phMSCs im Verlauf der adipogenen Differenzierung

Tab.14 Synthese von IL6, MCP1 und IL8 in Zellkulturüberständen von Visfatin-stimulierten und unstimulierten hMSCs/phMSCs im Verlauf der adipogenen Differenzierung

Tab.15 Synthese der Entzündungsmediatoren durch adipogen differenzierte Zellen nach der Kostimulation mit Visfatin und Inhibitoren

Tab.16 Synthese der Entzündungsmediatoren durch adipogen differenzierte Zellen nach der Kostimulation mit Visfatin und ERK1/2-Inhibitor

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des Lamellenknochens

Abb.2 Knochenumbau innerhalb einer BMU

Abb. 3: Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von MMPs im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSCs sowie phMSCs

Abb. 4: Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von TIMPs im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Abb. 5: Einfluss von Visfatin auf die Matrix-Synthese während der osteogenen Differenzierung der hMSCs und phMSCs

Abb. 6: Einfluss von Leptin und Resistin auf die Genexpression von Kollagen Typ I im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSCs bzw. phMSCs

Abb. 7: Einfluss von Visfatin auf die Expression von osteoblastären Markergenen in hMSCs bzw. phMSCs

Abb. 8: Einfluss von Leptin und Resistin auf die Genexpression von osteoblastären Markergenen

Abb. 9: Einfluss von Visfatin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Abb. 10: Einfluss von Resistin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Abb. 11: Einfluss von Leptin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der osteogenen Differenzierung von hMSCs und phMSCs

Abb. 12: Einfluss von Visfatin auf die Genexpression von ALP während der osteogenen Differenzierung unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS) sowie auf Spongiosa (aSP)

Abb. 13: Vergleich der ALP-Genexpression zwischen Standard- und 3D-Kultur während der osteogenen Differenzierung

Abb. 14: Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von IL6 während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Standard-Zellkultur

Abb. 15: Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von IL8 während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Standard-Zellkultur

Abb. 16: Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von MCP1 während der osteogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Standard-Zellkultur

Abb. 17: Adipogene Differenzierung von hMSCs

Abb. 18: Basale Genexpression von Leptin (n=4) und PPARG bei der adipogenen Differenzierung

Abb. 19: Einfluss von Adipokinen auf das adipogene Differenzierungspotential von hMSCs/phMSCs

Abb. 20: Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von MMP2 im Verlauf der adipogenen Differenzierung der phMSCs

Abb. 21: Einfluss von Adipokinen auf die mRNA Expression von MMP13 im Verlauf der adipogenen Differenzierung der hMSCs/phMSCs

Abb. 22: Einfluss von Visfatin auf die Proteinexpression von MMP13 im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs

Abb. 23: Einfluss von Adipokinen auf die Genexpression von TIMPs im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs

Abb. 24: Einfluss von Visfatin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs

Abb. 25: Einfluss von Resistin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs

Abb. 26: Einfluss von Leptin auf die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung in hMSCs/phMSCs

Abb. 27: Einfluss von Inhibitoren SB203580 und Apo866 auf die Visfatin-induzierte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs.

Abb. 28: Einfluss der Inhibierung von ERK1/2-Signalweg auf die Ausschüttung von Visfatin-induzierten Entzündungsmediatoren im Verlauf der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs

Abb. 29: Einfluss von Apo866 auf die Visfatin-induzierte mRNA-Expression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung der hMSCs/phMSCs

Abb. 30: Einfluss von Apo866 auf die Visfatin-induzierte Protein-Expression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung der hMSCs/phMSCs

Abb. 31: Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors auf die Visfatin-induzierte Expression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs

Abb. 32: Einfluss eines ERK1/2-Inhibitors auf die Visfatin-induzierte Proteinexpression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs

Abb. 33: Einfluss von Apo auf die Visfatin-induzierte Genexpression von Leptin und PPARG während der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs

Abb. 34: Einfluss von Apo auf das basale Genexpressionslevel von Leptin und PPARG während der adipogenen Differenzierung von hMSCs/phMSCs

Abb. 35: Einfluss von Visfatin auf die Genexpression von PPARG während der adipogenen Differenzierung unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS) sowie auf Spongiosa (aSP)

Abb. 36: Vergleich der Genexpression von PPARG während der adipogenen Differenzierung in Standardkultur und auf Spongiosa

Abb. 37: Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von IL6 während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Adipogenese unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS)

Abb. 38: Basale und Visfatin-induzierte Sekretion von IL8 während der adipogenen Differenzierung auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Adipogenese unter Standard-Zellkulturbedingungen (PS)

Abb. 39: Basales und Visfatin-induziertes MCP1 während der Adipogenese auf Spongiosa (aSP) im Vergleich zur Standard-Kultur (PS)

Abb. 40: Visfatin-induzierte mRNA- und Proteinexpression von MMP13 während der adipogenen Differenzierung in Standard-Kultur (PS) und auf Spongiosa (aSp)

Abb. 41: Visfatin-induzierte mRNA-Expression von MMP2 während der adipogenen Differenzierung in Standard-Kultur (PS) und auf Spongiosa (aSP)

