

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

**Die Rolle von MSC-geprägten Makrophagen
in der aseptischen Prothesenlockerung**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Mareike Leese

aus

Bietigheim-Bissingen

2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/78526

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230705-121836-5



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Jäger

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. H. Heep

Tag der mündlichen Prüfung: 20. April 2023

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	6
1.1 Aseptische Prothesenlockerung durch periprothetische Osteolyse.....	7
1.2 Abriebbedingte Titanpartikel.....	8
1.3 Die Schlüsselrolle von Makrophagen in der periprothetischen Osteolyse....	9
1.4 Die Bedeutung von mesenchymalen Progenitoren	11
1.5 MSC geprägte Makrophagen	12
2. MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Versuchsaufbau	15
2.2 Methoden	17
2.2.1 Chemikalien.....	17
2.2.2 Titanpartikel.....	17
2.2.3 Lipopolysaccharide	17
2.2.4 Oligonukleotide.....	18
2.2.5 Makrophagen- und MSC-Kulturen	18
2.2.6 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.7 Proteinbiochemische Methoden	26
3. ERGEBNISSE	30
3.1 Charakterisierung des Ausgangsmaterials.....	30
3.1.1 Differenzierung der Monozyten aus dem Vollblut	30
3.1.2 Differenzierung der MSC	31
3.1.3 Demographische Daten der Knochenmark- und Blutspender/innen..	33
3.2 Die Polarisationsmarker CD86 und CD206	33
3.2.1 CD86 Expression.....	34
3.2.2 CD206 Expression.....	35

3.3	Der Einfluss von MSC auf die Zytokinsekretion von Makrophagen unter osteolytischen Bedingungen.....	39
3.3.1	Sekretion von TNF- α	39
3.3.2	Sekretion von IL-6.....	40
3.3.3	Sekretion von IL-10.....	42
3.3.4	Sekretion von IL-1Ra.....	43
3.3.5	Sekretion von CCL-18	44
4.	DISKUSSION	47
4.1	Einsatz von Primärzellen im Vergleich zu differenzierte Zelllinien oder Tier-Modellen.....	47
4.2	Osteolytische Stimulation mit Titanpartikel und LPS	48
4.3	Indirekte und Direkte Kokultur	49
4.4	Bestimmung des Makrophagen-Phänotyps mit Hilfe der Oberflächenmarker CD86 und CD206	49
4.4.1	Die Rolle von CD86 bei Makrophagen unter MSC Kokultur	50
4.4.2	Die Rolle von CD206 durch Makrophagen unter MSC Kokultur	50
4.5	Zytokinprofil osteolytisch-stimulierter MSC geprägter Makrophagen.....	51
4.5.1	Das proinflammatorische Zytokin TNF- α	51
4.5.2	Das bifunktionelle Zytokin IL-6.....	52
4.5.3	Antiinflammatorische Zytokine	53
4.5.4	Therapeutisches Potential MSC geprägte Makrophagen	55
4.5.5	Limitationen der Arbeit.....	56
4.6	Schlussfolgerung.....	56
5.	ZUSAMMENFASSUNG	58
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	59

7. ANHANG	67
7.1 Laborgeräte, Software, Verbrauchsmaterialien, Oligonukleotide, Reagenzsysteme, Antikörper	67
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	72
7.3 Tabellenverzeichnis.....	72
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	73
9. DANKSAGUNG	74
10. LEBENS LAUF	75

1. EINLEITUNG

Die vorliegende Dissertationsschrift untersucht die direkte und indirekte Reaktion von humanen mesenchymalen Stromazellen (MSC) auf den Immunphänotyp und die funktionellen Eigenschaften von menschlichen Makrophagen während der Stimulation mit Titanpartikeln sowie bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS). Sollten MSC geprägte Makrophagen (MGM) ihr alternativ aktiviertes Profil auch unter osteolytischen Bedingungen beibehalten, könnten sie in der Prävention und Therapie der aseptischen Prothesenlockerung oder entzündlicher Knochenerkrankungen zum Einsatz kommen.

Gelenke bei Menschen sind häufig betroffen von degenerativen und entzündlichen Erkrankungen sowie Traumata. Bei symptomatischer Arthrose im Endstadium hat sich der totale Gelenkersatz (TJR, *total joint replacement*) als Goldstandard etabliert. Die damit einhergehende Schmerzreduktion, die Wiederherstellung der Gelenkfunktion und die Steigerung der Mobilität führen zu einer beträchtlichen Verbesserung der Lebensqualität der Patienten (Drees et al., 2007). Der Erfolg der Intervention spiegelt sich in den Zahlen jährlich ansteigender operativer Eingriffe wider. Laut Jahresbericht des deutschen Endoprothesenregisters wurden 2018 in Deutschland insgesamt etwa 450.000 endoprothetische Hüft- und Knieeingriffe durchgeführt (Endoprothesenregister Deutschland, 2019). Die durchschnittliche Standzeit der meisten Prothesen beträgt mehr als 10 Jahre und kann, bei durch Implantatversagen bedingte frühzeitige Wechseloperation, weit unter dem Durchschnitt liegen. Die Ursachen für eine Revisionsoperation sind meist multifaktoriell: Neben dem Implantatdesign, der Operationstechnik, der Fixationsmethode und bakteriellen Infektionen stellt die aseptische Prothesenlockerung die häufigste Komplikation dar und ist für mehr als 70% der Revisionsoperation ursächlich (Nich et al., 2013). Aktuell gibt es nur sehr begrenzte therapeutische Alternativen um diese Komplikationen ohne Austausch der Endoprothese zu heilen. Hinzu kommt, dass durch den demografischen Wandel der Gesellschaft und die ansteigende Lebenserwartung der Bevölkerung die Revisionsoperation in naher Zukunft erwartungsgemäß ein ernstzunehmendes Problem darstellen werden (Jäger et al., 2006). Studien prognostizieren, dass sich allein die Revisionsoperationen künstlicher Hüftgelenke bis 2026 verdoppeln werden (Bozic et al., 2009).

Ursächlicher Grund der aseptischen Prothesenlockerung ist die "Partikelkrankheit", bei der durch periimplantäre Abriebpartikel chronische Entzündungsreaktion entstehen, die zur periprothetischen Knochenresorption (Osteolysen) führen (Drees et al., 2007; Willert &

Semlitsch, 1996). Eine Schlüsselrolle dabei spielen Makrophagen, die bei Aktivierung durch Abriebpartikel sowohl verschiedene Zytokine als auch proinflammatorische Mediatoren freisetzen und dadurch primär für die Einleitung chronischer Entzündungsprozesse verantwortlich sind (Ingham & Fisher, 2005; Nich et al., 2013).

1.1 Aseptische Prothesenlockerung durch periprothetische Osteolyse

Die Ausbildung der aseptischen Prothesenlockerung ist komplex und das Resultat einer Verknüpfung mehrerer Faktoren. Einflüsse wie eine optimale Operationstechnik, genetische Faktoren, sowie patientenspezifische Einflüsse bezüglich Knochenqualität und -form spielen nachgewiesenermaßen eine entscheidende Rolle, sind aber nur schwer objektivierbar. Heute besteht allgemein Einigkeit darüber, dass die Entwicklung der aseptischen Prothesenlockerung durch periprothetische Osteolyse in hohem Maße mit Abriebpartikeln zusammenhängt, die kontinuierlich durch Verschleiß der Gelenkoberfläche des Implantats abgegeben werden (Ingham & Fisher, 2005) (Abbildung 1). Die Abnutzungsrate der künstlichen Gelenke variiert in Abhängigkeit von der Art der Bewegung, der Reibungsfläche, sowie der Materialkombination. Zudem tragen mechanische Kräfte wahrscheinlich zur Entwicklung von Osteolyse bei, indem sie die Freisetzung von Abriebpartikeln weiter beschleunigen und den Knochenumbau nachteilig beeinflussen (Bozic et al., 2009).

Je nach Größe werden Abriebpartikel von Makrophagen phagozytiert und initiieren eine Entzündungsreaktion, die zur Rekrutierung von aktivierten Osteoklasten und zur Osteolyse der Knochen-Implantat-Grenzfläche führt. Zytokine fungieren als Boten zwischen Zellen und sind maßgeblich an der Entzündungsreaktion beteiligt. Diese Theorie beruht auf den Ergebnissen zahlreicher Studien. (1) Margevicius et al. konnten nach Revisionsoperation hohe Partikelkonzentrationen im Bereich der Prothese angrenzenden Pseudomembran nachweisen (Margevicius et al., 1994). (2) Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Abriebpartikeln *in vitro* die Produktion von Zytokinen durch Makrophagen induziert (Blaine et al., 1996). (3) In periprothetischen Geweben konnten erhöhte Zytokinkonzentrationen, einschließlich Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) (J. W. Xu et al., 1996), Interleukin-1b (IL-1b) (K. J. Kim et al., 1993) und IL-6 (Sabokbar & Rushton, 1995), nachgewiesen werden. (4) Zytokine, die von Makrophagen sezerniert werden, sind *in vitro* mit der Knochenresorption assoziiert (Glant & Jacobs, 1994). (5) In *in vivo* Modellen mit Makrophagen der Maus konnte die Bedeutung von Zytokinen bei partikelinduzierten Osteolysen gezeigt werden (Schwarz et al., 2000).

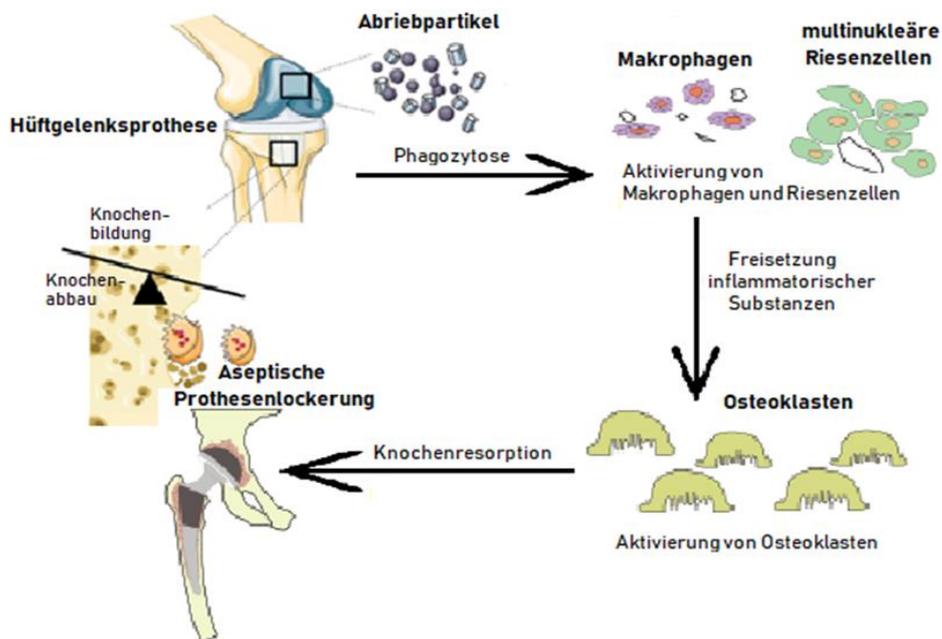


Abbildung 1: Prinzip der aseptischen Prothesenlockerung durch periprothetische Osteolyse
 Durch Artikulationsbewegungen zwischen den Komponenten des Gleitlagers der Prothese entstehen durch Verschleiß im Laufe der Zeit periimplantäre Abriebpartikel, die durch Makrophagen phagozytiert werden. Makrophagen aktivieren weitere Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen wie Neutrophile oder Fibroblasten, die inflammatorische Substanzen (z.B. Zytokine und Chemokine) synthetisieren und eine chronische Entzündungsreaktion in Gang setzen. Dies führt zur periprothetischen Osteolyse, indem die Entzündungsmediatoren die knochenabbauenden Osteoklasten um die Prothese vermehrt aktivieren und damit das Gleichgewicht des Knochenumbaus stören. Die verstärkte Knochenresorption bedingt eine Veränderung der Gewebemöostase und kann letztendlich zur aseptischen Prothesenlockerung führen (Abbildung modifiziert nach Mahon & Dunne, 2018).

1.2 Abriebbedingte Titanpartikel

Titan (Ti) und seine verschiedenen Legierungen kommen aufgrund ihrer Biokompatibilität, ihrer mechanischen Festigkeit und ihrer Stabilität routinemäßig in der Endoprothetik zur Anwendung (Agins et al., 1988). Ein Zusammenhang zwischen einem manifesten oder prognostiziertem Implantatversagen (periprothetische Osteolysen, *radiolucent line*) und Abrieb bedingter Titanpartikel wurde in einigen Studien belegt (Agins et al., 1988; Buly et al., 1992). Deshalb wurde in den letzten Jahren viel in die Forschung zur Verbesserung der Metalloberflächen orthopädischer Prothesen investiert. Neuste wissenschaftliche Erkenntnisse zeigen, dass die Förderung spezifischer Wechselwirkungen zwischen Zellen und Implantat die Immunakzeptanz und Immunintegration verbessert. Titanimplantate zeigten eine höhere Osseointegration, wenn vor dem Einsatz eine Modifikation der Oberflächen erfolgte, die eine Anlagerung und Einwanderung von knochenbildenden Zellen ermöglicht (Sridharan

et al., 2015). Trotz der Fortschritte bei der Entwicklung von Biomaterialien bleiben sie allerdings weiterhin anfällig für abriebbedingtes Implantatversagen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen Partikelcharakteristika bezüglich Größe, Form, Art und Menge einen Einfluss auf die Aktivierung von Makrophagen und die Produktion von Zytokinen haben (Bi et al., 2002; Nich et al., 2013). Durch ein verbessertes Verständnis hinsichtlich der Rolle von Makrophagen im Mechanismus der Knochenheilung verspricht man sich, effektivere Biomaterialien entwickelt zu können, die eine verbesserte Immunantwort bei den Implantaten hervorrufen und zukünftig Revisionsoperationen optimalerweise vermieden werden können.

1.3 Die Schlüsselrolle von Makrophagen in der periprothetischen Osteolyse

Makrophagen sind in der Lage, Abriebpartikel an den Gelenkflächen der Prothesen zu phagozytieren und entzündungsfördernde Zytokine zu sekretieren, die wiederum chronische Entzündungsprozesse initiieren. Sie nehmen somit eine Schlüsselrolle in der periprothetischen Osteolyse ein. Bei Makrophagen handelt es sich um eine heterogene Gruppe, die nicht nur in Knochen, sondern ubiquitär im Körper vorkommen und sich, je nachdem in welchem Gewebe sie sich befinden, morphologisch und phänotypisch voneinander unterscheiden. Sie interagieren mit der Matrix und anderen Zelltypen, sind in der Biosynthese aktiv und exprimieren eine breite Palette von verschiedenen Substanzen. Zudem tragen sie zur Erneuerung („*remodelling*“) des Gewebes bei, sind Bestandteil des angeborenen und adaptiven Immunsystems und in vielen Krankheitsprozessen involviert (S. Gordon & Martinez, 2010; S. Gordon & Taylor, 2005). Im Gegensatz zu T-Zellen können sie sich nicht nur an ihr Milieu anpassen, sondern auch effizient auf Umweltsignale reagieren, indem sie ihren Phänotyp verändern, ihre Plastizität aber beibehalten (Mosser & Edwards, 2008; Stout et al., 2005).

Aufgrund ihrer Heterogenität und Plastizität ist es schwierig, Makrophagenpopulationen anhand einzelner biochemischer Marker zu identifizieren, weshalb eine grobe Unterteilung, angelehnt an die Typ 1 T-Helferzelle (Th1) / Typ 2 T-Helferzelle (Th2) Nomenklatur (Mills et al., 2000), in zwei Gruppen erfolgte, bei der der M1 Phänotyp (klassisch aktiviert, proinflammatorisch) das eine Extrem und der M2 Phänotyp (alternativ aktiviert, entzündungshemmend, homöostatisch, Wundheilung) das andere Extrem darstellt (Mantovani et al., 2004; Mosser & Edwards, 2008).

M1 Makrophagen werden durch Interferon- γ (IFN- γ) und LPS aktiviert. Sie produzieren charakteristische pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6, IL-12, IL-23

und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und zeichnen sich durch eine geringe Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen wie IL-10 aus. Zudem sind sie effiziente antigenpräsentierende Zellen und sekretieren Effektormoleküle bei der Th1-Antwort. Im Gegensatz dazu werden M2-Zellen durch molekulare Signale wie IL-4, IL-13 und IL-10 aktiviert. Sie sind charakteristisch für hohe IL-4, IL-10, IL-13, IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) und Chemokin-Ligand-18 (CCL-18) Spiegel sowie die Expression von Oberflächenantigen CD206 (CD, *cluster of differentiation*). Sie besitzen immunregulatorische Fähigkeiten und sind in Th2-Reaktionen involviert (Simon Gordon, 2003; Mosser & Edwards, 2008). Die Eigenschaften der jeweiligen Makrophagenpopulationen werden in Abbildung 2 nochmals übersichtlich dargestellt.

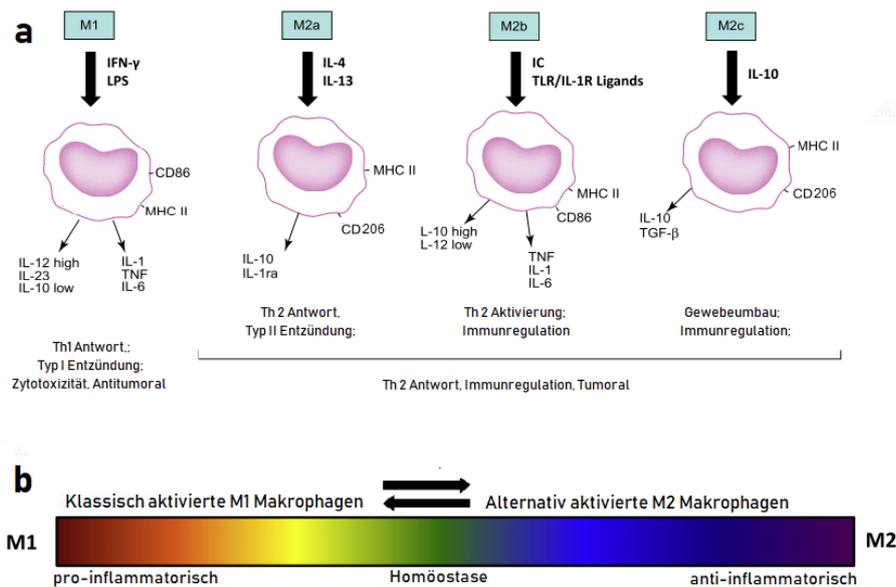


Abbildung 2: Makrophagenpolarisationsparadigma

(a) Auslöser und funktionale Eigenschaften verschiedener Makrophagenpopulationen: Makrophagen polarisieren und reagieren mit unterschiedlichen Eigenschaften auf Signale anderer Zellen in der Umgebung durch Expression von Oberflächenmolekülen, sowie Produktion von Zytokinen und Effektormolekülen.

(b) Vereinfachte Darstellung der Makrophagenpolarisation. Die hochkomplexe Makrophagenpolarisation stellt ein Spektrum zwischen dem M1- und M2-Extrem dar (Mosser & Edwards, 2008). Makrophagen besitzen nach Aktivierung eine bemerkenswerte Plastizität und die Phänotypen, M1 zu M2 bzw. M2 zu M1 können ineinander übergehen (Stout et al., 2005).

Abkürzungen: CD, *cluster of differentiation*; IC, *immune complex*; IFN- γ , *interferon gamma*; IL, *interleukin*; LPS, *lipopolysaccharide*; MHC, *major histocompatibility class*; TGF- β , *transforming growth factor beta*; TLR, *toll-like receptor*; TNF, *tumor necrosis factor* (Abbildung modifiziert nach Brown & Badylak, 2013; Mantovani et al., 2004).

Der Begriff M2 Makrophagen umfasst als Obergruppe praktisch alle Makrophagen, die nicht zu der klassisch aktivierten M1 Beschreibung passen. Die M2 Makrophagen werden durch externe Signale unterschiedlich aktiviert und können dadurch verschiedene Schlüsselfunktionen ausführen, weshalb eine Unterteilung in M2a, M2b und M2c Subgruppen erfolgte. Die genaue Rolle jedes M2 Subtyps konnte noch nicht exakt definiert werden, sie repräsentieren weiterhin lediglich die Extreme eines Kontinuums (Mantovani et al., 2004). Wiederum andere Studien haben eine andere Klassifikationsmöglichkeit gewählt, indem sie Makrophagen in drei Kategorien, bestehend aus klassisch aktivierten, wundheilenden und regulatorischen Makrophagen, aufgeteilt haben (Mosser & Edwards, 2008).

Gemäß Rao et al. nehmen Makrophagen als Antwort auf Abriebpartikel nach Gelenkersatz überwiegend den M1-Phänotyp mit hauptsächlich entzündungsfördernden Eigenschaften an und keinen M2-Phänotyp, der zu einem entzündungshemmenden Charakter neigen würde (Rao et al., 2012). Daraus abgeleitet trägt die Makrophagenpolarisation in Richtung eines M1-Phänotyps entscheidend zur periprothetischen Osteolyse bei. Forscher vermuten, dass eine Manipulation der Polarisation zu einem antiinflammatorischen Phänotyp mit einer Dominanz von M2-Makrophagen sowohl die Knochenheilung als auch die Bildung von neuem Knochengewebe fördern würde (Antonios et al., 2013). Diese Hypothese legt nahe, dass die Identifizierung der aktivierten Makrophagen-Zustände und die Ausrichtung der Makrophagenpolarisation von M1 auf M2 (oder umgekehrt) zukünftig entscheidend zur Maximierung der Langlebigkeit von künstlichen Gelenken beitragen könnte.

1.4 Die Bedeutung von mesenchymalen Progenitoren

Abriebpartikel erhöhen nicht nur die Knochenresorption durch Aktivierung von Makrophagen und Osteoklasten, das Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels in periimplantärem Gewebe wird auch direkt durch Hemmung der knochenbildenden Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen beeinträchtigt (Pajarinen et al., 2017).

Mesenchymale Stammzellen werden als multipotente adulte Stammzellen beschrieben, die aus verschiedenen menschlichen Geweben wie Knochenmark, Fettgewebe, Plazenta, Nabelschnur, Zahnmark oder Synovium isoliert werden können und die Fähigkeit besitzen, sich zu Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten und einigen anderen Zelltypen differenzieren zu können (Kalervo Väänänen, 2005). Die Internationale Gesellschaft für zelluläre Therapie (*International Society for Cellular Therapy*) hat Minimal Kriterien vorgeschlagen, um Zellen als mesenchymale Progenitoren zu definieren. In der Dissertationsschrift wird aufgrund der im Wandel befindlichen Definition und Erkenntnisse der

Begriff mesenchymale Stromazelle (MSC) verwendet. MSC müssen (1) *in vitro* an Plastik-Zellkulturoberflächen haften; (2) die Oberflächenantigene CD105, CD73, CD90 exprimieren, keine Expression von CD45-, CD34-, CD14- oder CD11b-, CD79 α - oder CD19- und HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen – DR Isotyp*) – Oberflächenmarkern aufweisen; und (3) die Fähigkeit haben, sich *in vitro* zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren (Dominici et al., 2006; Viswanathan et al., 2021).

MSC bieten beachtliche Perspektiven in der Behandlung unzähliger Krankheitsbilder, einschließlich Graft-versus-Host-Krankheit, Organtransplantation, Diabetes, kardiovaskulärer, neurologischer, hämatologischer, pulmonaler, hepatischer, nephrologischer, entzündlicher und ossärer Erkrankungen (Squillaro et al., 2016; Wei et al., 2013). Das therapeutische Potenzial dieser Zellen ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Sie haben die Fähigkeit, (1) an den genauen Ort der Verletzung zu wandern, (2) sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, (3) lösliche Faktoren zu sezernieren, die für das Überleben oder die Proliferation der Zellen entscheiden sind und (4) die Immunantwort zu modulieren (Squillaro et al., 2016). Die Vorteile von MSC sind, dass sie sich leicht aus adulten Geweben isolieren lassen, *in vitro* kultiviert werden können und im Vergleich zu embryonalen, pluripotenten und induzierten pluripotenten Stammzellen relativ sicher sind in Bezug auf ihr Entartungspotential und Tumorrisiko.

Eine vielversprechende Alternative, um beispielsweise Endoprothesen-assoziierte Knochendefekte zu heilen, könnte die direkte lokale Applikation von aus Knochenmark stammenden MSC sein (Jäger et al., 2006). Durch die gegenseitige Beeinflussung zwischen Makrophagen und MSC im Zusammenhang mit Frakturheilung und Knochenregeneration werden die Funktionen von MSC reguliert (Pajarinen et al., 2017). Basierend auf der Hoffnung, zukünftig sowohl die Knochenregeneration zu verbessern als auch eine Alternative in der Therapie periprothetische Osteolyse zu schaffen, hat in jüngster Zeit das Interesse, die Interaktion zwischen MSC und Makrophagen besser zu verstehen, stark zugenommen.

