



Einfluss von oxidativem Stress auf das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Benita Annabella Friederike Sahlender
aus Düsseldorf

Düsseldorf, September 2018

aus dem Institut für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

2. Prof. Dr. phil. nat. Freifrau Charlotte von Gall

Tag der mündlichen Prüfung: 05. November 2018

für Beryl

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Stammzellen.....	1
1.1.1 Allgemeine Charakterisierung von Stammzellen	1
1.1.2 Funktionen mesenchymaler Stammzellen im Organismus.....	2
1.1.3 Das Fettgewebe als Stammzellquelle	4
1.1.4. Nachweis des mesenchymalen Stammzellcharakters	6
1.1.5 Mesenchymale Stammzellen im „Tissue Engineering“	7
1.1.6 Altersseneszenz mesenchymaler Stammzellen	10
1.2 Oxidativer Stress	10
1.2.1 Antioxidantien.....	13
1.3 Osteogene Differenzierung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	15
1.3.1 Molekulare Aspekte der Osteogenese.....	17
1.3.2 Osteogenese <i>in vitro</i>	19
1.4 Osteogene Differenzierung und oxidativer Stress	20
2 Ziele der Arbeit.....	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Substanzen	23
Geräte	23
Verbrauchsmaterialien	24
Substanzen	25
Antikörper	28
Software	28
Zellen.....	29
3.2 Medien, Lösungen und Puffer.....	29
3.3 Zellkultur	32
3.3.1 Allgemeines.....	32
3.3.2 ASC-Isolierung und Kultivierung der ASCs	33
3.3.3 Passagierung der Zellen	33

3.3.4 Vitalitätstest und Lebendzellzahlermittlung	34
3.3.5 Kryokonservierung	34
3.3.6 Auftauen der Zellen	35
3.4 Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS))	35
3.5 Differenzierung unter Standardbedingungen	36
3.5.1 Allgemeines	36
3.5.2 Osteogene Differenzierung	36
3.5.3 Nachweis der osteogenen Differenzierung mittels Alizarinrot-S-Färbung	37
3.5.4 Nachweis der osteogenen Differenzierung mithilfe des Alkalischen Phosphataseassays	38
3.5.5 Nachweis der osteogenen Differenzierung auf Proteinebene	38
3.5.6 Chondrogene Differenzierung	39
3.5.7 Nachweis der chondrogenen Differenzierung mittels Alcianblau Färbung	39
3.5.8 Nachweis der chondrogenen Differenzierung auf Proteinebene	40
3.5.9 Adipogene Differenzierung	40
3.5.10 Nachweis der adipogenen Differenzierung mittels Ölrotfärbung	41
3.5.11 Nachweis der adipogenen Differenzierung auf Proteinebene	41
3.6 Proteinnachweis mittels Western Blot	42
3.6.1 Basisreaktion der Proteinbestimmung	42
3.6.2 Proteinlysate	42
3.6.3 Proteinbestimmung	42
3.6.4 SDS-Page	43
3.6.5 Herstellung der Gele	44
3.6.6 Probenvorbereitung	45
3.6.7 SDS-Page	45
3.6.8 Blotting	46
3.6.9 Ponceau-S-Färbung	47
3.6.10 Blocken und Antikörperfärbung	47
3.6.11 Detektion der Banden	49
3.6.12 Densitometrische Auswertung	49
3.7 Messung des intrazellulären ROS	49
3.8 Induktion von ROS	50
3.8.1 H ₂ O ₂	50
3.8.2 UVA	51

3.9. Behandlung mit Antioxidantien und Inhibitoren	51
3.9.1 Katalase	51
3.9.2 MnSOD	52
3.9.3 NAC und Glutathion	52
3.9.4 Ascorbat	52
3.9.5 ATA.....	53
3.10 Nachweis von Doppelstrangbrüchen nach ROS-Induktion	53
3.10.1 Immunfluoreszenzfärbung.....	53
3.11 Detektion des intrazellulären ROS mittels DCFDA.....	54
3.12 Statistik.....	55
4 Ergebnisse	56
4.1 Nachweis des Stammzellcharakters.....	56
Unterscheidung zwischen Responder- und Nonresponderzellen	56
4.1.1 Plastikadhärenz.....	57
4.1.2 Expression charakteristischer Oberflächenantigene	58
4.1.3 Differenzierung in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung.....	60
4.2 Osteogene Differenzierung und die Expression Reaktiver Sauerstoffspezies	72
4.2.1 ROS-Generierung während der Osteogenese.....	74
4.3 Toleranz konfluent und nicht konfluent gewachsener Zellen gegenüber ROS- Induktoren	79
4.3.1 Auswirkungen einer ROS-Induktion mittels H ₂ O ₂	79
4.3.2 Auswirkungen einer ROS-Induktion mittels UVA.....	82
4.4 Effekte einer ROS-Induktion auf die Osteogenese	85
4.4.1 Osteogene Differenzierung unter Zugabe verschiedener Antioxidantien.....	93
5 Diskussion	102
5.1 Kritische Betrachtung der Ergebnisse und klinische Verwendbarkeit.....	118
6 Literaturverzeichnis	120
Danksagung.....	129
Wissenschaftliche Beiträge	130
Vorträge	130
Poster	130
Eidesstattliche Erklärung.....	131

