

**Aus dem Department Chirurgie
Klinik für Plastische und Handchirurgie
des Universitätsklinikums Freiburg im Breisgau**

Einfluss von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2023
von Calvin Früh
geboren in Baden-Baden

Dekan: Prof. Dr. Lutz Hein

1. Gutachter: Prof. Dr. Günter Finkenzeller

2. Gutachter: PD Dr. Eva Johanna Kubosch

Tag der Promotion: 08.05.2024

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	
1. Einleitung	1
1.1. Critical-Size-Defect (CSD) und Knochenersatztherapie.....	1
1.2. Tissue Engineering	2
1.2.1. Definition.....	2
1.2.2. Tissue Engineering von Knochengewebe	2
1.3. Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	3
1.3.1. Definition und Kriterien mesenchymaler Stammzellen	3
1.3.2. Mesenchymale Stammzellen verschiedener Isolationsquellen im Vergleich	4
1.3.3. Sekretom der mesenchymalen Stammzellen.....	5
1.4. Entstehung und Regeneration von Knochengewebe	6
1.4.1. Physiologie des Knochenstoffwechsels.....	6
1.4.2. Osteogene Differenzierung.....	6
1.4.3. Prozesse der Knochenentstehung – desmale und enchondrale Ossifikation.....	7
1.4.4. Knochenheilung.....	7
1.5. PDGF-BB	9
1.5.1. Aufbau und Struktur von PDGF.....	9
1.5.2. Rezeptoren und Signaltransduktion von PDGF	9
1.5.3. Effekte von PDGF	10
1.5.4. Wirkung von PDGF-BB auf mesenchymale Stammzellen	10
1.5.5. Regulation des Effektes von PDGF-BB.....	12
1.6. Ziele der Dissertationsarbeit.....	13
2. Materialien und Methoden	14
2.1. Zellkultur	14
2.1.1. Präparation der ASCs	15
2.1.2. Kryokonservierung und Auftauen von ASCs.....	17
2.1.3. Splitten und Passagieren von Zellen	18
2.2. Durchflusszytometrie	19
2.2.1. Theoretische Grundlagen	19
2.2.2. Durchführung der FACS-Analyse.....	20
2.3. Proliferationsassay.....	22
2.3.1. Theoretische Grundlagen	22
2.3.2. Ausplattieren der ASCs in 6-Well-Platten	23

2.3.3.	Kultivierung der Zellen unter osteogenen Kontroll- und Differenzierungsbedingungen	24
2.3.4.	Durchführung des Zellproliferationsassays.....	25
2.4.	Untersuchung der osteogenen Differenzierung von ASCs in Abhängigkeit der Konzentration von PDGF-BB	26
2.4.1.	Kultivierung der ASCs mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDGF-BB	26
2.4.2.	Alizarin-Rot-Färbung und Mikroskopie.....	26
2.4.3.	Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung.....	27
2.4.4.	Calciumassay.....	28
2.5.	Untersuchung der Zeitkinetik der osteogenen Differenzierung unter Einfluss von PDGF-BB	29
2.5.1.	Kultivierung der ASCs mit unterschiedlicher Inkubationsdauer	29
2.5.2.	Auswertung der Zeitkinetik mittels Alizarin-Rot-Färbung.....	29
2.6.	Untersuchung der Genexpression von ASCs unter PDGF-BB in Abhängigkeit der Zeit	30
2.6.1.	RNA-Isolation	30
2.6.2.	DNase-I-Verdau	31
2.6.3.	Reverse Transkription und cDNA-Synthese	32
2.6.4.	Genexpressionsanalyse mittels TaqMan-RT-qPCR.....	33
2.6.5.	Statistische Auswertung	36
2.7.	Untersuchung der Signaltransduktion der osteogenen Differenzierung unter PDGF-BB in ASCs.....	37
2.7.1.	Kultivierung der ASCs mit unterschiedlichen Inhibitoren unter Einfluss von PDGF-BB	38
2.7.2.	Auswertung der Inhibitorenversuche mittels Alizarin-Rot-Färbung.....	38
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Charakterisierung der ASCs mittels Durchflusszytometrie	39
3.2.	Effekte von PDGF-BB auf die Proliferation von ASCs.....	39
3.3.	Effekte von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von ASCs in Abhängigkeit der PDGF-BB-Konzentration.....	40
3.4.	Effekte von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von ASCs in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	44
3.5.	Effekte von PDGF-BB auf die Genexpression osteogener Gene in ASCs	46
3.6.	Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion der PDGF-BB-vermittelten Induktion der osteogenen Differenzierung in ASCs	54
4.	Diskussion.....	59
4.1.	Durchflusszytometrie und verwendete Stammzellen	59

4.2. Einfluss von PDGF-BB auf die Zellzahl.....	60
4.3. Osteogene Differenzierung in Abhängigkeit der Konzentration an PDGF-BB.....	61
4.4. Zeitkinetik des Einflusses von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung	62
4.5. Signaltransduktion von PDGF-BB in ASCs	65
4.6. Ausblick.....	67
5. Zusammenfassung.....	69
6. Literaturverzeichnis	70
7. Anhang.....	89
7.1. Lebenslauf	89
7.2. Eidesstaatliche Versicherung	90
7.3. Erklärung zum Eigenanteil.....	91
7.4. Danksagung	92

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
Alk	Activin Receptor-like Kinase
ALP	Alkaline Phosphatase
ASC	Adipose Tissue Derived Stromal Cell
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
β-ME	β-Mercaptoethanol
BGLAP	Bone Gamma-carboxyglutamate Protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bmMSC	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukelinsäure (complementary Desoxyribonucleinic Acid)
COL1A1	Collagen Type I Alpha 1 Chain
CSD	Critical Size Defect
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein Acid
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IBSP	Integrin Binding Sialoprotein
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-4	Interleukin 4
JNK	c-Jun-N-terminal Kinase
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
miRNA	Micro Ribonucleic Acid
MSC	Mesenchymal Stem Cell

NTC	No Template Control
OD	Optische Dichte
OSF-2	Osteoblast-specific Factor 2
OSX	Osterix
p38-MAPK	p38-mitogen-activated Protein Kinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF(R)	Platelet-derived Growth Factor (Receptor)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PLC γ	Phospholipase C gamma
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per Minute)
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction)
RUNX2	Runt-related Transcription Factor 2
Saos-2	Sarcoma Osteogenic-2 Zellen
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF	Stromale Vaskuläre Fraktion
TGF- β	Transforming Growth Factor β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WF	Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Medienbehandlung der 6-Well-Platten	25
Abbildung 2: Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie im BD LSRFortessa™ .	39
Abbildung 3: Einfluss von PDGF auf die Proliferation der ASCs.....	40
Abbildung 4: Makroskopische Darstellung der Alizarin-Rot-Färbung der Konzentrationsreihe	41
Abbildung 5: Mikroskopische Darstellung der Alizarin-Rot-Färbung der Konzentrationsreihe	41
Abbildung 6: Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung der Konzentrationsreihe.....	42
Abbildung 7: Calciumkonzentration der Konzentrationsreihe.....	43
Abbildung 8: Makroskopische Darstellung der Alizarin-Rot-Färbung der Zeitkinetik.....	44
Abbildung 9: Mikroskopische Darstellung der Alizarin-Rot-Färbung der Zeitkinetik.....	45
Abbildung 10: Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung der Zeitkinetik.....	46
Abbildung 11: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von RUNX2	47
Abbildung 12: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von OSF-2	48
Abbildung 13: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von ALP	49
Abbildung 14: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von COL1A1	50
Abbildung 15: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von IBSP	51
Abbildung 16: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von SPARC	52
Abbildung 17: Ergebnis der Genexpressionsanalysen von SPP1	53
Abbildung 18: Makroskopische Darstellung der Alizarin-Rot-Färbung mit Inhibitoren	55
Abbildung 19: Mikroskopische Darstellung der Alizarin-Rot-Färbung mit Inhibitoren	57
Abbildung 20: Effekt der Inhibitoren auf die PDGF-BB-induzierte Mineralisation	58

1. Einleitung

Gemäß der *Global Burden of Disease* Studie aus dem Jahr 2019 hat sich die Weltbevölkerung zwischen 1990 und 2019 um 26% erhöht. Die durchschnittliche Lebenserwartung stieg im selben Zeitraum um etwa 7 Jahre an (1). Schätzungen dieser Studie zufolge wird die Weltbevölkerung bis zu ihrem Höchststand im Jahr 2064 um weitere 25% zunehmen und die durchschnittliche Lebenserwartung der Weltbevölkerung wird um weitere 5 Jahre steigen. Bis zum Jahr 2100 wird sich die Zahl der Menschen über 80 Jahre etwa versechsfachen (2). Auch die *World Health Organization* (WHO) schätzt, dass sich die Anzahl der Menschen über 60 Jahre zwischen 2015 und 2050 nahezu verdoppeln wird (3). Mit steigender Anzahl an älteren Menschen und konsekutiver Zunahme an altersbedingten Erkrankungen wird die Krankheitslast sowohl in einer sozialen als auch wirtschaftlichen Dimension zunehmen (4). Die Krankheitslast durch muskuloskelettale Beeinträchtigungen hat in den letzten Jahren stetig zugenommen, wobei diese für eine steigende Anzahl an Behinderungen verantwortlich sind, aber gleichzeitig nur wenige Todesfälle verursachen (5). Die Ursache dafür ist, dass mit zunehmendem Alter das Risiko für Frakturen steigt, da die Knochenmasse abnimmt, während strukturelle Schäden am Knochen sowie die Sturzneigung zunehmen (6).

1.1. Critical Size Defect (CSD) und Knochenersatztherapie

Mit steigendem Alter zeigt Knochengewebe ein schlechteres Regenerationspotential (7,8), sodass die Wahrscheinlichkeit für Wundheilungsstörungen zunimmt. Heilt ein Knochendefekt nicht von alleine über die Lebensdauer eines Individuums aus oder ist zusätzlich zur Stabilisation der Fraktur eine operative Intervention notwendig, um eine Heilung zu ermöglichen, so spricht man von einem *Critical Size Defect* (CSD) (9–11). Es existieren bisher weder eine einheitliche Definition eines CSD noch ist ein einheitliches Therapiemanagement etabliert (12–14). Dennoch gibt es verschiedene Möglichkeiten zur Therapie eines CSDs. Größere Knochendefekte erfordern einen Gewebersatz durch einen gestielten oder freien Gewebettransfer (15). Als Goldstandard in der Therapie von Knochendefekten wird der autologe Knochentransfer angesehen (14). Der autologe Transfer ist jedoch wegen einer begrenzten Verfügbarkeit an autologem Gewebe sowie der erhöhten spenderseitigen Morbidität, die durch den neu verursachten Knochendefekt an der Hebestelle entsteht, limitiert. Eine weitere Option in der Therapie von größeren Knochendefekten stellt ein allogener Gewebettransfer dar. Allerdings besteht bei einem allogenen Transfer zusätzlich zu den Limitationen des autogenen Transfers die Gefahr einer Abstoßungsreaktion von Seiten

des Empfängers sowie die Übertragung einer Krankheit vom Spender auf den Empfänger (16,17). Einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie von großen segmentalen Knochendefekten stellt das *Tissue Engineering* von Knochengewebe dar. Vorteile dieses Verfahrens sind, dass das entstehende Gewebe durch Vermehrung der Zellen *in vitro* in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung steht und die Vaskularisation des entstehenden Gewebes beeinflusst werden kann (18).

1.2. Tissue Engineering

1.2.1. Definition

Unter *Tissue Engineering* versteht man nach Skalak und Fox die „Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften zur Gewinnung eines fundamentalen Verständnisses von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologischen Säuger-Geweben und die Entwicklung von biologischem Ersatz zur Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion“ (19). Dabei werden lebende Zellen und strukturgebende Materialien kombiniert eingesetzt, um ein Gewebe zu regenerieren oder zu ersetzen. Um eine bestmögliche Funktionalität und Haltbarkeit zu erzielen, soll das auf diese Weise neu erstellte Gewebe dem ursprünglichen Gewebe sowohl in biologischer als auch mechanischer Hinsicht möglichst gleichen. Die drei Säulen des Tissue Engineerings sind gemäß Langer und Vacanti lebende Zellen, strukturgebendes Gerüstmaterial und biochemische, mechanische und physikochemische Signale (20).

1.2.2. Tissue Engineering von Knochengewebe

Lag zu Beginn des *Tissue Engineerings* der Schwerpunkt vor allem bei der Rekonstruktion von Haut und Knorpelgewebe, so ergaben sich mit zunehmendem Fortschritt und Weiterentwicklung der Techniken neue Ziele wie beispielsweise die Rekonstruktion von komplexeren Geweben wie Leber, Herz, Niere, Neuronen, Rückenmark, Sehnen, Muskeln sowie Knochen (21,22).

Das Konzept des *Tissue Engineerings* von Knochengewebe besteht darin, dass dem Patienten zum Ersatz von Knochendefekten im ersten Schritt autologe Stammzellen entnommen werden. Diese werden *in vitro* kultiviert und vermehrt und dann kombiniert mit einem Gerüst in den Empfänger eingebracht, wo sie neues Knochengewebe bilden sollen (20).

Beim *Tissue Engineering* von Knochengewebe stellt eine ausreichende Vaskularisation eine wichtige Voraussetzung dar, da sowohl während der Ossifikation als auch bei späteren Auf- und Umbauprozessen

sowie Regenerationsprozessen des Knochens eine suffiziente Vaskularisation erforderlich ist. Ein langfristiges Überleben des implantierten Gewebes kann somit nur mit einer ausgereiften Strategie zur Vaskularisation erreicht werden. Verschiedene Ansätze befassen sich mit dem Einsatz von angiogenen Wachstumsfaktoren, dem kombinierten Einsatz von vaskulären sowie osteogenen Zellreihen, chirurgischen Methoden oder der Biofabrikation neuer Gefäßnetzwerke mittels *3D-Bioprinting* (23). *3D-Bioprinting* ermöglicht eine genaue Anordnung und räumliche Verteilung der Zellen im Konstrukt und ist daher eine vielversprechende Methode im Bereich des Tissue Engineerings, die sich in den letzten Jahren erheblich weiterentwickelt hat (24,25).

Dem *3D-Bioprinting* liegt die Vorstellung zu Grunde, dass das gedruckte Konstrukt statisch ist und keinen weiteren Änderungen nach der Herstellung und Implantation unterliegt. Im Gegensatz dazu versucht das *4D-Bioprinting* als Weiterentwicklung unter Hinzunahme der Zeit als vierter Dimension, die natürlichen Regenerationsprozesse, die dynamische Änderungen des Gewebes durch intrinsische und externe Stimuli beinhalten, nachzuahmen, um eine bestmögliche Ausreifung des Konstrukts zu ermöglichen (26). Rukavina et al. zeigten, dass ein kombinierter Druck von aus dem Fettgewebe gewonnenen mesenchymalen Stammzellen (ASCs) und menschlichen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs) bei anschließender Implantation in ein *in vivo* Mausmodell zur Ausbildung von Knochengewebe mit Kalzifikation der Extrazellulärmatrix und zur Ausbildung von Blutgefäßen mit unterschiedlichen Durchmessern führt (27). Zusammenfassend stellt das *4D-Bioprinting* eine vielversprechende Technik insbesondere für Bereiche des *Tissue Engineerings* dar, die mehrere Zellarten nach einer strengen räumlichen Anordnung in einem Konstrukt platzieren. Je nachdem welches Gewebe oder Organ das Konstrukt ersetzen soll, kommen unterschiedliche Zellen zum Einsatz.

1.3. Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

1.3.1. Definition und Kriterien mesenchymaler Stammzellen

Multipotente mesenchymale Stromazellen, auch als mesenchymale Stammzellen bezeichnet (MSCs), werden häufig im Bereich des *Tissue Engineerings* verwendet, da sie sich als multipotente Stammzellen zu verschiedenen Geweben differenzieren lassen, dabei in ausreichender Menge in adulten Organismen vorhanden sind und aus diesen isoliert werden können. Sie stellen somit eine reichhaltige Quelle multipotenter Stammzellen dar (28,29). Die erste Isolation von MSCs erfolgte aus dem Knochenmark (30). Inzwischen können mesenchymale Stammzellen aus unterschiedlichsten weiteren Geweben wie

beispielsweise der Nabelschnur, Blut, Muskelgewebe, Fettgewebe und weiteren Geweben isoliert werden (31,32).

Gemäß der *International Society for Cellular Therapy* müssen multipotente mesenchymale Stammzellen verschiedene Kriterien erfüllen. Dazu gehört erstens die Fähigkeit, adhärent an Plastikoberflächen zu wachsen, zweitens müssen die Oberflächenmarker CD105, CD73 and CD90 exprimiert werden, während die Oberflächenmarker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR nicht exprimiert werden dürfen und drittens müssen sie sich *in vitro* zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren (33). Diese Kriterien erfüllen auch MSCs, die aus dem Fettgewebe isoliert werden (34–36). Sie werden als *Adipose-tissue-derived stromal cells* (ASCs) bezeichnet (37).

ASCs können mittels unterschiedlicher Techniken aus Fettgewebe gewonnen werden. Zum einen ist eine Isolation aus exzidiertem Fettgewebe und zum anderen eine Isolation aus Lipoaspirat möglich. Die Differenzierungsfähigkeit der einzelnen Zellen wird dabei nicht beeinflusst, allerdings ist die Ausbeute an vitalen Zellen bei Isolation aus dem Exzidat höher als beim Aspirat. Insgesamt ist dennoch die Gewinnung aus Lipoaspirat für den Patienten zu bevorzugen, da die Entnahme weniger invasiv ist (38). Somit stellen ASCs einen vielversprechenden Ansatz im Bereich des Tissue Engineering dar, da sie minimalinvasiv in großen Mengen gewonnen werden können (39).

1.3.2. Mesenchymale Stammzellen verschiedener Isolationsquellen im Vergleich

Die bisher am besten erforschten und am häufigsten eingesetzten MSCs im *Tissue Engineering* und in der regenerativen Medizin sind aus dem Knochenmark isolierte mesenchymale Stammzellen (BMSCs) (40–42). BMSCs eignen sich aufgrund ihrer osteogenen Differenzierungsfähigkeit mit resultierender Mineralisation der Extrazellulärmatrix insbesondere für das *Bone Tissue Engineering* (43). ASCs besitzen die Fähigkeit zur Mineralisation und Ossifikation *in vitro* und stellen somit eine vielversprechende Quelle für Stammzellen im *Bone Tissue Engineering* dar (44). Im Vergleich zu BMSCs zeigen ASCs eine identische Expression von relevanten Oberflächenmarkern und sind den BMSCs in Hinblick auf die Multipotenz und die Differenzierungsfähigkeit ebenbürtig (45–48). Mohamed-Ahmed et al. stellten fest, dass ASCs den BMSCs in Hinblick auf die osteogene Differenzierung unterlegen sind (49). Allerdings zeigten sich in einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe ASCs speziell in Hinblick auf die osteogene Differenzierung gegenüber BMSCs überlegen (31). Außerdem können ASCs mit einer geringeren Morbidität während der Isolation und in einer höheren Menge als BMSCs gewonnen werden (46,50), sodass sie in Zusammenschau aller Ergebnisse als geeignete Quelle für das *Tissue Engineering* von Knochengewebe angesehen werden können. ASCs bewirken weiterhin in Kombination mit

verschiedenen Gerüstmaterialien eine Verstärkung der Mineralisation der Extrazellulärmatrix im 3D-Modell und zeigen diese Fähigkeit sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (51–53).

1.3.3. Sekretom der mesenchymalen Stammzellen

Die Erkenntnis, dass mesenchymale Stammzellen auch Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, und Moleküle der Extrazellulärmatrix produzieren können, führte zu der Hypothese, dass die Regeneration von Geweben nicht nur von den Stammzellen selbst ausgehend durch Proliferation und *Remodelling* erfolgt, sondern dass die Stammzellen zusätzlich durch sekretierte Moleküle die bereits im Gewebe vorhandenen Zellen beeinflussen können. Dabei wirken sie nicht nur parakrin, sondern auch autokrin. Das bedeutet, dass sie sowohl auf körpereigene Zellen als auch auf die anderen implantierten Zellen und zuletzt auf sich selbst eine Wirkung ausüben können. Sie können zusätzlich die angeborene und die adaptive Immunantwort beeinflussen und zeigen in verschiedenen Arbeiten eine neuroprotektive und eine kardioprotektive Wirkung. Zusätzlich haben sie einen Einfluss auf die Heilung von Wunden der Haut und spielen eine Rolle bei der Regeneration von Knochen (54). Auch ASCs als Unterform der MSCs können Wachstumsfaktoren und andere Moleküle sekretieren, die einen Einfluss auf die Zellen des umliegenden Gewebes haben (55–59). Zu den von den ASCs sezernierten Wachstumsfaktoren zählen unter anderem *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Hepatocyte growth factor* (HGF) und *Basic fibroblast growth factor* (bFGF) (60,61). Gleichzeitig werden ASCs auch durch Wachstumsfaktoren beeinflusst. Kilroy et al. konnten zeigen, dass ASCs, denen *Epidermal growth factor* (EGF) und bFGF zugesetzt wird, vermehrt HGF sekretieren (59). Zusätzlich können verschiedene Wachstumsfaktoren sowie Umwelteinflüsse die Differenzierung von ASCs in unterschiedliche Zelltypen beeinflussen (62). So konnten Chen et al. zeigen, dass die adipo-osteogene Differenzierung sowohl von biologischen, chemischen, als auch physikalischen Faktoren beeinflusst wird (63).

Um den Einfluss der Wachstumsfaktoren im Prozess der Knochenentstehung verstehen zu können, werden im folgenden Abschnitt wesentliche Grundlagen und Charakteristika des Knochengewebes erläutert.

1.4. Entstehung und Regeneration von Knochengewebe

1.4.1. Physiologie des Knochenstoffwechsels

Knochen besteht aus verschiedenen Zelltypen, darunter Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten sowie einer mineralisierten Extrazellulärmatrix, die zum größten Teil aus Hydroxylapatit-Kristallen als anorganische Komponente und Kollagenfibrillen als organische Komponente besteht (64–66). Bei Hydroxylapatit handelt es sich um ein hydroxyliertes Calciumphosphatsalz. Die Kombination aus druckfesten Hydroxylapatitkristallen sowie zugfesten Kollagenfibrillen sorgt dafür, dass der Knochen biegefesten Eigenschaften aufweist. Aus mesenchymalen Stammzellen entstehen durch Differenzierung Osteoprogenitorzellen, die weiter zu Osteoblasten differenzieren (67). Die Osteoblasten synthetisieren schließlich Kollagen und regulieren die Mineralisation der Extrazellulärmatrix durch Calciumfreisetzung und tragen somit wesentlich zur Produktion der Extrazellulärmatrix bei (68). Gustavsson et al. konnten passend dazu *in vitro* zeigen, dass bei Kultivierung von osteoblastenähnlichen Saos-2-Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium die Konzentration an freiem Calcium im Medium abnimmt, während die Konzentration an gebundenem Calcium in der Extrazellulärmatrix zunimmt (69). Für eine erfolgreiche Mineralisation der Extrazellulärmatrix sind ausreichend hohe Konzentrationen an Calcium und Phosphat erforderlich (70). Nach Mineralisation der Extrazellulärmatrix differenziert ein Teil der Osteoblasten zu Osteozyten, die von mineralisiertem Osteoid umgeben sind, während andere Osteoblasten durch Apoptose zugrunde gehen. Knochen unterliegt stetigen Umbauprozessen, wobei die Extrazellulärmatrix von Osteoklasten, die aus monozytären Vorläuferzellen entstehen (71), abgebaut und anschließend von Osteoblasten wieder aufgefüllt wird. So kann eine stetige Erneuerung zur Vorbeugung gegen Materialermüdung sowie eine funktionelle Anpassung des Knochengewebes an Beanspruchung erfolgen.

1.4.2. Osteogene Differenzierung

Unter osteogener Differenzierung versteht man die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen über Osteoprogenitorzellen zu Preosteoblasten und deren Maturation zu Osteoblasten (67). Verschiedene biologische, chemische und physikalische Faktoren beeinflussen die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten (63). Eine Zugabe von Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbat zu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) als Basismedium fördert die osteogene Differenzierung (43). Während der osteogenen Differenzierung verändern sich die Morphologie der mesenchymalen Stammzellen, die Aktivität bestimmter Enzyme, die Genexpression sowie die Mineralisation der

Extrazellulärmatrix (43). Wichtige Transkriptionsfaktoren für die osteogene Differenzierung sind RUNX-2 und Osterix (72–77). Die beiden Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die osteogene Differenzierung (78). RUNX-2 ist ein Mastertranskriptionsfaktor und der früheste Marker der osteogenen Differenzierung (67,68,79). Osterix hingegen tritt erst im Verlauf als späterer Marker der osteogenen Differenzierung auf (68). Die Gene COL1A1, SPP1, IBSP, BGLAP, ALP sind assoziiert mit der osteogenen Differenzierung und werden währenddessen häufig verstärkt exprimiert (68,80). Die Expression der verschiedenen Gene ändert sich im Verlauf der osteogenen Differenzierung (52). Als Endpunkt der osteogenen Differenzierung kann eine verstärkte Formation von mineralisierten Noduli betrachtet werden (67).

1.4.3. Prozesse der Knochenentstehung – desmale und enchondrale Ossifikation

Knochengewebe kann durch zwei verschiedene Prozesse entstehen: durch desmale und enchondrale Ossifikation.

Bei der desmalen Ossifikation entstehen knochenbildende Zellen direkt aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Im embryonalen Bindegewebe proliferieren Vorläuferzellen, während zur selben Zeit an der gleichen Stelle eine ausgeprägte Angiogenese stattfindet. Die mesenchymalen Vorläuferzellen verdichten sich anschließend innerhalb eines durch die Angiogenese entstandenen engmaschigen Kapillarplexus und differenzieren dort zu Osteoblasten. Durch Sekretion und Mineralisation der Knochenmatrix bilden sich an verschiedenen Stellen Ossifikationszentren, die durch appositionelles Wachstum weiter an Substanz und Größe zunehmen und nach und nach miteinander fusionieren, sodass unreifer Geflechtknochen entsteht. Auf diese Art entstehen das Schlüsselbein, der Ober- und der Unterkiefer sowie Knochen der Schädelkalotte (65,81).

Im Gegensatz dazu entsteht bei der enchondralen Ossifikation Knochengewebe, indem eingewanderte MSCs zunächst zu Chondroblasten differenzieren und anschließend hypertrophieren. Die hypertrophierten Chondrozyten sezernieren Extrazellulärmatrix und gehen danach unter. Dadurch entstehen Spalten in der Extrazellulärmatrix, in die Blutgefäße, Vorläufer von Osteoblasten und Osteoklasten einwandern, sodass sekundär ein Umbau des Knorpelskeletts zu Knochen erfolgt (65,79,81–83).

1.4.4. Knochenheilung

Während der physiologischen Reparatur von Knochengewebe finden in Abhängigkeit des mechanischen Stimulus sowohl desmale als auch enchondrale Ossifikation statt (84,85). Beim Knochengewebersatz

mittels *Tissue Engineering* findet enchondrale Ossifikation statt (86). Bruder et al. zeigten im 3D-Modell *in vivo* im *Critical Size Defect* im Femur der erwachsenen athymischen Ratte, dass mit humanen MSCs besiedelte Scaffolds, wie sie auch im *Tissue Engineering* von Knochengewebe verwendet werden, eine Knochenentstehung durch desmale Ossifikation mit direkter Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten bewirken (87). Es tragen im *Tissue Engineering* also beide Prozesse zur Regeneration des Knochengewebes bei.

Die Reparatur von verletztem Knochengewebe weist einige Parallelen zu den stetigen Umbauprozessen von gesundem Knochen mit Abbau von Knochengewebe durch Osteoklasten und mit Knochenaufbau von Osteoblasten auf (88). Dabei zählt Knochen zu einem der wenigen Gewebe, die postnatal ohne Narbenbildung ausheilen können (84,85). Im Wesentlichen unterscheidet man drei Phasen in der Frakturheilung des Knochens: 1.) Die frühe inflammatorische Phase, 2.) Die proliferative Phase und 3.) Das *Remodeling* des Knochens. In der frühen inflammatorischen Phase kommt es als Begleiterscheinung der Fraktur zu Gefäßverletzungen. Als Folge davon treten Blutbestandteile in der Frakturlokalisation aus und es kommt zur Hämatombildung. Dabei kommt es auch zur Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und konsekutiv zur Infiltration von weiteren inflammatorischen Zellen. Durch die Freisetzung von Signalmolekülen wie BMP -2, -5 und -7 sowie VEGF, bFGF, TGF- β , PDGF und IGF kommt es zur Migration und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen im Frakturbereich und zur Vaskularisation und Bildung von Granulationsgewebe. In der proliferativen Phase wird nach Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen bei fortschreitender Vaskularisation ein fibrokartilaginärer Kallus gebildet, Osteoid sekretiert und Kollagen in der Extrazellulärmatrix angelagert. Der Kallus wird mineralisiert und zu Geflechtknochen umgebaut. In der Phase des *Remodelings* wird der Geflechtknochen zu Lamellenknochen umgewandelt und der Knochen an seine ursprüngliche Form, Größe und Festigkeit angepasst (85,88–90).

Essentiell für eine suffiziente Reparatur und Knochenheilung ist dabei eine ausreichende Vaskularisation (23,86,91). Ideale Eigenschaften eines Implantats zur Regeneration von Knochen sind Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osseointegration, da diese Eigenschaften die Knochenheilung fördern und beschleunigen können. Als Osteoinduktion wird die Fähigkeit des Implantats bezeichnet, durch Stimulation von mesenchymalen Stammzellen eine Differenzierung ebendieser zu Osteoblasten zu bewirken (92). Unter Osteokonduktion versteht man die Fähigkeit eines Materials, Knochenbildung auf und entlang der Oberfläche zu ermöglichen. Die Osteokonduktion ist abhängig vom Material des Implantats und von seiner Interaktion mit dem Empfängergewebe (93). Osseointegration bezeichnet die Entstehung eines funktionellen und strukturellen Verbandes durch Verankerung eines Implantats an neugebildetem Knochengewebe um das Implantat herum, ohne dass sich eine bindegewebigen Narbe ausbildet (94).

An der Regulation der Auf- und Umbauprozesse im Knochen sind verschiedene Signalmoleküle, beispielsweise Zytokine und Wachstumsfaktoren, beteiligt (79,81,88,95–97). Einige dieser Wachstumsfaktoren können eingesetzt werden, um osteoinduktive Eigenschaften des Knochengewebes zu verstärken und dadurch die Wundheilung zu verbessern (66,98).

Zu den Proteinen, die eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielen, gehören BMP, TGF- β , VEGF, FGF, PDGF und IGF (99,100). VEGF ist dabei essentiell für eine funktionierende Vaskularisation, ohne die kein vitaler Knochen entstehen kann (23,81,95,96). Auch PDGF spielt eine wichtige Rolle im Reparaturprozess von Knochengewebe (101).

1.5. PDGF-BB

1.5.1. Aufbau und Struktur von PDGF

Vor nahezu 50 Jahren wurde zum ersten Mal in Experimenten ein Faktor entdeckt, der aus Thrombozyten freigesetzt wurde (102–104). Der Wachstumsfaktor wurde wegen seiner Freisetzung aus Thrombozyten *Platelet-derived growth factor* (PDGF) genannt.