1.5 MSC geprägte Makrophagen

Das Konzept der "MSC geprägten Makrophagen" (MGM) wurde erstmals von Kim und Hematti angebracht (J. Kim & Hematti, 2009). Sie fanden heraus, dass Makrophagen nach 3-tägiger Kokultivierung mit MSC den M2 Phänotypen annehmen. MGM zeichnen sich durch den Oberflächenmarker CD206 für alternativ aktivierten Makrophagen aus und besitzen eine einzigartige entzündungshemmende Signatur (IL-10 \uparrow , IL-12 \downarrow IL-6 \uparrow und TNF- α \downarrow). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden MGM als eine Art alternativ aktivierter Phänotyp von

Makrophagen definiert, der sich von den bisher beschriebenen M2 Subkategorien von Makrophagen aufgrund ihrer erhöhten Produktion von IL-6 unterscheiden (Eggenhofer & Hoogduijn, 2012).

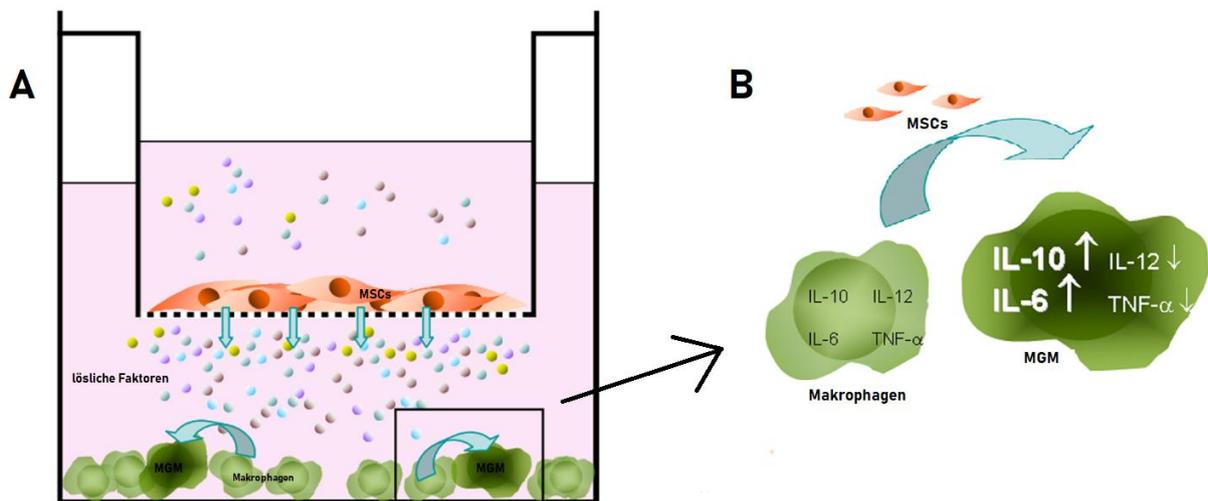


Abbildung 3: Generierung von MSC-geprägten Makrophagen (MGM)

(A) Kokultivierung von MSCs und ruhenden Makrophagen in einem Transwell-Zellkultursystem. Poren mit einer Größe von $0,4\mu\text{m}$ ermöglichen den Austausch von MSC-produzierten löslichen Faktoren von der oberen Kammer (MSC) zur unteren Kammer (Makrophagen), erlauben jedoch keinen Zeldurchtritt. (B) Die schematische Übersicht zeigt die Umwandlung von mit MSCs stimulierten Makrophagen zu MGMs (MSC geprägte Makrophagen). Die Pfeile der MGMs markieren eine Hoch- (\uparrow) oder Herunterregulation (\downarrow) der Zytokine (Abbildung modifiziert nach Eggenhofer & Hoogduijn, 2012).

Die Mechanismen, die den durch MSC vermittelten immunsuppressiven Wirkungen zugrunde liegen, sind nicht vollständig geklärt, scheinen jedoch größtenteils durch eine Anzahl von löslichen Faktoren vermittelt zu werden (Maggini et al., 2010). Somit können MSC, selbst wenn sie nicht in direktem Kontakt mit den infiltrierenden und residenten Makrophagen stehen, sondern physisch über eine Membran getrennt sind, über einen parakrinen Signalweg durch lösliche Stoffe miteinander kommunizieren und unabhängig von direktem Zell-Zell-Kontakt die Expression eines entzündungshemmenden M2 Profils initiieren (Freytes et al., 2013).

MGM zeichnen sich unter anderem auch durch eine verminderte Reaktion auf adhärenente Endotoxine wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS), primärer Bestandteil der äußeren Zellwandkomponente gramnegativer Bakterien, aus. LPS kommen häufig bei bakteriellen Infektionen in künstlichen Gelenken vor und vermittelt unterschiedliche biologische Reaktionen (Sundfeldt et al., 2006). Bi et al. zeigten, dass die Entfernung von Endotoxinen aus Titanpartikeln die partikelinduzierte Osteolyse um 50-70% reduzierte, während die Zugabe von Endotoxin zu den Partikeln die partikelinduzierte Osteolyse wiederherstellte (Bi et al., 2002). Makrophagen agieren dabei äußerst empfindlich auf LPS und selbst sehr geringe Mengen an

LPS können Makrophagen aktivieren und einen Anstieg des inflammatorischen Zytokinspiegels bewirken.

MSC können den im Verlauf von Entzündungsreaktionen, wie sie bei der periprothetischen Osteolyse vorkommen, über die Rekrutierung und Differenzierung von Makrophagen die Ausbildung eines regulatorischen Phänotyps (IL-10 ↑, IL-12 ↓, IL-6 ↑ und TNF-α ↓) begünstigen. Bei der Untersuchung der durch MSC vermittelten immunmodulatorischen Effekte befassten sich die meisten Studien bisher hauptsächlich mit dem Zusammenspiel zwischen MSC und T- und B-Lymphozyten, dendritischen Zellen oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Nauta & Fibbe, 2007). Über die Interaktionen von MSC mit Makrophagen ist jedoch nur sehr wenig bekannt. MGM haben ein vielversprechendes Potential, als Therapiealternative bei der Regeneration und Reparatur von Knochengewebe eingesetzt zu werden. Aus diesem Grund untersucht diese Arbeit die Reaktion von MGM unter inflammatorischen Bedingungen, indem humane Makrophagen aus Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut direkt oder indirekt mit MSC aus dem Knochenmark menschlicher Hüftköpfen kokultiviert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsaufbau

Tabelle 1: Blut- und Knochenmarkspender/innen
Abkürzungen: m, männlich; w, weiblich; P, Passage

Block	0	0,5	1	4	5	6	8	9	13	
Alter	42/28	24	26/25	24/26	57	25/25	26/23	28/26	25/25	Blut-spender/innen
m/w	w/m	w	w/m	w/m	w	w/m	w/m	w/m	m/m	
Alter	70	70	60	55	55	55	51	51	60	Knochenmark-spender/innen
m/w	w	w	w	w	w	w	w	w	m	
P	P4	P5	P7	P8	P8	P7	P8	P8	P6	
Block	15	16	17	18	20	21	22	23	24	
Alter	25/29	29	27/27	26/46	26/28	22/26	26/25	29	30/44	Blut-spender/innen
m/w	w/m	m	m/m	w/m	w/w	m/w	m/w	m	m/w	
Alter	79	77	77	77	60/77	77	78	77	71	Knochenmark-spender/innen
m/w	m	w	w	w	w/w	w	w	m	m	
P	P6	P5	P4	P3	P4/P5	P4 6	P6	P5	P4	

Primäre humane Makrophagen wurden aus peripheren Monozyten (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) von freiwilligen und gesunden Spendern gewonnen (vgl. Tabelle 1). Die monozytären Vorläuferzellen wurden zunächst mittels *Ficoll*-Dichtegradientenzentrifugation separiert und aus der Interphase anschließend mit Hilfe von magnetisch aktivierter Zellseparation (MACS) isoliert. Die daraus gewonnenen CD14-positiven Monozyten wurden in Insulin-haltigem Medium über 10 Tage zu Makrophagen differenziert (modifiziert nach J. Kim & Hematti, 2009).

Die Gewinnung der MSC erfolgte aus Hüftköpfen von Patienten der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Uniklinikums Essen (vgl. Tabelle 1), die bedingt durch Coxarthrose oder Hüftkopfnekrose für einen totalen Gelenkersatz vorgesehen waren. Patienten mit aktiven oder chronischen Tumorerkrankungen, akuten oder chronischen systemischen Infektionen oder Infektionen im Bereich der Entnahmestelle (Os ilium) wurden von der Studie ausgeschlossen. Die mononukleären Zellen wurden aus der Spongiosa über eine Dichtegradientenzentrifugation separiert, aus der Interphase gewonnen und kultiviert. Nach Expansion der adhären Zellen über 2-3 Passagen wurde ihre Identität mittels durchflusszytometrischer Charakterisierung der typischen MSC-Oberflächenmarker (CD34-, CD45-, CD73+, CD90+, CD105+) bestätigt (Bozic et al., 2009).

Für die Entnahme der Blutproben und Hüftköpfe lag eine Bewilligung der lokalen Ethikkommission (16-6975-BO) und eine Einverständniserklärung zur Studienteilnahme sowie Speicherung und Veröffentlichung von Daten der Spender vor.

Nach 10 Tagen wurden die MSCs entweder direkt oder, mit Hilfe eines Transwell-Systems, indirekt für 4 Tage mit den Makrophagen kokultiviert (nach J. Kim & Hematti, 2009). Danach wurden in dem indirekten Kokultursystem die MSCs entfernt und die Makrophagen mit Ti-Partikeln für 6h oder 24h stimuliert. Während in den Kontrollansätzen keine Stimuli zugesetzt wurden, waren in den LPS-Ansätzen die Zellen mit bakteriellen LPS inflammatorisch stimuliert (positive Kontrolle).

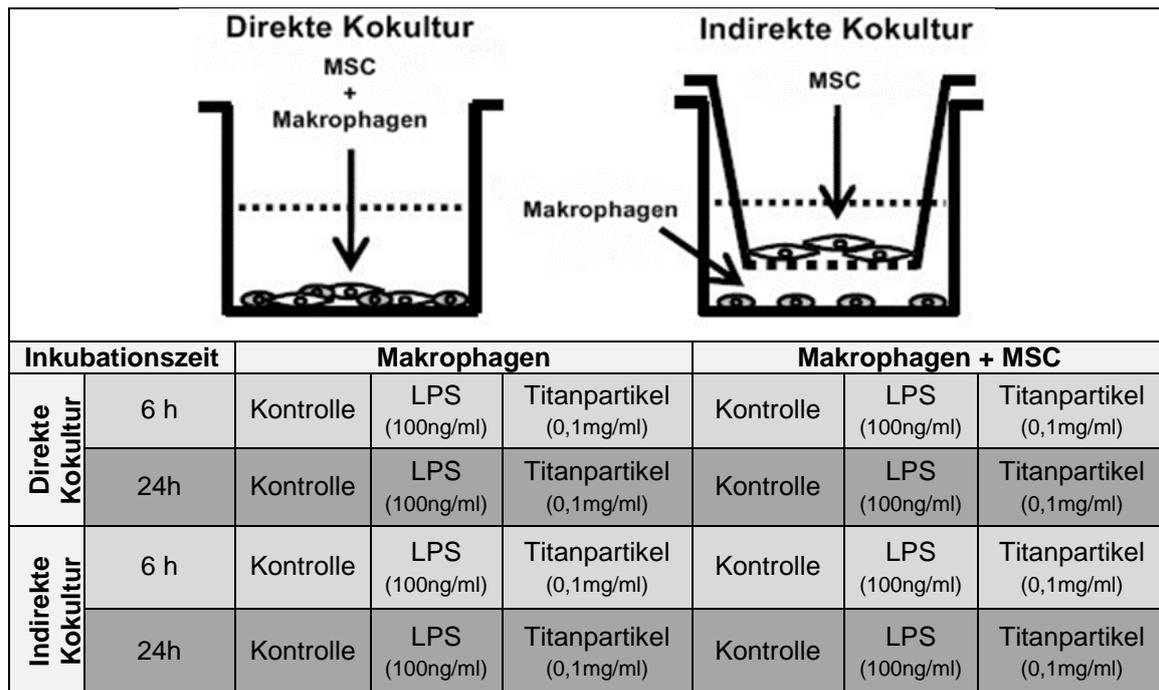


Abbildung 4: Direkte und indirekte Kokultur MSC-geprägter Makrophagen

Primäre humane Makrophagen wurden direkt (Zell-Zell-Kontakt) oder Indirekt (Transwell-System) mit MSC kokultiviert. Die Kokulturen werden, ebenso wie entsprechende Kontrollen ohne MSC, über 6 bzw. 24h mit LPS oder Titanpartikeln stimuliert. Die Makrophagenpolarisation im Vergleich zu den stimulierten Kontrollen wird über verschiedenste molekulare Marker bestimmt.

Die Reaktionen auf die osteolyseähnlichen Stimulationen wurden auf verschiedenste Weise analysiert. Die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine bzw. M1-Polarisationsmarker TNF- α und IL-6 sowie der antiinflammatorischen Zytokine bzw. M2-Polarisationsmarker IL-10, CCL-18 und IL-1Ra wurden mittels kommerziell erhältlichem *Enzyme-linked Immunosorbent-Assay* (ELISA) im Zellkulturüberstand quantifiziert. Die Expression des M1 Markers CD86 sowie des M2 Markers CD206 wurden auf Ribonukleinsäuren (RNA)-Ebene mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) sowie auf Proteinebene im Western Blot bzw. auf den Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2 Methoden

Die Protokolle und Methoden der vorliegenden Dissertationsschrift orientierten sich an der gegenwärtigen Laborliteratur (Mülhardt, 2013; Rehm & Letzel, 2016; Schmitz, 2020).

2.2.1 Chemikalien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen und entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad.

Tabelle 2: Hersteller mit Standorten

Hersteller	Standort
Bio-Rad	München
Carl Roth	Karlsruhe
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Merck	Darmstadt
Thermo Fischer Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Die für die Zellkultivierung verwendeten Medien und Zusätze wurden von den Firmen Thermo Fisher Scientific und Merck produziert.

2.2.2 Titanpartikel

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden Titanpartikel (Titan-Metall Pulver Grade A, UN1352; Chemetall, Frankfurt, Deutschland) mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 2µm verwendet. Kontaminationen der Partikel mit Endotoxinen wurden durch Vorbehandlung mit 70% Ethanol über 48h entgegengewirkt (Kauther et al., 2010; J. Xu et al., 2010). Nachfolgend wurden die Partikel in sterilem *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gewaschen und mittels Sonifikation in einem Ultraschallbad voneinander abgelöst. Als Stammlösung mit einer Konzentration von 10mg/ml wurden die Partikel für den späteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Für die Experimente der Kokultur wurden Partikel in einer Konzentration von 0,1mg/ml (W. Chen et al., 2015; Cui et al., 2014) verwendet.

2.2.3 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (#L-6529 Sigma, Saint-Louis, USA), isoliert aus *E. coli*, Hauptbestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, wurden in PBS gelöst und einer Stammlösung von 100mg/ml bei -20°C gelagert. LPS in der Konzentration von 100ng/ml wurde für die Experimente verwendet.

2.2.4 Oligonukleotide

Zur Amplifikation von CD86, CD206 und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) kam für die PCR der *QuantiTect® Primer Assay* (Qiagen, Hilden) zum Einsatz. Der Primer wurden in 1,1ml Tris Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Puffer (TE-Puffer, Fluka Biochemika, Steinheim), pH 8.0, zu einer 10-fachen Primerlösung konstituiert und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Makrophagen- und MSC-Kulturen

2.2.5.1 Isolation von PBMCs

Peripheres Blut wurde durch die venöse Blutentnahme freiwilliger gesunder Spender gewonnen. Anschließend erfolgte die Isolation peripherer PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation und MACS.

2.2.5.2 Dichtegradientenzentrifugation

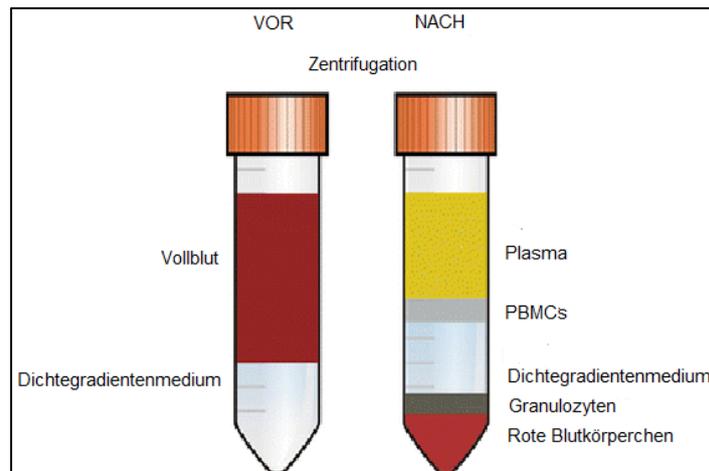


Abbildung 5: Röhrchen mit Dichtegradientenmedium vor und nach Zentrifugation
Abkürzungen: PBMCs, peripheral blood mononuclear cells

Bei der Dichtegradientenzentrifugation handelt es sich um eine physikalische Trennmethode, die eine Auftrennung von PBMCs und *red blood cells* (RBC) aus Vollblut bezüglich ihrer Dichte ermöglicht. Das venöse periphere Vollblut wurde in Heparinröhrchen entnommene und in einem Verhältnis von 1:1 mit DPBS und 2% fötalem Kälberserum (FKS) versetzt. Die Verdünnung wurde in das mit Dichtegradientenmedium (Ficoll Paque™ Premium, 1,078g/ml, GE Healthcare, Chalfont, UK) befüllte *SepMate* Röhrchen pipettiert und bei 1.200xg für 10min

zentrifugiert. Die trübe Interphase aus PBMCs wurde zusammen mit der oberhalb gelegenen Zellplasmaschicht abgeschüttet und gemäß Herstellerangaben gewaschen und zentrifugiert.

2.2.5.3 Magnetische Separation der Monozyten aus PBMCs mit MicroBeads

Die CD14+ Monozyten wurden mittels MACS aus der Interphase isoliert. MACS ist ein von der Firma *Miltenyi Biotec* entwickeltes Verfahren zur magnetischen Auftrennung einer Zellsuspension beruhend auf der Markierung einer gewünschten Zellpopulation mittels paramagnetischer *MicroBeads*. In dieser Arbeit wurden die in den PBMCs enthaltenen CD14+ Monozyten mit humanen CD14 *MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) markiert und anschließend magnetisch von den unmarkierten Zellen getrennt. Die Gewinnung der CD14+ Monozyten erfolgte durch mehrmaliges Spülen nach dem Abschalten der magnetischen Wirkung.

2.2.5.4 Durchflusszytometrie bei Makrophagen

Die Durchflusszytometrie (auch „FACS“, *Fluorescence Activated Cell Scanning*) beschreibt ein Messverfahren, bei dem verschiedene Parameter einer gefärbten Zelllösung durch Beleuchtung eines mit Hilfe eines Laserstrahls entstandenen Streu- und Fluoreszenzlichts bestimmt werden können. Zur Reinheitsbestimmung der gewonnenen CD14+ Monozyten (vgl. 2.2.5.3) erfolgte eine Oberflächenfärbung mit den Antikörpern CD3 und CD14 nach Anweisung des jeweiligen Hersteller-Protokolls.

2.2.5.5 Kultivierung von Makrophagen

Tabelle 3: Kulturmedium Makrophagen

Kulturmedium Makrophagen	Konzentration
IMDM	1x
FCS	10% (v/v)
MEM NEAA (100x)	1x
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml
Insulin Solution	4µg/ml

CD14+ Zellen wurden in 24-Well Platten mit einer Konzentration von ca. 300.000 Zellen/Well (ca. ~158.000 Zellen pro cm²) in einem Kulturmedium, bestehend aus *Iscove's modified Dulbecco's Medium* (IMDM), 10% FCS, Insulin (4µg/ml), 1% Penicillin/Streptomycin und 1x

Minium Essential Medium *Non-Essential Amino Acids* (MEM NEAA), ausgesät. Mögliche mikrobielle Kontaminationen sowie die Morphologie und Dichte der Zellen wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert. Das Kulturmedium wurde während der Differenzierung an Tag 3, 7 und 10 ausgewechselt.

2.2.5.6 Isolation von MSCs

Tabelle 4: Kulturmedium MSCs

Kulturmedium MSCs	Konzentration
DMEM	1x
FCS	10% (v/v)
MEM NEAA (100x)	1x
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100µg/ml
Insulin Solution	4µg/ml

Das feste Spongiosamaterial wurde mit einer Luerzange aus dem Hüftkopf entfernt, zum Erweichen in Collagenase D (Merck, Darmstadt) resuspendiert und für 15min inkubiert. Das flüssige Material wurde anschließend gefiltert und in DPBS gewaschen. Nach der Dichtegradientenzentrifugation (vgl. 2.2.5.2) wurden die Zellen in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), Kulturmedium angereichert mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2mM L-Glutamin und 1mM Natrium-Pyruvat, überführt. Mögliche mikrobielle Kontaminationen sowie die Morphologie und Dichte der Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Kultivierung erfolgte in Gewebekulturflaschen.

2.2.5.7 Kultivierung und Splitten von MSCs

Die in Gewebekulturflaschen ausgesäten MSC wurden in einem CO₂-Inkubator bei 37°C mit 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt gelagert. Das Kulturmedium wurde 2-3mal wöchentlich ausgewechselt. Um bestmögliche Wachstumsbedingungen für die Zellen sicherzustellen, wurden die Kulturen regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert und bei ca. 80% Konfluenz subkultiviert. Hierfür wurden die adhärennten Zellen mit *Accutase* (Thermo Fisher Scientific) gelöst, in einem Falcon Röhrchen vereinigt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und in 2 frische Kulturflaschen mit vorgewärmtem Medium aufgesplittet.

2.2.5.8 Durchflusszytometrie bei MSC

In der dritten oder vierten Passage erfolgte eine Reinheitsbestimmung der MSC durch Oberflächenfärbung mit den Antikörpern CD29, CD31, CD34, CD45, CD73, CD 90 und CD105 nach Anweisung des jeweiligen Hersteller-Protokolls mit anschließender Durchflusszytometrie (vgl. 2.2.5.4).

2.2.5.9 Einfrieren und Auftauen von MSC

Um für die bevorstehenden Experimente ausreichend Reservematerial zur Verfügung stellen zu können, wurden die Zellen tiefgefroren. Nach der gezielten Vermehrung erfolgte das Auszählen der Zellen und die Verteilung auf 750.000 Zellen pro Kryoröhrchen. Vor dem stufenweisen Einfrieren wurden die MSCs mit gekühltem Einfriermedium aus 10% (v/v) DMSO und 90% (v/v) FCS behandelt. Für die Langzeitlagerung wurden Lagerbehälter für Flüssigstickstoff verwendet. Die kryokonservierten Zellen wurden zunächst bei 37°C im Wasserbad angetaut, um das penetrierende Kryoprotektiva DMSO zu lösen und anschließend in die Gewebekulturflaschen mit vorgewärmtem Kulturmedium ausgesät. Mögliche mikrobielle Kontaminationen sowie die Morphologie und Dichte der Zellen wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert. In der hier vorliegenden Arbeit wurden für die Experimente MSC aus den Passagen 4 bis 8 verwendet (vgl. Tabelle 1).

2.2.5.10 Kokultivierung von Makrophagen und MSC

Nach 10 Tagen wurden die Makrophagen (vgl. 2.2.5.5) für die Differenzierung von MGM entweder indirekt über MSC beladene Transwell Inserts oder direkt mit MSC kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für zusätzliche 4 Tage im CO₂-Inkubator bei 37°C mit 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt kokultiviert.

2.2.5.10.1 Indirekte Kokultur

Für die indirekte Kokultur wurden an Tag 9 MSC mit einer Konzentration von 50.000 Zellen/Insert in Transwell Inserts befüllt. Die Transwell Inserts besitzen am Boden eine Membran mit 0,4µm großen, zylinderförmigen Poren, über die ein Austausch zwischen den Zellen ohne direkten Zellkontakt stattfinden kann. Zudem sind sie mit einer *Polyethylen Terephthalat* (PET) Membran ausgekleidet, die ein Zellwachstum sowohl auf der Innenseite als auch auf der Außenseite ermöglicht. Die MSC in den Inserts wurden in IMDM über Nacht inkubiert und am nächsten Tag in die mit den kultivierten Makrophagen bewachsenen 24 Wellplatten gesetzt.