9 Literaturverzeichnis

1. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(6): p. 1697-707.
2. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
3. Rastegar, F., et al., *Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications*. World J Stem Cells, 2010. **2**(4): p. 67-80.
4. Benisch, P., et al., *The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45142.
5. Verma, S., et al., *Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis*. J Clin Pathol, 2002. **55**(9): p. 693-8.
6. Sheu, Y. and J.A. Cauley, *The role of bone marrow and visceral fat on bone metabolism*. Curr Osteoporos Rep, 2011. **9**(2): p. 67-75.
7. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Osteoarthritis*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 626-34.
8. Hunter, D.J. and D.T. Felson, *Osteoarthritis*. Bmj, 2006. **332**(7542): p. 639-42.
9. Mahjoub, M., F. Berenbaum, and X. Houard, *Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis*. Osteoporos Int, 2012. **23 Suppl 8**: p. S841-6.
10. Sulzbacher, I., *Osteoarthritis: histology and pathogenesis*. Wien Med Wochenschr, 2012. **163**(9-10): p. 212-9.
11. Liu-Bryan, R. and R. Terkeltaub, *Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(1): p. 35-44.
12. Felson, D.T. and T. Neogi, *Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or of bone?* Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 341-4.
13. Brandt, K.D., et al., *Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(10): p. 1261-4.
14. Hadji, P., et al., *The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(4): p. 52-7.
15. Lerner, U.H., *Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis*. J Dent Res, 2006. **85**(7): p. 584-95.
16. Christiansen, C. and P. Riis, [*Consensus Development Conference. Prevention and treatment of osteoporosis*]. Nord Med, 1991. **106**(5): p. 145-7.
17. Kanis, J.A. and J.C. Stevenson, *Effect of estrogen therapy on bone density in elderly women*. N Engl J Med, 1994. **330**(10): p. 715; author reply 716.
18. Schuiling, K.D., K. Robinia, and R. Nye, *Osteoporosis update*. J Midwifery Womens Health, 2011. **56**(6): p. 615-27.
19. Chen, J.R., et al., *Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4632-8.
20. Taranta, A., et al., *The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro*. Bone, 2002. **30**(2): p. 368-76.
21. Dore, R.K., *How to prevent glucocorticoid-induced osteoporosis*. Cleve Clin J Med, 2010 **77**(8): p. 529-36.
22. Ward, K.D. and R.C. Klesges, *A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density*. Calcif Tissue Int, 2001. **68**(5): p. 259-70.

23. Boyce, B.F. and L. Xing, *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 139-46.
24. Bartl, R., *Klinische Osteologie: Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Kapitel 1: Normaler Knochen und Mineralstoffwechsel*. 2014, Studgard: New York: Thieme.
25. Boakey, A.L., *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (Second Edition), Kapitel 12: Mineralization, Structure and Function of Bone*. 2006, Burlington: Academic Press.
26. Hing, K.A., *Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?* Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2004. **362**(1825): p. 2821-50.
27. Marks, S.C., Jr. and S.N. Popoff, *Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton*. Am J Anat, 1988. **183**(1): p. 1-44.
28. Komori, T., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell, 1997. **89**(5): p. 755-64.
29. Stock, M. and F. Otto, *Control of RUNX2 isoform expression: the role of promoters and enhancers*. J Cell Biochem, 2005. **95**(3): p. 506-17.
30. Datta, H.K., et al., *The cell biology of bone metabolism*. J Clin Pathol, 2008. **61**(5): p. 577-87.
31. Owen, T.A., et al., *Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix*. J Cell Physiol, 1990. **143**(3): p. 420-30.
32. Stein, G.S., et al., *The onset and progression of osteoblast differentiation is functionally related to cellular proliferation*. Connect Tissue Res, 1989. **20**(1-4): p. 3-13.
33. Chambers, T.J. and K. Fuller, *Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact*. J Cell Sci, 1985. **76**: p. 155-65.
34. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
35. Drissi, H., et al., *1,25-(OH)₂-vitamin D₃ suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter*. Exp Cell Res, 2002. **274**(2): p. 323-33.
36. Kang, J.S., et al., *Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3*. Embo J, 2005. **24**(14): p. 2543-55.
37. Eriksen, E.F., *Cellular mechanisms of bone remodeling*. Rev Endocr Metab Disord, 2010. **11**(4): p. 219-27.
38. Uchihashi, K., et al., *Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: a novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte*. Bone, 2012. **52**(1): p. 102-10.
39. Arboleya, L. and S. Castaneda, *Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue*. Reumatol Clin, 2013. **9**(5): p. 303-15.
40. Xiong, J., et al., *Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138189.
41. Nakashima, T., et al., *Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1231-4.
42. Xiong, J., et al., *Matrix-embedded cells control osteoclast formation*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1235-41.
43. Day, T.F., et al., *Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis*. Dev Cell, 2005. **8**(5): p. 739-50.
44. Dallas, S.L. and L.F. Bonewald, *Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1192**: p. 437-43.