Es existieren verschiedene Isoformen vom Wachstumsfaktor PDGF. Diese setzen sich aus vier verschiedene Polypeptidketten zusammen: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D. Ein Protein besteht jeweils aus zwei Polypeptidketten, die ein Dimer bilden. Meist liegt der Wachstumsfaktor als Homodimer vor, lediglich zwischen PDGF-A und PDGF-B kann sich auch ein Heterodimer ausbilden. Die resultierenden Isoformen sind PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC und PDGF-DD (105–108).

1.5.2. Rezeptoren und Signaltransduktion von PDGF

PDGF vermittelt seine Wirkung über den PDGF-Rezeptor (PDGFR). Von diesem Tyrosinkinase-Rezeptor gibt es wiederum zwei Unterformen: *alpha* und *beta* (PDGFR α und PDGFR β). PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB und PDGF-CC können an PDGFR α binden und darüber ihre Wirkung entfalten. An PDGFR β können lediglich PDGF-BB und PDGF-DD binden und eine Aktivierung des Rezeptors bewirken (105–109). Nach Binden der jeweiligen Isoform von PDGF an den entsprechenden Rezeptor kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und anschließend zur Autophosphorylierung, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Viele der Moleküle, die vom aktivierten Rezeptor im Rahmen der Signalkaskade phosphoryliert werden, sind selbst Kinasen. Bei den

im Rahmen der Signaltransduktion aktivierten Molekülen handelt es sich unter anderem um die p38-MAPK, PI3-Kinase, Akt, ERK 1/2, PLC γ , STAT und JNK (108,110,111).

1.5.3. Effekte von PDGF

Ein wesentlicher Effekt von PDGF ist die Proliferationsförderung von unterschiedlichen Zellreihen wie Fibroblasten, arteriellen glatten Muskelzellen oder glialen Zellen (102–104).

Experimente mit Mäusen, die einen genetischen *Knockout* im Gen für PDGF-A, PDGF-B, PDGFR α oder PDGFR β aufwiesen, konnten darüber hinaus zeigen, dass PDGF eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung von Säugetieren spielt und an der Entstehung verschiedenster Organe mitwirkt (112,113).

Weiterhin spielt PDGF allgemein eine wichtige Rolle in der Wundheilung, insbesondere jedoch bei der Frakturheilung von Knochen (113,114). PDGF stellt einen der wesentlichen Wachstumsfaktoren, die in der direkten Umgebung von Knochengewebe vorliegen, dar (115). Mehrere Studien zeigten eine Verbesserung der Knochenheilung durch PDGF (101,114). Passend dazu können PDGF und seine Rezeptoren bei der physiologischen Heilung von Frakturen im Frakturspalt gefunden werden (108,116).

Neben der zuvor erwähnten mitogenen Wirkung sind weitere durch PDGF vermittelte Effekte für die verbesserte Frakturheilung verantwortlich. So bewirkt der Wachstumsfaktor durch Chemotaxis eine Migration von Zellen ins Zielgebiet (117). Diesen chemotaktischen Effekt übt PDGF vor allem auf mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten aus (118–121).

Ein weiterer relevanter Effekt von PDGF ist, dass es die Bildung neuer Blutgefäße und das Wachstum endothelialer Zellen in Kapillaren fördert (108,122–124). Ebenfalls von großer Bedeutung ist, dass PDGF die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in osteogene, adipogene oder chondrogene Vorläuferzellen beeinflussen kann (125–127). Die Effekte von PDGF wirken insgesamt auf eine Vielzahl von Zellen und unterscheiden sich in Abhängigkeit der Isoform des Wachstumsfaktors, der Zellart und des Differenzierungsgrades der Zellen (128). Je nachdem ob PDGFR α oder PDGFR β aktiviert werden, werden unterschiedliche Signalwege mit unterschiedlichen Folgeantworten ausgelöst (113). Die Isoform PDGF-BB des Wachstumsfaktors übt ihre Wirkung insbesondere auf mesenchymale Stammzellen aus (119).

1.5.4. Wirkung von PDGF-BB auf mesenchymale Stammzellen

In der Regeneration von Knochengewebe spielt PDGF eine wichtige Rolle als chemotaktischer Faktor bei der Rekrutierung von MSCs. Der chemotaktische Effekt von PDGF-BB auf mesenchymale Stammzellen ist dabei abhängig von der Dosis des Wachstumsfaktors (129,130). Laut Fiedler et al. nimmt der

chemotaktische Effekt auf die Stammzellen umso mehr ab, je weiter fortgeschritten die Differenzierung der Stammzellen ist (119). Für den proliferationsfördernden Effekt besteht ebenfalls eine Dosisabhängigkeit (115,131).

Auch auf humane ASCs als spezielle Unterform der MSCs wirkt PDGF-BB sowohl chemotaktisch als auch proliferationsfördernd (132).

PDGF-BB verbessert die osteogene Differenzierung in verschiedenen mesenchymalen Stammzellen und osteoblastenähnlichen Zellen (131,133). Verschiedene typische Gene wie BSP, OPN, Collagen Typ 1 und Osterix werden dabei verstärkt exprimiert (133). Weiterhin wird der Rezeptor PDGFR β in ASCs während der osteogenen Differenzierung vermehrt exprimiert (134).

Eine weitere Erkenntnis ist, dass eine Stimulation von ASCs mit PDGF-BB eine verbesserte Angiogenese zur Folge haben kann (135). Im Rahmen der Angiogenese trägt der Wachstumsfaktor wesentlich zur Bildung und Ausreifung von Kapillaren bei (124).

Hutton et al. zeigten in einem Experiment mit humanen ASCs, die zum einen in vaskulärem und zum anderen in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert wurden, dass ein Zusatz von PDGF-BB die Calciumablagerung der ASCs im Vergleich zu den ASCs, die nur in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, signifikant erhöht. Bei den ASCs im vaskulären Differenzierungsmedium zeigt eine Zugabe von PDGF eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme in der Länge der entstehenden Gefäße und eine signifikante Zunahme in der Breite der gebildeten Gefäße. Bei der Kombination aus vaskulär und osteogen differenzierten ASCs in einem Sphäroid zeigt sich eine signifikante Zunahme der Dichte und Länge der entstehenden Gefäße sowie eine signifikante Erhöhung der Mineralisation der Extrazellulärmatrix als Zeichen der verstärkten osteogenen Differenzierung durch Zugabe von PDGF-BB (136).

Mehrere Studien zeigten, dass neben ASCs auch bMSCs unter Zugabe von PDGF-BB eine signifikant erhöhte Proliferation und zusätzlich eine verstärkte Expression von typischen osteogenen Markern sowie eine erhöhte Calciumablagerung in der Extrazellulärmatrix aufweisen. Zeitgleich zur Förderung der osteogenen Differenzierung kommt es zu einer Suppression der Adipogenese unter PDGF-BB (80,137,138).

Neben der Proliferationsverstärkung und vermehrten osteogenen Differenzierung zeigen humane ASCs in Sphäroiden nach Zugabe von PDGF-BB eine vermehrte endotheliale Differenzierung (139). Eine Differenzierung von humanen ASCs zu Tenozyten durch PDGF-BB kann ebenfalls begünstigt werden (140,141).

Folglich ist PDGF-BB wesentlich an der Regulation der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beteiligt, kann die Differenzierung zu einigen Zellreihen fördern und zugleich die

Differenzierung in andere Zelltypen inhibieren. Zu welchem Zelltyp sich die PDGF-BB-behandelten Zellen differenzieren wird auch durch die Wahl des Mediums mitbeeinflusst (43).

Es gibt jedoch noch weitere Faktoren, die die Effekte von PDGF-BB modulieren oder mit PDGF-BB interagieren.

1.5.5. Regulation des Effektes von PDGF-BB

Wachstumsfaktoren können sich gegenseitig beeinflussen und ihren Effekt modulieren und damit auch verstärken oder verringern. So verstärkt PDGF die osteogene Differenzierung, die durch TGF β induziert wurde (110).

PDGF und verschiedene Proteine der BMP-Familie haben gemeinsam eine stärkere Wirkung haben als jedes Protein für sich alleine und können sich somit potenzieren. So entdeckten Biver et al., dass die BMP-2 induzierte osteogene Differenzierung in bMSCs durch PDGF-BB verringert wird (142). Bei konstanter Freisetzung von PDGF-BB aus Microsphären in 3D-*Scaffolds* besteht eine synergistische Wirkung von BMP-2 und PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von bMSCs (143). Dabei zeigt sich, dass die Interaktion zwischen den Wachstumsfaktoren zusätzlich durch die zeitliche Komponente beeinflusst wird. In Genexpressionsanalysen zeigt sich eine Verstärkung der COL1A1 Expression durch Kombination aus BMP-2 und PDGF-BB, während PDGF-BB alleine die Expression vermindert (144). Zudem kann eine verstärkte Mineralisation bei Kombination von BMP-2 und PDGF-BB festgestellt werden, wobei der synergistische Effekt abhängig von der PDGF-BB-Konzentration ist (145). Eine wichtige Bedeutung in der Interaktion von verschiedenen Wachstumsfaktoren kommt dem Verhältnis der einzelnen Faktoren zueinander zu, da PDGF-BB und BMP-2 je nach Verhältnis zueinander entweder eine Zunahme der osteogenen oder tenogenen Differenzierung bewirken (141). In Kombination mit BMP-6 zeigt PDGF-BB eine Verbesserung der osteogenen Differenzierung, in Kombination mit BMP-7 zeigt PDGF-BB einen stärkeren proliferationsfördernden Effekt (146,147). Die Interaktion von PDGF und verschiedenen Formen des BMP wird somit durch die Kombination bestimmter Faktoren selbst, die zeitliche Komponente, die Konzentration und das Mengenverhältnis der Wachstumsfaktoren zueinander bestimmt. Eine weitere Erkenntnis ist, dass PDGF-BB Angiogenese und Osteogenese koppeln kann (101,148). Eine Interaktion zwischen FGF-2 und PDGF-BB konnte von Tokuda et al. beobachtet werden. Dabei stimuliert FGF-2 eine VEGF-Freisetzung aus Osteoblasten, die durch PDGF-BB potenziert wird (149).

Der Wachstumsfaktor interferiert auch mit Zytokinen. Eine kombinierte Überexpression von PDGF-BB und IL-4 in murinen bMSCs führt zu einer Zunahme der Proliferation, Viabilität und Osteogenese (150). Eine wesentliche regulatorische Funktion in der Knochenregeneration kommt miRNAs zu (151). Eine Zugabe von PDGF zu mesenchymalen Stammzellen kann zur Erhöhung von bestimmten miRNAs, wie

beispielsweise let-7, miR-24, miR-125b und miR-138 führen (127,152). Die Erhöhung bestimmter miRNAs kann wiederum die Translation nicht-osteogener Ziel-mRNA, die die Osteogenese inhibieren würde, hemmen und dadurch eine Verstärkung der osteogenen Differenzierung auslösen (127).

Neben Interaktionen mit anderen Proteinen, die die Effekte von PDGF-BB modulieren, gibt es auch extrazelluläre Bedingungen, die die Expression von PDGF-BB direkt beeinflussen. Ein hypoxisches Milieu erhöht die Expression von PDGF-BB in humanen ASCs deutlich (153). Rhagavendran et al. stellten fest, dass die Zugabe von PDGF-BB das osteogene Differenzierungspotential von bMSCs in Abhängigkeit vom *Scaffold*-Material verstärkt (154). Eine kurzzeitige oder intermittierende Gabe von PDGF-BB verbessert die osteogene Differenzierung von bMSCs, wohingegen eine langandauernde Stimulation die Differenzierung vermindert (155).

1.6. Ziele der Dissertationsarbeit

Diese Arbeit dient der Verbesserung von Methoden und Verfahren des Tissue Engineerings in Ersatz und Regeneration von Knochengewebe. Der Fokus der Arbeit liegt dabei auf der Untersuchung des Einflusses von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierungsfähigkeit von ASCs.

In Vorarbeiten unseres Labors, die die osteogene Differenzierung von ASCs unter Zugabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren untersuchten, zeigte sich, dass ein Zusatz von PDGF-BB zum osteogenen Differenzierungsmedium eine verstärkte osteogene Differenzierung zur Folge hatte.

Initial wurde in dieser Arbeit die Reproduzierbarkeit des Effekts von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von ASCs mittels Alizarin-Rot-Färbung und Bestimmung der Calciumkonzentration überprüft. Anschließend wurden den Zellen verschiedene Konzentrationen des Wachstumsfaktors zugesetzt, um den Einfluss der Konzentration des Wachstumsfaktors auf den Effekt zu analysieren. Daraufhin wurde der Effekt zu mehreren Zeitpunkten bestimmt, um eine Aussage über die Zeitkinetik treffen zu können. Im nächsten Schritt wurde in Versuchen mit RT-qPCR Expressionsveränderungen spezifischer osteogener Zielgene unter Einfluss von PDGF-BB im Zeitverlauf untersucht. Zuletzt wurden durch Zusatz von verschiedenen Inhibitoren und Evaluation des Effekts auf die osteogene Differenzierung an der Signaltransduktion von PDGF-BB beteiligte Kinasen ermittelt.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu evaluieren, ob eine Zugabe von PDGF-BB zu ASCs einen möglichen Ansatz zur Verbesserung der osteogenen Differenzierung darstellt, und eine genauere Charakterisierung des Effekts zu ermöglichen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellkultur

In den Versuchen wurden humane *adipose-tissue-derived stem cells* (ASCs) verwendet, die aus einem Pool von Stammzellen dreier Spender bestanden. Keine der in den Versuchen verwendeten Zellpopulationen hatte die fünfte Passage überschritten. Zur Kontrolle der Vitalität und der Morphologie erfolgte eine regelmäßige Zellvisite mittels Lichtmikroskopie sowohl vor Versuchsbeginn als auch während der Versuche. Alle Experimente der Zellkultur fanden in der Sterilbank unter *Laminar Airflow* statt.

Die jeweiligen Versuche sind in den folgenden Kapiteln mit verwendeten Arbeitsgeräten, Materialien und Reagenzien samt Herstellerbezeichnung beschrieben. Allgemeine Gebrauchslösungen, Materialien, Arbeitsgeräte und Apparate sind im Vorfeld beschrieben.

Allgemeine Gebrauchslösungen

Reagenz	Hersteller	Artikelnummer
0,5% Trypsin-EDTA	Gibco	15400-054
Destilliertes Wasser (dH ₂ O)	Eigenherstellung mittels Reinstwasseranlage	
Ethanol 99,9%	Th. Geyer	22.461.000
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ and Mg ²⁺	Sigma	L182-01-BC
Steriles PBS	10l dH ₂ O aus der Milliporeanlage + 1 x Sigma PBS Dulbecco	
Trypsinlösung 1/1 in PBS	10 ml 0,5 % Trypsin-EDTA + 10 ml steriles PBS	

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Artikelnummer
Costar Serological Pipets 10ml	Corning Incorporated	4101
Costar Serological Pipets 25ml	Corning Incorporated	4251
Costar Serological Pipets 5 ml	Corning Incorporated	4051
Costar Serological Pipets 50ml	Corning Incorporated	4501
Pipettenspitzen blau 100-1200µl	ratiolab	2100610
Pipettenspitzen gelb 10-200µl	Greiner Bio-One	739290
Pipettenspitzen natural 10µl	VWR	613-0364

Gerät	Hersteller	Modell
Aufsatz für Schüttler 6-Well-Platte	IKA	MS 3.4 Microtiter attachment
Autoclav	Melag Medizintechnik	
Cell Counter	Bio-Rad	TC20 Automated Cell Counter
Inkubator	Eppendorf	New Brunswick Galaxy 170 R
Lichtmikroskop	Zeiss	Axiovert 25
Magnetrührer	IKA	RCT basic
Minizentrifuge	Thermo Fisher Scientific	mySPIN™ 6 Mini Centrifuge
Pipette 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf	Eppendorf Research plus Pipette 0,1 – 2,5 µl
Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf	Eppendorf Research plus Pipette 0,5-10µl
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf	Eppendorf Research plus Pipette 100-1000µl
Pipette 10-100 µl	Eppendorf	Eppendorf Research plus Pipette 10-100 µl
Pipette 20-200 µl	Eppendorf	Eppendorf Research plus Pipette 20-200 µl
Pipette 2-20 µl	Eppendorf	Eppendorf Research plus Pipette 2-20µl
Pipettierhilfe	Integra	Pipetboy acu 2
Schüttler für 6-Well-Platte	IKA	MS3 digital
Sterilbank	Ehret	Bio-CL-130
Vortexer	IKA	MS2 Minishaker
Wasserbad	GFL	GFL 1083
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5810 R

2.1.1. Präparation der ASCs

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Albumin	Fluka	05488
Ammoniumchlorid	Sigma	9718
Collagenase II	Sigma	C2-22-BC
EBM™-2 Endothelial Cell Growth Basal Medium-2	Lonza	CC-3156
EGM-2 Single Quots™ Kit	Lonza	CC-4176
FCS Superior	Sigma	S0615
Glucose	Sigma	G8270
Penicillin/Streptomycin	Sigma	P0781
Trizma® Base	Sigma	T1503
Trypan Blue Dye 0,40%	Bio-Rad	1450013

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
Zellsieb 70 µm	Falcon	352350
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One	07-000-229
50 ml Gefäß	Corning Incorporated	4870
Spritzenfilter 0,22 µm	Roth	P666.1

Die in der Zellkultur verwendeten ASCs wurden aus menschlichen Fettgewebsexzidaten gewonnen, die im Rahmen einer Abdominoplastik asserviert wurden. Die Zellen von drei Spendern wurden gemischt, um einen Pool von Zellen unterschiedlicher Individuen zu erhalten. Zwei Donoren waren männlich und zum Zeitpunkt der operativen Eingriffe 39 beziehungsweise 55 Jahre alt. Die dritte Donorin war weiblich und bei der Operation 41 Jahre alt. Die schriftlichen Einverständniserklärungen der Patienten liegen ebenso wie das Votum 334/15 der Ethikkommission der Universitätsklinikums Freiburg zum Gebrauch des Fettgewebes für experimentelle Forschungszwecke vor.

Zunächst wurden zur Herstellung des Transportmediums aus PBS mit 1% Penicilin/Streptomycin 495 ml PBS mit 5 ml Penicilin/Streptomycin gemischt. Nach intraoperativer Exzision wurde das Gewebe ins Transportmedium gegeben. Die Exzidate wurden anschließend mechanisch mittels Schere und Skalpell zerkleinert. Im nächsten Schritt wurde das Gewicht bestimmt und es wurden zwischen 50 und 100 g von jedem Exzidat in 50 ml Gefäße gegeben. Es wurden 20 ml PBS in das 50 ml Gefäß gegeben, um das Exzidat zu waschen. Dieser Waschschrift wurde zwei bis dreimal wiederholt. Dann erfolgte der Collagenase II Verdau des zerkleinerten Fettgewebes. Dazu wurden 2 ml Collagenase-II (20 mg/ml Collagenase II in PBS) mit 2 ml 5% Glucoselösung (0,5 mg/ml Glucose) und 16 ml 3,5% Albumin in PBS (Albumin-Phosphat-Lösung) gemischt und mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert. Es wurden 20 ml der angesetzten Collagenaseverdaulösung in jedes Tube gegeben und das Fettgewebe wurde für 2-4 Stunden bei 37°C unter Schütteln verdaut. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Tubes mit 1100 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet wurde mit PBS gewaschen und es erfolgte die Erythrozytenlyse, indem das Zellpellet mit 20 ml Lysepuffer 10% für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der Lysepuffer bestand aus 500 ml Aqua bidest., 1,029 g TRIS (17 mM) und 0,428 g NH₄Cl (16 mM). Nach der Inkubation wurde erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 1100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde farblich beurteilt und bei Bedarf erfolgte eine erneute Lyse. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 20 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde mit einem 70 µm Zellsieb filtriert, das Tube wurde mit 5 ml PBS nachgespült, die Spülflüssigkeit wurde durch den Zellsieb filtriert und anschließend wurde das Filtrat bei 1100 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet wurde in 10 ml Medium, das aus EBM-2 mit EGM-2 Supplements und mit 10% FCS und 1% P/S bestand,

resuspendiert. Es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit 20 µl Trypan Blue und 20 µl Zellsuspension im *Cell Counter*. Es wurden 1-2 Mio. Zellen mit 10 ml Medium in eine T75-Flasche ausplattiert, was etwa 13.000 bis 27.000 Zellen pro cm² entspricht. Die T75-Zellkulturflaschen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ als Passage 0 (P0) in den Inkubator gegeben. Ein Medienwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Wenn der Zellrasen durch die Proliferationsaktivität der Zellen mehr als 80% Konfluenz erreicht hatte, wurden die Zellen in den Kulturflaschen gesplittet, um einen Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition zu vermeiden. Die Zellen konnten entweder direkt für Versuche verwendet werden oder sie wurden kryokonserviert.

2.1.2. Kryokonservierung und Auftauen von ASCs

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
0,5% Trypsin-EDTA	Gibco	15400-054
DMSO	Sigma-Aldrich	276855
EBM TM -2 Endothelial Cell Growth Basal Medium-2	Lonza	CC-3156
EGM-2 Single Quots TM Kit	Lonza	CC-4176
FCS Superior	Sigma	S0615
Penicillin/Streptomycin	Sigma	P0781
Steriles PBS	H ₂ O aus der Milliporeanlage + Sigma PBS Dulbecco	

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
50 ml Gefäß	Corning Incorporated	4870
Cryotubes	Greiner Bio-One	126263
Zelleinfrierbehälter	Corning Incorporated	CLS432001
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One	07-000-229

Die Aufbewahrung von Zellen oder Gewebe durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff wird als Kryokonservierung bezeichnet. Kryokonservierte Zellen können später wieder in Zellkultur gebracht werden. Die Zellen wurden nach dem „Splitten und Passagieren“-Protokoll (2.1.3) durch Zugabe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in 50 ml Gefäßen gesammelt. Es erfolgte eine Zellzahlbestimmung mittels *Cell Counter*. Im Anschluss wurden die Zellen bei 1200 rpm bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand, der aus altem Medium bestand, abgenommen. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium bestehend aus FCS mit 10% DMSO resuspendiert, wobei für die Kryokonservierung von ca. 1x10⁶ bis 2x10⁶ Zellen 1000 µl Einfriermedium verwendet wurden. Dann wurden die Zellen in *Cryotubes* aliquotiert. Diese wurden verschlossen und in eine Cryobox geladen, die bei -80 °C eingefroren wurde. Dimethylsulfoxid (DMSO) dient bei der

Kryokonservierung als Gefrierschutzmittel und verhindert die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens. Da es in den verwendeten Konzentrationen zytotoxisch ist, muss auf ein zügiges Arbeiten während des Aliquotierens und des Transfers in den Gefrierschank geachtet werden. Die Überführung der *Cryotubes* in den Flüssigstickstofftank zur dauerhaften Aufbewahrung bei -196°C fand nach 24 Stunden statt.

Um die kryokonservierten Zellen wieder in Zellkultur zu bringen, wurden die *Cryotubes* im Wasserbad bei 37°C so weit aufgetaut, bis sich ein Flüssigkeitssaum am Rand des Gefäßes um den gefrorenen Kern des Pellets bildete. In ein 50 ml Gefäß, das mit 20 ml PBS gefüllt war, wurde die Zellsuspension in Einfriermedium gegeben, um das DMSO zu verdünnen und den zytotoxischen Effekt zu reduzieren. Das Gefäß wurde bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 10 ml Medium (EGM-2 mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und in einer T75-Zellkulturflasche ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei einer CO₂-Konzentration von 5% und einer Temperatur von 37°C. Der Versuchsstart der Zellen in den einzelnen Experimenten erfolgte frühestens 48 Stunden nach dem Auftauen und Ausplattieren.

2.1.3. Splitten und Passagieren von Zellen

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
0,5% Trypsin-EDTA	Gibco	15400-054
EBM TM -2 Endothelial Cell Growth Basal Medium-2	Lonza	CC-3156
EGM-2 Single Quots TM Kit	Lonza	CC-4176
FCS Superior	Sigma	S0615
Penicillin/Streptomycin	Sigma	P0781
Steriles PBS	H ₂ O aus der Milliporeanlage + Sigma PBS Dulbecco	

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
50 ml Gefäß	Corning Incorporated	4870
6-Well-Platten	Corning Incorporated	3506
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One	07-000-229

Da die isolierten und kultivierten Stammzellen weiterhin proliferationsfähig sind und bei zu dichtem Zellrasen ein Stopp der Zellteilung durch Kontaktinhibition auftritt, müssen die Zellen vor Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % vereinzelt und umgesetzt werden. Man nennt diesen Vorgang auch *Splitten* und Passagieren. Die Zellen wurden dabei im Verhältnis 1:2 aufgeteilt und in neue T75-Zellkulturflaschen ausplattiert. Dieses Verfahren wurde bei allen Zellen angewandt, solange sie sich in T75-Flaschen

befanden. Nachdem die Zellen für die einzelnen Versuche in 6-Well-Platten ausplattiert wurden, erfolgte kein weiteres *Splitten* und Passagieren.

Um die Zellen zu *splitten* und zu passagieren wurde zunächst das Medium aus der T75-Flasche entfernt, und das *Zelllayer* mit PBS gespült, um Reste von FCS zu entfernen, da diese das Trypsin inhibieren können. Anschließend wurden zu den Zellen in die T75-Flasche 5 ml einer 1:1-Mischung aus PBS und 0,5 % EDTA-Trypsin gegeben und die Zellen wurden für 3 Minuten im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die mechanische Ablösung der adhären Zellen, indem der Kulturflaschenrand auf eine harte Kante geklopft wurde. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde unter mikroskopischer Kontrolle bestätigt, bevor 2,5 ml FCS in die Kulturflasche gegeben wurden, um das Trypsin zu neutralisieren. Die Suspension wurde in einem 50 ml Gefäß gesammelt, die Flasche wurde direkt im Anschluss mit 12,5 ml PBS nachgespült und die Spülflüssigkeit wurde ebenfalls im Gefäß gesammelt. Das Gefäß wurde anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation konnte der Überstand abgenommen und verworfen werden. Das Pellet wurde dann in 20 ml Medium, das im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt wurde, resuspendiert und es wurden in zwei neue Kulturflaschen je 10 ml der Suspension gegeben. Bei diesem Vorgang erhöhte sich die Passage um eine Zahl. Die Zellen wurden so lange gesplittet und kultiviert, bis die maximale Passagenzahl erreicht wurde. Ein Medienwechsel der Zellen in Zellkultur erfolgte zweimal wöchentlich.

2.2. Durchflusszytometrie

Es wurde eine Analyse der Oberflächenmarkerexpression im Rahmen einer Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dabei wurde die Expression der Oberflächenmarker CD 14, CD 45, CD 73, CD 90 und CD105 sowie HLA-DR betrachtet.

2.2.1. Theoretische Grundlagen

Ein Durchflusszytometer besteht aus einem Flüssigkeitsstrom, einem Laser und einem Detektor, wobei der Flüssigkeitsstrom die Zellen am Laser vorbeiführt. Trifft das Laserlicht auf eine Zelle wird es je nach Größe und Granularität der Zelle gestreut. Dieses Streulicht wird vom Detektor bestimmt und erlaubt damit Aussagen über Größe und Granularität der in der Probe enthaltenen Zellen. Zudem können Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene oder intrazelluläre Antigene eingesetzt werden, die fluoreszenzmarkiert sind. Durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs und die Erkennung durch den Detektor kann so auch die Verteilung der Oberflächenantigene innerhalb der Probe bestimmt werden. Um

die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen, wird als Kontrolle ein Antikörper eingesetzt, der zum Beispiel gegen IgG oder IgA gerichtet ist und nicht an der Zelloberfläche exprimiert wird. Dadurch lässt sich die durch unspezifische Bindungen verursachte Hintergrundfluoreszenz der Probe bestimmen und in der Auswertung berücksichtigen (156,157). Ist die gemessene Fluoreszenz des Zielantikörpers genauso hoch wie die der Isotypkontrolle, so ist davon auszugehen, dass der entsprechende Oberflächenmarker in den untersuchten Zellen nicht exprimiert wird. Liegt die Fluoreszenz des Zielantikörpers über der der Isotypkontrolle, so wird dieser Marker auf der Zelloberfläche exprimiert.

2.2.2. Durchführung der FACS-Analyse

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
FITC Mouse anti-Human HLA-DR	BD Pharmingen™	555811
FITC Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Pharmingen™	556649
Natriumazid	Sigma	S8032
PE Mouse Anti-Human CD105	BD Pharmingen™	560839
PE Mouse Anti-Human CD14	BD Pharmingen™	561707
PE Mouse Anti-Human CD45	BD Pharmingen™	560975
PE Mouse Anti-Human CD73	BD Pharmingen™	550257
PE Mouse Anti-Human CD90	BD Pharmingen™	555596
PE Mouse IgG1, κ Isotype Control	BD Pharmingen™	556650
PE Mouse IgG2b, κ Isotype Control	BD Pharmingen™	555058

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
Durchflusszytometer	BD Biosciences	BD LSRFortessa™ Flow Cytometer
FACS-Tubes	Falcon	352058
Mikrozentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5427 R
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-One	616 201
Software für Durchflusszytometer	BD Biosciences	BD FACSDiva™ 8.0 Software

Zur FACS-Analyse wurden ASCs aus der Zellkultur in Passage 5 verwendet. Die Zellen wurden mittels Trypsin vom Kulturgefäß losgelöst und die Zellzahl wurde mittels *Zellcount* bestimmt (siehe Kapitel 2.1.3. Splitten und Passagieren von Zellen). Eine Million Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde in 1 ml Medium bestehend aus eiskaltem PBS mit Zusatz von 10% FCS und 1%

Natriumazid resuspendiert. Es wurden jeweils 100 µl der Suspension in neue Reaktionsgefäße überführt. In die Reaktionsgefäße wurden verschiedene PE- oder FITC-konjugierte Antikörper gegeben (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Darstellung der zur Durchflusszytometrie benötigten Antikörper mit Namen, zu pipettierendem Volumen und Farbstoffkonjugation

Reaktionsgefäß Nr.	Antikörper	Volumen (µl)	Farbstoffkonjugiert
1	Maus IgG1,k Isotypkontrolle	10	PE
2	Maus-anti-Human CD105	2,5	PE
3	Maus Anti-Human CD90	0,5	PE
4	Maus-anti-Human CD73	10	PE
5	Maus-anti-Human CD45	10	PE
6	Maus-anti-Human CD14	10	PE
7	Maus IgG2b,k Isotypkontrolle (CD14)	0,5	PE
8	Maus IgG1 Isotypkontrolle	10	FITC
9	Maus-anti-Human HLA-DR	10	FITC

Nach Zugabe der Antikörper erfolgte eine Inkubation für eine Dauer von 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln ohne Lichteinwirkung. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl eiskaltem PBS mit 10% FCS und 1% Natriumazid und Zentrifugation bei 450 g für 5 Minuten bei 4°C gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurden die Zellen in 500 µl der PBS-FCS-Natriumazidlösung resuspendiert, in ein FACS-Tube transferiert und zuletzt im Durchflusszytometer BD LSRFortessa™ Cell Analyzer analysiert.