2.2.5.10.2 Direkte Kokultur

Zur Differenzierung von MGM mit direktem Zell Kontakt wurden MSC (ca. 50.000 Zellen/Well) zu den 10 Tage alten Makrophagen (ca. 300.000 Zellen/Well) gegeben.

2.2.5.10.3 Stimulation von MGM mit LPS und Titan

Nach viertätiger Kokultivierung wurden die Transwell Inserts verworfen. Die Zellen in den 24-well Kulturplatten mit einem Gesamtvolumen von 1ml wurden durch die Behandlung mit LPS (100ng/ml) oder Ti-Partikel (0,1mg/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die weder mit LPS noch mit Titan Partikeln behandelt wurden.

Nach 6 bzw. 24-stündiger Inkubation wurde das Experiment beendet. Die sezernierten Proteine im Zellkulturüberstand wurden gesammelt, zentrifugiert und bei -20°C für deren spätere Quantifizierung (vgl. 2.2.7.5) gelagert. Die Zellpellets wurden für die Isolation von RNA oder Proteinen für die weitere molekularbiologischen bzw. proteinbiochemischer Analyse verwendet (vgl. 2.2.6.3 und 2.2.7.4).

Tabelle 5: Schema der Stimulation der Kokulturen

Primäre humane Makrophagen wurden direkt (Zell zu Zell Kontakt) oder Indirekt (*Transwell*-System) mit MSC kokultiviert. Die Kokulturen wurden, ebenso wie entsprechende Kontrollen ohne MSC, über 6h bzw. 24h mit LPS oder Titanpartikeln stimuliert. Die Makrophagenpolarisation im Vergleich zu den stimulierten Kontrollen wurden über verschiedenste molekulare Marker bestimmt.

Inkubations-Dauer		Makrophagen			Makrophagen & MSC		
Direkte Kokultur	6 h	Kontrolle	LPS (100ng/ml)	Ti-Partikel (0,1 mg/ml)	Kontrolle	LPS (100ng/ml)	Ti-Partikel (0,1mg/ml)
	24h	Kontrolle	LPS (100ng/ml)	Ti-Partikel (0,1mg/ml)	Kontrolle	LPS (100ng/ml)	Ti-Partikel (0,1mg/ml)
Indirekte Kokultur	6 h	Kontrolle	LPS (100ng/ml)	Ti-Partikel (0,1mg/ml)	Kontrolle	LPS (100ng/ml)	Ti-Partikel (0,1mg/ml)
	24h	Kontrolle	LPS (100ng/ml)	Ti-Partikel (0,1mg/ml)	Kontrolle	LPS (100ng/ml)	Ti-Partikel (0,1mg/ml)

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Isolation von Ribonukleinsäure

Nach Abschluss der experimentellen Behandlung der Kokultur (vgl. 2.2.5.10) erfolgte mit Hilfe des *Nucleo Spin RNA II (50) Isolation Kit* (Macherey-Nagel, Düren) die Aufreinigung von RNA aus dem Zelllysat zur weiteren molekularbiologischen Analyse laut vom Hersteller beigelegten Protokoll. Die Zellplatten wurden mit PBS gespült und anschließend die Zellpellets in RP1-

Lysepuffer mit β -Mercaptoethanol aufgenommen. Für die zunächst grobe Filtration wurde das Zellysate auf den Nucleo-Spin-Filter geladen, bei 11.000xg abzentrifugiert und mit 70%igen Ethanol vorsichtig vereinigt. Zur säulenchromatographischen Auftrennung der RNA wurde das Lysat-Ethanol-Gemisch auf die Nucleo-Spin-Säule überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde *Membrane Desalting Buffer* (MDB) auf die Spin-Säule hinzugeben. Mögliche Kontaminationen der RNA mit Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurden durch Zugabe des Enzyms rDNase (rekombinante Deoxyribonuklease) beseitigt. Nach Aufreinigung, den Herstellerangaben folgend mittels diverser Waschriffe, wurde die hochreine RNA in 50 μ l warmen rDNase-freiem Wasser abgelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.6.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrationsbestimmung wurde standardmäßig über eine OD (optische Dichte) 260/280 Messung der RNA Lösung bestimmt, da die in den Basen der RNA enthaltenen aromatischen Ringsysteme bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ einen charakteristischen Verlauf der Absorptionskurve aufzeigen. Die spektralphotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration (vgl. 2.2.6.1) erfolgte in der hier vorliegenden Arbeit über das NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen) sowie des „RNA-40“ Programms der NanoDrop® 1000 V3.7.0-Software (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Zur Initialisierung des Gerätes und als Referenz diente RNase (Ribonuklease) freies Wasser. Jeweils 1,5 μ l unverdünnte RNA wurde auf die Nanodrop Messfläche pipettiert, die gemessenen Konzentrationen wurden in ng/ μ l aufgeführt.

2.2.6.3 Quantitative-Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein zweistufiges quantitatives Echtzeit-PCR (qPCR) - System verwendet, bestehend aus dem Umschreiben der RNA in *komplementäre* DNA (cDNA), und der anschließenden quantitativen PCR mit Amplifikation spezifischer Sequenzen.

2.2.6.3.1 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wurde RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben und diente damit als Ausgangsmaterial für die anschließende qPCR. 500ng RNA aus dem Zellysate MSC-geprägter Makrophagen wurden mit 1 μ l Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer vereinigt und im Thermocycler über 5min bei 60°C denaturiert. Um eine Hybridisierung des Primers zu ermöglichen, wurden die Proben anschließend auf Eis gestellt. Mit Hilfe des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) erfolgte, den Anweisungen des vom Hersteller beigefügten Protokolls folgend, die Umschreibung in cDNA bei 37°C mit 220U *RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase*. Für den späteren Gebrauch wurde die cDNA unverdünnt bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 6: Standard-Reaktionsansatz RT

Standard-Reaktionsansatz RT	
RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200U/μl)	1μl
RiboLock RNase Inhibitor (20U/μl)	1μl
5 x Reaktionspuffer	4μl
10mM dNTP Mix	2μl
Oligo(dT)18-Primer (0,5μg/μl)	1μl
500ng gesamt RNA	Xμl
RNase-freies Wasser	ad 11μl - Xμl RNA

2.2.6.3.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation spezifischer Sequenzen der zuvor umgeschriebenen cDNA (vgl. 2.2.6.3.1) erfolgte mit einem für die qPCR charakteristischen Ablauf bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation.

Tabelle 7: Standard- Reaktionsansatz qPCR

Reaktionsansatz mit Eurofins-Primern	Reaktionsansatz mit Qiagen-Primern
QuantiTect SYBR Green 12,5 μl	QuantiTect SYBR Green 12,5μl
RNase-freies Wasser 8μl	RNase-freies Wasser 7,5μl
Primer sense 1μl	QuantiTect Primer Assay (10x) 2,5μl
Primer antisense 1μl	QuantiTect Primer Assay (10x) 2,5μl
cDNA-Template (1:5 Verdünnung) 2,5μl	cDNA-Template (1:5 Verdünnung) 2,5μl

In der hier vorliegenden Arbeit kam das *QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Einsatz. Die Durchführung der qPCR erfolgte entsprechend dem vom Hersteller beigelegten Protokoll, wobei CD206 und CD86 als spezifische Zielgene und GAPDH als internes Referenzgen im Duplikat amplifiziert wurden. Verunreinigungen der Template-DNA wurden durch Kontrollreaktionen überprüft. Hierfür wurde pro Oligonukleotidpaar eine Kontrolle ohne das Enzym Reverse Transkriptase („no reverse transcription control“, NRT) und

eine Negativkontrolle („*no template control*“) ohne cDNA-Template durchgeführt. Die Messung der Reaktionsansätze erfolgte mittels AB7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA). Das in der folgenden Tabelle aufgeführte Standard qPCR-Programm mit Primer-spezifischen Annealing-Temperaturen (vgl. 2.2.4) kam hierbei zu Anwendung:

Tabelle 8: Standard qPCR-Programm mit Primer-spezifischen Annealing-Temperaturen

Standard-qPCR-Programm	Temperatur	Zeit
Initiation	50°C	2min
	95°C	15min
Zyklus (45x)	95 °C	15s
	55°C bzw. 60°C	33s
	72°C	33s
	Datengewinnung (SYBR Green Fluoreszenz)	
Dissoziation:	95°C – 50°C	je 15s
	95°C	15s

Für die Qualitätskontrolle wurde anschließend an die qPCR eine Schmelzkurvenanalyse (Dissoziation) durchgeführt, um möglich entstandene Nebenprodukte durch beispielsweise Bildung von Primer-Dimeren oder unspezifischer Amplifikation der cDNA zu identifizieren.

Der „*threshold cycle*“ (C_t -Wert) beschreibt den Zyklus, an dem die gemessene Fluoreszenzintensität des Reportermoleküls SYBR® Green erstmals einen definierten Schwellenwert (t , „*threshold*“) übersteigt. Für alle Experimente in dieser Arbeit wurde ein $t=0,05$ festgelegt.

Zur Ermittlung des ΔC_t -Werts, erfolgte für jede untersuchte biologische Probe eine Subtraktion der C_t -Wert des konstant regulierten Referenzgens GAPDH vom C_t -Wert des Zielgens:

$$\Delta C_t = C_t (\text{Ziel} - \text{Gen}) - C_t (\text{GAPDH})$$

Aufgrund der Doppelbestimmung der biologischen Proben wurde für die Bildung des ΔC_t -Wertes die von der SDS V1.3 Software (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA) ermittelten Mittelwerte für C_t verwendet.

$$\text{rel. Transkription [\%]} = 100 - \left(\frac{\Delta C_t}{C_t (\text{GAPDH})} * 100 \right) \quad (1)$$

$$\text{fold Expression} = \frac{\text{rel. Transkription Stimuliert}}{\text{rel. Transkription NK}} \quad (2)$$

Die relative Transkription der Zielgene im Verhältnis zum Referenzgen GAPDH wurde durch die Formel (1) berechnet. Der Einfluss der experimentellen Behandlung der MGM auf ihre Genexpression wurde nach Formel (2) bestimmt.

2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.2.7.1 Isolation von Proteinen/ Aufreinigung von Proteinen aus Zelllysat

Zur weiteren proteinbiochemischen Analyse erfolgte nach Abschluss der experimentellen Behandlung der Kokultur (vgl. 2.2.5.10.3) die Aufreinigung der Proteine aus den Zelllysaten. Die während der gesamten Isolation auf Eis gelagert Proben wurden zunächst dreimal mit kalten PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Hilfe von 1ml *RIPA Buffer* + 10 μ l *Protease Inhibitor Cocktail* (Thermo Fisher Scientific), wobei in jedes Well 50 μ l des RIPA Mixes pipettiert und die 24-Well-Platten für 20min auf dem Schüttler inkubiert wurden. Wahlweise mit einem *Zellscraper* oder einer Pipettenspitzen wurden die Zellen zusammengesammelt und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Die Proben wurden im Ultraschallbad zweimalig für 1min geschallt und anschließend wurde das unlösliche Material für 10min bei 13.000xg und 4°C abzentrifugiert. Die Überstände aus den Ansätzen mit gleicher experimenteller Behandlung wurden in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und bis zu weiteren Proteinquantifizierung bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die kalorimetrische Proteingehaltbestimmung der Zelllysate erfolgte laut Herstellerangaben mittels *Micro BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Die spektralphotometrische Methode beruht auf Verbindung eines violetten Farb-Metall-Komplexes mit Proteinen im alkalischen Milieu. Zweiwertige Kupferionen reagieren in Verbindung mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen, wodurch im Zusammenhang mit Bicinchoninsäure (BCA) eine Komplexverbindung mit violetter Farbe entsteht, die bei $\lambda=562\text{nm}$ gemessen werden kann. Die Proben wurden mit sterilem Wasser und definiertem BSA (Bovines Serumalbumin) Proteinstandard mit einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ in den Vertiefungen der 96-well Mikrotiterplatte vereinigt, mit einer Folie verschlossen und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometers (Peqlab, Erlangen) im Duplikat.

2.2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Technik, die sich die elektrophoretische Mobilität von Protein zu Nutze macht und diese aufgrund ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld auftrennt. Das Gesamtprotein aus den Zelllysaten (vgl. 2.2.7.2) der MGM wurde unter der Verwendung von 8–16% *Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gele* (Bio-Rad) aufgetrennt. Die Gele wurden in einer Mini-Gel Twin Gelelektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) befestigt mit den zu quantifizierenden Proben (ca. 15µg Gesamtproteine pro Geltasche) sowie für die Positivkontrolle zwei Größenstandards, Precision Plus Dual Color Protein Standard (10–250kDa (kilo Dalton); Bio-RadSA) und Magic Marc XP (20-220kDa; Thermo Fisher Scientific) befüllt. Nachdem die Kammer mit 1xTris-Glycin-SDS-Laufpuffer bedeckt wurde, erfolgte bei RT und 180V für 45min die elektrophoretische Auftrennung.

Tabelle 9: SDS-Laufpuffer

10xTris-Glycin-SDS-Laufpuffer	
Tris Base	29g
Glycin	144g
SDS	10g
Methanol	ad 1l

2.2.7.4 Western Blot

Der Western Blot stellt eine Methode zur Identifizierung von Protein dar wobei die Proteine zunächst von einem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran transferiert und anschließend mit Hilfe immunologischer Verfahren detektiert werden. In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis humaner CD86 und CD206 (Mannose) auf Proteinebene. Hierfür wurden die Proteine mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt (vgl. 2.2.7.3) und zur spezifischeren Visualisierung aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Bio-Rad, München) transferiert. Die Blotkammer wurde mit 1xTowbin-Transferpuffer befüllt und bei 100V unter Raumtemperatur für 50min erfolgte die Übertragung der Proteine. Für die Überprüfung des Blotterfolgs wurde die Membran mit Ponceau-Lösung, ein reversibel an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen bindender Farbstoff, gefärbt und anschließend in 5% (w/v) Milchpulver oder 3% (w/v) BSA geblockt.

Tabelle 10: Towbin-Transferpuffer

1xTowbin-Transferpuffer (pH8)	
Tris Base	25 mM
Glycin	192mM
SDS	0,1% (w/v)
Methanol	10% (v/v)
Ponceau-Lösung	
Ponceau S	0,15 (w/v)
Essigsäure	5% (v/v)
Blockpuffer	
BSA	3% (w/v)
Milchpulver	5% (w/v)

Die Membran wurde bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler mit monoklonalen anti-humanen CD86 Antikörpern (ab53004, 1:1000-Verdünnung in Blockpuffer; Abcam, Cambridge, UK) oder polyklonalen anti-humanen CD206 Antikörpern (ab646993, 1:1000-Verdünnung in Blockpuffer; Abcam, Cambridge, UK) aus dem Kaninchen inkubiert. Für die Immundetektion wurde als Referenz der Nachweis humaner GAPDH mittels polyklonalen anti-GAPDH Antikörper aus dem Kaninchen (sc-25778, 1:1000-Verdünnung in Blockpuffer, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) verwendet.

Die Membran wurde am nächsten Tag bei Raumtemperatur für 3x8min mit DPBS gewaschen und mit einem Sekundärantikörper konjugiert. Hierfür kam der anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege (A0545; 1:20000-Verdünnung in DPBS- mit 1% Tween, DPBS-T, Merck, Darmstadt) zum Einsatz. Nach der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit DPBS gewaschen, um die überzähligen Antikörper zu beseitigen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels Pierce ECL plus Western Blotting Substrat (Thermo Fisher Scientific). Dabei handelt es sich um ein Chemolumineszenz-Substratsystem, das mit dem Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelten Sekundär-Antikörper reagiert und die farbigen Banden auf der Membran entstehen lässt, die mit Hilfe des Chemilumineszenz-Detektionssystems (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich) visualisiert und der Fusion SL Bildanalyse-Software (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich) ausgewertet wurden.

2.2.7.5 Enzyme-linked Immunosorbent-Assay

Der ELISA ist eine quantitative immunologische Methode, die als Nachweisverfahren bestimmter Proteine oder Enzyme dient. Das ausgewählte ELISA-Verfahren beruht auf dem Sandwich-Prinzip. Auf dem Boden einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde das nachzuweisende Protein als Antigen zunächst an einen spezifischen, zuvor immobilisierten Primärantikörper („Capture Antibody“) gebunden. Anschließend wurde nach dreimaligem Waschen ein weiterer, gegen das Antigen gerichteter biotinylierter Sekundärantikörper („Detection Antibody“) zugegeben. Nach der Inkubation wurde erneut dreimal gewaschen und die Substratlösung zugefügt. Durch die Zugabe einer leichten Säure wurde die Reaktion gestoppt, was durch einen Farbumschlag von blau nach gelb sichtbar war. Anschließend konnte die Absorption mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät bei $\lambda=450\text{nm}$ detektiert werden.

Tabelle 11: Messbereiche der ELISA

ELISA	Messbereich [pg/ml]
DuoSet ELISA, human TNF- α	15,6-1000
DuoSet ELISA, human IL-1ra/IL-1F3	39–2500
DuoSet ELISA, human IL-6	9,375–600
DuoSet ELISA, human IL-10	31,25–2000
DuoSet ELISA, human CCL18/PARC	7,8–500

In der hier vorliegenden Arbeit wurde aus den Zellkulturüberständen (vgl. 2.2.5.10.3) die Zytokine IL-6, IL-1Ra, IL-10 und TNF- α sowie CCL-18 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) laut Herstellerangaben bestimmt. In Tabelle 11 sind die jeweiligen Messbereiche aufgeführt. Die Standardreihe und die Proben wurden immer paarig gegen Sample Diluent als Referenzwert mit dem Multiscan Ascent ELISA Reader für Mikrotiterplatten (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Mit Hilfe der MicroWin 4.44 Software (Mikrotek Laborsysteme, Overath) wurden die Proteinkonzentration in pg/ml aus der Standardreihe bestimmt und gemittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung des Ausgangsmaterials

3.1.1 Differenzierung der Monozyten aus dem Vollblut

CD14 positive mononukleäre Zellen wurden aus humanen PBMC isoliert. In Abbildung 6 wird exemplarisch die Charakterisierung der Monozyten mittels Oberflächenmarker CD14 dargestellt. Nach der magnetischen Separation mit CD14 *Beads* exprimierten durchschnittlich $94,3\% \pm 5,1$ [77,0% - 98,8%] der Zellen CD14, womit eine ausreichende Reinheit an Monozyten nachgewiesen werden konnten.

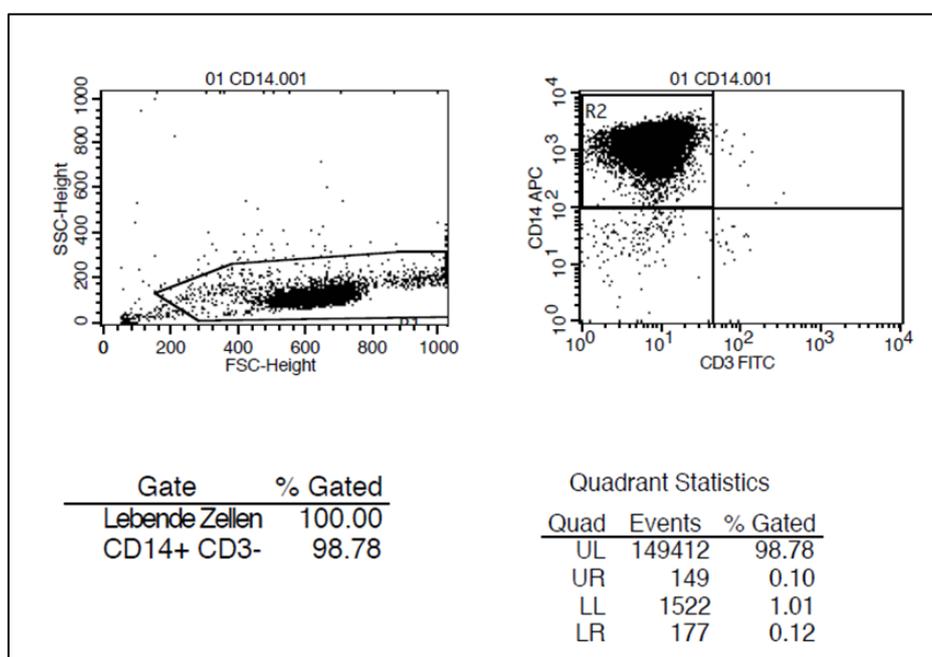


Abbildung 6: Charakterisierung der Monozyten mittels Oberflächenmarker CD14

Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrische Reinheitsbestimmung der Monozyten aus dem peripheren Blut von Proband 1 aus Block 13. Nachweis von CD14 auf fast 99% der Zellen, während keine CD3 positiven Zellen (T-Lymphozytenmarker) vorhanden waren.

Abkürzungen: SSC, sideward scatter; FSC, forward scatter; CD, cluster of differentiation; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; APC, Allophycocyanin

Die Behandlung der monozytären Zellen mit IMDM plus Insulin über 10 Tage führte zu Differenzierung von morphologisch polygonalen adhärennten Zellen, die zum Teil eine polygonale Morphologie aufweisen, die typisch für M1-ähnliche Makrophagen ist (Abumaree et al., 2013) (vgl. Abbildung 7).

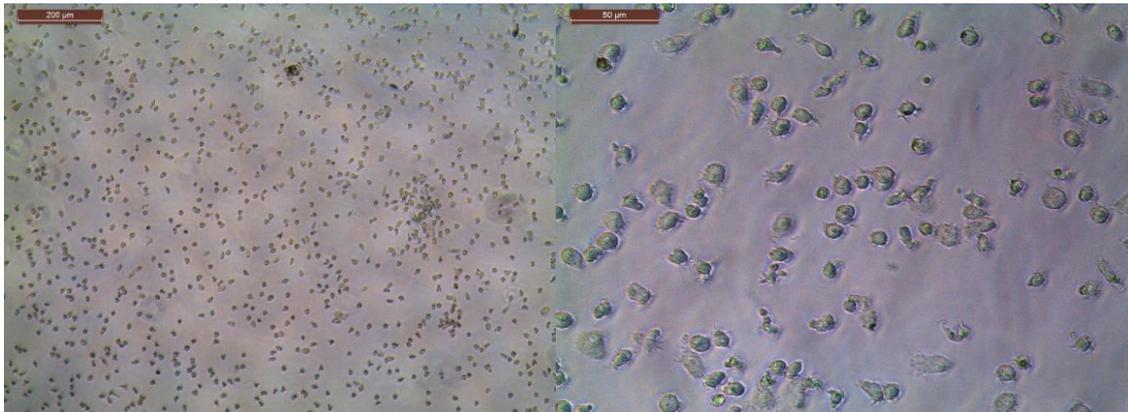


Abbildung 7: Morphologie differenzierter humaner Makrophagen isoliert aus PBMSC
 Differenzierte Makrophagen aus CD14 positiven monozytären Zellen. Die flach ausgebreiteten Zellen (Übersichtsbild links: x50) zeigen eine polygonale Morphologie (Detailbild rechts: x200) mit prominentem Zellkern.

3.1.2 Differenzierung der MSC

Aus menschlichen Hüftköpfen von insgesamt 11 Spendern wurden aus Spongiosamaterial Zellen kultiviert.

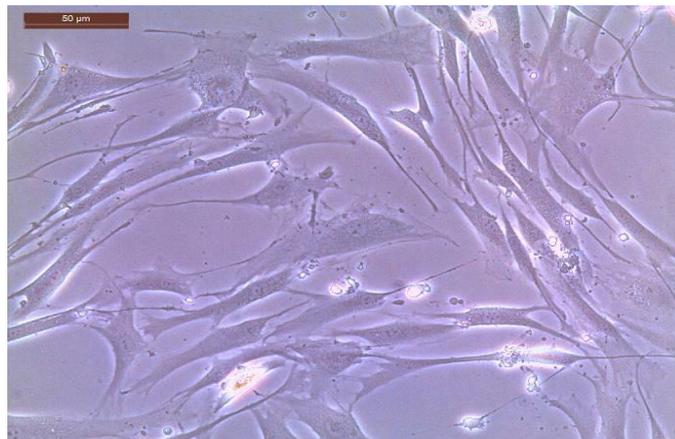


Abbildung 8: Morphologie humaner mesenchymaler Stammzellen
 Die Abbildung zeigt adhärente, länglich konfigurierte, humane mesenchymale Stammzellen unter dem Invertmikroskop (x200). Eine spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Morphologie ist für SS-hMSCs (*Spindel-Shape*) typisch.