45. Jang, M.G., et al., *Intermittent PTH treatment can delay the transformation of mature osteoblasts into lining cells on the periosteal surfaces*. J Bone Miner Metab, 2015. **34**(5): p. 532-9.
46. Kim, S.W., et al., *Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts*. J Bone Miner Res, 2012. **27**(10): p. 2075-84.
47. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, *Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 455-98.
48. Everts, V., et al., *The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(1): p. 77-90.
49. Eriksen, E.F., G.Z. Eghbali-Fatourehchi, and S. Khosla, *Remodeling and vascular spaces in bone*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(1): p. 1-6.
50. Florencio-Silva, R., et al., *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 421746.
51. Boyce, B.F. and L. Xing, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 1**: p. S1.
52. Rachner, T.D., S. Khosla, and L.C. Hofbauer, *Osteoporosis: now and the future*. Lancet. **377**(9773): p. 1276-87.
53. Wan, Y., *PPARgamma in bone homeostasis*. Trends Endocrinol Metab. **21**(12): p. 722-8.
54. Weitzmann, M.N., *T-cells and B-cells in osteoporosis*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. **21**(6): p. 461-7.
55. Takayanagi, H., et al., *T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma*. Nature, 2000. **408**(6812): p. 600-5.
56. Zhao, B. and L.B. Ivashkiv, *Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors*. Arthritis Res Ther. **13**(4): p. 234.
57. Reid, I.R., et al., *Effects of denosumab on bone histomorphometry: the FREEDOM and STAND studies*. J Bone Miner Res. **25**(10): p. 2256-65.
58. Eriksen, E.F., et al., *Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels*. J Bone Miner Res, 1990. **5**(4): p. 311-9.
59. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3 Suppl 3**: p. S131-9.
60. Frost, H.M., *Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm)*. Bone, 1997. **20**(5): p. 385-91.
61. Frost, H.M., et al., *Tetracycline-based analysis of bone remodelling in osteopetrosis*. Clin Orthop Relat Res, 1969. **65**: p. 203-17.
62. Parfitt, A.M., *Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone*. J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 273-86.
63. Martin, T.J. and E. Seeman, *Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. **22**(5): p. 701-22.
64. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 115-37.
65. Fogelman, I. and v.d.W.H. Gnanasegaran G, *Radionuclide and hybrid bone imaging. Kapitel 2: Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism*. Vol. . 2012, Berlin; Heidelberg: Springer
66. Sims, N.A. and J.H. Gooi, *Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(5): p. 444-51.

67. Ozaki, Y., et al., *Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(1): p. 119-29.
68. Ponte, A.L., et al., *The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities*. Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1737-45.
69. Pederson, L., et al., *Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20764-9.
70. Habisch, H.J., et al., *Altered migration and adhesion potential of pro-neurally converted human bone marrow stromal cells*. Cytotherapy, 2008. **10**(8): p. 824-33.
71. Blair, H.C., M. Zaidi, and P.H. Schlesinger, *Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation*. Biochem J, 2002. **364**(Pt 2): p. 329-41.
72. Ross, F.P. and S.L. Teitelbaum, *alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology*. Immunol Rev, 2005. **208**: p. 88-105.
73. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5 ed. 2008, New York Garland Science.
74. Harada, S. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 349-55.
75. Valtieri, M. and A. Sorrentino, *The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis*. J Cell Physiol, 2008. **217**(2): p. 296-300.
76. Sethe, S., A. Scutt, and A. Stolzing, *Aging of mesenchymal stem cells*. Ageing Res Rev, 2006. **5**(1): p. 91-116.
77. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
78. Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2739-49.
79. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 726-36.
80. Woodbury, D., et al., *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*. J Neurosci Res, 2000. **61**(4): p. 364-70.
81. Tio, M., et al., *Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9398.
82. Kopen, G.C., D.J. Prockop, and D.G. Phinney, *Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10711-6.
83. Jang, S., et al., *Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin*. BMC Cell Biol, 2010 **11**: p. 25.
84. Sgodda, M., et al., *Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo*. Exp Cell Res, 2007. **313**(13): p. 2875-86.
85. Sato, Y., et al., *Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion*. Blood, 2005. **106**(2): p. 756-63.
86. Banas, A., et al., *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes*. Hepatology, 2007. **46**(1): p. 219-28.
87. Aurich, H., et al., *Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo*. Gut, 2009. **58**(4): p. 570-81.
88. Friedenstein, A.J., et al., *Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. Transplantation, 1974. **17**(4): p. 331-40.

89. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. Cell Tissue Kinet, 1987. **20**(3): p. 263-72.
90. Owen, M. and A.J. Friedenstein, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.
91. Moroni, L. and P.M. Fornasari, *Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues*. J Cell Physiol, 2012. **228**(4): p. 680-7.
92. Zhu, Y., et al., *Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC*. Cell Biochem Funct, 2008. **26**(6): p. 664-75.
93. Colter, D.C., I. Sekiya, and D.J. Prockop, *Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7841-5.
94. Fuchs, E., T. Tumber, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. Cell, 2004. **116**(6): p. 769-78.
95. Song, L. and R.S. Tuan, *Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow*. Faseb J, 2004. **18**(9): p. 980-2.
96. Delorme, B., et al., *Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity*. Stem Cells, 2009. **27**(5): p. 1142-51.
97. Bruder, S.P., N. Jaiswal, and S.E. Haynesworth, *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. J Cell Biochem, 1997. **64**(2): p. 278-94.
98. Zimmermann, S., et al., *Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells*. Leukemia, 2003. **17**(6): p. 1146-9.
99. Bernardo, M.E., et al., *Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms*. Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9142-9.
100. Simonsen, J.L., et al., *Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 592-6.
101. Kobune, M., et al., *Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells*. Exp Hematol, 2003. **31**(8): p. 715-22.
102. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
103. Sacchetti, B., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. Cell, 2007. **131**(2): p. 324-36.
104. Kinnaird, T., et al., *Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms*. Circ Res, 2004. **94**(5): p. 678-85.
105. Hung, S.C., et al., *Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis*. Stem Cells, 2007. **25**(9): p. 2363-70.
106. Ries, C., et al., *MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines*. Blood, 2007. **109**(9): p. 4055-63.
107. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3838-43.