2.3. Proliferationsassay

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Ascorbat	Sigma	A8960
CellTiter 96 [®] AQ _{ueous} One Solution Reagent	Promega	G3582
Dexamethason	Sigma	D2915
DMEM-023	Gibco	31885-023
Essigsäure	Merck	100063
FCS Superior	Sigma	S0615
PDGF-BB	R&D	220-BB
Penicillin/Streptomycin	Sigma	P0781
β-Glycerophosphat	Roth	6847.1

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
50 ml Gefäß	Corning Incorporated	4870
6-Well-Platten	Corning Incorporated	3506
96-Well-Platten	Corning Incorporated	REF 3598
Absorptionsmesser für 96-Well-Platte	Tecan	SPECTRAFluor Plus
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-One	616 201

2.3.1. Theoretische Grundlagen

Die CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Reagent enthält als Bestandteil das Tetrazolium-Salz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] und eine elektronenkoppelnde Substanz (Phenazin Ethosulfat (PES)), um die Lösung zu stabilisieren. Wird die Lösung zu Zellen gegeben, wird der Farbstoff durch die beim Stoffwechsel der Zellen entstandenen Redoxäquivalente zu Formazan reduziert. Die ermittelte Absorption der Probe bei 490 nm verhält sich dabei direkt proportional zur Anzahl der in der Kultur lebenden Zellen (158).

2.3.2. Ausplattieren der ASCs in 6-Well-Platten

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
0,5% Trypsin-EDTA	Gibco	15400-054
EBM TM -2 Endothelial Cell Growth Basal Medium-2	Lonza	CC-3156
EGM-2 Single Quots TM Kit	Lonza	CC-4176
FCS Superior	Sigma	S0615
Penicillin/Streptomycin	Sigma	P0781
Steriles PBS	10l dH2O aus der Milliporeanlage + 1 x Sigma PBS Dulbecco	

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
50 ml Gefäß	Corning Incorporated	4870
6-Well-Platten	Corning Incorporated	3506
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One	07-000-229

Die ASCs in Zellkultur in den T75-Flaschen wurden mit PBS gewaschen, durch Trypsinzugabe vom Flaschenboden gelöst und das Trypsin wurde im Anschluss mittels FCS gestoppt (siehe Kapitel 2.1.3 Splitten und Passagieren von Zellen). Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Gefäß gesammelt und die Zellzahl wurde mittels *Cell Counter* bestimmt. Für dieses Experiment werden zwei 6-Well-Platten mit 150.000 Zellen je *Well* benötigt. Die erforderliche Menge an Zellen wurde in ein 50 ml Gefäß gegeben und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in den Gefäßen wurden in 12 ml Medium (EGM-2 + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und die Zellen wurden anschließend in 6-Well-Platten ausplattiert. Dabei wurde 1 ml Medium in jedes Well vorgelegt und anschließend 1 ml der Suspension dazugegeben. Dann wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, bis sie Konfluenz in den Wells erreichten. Medienwechsel erfolgten bis zum Erreichen der Konfluenz in den 6-Well-Platten zweimal wöchentlich. Die Zellen, die nicht zum Ausplattieren benötigt wurden, wurden nach der Zentrifugation in 10 ml Medium resuspendiert, in eine T75-Flasche ausgesät und im Brutschrank inkubiert, um sie für spätere Experimente einsetzen zu können.

2.3.3. Kultivierung der Zellen unter osteogenen Kontroll- und Differenzierungsbedingungen

Kontroll- und Differenzierungsmedium

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Dexamethason	Sigma	D2915
DMEM-023	Gibco	31885-023
FCS Superior	Sigma	S0615
Ascorbat	Sigma	A8960
PDGF-BB	R&D	220-BB
Penicillin/Streptomycin	Sigma	P0781
β -Glycerophosphat	Roth	6847.1

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
50 ml Gefäß	Corning Incorporated	4870
6-Well-Platten	Corning Incorporated	3506

Nach dem Ausplattieren erfolgte der Versuchsstart durch Umstellung des Mediums von EGM-2 mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin auf das Kontroll- beziehungsweise Differenzierungsmedium, sobald die Zellen in den 6-Well-Platten konfluent waren. Das Kontrollmedium bestand aus DMEM-023 und enthielt 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Das Differenzierungsmedium enthielt die gleichen Bestandteile wie das Kontrollmedium und zusätzlich Dexamethason in einer Konzentration von 100 nM, Ascorbat mit 50 μ g/ml und 10 mM β -Glycerophosphat. Eine Platte enthielt kein PDGF-BB. Der anderen waren 20 ng/ml PDGF-BB im Kontroll- und im Differenzierungsmedium zugesetzt. Nach der Umstellung des Mediums erfolgte der Medienwechsel dreimal wöchentlich mit 2 ml Medium je Well. Die Auswertung der 6-Well-Platten erfolgte an Tag 14. Es wurden biologische Triplikate angefertigt, sodass jeweils drei *Wells* das gleiche Medium enthielten (siehe Abbildung 1).

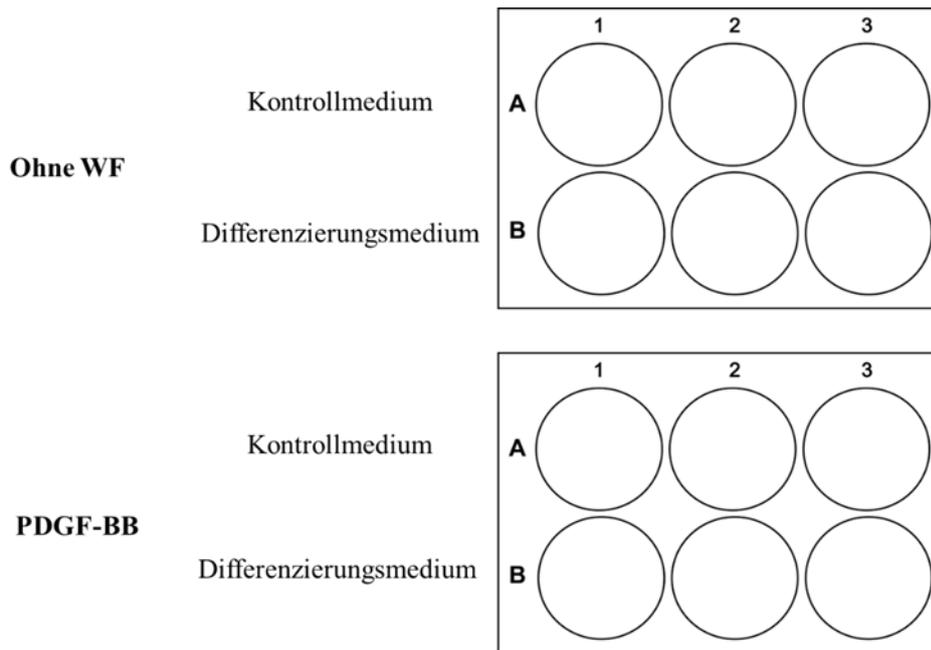


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Medienbehandlung der 6-Well-Platten

2.3.4. Durchführung des Zellproliferationsassays

Die Bestimmung der Zellproliferation wurde mit CellTiter 96® AQ_{ueous} Cell Proliferation Assay von Promega durchgeführt. Zunächst wurde das alte Medium aus den Wells entfernt und es wurden 1000 µl frisches Kontrollmedium in jedes Well gegeben. Zusätzlich wurde als Leerwert ein Well ohne Zellen auf einer leeren Platte mit Kontrollmedium versetzt. Dann wurden 200 µl CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Reagent in jedes Well hinzugegeben und die Platte wurde vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden dann für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde aus jedem Well der Überstand abgenommen und in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Jede Probe wurde kurz mit dem *Vortexer* durchmischt und es wurden von jeder Probe fünf Wells auf einer 96-Well-Platte mit je 100 µl befüllt. Die Absorption der Proben wurde zuletzt im Photometer bei 490 nm bestimmt. Als Leerwert wurde der Absorptionswert des Mediums mit CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Reagent ohne Zellen von den restlichen Absorptionswerten abgezogen.

2.4. Untersuchung der osteogenen Differenzierung von ASCs in Abhängigkeit der Konzentration von PDGF-BB

2.4.1. Kultivierung der ASCs mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDGF-BB

Um den Einfluss der Konzentration an PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung der ASCs zu untersuchen, wurden 150.000 Zellen je *Well* in 6-Well-Platten nach dem Protokoll zum Ausplattieren der Zellen in 6-Well-Platten (siehe Kapitel 2.3.2) gegeben. Der Versuchsstart erfolgte bei Erreichen der Konfluenz. Den 6-Well-Platten wurde nach Versuchsbeginn Kontrollmedium und Differenzierungsmedium mit PDGF-BB in Konzentrationen von 0 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml zugesetzt. Es wurde für jede Konzentration von PDGF-BB eine 6-Well-Platte angesetzt. Je Platte wurden drei *Wells* mit Kontrollmedium und drei *Wells* mit Differenzierungsmedium behandelt (siehe Kapitel 2.3.3), wobei innerhalb einer Platte alle *Wells* die gleiche Konzentration an PDGF-BB enthielten und dreimal wöchentlich ein Medienwechsel erfolgte.

2.4.2. Alizarin-Rot-Färbung und Mikroskopie

Grundlagen

Die Alizarin-Rot-S-Färbung ist ein etabliertes Verfahren, um Calcium nachzuweisen. Der Farbstoff bildet Chelat-Komplexe mit Calcium. Die Menge des gebundenen Farbstoffes und damit die Intensität der Färbung verhält sich dabei proportional zur Menge an Calcium in der Extrazellulärmatrix. Die Menge der Färbung kann semiquantitativ analysiert werden.

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
2N NaOH	Merck	109136
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich	A5533
Formalin	Fisher Scientific	10231622
Salzsäure 1 mol/l	VWR Chemicals	30024.290
Steriles PBS		

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer oder Modell
6-Well-Platten	Corning Incorporated	3506
Filterpapier	Whatman	WH10311647
Mikroskop	Zeiss	Axio Observer
pH-Elektrode	SI-Analytics	Blue line 14pH
pH-Meter	Schott	Schott Instruments Lab 850 pH-Meter
Software für Mikroskop	Zeiss	ZEN 3.1 (blue edition)

Zum Ansetzen der Alizarin-Rot-Lösung wurden 2 g Alizarin Red S in 100 ml H₂O dest. gelöst und über Nacht mit dem Magnetrührer gerührt. Am nächsten Morgen wurde der pH-Wert der Lösung mittels 2N Na(OH)-Lösung und HCl auf 4,2 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Whatman-Filterpapier filtriert, um ungelöste Partikel zu entfernen. Als nächstes wurde das Medium aus den nach Kapitel 2.4.1 behandelten 6-Well-Platten entfernt und vorsichtig PBS auf das *Monolayer* in jedem Well gegeben und wieder abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen durch 10-minütige Inkubation mit 2 ml 4% Formalin je Well. Nach der Fixierung wurde das Layer zweimal mit PBS gespült und anschließend mit 2 ml der Alizarin-Rot-Lösung je Well für 10 Minuten gefärbt. Nach der Färbung wurde das Layer so oft mit PBS gewaschen, bis die Waschflüssigkeit klar war. Es wurden 2 ml PBS in jedes Well gegeben, um ein Austrocknen des *Layers* zu verhindern. Die Platten wurden zur makroskopischen Beurteilung fotografiert, dann erfolgte die Auswertung der Alizarin-Rot-Färbung mittels Mikroskopie im Zeiss Axio Observer. Es wurde für jedes Triplikat ein repräsentativer Ausschnitt in der Mikroskopie gewählt und mit 25-facher Vergrößerung fotografiert.

2.4.3. Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Essigsäure	Merck	100063
Ammoniumhydroxidlösung	Sigma-Aldrich	338818

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer oder Modell
96-Well-Platten	Corning Incorporated	REF 3598
Absorptionsmesser für 96-Well-Platte	Tecan	SPECTRAFluor Plus
Indikatorstäbchen pH-Fix 0-14	Roth	0549.2
Mikrozentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5427 R
Reaktionsgefäß 1,5ml	Greiner Bio-One	616 201
Thermomixer	Eppendorf	ThermoMixer C
Zellschaber	TPP	99002

Direkt im Anschluss an die Mikroskopie der 6-Well-Platten erfolgte die Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung. In jedes Well der 6-Well-Platte wurden 800 µl 10% Essigsäure gegeben und die Platten wurden bei Raumtemperatur unter Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Zelllayer mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Jedes Gefäß wurde für 30 Sekunden gevortext. Daraufhin wurden die Gefäße bei 85°C für 10 Minuten erhitzt und anschließend für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden sie für 15 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 650 µl des Überstandes in ein neues Tube transferiert und es wurden 20 µl von

28% Ammoniumhydroxidlösung zugegeben, um die Säure teilweise zu neutralisieren und den pH-Wert zwischen 4,1 und 4,5 zu bringen. Im Anschluss wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit dem Puffer aus Essigsäure und Ammoniumhydroxid verdünnt, um die Absorption der Proben in einen für den Plattenreader messbaren Bereich zu bringen. Dann wurden in eine 96-Well-Platte 100 µl je Well pipettiert. Es wurden dabei von jeder Probe Triplikate angefertigt. Zuletzt wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem Reader bestimmt. Als Leerwert diente der Puffer aus 650 µl Essigsäure und 20 µl Ammoniumhydroxid.

2.4.4. Calciumassay

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Ascorbat	Sigma	A8960
Dexamethason	Sigma	D2915
DMEM-023	Gibco	31885-023
Essigsäure	Merck	100063
FCS Superior	Sigma	S0615
PDGF-BB	R&D	220-BB
Penicillin/Streptomycin	Sigma	P0781
QuantiChrom™ Calcium Assay Kit	Biotrend	DICA-500
β-Glycerophosphat	Roth	6847.1

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
50 ml Gefäß	Corning Incorporated	4870
6-Well-Platten	Corning Incorporated	3506
96-Well-Platten	Corning Incorporated	REF 3598
Absorptionsmesser für 96-Well-Platte	Tecan	SPECTRAFluor Plus
Indikatorstäbchen pH-Fix 0-14	Roth	0549.2
IntelliMixer	Elmi	RM-2L
Mikrozentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5427 R
Multikanalpipette 15-300µl	Eppendorf	Xplorer® plus Multikanalpipette 15-300 µl
Reaktionsgefäß 1,5ml	Greiner Bio-One	616 201
Thermomixer	Eppendorf	ThermoMixer C
Zellschaber	TPP	99002

Der QuantiChrom™ *Calcium Assay* stellt eine weitere Methode dar, um Calcium nachzuweisen. Er ist in niedrigen Konzentrationsbereichen sehr sensitiv für Calcium. Bei hohen Calciumkonzentrationen der Proben werden diese verdünnt, damit die Absorption innerhalb des linearen Bereiches des Calciumassays liegt.

Die Auswertung der gemäß Kapitel 2.4.1 behandelten 6-Well-Platten erfolgte an Tag 14. Zunächst wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und das *Zelllayer* wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen.

Anschließend wurden 400 µl 0,5 N Essigsäure dazugegeben und die Zellen wurden mit einem Zellschaber losgeschabt. Das losgeschabte Layer und die Flüssigkeit wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und über Nacht bei 4°C unter Schütteln im Intelli-Mixer inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Zentrifugation der Reaktionsgefäße bei 1000 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgenommen und 1:10 mit Essigsäure verdünnt. 5 µl der Verdünnung wurden benötigt, um gemäß dem Protokoll von QuantiChrom™ die Calciumkonzentration nach Messung der Proben und des Standards bei 605 nm zu bestimmen.

2.5. Untersuchung der Zeitkinetik der osteogenen Differenzierung unter Einfluss von PDGF-BB

2.5.1. Kultivierung der ASCs mit unterschiedlicher Inkubationsdauer

Es wurden 150.000 Zellen je Well in 6-Well-Platten ausplattiert (siehe Kapitel 2.3.2) und nach Erreichen der Konfluenz mit Kontroll- und Differenzierungsmedium behandelt (siehe Kapitel 2.3.3). Zu jedem Auswertungszeitpunkt stand eine Platte mit Kontroll- und Differenzierungsmedium ohne Wachstumsfaktor und eine Platte mit Kontroll- und Differenzierungsmedium mit PDGF-BB in einer Konzentration von 20 ng/ml zur Auswertung zur Verfügung. Die Auswertung der 6-Well-Platten erfolgte an Tag 2, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Medienwechsel wurden dreimal je Woche durchgeführt.

2.5.2. Auswertung der Zeitkinetik mittels Alizarin-Rot-Färbung

Die Auswertung der 6-Well-Platten erfolgte an Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 mittels Alizarin-Rot-Färbung und Mikroskopie (siehe Kapitel 2.4.2) und anschließender Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung (siehe Kapitel 2.4.3).

2.6. Untersuchung der Genexpression von ASCs unter PDGF-BB in Abhängigkeit der Zeit

2.6.1. RNA-Isolation

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Ethanol	Th. Geyer	22.461.000
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
β -Mercaptoethanol	Sigma	63689
Steriles PBS	H ₂ O aus der Milliporeanlage + Sigma PBS Dulbecco	

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer oder Modell
Kanüle	Braun	4657500
Mikrozentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5427 R
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-One	616 201
Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific	NanoDrop™ 2000
Spritze	Braun	9166017V
Zellschaber	TPP	99002

Die für das Experiment benötigte RNA wurde aus ASCs an Tag 2, Tag 7 und Tag 14 isoliert. Dazu wurden zwei 6-Well-Platten mit 400.000 Zellen je *Well* zum Isolationszeitpunkt nach 2 Tagen, zwei Platten mit 280.000 je *Well* zur RNA-Isolation nach 7 Tagen und zwei mit 200.000 Zellen je *Well*, deren RNA an Tag 14 isoliert wurde, nach Protokoll 2.3.2 ausplattiert. Die ausplattierten Zellzahlen wurden so gewählt, dass zu den verschiedenen Isolationszeitpunkten eine möglichst identische Zelldichte vorlag. Auf jeder Platte wurden drei Wells mit Kontrollmedium und drei Wells mit Differenzierungsmedium behandelt. Die Zellen wurden für die entsprechende Versuchsdauer bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Eine der beiden Platten für jeden Zeitpunkt enthielt zusätzlich sowohl im Kontroll- als auch im Differenzierungsmedium PDGF-BB in einer Konzentration von 20 ng/ml, die andere Platte enthielt kein zugesetztes PDGF-BB (siehe Kapitel 2.3.3). Die RNA, die später zur Ermittlung der Standardkurve diente, wurde aus Zellen gewonnen, die sieben Tage unter Differenzierungsbedingungen ohne PDGF inkubiert wurden. Daher wurden unter diesen Bedingungen drei zusätzliche Wells kultiviert. Es erfolgten drei Medienwechsel pro Woche.

Es wurde zu jedem Isolationszeitpunkt RNA von zwei Platten isoliert. Um die RNA zu isolieren, wurde das RNeasy Mini-Kit von Qiagen verwendet und das RNeasy-Herstellerprotokoll angewandt. Das Kit enthielt die Flüssigkeiten *Konzentrat RLT*, *Konzentrat RPE* und *Buffer RW1*. *Buffer RLT* erhielt man durch Zugabe von 10 μ l β -Mercaptoethanol je ml *RLT-Konzentrat*. Um *Buffer RPE* zu erhalten, wurden *RPE-Konzentrat* mit Ethanol im Verhältnis 1:4 gemischt. Nach Vorbereitung der Puffer wurde das Medium in

jedem Well abgesaugt und das *Layer* einmal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde entfernt und in jedes Well wurden 350 µl *Buffer RLT* gegeben. Der Zellverband eines Wells wurde mit einem Zellschaber abgeschabt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurden die Zellen zehnmals durch eine 20 Gauge Nadel mit einer Spritze auf- und abgezogen. Dann wurden 350 µl 70% Ethanol in jedes Reaktionsgefäß gegeben und jedes Reaktionsgefäß wurde durch Pipettieren gemischt. 700 µl der Probe wurden auf die Qiagen-Säule, die Bestandteil des Kits war, in einem 2 ml *Collection Tube* gegeben. Es erfolgte die Zentrifugation der Säulen bei 11.000 rpm für 20 Sekunden bei Raumtemperatur. Das Lysat sammelte sich am Boden der Säule, der Überstand im 2 ml *Collection Tube* wurde verworfen. Es folgte die Zugabe von 700 µl *Buffer RW1* auf die Säule mit anschließender Zentrifugation bei 11.000 rpm für 20 Sekunden bei Raumtemperatur, der Überstand wurde wieder verworfen. Dann wurden 500 µl *Buffer RPE* auf die Säule gegeben und unter den zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands im *Collection Tube* wurden erneut 500 µl *Buffer RPE* zugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 11.000 rpm für 2 Minuten bei Raumtemperatur und Verwerfen des Überstands wurde die Säule in ein neues 2 ml *Collection Tube* überführt und bei 13.000 rpm für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Nach dem Trocknen wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und es wurden 30 µl RNase-freies Wasser langsam direkt auf den Boden der Säule gegeben. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 11.000 rpm für eine Minute bei Raumtemperatur, wodurch die RNA aus der Säule eluiert wurde und sich dann im Überstand befand. Im Anschluss konnte die RNA-Konzentration des Eluats mittels NanoDrop™ Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Als Nullwert diente RNase-freies-Wasser.

2.6.2. DNase-I-Verdau

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
DNase I Amplification Grade	Invitrogen	18068-015

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer oder Modell
Thermocycler	Eppendorf	Mastercycler® nexus gradient
PCR Tubes 0,2ml	Sarstedt	72.737.002

Um eine Verunreinigung der Proben-RNA durch DNA-Reste aus der Probe auszuschließen, wurde ein DNase-I-Verdau nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurde durch Zugabe der DNase-I eventuell vorhandene DNA, die sich als Kontamination in der Probe befand, verdaut, sodass nur die zu transkribierende RNA in der Probe verblieb. Der Verdau erfolgte mittels DNase-I, *Amplification Grade* von Invitrogen. 0,5 µg jeder Proben-RNA wurden in einem 0,2 ml PCR-Tube mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 8 µl gebracht. Dann wurde zu jeder Probe 1 µl *DNase-I-Reaction Buffer* und 1µl DNase-I

(1 U/ μ l) gegeben. Die Proben wurden im *Thermocycler* für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde 1 μ l 25 mM EDTA zu jeder Probe hinzugefügt und es erfolgte eine weitere Inkubation über eine Dauer von 10 Minuten bei 65°C im *Thermocycler*. Im letzten Schritt wurde die DNase-I denaturiert, sodass sie in der anschließenden cDNA-Synthese keinen Einfluss auf die entstehende cDNA ausüben kann.

2.6.3. Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies	200436

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer oder Modell
Thermocycler	Eppendorf	Mastercycler® nexus gradient
PCR Tubes 0,2ml	Sarstedt	72.737.002

Die Synthese von cDNA aus RNA wurde mit dem *AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit* nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zu den Proben aus dem DNase-I-Verdau, die 0,5 μ g Total-RNA in einem Volumen von 11 μ l enthielten, wurden 2,7 μ l DEPC- H₂O gegeben, sodass jede Probe ein Volumen von 12,7 μ l hatte. Es wurden in jedes *PCR-Tube* 3 μ l *Random Primers* mit einer Konzentration von 0,1 μ g/ μ l gegeben, dann wurde der Inhalt vorsichtig durchmischt und für 5 Minuten bei 65°C im *Thermocycler* inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten auf Raumtemperatur herabgekühlt. Es wurden in jedes Tube 2 μ l *Affinity Script RT Buffer*, 0,8 μ l dNTP mix (25 mM von jedem dNTP), 0,5 μ l *RNase Block Ribonuclease Inhibitor* (40 U/ μ l) und 1 μ l *AffinityScript Multiple Temperature RT* hinzugefügt, dann wurde alles vorsichtig durchmischt. Die Proben wurden erneut in den *Thermocycler*, der mit einem beheizbaren Deckel zur Vermeidung einer Kondensatentstehung im Deckel der Reaktionsgefäße ausgestattet war, gegeben und dort für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Als nächstes erfolgte die reverse Transkription der isolierten und aufgereinigten RNA von RNA in cDNA über 60 Minuten bei 42°C und zuletzt fand die Inaktivierung des Enzyms und damit die Beendigung des Transkriptionsvorganges bei 70°C für 15 Minuten statt. Mit einer eingebrachten RNA-Menge von 0,5 μ g in einem finalen Volumen von 20 μ l ergab sich eine Konzentration von 25 ng RNA/ μ l vor der Transkription und 25 ng cDNA/ μ l danach. Die Proben wurden bei -20°C eingefroren.

2.6.4. Genexpressionsanalyse mittels TaqMan-RT-qPCR

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
ABsolute QPCR ROX Mix	Thermo Fisher Scientific	AB1139A
Forward Primer GAPDH 875F	Eurofins Genomics	15-1223
Forward Primer OSF-2 287F	Operon Biotechnologies	19123-5378
Probe GAPDH -probe 899	Eurofins Genomics	15-1222
Probe OSF-2 -probe 317	Operon Biotechnologies	19123-5380
Reverse Primer GAPDH 946R	Eurofins Genomics	15-1223
Reverse Primer OSF-2 359R	Operon Biotechnologies	19123-5379
TaqMan® Gene Expression Assays Hs00231692_m1 RUNX-2	Applied Biosystems	4331182 FAM-MGB
TaqMan® Gene Expression Assays Hs00234160_m1 SPARC	Applied Biosystems	4331182 FAM-MGB
TaqMan® Gene Expression Assays Hs00541729_m1 SP7	Applied Biosystems	4331182 FAM-MGB
TaqMan® Gene Expression Assays Hs00913377_m1 IBSP	Applied Biosystems	4331182 FAM-MGB
TaqMan® Gene Expression Assays Hs00959006_g1 SPP1	Applied Biosystems	4331182 FAM-MGB
TaqMan® Gene Expression Assays Hs01029144_m1 ALPL	Applied Biosystems	4331182 FAM-MGB
TaqMan® Gene Expression Assays Hs01076756_g1 COL1A1	Applied Biosystems	4351372 FAM-MGB
TaqMan® Gene Expression Assays Hs01587814_g1 BGLAP	Applied Biosystems	4331182 FAM-MGB

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer oder Modell
384-Well-Platte	Roche	04 729 749 001
LightCycler	Roche	LightCycler® 480 Instrument II, 384-well
Mikrozentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5427 R
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio-One	616 201
Software für LightCycler	Roche	LightCycler® 480 Software, Version 1.5
Software zum Primerdesign	Premier Biosoft	Beacon Designer™ Primer Design

Eine Vervielfältigung von DNA-Abschnitten kann mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt werden. Dabei wird die Zielsequenz, die vervielfältigt werden soll, durch zwei Primer festgelegt, die komplementär an die Zielsequenz binden. Zur Vervielfältigung der Zielsequenz sind für einen PCR-Zyklus drei Schritte notwendig, die jeweils unterschiedliche Temperatureinstellungen

erfordern. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu zwei Einzelsträngen, indem durch Hitze die Wasserstoffbrücken zwischen den Doppelsträngen aufgebrochen werden. Im zweiten Schritt binden die hinzugegebenen Primer an die Zielsequenz, wodurch die DNA-Polymerase an die zu vervielfältigende Sequenz binden kann. Im letzten Schritt erfolgt dann die Elongation des komplementären Einzelstranges, indem die DNA-Polymerase von den Primern ausgehend komplementäre Nukleotide zu einem neuen Einzelstrang ergänzt. Innerhalb eines Zyklus werden die zu amplifizierenden Sequenzen verdoppelt und dienen dann wiederum als Vorlage für den nächsten PCR-Zyklus. Die Zahl der Zielsequenzen steigt daher im Verlauf der PCR exponentiell an.

Entstand die cDNA aus vorliegender RNA durch Reverse Transkription, so spricht man von einer RT-PCR. Können mithilfe von Fluoreszenzmessungen während der gesamten Reaktion kontinuierlich Rückschlüsse auf die Menge an DNA-Strängen der Zielsequenz gezogen werden, so spricht man von einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR oder real-time PCR). Bei einer RT-qPCR werden beide Verfahren kombiniert.

Bei der TaqMan-RT-qPCR wird der PCR-Reaktion eine Probe zugemischt, die zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz bindet und mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und einem *Quencher* versehen ist. Dabei unterdrückt der *Quencher* die Fluoreszenzausstrahlung des Reporters. Als *Quencher* wurde in den Experimenten Tetramethylrhodamine (TAMRA) und als Reporter 6-Carboxyfluoresceine (FAM) verwendet. Die Taq-Polymerase hat eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und baut dadurch die Probe während der Elongation des Einzelstranges ab, sodass Reporter und *Quencher* voneinander getrennt werden und ein Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge an abgebauter Probe und damit proportional zur Menge an amplifizierten DNA-Strängen der Zielsequenz an. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase.

Es wurde die Expression der Gene OSF-2, RUNX-2, ALP, BGLAP, OSX, COL1A1, IBSP, SPP1 und SPARC analysiert. Die Primer für das menschliche GAPDH wurden mittels *Beacon Designer Primer Design* entworfen und von *Eurofins Genomics* synthetisiert. Die Primer für OSF-2 wurden mittels *Beacon Designer Primer Design* entworfen und von *Operon Biotechnologies* synthetisiert.

Die qPCR wurde mit einem *Roche Lightcycler LC2* durchgeführt. Die ermittelte Genexpression zu den Zeitpunkten Tag 2, Tag 7 und Tag 14 wurde auf das ubiquitär in den Zellen exprimierte GAPDH normalisiert.

Zur Auswertung wurden für alle Probe C_T -Werte (*Cycle threshold*) ermittelt. Der C_T -Wert einer Probe ist der x-Wert des Punktes, an dem die Fluoreszenz der Probe zum ersten Mal signifikant über den Hintergrundwert ansteigt. Je stärker das Gen exprimiert wird, desto niedriger ist der C_T -Wert der Probe.

Eine Standard-Verdünnungsreihe für jedes zu analysierende Gen sowie GAPDH wurde in jedem Lauf der PCR erstellt.

Tabelle 2: Primersequenzen der Gene

GAPDH forward primer	5'-TGGGCTACACTGAGCACCAG-3'
GAPDH reverse primer	5'-CAGCGTCAAAGGTGGAGGAG-3'
GAPDH probe	5'-[6-FAM]TCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCC[TAMRA-Q]-3'
OSF2 forward primer	5'-CCCAGCAGTTTTGCCATT-3'
OSF2 reverse primer	5'-ATAGCGCTGCGTTGTGGTG-3'
OSF2 probe	5'-[6-FAM]TGGCACTCTGGGCATCGTGGG[TAMRA-Q]-3'

Für die Standard-Reihe wurden je 30 µl Master Mix mit 2 µl der unterschiedlichen Verdünnungsstufen der DNA gemischt. Die Verdünnungsstufen der cDNA sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Standard-Verdünnungsreihe der cDNA für Taq-Man-Analyse

Volumen cDNA	Volumen DEPC- H ₂ O	Konzentration cDNA
cDNA unverdünnt		25 ng/µl
15 µl 25 ng/µl cDNA	15 µl	12,5 ng/µl
15 µl 12,5 ng/µl cDNA	15 µl	6,25 ng/µl
15 µl 6,25 ng/µl cDNA	30 µl	2,08 ng/µl
15 µl 2,08 ng/µl cDNA	15 µl	1,04 ng/µl
10 µl 1,04 ng/µl cDNA	90 µl	0,104 ng/µl

Zusätzlich wurde die *No Template Control* (NTC) mit 40 µl *MasterMix* und 2 µl DEPC- H₂O angesetzt, um eine Kontamination des Laufs mit DNA erkennen oder ausschließen zu können. Die NTC und die Standard-Verdünnungsreihen wurden jeweils in Duplikaten pipettiert. Für jede Probe wurden 40 µl *MasterMix* jedes Gens mit je 2 µl cDNA der Probe gemischt und dann in Triplikaten pipettiert. Bei den Genen GAPDH und OSF-2 wurden dem *MasterMix* der *Forward Primer*, der *Reverse Primer* und die Probe zugesetzt (siehe Tabelle 4), bei den restlichen analysierten Genen enthielt der erworbene *PrimerMix* bereits alle drei Komponenten (siehe Tabelle 5).