Tabelle 12: Übersicht über die Analyse der MSC Charakterisierung

Charakterisierung der MSCs	CD73**	CD90**	CD105+ *	CD29**	CD31*	CD34*	CD45*
Summe der regelhaft erfolgten FACS-Analysen	11	11	10	11	7	11	8
<i>*siehe deutsche Stammzellliga (Bozic et al., 2009)</i>							

Die positive Färbung der Zellen mit den Oberflächenmarkern CD 29⁺, CD 73⁺, CD 90⁺ und CD 105⁺ sowie keine Färbung von CD31⁻, CD34⁻, CD45⁻ Antikörpern, (vgl. Tabelle 12 und Abbildung 9) identifizieren die Zellen als MSC, die damit die Anforderungen der deutschen Stammzellliga erfüllen (Bozic et al., 2009).

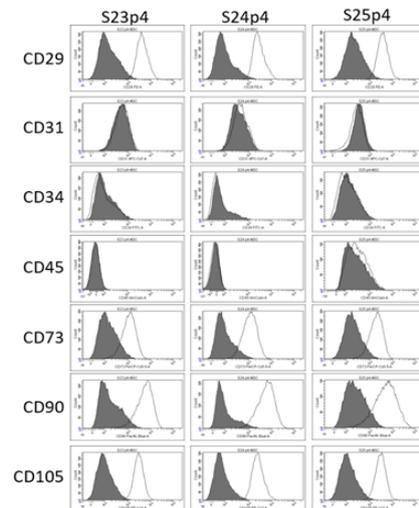


Abbildung 9: Charakterisierung anhand von Oberflächenmarkern durch FACS-Analyse

Die Abbildung zeigt exemplarisch die FACS Kontrollen aus den Chargen S23, S24 und S25. Die Reinheitsbestimmung erfolgte in der vierten Passage (p4) durch Oberflächenfärbung mit den Antikörpern: CD 29⁺, CD 73⁺, CD 90⁺ und CD 105⁺ sowie die negativ-Färbung von CD31⁻, CD34⁻ und CD45⁻.

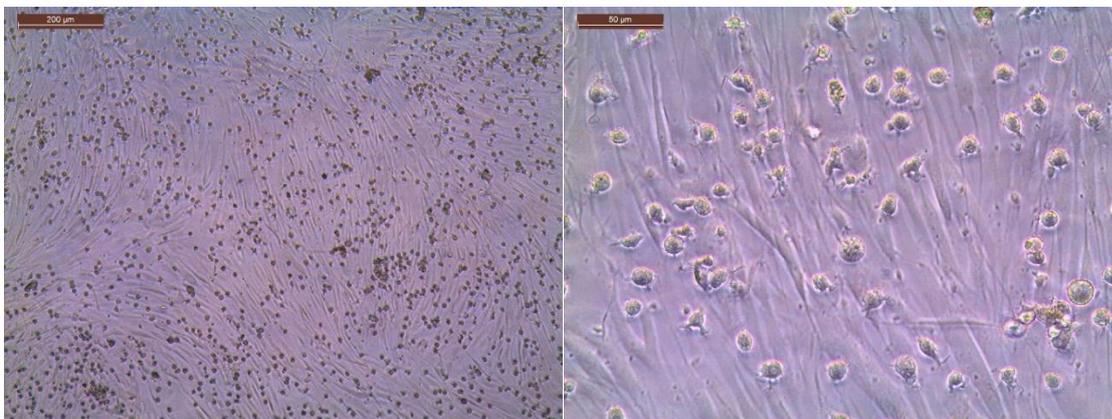


Abbildung 10: Morphologie mesenchymal geprägter Makrophagen.

Direkte Kokultivierung MSC mit Makrophagen (Bild links: x50; Bild rechts: x200). Es scheint als würden die Makrophagen den adhärennten spindelförmigen MSC aufsitzen, obwohl die Makrophagen in einer 6-fachen höheren Zelldichte ausgesät wurden und erst am Tag 10 die MSC hinzugegeben wurden.

Nach 10-tägiger Kultivierung der Makrophagen wurden MSC entweder indirekt (in Transwell *Inserts*) oder direkt hinzugegeben, um eine Differenzierung zu mesenchymal geprägten

Makrophagen zu erzielen. Auf den Zellbildern ist zu erkennen, dass Makrophagen sich im Lauf der Zeit den adhären MSC annähern (Vgl. Abbildung 10).

3.1.3 Demographische Daten der Knochenmark- und Blutspender/innen

Die Gewinnung von Makrophagen aus monozytären Vorläuferzellen erfolgte aus einer Vollblutspende gesunder Probanden. MSC wurden aus Hüftköpfen von Patienten während einer Total-Endoprothesen-Operation gewonnen.

Das Alter der freiwilligen Spender/innen lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Bereich von 22 - 57 Jahren, bei einem durchschnittlichen Alter von $28,8 \pm 7,6$ Jahren. 15 der 32 (47%) Blutspender/innen waren weiblich. Im Vergleich dazu lag das Alter der Knochenmarksspender/innen zum Zeitpunkt der Operation im Bereich von 51 - 70 Jahren. Das durchschnittliche Alter betrug $67,2 \pm 10,5$ Jahren und 8 der 11 (73%) Knochenmarksspender/innen waren weiblich (vgl. Tabelle 1).

3.2 Die Polarisationsmarker CD86 und CD206

Tabelle 13: Relative mRNA Expression [%] von CD86 und CD206

Die relative mRNA Expression von CD86 und CD206 ist definiert als $100 - (\Delta Ct / Ct (GAPDH)) * 100$, Daten aus n=4 unabhängigen Experimenten.

NK Negativ-Kontrolle = reine Kultur ohne Kokultur und ohne Stimulation, entweder nur Makrophagen oder MSC. Bezugspunkt = LPS Stimulation von nur Makrophagen gewählt (normiert auf 100%).

CD86 rel. mRNA Expression [%]			CD206 rel. mRNA Expression [%]	
6h	24h	Makrophagen	6h	24h
$87,0 \pm 4,2$	$76,8 \pm 5,5$	NK	$83,1 \pm 2,0$	$76,6 \pm 5,8$
$88,6 \pm 2,2$	$87,5 \pm 3,5$	LPS	$79,3 \pm 2,1$	$74,2 \pm 15,3$
$79,7 \pm 2,9$	$69,7 \pm 3,2$	Titan	$73,0 \pm 0,6$	$66,9 \pm 2,9$
6h	24h	MSCs	6h	24h
$-3,9 \pm 36,7$	$16,6 \pm 12,2$	NK	$11,5 \pm 14,4$	$15,2 \pm 7,0$
$5,1 \pm 19,5$	$18,0 \pm 13,1$	LPS	$12,3 \pm 11,5$	$13,6 \pm 7,0$
$6,8 \pm 15,6$	$8,6 \pm 16,2$	Titan	$9,5 \pm 12,1$	$2,4 \pm 3,8$

Tabelle 14: Relativer fold mRNA Expressionsquotient von CD 86 und CD 206

Der rel. fold mRNA Expressionsquotient von CD86 und CD206 ist definiert als rel. Expression (LPS, Ti) / rel. Expression (NK), Daten aus n=4 unabhängigen Experimenten.

CD86 rel. fold mRNA Expressionsquotient			CD206 rel. fold mRNA Expressionsquotient	
6h	24h	Makrophagen	6h	24h
$1,0 \pm 0,03$	$1,1 \pm 0,10$	LPS	$1,0 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,25$
$0,9 \pm 0,03$	$0,9 \pm 0,09$	Titan	$0,9 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,04$
6h	24h	Indirekt	6h	24h
$1,0 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,04$	LPS	$1,0 \pm 0,03$	$0,8 \pm 0,09$
$0,9 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,06$	Titan	$0,9 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,02$
6h	24h	Direkt	6h	24h
$0,9 \pm 0,16$	$1,0 \pm 0,11$	LPS	$0,9 \pm 0,07$	$0,8 \pm 0,10$
$0,9 \pm 0,23$	$1,0 \pm 0,10$	Titan	$1,0 \pm 0,08$	$1,1 \pm 0,08$

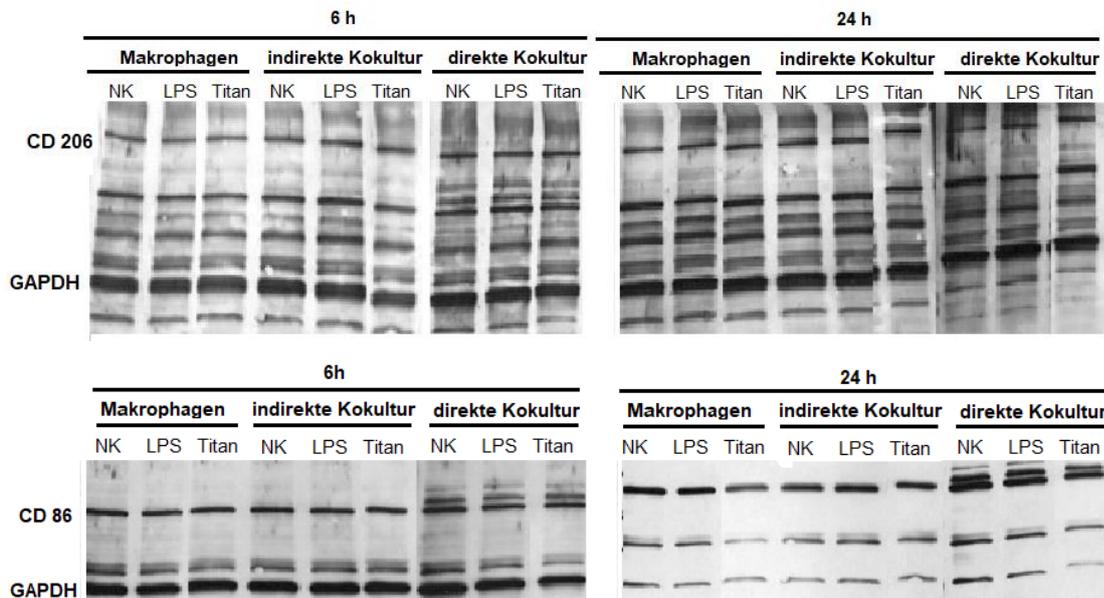


Abbildung 11: Proteinexpression von CD86 und CD206

Proteinexpression von CD86 und CD206 wurden an jeweils 15-20 μ g Gesamtprotein mit Hilfe von SDS-Page und anschließendem Western Blot qualitativ untersucht. Als interne Referenz wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

3.2.1 CD86 Expression

Die relative CD86 Expression der unstimulierten Makrophagen auf Transkriptionsebene diente als Negativkontrolle (NK) und lag nach 6h mit 87% ($87,0 \pm 4,2\%$) etwas höher als nach 24h mit 77% ($76,8 \pm 5,5\%$) (vgl. Tabelle 13).

Bei Behandlung der Makrophagen mit LPS blieb die CD86 Expression über 6h ($88,6 \pm 2,2\%$) und 24h ($87,5 \pm 3,5\%$) konstant. Die Zugabe von Titanpartikeln bewirkte eine leichte Abnahme auf 79% nach 6h ($79,7 \pm 2,9\%$) und auf 70% nach 24h ($69,7 \pm 3,2\%$) (vgl. Tabelle 13). Die stimulierten Makrophagen exprimierten, mit Ausnahme der über 24h stimulierten Makrophagen mit LPS, somit etwas weniger CD86 im Gegensatz zu den Negativkontrollen.

Da CD86 ein Makrophagenmarker ist, war in reinen MSC Kulturen nach 6h und 24h keine CD86 Expression nachweisbar bzw. lag bei 16%. Dieser Wert kann demnach als Hintergrundsignal durch MSC gewertet werden. Der relative mRNA-Expressionsquotient, definiert als rel. Expression (LPS, Ti) / rel. Expression (NK), von CD86 nahm bei Aktivierung der Makrophagen mit LPS mit der Zeit leicht zu ($1,0 \pm 0,03$ auf $1,1 \pm 0,10$) und war bei Zusatz von Titan-Partikeln unter osteolytischen Bedingungen etwas geringer und mit der Zeit abnehmend ($0,9 \pm 0,03$ auf $0,9 \pm 0,09$ nach 6h und 24h) (vgl. Tabelle 14).

Die CD86 Werte der indirekten Kokultur waren stets niedriger als die Ergebnisse der Monokultur, die Tendenzen stimmten jedoch überein. So führte die LPS Stimulation zu einer leichten Hochregulierung des relativen mRNA-Expressionsquotienten von CD86 von $1,0 \pm 0,02$ auf $1,0 \pm 0,04$, während der Zusatz von Titan-Partikeln (osteolytischen Bedingungen) die rel. Expression reduzierte ($0,9 \pm 0,01$ nach 6h und $0,8 \pm 0,06$ nach 24h) (vgl. Tabelle 14). In der direkten Kokultur zeigte sich unabhängig vom Stimulationsreiz eine Hochregulierung der CD86 Werte im zeitlichen Verlauf. Die Inkubation mit LPS bewirkte nach 6h einen relativen CD86 mRNA-Expressionsquotienten von $0,9 \pm 0,16$ und nach 24h von $1,0 \pm 0,11$. Nach 6-stündiger Titan-Partikel- Stimulation zeigte sich mit $0,9 \pm 0,23$ ein ähnliches Ergebnis im Vergleich zur indirekten Kokultur und Monokultur, wohingegen bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 24h der CD86 Expressionsquotient der direkten Kokultur auf $1,0 \pm 0,10$ anstieg (vgl. Tabelle 14).

Die Analyse der Proteinexpression von CD86 im Western Blot bestätigen die Ergebnisse der qPCR. CD86 konnte als Proteinbande sowohl bei den unstimulierten Makrophagen als auch in direkter und indirekter Kokultur nachgewiesen werden. Die Proteinexpression veränderte sich auch nach Stimulation der Zellen mit Titan oder LPS im Vergleich zur Negativkontrolle nicht (vgl. Abbildung 11).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD86 Synthese auf die Makrophagen Kulturen beschränkt war und die Verfälschung der Ergebnisse der quantitativen Genexpressionsanalyse durch die MSC Kokulturen minimal (<16% Hintergrundsignal) gehalten wurde. Die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Analysen mittels qPCR bzw. Western Blot zeigten, dass sich direkte und indirekte Kokulturen im Vergleich zur Negativkontrolle bezüglich der Expression von CD86 nicht signifikant unterscheiden. Unter osteolytischen Bedingungen hemmten kokultivierte MSC nicht die Expression von CD86, einem Polarisationsmarker, der hauptsächlich von inflammatorischen M1 Makrophagen exprimiert wird. Das Polarisationsverhalten der Kokulturen wurde nicht wie erwartet in Richtung eines antiinflammatorischen Makrophagenprofils verschoben.

3.2.2 CD206 Expression

Die relative CD206 Expression der unstimulierten Makrophagen diente als Negativkontrolle (NK) und nahm mit der Zeit von 83% nach 6h ($83,1 \pm 2,0\%$) auf 77% nach 24h ($76,6 \pm 5,8\%$) ab (vgl. Tabelle 13). Die Induktion der relativen m-RNA Expressionen von CD206 der unstimulierten Makrophagen (Negativkontrolle) war nach 6h ($83,1 \pm 2,0\%$) höher als nach 24h ($76,6 \pm 5,8\%$) und nahm im zeitlichen Verlauf folglich ab. Stimulationsreize zur Simulation

entzündlicher bzw. osteolytischer Bedingungen bewirkten eine leichte Abnahme der CD206 Expression im zeitlichen Verlauf von 79% nach 6h ($79,3 \pm 2,1\%$) auf 74% ($74,2 \pm 15,3\%$) nach 24h bei LPS bzw. von 73% ($73,0 \pm 0,6\%$) nach 6h auf 67% ($66,9 \pm 2,9\%$) nach 24h bei Titan-Partikeln (vgl. Tabelle 13). Insgesamt exprimierten die stimulierten Makrophagen weniger CD206 im Vergleich zur Negativkontrolle. Da CD206, wie auch CD86, ein reiner Makrophagenmarker ist, war in reinen MSC Kulturen nach 6h und 24h nur eine geringe CD206 Expression von 12% bzw. 17% nachweisbar, welche folglich als Hintergrundsignal durch MSC gewertet werden muss.

Die relativen mRNA-Expressionen von CD206 im Verhältnis zur Negativkontrolle (mRNA fold Expression) werden als Expressionsquotient angegeben und nahmen bei LPS aktivierten Makrophagen und Kokulturen im zeitlichen Verlauf tendenziell ab, während sich bei der Stimulation mit Titan-Partikeln keine Tendenz abzeichnete (vgl. Tabelle 14).

Der Expressionsquotient für CD206 der mit LPS aktivierten Makrophagen lag nach 6h mit $1,0 \pm 0,01$ und war vergleichbar mit der indirekten $1,0 \pm 0,03$ und der direkten $0,9 \pm 0,07$ Kokultur, wohingegen nach 24-stündiger LPS Inkubation der relative CD206 Expressionsquotient größer war als in der Monokultur $0,9 \pm 0,25$ und als in der indirekten $0,8 \pm 0,09$ oder direkten $0,8 \pm 0,10$ Kokultur. Die Dauer der Titan-Stimulation wirkte sich nicht auf die Reinkultur der Makrophagen aus, nach 6h und 24h blieb der CD206 Expressionsquotient konstant mit $0,9 \pm 0,02$ und $0,9 \pm 0,04$ (vgl. Tabelle 14). Auch in der indirekten Kokultur war die Inkubationszeit ohne Einfluss, die Ergebnisse der CD206 Expression waren nach 6-stündiger Titan-Stimulation mit $0,9 \pm 0,01$ vergleichbar mit denen nach 24h $0,9 \pm 0,02$. Ein Unterschied zeigte sich in der direkten Kokultur, hier stieg der relative CD206 Expressionsquotient von $1,0 \pm 0,08$ nach 6h auf $1,1 \pm 0,08$ nach 24h unter osteolytischen Bedingungen (Titan- Zugabe) an (vgl. Tabelle 14).

Die Analyse der Proteinexpression von CD206 im Western Blot bestätigten die Ergebnisse der qPCR. CD206 konnte als Proteinbande sowohl bei den unstimulierten Makrophagen als auch in direkter und indirekter Kokultur nachgewiesen werden. Die Proteinexpression veränderte sich auch nach Stimulation der Zellen mit Titan oder LPS im Vergleich zur Negativkontrolle nicht (vgl. Abbildung 11).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass unter osteolytischen Bedingungen die direkte und indirekte Kokulturen im Vergleich zur Negativkontrolle der M2 Marker CD206 nicht verstärkt exprimiert werden. Das Polarisationsverhalten der Kokulturen wurde nicht wie erwartet in Richtung eines antiinflammatorischen Makrophagenprofils verschoben.

Tabelle 15: Relative CD86 mRNA-Expression

Makrophagen, MSC und MSC geprägte Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur wurden für 6h und 24h mit verschiedenen Stimuli (LPS 100ng/ml und Titan-Partikel 0,1mg/ml) *in vitro* stimuliert.

(A) Relative m-RNA-Expression von CD86 im Verhältnis zum Referenzgen GAPDH [%]. Die Veränderungen der relativen CD86 Genexpression von Makrophagen im Vergleich zu MSC bei Stimulation mit LPS oder Titan für 6h und 24h gegenüber unbehandelten Zellen (NK) wurden mittels quantitativer RT-PCR ermittelt.

(B-D) Relative mRNA-Expression von CD86 im Verhältnis zu NK [%]. Der Einfluss der experimentellen Stimulation auf die CD86 mRNA-Expression von Makrophagen und MSC geprägten Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur nach LPS oder Titan Stimulation wurden durch quantitative RT-PCR bestimmt.

Abkürzungen: NK, Negativkontrolle; Makro, Makrophagen; MSC, mesenchymale Stromazellen; LPS, Lipopolysacchariden; Ti, Titan, mRNA.

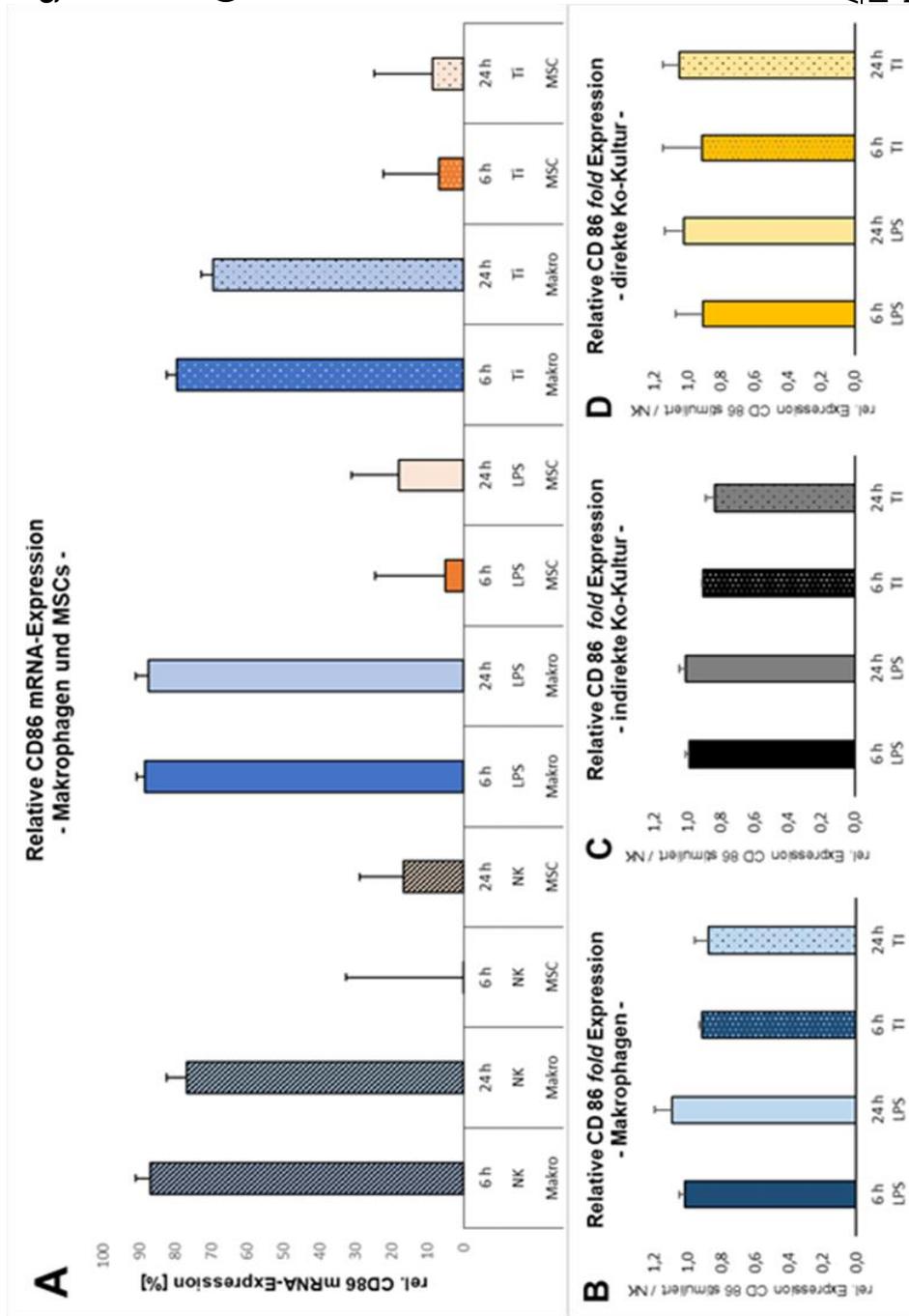


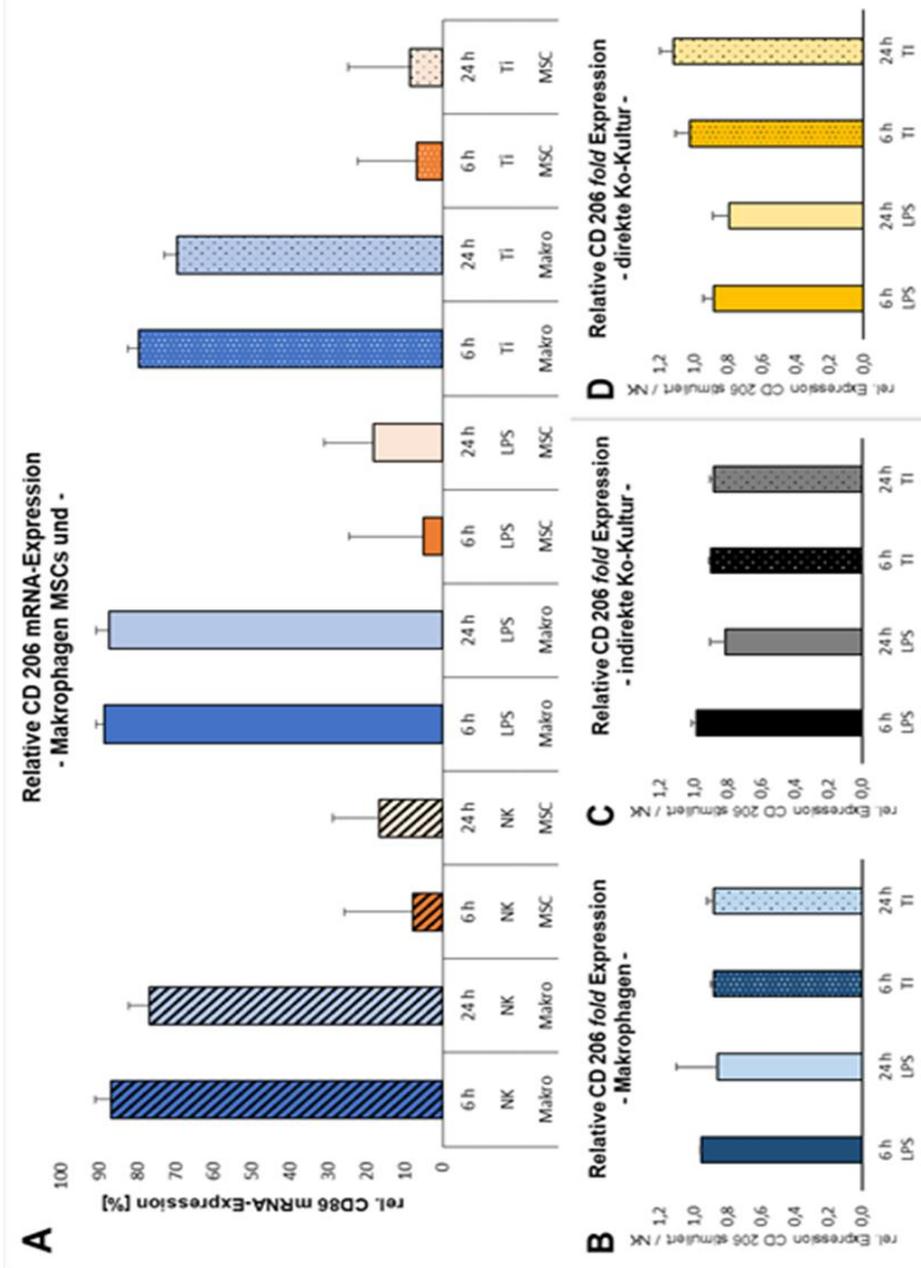
Tabelle 16: Relative CD206 mRNA Expression

Makrophagen, MSC und MSC geprägte Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur wurden für 6h und 24h mit verschiedenen Stimuli (LPS 100ng/ml und Titan-Partikel 0,1mg/ml) *in vitro* stimuliert.