108. Bartholomew, A., et al., *Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(1): p. 42-8.
109. Banas, A., et al., *IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury*. *Stem Cells*, 2008. **26**(10): p. 2705-12.
110. Dai, W., et al., *Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects*. *Circulation*, 2005. **112**(2): p. 214-23.
111. Gaebel, R., et al., *Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e15652.
112. Grinnemo, K.H., et al., *Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. **127**(5): p. 1293-300.
113. Noiseux, N., et al., *Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation*. *Mol Ther*, 2006. **14**(6): p. 840-50.
114. Horwitz, E.M., et al., *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. *Nat Med*, 1999. **5**(3): p. 309-13.
115. Ichioka, N., et al., *Prevention of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells*. *Stem Cells*, 2002. **20**(6): p. 542-51.
116. Tisato, V., et al., *Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease*. *Leukemia*, 2007. **21**(9): p. 1992-9.
117. Le Blanc, K., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. *Lancet*, 2004. **363**(9419): p. 1439-41.
118. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study*. *Lancet*, 2008. **371**(9624): p. 1579-86.
119. Justesen, J., et al., *Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis*. *Biogerontology*, 2001. **2**(3): p. 165-71.
120. Chung, N.G., et al., *Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation*. *Int J Hematol*, 2004. **80**(4): p. 370-6.
121. Rosland, G.V., et al., *Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation*. *Cancer Res*, 2009. **69**(13): p. 5331-9.
122. Justesen, J., et al., *Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures*. *Calcif Tissue Int*, 2002. **71**(1): p. 36-44.
123. Kassem, M., et al., *Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts*. *Osteoporos Int*, 1997. **7**(6): p. 514-24.
124. Rodriguez, J.P., et al., *Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics*. *J Cell Biochem*, 1999. **75**(3): p. 414-23.
125. Sui, B., et al., *Mesenchymal progenitors in osteopenias of diverse pathologies: differential characteristics in the common shift from osteoblastogenesis to adipogenesis*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 30186.
126. Moerman, E.J., et al., *Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways*. *Aging Cell*, 2004. **3**(6): p. 379-89.
127. Rodriguez, J.P., et al., *Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation*. *J Cell Biochem*, 2000. **79**(4): p. 557-65.

128. Martin, R.B. and S.L. Zissimos, *Relationships between marrow fat and bone turnover in ovariectomized and intact rats*. Bone, 1991. **12**(2): p. 123-31.
129. Kajkenova, O., et al., *Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(11): p. 1772-9.
130. Bühling, K.J., J. Lepenies, and K. Witt, *Intensivkurs: Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 2008, München Urban und Fischer
131. Dunnill, M.S., J.A. Anderson, and R. Whitehead, *Quantitative histological studies on age changes in bone*. J Pathol Bacteriol, 1967. **94**(2): p. 275-91.
132. Smahel, J., *Adipose tissue in plastic surgery*. Ann Plast Surg, 1986. **16**(5): p. 444-53.
133. Zhao, L.J., et al., *Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(1): p. 17-29.
134. Pollock, N.K., et al., *Lower bone mass in prepubertal overweight children with prediabetes*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(12): p. 2760-9.
135. Choi, J.H., et al., *Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(4): p. 413-26.
136. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1147-56.
137. Tontonoz, P., et al., *ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4753-9.
138. Kersten, S., B. Desvergne, and W. Wahli, *Roles of PPARs in health and disease*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 421-4.
139. Imai, T., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4543-7.
140. Dalbay, M.T., et al., *Adipogenic Differentiation of hMSCs is Mediated by Recruitment of IGF-1r Onto the Primary Cilium Associated With Cilia Elongation*. Stem Cells, 2015. **33**(6): p. 1952-61.
141. Chawla, A., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation*. Endocrinology, 1994. **135**(2): p. 798-800.
142. Bunnell, B.A., et al., *Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation*. Methods, 2008. **45**(2): p. 115-20.
143. Valenti, M.T., et al., *Role of ox-PAPCs in the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) and Runx2 and PPARgamma2 expression in MSCs-like of osteoporotic patients*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20363.
144. Löffler, G., Petrides, Petro E. , *Biochemie und Pathobiochemie, Stoffwechsel der Lipide*. 1998, Berlin, Heidelberg: Springer.
145. Pereira, S.S. and J.I. Alvarez-Leite, *Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes*. Curr Obes Rep, 2014. **3**(4): p. 422-31.
146. Siegmund, B., et al., *Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis*. Eur J Immunol, 2002. **32**(2): p. 552-60.
147. Turner, R.T., et al., *Morbid obesity attenuates the skeletal abnormalities associated with leptin deficiency in mice*. J Endocrinol, 2014. **223**(1): p. M1-15.
148. Lago, F., et al., *The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 313-25.
149. Abella, V., et al., *Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders*. Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(2): p. 100-109.
150. Sweeney, G., *Leptin signalling*. Cell Signal, 2002. **14**(8): p. 655-63.

151. Fong, T.M., et al., *Localization of leptin binding domain in the leptin receptor*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(2): p. 234-40.
152. Lam, Q.L. and L. Lu, *Role of leptin in immunity*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(1): p. 1-13.
153. Margetic, S., et al., *Leptin: a review of its peripheral actions and interactions*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(11): p. 1407-33.
154. Ceddia, R.B., W.N. William, Jr., and R. Curi, *The response of skeletal muscle to leptin*. Front Biosci, 2001. **6**: p. D90-7.
155. Ceddia, R.B., et al., *Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance*. Faseb J, 2002. **16**(10): p. 1163-76.
156. Henson, M.C. and V.D. Castracane, *Leptin in pregnancy*. Biol Reprod, 2000. **63**(5): p. 1219-28.
157. Collins, S., et al., *Role of leptin in fat regulation*. Nature, 1996. **380**(6576): p. 677.
158. Zarkesh-Esfahani, H., et al., *High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4593-9.
159. Sanchez-Margalet, V., et al., *Leptin receptor (Ob-R) expression is induced in peripheral blood mononuclear cells by in vitro activation and in vivo in HIV-infected patients*. Clin Exp Immunol, 2002. **129**(1): p. 119-24.
160. Ozata, M., I.C. Ozdemir, and J. Licinio, *Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(10): p. 3686-95.
161. Farooqi, I.S., et al., *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1093-103.
162. Santos-Alvarez, J., R. Goberna, and V. Sanchez-Margalet, *Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes*. Cell Immunol, 1999. **194**(1): p. 6-11.
163. Lord, G.M., et al., *Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(2): p. 330-8.
164. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
165. Gainsford, T., et al., *Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14564-8.
166. Siegmund, B., H.A. Lehr, and G. Fantuzzi, *Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 2011-25.
167. Bokarewa, M., et al., *Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(10): p. 952-6.
168. Dumond, H., et al., *Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(11): p. 3118-29.
169. Otero, M., et al., *Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights*. FEBS Lett, 2005. **579**(2): p. 295-301.
170. Reseland, J.E., et al., *Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(8): p. 1426-33.
171. Ducy, P., et al., *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass*. Cell, 2000. **100**(2): p. 197-207.
172. Nogueiras, R., et al., *Resistin: regulation of food intake, glucose homeostasis and lipid metabolism*. Endocr Dev, 2010. **17**: p. 175-184.