Tabelle 4: MasterMix für GAPDH und OSF-2

Name des Gens	Volumen qPCR ROX Mix	Volumen Forward Primer 200 nM	Volumen Reverse Primer 200 nM	Volumen Probe 100 nM	Volumen autoklaviertes H ₂ O bidest.
GAPDH	400 µl	16 µl 10 µM	16 µl 10 µM	8 µl 10 µM	360 µl
OSF-2	400 µl	1,6 µl 100 µM	1,6 µl 100 µM	0,8 µl 100 µM	396 µl

Tabelle 5: MasterMix für Gene mit fertig gemischtem Primermix

Name des Gens	Volumen qPCR ROX Mix	Volumen Primer Mix	Volumen autoklaviertes H ₂ O bidest.
RUNX-2	400 µl	40 µl	360 µl
BGLAP	400 µl	40 µl	360 µl
ALP	400 µl	40 µl	360 µl
OSF	400 µl	40 µl	360 µl
COL1A1	400 µl	40 µl	360 µl
IBSP	400 µl	40 µl	360 µl
SPARC	400 µl	40 µl	360 µl
SPP1	400 µl	40 µl	360 µl

Die Duplikate des Standards und die Triplikate der Proben wurden für mehrere Gene in eine 384-Well-Platte mit 10 µl je Well pipettiert. Im Anschluss wurde die Platte mit einer selbsthaftenden Folie bedeckt, um ein Austreten der Proben aus dem Well und eine Durchmischung mit benachbarten Proben zu verhindern. Die Platte wurde dann bei 3.500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, damit sich das gesamte Probenvolumen am Boden des *Wells* befand. Zu Beginn der qPCR wurde die Platte bei 95°C für 15 Minuten inkubiert. Dann wurden 50 Zyklen der PCR durchgeführt. Jeder Zyklus bestand dabei aus einer Denaturierungsphase mit 15 Sekunden bei 95°C und anschließendem *Annealing* sowie Elongation für 60 Sekunden bei 60°C. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am Ende eines jeden Zyklus.

2.6.5. Statistische Auswertung

Software	Hersteller	Version
Microsoft Excel 2021	Microsoft Corporation	Microsoft Excel 2021
GraphPad Prism	Graphpad Software	Version 8.00

Mithilfe der Standardkurven ließ sich aus den ermittelten C_T -Werten die Konzentration der cDNA des Zielgens sowie die Konzentration von GAPDH in der Probe bestimmen. Mit dem Quotienten aus Konzentration des Zielgens und Konzentration von GAPDH erhielt man die relative mRNA-Expression

des Zielgens normiert auf GAPDH. Anschließend wurde die Differenzierung mit Wachstumsfaktor auf die entsprechende Kontrolle (Wachstumsmedium ohne Differenzierungszusätze mit PDGF-BB) und die Differenzierung ohne Wachstumsfaktor auf die entsprechende Kontrolle (Wachstumsmedium ohne Differenzierungszusätze ohne PDGF-BB) normiert. Es wurde durch Vergleich der Mittelwerte überprüft, ob PDGF-BB einen signifikanten Effekt auf die Genexpression während der osteogenen Differenzierung hatte. Zur statistischen Auswertung der Daten der RT-qPCR wurde ein *two-tailed unpaired t-Test* durchgeführt. Der p-Wert wurde durch den Vergleich der Mittelwerte der relativen Genexpression mit den entsprechenden Standardabweichungen berechnet. Es wurde eine Stichprobenzahl von n=3 verwendet, da von jeder Probe drei Wells unter identischen Bedingungen inkubiert wurden. Für die Auswertung und graphische Darstellung wurden die Programme Microsoft Excel und *GraphPad Prism* verwendet.

2.7. Untersuchung der Signaltransduktion der osteogenen Differenzierung unter PDGF-BB in ASCs

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Ascorbat	Sigma	A8960
Dexamethason	Sigma	D2915
DMEM-023	Gibco	31885-023
FCS Superior	Sigma	S0615
PDGF-BB	R&D	220-BB
Penicillin/Streptomycin	Sigma	P0781
β-Glycerophosphat	Roth	6847.1
SB202190	Sigma-Aldrich	S7067
SH-4-54	Selleckchem/Biozol	S7337
SP600125	Sigma-Aldrich	S5567
MK-2206	Santa Cruz	sc-364537
LDN-193189	Selleckchem/Biozol	S2618
Tyrphostin AG-1296	Enzo	ALEXBML-EI303
U0126	Sigma-Aldrich	19-147

Geräte und Gebrauchswaren	Hersteller	Artikelnummer
50 ml Gefäß	Corning Incorporated	4870
6-Well-Platten	Corning Incorporated	3506

2.7.1. Kultivierung der ASCs mit unterschiedlichen Inhibitoren unter Einfluss von PDGF-BB

Zur Erfassung der an der Signaltransduktion beteiligten Zielstrukturen wurden nach dem Protokoll zum Ausplattieren der Zellen in 6-Well-Platten (siehe Kapitel 2.3.2) 150.000 ASCs je Well ausgebracht. Insgesamt wurden sieben verschiedene Inhibitoren untersucht. Es wurden je zwei 6-Well-Platten mit dem gleichen Inhibitor inkubiert. Zusätzlich wurden zwei Platten ohne Inhibitor inkubiert. Jede Platte enthielt in drei Wells Kontrollmedium und in drei Wells Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 2.3.3). Für jeden Inhibitor enthielt eine Platte zusätzlich PDGF-BB in einer Konzentration von 20 ng/ml, der anderen wurde kein PDGF-BB zugesetzt. Der Inhibitor wurde dem Medium in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt. Lediglich LDN193189 wurde in einer niedrigeren Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ zugesetzt, da es in der höheren Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zytotoxisch war und zu einem Absterben der Zellen führte. Insgesamt wurden sechzehn 6-Well-Platten für den Versuch benötigt. Der Versuch startete bei Erreichen der Konfluenz in den 6-Well-Platten und dauerte ebenfalls 14 Tage. Es wurden dreimal wöchentlich Medienwechsel vorgenommen.

2.7.2. Auswertung der Inhibitorenversuche mittels Alizarin-Rot-Färbung

Mittels Mikroskopie der Alizarin-Rot-Färbung (siehe Kapitel 2.4.2) und anschließender Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung (siehe Kapitel 2.4.3) erfolgte die Auswertung der 6-Well-Platten an Tag 14. Zur Auswertung der Quantifizierung wurden die Absorptionswerte der Proben unter Differenzierungsbedingungen herangezogen. Der Quotient aus der Absorption der Probe mit Inhibitor mit PDGF-BB und der Absorption der Probe mit Inhibitor ohne PDGF-BB gibt den Effekt von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung an. Anschließend wurden der Effekt ohne Inhibitor und der Effekt mit den verschiedenen Inhibitoren im Vergleich betrachtet. Dabei wurde mittels *two-tailed unpaired t-Test* untersucht, ob die PDGF-BB-induzierte Absorptionzunahme durch die Inhibitoren im Einzelnen signifikant vermindert oder signifikant verstärkt wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der ASCs mittels Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung der in den Versuchen verwendeten Zellen anhand von bestimmten Oberflächenmarkern wurde eine Durchflusszytometrie mittels *BD LSRFortessa™* durchgeführt. Die Analyse der Oberflächenmarker der in den Experimenten verwendeten Zellen mittels unterschiedlicher Antikörper ergab, dass die Zellen positiv für CD73, CD90 und CD105 und negativ für CD14, CD45 und HLA-DR waren (siehe Abbildung 2).

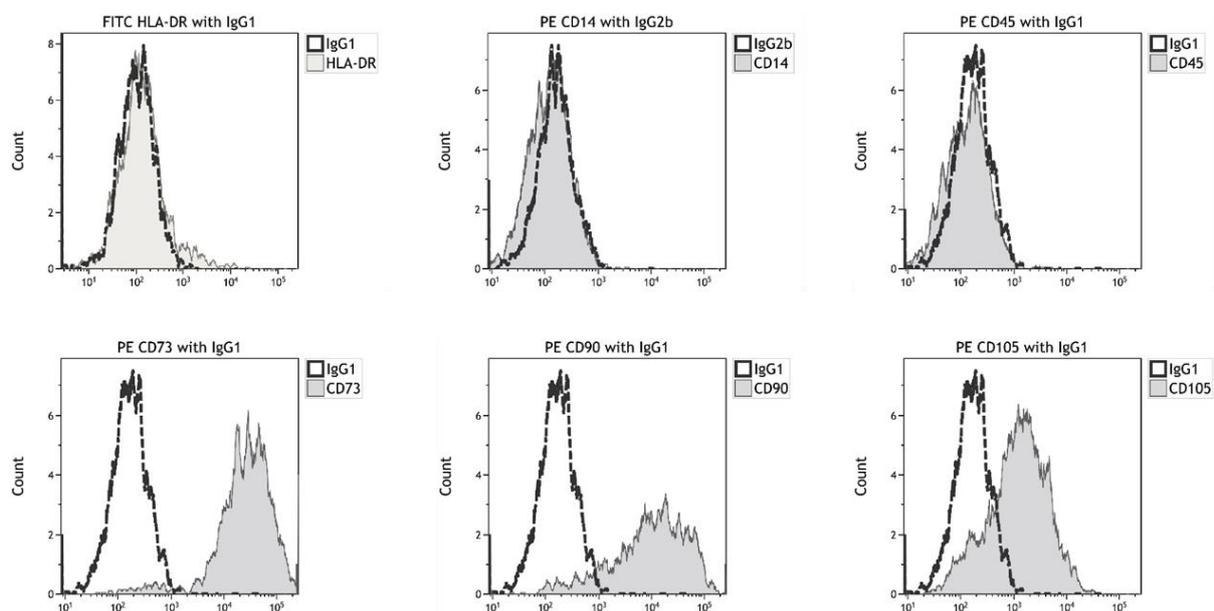


Abbildung 2: Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie im *BD LSRFortessa™* nach Konjugation mit unterschiedlichen Antikörpern. In jedem Diagramm ist der untersuchte Oberflächenmarker sowie eine Isotypkontrolle gezeigt. Die Zellen sind HLA-DR⁻, CD14⁻, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺ und CD105⁺.

3.2. Effekte von PDGF-BB auf die Proliferation von ASCs

Nach der Inkubation der Zellen unter Kontroll- und Differenzierungsbedingungen mit und ohne PDGF-BB wurde die Auswertung an Tag 14 mittels *CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent* durchgeführt, um den Einfluss der unterschiedlichen Kulturbedingungen auf die Zellzahl ermitteln zu können. Es konnten weder signifikante Unterschiede der Zellzahl zwischen Kontrollbedingungen mit und ohne PDGF-BB bestimmt werden, noch zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Zellzahl zwischen

Differenzierungsbedingungen mit und ohne PDGF-BB (siehe Abbildung 3). PDGF-BB hatte in unseren Experimenten keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

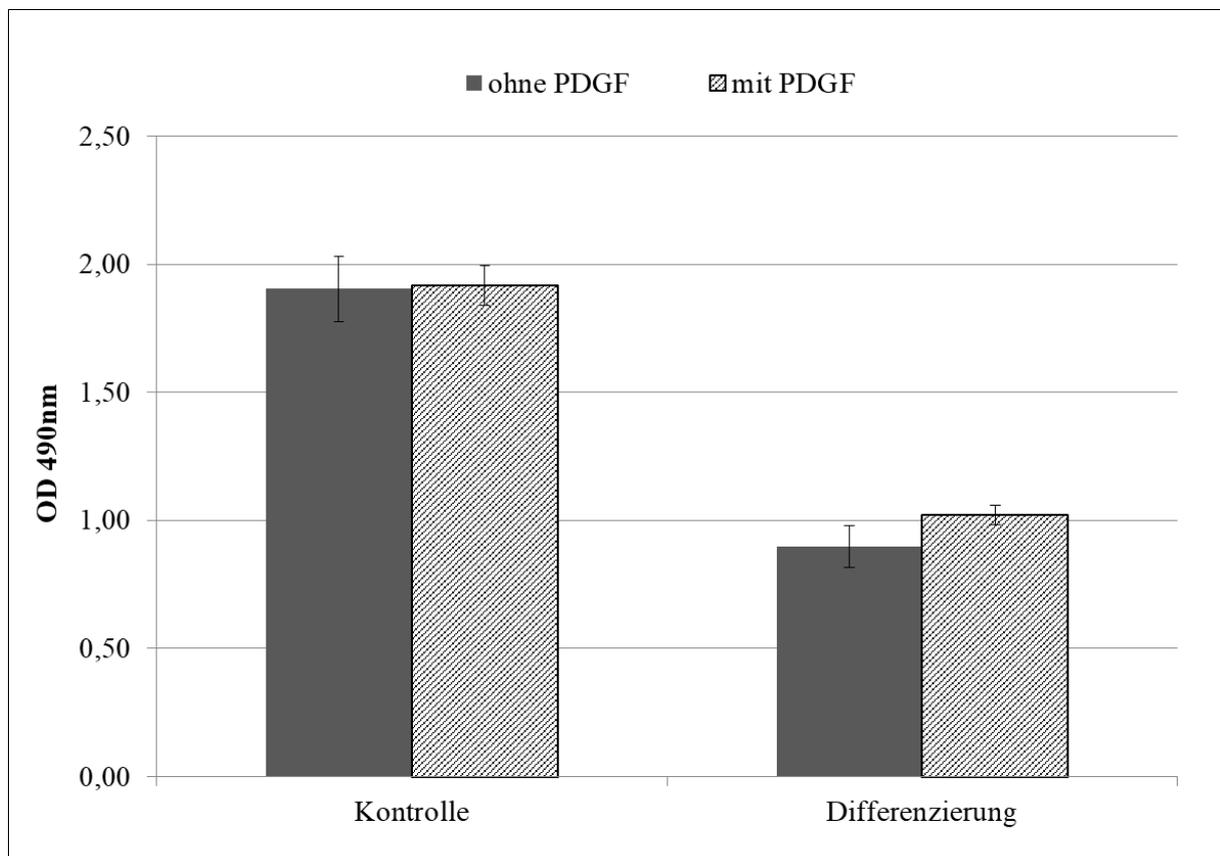


Abbildung 3: Der Einfluss von PDGF auf die Proliferation der ASCs wurde mittels CellTiter 96®Aqueous One Solution Reagent bestimmt. Die OD wurde bei 490 nm gemessen. Für jedes Well wurde bei der Bestimmung der OD fünffache Proben angelegt und der Mittelwert daraus als Wert für ein Well bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus je drei Wells unter den gleichen Bedingungen mit Standardabweichung. (* $p < 0,05$).

3.3. Effekte von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von ASCs in Abhängigkeit der PDGF-BB-Konzentration

Nach der Behandlung der Zellen mit Kontroll- und Differenzierungsmedium, denen Konzentrationen an PDGF-BB von 0 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml zugesetzt waren, erfolgte die Auswertung der Platten an Tag 14. Makroskopisch ließ sich ein deutlicher Unterschied in der Rotfärbung zwischen Kontrollen und Differenzierung feststellen. Zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen zeigte sich makroskopisch kein Unterschied in der Rotfärbung (siehe Abbildung 4).

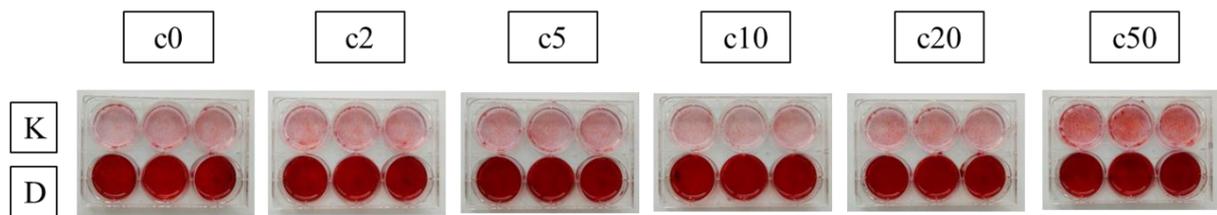


Abbildung 4: Makroskopische Aufnahme der Platten mit Alizarin-Rot-Färbung nach 14 Tagen Inkubation. Die Platten wurden mit Konzentrationen zwischen 0 und 50 ng/ml (c0 – c50) PDGF-BB behandelt (K = Kontrolle, D = Differenzierung).

Bei der folgenden Betrachtung unter dem Mikroskop zeigt sich eine Tendenz zur Zunahme der Rotfärbung unter Differenzierungsbedingungen mit steigender Konzentration an PDGF-BB. Die Ausschnitte aus der Mikroskopie sind in Abbildung 5 zu sehen.

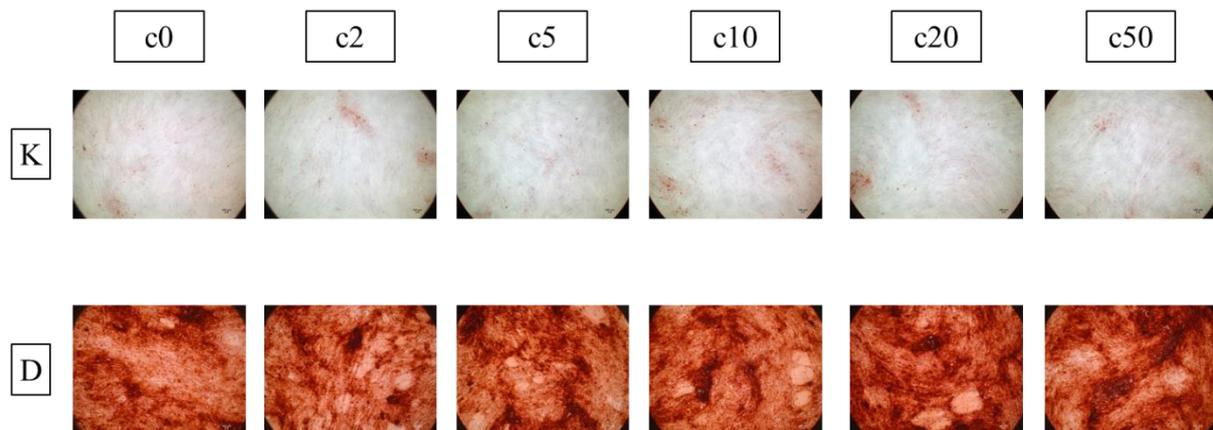


Abbildung 5: Mikroskopische Aufnahmen in 25-facher Vergrößerung. Die ASCs wurden mit PDGF-BB in Konzentrationen zwischen 0 und 50 ng/ml (c0 – c50) im Kontroll- und Differenzierungsmedium behandelt (K = Kontrolle, D = Differenzierung).

Die anschließende Quantifizierung der Färbung zeigte eine Zunahme der Rotfärbung von 0 nach 50 ng/ml unter Differenzierungsbedingungen. Die Platten, die mit Konzentrationen zwischen 2 ng/ml und 20 ng/ml PDGF-BB behandelt wurden, zeigten deutliche Schwankungen der Rotfärbung. Die Absorption der Differenzierung war bei einer Konzentration von 2 ng/ml PDGF-BB signifikant vermindert ($p=0,0416$). Es zeigte sich eine signifikant verstärkte Absorption unter Differenzierungsbedingungen bei 20 ng/ml PDGF-BB ($p=0,0297$) und bei 50 ng/ml PDGF-BB ($p=0,0078$). Unter Kontrollbedingungen blieb die Färbung über die gesamten Konzentrationsstufen hinweg unverändert (siehe Abbildung 6).

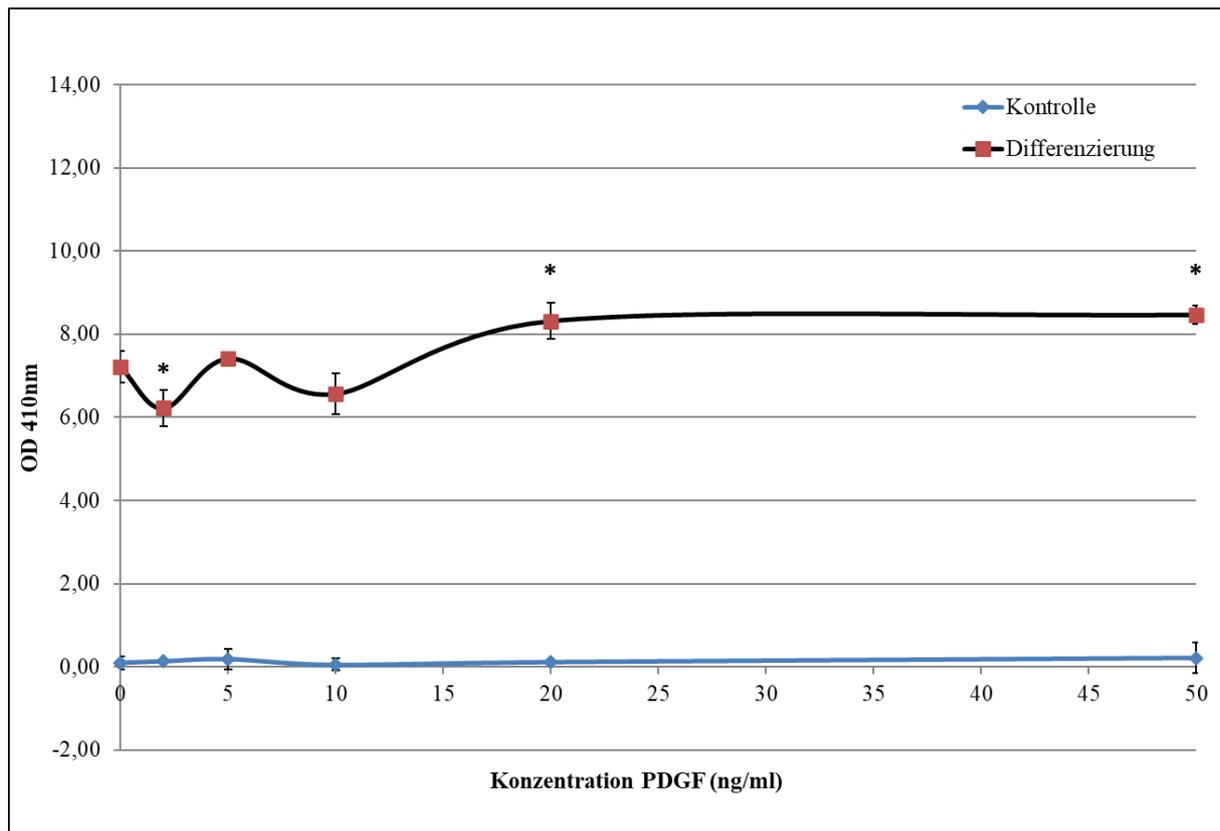


Abbildung 6: Quantifizierung der Konzentrationsreihe. Es wurde die Absorption bei 410 nm gemessen. Die Werte sind als Mittelwert aus den biologischen Triplikaten mit Standardabweichung angegeben. Zur Ermittlung des Wertes jedes Wells wurde bei der Auswertung ein technisches Triplikat angefertigt und der Mittelwert als Wert des Wells bestimmt. Die Signifikanz errechnete sich in Bezug zur Probe mit 0 ng/ml PDGF-BB (* $p < 0.05$).

Ein weiteres Experiment mit Auswertung durch einen *Calciumassay* zur Bestimmung der Calciumkonzentration fand unter gleichen Bedingungen statt. Die Zellen wurden erneut für einen Zeitraum von 14 Tagen mit unterschiedlichen Konzentrationen an PDGF-BB behandelt. Dabei wurde sowohl dem Kontroll- als auch dem Differenzierungsmedium PDGF-BB in den Konzentrationen 0 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml zugesetzt. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse des Versuches zu sehen. Im direkten Vergleich zwischen Kontroll- und Differenzierungsbedingungen zeigte sich, dass unter Differenzierungsbedingungen deutlich höhere Calciumkonzentrationen in den Proben vorhanden waren. Unter Differenzierungsbedingungen zeigte sich eine Zunahme der Calciumkonzentration mit steigender PDGF-BB-Konzentration, die im Konzentrationsbereich von 20 ng/ml bis 50 ng/ml saturierte. Im Vergleich zur Probe mit einer PDGF-BB-Konzentration von 0 ng/ml zeigte sich eine signifikant höhere Calciumkonzentration bei 5 ng/ml PDGF-BB ($p = 0,0132$) und bei 20 ng/ml ($p = 0,0032$). Bei niedrigen Konzentrationen von PDGF-BB schwankte die Calciumkonzentration. Bei 20 ng/ml PDGF-BB zeigte sich auch hier eine signifikante Zunahme der Calciumkonzentration ($p = 0,0236$).

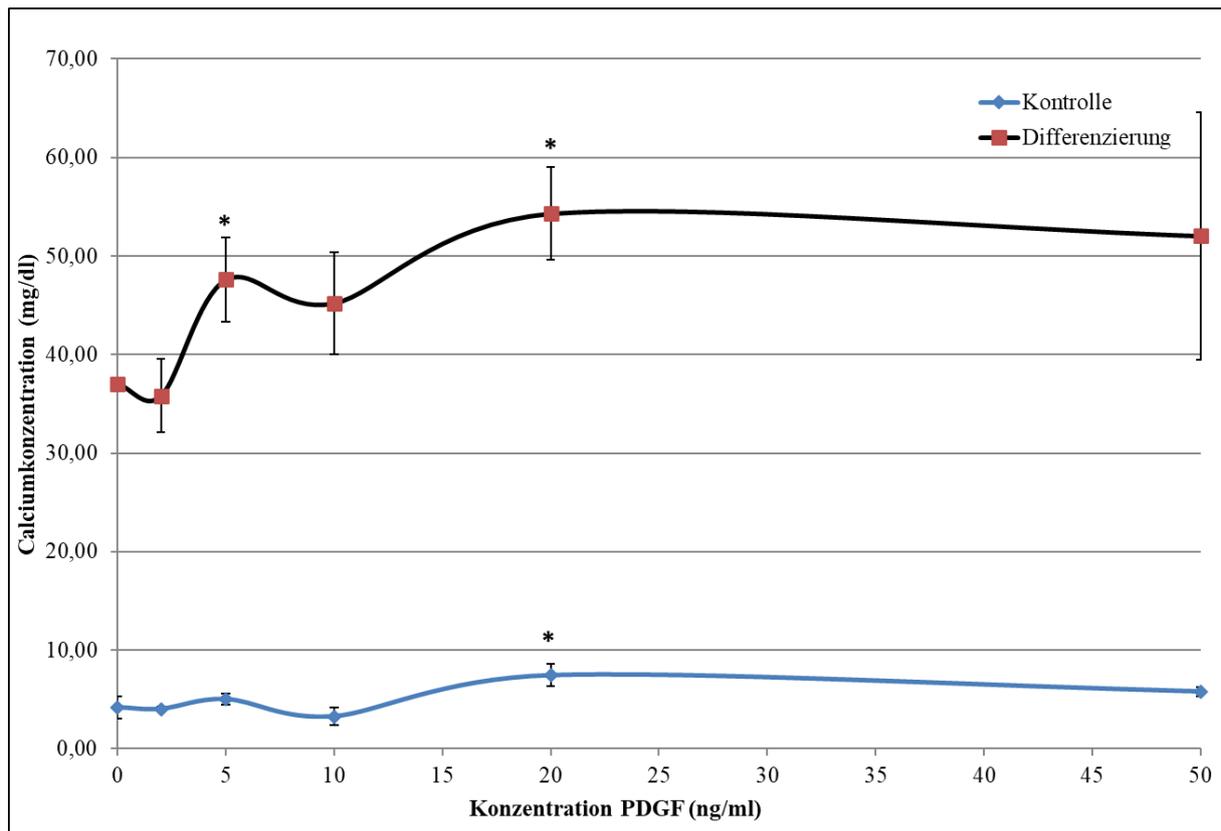


Abbildung 7: Die Calciumkonzentration wurde mittels Calciumassay bestimmt. Den ASCs wurde Kontroll- bzw. Differenzierungsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen von PDGF-BB zugesetzt. Für jedes Well wurde bei der Auswertung ein technisches Triplikat angefertigt, aus dem der Wert eines Wells als Mittelwert bestimmt wurde. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den drei Werten der Wells mit Standardabweichung. Die OD wurde bei 612 nm gemessen. Die Signifikanz errechnete sich in Bezug zur Probe mit 0 ng/ml PDGF-BB (* $p < 0.05$).

3.4. Effekte von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von ASCs in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

In diesem Experiment wurde untersucht, wie sich die osteogene Differenzierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter Einfluss von PDGF-BB in einer Konzentration von 20 ng/ml unter Kontroll- und Differenzierungsbedingungen verhält. Der Versuchsstart erfolgte nach Erreichen der Konfluenz durch Umstellung auf Kontroll- und Differenzierungsmedium und die Auswertung der Platten erfolgte an Tag 1, 7, 14, und 21 mittels Alizarin-Rot-Färbung. Die Plattenbelegung fand dabei nach dem in Abbildung 1 beschriebenen Schema statt. Makroskopisch zeigte sich eine Zunahme der Rotfärbung sowohl unter Kontroll- als auch Differenzierungsbedingungen, die mit fortschreitender Inkubationsdauer zunahm. Unter Kontrollbedingungen führte ein Zusatz von PDGF-BB zu einer Zunahme der Farbintensität bei makroskopischer Betrachtung. Unter Differenzierungsbedingungen zeigte sich ab Tag 14 ebenfalls eine stärkere Farbintensität in den Wells mit Zellen, die PDGF-BB ausgesetzt waren. Der größte PDGF-induzierte Unterschied zwischen den Wells bestand unter Kontrollbedingungen an Tag 21 und unter Differenzierungsbedingungen an Tag 14 (siehe Abbildung 8).

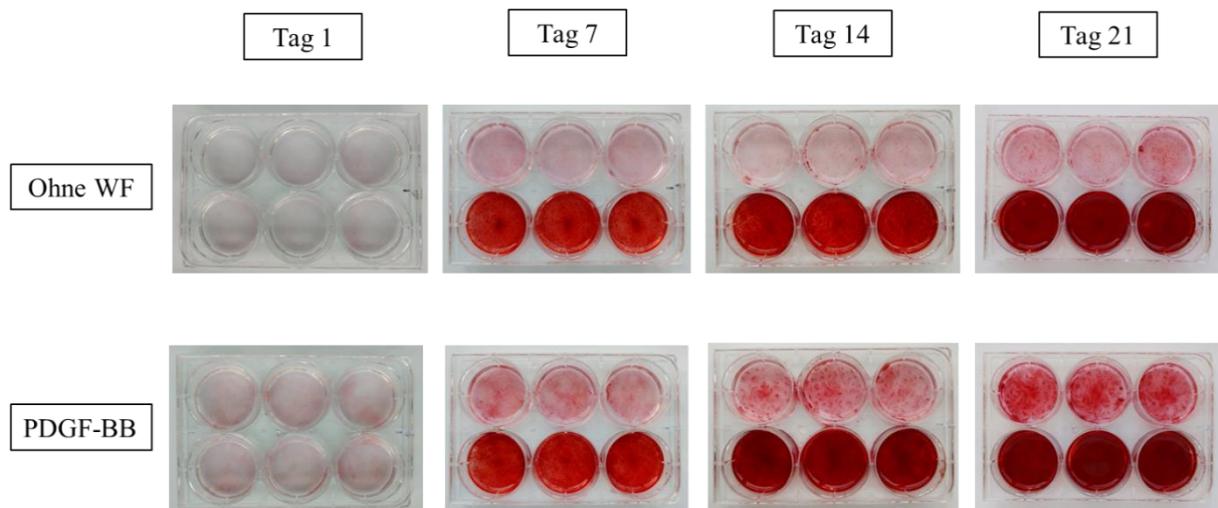


Abbildung 8: Makroskopische Darstellung der Platten nach Alizarin-Rot-Färbung an Tag 1, Tag 7, Tag 14 und Tag 21. Die Zellen wurden mit Kontroll- und Differenzierungsmedium mit und ohne 20 ng/ml PDGF-BB behandelt (WF=Wachstumsfaktor).