(A) Relative m-RNA-Expression von CD206 im Verhältnis zum Referenzgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) [%]. Die Veränderungen der relativen CD206 Genexpression von Makrophagen im Vergleich zu MSC bei Stimulation mit LPS oder Titan für 6h und 24h gegenüber unbehandelten Zellen (NK) wurden mittels quantitativer RT-PCR ermittelt.

(B-D) Relative mRNA-Expression von CD206 im Verhältnis zu NK [%]. Der Einfluss der experimentellen Stimulation auf die CD206 mRNA-Expression von Makrophagen und MSC geprägten Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur nach LPS oder Titan Stimulation wurden durch quantitative RT-PCR bestimmt.

Abkürzungen: NK, Negativkontrolle; Makro, Makrophagen; MSC, mesenchymale Stromazellen; LPS, Lipopolysacchariden; Ti, Titan; mRNA, messenger ribonucleic acid; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase.



3.3 Der Einfluss von MSC auf die Zytokinsekretion von Makrophagen unter osteolytischen Bedingungen

Die Konzentrationsbestimmungen der pro- (TNF- α , IL-6) und anti-inflammatorischer (IL-10, IL-6, IL-1Ra, CCL-18) Zytokine erfolgte aus den Zellkulturüberständen der indirekt und der direkt kokultivierten Makrophagen mit MSC mittels ELISA. Die Zytokinkonzentrationen der unstimulierten Zellen (NK) lagen teilweise unterhalb der Nachweisgrenze (vgl. Tabelle Messbereiche ELISA). Daher konnte diese Negativkontrolle nicht als Referenz gewählt werden. Um dennoch die Zytokin-Sekretion zu vergleichen, wurde als Bezugspunkt jeweils die LPS Stimulation Makrophagenreinkultur gewählt (normiert auf 100%), stellvertretend für die maximal mögliche Stimulation, nach 6h und auch nach 24h. Die Zytokinkonzentrationen wurden mit diesem Bezugswert normiert und als relative Konzentration dargestellt.

3.3.1 Sekretion von TNF- α

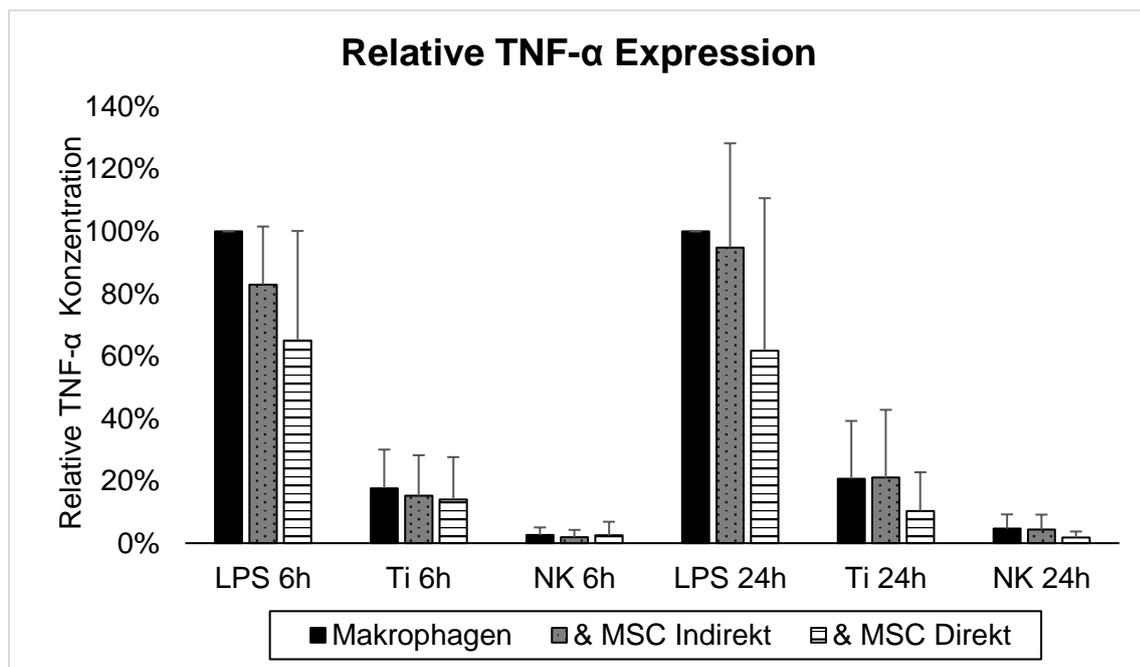


Abbildung 12: Relative Zytokinsekretion von TNF- α

Makrophagen und MSC geprägte Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur wurden für 6h und 24h mit verschiedenen Stimuli (LPS100 ng/ml und Titanpartikel 0,1mg/ml) zur Simulation osteolytischer Bedingungen *in vitro* stimuliert. Die Quantifizierung von TNF- α erfolgte mittels ELISA und wurde anhand der Sekretion von LPS-stimulierten Makrophagen (normiert auf 100 %) standardisiert. Mittelwerte aus n=14 Ansätzen.

Im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS bewirkte die Kokultur eine verminderte TNF- α Sekretion nach 6h in der indirekten ($83 \pm 19\%$) und in der direkten ($65 \pm$

35%) (vgl. Tabelle 17). Nach 24h war der abschwächende Effekt der Kokultur auf die TNF- α Sekretion nur noch bei der direkten Kokultur zu sehen ($62 \pm 49\%$).

Osteolytische Bedingungen in Form von Titanpartikeln induzierten nach 6h eine nur geringe TNF- α Sekretion von 12-15% der Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS, wobei eine MSC Kokultur (indirekt oder direkt) keine Rolle spielten. Nach 24h waren die von den Titanpartikeln induzierte TNF- α Sekretion mit 19% in der Reinkultur und 18% in der indirekten Kokultur vergleichbar. Zu diesem Zeitpunkt wies die direkte Kokultur jedoch eine leicht verminderte TNF- α Sekretion auf ($8 \pm 8\%$).

In der Negativkontrolle (unstimulierter Ansatz) waren im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS nur sehr geringe TNF- α Konzentrationen im Bereich von 1-4% messbar, die als Hintergrundwerte eingeordnet werden können.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in der Negativkontrolle kein TNF- α sekretiert wurde und ein osteolytischer Stimulus durch Titan eine Sekretion von 12-18 % der mit LPS erzielten TNF- α Sekretion bedingte. Eine direkte Kokultur reduziert die durch LPS induzierte TNF- α Sekretion, sowohl nach 6h als auch nach 24h auf 65% und 62%.

3.3.2 Sekretion von IL-6

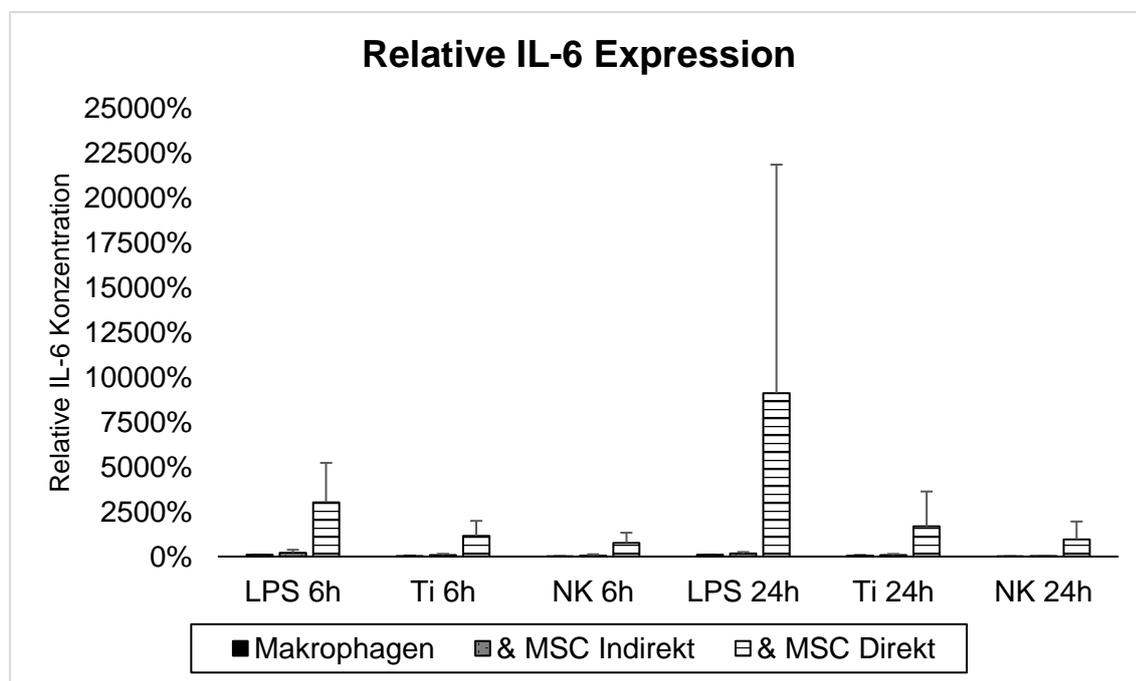


Abbildung 13: Relative Zytokinsekretion von IL-6

Makrophagen und MSC geprägte Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur wurden für 6h und 24h mit verschiedenen Stimuli (LPS 100ng/ml und Titanpartikel 0,1mg/ml) zur Simulation osteolytischer Bedingungen *in vitro* stimuliert. Die Quantifizierung von IL-6 erfolgte mittels ELISA und wurde anhand der Sekretion von LPS-stimulierten Makrophagen (normiert auf 100%) standardisiert. Mittelwerte aus n=15 Ansätzen.

Im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS bewirkte eine indirekte Kokultur eine um das 1,6-fache und die direkte Kokultur eine um das 32,3-fache erhöhte IL-6 Sekretion nach 6h. Nach 24h war der stimulierende Effekt der Kokultur bezüglich der IL-6 Sekretion noch deutlicher zu sehen: bei der direkten Kokultur stieg die IL-6 Sekretion auf das 66-fache ($66,82 \pm 64,04$), während er für die indirekte Kokultur mit dem Wert nach 6h vergleichbar war ($1,70 \pm 0,82$).

Osteolytische Bedingungen in Form von Titanpartikeln induzierten eine nur geringe IL-6 Sekretion von 30 bzw. 41% der Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS nach 6h bzw. 24h. Diese lag bei der indirekten Kokultur höher ($72 \pm 41\%$ bzw. $85 \pm 62\%$) nach 6h bzw. 24h. Im Gegensatz dazu war die IL-6 Sekretion in der direkten Kokultur auf das 12,4-fache erhöht ($1236 \pm 804\%$) bzw. auf das 13,71-fache ($1371 \pm 1232\%$). Während die unstimulierten Makrophagenreinkulturen weder nach 6h noch nach 24h relevante IL-6 Werte (6–7%) produzierten, waren zu beiden Zeitpunkten bei der direkten Kokultur über 7-fach erhöhte IL-6 Werte messbar (6h: $7,31 \pm 5,07\%$; 24h: $7,94 \pm 6,11\%$). Bei der indirekten Kokultur lagen die Werte zwischen 28-49% der LPS Stimulation der Makrophagenreinkultur (vgl. Tabelle 17).

Insgesamt fällt auf, dass in der Makrophagenreinkultur kein IL-6 gebildet wurde, ein osteolytischer Stimulus durch Titan jedoch eine Sekretion von 30-41% der Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS bedingte. Bei den direkten Kokulturen wurde in allen Ansätzen (Negativkontrolle, mit LPS, mit Titan) die IL-6 Synthese hochreguliert. Hier scheint die indirekte Kokultur nur einen geringen Einfluss zu haben.

3.3.3 Sekretion von IL-10

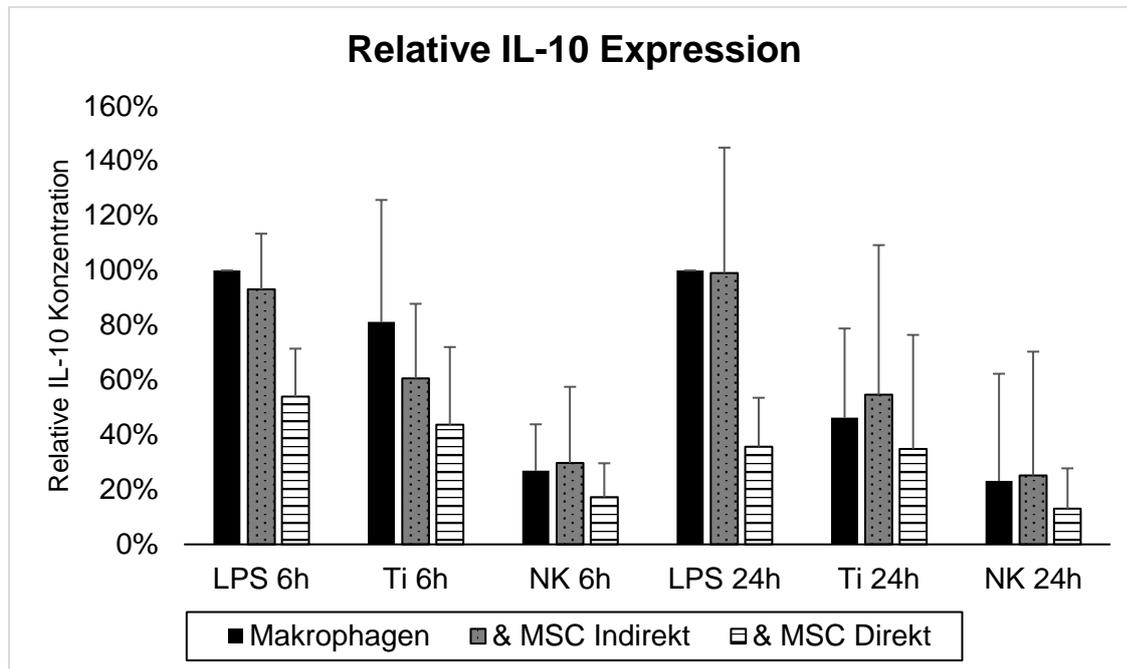


Abbildung 14: Relative Zytokinsekretion von IL-10

Makrophagen und MSC geprägte Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur wurden für 6h und 24h mit verschiedenen Stimuli (LPS 100ng/ml und Titanpartikel 0,1mg/ml) zur Simulation osteolytischer Bedingungen *in vitro* stimuliert. Die Quantifizierung von IL-10 erfolgte mittels ELISA und wurde anhand der Sekretion von LPS-stimulierten Makrophagen (normiert auf 100%) standardisiert. Mittelwerte aus n=14 Ansätzen.

Während die IL-10 Konzentration sich durch den indirekten Zusatz von MSC kaum änderte (6h: $94 \pm 12\%$; 24h: $91 \pm 35\%$), bewirkte eine direkte Kokultur eine verminderte IL-10 Sekretion nach 6h und 24h (6h: $54 \pm 17\%$; 24h: $33 \pm 16\%$) im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS (vgl. Tabelle 17).

Osteolytische Bedingungen in Form von Titanpartikeln induzierten eine geringere IL-10 Sekretion der Makrophagenreinkultur von 72% nach 6h und von 46% nach 24h im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS. Der Zusatz von MSC scheint die IL-10 Sekretion weiter zu reduzieren: in der indirekten Kokultur auf $57 \pm 24\%$ nach 6h, jedoch nicht nach 24h ($44 \pm 41\%$) und in der direkten Kokultur auf $38 \pm 22\%$ nach 6h und $25 \pm 19\%$ nach 24h (vgl. Tabelle 17).

In der Negativkontrolle (unstimulierter Ansatz) waren im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS nur IL-10 im Bereich von 27 bzw. 13% messbar nach 6h und 24h ohne erkennbaren Einfluss eines MSC Zusatzes.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass unter osteolytischen Bedingungen mit Titanpartikeln eine Verdopplung der IL-10 Konzentration induziert wurde im Vergleich zur Negativkontrolle.

Diese zeigte sich jedoch nur etwa halb so hoch wie nach einer Stimulation mit LPS. Die direkte Kokultur hemmte die IL-10 Sekretion in allen drei Ansätzen (LPS, Titan, NK), wobei die indirekte Kokultur die IL-10 kaum beeinflusste.

3.3.4 Sekretion von IL-1Ra

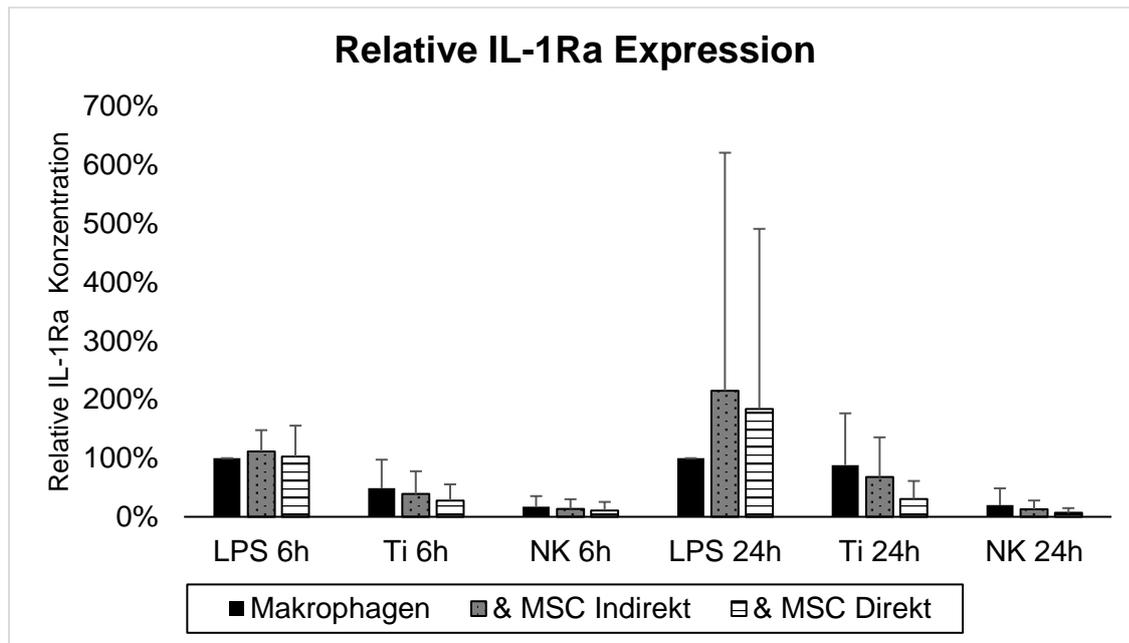


Abbildung 15: Relative Zytokinsekretion von IL-1Ra

Makrophagen und MSC geprägte Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur wurden für 6h und 24h mit verschiedenen Stimuli (LPS 100ng/ml und Titanpartikeln 0,1mg/ml) zur Simulation osteolytischer Bedingungen *in vitro* stimuliert. Die Quantifizierung von IL-1Ra erfolgte mittels ELISA und wurde anhand der Sekretion von LPS-stimulierten Makrophagen (normiert auf 100%) standardisiert. Mittelwerte aus den Kokulturen für 6h mit n=12 Ansätzen und für 24h mit n=13 Ansätzen.

Eine Änderung der IL-1Ra Sekretion in der direkten (6h: $103 \pm 53\%$; 24h: $101 \pm 71\%$) und in der indirekten Kokultur (6h: $111 \pm 36\%$; 24h: $102 \pm 23\%$) im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS (vgl. Tabelle 17) wurde nicht beobachtet.

Osteolytische Bedingungen in Form von Titanpartikeln induzierten eine Reduktion der IL-1Ra Sekretion der Makrophagenreinkultur von $46 \pm 19\%$ bzw. $45 \pm 33\%$ nach 6h bzw. 24h im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS. Während die indirekten Kokulturen die IL-1Ra Konzentration leicht reduzierten (6h: $36 \pm 19\%$; 24h: $42 \pm 31\%$), wurden die Werte bei den direkten Kokulturen halbiert (6h: $24 \pm 20\%$; 24h: $21 \pm 19\%$).

In der Negativkontrolle (unstimulierter Ansatz) waren im Vergleich zur maximalen Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS nur IL-1Ra Konzentrationen von 13-20% messbar, während der Wert bei der Kokultur (7-13%) minimal vermindert war.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass unter osteolytischen Bedingungen eine Verdopplung der IL-1Ra Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle induziert wurde, die jedoch nur etwa halb so hoch war wie nach einer Stimulation mit LPS. Die direkte Kokultur hemmte die IL-1Ra Sekretion im osteolytischen Ansatz, nicht jedoch die indirekte Kokultur.

3.3.5 Sekretion von CCL-18

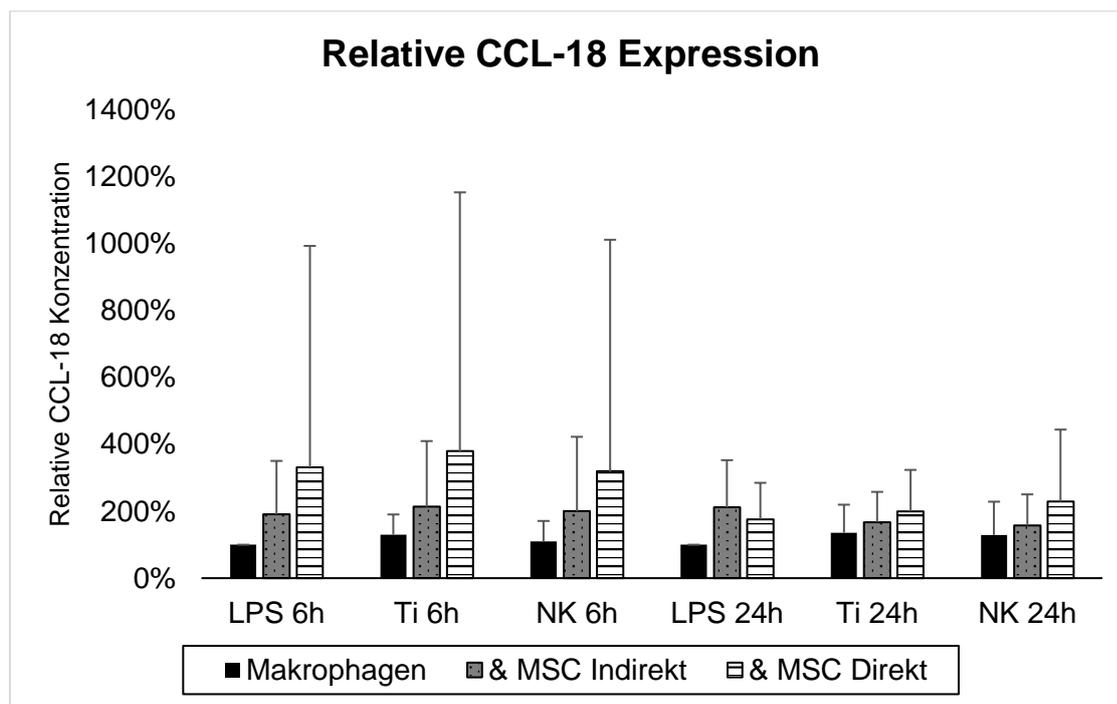


Abbildung 16: Relative Zytokinsekretion von CCL-18

Makrophagen und MSC geprägte Makrophagen in indirekter und direkter Kokultur wurden für 6h und 24h mit verschiedenen Stimuli (LPS 100ng/ml und Titanpartikel 0,1mg/ml) zur Simulation osteolytischer Bedingungen *in vitro* stimuliert. Die Quantifizierung von CCL-18 erfolgte mittels ELISA und wurde anhand der Sekretion von LPS-stimulierten Makrophagen (normiert auf 100%) standardisiert. Mittelwerte aus n=15 Ansätzen.