173. Savage, D.B., et al., *Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans*. Diabetes, 2001. **50**(10): p. 2199-202.
174. Schaffler, A., et al., *Adipocytokines in synovial fluid*. Jama, 2003. **290**(13): p. 1709-10.
175. Gremese, E., et al., *Obesity as a risk and severity factor in rheumatic diseases (autoimmune chronic inflammatory diseases)*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 576.
176. Gremese, E. and G. Ferraccioli, *The metabolic syndrome: the crossroads between rheumatoid arthritis and cardiovascular risk*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(10): p. 582-9.
177. Mu, H., et al., *Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(1): p. 146-57.
178. Neumann, E., et al., *[Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis]*. Z Rheumatol, 2007. **66**(2): p. 139-41.
179. Samal, B., et al., *Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1431-7.
180. Ying, W., *NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(2): p. 179-206.
181. Wang, T., et al., *Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(7): p. 661-2.
182. Kim, M.K., et al., *Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor I/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866*. J Mol Biol, 2006. **362**(1): p. 66-77.
183. Friebe, D., et al., *Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans*. Diabetologia, 2011. **54**(5): p. 1200-11.
184. Revollo, J.R., A.A. Grimm, and S. Imai, *The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(2): p. 164-70.
185. Revollo, J.R., et al., *Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 363-75.
186. Kover, K., et al., *Expression and regulation of nampt in human islets*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58767.
187. Otero, M., et al., *Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(9): p. 1198-201.
188. Brentano, F., et al., *Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(9): p. 2829-39.
189. Spinnler, R., et al., *The adipocytokine Nampt and its product NMN have no effect on beta-cell survival but potentiate glucose stimulated insulin secretion*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54106.
190. Fukuhara, A., et al., *Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin*. Science, 2005. **307**(5708): p. 426-30.
191. Brown, J.E., et al., *Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells*. J Mol Endocrinol, 2010. **44**(3): p. 171-8.
192. Meier, F.M., et al., *Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF), a proinflammatory and cell motility-changing factor in rheumatoid arthritis*. J Biol Chem, 2012. **287**(34): p. 28378-85.
193. Garten, A., et al., *Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(3): p. 130-8.

194. Moschen, A.R., et al., *Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1748-58.
195. Gosset, M., et al., *Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(5): p. 1399-409.
196. Jia, S.H., et al., *Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1318-27.
197. Junker, S., et al., *Expression of adipokines in osteoarthritis osteophytes and their effect on osteoblasts*. Matrix Biol, 2016. **62**: p. 75-91.
198. Xie, H., et al., *Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts*. Calcif Tissue Int, 2007. **80**(3): p. 201-10.
199. Li, Y., et al., *Nampt expression increases during osteogenic differentiation of multi- and omnipotent progenitors*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **434**(1): p. 117-23.
200. Venkateshaiah, S.U., et al., *NAMPT/PBEF1 enzymatic activity is indispensable for myeloma cell growth and osteoclast activity*. Exp Hematol, 2013. **41**(6): p. 547-557 e2.
201. Moschen, A.R., et al., *Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin and its role in inflammation-related bone disease*. Mutat Res, 2009. **690**(1-2): p. 95-101.
202. Tsiklauri, L., et al., *Visfatin alters the cytokine and matrix-degrading enzyme profile during osteogenic and adipogenic MSC differentiation*. Osteoarthritis Cartilage, 2018. **26**(9): p. 1225-1235.
203. Busse, B., et al., *Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae*. Bone, 2009. **45**(6): p. 1034-43.
204. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. Anal Biochem, 2004. **329**(1): p. 77-84.
205. Laan, R.F., et al., *Differential effects of glucocorticoids on cortical appendicular and cortical vertebral bone mineral content*. Calcif Tissue Int, 1993. **52**(1): p. 5-9.
206. Kraus, D., et al., *Leptin secretion and negative autocrine crosstalk with insulin in brown adipocytes*. J Endocrinol, 2002. **175**(1): p. 185-91.
207. Takeda, S., et al., *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system*. Cell, 2002. **111**(3): p. 305-17.
208. Yue, R., et al., *Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow*. Cell Stem Cell, 2016. **18**(6): p. 782-96.
209. Shih, C.L. and K.M. Ajuwon, *Inhibition of MMP-13 prevents diet-induced obesity in mice and suppresses adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes*. Mol Biol Rep, 2015. **42**(7): p. 1225-32.
210. Ducy, P., T. Schinke, and G. Karsenty, *The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1501-4.
211. van der Velde, M., et al., *An age-dependent interaction with leptin unmasks ghrelin's bone-protective effects*. Endocrinology, 2012. **153**(8): p. 3593-602.
212. Thomas, T., et al., *Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes*. Endocrinology, 1999. **140**(4): p. 1630-8.
213. Kazmi, A., et al., *Serum leptin values in the healthy obese and non-obese subjects of Rawalpindi*. J Pak Med Assoc, 2013. **63**(2): p. 245-8.
214. Thommesen, L., et al., *Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism*. J Cell Biochem, 2006. **99**(3): p. 824-34.
215. Li, Y., et al., *Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) affects the lineage fate determination of mesenchymal stem cells: a possible cause for reduced osteogenesis*