Die Zunahme der Rotfärbung mit fortschreitender Zeit zeigte sich auch mikroskopisch. Unter Differenzierungsbedingungen war die Zunahme der Rotfärbung stärker ausgeprägt als unter Kontrollbedingungen. Mikroskopisch ließen sich unter Kontrollbedingungen nur marginale Unterschiede nach Exposition gegenüber PDGF-BB beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Vergleich zwischen Differenzierungsbedingungen ohne PDGF-BB und mit PDGF-BB eine stärkere Rotfärbung bei Zusatz von PDGF-BB. Die repräsentativen Ausschnitte aus der Mikroskopie sind in Abbildung 9 zu sehen.

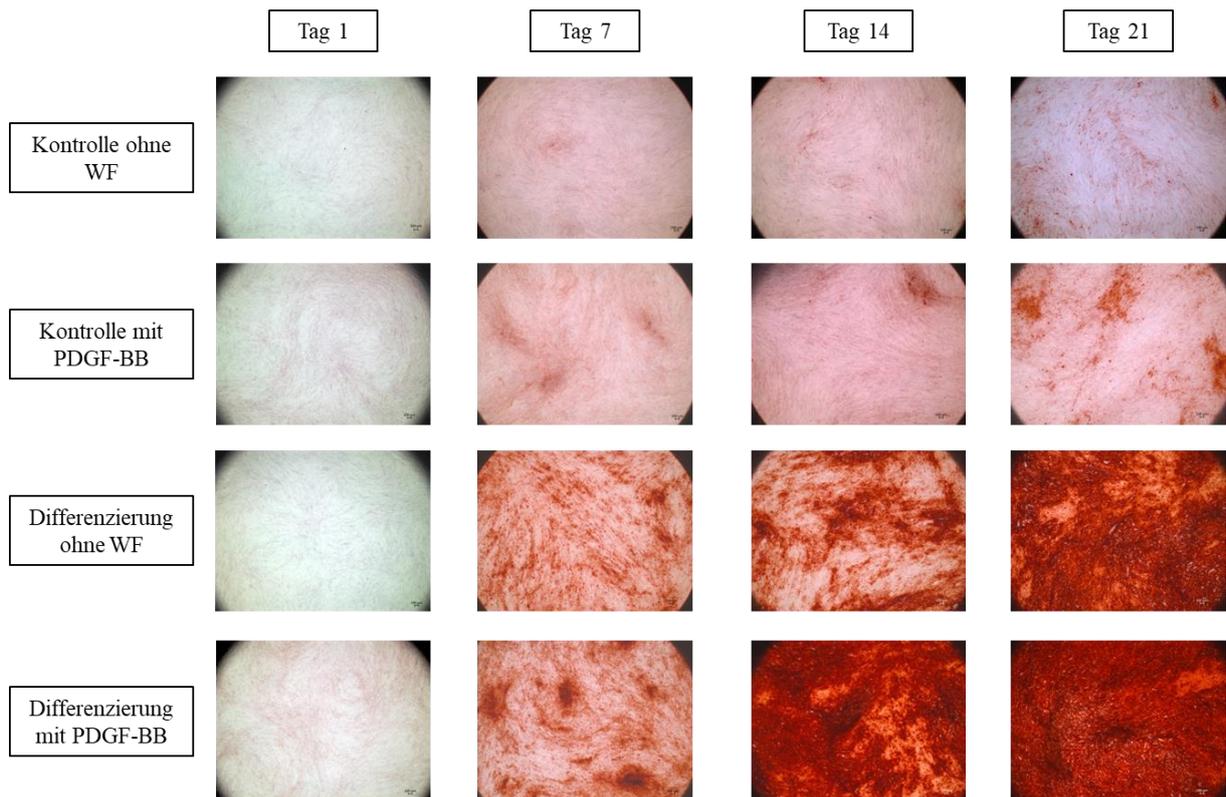


Abbildung 9: Mikroskopische Betrachtung der Alizarin-Rot-Färbung in 25-facher Vergrößerung. Es wurden repräsentative Ausschnitte aus den Triplikaten ausgewählt.

In der anschließenden Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung zeigte sich, dass unter Differenzierungsbedingungen eine stärkere Färbung als unter Kontrollbedingungen vorlag. Bei Zusatz von PDGF-BB unter Differenzierungsbedingungen verstärkte sich die Färbung (siehe Abbildung 10). Die Unterschiede zwischen Kontrolle und Differenzierung waren sowohl mit als auch ohne Zusatz von PDGF-BB an Tag 7, Tag 14 und Tag 21 signifikant. Der größte Unterschied zwischen Differenzierung mit und ohne PDGF-BB bestand an Tag 14 und war statistisch signifikant ($p=0,0018$). Auch an Tag 21 zeigte sich ein signifikanter Unterschied unter Differenzierungsbedingungen mit und ohne PDGF-BB ($p=0,0229$).

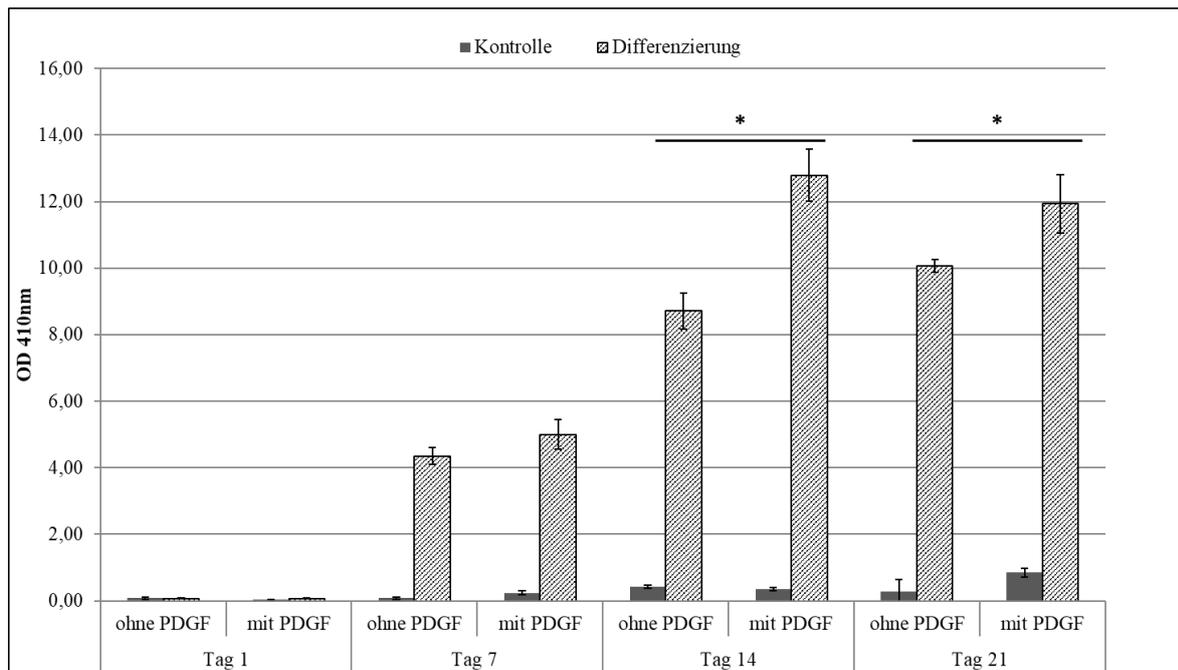


Abbildung 10: Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung. Es wurde für jede Probe die OD bei 410nm gemessen. Der Mittelwert der Triplikate wurde mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz errechnete sich im Vergleich zur Probe unter gleichen Bedingungen ohne PDGF-BB (* $p < 0.05$).

3.5. Effekte von PDGF-BB auf die Genexpression osteogener Gene in ASCs

Die Auswertung der Genexpressionsanalysen erfolgte mittels RT-qPCR und Normalisierung der Analysen auf GAPDH. Die Auswertung der Expression der verschiedenen Gene erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl in Kontroll- als auch in Differenzierungsmedium ohne und mit PDGF-BB in einer Konzentration von 20 ng/ml. Nachdem sämtliche Werte auf GAPDH normiert wurden, wurde der Quotient aus Differenzierung und Kontrolle (Wachstumsmedium ohne Differenzierungszusätze) für die Gruppe mit und die Gruppe ohne Wachstumsfaktor gebildet. Es wurde durch Vergleich der Mittelwerte der Gruppen mit und ohne PDGF-BB überprüft, ob PDGF-BB einen signifikanten Effekt auf die Genexpression während der osteogenen Differenzierung hatte. Dabei wurden die Analysen der folgenden Gene durchgeführt: RUNX-2, OSF-2, ALP, COL1A1, SPARC, SPP1, IBSP, BGLAP und OSX.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse des Gens RUNX2 sind in Abbildung 11 zu sehen. An Tag 2 zeigte sich kein Unterschied der Genexpression in Anwesenheit von PDGF-BB. Zu Tag 7 zeigte sich eine signifikante niedrigere Genexpression unter PDGF-BB ($p=0.0037$). An Tag 14 war die Genexpression unter PDGF-BB erniedrigt, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

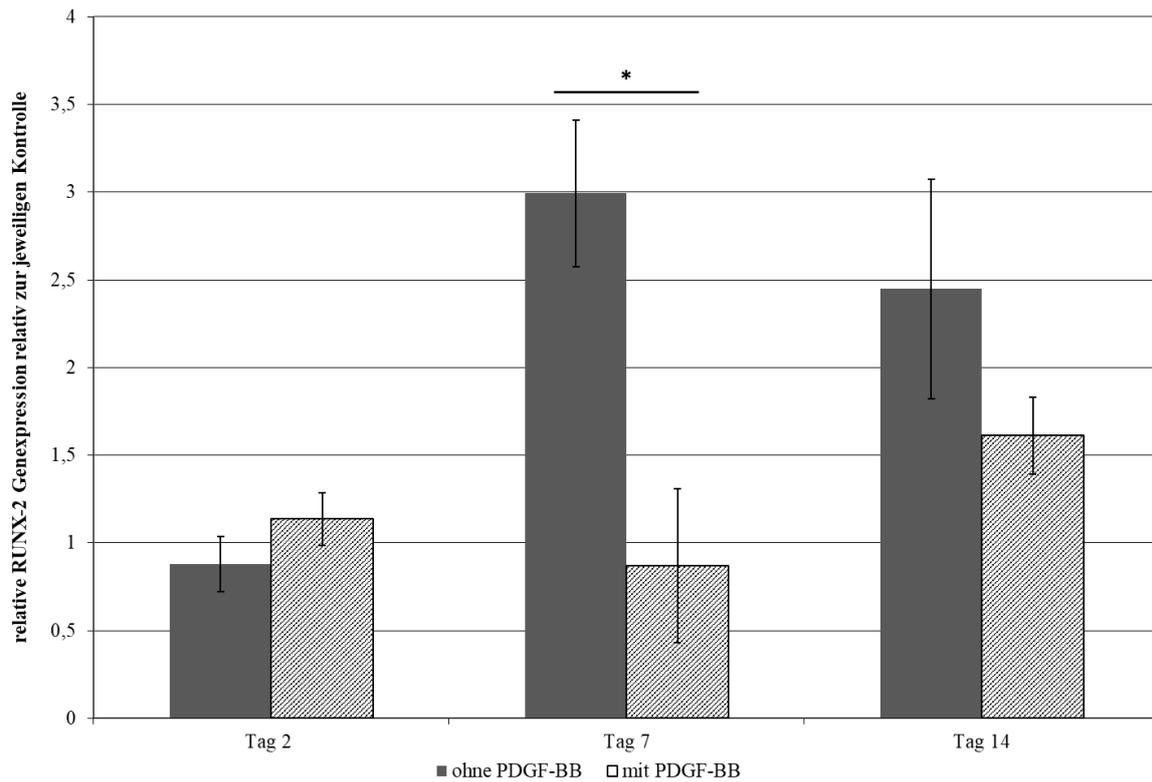


Abbildung 11: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von RUNX2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Expression von RUNX2 ist relativ zur GAPDH-Expression dargestellt. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (* $p < 0.005$).

Abbildung 12 zeigt die Genexpression von OSF-2. Zu keinem der Zeitpunkte zeigte sich eine signifikante Veränderung der Genexpression von OSF-2 durch PDGF-BB.

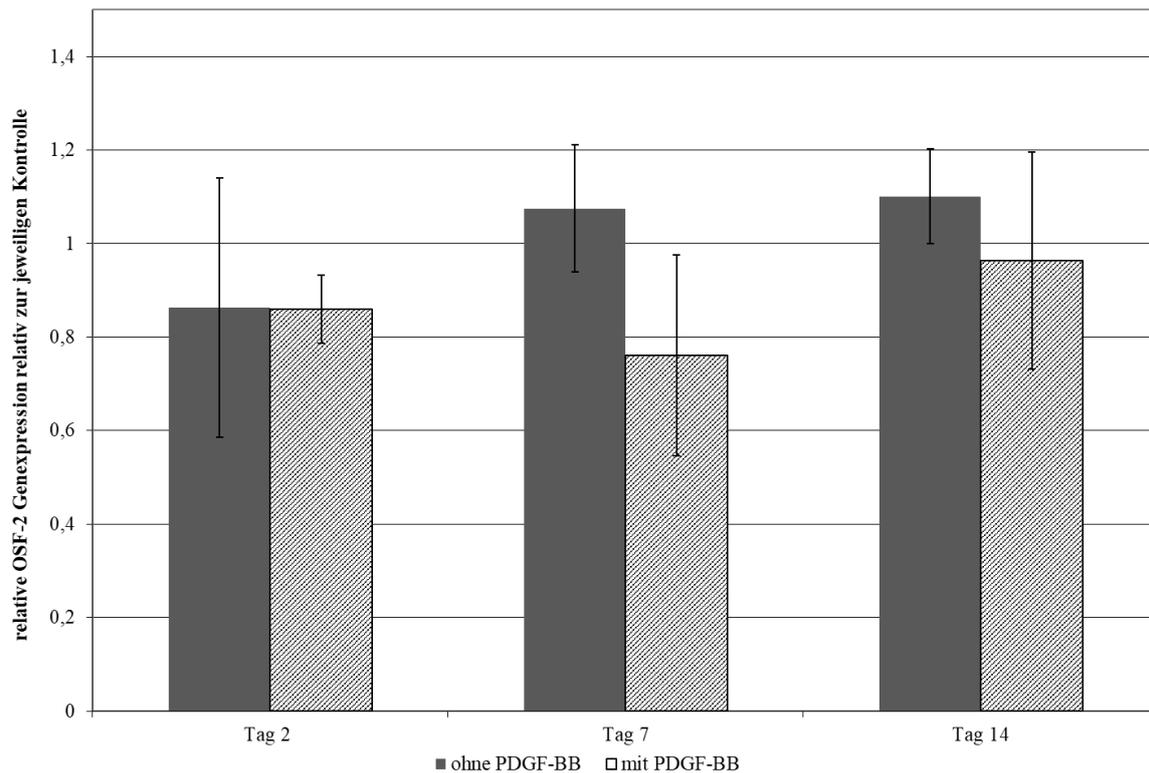


Abbildung 12: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von OSF-2 zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Expression des Zielgens ist relativ zur Expression von GAPDH dargestellt. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Analyse von ALP. An Tag 2 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression bei Zugabe von PDGF-BB festgestellt werden. An Tag 7 zeigte sich in den mit PDGF-BB behandelten Zellen eine signifikant niedrigere Genexpression von ALP als in den Zellen ohne PDGF-BB ($p=0.0033$). An Tag 14 zeigte sich keine signifikante Veränderung unter PDGF-BB.

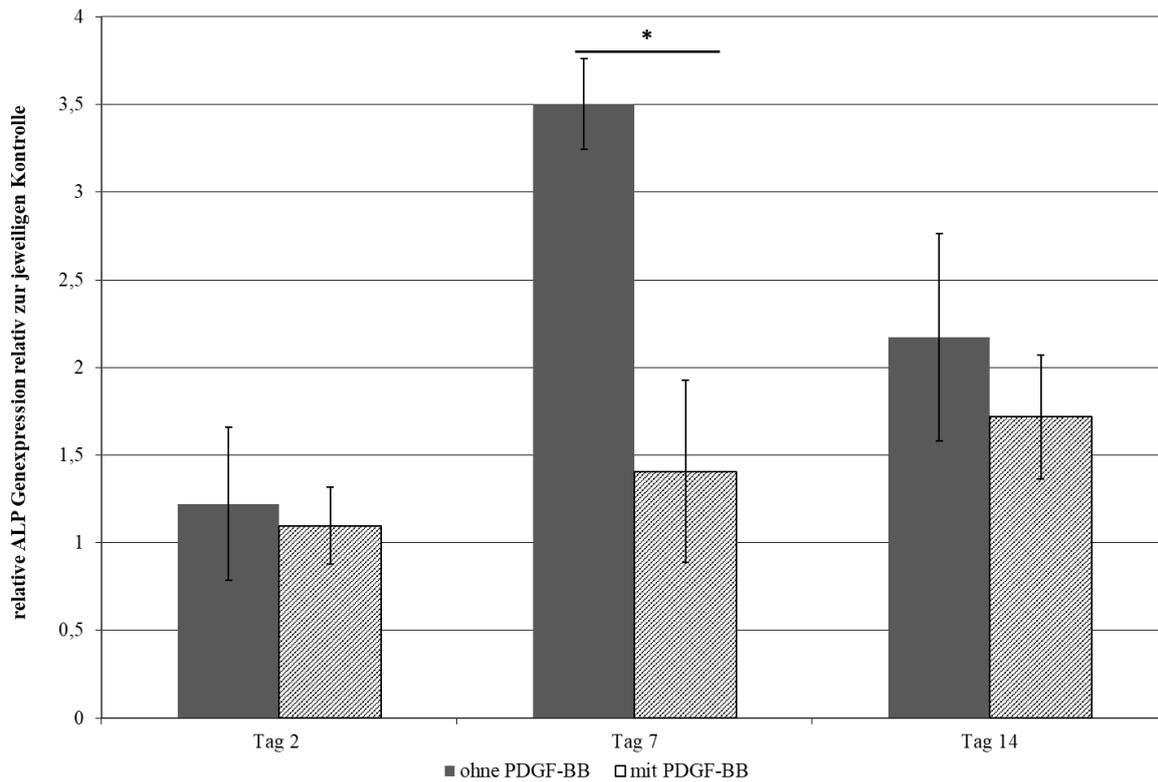


Abbildung 13: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von ALP zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Genexpression von ALP wurde relativ zur Expression von GAPDH dargestellt. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (* $p < 0,005$).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von COL1A1 sind in Abbildung 14 gezeigt. An Tag 2 und Tag 7 zeigte sich keine signifikante Veränderung der Genexpression von COL1A1 durch PDGF-BB. An Tag 14 wurde COL1A1 bei Zusatz von PDGF-BB signifikant mehr exprimiert ($p=0,0262$).

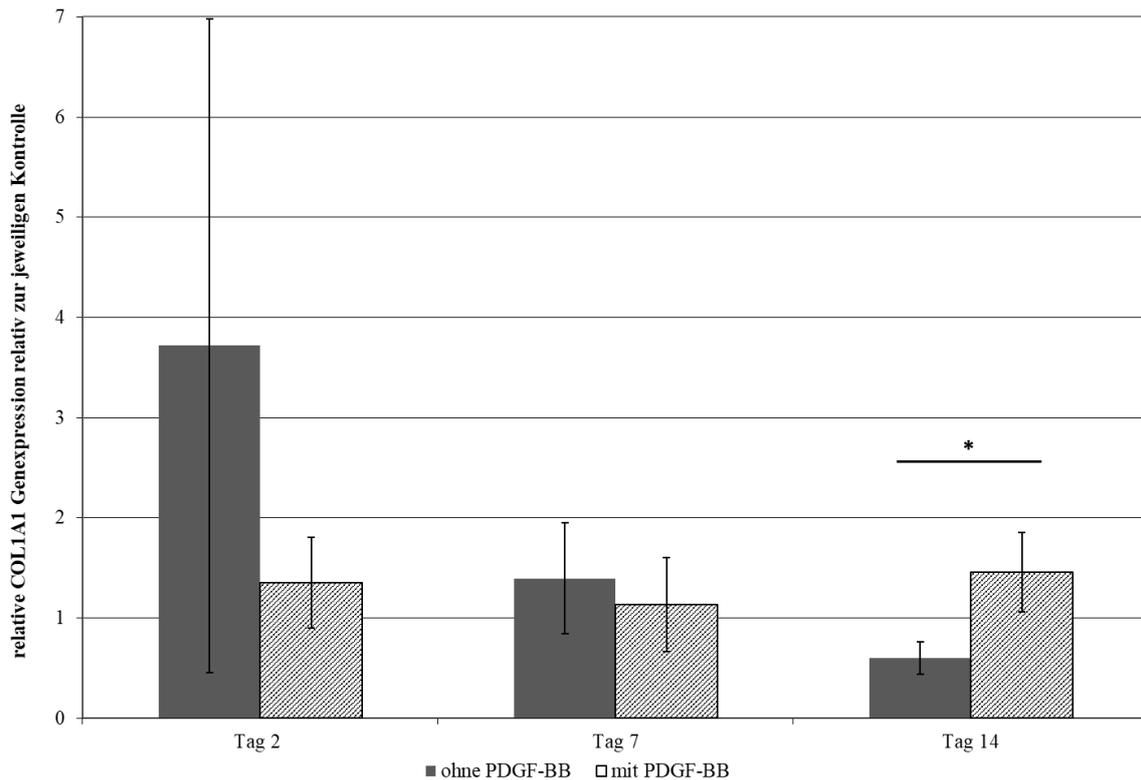


Abbildung 14: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von COL1A1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Expression von COL1A1 wurde in Relation zur Expression von GAPDH gesetzt. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (* $p < 0.05$).

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von IBSP. Es zeigte sich sowohl an Tag 2 als auch an Tag 7 und Tag 14 eine höhere Genexpression von IBSP unter Einfluss von PDGF-BB. Zu allen Zeitpunkten wurde in Anwesenheit von PDGF-BB mehr IBSP in der Differenzierung exprimiert als unter Kontrollbedingungen (relative Genexpression >1). Ohne Zusatz von PDGF-BB wurde unter Differenzierungsbedingungen weniger IBSP exprimiert als unter Kontrollbedingungen (relative Genexpression <1).

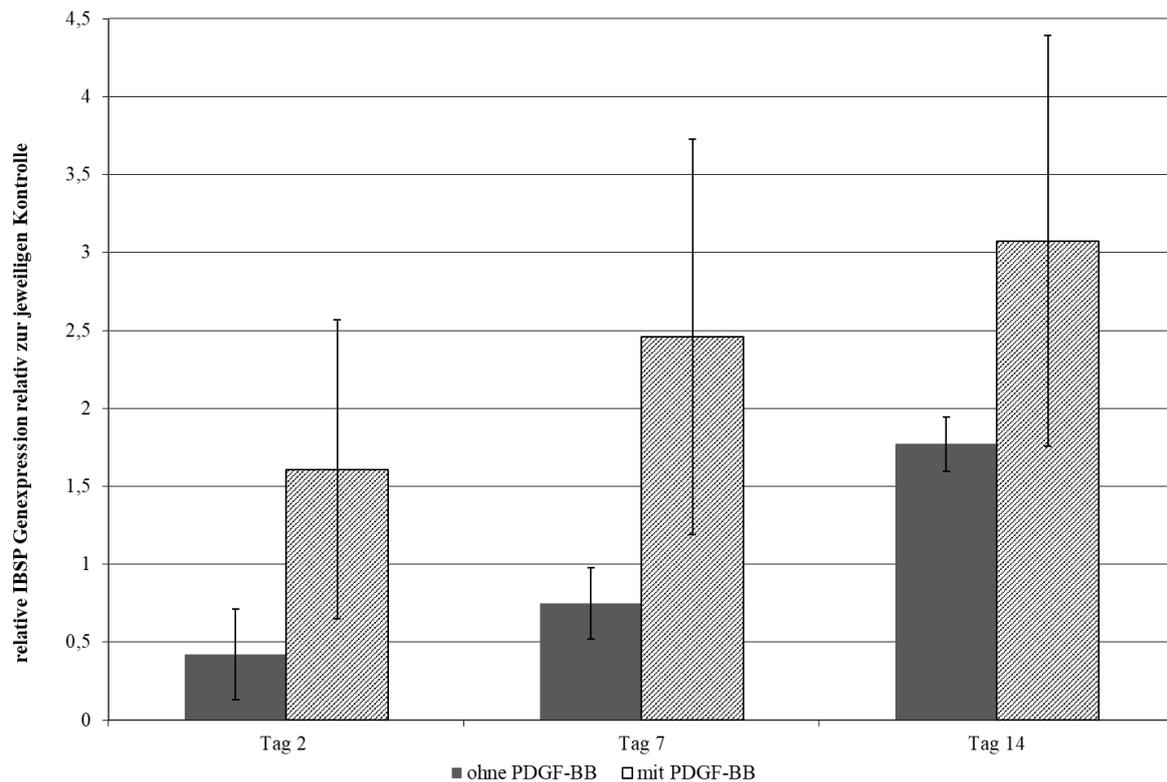


Abbildung 15: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von IBSP zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Expression des Zielgens wurde auf die Expression von GAPDH relativiert. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von SPARC sind in Abbildung 16 gezeigt. Es zeigte sich eine tendenziell verstärkte Expression von SPARC in Anwesenheit von PDGF-BB, allerdings keine signifikante Verstärkung. Mit fortschreitender Zeit zeigte sich bei den mit PDGF-BB behandelten Zellen eine Zunahme der Genexpression.

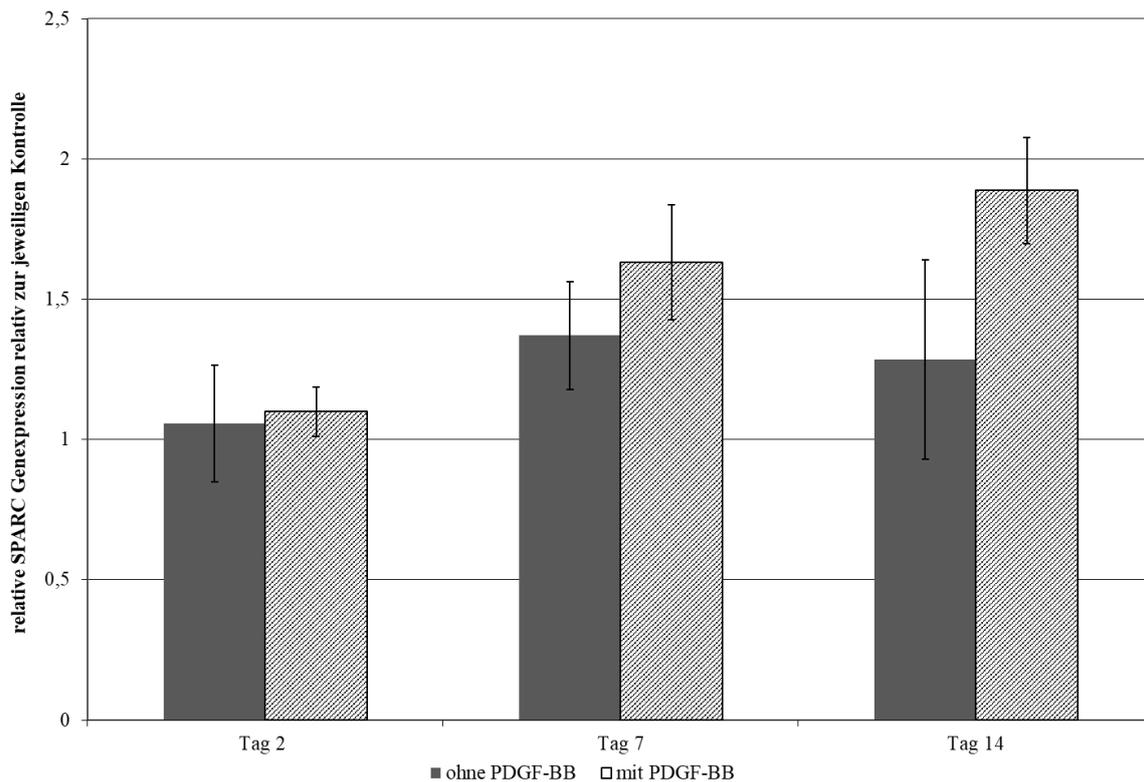


Abbildung 16: Ergebnis der Genexpressionsanalyse von SPARC zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Expression von SPARC wurde zur Expression von GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von SPP1. Insgesamt zeigte sich sowohl mit als auch ohne PDGF-BB eine Reduktion der Genexpression unter Differenzierungsbedingungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen (relative Genexpression <1). An Tag 2 war die Genexpression mit PDGF-BB signifikant höher als ohne den Wachstumsfaktor ($p=0.0256$).

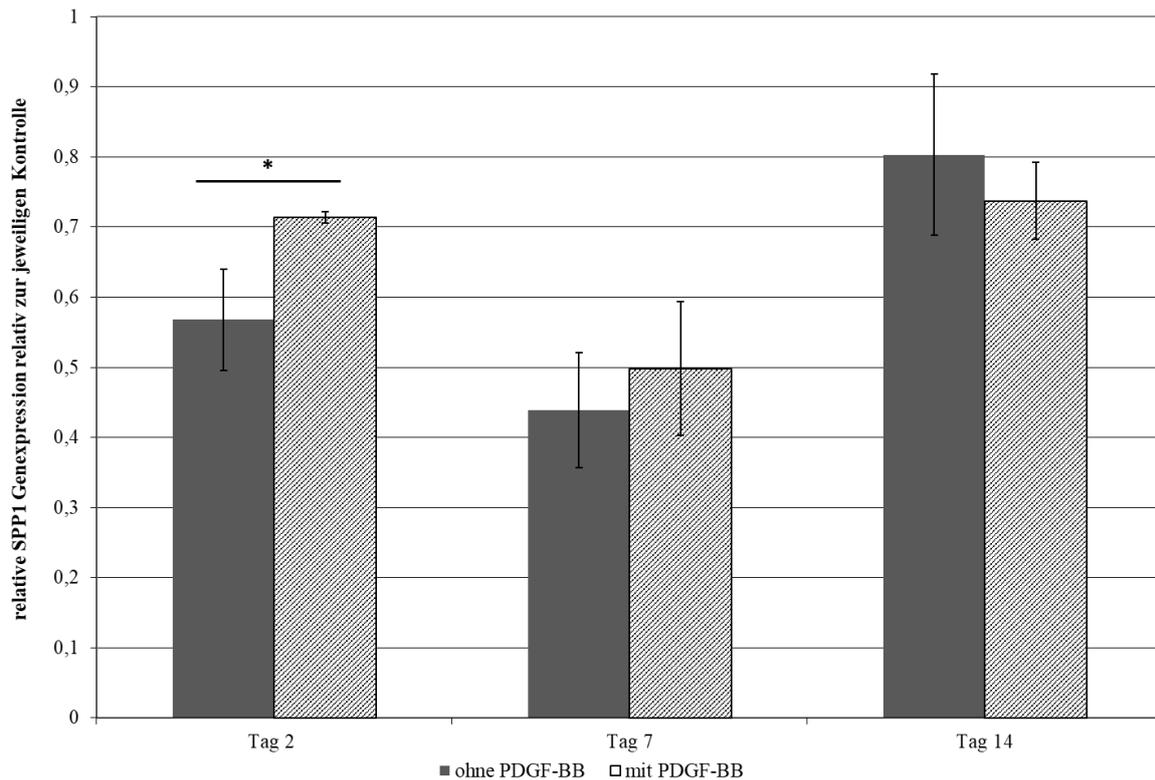


Abbildung 17: Ergebnis der Genexpressionsanalysen von SPP1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Genexpression des Zielgens SPP1 wurde in Relation zur Expression von GAPDH gesetzt. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte und ihre Standardabweichung (* $p < 0.05$).