Eine erhöhte CCL-18 Sekretion nach 6h in der indirekten ($158 \pm 96\%$) und in der direkten ($162 \pm 89\%$) Kokultur im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS (vgl. Tabelle 17) wurde beobachtet. Nach 24h war der stimulierende Effekt einer Kokultur auf die CCL-18 Sekretion noch deutlicher zu sehen: bei der indirekten Kokultur stieg die CCL-18 Sekretion auf das 1,9-fache ($187 \pm 108\%$) während er für die direkte Kokultur mit dem Wert nach 6h vergleichbar war ($159 \pm 89\%$).

Osteolytische Bedingungen in Form von Titanpartikeln induzierten eine Steigerung der CCL-18 Sekretion um mehr als 18% im Vergleich zur maximalen LPS Stimulation der Makrophagenreinkultur nach 6h. MSC bewirkten zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte CCL-18

Sekretion um das 1,7- fache in der indirekten und um das 1,8- fache in der direkten Kokultur. Ähnlich wie nach 6h zeigte sich der stimulierende Effekt der Titanpartikel mit 136% in der Reinkultur sowie in der Kokultur 150-160% im Vergleich zur Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS nach 24h (vgl. Tabelle 17).

In der Negativkontrolle (unstimulierter Ansatz) waren im Vergleich zur maximalen Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS die CCL-18 Konzentrationen vergleichbar mit $98 \pm 43\%$ nach 6h und $107 \pm 50\%$ nach 24h. Eine indirekte Kokultur mit MSC erhöhte die CCL-18 Sekretion auf $148 \pm 97\%$ nach 6 bzw. $140 \pm 68\%$ nach 24h. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch nach direkter Kokultur nach 6h erreicht ($142 \pm 74\%$), der jedoch nach 24h deutlich höher lag ($229 \pm 215\%$).

Insgesamt fällt auf, dass die Negativkontrolle vergleichbar hohe CCL-18 Konzentrationen wie nach Stimulation mit LPS aufweist. Osteolytische Bedingungen bewirkten eine leichte Erhöhung sowohl nach 6h als auch nach 24h. MSC scheinen sowohl in direkt oder indirekter Kokultur die CCL-18 Synthese in Makrophagen in allen drei Ansätzen (LPS, Titan, NK) hochzuregulieren, wobei der Effekt in der direkten Kokultur am deutlichsten ausgeprägt war und nach 6h größer war als nach 24h.

Tabelle 17: Übersicht über die relative Zytokinsynthese

Die maximale Stimulation der Makrophagenreinkultur mit LPS wurde als 1 gesetzt und alle anderen ZytokinKonzentrationen darauf normiert.

		Relative Expression nach 6h					Relative Expression nach 24 h				
Zytokine	Makrophagen	& MSC Indirekt	& MSC Direkt	Stimulation	Makrophagen	& MSC Indirekt	& MSC Direkt				
TNF-α	100 \pm 0 %	83 \pm 19 %	65 \pm 35 %	LPS	100 \pm 0 %	97 \pm 34 %	62 \pm 49 %				
	15 \pm 7 %	12 \pm 6 %	12 \pm 12 %	Ti	19 \pm 17 %	18 \pm 19 %	8 \pm 8 %				
	3 \pm 2 %	2 \pm 2 %	2 \pm 4 %	NK	4 \pm 3 %	4 \pm 5 %	1 \pm 3 %				
IL-6	100 \pm 0 %	162 \pm 58 %	3228 \pm 2134 %	LPS	100 \pm 0 %	170 \pm 0,82 %	6682 \pm 6404 %				
	30 \pm 22 %	72 \pm 41 %	1236 \pm 804 %	Ti	41 \pm 32 %	85 \pm 0,62 %	1371 \pm 1232 %				
	6 \pm 4 %	49 \pm 70 %	731 \pm 507 %	NK	7 \pm 5 %	28 \pm 0,26 %	794 \pm 611 %				
IL-10	100 \pm 0 %	94 \pm 12 %	54 \pm 17 %	LPS	100 \pm 0 %	91 \pm 35 %	33 \pm 16 %				
	72 \pm 29 %	57 \pm 24 %	38 \pm 22 %	Ti	46 \pm 33 %	44 \pm 41 %	25 \pm 19 %				
	27 \pm 17 %	25 \pm 14 %	19 \pm 12 %	NK	13 \pm 11 %	13 \pm 12 %	10 \pm 9 %				
IL-1Ra	100 \pm 0 %	111 \pm 36 %	103 \pm 53 %	LPS	100 \pm 0 %	102 \pm 23 %	101 \pm 71 %				
	46 \pm 19 %	36 \pm 19 %	24 \pm 20 %	Ti	45 \pm 33 %	42 \pm 31 %	21 \pm 19 %				
	13 \pm 8 %	10 \pm 8 %	8 \pm 10 %	NK	20 \pm 29 %	13 \pm 15 %	7 \pm 8 %				
CCL-18	100 \pm 0 %	158 \pm 96 %	162 \pm 89 %	LPS	100 \pm 0 %	187 \pm 108 %	159 \pm 89 %				
	118 \pm 43 %	172 \pm 115 %	182 \pm 128 %	Ti	136 \pm 84 %	150 \pm 61 %	160 \pm 68 %				
	98 \pm 43 %	148 \pm 97 5	142 \pm 74 %	NK	107 \pm 50 %	140 \pm 68 %	229 \pm 215 %				

4. DISKUSSION

Diese Arbeit prüft, inwieweit humane MSC unter in *vivo* simulierten osteolytischen Bedingungen die Makrophagenpolarisation beeinflussen. Die Untersuchungen zeigten, dass kokultivierte MSC während der Stimulation mit bakteriellem LPS oder Titan-Partikel die Sekretion verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Makrophagen beeinflussen und teilweise einen entzündungshemmenden Phänotyp begünstigen. Damit leistet die Arbeit, durch ein verbessertes Verständnis hinsichtlich der Rolle MSC geprägter Makrophagen in der aseptischen Prothesenlockerung, einen Beitrag zur Maximierung der Standzeit von Prothesen.

4.1 Einsatz von Primärzellen im Vergleich zu differenzierte Zelllinien oder Tier-Modellen

In den Experimenten kamen ausschließlich humane Primärzellen zum Einsatz, sodass möglichst unverfälschte Resultate abgebildet werden konnten. Die wesentlichen Anforderungen der CD14+ Monozyten wurden mit einer durchschnittlichen Reinheit von $94,3 \pm 5,1\%$ erfüllt. Der Aufbau der Experimente sah eine große Konzentration von Primärzellen vor, die im Vergleich zu differenzierten Zelllinien, nur durch unterschiedliche Probanden und Probandinnen gedeckt werden konnten. Es ist allgemeingültig, dass die Herkunft der jeweiligen Blutspender/innen phänotypische und genotypische Auswirkungen auf die Heterogenität von Makrophagen haben (Mosser & Edwards, 2008). Dies bedingt in den meisten Fällen, so wie auch in dieser Arbeit, eine erhebliche Varianz der quantitativ gewonnenen Ergebnisse. Die bisher publizierten Studien verwendeten größtenteils Makrophagen Zelllinien (RAW 264.7 und THP-1) oder primäre Makrophagen von Tieren (Maus, Ratte und Kaninchen) (R. L. Shin et al., 2021).

Differenzierte Zelllinien sind wesentlich praktischer in der Anschaffung, was die Kultivierung einheitlicher makrophagenähnlicher Zellen stark vereinfacht. *In situ* vorliegende Störfaktoren beispielsweise bleiben jedoch unbeachtet (Kohro et al., 2004), weshalb sich das Verhalten differenzierter Gewebemakrophagen nicht ohne weiteres auf Menschen übertragen lässt. Zudem sind grundlegende Unterschiede bei der Entwicklung, Aktivierung und Reaktion des Immunsystems zwischen murinen und humanen Makrophagen bekannt, so dass Ergebnisse einer Mausstudie nicht ohne Weiteres mit menschlichen Primärzellen verglichen werden können (Del Prete et al., 1993; Schneemann & Schoeden, 2007).

Ähnliches gilt für MSC, die aus verschiedenen menschlichen Geweben isoliert werden können und die Fähigkeit besitzen, sich zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten zu differenzieren. MSC aus dem Fettgewebe weisen beispielsweise unterschiedliche phänotypische und funktionelle Eigenschaften auf wie MSC aus dem Knochenmark (Melief, Zwaginga, et al., 2013). Aufgrund des Fehlens eines bestimmten Oberflächenmarkers gibt es jedoch auch Einschränkungen bei der Charakterisierung von humanen MSC. In dieser Arbeit kamen differenzierte MSC aus Spongiosamaterial menschlicher Oberschenkelköpfe zum Einsatz, die die Anforderungen der internationalen Gesellschaft für zelluläre Therapie erfüllten. Insbesondere in älteren Studien zeigen sich eine signifikante Variabilität in der Methodik bezüglich Isolierung und Kultivierung von MSC aus dem Knochenmark (Gupta et al., 2007). Obwohl sich die Mehrzahl der Studien heute an den Richtlinien orientiert, wird es bis zur Charakterisierung spezifischer Zelloberflächenmarker Schwierigkeiten bei der Standardisierung von MSC geben. Letztendlich leisten alle Modelle, trotz unterschiedlicher Möglichkeiten und Grenzen, einen Beitrag zu einem verbesserten Verständnis. Ein Vergleich untereinander sollte immer mit Vorbehalt beurteilt werden.

4.2 Osteolytische Stimulation mit Titanpartikel und LPS

Der Untersuchung des Phänotyps von MGM bei aseptischer Prothesenlockerung in Folge periprothetischer Osteolysen wird zunehmend mehr Aufmerksamkeit geschenkt, da es sich um eine häufige Ursache für das Versagen von Implantaten handelt. Aktuell gibt es nur sehr begrenzte therapeutische Alternativen diese Komplikation ohne Austausch der Prothese zu behandeln. Durch Abriebpartikel induzierte Entzündungen spielen bei der periprothetischen Osteolyse eine entscheidende Rolle. Um zukünftig die Standzeiten der Prothesen zu verbessern, fokussiert sich diese Arbeit auf die Rolle von MGM unter osteolytischer Bedingungen. Bei den verwendeten Konzentrationen stellte sich LPS (100ng/ml) gegenüber Titanpartikel (0,1mg/ml) als wirksamerer Stimulus dar.

Titan wurden als stellvertretendes Material ausgewählt, da es aufgrund seiner günstigen mechanischen und biologischen Eigenschaften seit vielen Jahren routinemäßig in der Endoprothetik als Implantatmaterial eingesetzt wird (Long & Rack, 1998) und in Studien zur partikelinduzierter Osteolyse weit verbreitet ist (Agins et al., 1988; Buly et al., 1992). Immer mehr Arbeiten konzentrieren sich auf die Untersuchung der Wechselwirkungen verschiedener Zelltypen im Rahmen der „Partikelkrankheit“. Die Interaktion zwischen Titanpartikel stimulierter Makrophagen führt zu einer veränderten Sekretion, der am Knochenumsatz beteiligten löslichen Faktoren (Lee et al., 2012; Vallés et al., 2008).

In der gegenwärtigen Literatur werden Endotoxine eine bisher unterschätzte Rolle bei der Entwicklung der periprothetischen Osteolyse zugesprochen. LPS scheint maßgeblich an der aseptischen Prothesenlockerung durch periprothetische Osteolysen beteiligt zu sein (Bi et al., 2002), weshalb in dieser Arbeit auch LPS stimulierte MGM untersucht wurden. Hinzukommt, dass Verschleißpartikel und Endotoxine auf molekularer Ebene viele Ähnlichkeiten hinsichtlich der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen aufweisen (Ragab et al., 1999).

4.3 Indirekte und Direkte Kokultur

In dieser Arbeit konnte in einem *in vitro* Kokultursystem mit humanen Makrophagen und MSC belegt werden, dass ein Austausch von löslichen Faktoren zwischen beiden Zellarten ohne direkten Zellkontakt möglich ist. MSC stimulieren über konstitutiv sezernierte Faktoren die Expression eines M2-Phänotyps durch eine semipermeable Membran. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die zeigen konnten, dass MSC die Aktivierung und Funktion von Makrophagen *in vitro* und *in vivo* sowohl zellkontaktabhängig als auch -unabhängig beeinflussen können (Dameshghi et al., 2016; Dayan et al., 2011; J. Kim & Hematti, 2009; Maggini et al., 2010; Q. Z. Zhang et al., 2010). Interessanterweise wurden in dieser Arbeit nach Hinzugabe der osteolytischen Stimulanzen deutlich erhöhte IL-6 sowie verminderte IL-10 und TNF- α Spiegel gemessen, wenn MSC direkt mit Makrophagen kokultiviert wurden. Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Makrophagen und MSC sind noch nicht vollständig verstanden. Vergleichbar mit den Resultaten von Zheng et al., deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Interaktion zwischen MSC und Makrophagen möglicherweise insbesondere auf direkten Zell-zu-Zell Kontakt und nicht nur auf parakrine Zytokine zurückzuführen sind (Zheng et al., 2018).

4.4 Bestimmung des Makrophagen-Phänotyps mit Hilfe der Oberflächenmarker CD86 und CD206

Makrophagen sind wichtige Koordinatoren des angeborenen und des adaptiven Immunsystems bezüglich Entzündungsreaktionen, wie sie bei periprothetischen Osteolysen vorkommen. Um diese Funktionen erfüllen zu können, sind Makrophagenmembranen mit einer Vielzahl von Oberflächenrezeptoren ausgestattet. Der bisherigen Literatur zufolge gibt es eine Vielzahl von Oberflächenmarkern auf Makrophagen, dabei sind CD86 und CD206 spezifische und weit verbreitete Marker von M1 bzw. M2 Makrophagen (Biswas & Mantovani, 2010; Mosser & Edwards, 2008; Tan et al., 2015). In dieser Arbeit zeigte sich sowohl auf der transkriptionalen als auch auf der translationalen Ebene, dass MSC geprägte Makrophagen

im Vergleich zu Makrophagen allein keine relevante Differenz bezüglich der Zelloberflächenmarker CD86 und CD206 aufweisen.

4.4.1 Die Rolle von CD86 bei Makrophagen unter MSC Kokultur

In der hier vorliegenden Arbeit konnte weder durch die verwendeten osteolytischen Stimuli noch durch den Einsatz von MSC in direkter und indirekter Kokultur mit Makrophagen eine verminderte Konzentration von CD86 gemessen werden.

Die Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu vorrausgegangenen Studien, die nachweisen konnten, dass beispielsweise MSC aus der Plazenta (pMSC) in humanen Makrophagen durch Veränderung der Zelloberflächenmarker einen entzündungshemmenden Phänotyp induzieren können, indem kostimulatorische Moleküle von M1 Makrophagen einschließlich CD86 herunterreguliert wurden (Abumaree et al., 2013). Maggini et al. beobachteten zudem, dass mMSC in LPS-stimuliertem peritonealen Maus-Makrophagen die Hochregulierung von CD86 inhibierten (Maggini et al., 2010). Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten einerseits durch den Einsatz der verschiedenen Primärzellen erklärt werden. Andererseits könnten auch Differenzen im Versuchsaufbau wie beispielsweise die LPS-Konzentrationen, die Dauer der Kokultivierung sowie der Zeitpunkt der Quantifizierung der jeweiligen Zellen eine Rolle gespielt haben.

CD86 wird insbesondere in der frühen Phase der Immunantwort, beispielsweise als Reaktion auf eine Infektion, schnell hochreguliert und ist ein Oberflächenmarker, der hauptsächlich von inflammatorischen M1 Makrophagen exprimiert wird (Heikkinen et al., 2003). Er kann aber auch eine Rolle bei M2b Makrophagen spielen, die eher entzündungshemmende Eigenschaften besitzen (Mantovani et al., 2004). Es existiert aktuell keine einheitliche Definition der verschiedenen Polarisationszustände, die Makrophagen-Phänotypen stellen lediglich mögliche Extremvarianten dar. Um eine bessere Charakterisierung des Profils von MSC geprägten Makrophagen zu erhalten, benötigt es weitere Untersuchungen bekannter M1 (z.B. CD11c, CD40 oder CD80) und M2 (z.B. CD14, CD36, CD163, CD204, B7-H4 oder CD11b) Polarisationsmarker (Klopfleisch, 2016).

4.4.2 Die Rolle von CD206 durch Makrophagen unter MSC Kokultur

In der hier vorliegenden Arbeit konnten weder durch die verwendeten osteolytischen Stimuli noch durch den Einsatz von MSC in direkter und indirekter Kokultur mit Makrophagen eine erhöhte Konzentration von CD206, einen bekannten antiinflammatorischen M2a und M2c Marker (Brown & Badylak, 2013), gemessen werden. Entgegen vorherigen Studien (Abumaree

et al., 2013; J. Kim & Hematti, 2009) beeinflussten MSC das Polarisationsverhalten in Richtung eines antiinflammatorischen Makrophagenprofils nicht. Ein detaillierter Vergleich mit der Arbeit von Kim und Hematti ist im Hinblick auf die konträren Resultate trotz einiger Parallelen im Studiendesign interessant. Übereinstimmungen zeigen sich sowohl bezüglich der Isolierung sowie der Reinheitsbestimmung der CD14 positiven Zellen. Im anschließenden Nachweisverfahren weichen die angewendeten Methoden voneinander ab. Während in dieser Arbeit durch molekularbiologische und proteinbiochemische Analysen mittels qPCR und Western Blot keine erhöhte Konzentration von CD206 gemessen werden konnte, zeigten in der Studie von Kim und Hematti MSC geprägte Makrophagen mit Hilfe von FACS Messungen durchweg eine erhöhte Konzentration von CD206 (J. Kim & Hematti, 2009). Es wäre interessant gewesen, die Kokulturen dieser Arbeit mit Hilfe der FACS Methode zu analysieren, um einen exakteren Vergleich der Resultate zu erzielen. Ein Vergleich mit dem Oberflächenrezeptor CD86 ist nicht möglich, da er von Kim und Hematti nicht überprüft wurde. Eine mögliche Ursache der widersprüchlichen Ergebnisse der gemessenen CD206 Werte könnte auch mit den reduzierten IL-10 Konzentrationen (vgl. 4.5.3) zusammenhängen. In vorherigen Studien wurde beschrieben, dass M2 Makrophagen einen erhöhten CD206 Spiegel relativ zu IL-10 Konzentration zeigten (Tan et al., 2015). Im Umkehrschluss konnte eine andere Arbeit nachweisen, dass der Einsatz eines IL-10 blockierenden Antikörpers die Konzentration von CD206 in MSC geprägten Makrophagen herunterreguliert (Dayan et al., 2011).

4.5 Zytokinprofil osteolytisch-stimulierter MSC geprägter Makrophagen

Entzündliche Prozesse werden durch inflammatorische Zytokine stimuliert, während antiinflammatorische Zytokine eine hemmende Wirkung zeigen. Diese Arbeit untersuchte das Verhalten MSC geprägter Makrophagen durch die Quantifizierung von verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auf Proteinebene. Teilweise zeigte sich eine Veränderung der Zytokinspiegel von TNF- α , IL-10, IL-6 und IL-1Ra sowie CCL-18 bei den osteolytisch stimulierten kokultivierten MSC mit Makrophagen.

4.5.1 Das proinflammatorische Zytokin TNF- α

In dieser Arbeit wurden in kokultivierten Makrophagen mit MSC im Vergleich zur Makrophagenreinkultur verminderte TNF- α Konzentrationen gemessen. Der Effekt war insbesondere bei verlängerter Stimulationsdauer über 24h mit LPS oder Titan nachweisbar. Makrophagen spielen eine Schlüsselrolle bei der periprothetischen Osteolyse, indem sie durch die Aufnahme von Partikeln wie beispielsweise Titan eine durch Zytokine vermittelte

Entzündungsreaktion auslösen (Mosser & Edwards, 2008; Stout et al., 2005). Abriebpartikel in Form von Titan-Partikel lösen in Makrophagen dabei eine erhöhte Produktion von TNF- α aus (Drees et al., 2007). Die durch Makrophagen induzierte Sekretion von TNF- α ist maßgeblich an der aseptischen Prothesenlockerung beteiligt. TNF- α beeinträchtigt die Knochenbildungsaktivität von Osteoprogenitoren (Lee et al., 2012), wie sie bei der periprothetischen Osteolyse beobachtet wird und induziert direkt die Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten (Schwarz et al., 2000). Diese und andere Studien zeigen, dass MSC über die Rekrutierung und Differenzierung von Makrophagen immunmodulatorische Fähigkeiten besitzen, die Ausbildung eines entzündungshemmenden regulatorischen Phänotyps zu polarisieren (Abumaree et al., 2013; Gupta et al., 2007; J. Kim & Hematti, 2009; Maggini et al., 2010; Nemeth et al., 2009; K. Zhang et al., 2015). Die Arbeit von Zheng et al. beobachtete ebenfalls, dass durch eine LPS-Stimulation über 24h die deutlichste Reduktion der TNF- α -Spiegel in MGM erzielt werden können (Zheng et al., 2018).

4.5.2 Das bifunktionelle Zytokin IL-6

In der hier vorliegenden Arbeit wurde insbesondere bei direkter Kokultivierung mit MSC und Makrophagen eine signifikante Aktivierung der IL-6 Synthese beobachtet. Dies deckt sich mit dem Konzept der "MSC geprägten Makrophagen" von Kim und Hematti die den wesentlichen Unterschied zwischen MGM und anderen Arten von alternativ aktivierten M2 Makrophagen in einer erhöhten Expression von IL-6 sahen und daraufhin erstmals eine neue Subgruppe von M2 Makrophagen definierten (J. Kim & Hematti, 2009).

Die Rolle von IL-6 in entzündlichen Prozessen ist jedoch umstritten. Während diese und andere Arbeiten nachweisen konnten, dass die IL-6-Spiegel in MGM durch die Stimulation mit LPS in einem größeren Ausmaß ansteigt als bei Reinkulturen von Makrophagen oder MSC (Bouchlaka et al., 2017), sprechen andere Studien IL-6 eine entzündungsfördernde Rolle zu und beobachteten eine Hemmung der IL-6 Konzentration bei LPS stimulierten Makrophagen (Anderson et al., 2013; Maggini et al., 2010). Zudem kommt IL-6 in praktisch allen Zellen und Geweben vor und wird häufig zusammen mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- α gemessen (Kuczkowski et al., 2011; Lin et al., 2000). Eine mögliche Erklärung der bifunktionellen Eigenschaften von IL-6 resultiert in Folge unterschiedlicher Signaltransduktionswege. Die regenerative bzw. entzündungshemmende Aktivitäten von IL-6 werden durch den klassischen Signaltransduktionsweg vermittelt, indem IL-6 die Zielzellen über einen membrangebundenen IL-6-Rezeptor direkt stimuliert. Im Gegensatz dazu werden entzündungsfördernde Reaktionen durch IL-6 nicht direkt aktiviert, sondern über einen IL-6-

Komplex, der an einer natürlich vorkommenden löslichen Form des IL-6-Rezeptors gebunden ist (Scheller et al., 2011).

4.5.3 Antiinflammatorische Zytokine

Als Reaktion auf die Stimulation mit Titan-Partikel wurden in der hier vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der antiinflammatorischen Zytokine im Vergleich zur Negativkontrolle induziert. Im osteolytischen Ansatz führten direkt kokultivierte MSC zu einer Hemmung der IL-10 und IL-1Ra Sekretion in Makrophagen. Demgegenüber regulierten MSC in direkter und indirekter Kokultur die CCL-18 Synthese in Makrophagen hoch.