- and increased adipogenesis in older individuals.* J Bone Miner Res, 2011. **26**(11): p. 2656-64.
216. Xie, Z., et al., *Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.* Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 13.
217. Li, X., et al., *IL-6 Contributes to the Defective Osteogenesis of Bone Marrow Stromal Cells from the Vertebral Body of the Glucocorticoid-Induced Osteoporotic Mouse.* PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0154677.
218. Lane, J.M., E.H. Riley, and P.Z. Wirganowicz, *Osteoporosis: diagnosis and treatment.* Instr Course Lect, 1997. **46**: p. 445-58.
219. Rajala, M.W. and P.E. Scherer, *Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis.* Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3765-73.
220. Porter, R.M., W.R. Huckle, and A.S. Goldstein, *Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells.* J Cell Biochem, 2003. **90**(1): p. 13-22.
221. Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul, *Understanding adipocyte differentiation.* Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 783-809.
222. Atmani, H., et al., *Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells.* J Cell Biochem, 2002. **85**(3): p. 640-50.
223. Fromigue, O., P.J. Marie, and A. Lomri, *Differential effects of transforming growth factor beta2, dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells.* Cytokine, 1997. **9**(8): p. 613-23.
224. Pei, W., Y. Yoshimine, and J.N. Heersche, *Identification of dexamethasone-dependent osteoprogenitors in cell populations derived from adult human female bone.* Calcif Tissue Int, 2003. **72**(2): p. 124-34.
225. Rickard, D.J., et al., *Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow.* J Bone Miner Res, 1996. **11**(3): p. 312-24.
226. Vicennati, V., et al., *Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(7): p. 905-11.
227. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg, *Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 847-50.
228. Breuninger, L.M., et al., *Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes.* Clin Immunol Immunopathol, 1993. **69**(2): p. 205-14.
229. Ruan, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory.* Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1319-36.
230. Charriere, G., et al., *Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity.* J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9850-5.
231. Cousin, B., et al., *A role for preadipocytes as macrophage-like cells.* FASEB J, 1999. **13**(2): p. 305-12.
232. Wong, P.K., et al., *Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(1): p. 158-68.
233. Sul, O.J., et al., *Absence of MCP-1 leads to elevated bone mass via impaired actin ring formation.* J Cell Physiol, 2012. **227**(4): p. 1619-27.

234. Bendre, M.S., et al., *Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease*. Bone, 2003. **33**(1): p. 28-37.
235. Evans, L., et al., *Suppression of leukocyte infiltration and cartilage degradation by selective inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase: Apo866-mediated therapy in human fibroblasts and murine collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(7): p. 1866-77.
236. Bokarewa, M., et al., *Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5789-95.
237. Fadda, S.M., et al., *Resistin in inflammatory and degenerative rheumatologic diseases. Relationship between resistin and rheumatoid arthritis disease progression*. Z Rheumatol, 2013. **72**(6): p. 594-600.
238. Yarasheski, K.E., et al., *Serum leptin concentrations in human immunodeficiency virus-infected men with low adiposity*. Metabolism, 1997. **46**(3): p. 303-5.
239. Koc, E., et al., *Serum leptin levels and their relationship to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in neonatal sepsis*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2003. **16**(9): p. 1283-7.
240. Harkins, J.M., et al., *Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3-L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice*. J Nutr, 2004. **134**(10): p. 2673-7.
241. Bord, S., et al., *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone*. Bone, 1999. **24**(3): p. 229-35.
242. Haeusler, G., et al., *Localization of matrix metalloproteinases,(MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation*. Calcified tissue international, 2005. **76**(5): p. 326-335.
243. Holmbeck, K., et al., *The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone*. J Cell Sci, 2005. **118**(1): p. 147-156.
244. Fu, J., et al., *Multiple myeloma-derived MMP-13 mediates osteoclast fusion and osteolytic disease*. J Clin Invest, 2016. **126**(5): p. 1759-72.
245. Fan, Y., et al., *Visfatin/PBEF/Nampt induces EMMPRIN and MMP-9 production in macrophages via the NAMPT-MAPK (p38, ERK1/2)-NF-kappaB signaling pathway*. Int J Mol Med, 2011. **27**(4): p. 607-15.
246. Adya, R., et al., *Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(2): p. 356-65.
247. Park, H.Y., et al., *Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro*. Exp Mol Med, 2001. **33**(2): p. 95-102.
248. Kume, K., et al., *Potential role of leptin in endochondral ossification*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(2): p. 159-69.
249. Jamaluddin, M.S., et al., *Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(3): p. 622-32.
250. Yaykaşli, K.O., et al., *The upregulation of matrix metalloproteinase-2 and-9 genes caused by resistin in human chondrocytes*. Acta Med Anatol, 2014. **2**(1): p. 19-23.
251. Koskinen, A., et al., *Resistin as a factor in osteoarthritis: synovial fluid resistin concentrations correlate positively with interleukin 6 and matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-3*. Scand J Rheumatol, 2014. **43**(3): p. 249-53.