Für das Gen BGLAP ließen sich nur für wenige Proben C_T -Werte ermitteln. Dabei lagen die ermittelten C_T -Werte jenseits von 40 Zyklen. Da keine Standardkurve ermittelt werden konnte, ließen sich die ermittelten C_T -Werte nicht rechnerisch auswerten.

Im Falle des Gens OSX ließen sich im gesamten Experiment lediglich für drei Proben C_T -Werte bestimmen, sodass ebenfalls keine statistische Auswertung durchgeführt werden konnte.

3.6. Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion der PDGF-BB-vermittelten Induktion der osteogenen Differenzierung in ASCs

Für jeden Inhibitor wurden zwei Platten mit Kontroll- und Differenzierungsmedium einmal mit und einmal ohne PDGF behandelt. Zwei Platten wurde ohne Inhibitor inkubiert; sie dienten als versuchsinterne Referenz unter Normalbedingungen. Die verwendeten Inhibitoren samt ihrer Zielstruktur und Endkonzentration sind in Tabelle 6 zu sehen.

Tabelle 6: Inhibitoren mit jeweiliger Zielstruktur und in den Experimenten verwendeter Endkonzentration

Name des Inhibitors	inhibierte Zielstruktur(en)	Endkonzentration Inhibitor
Tyrphostin AG 1296	PDGFR	10 μ M
UO126	MEK1 (MAP2K1), MEK2 (MAP2K2), ERK	10 μ M
MK-2206	PKB (Akt1/2/3), PI3K	10 μ M
SP600125	JNK (JNK1, JNK2, JNK3)	10 μ M
SB202190	p38 MAPK	10 μ M
SH454	STAT3, STAT5	10 μ M
LDN193189	BMP, ALK1, ALK2, ALK3, ALK6, TGF- β 1, Smad1, Smad5, Smad9	1 μ M

Während der Inkubation zeigten sich bei einigen Inhibitoren eine veränderte Morphologie der Zellen (Bilder nicht gezeigt). Nach der Inkubationsphase erfolgte die Auswertung mittels Alizarin-Rot-Färbung. Makroskopisch zeigte sich in allen Platten eine stärkere Rotfärbung unter Differenzierungsbedingungen als unter Kontrollbedingungen. In Hinblick auf den Effekt von PDGF-BB in einer Konzentration von 20 ng/ml zeigte sich in den beiden Platten ohne Inhibitor eine Zunahme der Rotfärbung unter Differenzierungsbedingungen durch Zugabe von PDGF-BB. Dies entsprach den zuvor in der Zeitkinetik beobachteten Ergebnissen. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich in keiner der Platten eine Veränderung. Der verstärkende Effekt von PDGF-BB auf die Rotfärbung zeigte sich makroskopisch auch in Anwesenheit von UO126 oder SH-4-54. Bei Zusatz von Tyrphostin AG-1296, MK2206, SP600125 und LDN193189 blieb dieser Effekt aus. Bei Zugabe von SB202190 verringerte sich die Rotfärbung der Differenzierung durch Zusatz von PDGF (siehe Abbildung 18).

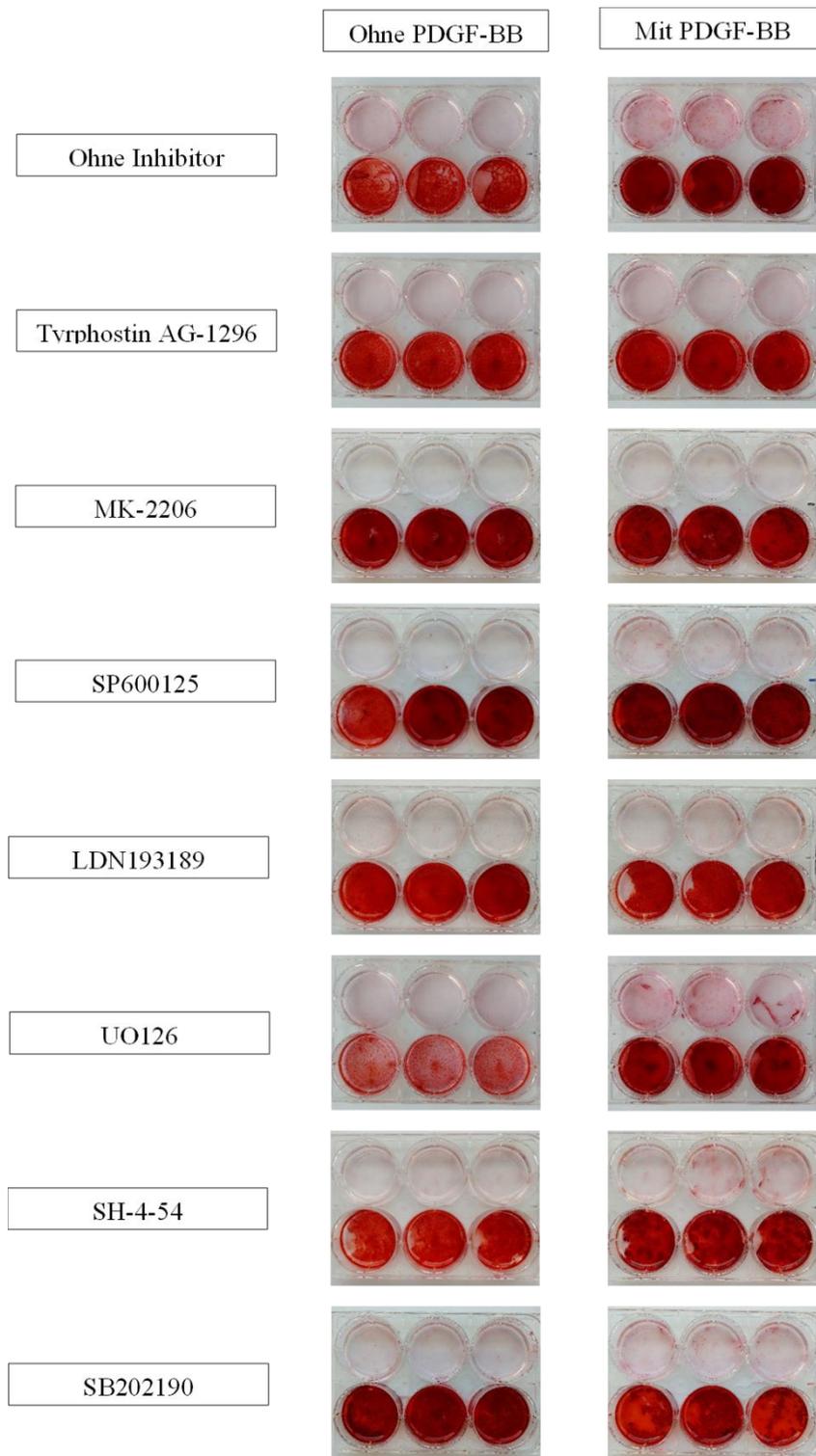


Abbildung 18: Makroskopische Aufnahmen der Platten nach Alizarin-Rot-Färbung nach 14-tägiger Inkubation mit und ohne 20 ng/ml PDGF-BB sowie mit verschiedenen zugesetzten Inhibitoren.

Bei anschließender Betrachtung der Platten in der Hellfeldmikroskopie zeigte sich, dass die *Wells* unter Differenzierungsbedingungen ausnahmslos stärker gefärbt waren als die *Wells* unter Kontrollbedingungen. Unter Kontrollbedingungen bewirkten weder die verschiedenen Inhibitoren noch der Zusatz von PDGF-BB einen Unterschied in der Intensität der Färbung. Unter

Differenzierungsbedingungen ohne Inhibitor bewirkte PDGF-BB eine Zunahme der Intensität der Färbung. Der Effekt von PDGF-BB blieb in Anwesenheit von UO126 und SH-4-54 bestehen, in Anwesenheit von Tyrphostin AG-1296 war der Effekt von PDGF-BB vermindert und durch MK2206, SP600125, LDN193189 und SB202190 blieb die PDGF-BB-vermittelte Zunahme der Rotfärbung aus (siehe Abbildung 19).

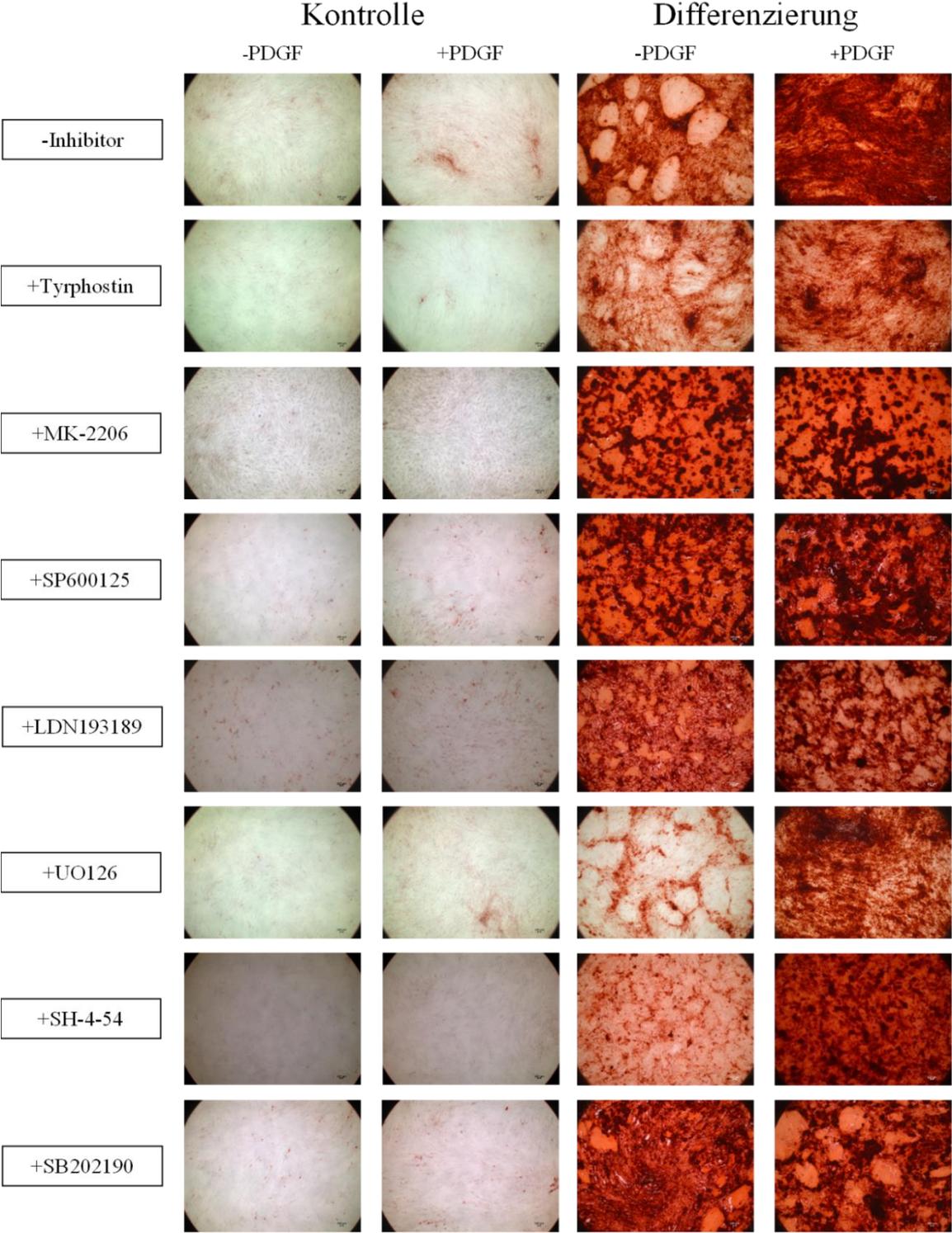


Abbildung 19: Mikroskopische Aufnahmen der Zellen nach Alizarin-Rot-Färbung in 25-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden in Kontroll- und Differenzierungsmedium für 14 Tage ohne und mit PDGF-BB in einer Konzentration von 20 ng/ml inkubiert. Dem Medium waren zusätzlich unterschiedliche Inhibitoren mit einer Konzentration von 10 μ M zugesetzt, lediglich LDN193189 wurde in einer niedrigeren Konzentration von 1 μ M zugesetzt. Es wurden jeweils repräsentative Ausschnitte gewählt und fotografiert.

In der Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung zeigte sich in sämtlichen Proben unter Differenzierungsbedingungen eine deutlich höhere Absorption als unter Kontrollbedingungen. Die absolute Intensität der Färbung unterschied sich je nach zugegebenem Inhibitor (Daten nicht gezeigt). Der Absorptionswert der Proben unter Differenzierungsbedingungen mit PDGF-BB wurde auf den Absorptionswert der Proben unter Differenzierungsbedingungen ohne PDGF-BB normiert, um den Effekt von PDGF-BB auf die Mineralisation während der osteogenen Differenzierung darzustellen. Der Effekt von PDGF-BB wurde in Anwesenheit jedes Inhibitors bestimmt. Der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den Effekt der PDGF-BB-induzierten Absorptionszunahme unter Differenzierungsbedingungen ist in Abbildung 20 zu sehen. Die Signifikanzen errechneten sich in Bezug zum Effekt von PDGF-BB ohne Inhibitor.

Ohne Zusatz von Inhibitoren zeigte sich eine PDGF-BB-bedingte Zunahme der Mineralisation um den Faktor 2. Bei Zusatz von Tyrphostin AG-1296 zeigte sich eine signifikante Abnahme der Mineralisation auf den Faktor 1,45 ($p=0,0057$). In Anwesenheit von MK-2206 zeigte sich eine signifikante Abnahme des Effekts auf einen Faktor von 1,01 ($p=0,0006$). Der Inhibitor SP600125 zeigte mit einem Faktor 0,99 ebenso eine signifikante Verminderung des Effekts von PDGF-BB ($p=0,0002$). LDN193189 bewirkte eine signifikante Reduktion der Mineralisation auf den Faktor 0,95 ($p=0,0001$). UO126 zeigte mit einer 6,44-fach erhöhten Mineralisation eine signifikante Zunahme des Effekts von PDGF-BB ($p<0,0029$). SH-4-54 zeigte mit einem Faktor von 1,65 eine signifikante Reduktion des Effekts von PDGF-BB auf die Absorption ($p=0,0359$). SB202190 zeigte mit einem Faktor von 0,73 ebenfalls eine reduzierte Mineralisation ($p=0,0002$).

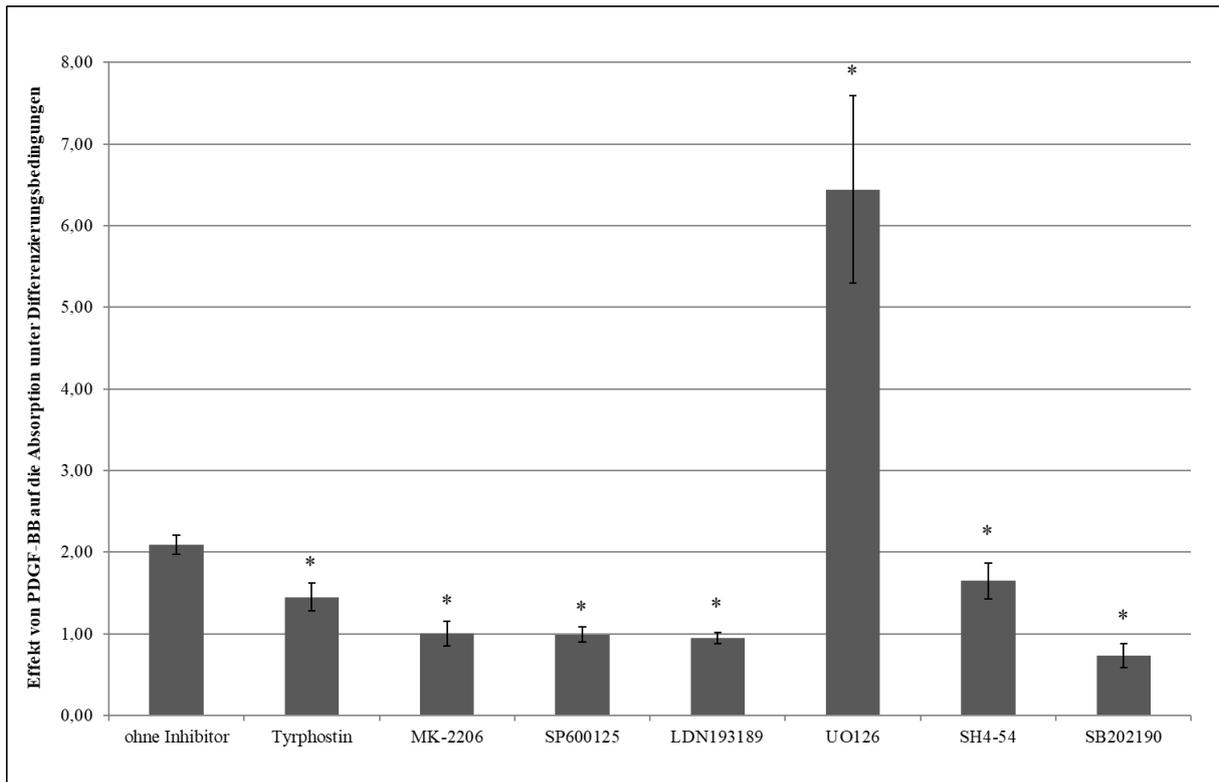


Abbildung 20: Effekt von PDGF-BB auf die Absorption unter Differenzierungsbedingungen. Zur Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung wurde die OD bei 410 nm gemessen. Für jeden Inhibitor wurde die Absorption unter Differenzierungsbedingungen mit PDGF-BB auf die Absorption unter Differenzierungsbedingungen ohne PDGF-BB relativiert, um den Effekt von PDGF-BB auf die Mineralisation während der osteogenen Differenzierung darzustellen. Die Signifikanz errechnet sich in Bezug zum Effekt von PDGF-BB ohne Inhibitor. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den Triplikaten mit Standardabweichungen (* $p < 0,05$).

4. Diskussion

Die Effekte von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung werden in der Wissenschaft kontrovers diskutiert. So gibt es Studien, die keinen, einen verstärkenden oder einen inhibierenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung belegen (152,159,160).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Wachstumsfaktors PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von aus dem Fettgewebe gewonnenen mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen. Dabei sollten die Konzentrationsabhängigkeit in Hinblick auf die Mineralisation, die Zeitkinetik der osteogenen Differenzierung unter PDGF-BB in Hinblick auf die Mineralisation sowie die Genexpression, sowie am Signalweg beteiligte Proteinkinasen ermittelt werden.

4.1. Durchflusszytometrie und verwendete Stammzellen

Zur Charakterisierung der in den Experimenten verwendeten Zellen wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Im Rahmen von Vorversuchen für die vorliegende Arbeit zeigte sich, dass die Zellen die Fähigkeit zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung aufwiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). In Zusammenschau der Ergebnisse der Durchflusszytometrie sowie in Anbetracht der Tatsache, dass die in den Versuchen verwendeten Zellen adhärent an Plastik wuchsen und sich osteogen, chondrogen und adipogen differenzieren ließen, erfüllen die verwendeten Zellen die Kriterien für multipotente mesenchymale Stammzellen gemäß *International Society for Cellular Therapy* (33) und zeigen alle Charakteristika für *human adipose-derived stem cells* (35). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich ASCs verwendet, da diese für die Zwecke des *Tissue Engineering* eine optimale Quelle darstellen, indem sie leicht und in großer Menge aus Fettgewebe bei erhaltener Differenzierungsfähigkeit gewonnen werden können (39).

Mehrere Arbeiten konnten bei Zugabe von PDGF-BB eine signifikant erhöhte Proliferation und eine Verstärkung der osteogenen Differenzierung in ASCs und in bMSCs zeigen (80,137,138). Gleichzeitig haben andere Autoren einen gegensätzlichen Effekt mit Hemmung der osteogenen Differenzierung oder gar keinen Effekt beobachtet (152,155,161,162). Gründe für die Heterogenität der Ergebnisse sind, dass die experimentellen Bedingungen, unter denen eine Verringerung oder ein Ausbleiben des Effekts auf die osteogene Differenzierung beobachtet wurden, nicht identisch waren. So unterschieden sich zwischen den Arbeitsgruppen die in den Experimenten verwendeten Zellen, die Protokolle zur Isolation, die Parameter zur Analyse der osteogenen Differenzierung und die Dynamik der Zugabe des Wachstumsfaktors. Eine

weitere Erklärung für die heterogene Datenlage ist, dass es eine natürliche Variabilität zwischen den Spendern in Hinblick auf Alter, Immunerkrankungen und weiteren Faktoren, die die Differenzierungsfähigkeit der Zellen selbst vermindern, gibt (163,164). Um der natürlichen biologischen Variabilität der Stammzellspender gerecht zu werden und den Einfluss der Variabilität auf die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zu minimieren, wurden alle Experimente mit der gleichen Zellpopulation, die Stammzellen dreier Spender enthielt, durchgeführt. Dadurch konnten interindividuelle Unterschiede ausgeglichen und somit eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Allgemeinheit erzielt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Aussagen über die Effekte von PDGF-BB auf ASCs können daher mit hoher Wahrscheinlichkeit generell auf ASCs unterschiedlicher humaner Spender übertragen werden.

4.2. Einfluss von PDGF-BB auf die Zellzahl

Im Rahmen seiner Beteiligung an zahlreichen Vorgängen in mesenchymalen Stammzellen zeigt PDGF-BB einen verstärkenden Effekt auf die Migration und die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen (150,165,166). Es wurde ein MTT-Assay durchgeführt, um den Einfluss von PDGF-BB auf die Zellzahl unter den in den Experimenten herrschenden Bedingungen zu bestimmen. Der von uns verwendete MTT-Assay erlaubt indirekt Rückschlüsse auf die Zellzahl, die direkt proportional zur im Versuch gemessenen Absorption ist (158). Aus den Ergebnissen des MTT-Assays konnte geschlossen werden, dass PDGF-BB unter den in den Experimenten verwendeten Kulturbedingungen keinen proliferativen Effekt auf ASCs hat. Der indirekte Rückschluss auf die Zellzahl im MTT-Assay zeigt, dass die Zellen unter Kontrollbedingungen stärker proliferieren als unter Differenzierungsbedingungen. Dieses Erkenntnis ist vereinbar mit der Hypothese von Aubin et al., wonach Stammzellen entweder vermehrt proliferieren oder sich differenzieren, weil die Proliferation bei sich differenzierenden Zellen sinkt (67). Eine Limitation des vorliegenden Experiments ist, dass die Zellzahl lediglich zu einem Zeitpunkt bestimmt wurde, so dass keine Aussage über den Verlauf der Zellzahlen zwischen Versuchsbeginn und Auswertungszeitpunkt getroffen werden kann. Dadurch können mögliche Schwankungen unter Einfluss des Wachstumsfaktors, die im Vergleich zu entsprechenden Bedingungen ohne PDGF-BB in einer am Auswertungszeitpunkt äquivalenten Zellzahl enden, nicht erfasst werden. In Anbetracht der Hypothese von Aubin et al. sind derartige Schwankungen jedoch nicht zu erwarten. Ein weiterer potentieller Einflussfaktor stellt eine mögliche Veränderung des Stoffwechsels der Zellen während des Differenzierungsvorgangs dar. Stammzellen verändern ihren Metabolismus wenn sie sich entwickeln oder differenzieren (167). Auch in humanen mesenchymalen Stammzellen finden multiple

Veränderungen im Metabolismus während der osteogenen Differenzierung statt (168). Unter der Voraussetzung, dass sich in den Experimenten Stoffwechselfvorgänge während der Differenzierung ändern, ist die Vergleichbarkeit zwischen Kontroll- und Differenzierungsbedingungen eingeschränkt. Eine erhaltene Vergleichbarkeit besteht jedoch innerhalb der Kontrollgruppen mit und ohne PDGF-BB oder innerhalb der Differenzierungsgruppen mit und ohne PDGF-BB. Somit bleibt die Aussagekraft bezüglich des Effektes von PDGF-BB auf Fettgewebstammzellen erhalten und man kann folgern, dass PDGF-BB auf ASCs unter Kontroll- und Differenzierungsbedingungen keinen signifikanten proliferativen Effekt hat. Phipps et al. zeigten in ihren Untersuchungen zur Adsorption und Freisetzung von PDGF-BB aus verschiedenen *Scaffoldmaterialien* ebenfalls, dass PDGF-BB keinen mitogenen Effekt hatte (129).

4.3. Osteogene Differenzierung in Abhängigkeit der Konzentration an PDGF-BB

In ASCs zeigt PDGF-BB einen verstärkenden Effekt auf die osteogene Differenzierung (160). Zur Ermittlung des Grades der osteogenen Differenzierung wurde als Parameter die Matrixmineralisation gewählt, da sie den Endpunkt der osteogenen Differenzierung darstellt. In den Experimenten, die zur Ermittlung der optimalen Dosis an PDGF-BB durchgeführt wurden, zeigten sich sowohl bei Bestimmung der Mineralisation mittels Alizarin-Rot-Färbung als auch bei Bestimmung der Calciumkonzentration deutliche Schwankungen in niedrigeren Konzentrationsbereichen von PDGF-BB bis 10 ng/ml. Mezawa et al. stellten einen maximalen Effekt von PDGF-BB auf die mRNA-Expression von Bone Sialoprotein in *Human osteoblast-like-Saos2-cells* bei einer PDGF-Konzentration von 5 ng/ml fest (133). In der Arbeit von Lennon et al. zeigte sich bei einer PDGF-BB-Konzentration von 10 ng/ml in Abhängigkeit von der Passage der verwendeten bmMSCs eine leichte Zunahme der osteogenen Differenzierung (169). Da sich in den Experimenten der vorliegenden Arbeit jedoch ab 20 ng/ml PDGF-BB eine stabile Zunahme der Mineralisation zeigte, wurde diese Konzentration für sämtliche Experimente gewählt. In den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wurde ebenfalls über einen maximalen Effekt von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierungsfähigkeit von ASCs in einer Konzentration von 20 ng/ml berichtet (136,160). Zhao et al. konnten ebenfalls eine dosisabhängige Verstärkung der osteogenen Differenzierung von bmMSCs einer diabetischen Ratte zeigen, wobei sich PDGF-BB in einer Konzentration von 50 ng/ml im Vergleich zur Konzentration von 10 ng/ml überlegen zeigt (131). In der vorliegenden Arbeit stagnierte der Effekt auf die Mineralisation der Zellen ab einer PDGF-Konzentration von etwa 50 ng/ml und es konnte keine weitere Verstärkung des Effekts durch höhere Konzentrationen an PDGF-BB erreicht werden.

Auf andere Zellen und andere Arten der Differenzierung, beispielsweise die Osteoklastogenese hat PDGF-BB ebenfalls einen dosisabhängigen Effekt (170). In weiteren Experimenten zeigt sich ein dosisabhängiger Effekt von PDGF-BB auf die Chemotaxis von mesenchymalen Progenitorzellen, der von 0,01 ng/ml nach 1 ng/ml ansteigt (130).

Da eine dosisabhängige Wirkung von PDGF-BB auf verschiedenste Zellen und Prozesse vorliegt, die jedoch nicht in allen Fällen proportional zur Konzentration an PDGF-BB zunimmt, ist es essentiell die optimale Konzentration des Wachstumsfaktors für jede Fragestellung in Abhängigkeit der Zellart und des zu untersuchenden Vorgangs vor Durchführung weiterer Untersuchungen zu bestimmen.

4.4. Zeitkinetik des Einflusses von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung

Nach Bestimmung der optimalen Konzentration des Wachstumsfaktors wurden weitere Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse der Alizarin-Rot-Färbung zur Analyse der Mineralisation der Extrazellulärmatrix zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigten, dass PDGF-BB die osteogene Differenzierung von ASCs im Differenzierungsmedium verstärkt, während es auf Zellen im Kontrollmedium keinen Einfluss hat. Eine mögliche Erklärung ist, dass PDGF-BB selbst einen direkten Signalweg auslöst, der zu verstärkter osteogener Differenzierung führt und dass Bestandteile des Differenzierungsmediums essentiell für eine Mineralisation der Extrazellulärmatrix durch die Zellen sind. Ein weiterer Ansatz ist, dass PDGF-BB die Mineralisation verstärkt, indem es das Ansprechen von ASCs auf osteogene Reize erhöht, sodass die regulären Signalkaskaden verstärkt ablaufen. Mit beiden Hypothesen lässt sich erklären, weshalb PDGF-BB unter Kontrollbedingungen keinen verstärkenden Effekt auf die Mineralisation hat (136). Der beobachteten Zunahme der osteogenen Differenzierung entsprechend konnte die vermehrte Mineralisation unter Einfluss von PDGF-BB bei ASCs bereits in anderen Studien gezeigt werden (80,136,160). Insgesamt existieren dennoch sehr heterogene Ergebnisse in Hinblick auf den Effekt von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung. Die Differenzierungsfähigkeit von ASCs zeigt ein besseres Ansprechen auf PDGF-BB als die von bmMSCs (160). Für bmMSCs konnten in verschiedenen Arbeiten eine Zunahme der osteogenen Differenzierung durch PDGF-BB (137), eine Inhibition (152,171) oder keine Einflussnahme auf die osteogene Differenzierung (159) beobachtet werden. Neben der verwendeten Zellart gibt es zahlreiche zusätzliche Einflussfaktoren. Für ASCs zeigten Rhagavendran et al. *in vivo* im 3D-Modell der Ratte in Abhängigkeit von bestimmten Gerüstmaterialien eine Zunahme der Genexpression osteogener Gene (154). Ein weiterer Einflussfaktor ist die Dynamik der Zugabe des Wachstumsfaktors, da eine Verstärkung bei kurzzeitiger

Gabe von PDGF-BB und eine Reduktion der osteogenen Differenzierung bei langzeitiger Gabe von PDGF-BB beschrieben wurde (138,155). Zudem zeigt sich in manchen Arbeiten kein Effekt von PDGF-BB *in vitro*, sondern erst eine Zunahme des relativen Knochenvolumens *in vivo* (161). Auch der PDGF-Rezeptor ist in die osteogene Differenzierung involviert (126,127). Wegen der zahlreichen Einflussfaktoren wurde in der vorliegenden Arbeit darauf geachtet, dass die Bedingungen in allen Experimenten möglichst identisch waren.