Die experimentellen Resultate dieser Arbeit zeigten, dass MSC durch Hemmung der IL-10 Sekretion die Polarisation von Makrophagen, insbesondere in direkter Kokultur, beeinflussen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Damesghi et al. beschrieben, die bei kokultivierten MSC mit Makrophagen niedrigere IL-10-Spiegel im Vergleich zu Makrophagenreinkultur vor und nach einer *Leishmaniose major* Infektion beobachteten (Damesghi et al., 2016). Hingegen wurden in anderen Kokultur-Modellen beobachtet, dass MSC die LPS-induzierte Produktion von IL-10 durch murine Makrophagen induzieren und sie Richtung eines regulatorischen Profils, ähnlich den M2-Makrophagen, verschieben (Cho et al., 2014; Maggini et al., 2010; Nemeth et al., 2009). In diesen Studien kamen, im Vergleich zu dieser Arbeit, Makrophagen aus Zell- oder Tier-Modellen zum Einsatz, die möglicherweise nicht die tatsächliche *in vivo* Situation widerspiegeln. Die Polarisation in Richtung des M2-Phänotyps können bei humanen Makrophagen im Gegensatz zu Zelllinien wie beispielsweise RAW264.7-Zellen nicht vorherig modifiziert werden, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen IL-10 Ergebnisse sein könnte (Gao et al., 2014).

Nur wenige Studien haben sich generell mit den direkten Auswirkungen von Zytokinen auf MSC auseinandergesetzt. Unlängst wurde beobachtet, dass Faktoren, die von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Makrophagen stammen, die immunregulatorischen Eigenschaften von MSC verbessern (Saldaña et al., 2019). IL-10 ist ein entzündungshemmendes und wichtiges immunregulatorisches Zytokin mit zahlreichen Funktionen in verschiedenen Zelltypen (Moore et al., 2001). Beispielsweise hemmt IL-10 die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen und kontrolliert dadurch das Ausmaß entzündlicher Prozesse (Antonios et al., 2013). Darüber hinaus reguliert IL-10 die Adhäsion, Migration und das osteogene Potenzial von MSC (Vallés et al., 2020).

Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte, dass physiologische Spiegel von rekombinantem IL-10 die osteogene Differenzierung von MSC stimulieren (Vallés et al., 2020), während durch

pathologisch erhöhte Konzentrationen eine hemmende Wirkung erzielt wurde (E. Chen et al., 2018). Es wird angenommen, dass für die Förderung der Osteogenese ein Verhältnis von 5:1 Makrophagen zu MSC erforderlich ist (Pajarinen et al., 2019). In dieser Arbeit kamen im Vergleich zu einer Arbeit mit ähnlichem Studiendesign (J. Kim & Hematti, 2009) eine deutlich geringere Zellzahl und ein erhöhtes Verhältnis von Makrophagen/MSK von 1:6 zum Einsatz. Dies könnte zu einer verminderten IL-10 Expression beigetragen haben und eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der Resultate sein. Neben der konzentrationsabhängigen Doppelrolle scheinen die Auswirkungen von IL-10 auf MSC *in vitro* auf die Osteogenese auch abhängig von der Anwendungsdauer zu sein (E. Chen et al., 2018). In den hier durchgeführten Experimenten wäre eine Verlängerung der osteolytischen Stimulation über 48 oder 72 Stunden zur Bestimmung der maximalen Zytokinspiegel sicher aufschlussreich gewesen.

Neben seinen entzündungshemmenden Eigenschaften durch die Herunterregulierung proinflammatorischer Zytokine reguliert IL-10 die Expression von IL-1Ra. Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass MSC eine vermehrte Freisetzung von IL-1Ra unter der Stimulation mit LPS induzierten, wobei Titanpartikel zu einer Verminderung der IL-1Ra Sekretion bei MSC geprägten Makrophagen führten. Ulich et al. beobachteten früh, dass IL-1Ra eine wichtige Rolle als negativer Feedback-Mechanismus zur Herunterregulierung von LPS-initiierten akuten Entzündungen spielen kann (Ulich et al., 1991). IL-1Ra hemmt kompetitiv den IL-1 α und β -Effekt (Langdahl et al., 2000) und kann den Wechsel in Richtung eines antiinflammatorischen M2-Makrophagenphänotyps induzieren. Es wird vermutet, dass die gezielte Inhibierung der IL-1 β Aktivität durch IL-1Ra effektiver die durch Abriebpartikel induzierten Entzündungsprozesse im Vergleich zur Hemmung der TNF- α Funktion mittels TNF- α Inhibitoren unterdrückt (Vallés et al., 2008).

Chemokine können bekanntermaßen eine zentrale Bedeutung bei der Polarisation von Makrophagen spielen. CCL-18 ist hierbei ein bekannter Vertreter der antiinflammatorischen M2-Marker (Martinez et al., 2006). Koulouvaris et al. brachten erstmalig CCL-18 in Zusammenhang mit der aseptischen Prothesenlockerung. Sie beobachteten, dass Makrophagen im Endstadium der Osteolyse einen alternativen Aktivierungsphänotyp zeigten, der insbesondere durch erhöhte CCL-18-Spiegel gekennzeichnet war (Koulouvaris et al., 2008). In dieser Arbeit konnte durch die verwendeten Stimulationsreize LPS und Titanpartikel keinen Effekt auf das Expressionsverhalten von CCL-18 gemessen werden. MSC beeinflussen Makrophagen nicht nur direkt durch ihre immunmodulatorische Fähigkeiten, sondern regulieren auch deren Chemotaxis. Bezüglich der entzündungshemmenden Rolle von CCL-18, insbesondere im Zusammengang mit MSC, gibt es nur sehr wenige Studien. Zudem

fürten Untersuchungen des CCL-18 Expressionsverhalten bei MSC geprägten Makrophagen in der Vergangenheit zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während bei Melief et al. und auch in dieser Arbeit die Interaktion von Makrophagen mit MSC zu einer Steigerung der CCL-18 Konzentration führte (Melief, Schrama, et al., 2013), löste in einer anderen Studie CCL-18 direkt in MSC keine chemotaktische Reaktion aus (Kalwitz et al., 2010).

4.5.4 Therapeutisches Potential MSC geprägte Makrophagen

Zur Verbesserung der Knochenregeneration beschränken sich aktuell die bestehenden Behandlungsmöglichkeiten weitestgehend auf das Potenzial von MSC (Dawson et al., 2014; Patterson et al., 2008). In jüngster Zeit konzentriert sich die Forschung jedoch zunehmend mit dem Einsatz von Makrophagen oder MSC geprägten Makrophagen, um eine Alternative in der Therapie periprothetischer Osteolysen zu schaffen. Auf der Grundlage der aktuellen Literatur ist zur Unterstützung der Knochenresorption vor allem die gezielte Modifikation der lokalen Makrophagenpolarisation in Richtung eines M2-Phänotyps vielversprechend. Chen et al. untersuchten die Auswirkungen des osteokonduktiven Biomaterials β -Tricalciumphosphat (β -TCP) auf die Interaktion zwischen murinen Makrophagen und menschlichen MSC aus dem Knochenmark (Z. Chen, Mao, et al., 2014; Z. Chen, Wu, et al., 2014). β -TCP stimulierte Makrophagen nahmen einen M2-ähnlichen Phänotyp an, mit verminderter Produktion von proinflammatorischen Mediatoren. MSC geprägte Makrophagen in β -TCP konditionierten Medien erhöhten die Expression von osteogenen Markern und die Matrixmineralisierung. In mehreren Studien wurden Biomaterialien entwickelt, die *in vivo* durch die Freisetzung von IL-4 die Makrophagenpolarisierung in Richtung eines M2-Phänotyps modulierten (Hachim et al., 2017; Minardi et al., 2016).

In Anbetracht der immunmodulatorischen Funktion von MSC ist eine attraktive Hypothese, dass MSC, die zunächst von entzündlichen Makrophagen rekrutiert werden und anschließend den Wechsel vom M1- zum M2-Phänotyp vermitteln. Durch eine frühzeitige Modifikation der Makrophagenpolarisation könnte eine Fehlregulierung verhindert und dadurch die Knochenregeneration verbessert werden (Pajarinen et al., 2019). Loi et al. (Loi et al., 2016) untersuchten die sequenzielle Modulation von murinen Makrophagen auf die durch Prä-Osteoblasten vermittelte Knochenbildung *in vitro*. Alle wichtigen Makrophagen-Phänotypen M0, M1 und M2 zeigten eine erhöhte Knochenbildung in direkter Kokultur. Interessanterweise führte jedoch eine Modulation der Makrophagenpolarisation von M1 zu M2 nach 72 Stunden zu einer weiteren Verbesserung der Knochenbildung, was darauf hindeutet, dass eine

vorübergehende Entzündungsphase, gefolgt von einer von M2 dominierten Regenerationsphase, zu einer optimalen Knochenbildung führen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Knochenregeneration auf der koordinierten Interaktion zwischen MSC und Makrophagen beruht. Obwohl die beschriebenen Modelle vielversprechende Resultate erbracht haben, sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Interaktion zwischen MSC und Makrophagen besser zu verstehen.

4.5.5 Limitationen der Arbeit

Eine Einschränkung dieser Arbeit bestand sicherlich im Alter der Knochenmarksspender, das mit durchschnittlich $67,2 \pm 10,5$ Jahren hoch war. Es ist allgemein bekannt, dass das Fehlen eines regulatorischen Phänotyps in alternden menschlichen MSCs mit dem Versagen dieser Zellen, was sich in einer signifikanten Reduzierung des Zytokinpiegels niederschlagen kann, korreliert (Sepulveda et al., 2014). Es wird vermutet, dass der Verlust der immunregulatorischen Aktivität in vivo bei alternden humanen MSCs auf ein reduziertes Migrationspotenzial und nicht auf eine Dysfunktion ihrer Signalmechanismen zurückzuführen ist (Kasper et al., 2009; Reed et al., 2001; Sandeman et al., 2000). Die alternden Zellen können die Funktion von Makrophagen bis zu einem gewissen Grad modulieren, aber zu wenige Zellen wären in der Lage, die Entzündungsorte zu erreichen, um einen klinischen Nutzen zu erzielen. Die alternden MSC in dieser Arbeit haben vermutlich durch ein vermindertes Migrationspotenzial zu einer Abschwächung der Reaktion beigetragen und erklären mitunter die Diskrepanz der Ergebnisse.

Zudem ist die Arbeit hinsichtlich der Überprüfung weiterer immunsuppressiver Mediatoren, wie z.B. *transforming growth factor- β* (TGF- β), Prostaglandin E2 und *Nuclear Factor Kappa B* (NF κ B), die MSCs über parakrine Effekte beeinflussen können, limitiert. Sie modulieren die Immunantwort und schaffen eine immunsuppressive Mikroumgebung und sind somit in der Lage ist entzündliche Prozesse zu modulieren (S. Shin et al., 2013). Eine zusätzliche Untersuchung dieser löslichen Faktoren hätte hilfreich sein können, um den Effekt von MSC auf mehreren Ebenen besser zu verstehen zu können.

4.6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der immunologisch nachgewiesenen Zytokine bestätigten, dass MSC während der Stimulation mit bakteriellem LPS oder Titan-Partikel die Sekretion verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Makrophagen beeinflussten und teilweise ihren alternativ aktivierten Phänotypen (TNF- α ↓, IL-6 ↑) im Gegensatz zu Makrophagen-Reinkulturen

beibehalten können. Die Synthese ausgewählter Oberflächenantigene ist weitestgehend auf die Makrophagen Kulturen beschränkt. Ein signifikanter Effekt von direkt oder indirekt kokultivierten MSC auf die Hochregulierung von CD206 bzw. Herunterregulierung von CD86 im Vergleich zur Makrophagen zeigte sich nicht. Damit MSC-geprägte Makrophagen als therapeutische Alternative bei aseptischer Prothesenlockerung in naher Zukunft zum Einsatz kommen können, muss die Auswirkung weiterer pro- und antiinflammatorischer Signale sowie ein verbessertes Verständnis bezüglich der spezifischen Rolle von MSCs geprägten Makrophagen untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung der aseptischen Prothesenlockerung hängt maßgeblich mit Abriebpartikeln zusammen. Makrophagen phagozytierten diese und initiieren eine Entzündungsreaktion, die zur periprotetische Osteolysen an der Knochen-Implantat-Grenzfläche führt. Unlängst wurde eine neue Spezies von alternativ aktivierten M2-Makrophagen beschrieben, die durch den Kontakt zu mesenchymalen Stromazellen (MSC) entstehen und potenziell in der Therapie von partikelinduzierter Prothesenlockerung eingesetzt werden könnten.

Die hier vorliegende Arbeit untersuchte die Reaktion von MSC geprägten Makrophagen unter inflammatorischen Bedingungen, indem humane Makrophagen aus Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut in direkter bzw. indirekter Ko-Kultur mit MSC aus dem Knochenmark menschlicher Hüftköpfen kultiviert und mit Titanpartikeln oder Lipopolysaccharide (LPS) über unterschiedliche Zeiträume (6/24 Stunden) stimuliert wurden. Die Expression der Makrophagen spezifischen Polarisationsmarker *cluster of differentiation* 86 (CD86) und CD206 wurden mit Hilfe Echtzeit-PCR (qPCR) sowie im Western Blot quantifiziert. Aus den Zellkulturüberständen wurde ein Profil mit den Zytokinen Tumornekrose Faktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), IL-10, IL-1Ra und Chemokin Ligand-18 (CCL18) mittels *Enzyme-linked Immunosorbent-Assay* (ELISA) bestimmt.

Einen signifikanten Effekt auf die Herunter- bzw. Hochregulierung der ausgewählten Oberflächenmarker CD86 und CD206 bei mesenchymal geprägte Makrophagen konnte nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse der immunologisch nachgewiesenen Zytokine zeigen, dass MSC unter osteolytischer Stimulation teilweise ihren alternativ aktivierten Phänotypen beibehalten können. Insbesondere bei MSC in direkter Kokultur mit Makrophagen kam es zu einer Hemmung der TNF- α , IL-10 und IL-1Ra Sekretion, wohingegen IL-6 vermehrt gebildet wurde. Die verwendeten Stimulationsreize scheinen jedoch keinen Effekt auf das CCL-18 Expressionsmuster zu haben. Erhöhte CCL-18 Konzentration bei MSC wurden in direkter und indirekter Kokultur in allen drei Ansätzen (LPS, Titan, Negativkontrolle) gemessen. Damit MSC-geprägte Makrophagen als therapeutische Alternative bei aseptischer Prothesenlockerung in naher Zukunft zum Einsatz kommen können, muss die Auswirkung weiterer pro- und antiinflammatorischer Signale sowie ein verbessertes Verständnis bezüglich der spezifischen Rolle von MSC geprägten Makrophagen untersucht werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abumaree, M. H., Al Jumah, M. A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., Abomaray, F. M., Fatani, A. S., Chamley, L. W., & Knawy, B. A. (2013): Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev* 9, 620-641.
2. Agins, H. J., Alcock, N. W., Bansal, M., Salvati, E. A., Wilson, P. D., Jr., Pellicci, P. M., & Bullough, P. G. (1988): Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis. *J Bone Joint Surg Am* 70, 347-356.
3. Anderson, P., Souza-Moreira, L., Morell, M., Caro, M., O'Valle, F., Gonzalez-Rey, E., & Delgado, M. (2013): Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 62, 1131-1141.
4. Antonios, J. K., Yao, Z., Li, C., Rao, A. J., & Goodman, S. B. (2013): Macrophage polarization in response to wear particles in vitro. *Cellular and Molecular Immunology* 10, 471-482.
5. Bi, Y., Collier, T. O., Goldberg, V. M., Anderson, J. M., & Greenfield, E. M. (2002): Adherent endotoxin mediates biological responses of titanium particles without stimulating their phagocytosis. *J Orthop Res* 20, 696-703.
6. Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010): Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 11, 889-896.
7. Blaine, T. A., Rosier, R. N., Puzas, J. E., Looney, R. J., Reynolds, P. R., Reynolds, S. D., & O'Keefe, R. J. (1996): Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles. *J Bone Joint Surg Am* 78, 1181-1192.
8. Bouchlaka, M. N., Moffitt, A. B., Kim, J., Kink, J. A., Bloom, D. D., Love, C., Dave, S., Hematti, P., & Capitini, C. M. (2017): Human Mesenchymal Stem Cell-Educated Macrophages Are a Distinct High IL-6-Producing Subset that Confer Protection in Graft-versus-Host-Disease and Radiation Injury Models. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 23, 897-905.
9. Bozic, K. J., Kurtz, S. M., Lau, E., Ong, K., Vail, T. P., & Berry, D. J. (2009): The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. *J Bone Joint Surg Am* 91, 128-133.
10. Brown, B. N., & Badylak, S. F. (2013): Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host-biomaterial interactions. *Acta Biomater* 9, 4948-4955.
11. Buly, R. L., Huo, M. H., Salvati, E., Brien, W., & Bansal, M. (1992): Titanium wear debris in failed cemented total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 7, 315-323.
12. Chen, E., Liu, G., Zhou, X., Zhang, W., Wang, C., Hu, D., Xue, D., & Pan, Z. (2018): Concentration-dependent, dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38/MAPK and NF- κ B signaling pathways. *FASEB J* 32, 4917-4929.

-
13. Chen, W., Li, Z., Guo, Y., Zhou, Y., Zhang, Z., Zhang, Y., Luo, G., Yang, X., Liao, W., Li, C., Chen, L., & Sheng, P. (2015): Wear particles promote reactive oxygen species-mediated inflammation via the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase pathway in macrophages surrounding loosened implants. *Cell Physiol Biochem* 35, 1857-1867.
 14. Chen, Z., Mao, X., Tan, L., Friis, T., Wu, C., Crawford, R., & Xiao, Y. (2014): Osteoimmunomodulatory properties of magnesium scaffolds coated with β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 35, 8553-8565.
 15. Chen, Z., Wu, C., Gu, W., Klein, T., Crawford, R., & Xiao, Y. (2014): Osteogenic differentiation of bone marrow MSCs by β -tricalcium phosphate stimulating macrophages via BMP2 signalling pathway. *Biomaterials* 35, 1507-1518.
 16. Cho, D. I., Kim, M. R., Jeong, H. Y., Jeong, H. C., Jeong, M. H., Yoon, S. H., Kim, Y. S., & Ahn, Y. (2014): Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental and Molecular Medicine* 46, e70.
 17. Cui, J., Zhu, M., Zhu, S., Wang, G., Xu, Y., & Geng, D. (2014): Inhibitory effect of icariin on Ti-induced inflammatory osteoclastogenesis. *J Surg Res* 192, 447-453.
 18. Dameshghi, S., Zavarani-Hosseini, A., Soudi, S., Shirazi, F. J., Nojehdehi, S., & Hashemi, S. M. (2016): Mesenchymal stem cells alter macrophage immune responses to *Leishmania major* infection in both susceptible and resistance mice. *Immunology Letters* 170, 15-26.
 19. Dawson, J. I., Kanczler, J., Tare, R., Kassem, M., & Oreffo, R. O. (2014): Concise review: bridging the gap: bone regeneration using skeletal stem cell-based strategies - where are we now? *Stem Cells* 32, 35-44.
 20. Dayan, V., Yannarelli, G., Billia, F., Filomeno, P., Wang, X. H., Davies, J. E., & Keating, A. (2011): Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology* 106, 1299-1310.
 21. Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., & Romagnani, S. (1993): Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150, 353-360.
 22. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
 23. Drees, P., Eckardt, A., Gay, R. E., Gay, S., & Huber, L. C. (2007): Mechanisms of disease: Molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 165-171.
 24. Eggenhofer, E., & Hoogduijn, M. J. (2012): Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res* 1, 12.
 25. Endoprothesenregister Deutschland. (2019): Jahresbericht 2019: Mit Sicherheit mehr Qualität. Berlin: EPRD Deutsche Endoprothesenregister gGmbH.
 26. Freytes, D. O., Kang, J. W., Marcos-Campos, I., & Vunjak-Novakovic, G. (2013): Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 114, 220-229.

-
27. Gao, S., Mao, F., Zhang, B., Zhang, L., Zhang, X., Wang, M., Yan, Y., Yang, T., Zhang, J., Zhu, W., Qian, H., & Xu, W. (2014): Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Exp Biol Med (Maywood)* 239, 366-375.
 28. Glant, T. T., & Jacobs, J. J. (1994): Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. *J Orthop Res* 12, 720-731.
 29. Gordon, S. (2003): Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 3, 23.
 30. Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010): Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
 31. Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 5, 953-964.
 32. Gupta, N., Su, X., Popov, B., Lee, J. W., Serikov, V., & Matthay, M. A. (2007): Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* 179, 1855-1863.
 33. Hachim, D., LoPresti, S. T., Yates, C. C., & Brown, B. N. (2017): Shifts in macrophage phenotype at the biomaterial interface via IL-4 eluting coatings are associated with improved implant integration. *Biomaterials* 112, 95-107.
 34. Heikkinen, J., Mottonen, M., Komi, J., Alanen, A., & Lassila, O. (2003): Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clinical and Experimental Immunology* 131, 498-505.
 35. Ingham, E., & Fisher, J. (2005): The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials* 26, 1271-1286.
 36. Jäger, M., Emami, R., Thorey, F., & Krauspe, R. (2006): Saving Implants BMP-2 Application in Revision Total Hip Surgery. *Int J Biomed Sci* 2, 187-195.
 37. Kalervo Väänänen, H. (2005): Mesenchymal stem cells. *Annals of Medicine* 37, 469-479.
 38. Kalwitz, G., Andreas, K., Endres, M., Neumann, K., Notter, M., Ringe, J., Sittinger, M., & Kaps, C. (2010): Chemokine profile of human serum from whole blood: migratory effects of CXCL-10 and CXCL-11 on human mesenchymal stem cells. *Connective Tissue Research* 51, 113-122.
 39. Kasper, G., Mao, L., Geissler, S., Draycheva, A., Trippens, J., Kuhnisch, J., Tschirschmann, M., Kaspar, K., Perka, C., Duda, G. N., & Klose, J. (2009): Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells* 27, 1288-1297.
 40. Kauther, M. D., Xu, J., & Wedemeyer, C. (2010): Alpha-calcitonin gene-related peptide can reverse the catabolic influence of UHMWPE particles on RANKL expression in primary human osteoblasts. *Int J Biol Sci* 6, 525-536.
 41. Kim, J., & Hematti, P. (2009): Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology* 37, 1445-1453.
 42. Kim, K. J., Rubash, H. E., Wilson, S. C., D'Antonio, J. A., & McClain, E. J. (1993): A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses. *Clin Orthop Relat Res*, 142-152.

-
43. Klopffleisch, R. (2016): Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers. *Acta Biomater* 43, 3-13.
 44. Kohro, T., Tanaka, T., Murakami, T., Wada, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., & Kodama, T. (2004): A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb* 11, 88-97.
 45. Koulouvaris, P., Ly, K., Ivashkiv, L. B., Bostrom, M. P., Nestor, B. J., Sculco, T. P., & Purdue, P. E. (2008): Expression profiling reveals alternative macrophage activation and impaired osteogenesis in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 26, 106-116.
 46. Kuczkowski, J., Sakowicz-Burkiewicz, M., Izycka-Swieszewska, E., Mikaszewski, B., & Pawelczyk, T. (2011): Expression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, interleukin-6 and interleukin-10 in chronic otitis media with bone osteolysis. *ORL; Journal of Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties* 73, 93-99.
 47. Langdahl, B. L., Lokke, E., Carstens, M., Stenkjaer, L. L., & Eriksen, E. F. (2000): Osteoporotic fractures are associated with an 86-base pair repeat polymorphism in the interleukin-1--receptor antagonist gene but not with polymorphisms in the interleukin-1beta gene. *J Bone Miner Res* 15, 402-414.
 48. Lee, S. S., Sharma, A. R., Choi, B. S., Jung, J. S., Chang, J. D., Park, S., Salvati, E. A., Purdue, E. P., Song, D. K., & Nam, J. S. (2012): The effect of TNFalpha secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 33, 4251-4263.
 49. Lin, E., Calvano, S. E., & Lowry, S. F. (2000): Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 127, 117-126.
 50. Loi, F., Córdova, L. A., Zhang, R., Pajarinen, J., Lin, T. H., Goodman, S. B., & Yao, Z. (2016): The effects of immunomodulation by macrophage subsets on osteogenesis in vitro. *Stem Cell Res Ther* 7, 15.
 51. Long, M., & Rack, H. J. (1998): Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective. *Biomaterials* 19, 1621-1639.
 52. Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzón, I. M., Nepomnaschy, I., Costa, H., Cañones, C., Raiden, S., Vermeulen, M., & Geffner, J. R. (2010): Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile. *PLoS ONE* 5, e9252.
 53. Mahon, O. R., & Dunne, A. (2018): Disease-Associated Particulates and Joint Inflammation; Mechanistic Insights and Potential Therapeutic Targets. *Front Immunol* 9, 1145.
 54. Mantovani, A. (1999): The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunology Today* 20, 254-257.
 55. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25, 677-686.
 56. Margevicius, K. J., Bauer, T. W., McMahan, J. T., Brown, S. A., & Merritt, K. (1994): Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J Bone Joint Surg Am* 76, 1664-1675.