252. Ripamonti, U., S. Ma, and A.H. Reddi, *The critical role of geometry of porous hydroxyapatite delivery system in induction of bone by osteogenin, a bone morphogenetic protein*. Matrix, 1992. **12**(3): p. 202-12.
253. Kneser, U., et al., *Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(1): p. 7-19.
254. Arrington, E.D., et al., *Complications of iliac crest bone graft harvesting*. Clin Orthop Relat Res, 1996(329): p. 300-9.
255. Banwart, J.C., M.A. Asher, and R.S. Hassanein, *Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation*. Spine (Phila Pa 1976), 1995. **20**(9): p. 1055-60.
256. Conrad, E.U., et al., *Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation*. J Bone Joint Surg Am, 1995. **77**(2): p. 214-24.
257. Li, C., Y.-R. Ho, and Y. Liu, *Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: a case report*. Journal of the Formosan Medical Association= Taiwan yi zhi, 2001. **100**(5): p. 350-351.
258. Friedlaender, G.E. and M.C. Horowitz, *Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance*. Orthopedics, 1992. **15**(10): p. 1171-5.
259. Hallfeldt, K., et al., *Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties*. Journal of Surgical Research, 1995. **59**(5): p. 614-620.
260. Knaepler, H., H. Haas, and H.U. Puschel, *[Biomechanical properties of heat and irradiation treated spongiosa]*. Unfallchirurgie, 1991. **17**(4): p. 194-9.
261. Jager, M., et al., *Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro*. Ann Biomed Eng, 2005. **33**(10): p. 1319-32.
262. Fischbach, C., et al., *Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes*. Exp Cell Res, 2004. **300**(1): p. 54-64.
263. Honsawek, S., R.M. Powers, and L. Wolfinger, *Extractable bone morphogenetic protein and correlation with induced new bone formation in an in vivo assay in the athymic mouse model*. Cell Tissue Bank, 2005. **6**(1): p. 13-23.
264. Urist, M.R., *The classic : a morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue*. Clin Orthop Relat Res, 2009. **467**(12): p. 3068-70.
265. Wildemann, B., et al., *Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations*. J Biomed Mater Res A, 2007. **81**(2): p. 437-42.
266. Alliot-Licht, B., A. Jean, and M. Gregoire, *Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro*. Arch Oral Biol, 1994. **39**(6): p. 481-9.
267. Buxton, P.G., et al., *Dense collagen matrix accelerates osteogenic differentiation and rescues the apoptotic response to MMP inhibition*. Bone, 2008. **43**(2): p. 377-85.
268. Gruber, R., et al., *Fracture healing in the elderly patient*. Exp Gerontol, 2006. **41**(11): p. 1080-93.
269. Lynch, M.P., et al., *The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization*. Exp Cell Res, 1995. **216**(1): p. 35-45.
270. Smalley, K.S., M. Lioni, and M. Herlyn, *Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2006. **42**(8-9): p. 242-7.
271. Salasnyk, R.M., et al., *Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells*. J Biomed Biotechnol, 2004. **2004**(1): p. 24-34.

272. Meyers, V.E., et al., *Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells*. J Cell Biochem, 2004. **93**(4): p. 697-707.
273. Takeuchi, Y., et al., *Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(46): p. 29309-16.
274. Docheva, D., et al., *Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 21-38.
275. Lundgren-Akerlund, E., L. Varas, and C. Kjellman, *THE COLLAGEN-BINDING INTEGRIN α 10 β 1 REGULATES CHONDROCYTE PHENOTYPE AND EXPRESSION OF MMP13*, O.a. Cartilage, Editor, Osteoarthritis and Cartilage.
276. Brooks, P.C., et al., *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. Cell, 1996. **85**(5): p. 683-93.
277. Wu, M.H., et al., *Visfatin Promotes IL-6 and TNF-alpha Production in Human Synovial Fibroblasts by Repressing miR-199a-5p through ERK, p38 and JNK Signaling Pathways*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
278. Cea, M., et al., *Targeting NAD⁺ salvage pathway induces autophagy in multiple myeloma cells via mTORC1 and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) inhibition*. Blood, 2012. **120**(17): p. 3519-29.
279. Favata, M.F., et al., *Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18623-32.
280. Lai, C.F., et al., *Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 14443-50.
281. Jaiswal, R.K., et al., *Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9645-52.
282. Ba, P., et al., *Differential effects of p38 and Erk1/2 on the chondrogenic and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells*. Mol Med Rep, 2017. **16**(1): p. 63-68.
283. Xu, D.J., et al., *Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells*. BMB Rep, 2012. **45**(4): p. 247-52.

10 Publikationen

Tsiklauri L, Werner J, Kampschulte M, Frommer KW, Berninger L, Irrgang M, Glenske K, Hose D, El Khassawna T, Rehart S, Wenisch S, Müller-Ladner U, Neumann E. Visfatin alters the cytokine and matrix-degrading enzyme profile during osteogenic and adipogenic MSC differentiation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018 Sep;26(9):1225-1235. doi: 10.1016/j.joca.2018.06.001.

Junker S, Frommer KW, Krumbholz G, **Tsiklauri L**, Gerstberger R, Rehart S, Steinmeyer J, Rickert M, Wenisch S, Schett G, Müller-Ladner U, Neumann E. Expression of adipokines in osteoarthritis osteophytes and their effect on osteoblasts. *Matrix Biol*. 2016 Nov 22. pii: S0945-053X(16)30195-0. doi: 10.1016/j.matbio.2016.11.005.