Im Verlauf des Experiments zeigte sich der größte Effekt des Wachstumsfaktors an Tag 14 und nicht am Ende des Experiments an Tag 21. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass PDGF-BB die Differenzierung beschleunigt, aber nicht den Endpunkt der Differenzierung verändert. Diese Hypothese wird durch Experimente gestützt, die zeigten, dass PDGF-BB die Kinetik der osteogenen Differenzierung verändert und für eine frühere Hochregulation der Gene sorgt (172). Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Methode der Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung bei zu großer Menge an Calciumdeposition nicht mehr geeignet ist, um Unterschiede sensitiv zu bestimmen, da Alizarin-Rot bei großer Menge an mineralisierter Matrix nicht mehr an sämtliches Calcium binden kann und somit nicht länger ein linearer Zusammenhang der Absorption und Mineralisation besteht.

Zusätzlich zur Bestimmung der Mineralisation als Parameter der osteogenen Differenzierung wurde die Genexpression von typischen osteogenen Markergenen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter Einfluss von PDGF-BB bestimmt. Je nach Inkubationsdauer bis zur RNA-Isolation wurden unterschiedliche Zellzahlen ausplattiert, da die Zellen bei längerer Inkubationsdauer länger proliferieren und die Gesamtmenge an isolierter RNA zum Isolationszeitpunkt über die verschiedenen Versuche möglichst ähnlich sein sollte.

In ASCs werden osteogene Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedlich stark exprimiert (52,173). Die drei in dieser Arbeit gewählten Zeitpunkte stellen nur einen Ausschnitt der Genexpression während der osteogenen Differenzierung dar.

In den Genexpressionsanalysen zeigten sich lediglich für COL1A1 an Tag 14 eine signifikant höhere Expression durch PDGF-BB. IBSP, SPARC und SPP1 zeigten lediglich eine Tendenz zur verstärkten Expression. Die verstärkte Expression dieser Gene passt zur beobachteten Zunahme der Mineralisation der Extrazellulärmatrix. Nicht alle verstärkt exprimierten Gene zeigten einen signifikanten Unterschied. Eine mögliche Ursache ist die geringe Anzahl an Proben und die daraus resultierenden großen Standardabweichungen.

OSF-2 zeigte keine Veränderung der Genexpression unter PDGF-BB und scheint damit nicht bedeutsam für die PDGF-BB-induzierte Verstärkung der osteogenen Differenzierung. SPP1 scheint ebenfalls nicht bedeutsam für die osteogene Differenzierung in ASCs, da es unter Differenzierungsbedingungen geringer exprimiert wurde als unter Kontrollbedingungen.

RUNX-2 und ALP wurden in Gegenwart von PDGF-BB an Tag 7 signifikant vermindert exprimiert. Auch andere Arbeiten stellten fest, dass PDGF-BB zwar die Calciumablagerung in der Extrazellulärmatrix signifikant erhöht, aber keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von RUNX-2, Osteocalcin oder Osteopontin hat (172). Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Mineralisation bei äquivalenter Expression oder sogar gleichzeitiger Reduktion der Genexpression dieser typischen osteogenen Markergene ist, dass PDGF-BB die Zeitkinetik der Genexpression dieser Gene verändert. Zudem ist denkbar, dass PDGF-BB den verstärkenden Effekt auf die Mineralisation auf posttranslationaler Ebene durch micro-RNAs bewirkt. Micro-RNAs sind an der Knochenbildung und Homöostase beteiligt und fördern oder blockieren die Differenzierung der Stammzellen in eine bestimmte Zellart oder regulieren wichtige Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise RUNX-2 (174). So reguliert miR-126 den PDGFR α und beeinflusst die Migration von humanen Osteoblasten, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation oder Differenzierung der humanen Osteoblasten (175). Zusätzlich interagiert miR126 in humanen Osteoblasten direkt mit dem CAMSAP1-Gen (176). Folglich erscheint eine Beteiligung anderer micro-RNAs an der Regulation der osteogenen Differenzierung wahrscheinlich.

Aus der Tatsache, dass bei BGLAP und OSX nur einzelne C_T-Werte ermittelt werden konnten, während für alle Proben anderer Gene zuverlässig C_T-Werte ermittelt werden konnten, kann geschlossen werden, dass sowohl BGLAP als auch OSX in den vorliegenden Zellen nur in sehr geringem Maße oder überhaupt nicht exprimiert werden. Die fehlende Expression von BGLAP kann als Folge der unzureichenden Expression von Osterix betrachtet werden, weil Osterix die Expression von BGLAP induziert (177). Da Osterix ein später Marker der osteogenen Differenzierung ist (68), besteht die Möglichkeit, dass er in den Versuchen im Differenzierungsstadium der ASCs zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht exprimiert wurde. Eine weitere Theorie besteht darin, dass die Zellen, die mit PDGF-BB behandelt wurden, bereits ausdifferenziert sind und daher nicht länger eine verstärkte Expression von Markern der Differenzierung erfolgt.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass PDGF-BB die osteogene Differenzierung in ASCs verstärkt und zu einer verstärkten Calciumablagerung in der Extrazellulärmatrix führt. Gleichzeitig zeigt PDGF-BB eine verminderte Genexpression einiger typischer Gene. Die verminderte Expression dieser Gene kann dabei eine Folge der verminderten Expression von RUNX-2 sein, da dies der Mastertranskriptionsfaktor der osteogenen Differenzierung ist (79). Eine Regulation des Effekts von PDGF-BB auf posttranslationaler Ebene erscheint wahrscheinlich.

4.5. Signaltransduktion von PDGF-BB in ASCs

Da der Effekt von PDGF-BB unter Tyrphostin AG1296 als selektivem und hochpotentem Inhibitor der PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (178,179) nicht vollständig aufgehoben werden konnte, kann daraus geschlossen werden, dass der Inhibitor einem kompetitiven Hemmmechanismus am Rezeptor unterliegt. Dennoch zeigte sich in Anwesenheit von Tyrphostin AG1296 eine signifikante Reduktion des Effektes von PDGF-BB auf die Mineralisation, woraus geschlossen werden kann, dass der PDGF-Rezeptor an der Vermittlung der osteogenen Differenzierung durch PDGF-BB beteiligt ist.

MK 2206 ist ein allosterischer Inhibitor von allen drei Isoformen der Proteinkinase B (180). Von der Proteinkinase B, die auch Akt genannt wird, existieren die drei Isoformen Akt-1, Akt-2 und Akt-3 (181). Akt ist Bestandteil des PI3-Kinase Signalwegs (182) und kann von PDGF aktiviert werden (183). In Anwesenheit von MK-2206 hatte PDGF-BB in den Experimenten keinen verstärkenden Effekt auf die osteogene Differenzierung. Somit ist der PI3-Kinase Signalweg durch Akt an der Signaltransduktion von PDGF-BB beteiligt. Auch in anderen Arbeiten bewirkte eine Inhibition der PI3-Kinase, die Akt übergeordnet ist, ein Ausbleiben der osteogenen Differenzierung (161).

SP600125 ist ein Inhibitor aller Isoformen der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), die Bestandteil der Familie der MAP-Kinasen ist (184,185). In den Experimenten dieser Arbeit bewirkt eine Inhibition der c-Jun-N-terminalen Kinase durch SP600125 ein Ausbleiben des Effekts von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung, sodass JNK in der Signalkaskade, die durch PDGF-BB ausgelöst wird, involviert sein muss. Laut Lopez-Isalca et al. vermittelt PDGF in der Fibroblasten-ähnlichen Zelllinie COS-7 die Aktivierung der c-Jun-N-terminalen-Kinase über den PI3-Kinase-Pathway (186). Diese Erkenntnis und die Tatsache, dass die Inhibition von Akt-1, Akt-2 und Akt-3 dieselben Charakteristika bezüglich des Einflusses auf die Mineralisation wie eine Inhibition der c-Jun-N-terminalen Kinase zeigt, führt zu der Hypothese, dass die Wirkung von PDGF-BB auf die JNK und auf Akt miteinander in Verbindung stehen und der PI3-Kinase-Signalweg eine wichtige Rolle in der osteogenen Differenzierung von ASCs spielt.

LDN193189 als potenter Inhibitor von ALK1, ALK2 und ALK3 als Bestandteilen des BMP-Signalwegs (187,188) bewirkt ebenfalls ein Ausbleiben des Effekts von PDGF-BB. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von ALK2 und ALK3 *in vitro* zu einer verminderten BMP-induzierten osteoblastären Differenzierung und *in vivo* zu einer reduzierten ossären Mineralisation führt (189). Zudem spielen ALK1 und ALK2 eine wichtige Rolle bei der BMP-9-vermittelten Induktion der osteogenen Differenzierung in MSCs (190). In Zusammenschau mit den von uns beobachteten Ergebnissen zeigt sich, dass ALK1, ALK2 und ALK3 an der PDGF-BB-vermittelten Zunahme der Mineralisation beteiligt sind. Mögliche Mechanismen sind eine direkte Wirkung von PDGF-BB auf ALK1, ALK2 und ALK3, eine Erhöhung der Expression von BMP oder eine Verstärkung des Signalwegs bei gleicher Menge an BMP.

Bei UO126 handelt es sich um einen nicht-kompetitiven selektiven Inhibitor von MEK-1 und MEK-2, die Bestandteil des MAP-Kinase-Pathways sind (191). Gemäß den Ergebnissen der Analyse der Mineralisation nach Inhibition von MEK-1 und MEK-2 sind diese nicht an der PDGF-spezifischen Antwort der Zellen beteiligt. MEK1 und MEK2 aktivieren die Kinasen ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierung (192). ERK 1 und ERK 2 wiederum sind essentiell für die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und inhibieren die chondrogene Differenzierung, zudem konnte im Mausmodell *in vivo* gezeigt werden, dass eine aktivierende Mutation von MEK 1 für vermehrte Knochenbildung sorgt (177). Dem entgegen stehen die Beobachtung von Kratchmarova et al., dass bei Zugabe von UO126 in einer Konzentration von 10 µm die osteogene Differenzierung in humanen MSCs in Gegenwart von PDGF-BB vollständig verhindert wird (161).

SH-4-54 ist ein potenter STAT3 und STAT5-Inhibitor (193). In den Experimenten verringerte sich durch Zugabe von SH-4-54 der PDGF-BB-induzierte Mineralisationsanstieg signifikant, wurde jedoch nicht komplett ausgelöscht. Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass STAT an der Vermittlung der osteogenen Differenzierung durch PDGF-BB beteiligt ist und dass der Inhibitor eine kompetitive Hemmung bewirkt. Auch andere Arbeiten zeigten, dass eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs essentiell für die durch Cytokine beeinflusste Differenzierung von Osteoblasten ist (194). Zudem besteht eine Beteiligung des JAK-STAT-Signalwegs an der Regulation der Knochenbildung (195,196). STAT3 ist dabei besonders relevant für den Signalweg in Osteoblasten und Osteoklasten (195). Auch STAT5b ist an der Vermittlung der Wachstumshormon-induzierten osteogenen Differenzierung von MSCs beteiligt und verstärkt den Effekt von anderen Wachstumsfaktoren wie BMP-7 und IGF-1 (197,198).

Die Kinase p38 gehört ebenso wie ERK-1 und ERK-2 und JNK zur Familie der MAP-Kinasen (184). SB202190 bindet an die p38-MAP-Kinase und inhibiert diese ATP-kompetitiv (199,200). Bei Zugabe von SB202190 zeigte sich in unseren Experimenten eine Reduktion des Effektes von PDGF-BB. Die p38-MAP-Kinase muss daher auch an der Vermittlung der PDGF-BB-spezifischen Differenzierung involviert sein. In anderen Arbeiten zeigte sich, dass der Inhibitor SB202190 eine Aktivierung der JNK verursacht (201). Im Gegensatz dazu stellten andere Arbeitsgruppen bei ihrer Spezifitätsanalyse des Inhibitors fest, dass SB202190 einen unspezifischen inhibitorischen Effekt auf JNK und Akt hat, der allerdings deutlich schwächer ausgeprägt ist als der inhibitorische Effekt auf p38-MAPK (202).

Zusammenfassend zeigte sich, dass an der Signaltransduktion der durch PDGF-BB induzierten osteogenen Differenzierung zahlreiche Proteinkinasen und Signalwege beteiligt sind, darunter der PDGF-Rezeptor, PKB, JNK, ALK, STAT und p38-MAPK. MEK hingegen ist nicht an der Signaltransduktion des Effektes von PDGF-BB beteiligt.

4.6. Ausblick

Die Differenzierung von ASCs lässt sich durch Wachstumsfaktoren beeinflussen (62). Dabei verstärkt PDGF-BB in ASCs die osteogene Differenzierung spezifisch (160). Eine Verstärkung und Beschleunigung der osteogenen Differenzierung ist eine gute Möglichkeit, um die Anwendung des Tissue Engineerings in der Knochenregeneration und Knochenersatztherapie zu verbessern. Insbesondere im Gebiet des *4D-Bioprintings* würde eine schnellere Mineralisation des gedruckten Konstrukts beim Einsatz *in vivo* zu einer früheren Stabilität des Konstrukts bei Einheilung führen und somit beispielsweise eine frühere Belastung ermöglichen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigten, dass der positive Effekt auf die osteogene Differenzierung von ASCs reproduzierbar ist. Die Identifizierung weiterer PDGF-BB-spezifischer Zielgene mittels Microarray und eine detailliertere Betrachtung der intrazellulären Vorgänge beispielsweise mittels *Western Blot* können weitere Ansätze zur Verbesserung der osteogenen Differenzierung liefern. Um ein detaillierteres Verständnis der Dynamik der Genexpression zu entwickeln, kann eine Genexpressionsanalyse zu multiplen Zeitpunkten mit kurzen Zeitabständen durchgeführt werden. Eine Analyse verschiedener micro-RNAs unter Einfluss von PDGF-BB könnte Aufschluss über weitere Regulationsmechanismen liefern. Weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der osteogenen Differenzierung können Experimente liefern, die die Effekte der Kombination von verschiedenen Wachstumsfaktoren prüfen.

Für die Zukunft sollte eine Evaluation des Effekts von PDGF-BB *in vitro* im 3D-Modell auf die osteogene Differenzierung erfolgen. Andere Arbeiten zeigten, dass sowohl die Genexpression von typischen osteogenen Genen als auch die Mineralisation im 3D-Modell im Vergleich zum 2D-Modell erhöht ist (52). PCL-basierte Scaffolds verbessern die Anhaftung, Proliferation und osteogene Differenzierungsfähigkeit *in vitro* (53). Von besonderem Interesse ist dabei, ob der Effekt der 3D-Anordnung und die Interaktion mit Gerüstmaterialien den Effekt von PDGF-BB potenzieren können. Bei einer bereits beschriebenen Kopplung von Osteogenese und Angiogenese sollte in weiteren Schritten die Analyse des Effekts von PDGF-BB im 3D-Modell *in vivo* erfolgen, um zu bestimmen, ob der PDGF-BB-Effekt bestehen bleibt und durch Kopplung von Osteogenese und Angiogenese eine bessere Knochenbildung bedingt (93,148). Zudem kann durch Experimente *in vivo* evaluiert werden, ob der Zusatz des Wachstumsfaktors zu lokalen oder systemischen Veränderungen in Geweben des Empfängers oder zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen führt. Eine kontinuierliche Freisetzung von PDGF-BB bei Experimenten *in vivo* könnte mittels kontinuierlicher Abgabe des Wachstumsfaktors aus einem Drug-Release-System erfolgen (203).

Die Erkenntnis, dass PDGF-BB die osteogene Differenzierung in ASCs verstärken kann, führt somit zu einer Vielzahl neuer Möglichkeiten und ermöglicht neue Ansätze auf dem Gebiet des Tissue Engineerings. Insbesondere in der Regeneration und Ersatztherapie von Knochengewebe bieten sich dadurch zahlreiche Chancen für Optimierungen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von aus dem Fettgewebe gewonnenen Stammzellen zu untersuchen und genauer zu charakterisieren. Dazu wurde die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts untersucht. Zudem wurde der Effekt im Verlauf einer 21-tägigen Inkubation in Hinblick auf die Mineralisation der Extrazellulärmatrix mittels Alizarin-Rot-Färbung und Ermittlung der Calciumkonzentration bestimmt und die Änderung der Genexpression wurde im Zeitverlauf über 14 Tage hinweg beurteilt. Außerdem wurden an der Signaltransduktion beteiligte Proteinkinasen ermittelt.

Es zeigte sich sowohl in der Alizarin-Rot-Färbung als auch bei Bestimmung der Calciumkonzentration, dass PDGF-BB einen fördernden Effekt auf die Mineralisation von mesenchymalen Stammzellen hat. Der Effekt nahm mit zunehmender Konzentration von PDGF-BB zu, aber saturierte im Bereich zwischen 20 und 50 ng/ml. Gleichzeitig konnte innerhalb der 14-tägigen Inkubationsdauer eine verminderte Expression typischer Gene wie RUNX-2 und ALP, eine unveränderte Expression von OSF-2, IBSP, SPARC und SPP1 und eine verstärkte Expression von COL1A1 beobachtet werden. Je nach analysiertem Gen zeigte die PDGF-BB-induzierte Expression eine unterschiedliche Dynamik innerhalb des 14-tägigen Analysezeitraumes. Durch Zugabe von Inhibitoren verschiedener Proteinkinasen und Evaluation ihres Einflusses auf die Mineralisation mittels Alizarin-Rot-Färbung konnte ihre Beteiligung an der Signaltransduktion von PDGF-BB bestimmt werden. Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich, dass sowohl PDGFR, JNK, STAT3/5, ALK2/3 und p38-MAPK als auch der PI3-K/Akt-Signalweg an der Signaltransduktion der osteogenen Differenzierung beteiligt sind, während MEK1 und MEK2 als Bestandteile des MAP-Kinase-Signalwegs keinen Einfluss auf die Signaltransduktion von PDGF-BB zur Verstärkung der osteogenen Differenzierung haben.

Abschließend stellt PDGF-BB mit seiner differenzierungsfördernden Wirkung einen vielversprechenden Ansatz im Tissue Engineering dar. Eine weitere Evaluation des Effekts und möglicher Interaktionen sollte *in vitro* und *in vivo* erfolgen.

6. Literaturverzeichnis

1. GBD 2019 Demographics Collaborators (2020). Global age-sex-specific fertility, mortality, healthy life expectancy (HALE), and population estimates in 204 countries and territories, 1950-2019: a comprehensive demographic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)*, 396(10258), 1160–1203. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30977-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30977-6)
2. Vollset, S. E., Goren, E., Yuan, C. W., Cao, J., Smith, A. E., Hsiao, T., Bisignano, C., Azhar, G. S., Castro, E., Chalek, J., Dolgert, A. J., Frank, T., Fukutaki, K., Hay, S. I., Lozano, R., Mokdad, A. H., Nandakumar, V., Pierce, M., Pletcher, M., Robalik, T., Steuben, K. M., Wunrow, H. Y., Zlavog, B. S., Murray, C. J. L. (2020). Fertility, mortality, migration, and population scenarios for 195 countries and territories from 2017 to 2100: a forecasting analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet (London, England)*, 396(10258), 1285–1306. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30677-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30677-2).
3. Ageing and health [Internet]. [zitiert 28. September 2022]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
4. Li, Z., Zhang, Z., Ren, Y., Wang, Y., Fang, J., Yue, H., Ma, S., & Guan, F. (2021). Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology*, 22(2), 165–187. <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09910-5>
5. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)*, 396(10258), 1204–1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
6. Ensrud K. E. (2013). Epidemiology of fracture risk with advancing age. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 68(10), 1236–1242. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt092>
7. Meyer, R. A., Jr, Tsahakis, P. J., Martin, D. F., Banks, D. M., Harrow, M. E., & Kiebzak, G. M. (2001). Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 19(3), 428–435. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(00\)90034-2](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(00)90034-2)
8. Skak, S. V., & Jensen, T. T. (1988). Femoral shaft fracture in 265 children. Log-normal correlation with age of speed of healing. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 59(6), 704–707. <https://doi.org/10.3109/17453678809149430>
9. Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*, (205), 299–308.
10. Keating, J. F., Simpson, A. H., & Robinson, C. M. (2005). The management of fractures with bone loss. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 87(2), 142–150. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.87b2.15874>

11. Liu, Y., Wu, G., & de Groot, K. (2010). Biomimetic coatings for bone tissue engineering of critical-sized defects. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7 Suppl 5(Suppl 5), S631–S647. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0115.focus>
12. Nauth, A., Schemitsch, E., Norris, B., Nollin, Z., & Watson, J. T. (2018). Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment?. *Journal of orthopaedic trauma*, 32 Suppl 1, S7–S11. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001115>
13. Liu, T., Wu, G., Gu, Z., Wismeijer, D., & Liu, Y. (2014). A critical-sized bone defect. *Bone*, 68, 163–164. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.016>
14. Schemitsch E. H. (2017). Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!. *Journal of orthopaedic trauma*, 31 Suppl 5, S20–S22. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000000978>
15. Taylor, G. I., Miller, G. D., & Ham, F. J. (1975). The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plastic and reconstructive surgery*, 55(5), 533–544. <https://doi.org/10.1097/00006534-197505000-00002>
16. Kurien, T., Pearson, R. G., & Scammell, B. E. (2013). Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice: the evidence for their use. *The bone & joint journal*, 95-B(5), 583–597. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.95B5.30286>
17. Wang, W., & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive materials*, 2(4), 224–247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
18. Valtanen, R. S., Yang, Y. P., Gurtner, G. C., Maloney, W. J., & Lowenberg, D. W. (2021). Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future?. *Injury*, 52 Suppl 2, S72–S77. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.07.040>
19. Skalak, R., & Fox, C.F. (1988). Tissue engineering : proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988.
20. Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
21. Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
22. Langer, R., & Vacanti, J. (2016). Advances in tissue engineering. *Journal of pediatric surgery*, 51(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022>
23. Simunovic, F., & Finkenzeller, G. (2021). Vascularization Strategies in Bone Tissue Engineering. *Cells*, 10(7), 1749. <https://doi.org/10.3390/cells10071749>
24. Dey, M., & Ozbolat, I. T. (2020). 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Scientific reports*, 10(1), 14023. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70086-y>

25. Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology advances*, *34*(4), 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
26. Wan, Z., Zhang, P., Liu, Y., Lv, L., & Zhou, Y. (2020). Four-dimensional bioprinting: Current developments and applications in bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, *101*, 26–42. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.10.038>
27. Rukavina, P., Koch, F., Wehrle, M., Tröndle, K., Björn Stark, G., Koltay, P., Zimmermann, S., Zengerle, R., Lampert, F., Strassburg, S., Finkenzeller, G., & Simunovic, F. (2020). In vivo evaluation of bioprinted prevascularized bone tissue. *Biotechnology and bioengineering*, *117*(12), 3902–3911. <https://doi.org/10.1002/bit.27527>
28. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., & Verfaillie, C. M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, *418*(6893), 41–49. <https://doi.org/10.1038/nature00870>
29. Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, *8*(8), 886. <https://doi.org/10.3390/cells8080886>
30. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, *3*(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
31. Wehrle, M., Koch, F., Zimmermann, S., Koltay, P., Zengerle, R., Stark, G.B., Strassburg, S., & Finkenzeller, G. (2019). Examination of Hydrogels and Mesenchymal Stem Cell Sources for Bioprinting of Artificial Osteogenic Tissues. *Cellular and Molecular Bioengineering*, *12*, 583 - 597.
32. Beane, O. S., & Darling, E. M. (2012). Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Annals of biomedical engineering*, *40*(10), 2079–2097. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0639-8>
33. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.j, & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
34. Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, *13*(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>
35. Gaiba, S., França, L. P., França, J. P., & Ferreira, L. M. (2012). Characterization of human adipose-derived stem cells. *Acta cirurgica brasileira*, *27*(7), 471–476. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502012000700007>

36. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
37. Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, *15*(6), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
38. Torio-Padron, N., Huotari, A. M., Eisenhardt, S. U., Borges, J., & Stark, G. B. (2010). Comparison of pre-adipocyte yield, growth and differentiation characteristics from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells, tissues, organs*, *191*(5), 365–371. <https://doi.org/10.1159/000276594>
39. Kolaparthi, L. K., Sanivarapu, S., Moogla, S., & Kutcham, R. S. (2015). Adipose Tissue - Adequate, Accessible Regenerative Material. *International journal of stem cells*, *8*(2), 121–127. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2015.8.2.121>
40. Dmitrieva, R. I., Minullina, I. R., Bilibina, A. A., Tarasova, O. V., Anisimov, S. V., & Zaritskey, A. Y. (2012). Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *11*(2), 377–383. <https://doi.org/10.4161/cc.11.2.18858>
41. Hernigou, P., Homma, Y., Flouzat Lachaniette, C. H., Poignard, A., Allain, J., Chevallier, N., & Rouard, H. (2013). Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells. *International orthopaedics*, *37*(11), 2279–2287. <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2017-z>
42. Shanti, R. M., Li, W. J., Nesti, L. J., Wang, X., & Tuan, R. S. (2007). Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, *65*(8), 1640–1647. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.04.008>
43. Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, *64*(2), 295–312.
44. Zhang, X., Yang, M., Lin, L., Chen, P., Ma, K. T., Zhou, C. Y., & Ao, Y. F. (2006). Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose--derived stem cells in vitro and in vivo. *Calcified tissue international*, *79*(3), 169–178. <https://doi.org/10.1007/s00223-006-0083-6>
45. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *24*(5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>

46. Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X., & Cui, Z. (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochemistry and function*, 26(6), 664–675. <https://doi.org/10.1002/cbf.1488>
47. De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., Drago, J. L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., & Hedrick, M. H. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells, tissues, organs*, 174(3), 101–109. <https://doi.org/10.1159/000071150>
48. De Ugarte, D. A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M. H., & Fraser, J. K. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology letters*, 89(2-3), 267–270. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(03\)00108-1](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(03)00108-1)
49. Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S. A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., & Idris, S. B. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>
50. Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Fraser, J. K., & Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio journal of medicine*, 54(3), 132–141. <https://doi.org/10.2302/kjm.54.132>
51. Correia, C., Grayson, W., Eton, R., Gimble, J. M., Sousa, R. A., Reis, R. L., & Vunjak-Novakovic, G. (2014). Human adipose-derived cells can serve as a single-cell source for the in vitro cultivation of vascularized bone grafts. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 8(8), 629–639. <https://doi.org/10.1002/term.1564>
52. Rumiński, S., Ostrowska, B., Jaroszewicz, J., Skirecki, T., Włodarski, K., Świążkowski, W., & Lewandowska-Szumieł, M. (2018). Three-dimensional printed polycaprolactone-based scaffolds provide an advantageous environment for osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(1), e473–e485. <https://doi.org/10.1002/term.231053>. Osathanon, T., Chuenjitkuntaworn, B., Nowwarote, N., Supaphol, P., Sastravaha, P., Subbalekha, K., & Pavasant, P. The responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells on polycaprolactone-based scaffolds: an in vitro study. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11, 239 - 246.
54. Baraniak, P. R., & McDevitt, T. C. (2010). Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*, 5(1), 121–143. <https://doi.org/10.2217/rme.09.74>
55. Lee, C. S., Burnsed, O. A., Raghuram, V., Kalisvaart, J., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2012). Adipose stem cells can secrete angiogenic factors that inhibit hyaline cartilage regeneration. *Stem cell research & therapy*, 3(4), 35. <https://doi.org/10.1186/scrt126>
56. Lee, C. S., Nicolini, A. M., Watkins, E. A., Burnsed, O. A., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2014). Adipose stem cell microbeads as production sources for chondrogenic growth factors. *Journal of stem cells & regenerative medicine*, 10(2), 38–48. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1002007>

57. Nie, C., Yang, D., & Morris, S. F. (2009). Local delivery of adipose-derived stem cells via acellular dermal matrix as a scaffold: a new promising strategy to accelerate wound healing. *Medical hypotheses*, 72(6), 679–682. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.10.033>
58. Nambu, M., Kishimoto, S., Nakamura, S., Mizuno, H., Yanagibayashi, S., Yamamoto, N., Azuma, R., Nakamura, S., Kiyosawa, T., Ishihara, M., & Kanatani, Y. (2009). Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Annals of plastic surgery*, 62(3), 317–321. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31817f01b6>
59. Kilroy, G. E., Foster, S. J., Wu, X., Ruiz, J., Sherwood, S., Heifetz, A., Ludlow, J. W., Stricker, D. M., Potiny, S., Green, P., Halvorsen, Y. D., Cheatham, B., Storms, R. W., & Gimble, J. M. (2007). Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of cellular physiology*, 212(3), 702–709. <https://doi.org/10.1002/jcp.21068>
60. Zaragosi, L. E., Ailhaud, G., & Dani, C. (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(11), 2412–2419. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0006>
61. Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., Pell, C. L., Johnstone, B. H., Considine, R. V., & March, K. L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109(10), 1292–1298. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1>
62. Gimble, J., & Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5(5), 362–369. <https://doi.org/10.1080/14653240310003026>
63. Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T., Zhang, X., Xu, C., Zhang, L., Yang, H., Hou, J., Wang, Y., & Shi, Y. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?. *Cell death and differentiation*, 23(7), 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>
64. Kikuchi M. (2013). Hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 36(11), 1666–1669. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00460>
65. Lüllmann-Rauch R. Histologie: Verstehen, Lernen, Nachschlagen ; 10 Tabellen. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003. 552 S.
66. Janicki, P., & Schmidmaier, G. (2011). What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, 42 Suppl 2, S77–S81. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.014>
67. Aubin J. E. (2001). Regulation of osteoblast formation and function. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 2(1), 81–94. <https://doi.org/10.1023/a:1010011209064>
68. Chan, W. C. W., Tan, Z., To, M. K. T., & Chan, D. (2021). Regulation and Role of Transcription Factors in Osteogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5445. <https://doi.org/10.3390/ijms22115445>

69. Gustavsson, J., Planell, J., & Engel, E. (2013). Ion-selective electrodes to monitor osteoblast-like cellular influence on the extracellular concentration of calcium. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 7(8), 609–620. <https://doi.org/10.1002/term.550>
70. Allori, A. C., Sillon, A. M., & Warren, S. M. (2008). Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 14(3), 259–273. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0082>
71. Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature01658>
72. Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation; research in biological diversity*, 92(1-2), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005>
73. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00622-5)
74. Galindo, M., Pratap, J., Young, D. W., Hovhannisyan, H., Im, H. J., Choi, J. Y., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S., & van Wijnen, A. J. (2005). The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. *The Journal of biological chemistry*, 280(21), 20274–20285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413665200>
75. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755–764. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80258-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80258-5)
76. Zhang, H., Recker, R., Lee, W. N., & Xiao, G. G. (2010). Proteomics in bone research. *Expert review of proteomics*, 7(1), 103–111. <https://doi.org/10.1586/epr.09.90>
77. James A. W. (2013). Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*, 2013, 684736. <https://doi.org/10.1155/2013/684736>
78. Byers, B. A., Pavlath, G. K., Murphy, T. J., Karsenty, G., & García, A. J. (2002). Cell-type-dependent up-regulation of in vitro mineralization after overexpression of the osteoblast-specific transcription factor Runx2/Cbfa1. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17(11), 1931–1944. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.11.1931>
79. Karsenty, G., Kronenberg, H. M., & Settembre, C. (2009). Genetic control of bone formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 25, 629–648. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113308>