-
57. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. (2006): Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177, 7303-7311.
 58. Melief, S. M., Schrama, E., Brugman, M. H., Tiemessen, M. M., Hoogduijn, M. J., Fibbe, W. E., & Roelofs, H. (2013): Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 31, 1980-1991.
 59. Melief, S. M., Zwaginga, J. J., Fibbe, W. E., & Roelofs, H. (2013): Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* 2, 455-463.
 60. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000): M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164, 6166-6173.
 61. Minardi, S., Corradetti, B., Taraballi, F., Byun, J. H., Cabrera, F., Liu, X., Ferrari, M., Weiner, B. K., & Tasciotti, E. (2016): IL-4 Release from a Biomimetic Scaffold for the Temporally Controlled Modulation of Macrophage Response. *Annals of Biomedical Engineering* 44, 2008-2019.
 62. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19, 683-765.
 63. Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008): Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews. Immunology* 8, 958-969.
 64. Mülhardt, C. (2013): *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. 7. Auflage. Berlin: Springer.
 65. Naskar, D., Nayak, S., Dey, T., & Kundu, S. C. (2014): Non-mulberry silk fibroin influence osteogenesis and osteoblast-macrophage cross talk on titanium based surface. *Sci Rep* 4, 4745.
 66. Nauta, A. J., & Fibbe, W. E. (2007): Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-3506.
 67. Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., & Mezey, E. (2009): Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine* 15, 42-49.
 68. Nich, C., Takakubo, Y., Pajarinen, J., Ainola, M., Salem, A., Sillat, T., Rao, A. J., Raska, M., Tamaki, Y., Takagi, M., Konttinen, Y. T., Goodman, S. B., & Gallo, J. (2013): Macrophages – Key Cells in the Response to Wear Debris from Joint Replacements. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 101, 3033-3045.
 69. Pajarinen, J., Lin, T., Gibon, E., Kohno, Y., Maruyama, M., Nathan, K., Lu, L., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2019): Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials* 196, 80-89.
 70. Pajarinen, J., Lin, T. H., Nabeshima, A., Jämsen, E., Lu, L., Nathan, K., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2017): Mesenchymal stem cells in the aseptic loosening of total joint replacements. *J Biomed Mater Res A* 105, 1195-1207.

-
71. Patterson, T. E., Kumagai, K., Griffith, L., & Muschler, G. F. (2008): Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1, 111-119.
 72. Ragab, A. A., Van De Motter, R., Lavish, S. A., Goldberg, V. M., Ninomiya, J. T., Carlin, C. R., & Greenfield, E. M. (1999): Measurement and removal of adherent endotoxin from titanium particles and implant surfaces. *J Orthop Res* 17, 803-809.
 73. Rao, A. J., Gibon, E., Ma, T., Yao, Z., Smith, R. L., & Goodman, S. B. (2012): Revision joint replacement, wear particles, and macrophage polarization. *Acta Biomater* 8, 2815-2823.
 74. Reed, M. J., Ferrara, N. S., & Vernon, R. B. (2001): Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mechanisms of Ageing and Development* 122, 1203-1220.
 75. Rehm, H., & Letzel, T. (2016): *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 7. Auflage. Berlin: Springer.
 76. Sabokbar, A., & Rushton, N. (1995): Role of inflammatory mediators and adhesion molecules in the pathogenesis of aseptic loosening in total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* 10, 810-816.
 77. Saldaña, L., Bensiamar, F., Vallés, G., Mancebo, F. J., García-Rey, E., & Vilaboa, N. (2019): Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors. *Stem Cell Res Ther* 10, 58.
 78. Sandeman, S. R., Allen, M. C., Liu, C., Faragher, R. G., & Lloyd, A. W. (2000): Human keratocyte migration into collagen gels declines with in vitro ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 119, 149-157.
 79. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011): The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813, 878-888.
 80. Schmitz, S. (2020): *Der Experimentator: Zellkultur*. 4. Auflage. Berlin: Springer.
 81. Schneemann, M., & Schoeden, G. (2007): Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J Leukoc Biol* 81, 579; discussion 580.
 82. Schwarz, E. M., Lu, A. P., Goater, J. J., Benz, E. B., Kollias, G., Rosier, R. N., Puzas, J. E., & O'Keefe, R. J. (2000): Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB signaling in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 18, 472-480.
 83. Sepulveda, J. C., Tome, M., Fernandez, M. E., Delgado, M., Campisi, J., Bernad, A., & Gonzalez, M. A. (2014): Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells* 32, 1865-1877.
 84. Shin, R. L., Lee, C. W., Shen, O. Y., Xu, H., & Lee, O. K. (2021): The Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and Macrophages in Bone Regeneration: A Systematic Review. *Stem Cells Int* 2021, 8835156.
 85. Shin, S., Kim, Y., Jeong, S., Hong, S., Kim, I., Lee, W., & Choi, S. (2013): The therapeutic effect of human adult stem cells derived from adipose tissue in endotoxemic rat model. *Int J Med Sci* 10, 8-18.
 86. Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016): Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplantation* 25, 829-848.

-
87. Sridharan, R., Cameron, A. R., Kelly, D. J., Kearney, C. J., & O'Brien, F. J. (2015): Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Materials Today* 18, 313-325.
 88. Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K., & Suttles, J. (2005): Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *The Journal of Immunology* 175, 342.
 89. Sundfeldt, M., V Carlsson, L., B Johansson, C., Thomsen, P., & Gretzer, C. (2006): Aseptic loosening, not only a question of wear: A review of different theories. *Acta Orthopaedica* 77, 177-197.
 90. Tan, H. Y., Wang, N., Man, K., Tsao, S. W., Che, C. M., & Feng, Y. (2015): Autophagy-induced RelB/p52 activation mediates tumour-associated macrophage repolarisation and suppression of hepatocellular carcinoma by natural compound baicalin. *Cell Death and Disease* 6, e1942.
 91. Ulich, T. R., Yin, S. M., Guo, K. Z., del Castillo, J., Eisenberg, S. P., & Thompson, R. C. (1991): The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. III. The interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist inhibits endotoxin- and IL-1-induced acute inflammation. *Am J Pathol* 138, 521-524.
 92. Vallés, G., Bensiamar, F., Maestro-Paramio, L., García-Rey, E., Vilaboa, N., & Saldaña, L. (2020): Influence of inflammatory conditions provided by macrophages on osteogenic ability of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 11, 57.
 93. Vallés, G., Gil-Garay, E., Munuera, L., & Vilaboa, N. (2008): Modulation of the cross-talk between macrophages and osteoblasts by titanium-based particles. *Biomaterials* 29, 2326-2335.
 94. Viswanathan, S., Ciccocioppo, R., Galipeau, J., Krampera, M., Le Blanc, K., Martin, I., Moniz, K., Nolta, J., Phinney, D. G., Shi, Y., Szczepiorkowski, Z. M., Tarte, K., Weiss, D. J., & Ashford, P. (2021): Consensus International Council for Commonality in Blood Banking Automation-International Society for Cell & Gene Therapy statement on standard nomenclature abbreviations for the tissue of origin of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 23, 1060-1063.
 95. Wei, X., Yang, X., Han, Z.-p., Qu, F.-f., Shao, L., & Shi, Y.-f. (2013): Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 34, 747-754.
 96. Willert, H. G., & Semlitsch, M. (1996): Tissue reactions to plastic and metallic wear products of joint endoprostheses. *Clin Orthop Relat Res*, 4-14.
 97. Xu, J., Kauther, M. D., Hartl, J., & Wedemeyer, C. (2010): Effects of alpha-calcitonin gene-related peptide on osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression in MG-63 osteoblast-like cells exposed to polyethylene particles. *J Orthop Surg Res* 5, 83.
 98. Zhang, K., Yang, S. Y., Yang, S., Bai, L., Li, P., Liu, D., Schurman, J. R., 2nd, & Wooley, P. H. (2015): Different influence of Ti, PMMA, UHMWPE, and Co-Cr particles on peripheral blood monocytes during periprosthetic inflammation. *J Biomed Mater Res A* 103, 358-364.

-
99. Zhang, Q. Z., Su, W. R., Shi, S. H., Wilder-Smith, P., Xiang, A. P., Wong, A., Nguyen, A. L., Kwon, C. W., & Le, A. D. (2010): Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells* 28, 1856-1868.
 100. Zheng, Y. H., Deng, Y. Y., Lai, W., Zheng, S. Y., Bian, H. N., Liu, Z. A., Huang, Z. F., Sun, C. W., Li, H. H., Luo, H. M., Ma, L. H., Chen, H. X., & Xiong, B. (2018): Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the polarization of macrophages. *Mol Med Rep* 17, 4449-4459.

7. ANHANG

7.1 Laborgeräte, Software, Verbrauchsmaterialien, Oligonukleotide, Reagenzsysteme, Antikörper

Supplementäre Daten 1: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller, Standort
Agilent Sure Thermocycler	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien USA
Antair BSK Sterilbank	Bio-Flow Technik GmbH, Meckenheim
Applied Biosystems AB7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystem, Karlsbad, Kalifornien USA
Axiostar plus Auflichtmikroskop Objektive: 10x,20x,40x, SP100 Oil	Carl Zeiss AG, Jena
Biometra BIO105LVD Power Supply	Biometra, Göttingen
Biometra Mini-Gel Twin Gelelektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Eppendorf Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Resaerch Plus Einkanal-Pipetten: Volume: 0.5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf MiniSpin Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
FACS Calibur Durchflusszytometer	BD bioscience, Heidelberg
Forma Scientific Bio Freezer -80°C Tiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fuison SL Chemilumineszenz-Detektionssystem	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich
Hämazytometer-Deckgläser, 20x26mm	Carl Roth, Karlsruhe
Hämazytometer; Zählkammer ohne Federklemmen; Kammertiefe: 0,1 mm, Großquadrat: 1mm ² , Gruppenquadrat: 0.04 mm ² , Kleinstquadrat: 0.0025 mm ²	Carl Roth, Karlsruhe
HERAcell 240i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Fresco 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Laborfuge 400 R Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Varifuge 3.0 R Standzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
IKA Ikamag Reo Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
IKA MTS 4 Kreisschüttler für Mikrotiterplatten	IKA Labortechnik, Staufen
Julabo TWB12 Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Labex® 432 Labor-Kühlschrank	Kirsch, Offenburg
Liebherr Gp1366 Premium Stand-Gefrierschrank	Liebherr, Biberach

Liebherr KT1830 Comfort Stand-Kühlschrank	Liebherr, Biberach
MACS Separator pro Zellseparator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mini-Protocan Tetra System Elektrophorese	Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA
Multiscan Ascent ELISA Reader	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MSC-Advantage Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Power Supply EPS 2A100	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
RS Series 750 RS Kryokonservierungssystem	Taylor-Wharton, Theodore, Alabama, USA
Thermo Finnpipette Multikanal-Pipetten: Volumen: 5-50µl, 50-300µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ultrasonic Cleaner USC 200T	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA

**Supplementäre Daten 2:
Software**

Software	Hersteller, Standort
Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System; V 1.3	Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien USA
Bio-Plex Manager 6.0	Bio-Rad, herkules, Kalifornien USA
ELISA MicroWin 4.44	Mikrotek Laborsysteme, Overath
EndNote X8	Thomson Reuters, Karlsbad, Kalifornien, USA
FACS CellQuest pro 6.0	BD bioscience, Heidelberg
Fusion SL Bildanalyse-Software	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Frankreich
Irfan View Version 4.40	Irfan Skiljan, Wien, Österreich
Microsoft Office 2013	Microsoft, Redmond, Washington, USA
NanoDrop 1000 V3.7.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SDS V1.3 für AB7500 Real-Time PCR Series	Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA

**Supplementäre Daten 3:
Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Standort
8–16% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 µl	Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA
BD Falcon Multiwell Zellkulturplatten, Format 24-well, 96-well	BD Biosciences, Heidelberg
Cell Culture Flask T75 (roter Filterdeckel)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cell Culture Inserts, 24-Well, Translucent, 0,4HD	BD Bioscience, Heidelberg
Clean and Clever Kosmetiktücher	Igefa, Ahrensfelde OT Blumberg
Cryo.s Einfrierröhrchen, Volumen: 2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Ecotainer Aqua steriles Wasser (AMPUWA)	B. Braun, Melsungen
Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße, Volumen: 1.5 ml, 2.0 ml	VWR International Darmstadt
Film - Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Filter 30µm Cell Trics	Sysmex AG, Norderstedt
Klarsichtsfolie Sarogold pro	Carl Roth, Karlsruhe
Li-Heparin Monowetten, 500Stk.	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Lyreco Prospekthüllen DIN A4, Stärke: 0.08mm	Lyreco, Barsinghausen
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
MicroAmp optische Klebefolie für 96-well optische Mikrotiterplatten	Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornien, USA
MultiFlex-Kristall-Tips Gelbladungs-Spitzen, Volumen: 0.5 - 10 µl	Carl Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose-Membran 0.45 µm	Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA
Parafilm "M" Polymerfilm	American National Can, Chicago, Illinois, USA
Petrischale 100 x 15mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Precision Plus Dual Color Protein Standard, 10 - 250 kDa	Bio-Rad, Herkules, Kalifornien, USA
Qiagen RNAase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Röntgen - Entwicklerkonzentrat	Adefo Chemie, Neu Isenburg
Röntgen - Fixierkonzentrat	Adefo Chemie, Neu Isenburg
SepMate Polypropylen-Röhrchen mit Schraubverschluss, konisch, steril, Volumen: 50ml	STEMCELL Technologies, Köln
Serologische Pipetten, Volumen: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
terralin liquid Flächendesinfektion	Schülke & Mayr, Norderstedt
Thermo-Fast 0.2 ml optische 96-well real-time optische PCR Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TipOne Pipettenspitzen, Volumen 0,5µl -10µl, 10µl - 100µl, 100µl - 1250µl	Starlab, Hamburg
Transferpipetten, Volumen: 3.5 ml, steril	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
ultratip Pipettenspitzen,	Greiner Bio-One, Frickenhausen
VWR Filterspitzen, Volumen: 0.1 - 10 µl, 1 - 100 µl, 100 - 1000 µl	VWR International, Darmstadt
Whatman-Filterpapier	Whatman, Dassel
Zellschaber 24cm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellsiebe 70µm	SPL life Sciences, Naechon-myeon, Südkorea

**Supplementäre Daten 4:
Oligonukleotide**

Name	Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')	Annealing Temperatur (°C)
CD 86	Hs_CD86_1_SG	55°C
CD 206	Hs_MRC1_1_SG	55°C
GAPDH	Hs_GAPDH_1_SG	55°C

**Supplementäre Daten 5:
Reagenzsysteme (Kits)**

Kit	Katalog-Nr.	Hersteller
CD14 MicroBeads, human	130-050-201	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
DuoSet ELISA, human CCL18/PARC, 15 Platten	DY394	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
DuoSet ELISA, human IL-1ra/IL-1F3, 5 Platten	DY280-05	
DuoSet ELISA, human IL-6, 15 Platten	DY206	
DuoSet ELISA, human IL-10, 15 Platten	DY217B	
DuoSet ELISA, human IL-12, 15 Platten	DY1270	
DuoSet ELISA, human TNF- α , 15 Platten	DY210	
QuantiTect® Primer Assay, 400 Reaktionen - Hs_CD86_1_SG - Hs_GAPDH_1_SG - Hs_MRC1_1_SG	QT00033915 QT00079247 QT00012810	
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit, 1000 Reaktionen	204145	
Nucleo Spin II RNA Isolation	740955.50	Machery Nagel, Düren
Micro BCA Assay Kit	23235	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate	32106	
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	K1632	

**Supplementäre Daten 6:
Antikörper für die Anwendung der Durchflusszytometrie der Makrophagen**

Konjugat	Antikörper-Spezifität	Klon	Konzentration	Isotyp	Katalog-Nummer	Firma
APC	anti-human CD14	MEM-15	1 μ l/ Test	Maus IgG1	21279146	ImmunoTools, Friesosythe
PE	anti-human CD3	MEM-57	3 μ l/ Test	Maus IgG2a	21270034	ImmunoTools, Friesosythe

**Supplementäre Daten 7:
Antikörper für die Anwendung der Durchflusszytometrie der MSCs**

Konjugat	Antikörper-Spezifität	Klon	Konzentration	Isotyp	Katalog-Nummer	Firma
PE	anti-human CD29	MAR4	20µl/ Test	Maus IgG1	555443	BD Pharmingen
APC	anti-human CD31	WM-59	5µl/ Test	Maus IgG1	47-0319-42	Invitrogen
FITC	anti-human CD34	MOPC-21	20µl bis 5µl/ Test	Maus IgG1	343503	Bio Legend
V500	anti-human CD45	HI30	5µl/ Test	Maus IgG1	560777	BD Horizon
PerCP-eFluor710	anti-human CD73	AD2	5µl/ Test	Maus IgG1	46-0739-42	Invitrogen
Brilliant Violet 421	anti-human CD90	5E 10	5µl/ Test	Maus IgG1	328121	Bio Legend
PE/Cy7	anti-human CD105	43A3	20µl bis 5µl/ Test	Maus IgG1	323217	Bio Legend

**Supplementäre Daten 8:
Erster und zweiter Antikörper Western Blot**

Antikörper	Reaktivität	Spezies	Katalog-Nummer	Hersteller
Primärantikörper				
anti-CD86, monoklonal	human	Kaninchen	ab53004	Abcam, Cambridge, UK
GAPDH, polyklonal	human	Kaninchen	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Anti-Mannose CD 206, polyklonal	human	Kaninchen	ab64693	Abcam, Cambridge, UK
Sekundärantikörper				
Anti-Kaninchen IgG – HRP	Kaninchen	Ziege	A0545	Merck, Darmstadt, Deutschland

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der aseptischen Prothesenlockerung durch periprothetische Osteolyse	8
Abbildung 2: Makrophagenpolarisationsparadigma	10
Abbildung 3: Generierung von MSC-geprägten Makrophagen (MGM).....	13
Abbildung 4: Direkte und indirekte Kokultur MSC-geprägter Makrophagen	16
Abbildung 5: Röhrchen mit Dichtegradientenmedium vor und nach Zentrifugation	18
Abbildung 6: Charakterisierung der Monozyten mittels Oberflächenmarker CD14	30
Abbildung 7: Morphologie differenzierter humaner Makrophagen isoliert aus PBMSC	31
Abbildung 8: Morphologie humaner mesenchymaler Stammzellen	31
Abbildung 9: Charakterisierung anhand von Oberflächenmarkern durch FACS-Analyse	32
Abbildung 10: Morphologie mesenchymal geprägter Makrophagen.....	32
Abbildung 11: Proteinexpression von CD86 und CD206	34
Abbildung 12: Relative Zytokinsekretion von TNF- α	39
Abbildung 13: Relative Zytokinsekretion von IL-6	40
Abbildung 14: Relative Zytokinsekretion von IL-10	42
Abbildung 15: Relative Zytokinsekretion von IL-1Ra	43
Abbildung 16: Relative Zytokinsekretion von CCL-18.....	44

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Blut- und Knochenmarkspender/innen	15
Tabelle 2: Hersteller mit Standorten	17
Tabelle 3: Kulturmedium Makrophagen	19
Tabelle 4: Kulturmedium MSCs.....	20
Tabelle 5: Schema der Stimulation der Kokulturen	22
Tabelle 6: Standard-Reaktionsansatz RT	24
Tabelle 7: Standard- Reaktionsansatz qPCR.....	24
Tabelle 8: Standard qPCR-Programm mit Primer-spezifischen Annelaig-Temperaturen.....	25
Tabelle 9: SDS-Laufpuffer	27
Tabelle 10: Towbin-Transferpuffer	28
Tabelle 11: Messbereiche der ELISA	29
Tabelle 12: Übersicht über die Analyse der MSC Charakterisierung.....	31
Tabelle 13: Relative mRNA Expression [%] von CD86 und CD206.....	33
Tabelle 14: Relativer fold mRNA Expressionsquotient von CD 86 und CD 206	33
Tabelle 15: Relative CD86 mRNA-Expression	37
Tabelle 16: Relative CD206 mRNA Expression	38
Tabelle 17: Übersicht über die relative Zytokinsynthese	46
Tabelle 18: Laborgeräte	67
Tabelle 19: Software	68
Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien.....	68
Tabelle 21: Oligonukleotide	70
Tabelle 22: Reagenzsysteme (Kits)	70
Tabelle 23: Antikörper für die Anwendung der Durchflusszytometrie der Makrophagen.....	70
Tabelle 24: Antikörper für die Anwendung der Durchflusszytometrie der MSCs	71
Tabelle 25: Erster und zweiter Antikörper Western Blot	71

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ASC	<i>adipose-derived mesenchymal stem cells</i>	mM	<i>Millimolar</i>
β-TCP	<i>Biomaterials β-Tricalciumphosphat</i>	mMSC	<i>murine MSC</i>
BCA	<i>Bicinchoninsäure</i>		
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>	MSC	<i>mesenchymale Stammzellen</i>
CCL-18	<i>Chemokin-Ligand-18</i>	NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>	NK-Zellen	<i>natürlichen Killerzellen</i>
cDNA	<i>complenmentary DNA</i>	nm	<i>Nanometer</i>
C _t -Wert	<i>threshold cycle</i>	NRT	<i>no reverse transcription control</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	NTC	<i>no template control</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>	OD	<i>optische Dichte</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>	PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
DPBS-T	<i>DPBS + Twinn-20</i>	PET	<i>Polyethylene terephthalate</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent-Assay</i>	pMSC	<i>plazentare MSC</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i>	qPCR	<i>quantitative Polymerasekettenreaktion</i>
FCS	<i>fetales Kälberserum</i>	RBC	<i>red blood cells</i>
<i>g</i>	<i>RCF, Relative Zentrifugalbeschleunigung</i>	rDNase	<i>rekombinante Deoxyribonuklease</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>	RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
h	<i>Stunde</i>	RNase	<i>Ribonuklease</i>
HKG	<i>housekeeping gene</i>	RT	<i>Reverse Transkription</i>
HLA-DR	<i>humanes Leukozyten Antigen – DR isotype</i>	SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
HRP	<i>Meerrettichperoxidase, horseradish peroxidase</i>	TE-Puffer	<i>tris Ethylenediaminetetraacetic acid-Puffer</i>
IC	<i>immune complex</i>	TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
IFN-γ	<i>Interferon-γ</i>	TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
IL	<i>Interleukin</i>	Th1	<i>Typ 1-T-Helferzelle</i>
IL-1Ra	<i>IL-1 Rezeptorantagonisten</i>	Th2	<i>Typ 2-T-Helferzelle</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's Medium</i>	Ti	<i>Titan</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>	TJR	<i>total joint replacement</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>	TLR	<i>toll-like receptor</i>
MACS	<i>Magnet-associated Cell-Sorting</i>	TMB	<i>Tetramethylbenzidin</i>
MDB	<i>Membrane Desalting Buffer</i>	TNF	<i>Tumornekorse-Faktor</i>
MEM	<i>Minium Essential Medium</i>	U	<i>Unit</i>
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acids</i>		
MGM	<i>MSC-geprägte Makrophagen</i>	v/v	<i>Volumen/Volumen</i>
MHC	<i>major histocompatibility class</i>	λ	<i>Lambda</i>
min	<i>Minute</i>	μg	<i>Mikrogramm</i>
ml	<i>Milliliter</i>	μl	<i>Mikroliter</i>

9. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Marcus Jäger, für die Möglichkeit dieser Dissertationsschrift in seiner Arbeitsgruppe bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen beiden Betreuerinnen Frau Dr. med. Heidrun Jablonski und Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Monika Herten für die Planung der Experimente und Unterstützung bei der Ausarbeitung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht auch an Heike Rekasi für ihre Hilfe beim Erlernen der methodischen Abläufe und ihren unermüdlichen Einsatz in der experimentellen Phase. Danke auch Dominik Kreuzberg für die Zusammenarbeit während der gesamten Zeit.

Ganz herzlich danke ich an dieser Stelle auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biomaterialien und Osteoimmunologie sowie Immunologie Sepsis/Trauma für die unkomplizierte Aufnahme und das hilfsbereite Miteinander.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich die gesamte Zeit über immer wieder motiviert und unterstützt hat.

10. LEBENSLAUF

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."