Kongressbeiträge

Vorträge:

L. Tsiklauri, J. Werner, K. W. Frommer, U. Müller-Ladner, S. Rehart, S. Wenisch, E. Neumann. Adipokines effect differentiation of osteoporosis and osteoarthritis spongiosa-derived mesenchymal stromal cells. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, DGRh, Frankfurt 2016.

L. Tsiklauri, J. Werner, K. W. Frommer, U. Müller-Ladner, S. Rehart, S. Wenisch, E. Neumann. Adipokine effects on differentiation of osteoporosis and osteoarthritis spongiosa-derived mesenchymal stromal cells. The Annual European Congress of Rheumatology - EULAR, London 2016.

L. Tsiklauri, J. Werner, K. W. Frommer, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Adipokines affect differentiation of osteoarthritis and osteoporosis spongiosa-derived mesenchymal stroma cells. European Workshop for Rheumatology Research – EWRR, York 2016.

Poster:

L. Tsiklauri, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Signaling pathways involved in visfatin-mediated induction of proinflammatory cytokines and MMPs during adipogenic MSC differentiation. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, DGRh, Dresden 2019.

- L. Tsiklauri**, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Visfatin-mediated osteodestructive effects are reduced during adipogenic differentiation of MSC on mineralized bone fragments. The Annual European Congress of Rheumatology - EULAR, Madrid 2019.
- L. Tsiklauri**, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Extrazellulärmatrix reduziert die Visfatin-vermittelten osteodestruktiven Effekte bei der adipogenen MSC-Differenzierung. Kongress für Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, DGIM, Wiesbaden 2019.
- L. Tsiklauri**, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Extracellular matrix attenuated matrix-degrading effects of visfatin during adipogenic MSC differentiation. European Workshop for Rheumatology Research – EWRR, Lion 2019.
- L. Tsiklauri**, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Extracellular matrix attenuated matrix-degrading effects of visfatin during adipogenic MSC differentiation. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, DGRh, Mannheim 2018.
- L. Tsiklauri**, J. Werner, K. W. Frommer, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Visfatin in Knochenhomöostase von Patienten mit Arthrose und Osteoporose. Kongress für Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, DGIM, Mannheim 2018.
- L. Tsiklauri**, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Visfatin in bone metabolism of osteoporosis and osteoarthritis patients. European Workshop for Rheumatology Research – EWRR, Geneva 2018.
- L. Tsiklauri**, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, S. Wenisch, U. Müller-Ladner, E. Neumann. Influence of adipokines on the differentiation of spongiosa-derived mesenchymal stromal cells from osteoporosis and osteoarthritis patients. American College of Rheumatology, ACR, San Diego 2017.
- L. Tsiklauri**, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Visfatin influences differentiation of spongiosa-derived mesenchymal stromal cells from osteoporotic and osteoarthritis patients. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie, DGRh, Stuttgart 2017.
- L. Tsiklauri**, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Einfluss von Adipokinen auf die Differenzierung der Spongiosa-abgeleiteten mesenchymalen Stammzellen. Kongress für Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, DGIM, Mannheim 2017.

L. Tsiklauri, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Influence of adipokines on differentiation of osteoarthritis and osteoporosis spongiosa-derived mesenchymal stromal cells. European Workshop for Rheumatology Research – EWRR, Athens 2017.

L. Tsiklauri, J. Werner, K. W. Frommer, R. Engel, S. Rehart, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Differentiation of spongiosa-derived mesenchymal stromal cells from osteoporosis and osteoarthritis patients are influenced by adipokines. American College of Rheumatology, ACR, Washington 2016.

L. Tsiklauri, J. Werner, K. W. Frommer, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Adipokine beeinflussen die Differenzierung der Spongiosa-abgeleiteten mesenchymalen Stammzellen. Kongress für Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, DGIM, Mannheim 2016.

L. Tsiklauri, J. Werner, K. W. Frommer, U. Müller-Ladner, S. Wenisch, E. Neumann. Adipokines affect differentiation of osteoarthritis and osteoporotic spongiosa-derived mesenchymal stroma cells. von Behring-Röntgen-Symposium, Gießen 2015.

Dankeschön...

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Müller-Ladner für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Betreuung meiner Promotionsarbeit und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat am Institut für Rheumatologie und klinische Immunologie des Lehrstuhls für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der JLU Gießen meine Arbeit durchzuführen.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Elena Neumann für die Betreuung, ihre Unterstützung im Labor und auf wissenschaftlichen Kongressen sowie für ihre kompetenten Ratschläge und ihre immer vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Trenczek und Herrn Prof. Martin danke ich für die Betreuung und Prüfung meiner Arbeit im Fachbereich Biologie.

Rosel möchte ich ganz besonders dafür danken, dass sie mich zu Beginn meiner Promotion so freundlich im Labor eingewiesen hat und mit ihrer Erfahrung und Ihren hervorragenden Protokollen immer hilfsbereit an meiner Seite stand. Außerdem danke ich ihr für Ihre Ratschläge, direkte Meinung, konstruktive Kritik und ihre Hilfe in allen Lebenssituationen. Auch Lisa danke ich für den sorgfältigen Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Prof. Wenisch und ihrer Arbeitsgruppe für die angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Etablierung der Methoden bedanken.

Ein sehr großes Dankeschön geht an das ganze Laborteam und hier speziell an Klaus für sein Fachwissen und seine Unterstützung bei sämtlichen Fragen, an Christiane, Magnus, Carina, Iris, Marie, Mona, Silvia, Christine, Maria, Rebecca und Dennis für ihre Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsklima.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meinen Schwestern Natia, Tamar und Dali, meinen Eltern und meinem Schwager, die mich stets unterstützt und mit aufmunternden Worten motiviert haben.