80. Jin, Y., Zhang, W., Liu, Y., Zhang, M., Xu, L., Wu, Q., Zhang, X., Zhu, Z., Huang, Q., & Jiang, X. (2014). rhPDGF-BB via ERK pathway osteogenesis and adipogenesis balancing in ADSCs for critical-sized calvarial defect repair. *Tissue engineering. Part A*, 20(23-24), 3303–3313. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0556>
81. Percival, C. J., & Richtsmeier, J. T. (2013). Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 242(8), 909–922. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23992>
82. Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(1), 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.009>
83. Rolian C. (2020). Endochondral ossification and the evolution of limb proportions. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 9(4), e373. <https://doi.org/10.1002/wdev.373>
84. Shapiro F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *European cells & materials*, 15, 53–76. <https://doi.org/10.22203/ecm.v015a05>
85. Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>
86. Knuth, C., Kiernan, C., Wolvius, E., Narcisi, R., & Farrell, E. (2019). Understanding tissue-engineered endochondral ossification; towards improved bone formation. *European cells & materials*, 37, 277–291. <https://doi.org/10.22203/eCM.v037a17>
87. Bruder, S. P., Kurth, A. A., Shea, M., Hayes, W. C., Jaiswal, N., & Kadiyala, S. (1998). Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 16(2), 155–162. <https://doi.org/10.1002/jor.1100160202>
88. Oryan, A., Monazzah, S., & Bigham-Sadegh, A. (2015). Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 28(1), 57–71. <https://doi.org/10.3967/bes2015.006>
89. Claes, L., Recknagel, S., & Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature reviews. Rheumatology*, 8(3), 133–143. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.1>
90. Pilitsis, J. G., Lucas, D. R., & Rengachary, S. S. (2002). Bone healing and spinal fusion. *Neurosurgical focus*, 13(6), e1. <https://doi.org/10.3171/foc.2002.13.6.2>
91. Meijer, G. J., de Bruijn, J. D., Koole, R., & van Blitterswijk, C. A. (2008). Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*, 29(21), 3053–3061. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.012>
92. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>

93. Rather, H. A., Jhala, D., & Vasita, R. (2019). Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, *103*, 109761. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109761>
94. Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, *10 Suppl 2(Suppl 2)*, S96–S101. <https://doi.org/10.1007/s005860100282>
95. Hu, K., & Olsen, B. R. (2016). Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *The Journal of clinical investigation*, *126(2)*, 509–526. <https://doi.org/10.1172/JCI82585>
96. Colnot, C. I., & Helms, J. A. (2001). A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. *Mechanisms of development*, *100(2)*, 245–250. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(00\)00532-3](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(00)00532-3)
97. Açil, Y., Ghoniem, A. A., Gülses, A., Kisch, T., Stang, F., Wiltfang, J., & Gierloff, M. (2017). Suppression of osteoblast-related genes during osteogenic differentiation of adipose tissue derived stromal cells. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, *45(1)*, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.10.006>
98. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*, *9(1)*, 18. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>
99. Tsiridis, E., Upadhyay, N., & Giannoudis, P. (2007). Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?. *Injury*, *38 Suppl 1*, S11–S25. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.006>
100. Devescovi, V., Leonardi, E., Ciapetti, G., & Cenni, E. (2008). Growth factors in bone repair. *La Chirurgia degli organi di movimento*, *92(3)*, 161–168. <https://doi.org/10.1007/s12306-008-0064-1>
101. Caplan, A. I., & Correa, D. (2011). PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, *29(12)*, 1795–1803. <https://doi.org/10.1002/jor.21462>
102. Kohler, N., & Lipton, A. (1974). Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Experimental cell research*, *87(2)*, 297–301. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(74\)90484-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(74)90484-4)
103. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., & Harker, L. (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71(4)*, 1207–1210. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1207>

104. Westermark, B., & Wasteson, A. (1976). A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Experimental cell research*, 98(1), 170–174. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(76\)90476-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90476-6)
105. Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development*, 22(10), 1276–1312. <https://doi.org/10.1101/gad.1653708>
106. Fredriksson, L., Li, H., & Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(4), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.007>
107. Yu, J., Ustach, C., & Kim, H. R. (2003). Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 36(1), 49–59. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2003.36.1.049>
108. Heldin, C. H., & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews*, 79(4), 1283–1316. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1283>
109. Heldin, C. H., & Westermark, B. (1990). Signal transduction by the receptors for platelet-derived growth factor. *Journal of cell science*, 96 (Pt 2), 193–196. <https://doi.org/10.1242/jcs.96.2.193>
110. Yokota, J., Chosa, N., Sawada, S., Okubo, N., Takahashi, N., Hasegawa, T., Kondo, H., & Ishisaki, A. (2014). PDGF-induced PI3K-mediated signaling enhances the TGF- β -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a TGF- β -activated MEK-dependent manner. *International journal of molecular medicine*, 33(3), 534–542. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1606>
111. McCarthy, H. S., Williams, J. H., Davie, M. W., & Marshall, M. J. (2009). Platelet-derived growth factor stimulates osteoprotegerin production in osteoblastic cells. *Journal of cellular physiology*, 218(2), 350–354. <https://doi.org/10.1002/jcp.21600>
112. Betsholtz C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(4), 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.005>
113. Rosenkranz, S., & Kazlauskas, A. (1999). Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 16(3), 201–216. <https://doi.org/10.3109/08977199909002130>
114. Friedlaender, G. E., Lin, S., Solchaga, L. A., Snel, L. B., & Lynch, S. E. (2013). The role of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in orthopaedic bone repair and regeneration. *Current pharmaceutical design*, 19(19), 3384–3390. <https://doi.org/10.2174/1381612811319190005>
115. Kasperk, C. H., Wergedal, J. E., Mohan, S., Long, D. L., Lau, K. H., & Baylink, D. J. (1990). Interactions of growth factors present in bone matrix with bone cells: effects on DNA synthesis and alkaline phosphatase. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 3(2), 147–158. <https://doi.org/10.3109/08977199009108277>

116. Andrew, J. G., Hoyland, J. A., Freemont, A. J., & Marsh, D. R. (1995). Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone*, *16*(4), 455–460. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(95\)90191-4](https://doi.org/10.1016/8756-3282(95)90191-4)
117. Siegbahn, A., Hammacher, A., Westermark, B., & Heldin, C. H. (1990). Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *The Journal of clinical investigation*, *85*(3), 916–920. <https://doi.org/10.1172/JCI114519>
118. Celotti, F., Colciago, A., Negri-Cesi, P., Pravettoni, A., Zaninetti, R., & Sacchi, M. C. (2006). Effect of platelet-rich plasma on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts: role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, *14*(2), 195–202. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00110.x>
119. Fiedler, J., Etzel, N., & Brenner, R. E. (2004). To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *Journal of cellular biochemistry*, *93*(5), 990–998. <https://doi.org/10.1002/jcb.20219>
120. Casati, L., Celotti, F., Negri-Cesi, P., Sacchi, M. C., Castano, P., & Colciago, A. (2014). Platelet derived growth factor (PDGF) contained in Platelet Rich Plasma (PRP) stimulates migration of osteoblasts by reorganizing actin cytoskeleton. *Cell adhesion & migration*, *8*(6), 595–602. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.972785>
121. Canalis, E., Varghese, S., McCarthy, T. L., & Centrella, M. (1992). Role of platelet derived growth factor in bone cell function. *Growth regulation*, *2*(4), 151–155.
122. Smits, A., Hermansson, M., Nistér, M., Karnushina, I., Heldin, C. H., Westermark, B., & Funari, K. (1989). Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, *2*(1), 1–8. <https://doi.org/10.3109/08977198909069076>
123. Ambrus, J. L., Ambrus, C. M., Toumbis, C. A., Forgach, P., Karakousis, C. P., Niswander, P., & Lane, W. (1991). Studies on tumor induced angiogenesis. *Journal of medicine*, *22*(6), 355–369.
124. Gehmert, S., Gehmert, S., Hidayat, M., Sultan, M., Berner, A., Klein, S., Zellner, J., Müller, M., & Prantl, L. (2011). Angiogenesis: the role of PDGF-BB on adipose-tissue derived stem cells (ASCs). *Clinical hemorheology and microcirculation*, *48*(1), 5–13. <https://doi.org/10.3233/CH-2011-1397>
125. Li, A., Xia, X., Yeh, J., Kua, H., Liu, H., Mishina, Y., Hao, A., & Li, B. (2014). PDGF-AA promotes osteogenic differentiation and migration of mesenchymal stem cell by down-regulating PDGFR α and derepressing BMP-Smad1/5/8 signaling. *PloS one*, *9*(12), e113785. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113785>

126. Ng, F., Boucher, S., Koh, S., Sastry, K. S., Chase, L., Lakshmiathy, U., Choong, C., Yang, Z., Vemuri, M. C., Rao, M. S., & Tanavde, V. (2008). PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*, *112*(2), 295–307. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-103697>
127. Goff, L. A., Boucher, S., Ricupero, C. L., Fenstermacher, S., Swerdel, M., Chase, L. G., Adams, C. C., Chesnut, J., Lakshmiathy, U., & Hart, R. P. (2008). Differentiating human multipotent mesenchymal stromal cells regulate microRNAs: prediction of microRNA regulation by PDGF during osteogenesis. *Experimental hematology*, *36*(10), 1354–1369. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.05.004>
128. Hoch, R. V., & Soriano, P. (2003). Roles of PDGF in animal development. *Development (Cambridge, England)*, *130*(20), 4769–4784. <https://doi.org/10.1242/dev.00721>
129. Phipps, M. C., Xu, Y., & Bellis, S. L. (2012). Delivery of platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds. *PloS one*, *7*(7), e40831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040831>
130. Fiedler, J., Röderer, G., Günther, K. P., & Brenner, R. E. (2002). BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *Journal of cellular biochemistry*, *87*(3), 305–312. <https://doi.org/10.1002/jcb.10309>
131. Zhao, Y., Zhang, S., Zeng, D., Xia, L., Lamichhane, A., Jiang, X., & Zhang, F. (2014). rhPDGF-BB promotes proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells from streptozotocin-induced diabetic rats through ERK pathway. *BioMed research international*, *2014*, 637415. <https://doi.org/10.1155/2014/637415>
132. Kang, Y. J., Jeon, E. S., Song, H. Y., Woo, J. S., Jung, J. S., Kim, Y. K., & Kim, J. H. (2005). Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, *95*(6), 1135–1145. <https://doi.org/10.1002/jcb.20499>
133. Mezawa, M., Araki, S., Takai, H., Sasaki, Y., Wang, S., Li, X., Kim, D. S., Nakayama, Y., & Ogata, Y. (2009). Regulation of human bone sialoprotein gene transcription by platelet-derived growth factor-BB. *Gene*, *435*(1-2), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.12.020>
134. Levi, B., James, A. W., Wan, D. C., Glotzbach, J. P., Commons, G. W., & Longaker, M. T. (2010). Regulation of human adipose-derived stromal cell osteogenic differentiation by insulin-like growth factor-1 and platelet-derived growth factor-alpha. *Plastic and reconstructive surgery*, *126*(1), 41–52. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181da8858>
135. Lopatina, T., Bruno, S., Tetta, C., Kalinina, N., Porta, M., & Camussi, G. (2014). Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell communication and signaling : CCS*, *12*, 26. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-26>

136. Hutton, D. L., Moore, E. M., Gimble, J. M., & Grayson, W. L. (2013). Platelet-derived growth factor and spatiotemporal cues induce development of vascularized bone tissue by adipose-derived stem cells. *Tissue engineering. Part A*, *19*(17-18), 2076–2086. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0752>
137. Zhang, M., Yu, W., Niibe, K., Zhang, W., Egusa, H., Tang, T., & Jiang, X. (2018). The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Bone Marrow Stromal Cell-Mediated Vascularized Bone Regeneration. *Stem cells international*, *2018*, 3272098. <https://doi.org/10.1155/2018/3272098>
138. Gharibi, B., & Hughes, F. J. (2012). Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem cells translational medicine*, *1*(11), 771–782. <https://doi.org/10.5966/sctm.2010-0031>
139. Lee, J., Lee, S., Ahmad, T., Madhurakkat Perikamana, S. K., Lee, J., Kim, E. M., & Shin, H. (2020). Human adipose-derived stem cell spheroids incorporating platelet-derived growth factor (PDGF) and bio-minerals for vascularized bone tissue engineering. *Biomaterials*, *255*, 120192. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120192>
140. Younesi Soltani, F., Javanshir, S., Dowlati, G., Parham, A., & Naderi-Meshkin, H. (2022). Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells toward tenocyte by platelet-derived growth factor-BB and growth differentiation factor-6. *Cell and tissue banking*, *23*(2), 237–246. <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09935-7>
141. Min, H. K., Oh, S. H., Lee, J. M., Im, G. I., & Lee, J. H. (2014). Porous membrane with reverse gradients of PDGF-BB and BMP-2 for tendon-to-bone repair: in vitro evaluation on adipose-derived stem cell differentiation. *Acta biomaterialia*, *10*(3), 1272–1279. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.031>
142. Biver, E., Thouverey, C., Magne, D., & Caverzasio, J. (2014). Crosstalk between tyrosine kinase receptors, GSK3 and BMP2 signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Molecular and cellular endocrinology*, *382*(1), 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.018>
143. Mohan, S., Raghavendran, H. B., Karunanithi, P., Murali, M. R., Naveen, S. V., Talebian, S., Mehrali, M., Mehrali, M., Natarajan, E., Chan, C. K., & Kamarul, T. (2017). Incorporation of Human-Platelet-Derived Growth Factor-BB Encapsulated Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres into 3D CORAGRAF Enhances Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. *ACS applied materials & interfaces*, *9*(11), 9291–9303. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13422>
144. Banks, J. M., Mozdzen, L. C., Harley, B. A., & Bailey, R. C. (2014). The combined effects of matrix stiffness and growth factor immobilization on the bioactivity and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, *35*(32), 8951–8959. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.012>
145. Chen, W., Baylink, D. J., Brier-Jones, J., Neises, A., Kiroyan, J. B., Rundle, C. H., Lau, K. H., & Zhang, X. B. (2015). PDGFB-based stem cell gene therapy increases bone strength in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(29), E3893–E3900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501759112>

146. Demirtaş, T. T., Göz, E., Karakeçili, A., & Gümüşderelioğlu, M. (2016). Combined delivery of PDGF-BB and BMP-6 for enhanced osteoblastic differentiation. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 27(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5626-9>
147. Wada, K., Gerbaudo, V. H., & Spector, M. (2013). Effects of PDGF-BB and OP-1 on mesenchymal stem cells in a porous mineral block. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, 33(2), e72–e78. <https://doi.org/10.11607/prd.1670>
148. Xie, H., Cui, Z., Wang, L., Xia, Z., Hu, Y., Xian, L., Li, C., Xie, L., Crane, J., Wan, M., Zhen, G., Bian, Q., Yu, B., Chang, W., Qiu, T., Pickarski, M., Duong, L. T., Windle, J. J., Luo, X., Liao, E., Cao, X. (2014). PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. *Nature medicine*, 20(11), 1270–1278. <https://doi.org/10.1038/nm.3668>
149. Tokuda, H., Takai, S., Hanai, Y., Harada, A., Matsushima-Nishiwaki, R., Kato, H., Ogura, S., & Kozawa, O. (2008). Potentiation by platelet-derived growth factor-BB of FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. *Journal of bone and mineral metabolism*, 26(4), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s00774-007-0829-x>
150. Zhang, N., Lo, C. W., Utsunomiya, T., Maruyama, M., Huang, E., Rhee, C., Gao, Q., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2021). PDGF-BB and IL-4 co-overexpression is a potential strategy to enhance mesenchymal stem cell-based bone regeneration. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02086-8>
151. Fröhlich L. F. (2019). Micrnas at the Interface between Osteogenesis and Angiogenesis as Targets for Bone Regeneration. *Cells*, 8(2), 121. <https://doi.org/10.3390/cells8020121>
152. Qu, B., Xia, X., Wu, H. H., Tu, C. Q., & Pan, X. M. (2014). PDGF-regulated miRNA-138 inhibits the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 448(3), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.091>
153. Fotia, C., Massa, A., Boriani, F., Baldini, N., & Granchi, D. (2015). Prolonged exposure to hypoxic milieu improves the osteogenic potential of adipose derived stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 116(7), 1442–1453. <https://doi.org/10.1002/jcb.25106>
154. Raghavendran, H. R., Mohan, S., Genasan, K., Murali, M. R., Naveen, S. V., Talebian, S., McKean, R., & Kamarul, T. (2016). Synergistic interaction of platelet derived growth factor (PDGF) with the surface of PLLA/Col/HA and PLLA/HA scaffolds produces rapid osteogenic differentiation. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 139, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.053>
155. Khojasteh, A., Dashti, S. G., Dehghan, M. M., Behnia, H., Abbasnia, P., & Morad, G. (2014). The osteoregenerative effects of platelet-derived growth factor BB cotransplanted with mesenchymal stem cells, loaded on freeze-dried mineral bone block: a pilot study in dog mandible. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 102(8), 1771–1778. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33156>

156. McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
157. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
158. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
159. Kumar, A., Salimath, B. P., Stark, G. B., & Finkenzeller, G. (2010). Platelet-derived growth factor receptor signaling is not involved in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part A*, 16(3), 983–993. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0230>
160. Hung, B. P., Hutton, D. L., Kozielski, K. L., Bishop, C. J., Naved, B., Green, J. J., Caplan, A. I., Gimble, J. M., Dorafshar, A. H., & Grayson, W. L. (2015). Platelet-Derived Growth Factor BB Enhances Osteogenesis of Adipose-Derived But Not Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 33(9), 2773–2784. <https://doi.org/10.1002/stem.2060>
161. Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kassem, M., & Mann, M. (2005). Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5727), 1472–1477. <https://doi.org/10.1126/science.1107627>
162. Banks, J. M., Mozdzen, L. C., Harley, B. A., & Bailey, R. C. (2014). The combined effects of matrix stiffness and growth factor immobilization on the bioactivity and differentiation capabilities of adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, 35(32), 8951–8959. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.012>
163. de Girolamo, L., Lopa, S., Arrigoni, E., Sartori, M. F., Baruffaldi Preis, F. W., & Brini, A. T. (2009). Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytotherapy*, 11(6), 793–803. <https://doi.org/10.3109/14653240903079393>
164. Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., & Harris, D. T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of translational medicine*, 12, 8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8>
165. Gruber, R., Karreth, F., Kandler, B., Fuerst, G., Rot, A., Fischer, M. B., & Watzek, G. (2004). Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets*, 15(1), 29–35. <https://doi.org/10.1080/09537100310001643999>
166. Fierro, F. A., Kalomoiris, S., Sondergaard, C. S., & Nolte, J. A. (2011). Effects on proliferation and differentiation of multipotent bone marrow stromal cells engineered to express growth factors for combined cell and gene therapy. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 29(11), 1727–1737. <https://doi.org/10.1002/stem.720>

167. Shyh-Chang, N., Daley, G. Q., & Cantley, L. C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development (Cambridge, England)*, *140*(12), 2535–2547. <https://doi.org/10.1242/dev.091777>
168. Chen, C. T., Shih, Y. R., Kuo, T. K., Lee, O. K., & Wei, Y. H. (2008). Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *26*(4), 960–968. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0509>
169. Lennon, D., Solchaga, L. A., Somoza, R. A., Schluchter, M. D., Margevicius, S., & Caplan, A. I. (2018). Human and Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Differ in Their Response to Fibroblast Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor. *Tissue engineering. Part A*, *24*(23-24), 1831–1843. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2018.0126>
170. Li, D. Q., Wan, Q. L., Pathak, J. L., & Li, Z. B. (2017). Platelet-derived growth factor BB enhances osteoclast formation and osteoclast precursor cell chemotaxis. *Journal of bone and mineral metabolism*, *35*(4), 355–365. <https://doi.org/10.1007/s00774-016-0773-8>
171. Kubota, K., Sakikawa, C., Katsumata, M., Nakamura, T., & Wakabayashi, K. (2002). Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *17*(2), 257–265. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.2.257>
172. Rindone, A. N., Kachniarz, B., Achebe, C. C., Riddle, R. C., O'Sullivan, A. N., Dorafshar, A. H., & Grayson, W. L. (2019). Heparin-Conjugated Decellularized Bone Particles Promote Enhanced Osteogenic Signaling of PDGF-BB to Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Engineered Bone Grafts. *Advanced healthcare materials*, *8*(10), e1801565. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801565>
173. Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, *13*(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>
174. Lian, J. B., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Hassan, M. Q., Gaur, T., & Zhang, Y. (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature reviews. Endocrinology*, *8*(4), 212–227. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.234>
175. Schmidt, Y., Simunovic, F., Strassburg, S., Pfeifer, D., Stark, G. B., & Finkenzeller, G. (2015). miR-126 regulates platelet-derived growth factor receptor- α expression and migration of primary human osteoblasts. *Biological chemistry*, *396*(1), 61–70. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0168>
176. Strassburg, S., Nabar, N., Lampert, F., Goerke, S. M., Pfeifer, D., Finkenzeller, G., Stark, G. B., & Simunovic, F. (2017). Calmodulin Regulated Spectrin Associated Protein 1 mRNA is Directly Regulated by miR-126 in Primary Human Osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry*, *118*(7), 1756–1763. <https://doi.org/10.1002/jcb.25838>

177. Matsushita, T., Chan, Y. Y., Kawanami, A., Balmes, G., Landreth, G. E., & Murakami, S. (2009). Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 play essential roles in osteoblast differentiation and in supporting osteoclastogenesis. *Molecular and cellular biology*, 29(21), 5843–5857. <https://doi.org/10.1128/MCB.01549-08>
178. Kovalenko, M., Gazit, A., Böhmer, A., Rorsman, C., Rönstrand, L., Heldin, C. H., Waltenerger, J., Böhmer, F. D., & Levitzki, A. (1994). Selective platelet-derived growth factor receptor kinase blockers reverse sis-transformation. *Cancer research*, 54(23), 6106–6114.
179. Kovalenko, M., Rönstrand, L., Heldin, C. H., Loubtchenkov, M., Gazit, A., Levitzki, A., & Böhmer, F. D. (1997). Phosphorylation site-specific inhibition of platelet-derived growth factor beta-receptor autophosphorylation by the receptor blocking tyrophostin AG1296. *Biochemistry*, 36(21), 6260–6269. <https://doi.org/10.1021/bi9625531>
180. Yan, L. (2009). Abstract #DDT01-1: MK-2206: A potent oral allosteric AKT inhibitor. *Cancer Research*, 69.
181. Vanhaesebroeck, B., & Alessi, D. R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical journal*, 346 Pt 3(Pt 3), 561–576.
182. Datta, K., Bellacosa, A., Chan, T. O., & Tsichlis, P. N. (1996). Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 271(48), 30835–30839. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30835>
183. Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., & Tsichlis, P. N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, 81(5), 727–736. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90534-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90534-0)
184. Cano, E., & Mahadevan, L. C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends in biochemical sciences*, 20(3), 117–122. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)88978-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)88978-1)
185. Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M., & Anderson, D. W. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 13681–13686. <https://doi.org/10.1073/pnas.251194298>
186. Lopez-Illasaca, M., Li, W., Uren, A., Yu, J. C., Kazlauskas, A., Gutkind, J. S., & Heidaran, M. A. (1997). Requirement of phosphatidylinositol-3 kinase for activation of JNK/SAPKs by PDGF. *Biochemical and biophysical research communications*, 232(2), 273–277. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6289>
187. Yu, P. B., Deng, D. Y., Lai, C. S., Hong, C. C., Cuny, G. D., Bouxsein, M. L., Hong, D. W., McManus, P. M., Katagiri, T., Sachidanandan, C., Kamiya, N., Fukuda, T., Mishina, Y., Peterson, R. T., & Bloch, K. D. (2008). BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nature medicine*, 14(12), 1363–1369. <https://doi.org/10.1038/nm.1888>

188. Sanvitale, C. E., Kerr, G., Chaikuad, A., Ramel, M. C., Mohedas, A. H., Reichert, S., Wang, Y., Triffitt, J. T., Cuny, G. D., Yu, P. B., Hill, C. S., & Bullock, A. N. (2013). A new class of small molecule inhibitor of BMP signaling. *PloS one*, 8(4), e62721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062721>
189. Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., Lin, H. Y., Bloch, K. D., & Peterson, R. T. (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nature chemical biology*, 4(1), 33–41. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.54>
190. Luo, J., Tang, M., Huang, J., He, B. C., Gao, J. L., Chen, L., Zuo, G. W., Zhang, W., Luo, Q., Shi, Q., Zhang, B. Q., Bi, Y., Luo, X., Jiang, W., Su, Y., Shen, J., Kim, S. H., Huang, E., Gao, Y., Zhou, J. Z., Yang, K., Luu, H. H., Pan, X., Haydon, R. C., Deng, Z. L., He, T. C. (2010). TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(38), 29588–29598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130518>
191. Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A., & Trzaskos, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of biological chemistry*, 273(29), 18623–18632. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.29.18623>
192. Roskoski R., Jr (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research*, 66(2), 105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
193. Haftchenary, S., Luchman, H. A., Jouk, A. O., Veloso, A. J., Page, B. D., Cheng, X. R., Dawson, S. S., Grinshtein, N., Shahani, V. M., Kerman, K., Kaplan, D. R., Griffin, C., Aman, A. M., Al-Awar, R., Weiss, S., & Gunning, P. T. (2013). Potent Targeting of the STAT3 Protein in Brain Cancer Stem Cells: A Promising Route for Treating Glioblastoma. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(11), 1102–1107. <https://doi.org/10.1021/ml4003138>
194. Bellido, T., Borba, V. Z., Roberson, P., & Manolagas, S. C. (1997). Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 138(9), 3666–3676. <https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5364>
195. Li J. (2013). JAK-STAT and bone metabolism. *JAK-STAT*, 2(3), e23930. <https://doi.org/10.4161/jkst.23930>
196. Sanpaolo, E. R., Rotondo, C., Cici, D., Corrado, A., & Cantatore, F. P. (2020). JAK/STAT pathway and molecular mechanism in bone remodeling. *Molecular biology reports*, 47(11), 9087–9096. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05910-9>
197. Joung, Y. H., Lim, E. J., Darwin, P., Chung, S. C., Jang, J. W., Do Park, K., Lee, H. K., Kim, H. S., Park, T., & Yang, Y. M. (2012). MSM enhances GH signaling via the Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs. *PloS one*, 7(10), e47477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047477>

198. Joung, Y. H., Lim, E. J., Darvin, P., Jang, J. W., Park, K. D., Lee, H. K., Kim, H. S., Cho, B. W., Park, T., Chung, S., Park, J. H., & Yang, Y. M. (2013). Hwanggeumchal sorghum extract enhances BMP7 and GH signaling through the activation of Jak2/STAT5B in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Molecular medicine reports*, 8(3), 891–896. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1593>
199. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., Strickler, J. E., McLaughlin, M. M., Siemens, I. R., Fisher, S. M., Livi, G. P., White, J. R., Adams, J. L., & Young, P. R. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372(6508), 739–746. <https://doi.org/10.1038/372739a0>
200. Young, P. R., McLaughlin, M. M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M. L., McNulty, D., Gallagher, T. F., Fisher, S., McDonnell, P. C., Carr, S. A., Huddleston, M. J., Seibel, G., Porter, T. G., Livi, G. P., Adams, J. L., & Lee, J. C. (1997). Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *The Journal of biological chemistry*, 272(18), 12116–12121. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.18.12116>
201. Muniyappa, H., & Das, K. C. (2008). Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: a MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cellular signalling*, 20(4), 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.003>
202. Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R., & Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *The Biochemical journal*, 408(3), 297–315. <https://doi.org/10.1042/BJ20070797>
203. Minardi, S., Pandolfi, L., Taraballi, F., Wang, X., De Rosa, E., Mills, Z. D., Liu, X., Ferrari, M., & Tasciotti, E. (2017). Enhancing Vascularization through the Controlled Release of Platelet-Derived Growth Factor-BB. *ACS applied materials & interfaces*, 9(17), 14566–14575. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13760>

7. Anhang

7.1. Lebenslauf

Die Seite 89 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

7.2. Eidesstaatliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 Absatz 2 Nr. 9 der Medizinischen Fakultät für den Dr. med./Dr. med. dent. vom 08.12.2020 gültig ab 01.04.2021

Name, Vorname: Früh, Calvin

Geburtsdatum: 29.05.2000

Geburtsort: Baden-Baden

Bei der eingereichten Dissertation mit dem nachstehend benannten Titel handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung:

Einfluss von PDGF-BB auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslandes als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Freiburg, 08.06.2024

Ort, Datum



Calvin Früh

7.3. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde in der Sektion Tissue Engineering der Klinik für Plastische und Handchirurgie der Universitätsklinik Freiburg von Herrn Professor Dr. Günter Finkenzeller konzipiert. Die Betreuung der Arbeit erfolgte ebenfalls durch Herrn Professor Dr. Günter Finkenzeller. Die chondrogene und adipogene Differenzierung zur Charakterisierung der verwendeten Stammzellen wurde von Frau Baumer und Frau Strassburg im Vorfeld zu den Experimenten dieser Arbeit durchgeführt. Nach Einarbeitung durch die technische Assistentin Frau Baumer wurden alle Experimente dieser Arbeit selbstständig von mir, Calvin Früh, durchgeführt. Dies umfasst die osteogene Differenzierung der Stammzellen unter verschiedenen Bedingungen, die Alizarin-Rot-Färbungen, den Calciumassay, die FACS-Analyse, den Proliferationsassay, die Genexpressionsanalysen sowie die Versuche mit den Proteinkinaseinhibitoren. Die Auswertung, Visualisierung und Interpretation der Ergebnisse wurden von mir vorgenommen.

7.4. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Finkenzeller für die Überlassung des Dissertationsthemas und die exzellente Betreuung der Arbeit. Meinen Anliegen und Fragen begegnete er stets geduldig, nahm sich die Zeit mir zuzuhören und bereicherte mich mit wertvollen Ratschlägen.

Ich danke Frau PD Dr. Brigitte Altmann für die Übernahme der Zweitbetreuung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Eva Johanna Kubosch danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Brunhilde Baumer für die hervorragende Einarbeitung und Unterstützung bei sämtlichen experimentellen Anliegen. Sie hatte immer ein offenes Ohr und der Austausch bereicherte mich enorm. Ihre Gesellschaft im Labor und die gemeinsamen Mittagessen bereicherten den Laboralltag sehr.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Abteilung für Plastische und Handchirurgie für die angenehme Atmosphäre. Ich bin immer mit Freude ins Labor gegangen. Ebenfalls danke ich meinen Mitdoktoranden für das nette Miteinander und den gemeinsamen Austausch.

Ich möchte insbesondere meinem Zwillingbruder Robin Früh danken für seine endlose Geduld in vielen Gesprächen, in denen ich ihm von meinen Gedanken und Überlegungen berichten konnte, um diese für mich selbst zu sortieren. Er stand mir bei Rückschlägen als emotionale Stütze und mit aufbauenden Worten zur Seite. Seine Ratschläge und sein stetiges Feedback erleichterten mir die Fertigstellung meiner Dissertationsschrift unendlich.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken, die immer für mich da war. Insbesondere meine Eltern Kim und Heiko Früh, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Lebensweg legten und durch ihre Unterstützung sowohl mein Studium als auch die Dissertation überhaupt erst ermöglichten.