Zusammenfassung

Der Einsatz mesenchymaler Stammzellen in der regenerativen Medizin gewinnt eine immer größere Bedeutung, besonders im Bereich des *Tissue Engineering*. Wurden bis vor wenigen Jahren besonders knochenmarkstämmige Stammzellen für (autologe) Stammzelltherapien eingesetzt, gewannen in letzter Zeit Stammzellen aus dem Fettgewebe eine immer größere Bedeutung, da sie im Gegensatz zu knochenmarkstämmigen Stammzellen minimalinvasiv und komplikationsärmer gewonnen werden können. Allerdings stellt bei allen autologen Stammzelltherapien die Seneszenz der Zellen eine nicht zu unterschätzende Problematik dar. Dabei muss sowohl die Seneszenz berücksichtigt werden, welche aufgrund des fortgeschrittenen Alters der Spenderin oder des Spenders auftritt, aber auch die Seneszenz, welche unter Kulturbedingungen zu beobachten ist, da die Notwendigkeit, eine ausreichende Zellmenge zur Verfügung zu haben, es oftmals erfordert, dass die Zellen für eine gewisse Zeit in Kultur gehalten und so lange *in vitro* vermehrt werden, bis die für die jeweilige Therapie benötigte Zellzahl vorliegt. Um eine Vermehrung der Zellen zu erreichen, müssen die Zellen in regelmäßigen Abständen auf neue Zellkulturgefäße aufgeteilt („passagiert“) werden, um den Zellen genügend Platz für weitere Zellteilungen bieten zu können. In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass Zellen, die zehnmal oder häufiger passagiert wurden, ein bereits stark reduziertes Differenzierungspotential aufweisen.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf interindividuellen Unterschieden zwischen den Zellen der verschiedenen Spender(innen). Ich konnte zeigen, dass mit zunehmendem Alter der Stammzellspenderin oder des Stammzellspenders die Fähigkeit der Zellen, osteogen zu differenzieren, signifikant reduziert ist oder gar vollständig verschwindet. Gut osteogen zu differenzierende Zellen bezeichneten wir demzufolge als Responderzellen, Zellen mit einem stark verminderten osteogenen Differenzierungspotential hingegen als Nonresponderzellen.

Weiterführend konnte ich zeigen, dass eine exogene Erhöhung des reaktiven Stresses durch eine Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid

das Differenzierungspotential der Zellen signifikant reduzierte. Statt der induzierten Osteogenese trat eine Adipogenese der mit H_2O_2 behandelten Zellen ein. Dieser Effekt war umso stärker ausgeprägt, je höher die eingesetzten H_2O_2 -Konzentrationen waren. Auch eine intrazelluläre Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies durch eine Bestrahlung mit UVA führte zu einer Reduktion der osteogenen Differenzierung und einer Verschiebung Richtung Adipogenese. Auch hier war die Verschiebung von der osteogenen hin zur adipogenen Differenzierung umso stärker ausgeprägt, je höher die gewählten UVA-Dosen waren. Eine Behandlung der Zellen mit Katalase, welche Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff umsetzt, führte dagegen zu einer signifikanten Erhöhung der Osteogenese der Zellen. Dies traf sowohl auf die Responder- als auch auf die Nonresponderzellen zu. Die Behandlung der Zellen mit anderen Antioxidantien zeigte hingegen keine signifikanten Auswirkungen auf das osteogene Differenzierungspotential. Der molekulare Mechanismus, der zu dem beschriebenen, signifikant positiven Effekt der Katalase auf die osteogene Differenzierung der fettstämmigen Stammzellen führt, bleibt Gegenstand weiterführender Arbeiten.

Die Beobachtung, dass es mithilfe einer Katalasebehandlung möglich ist, das osteogene Differenzierungspotential der Zellen signifikant zu verbessern, könnte, nach Aufklärung der dahinterstehenden, molekularen Ursachen, den Grundstein für die Entwicklung neuartiger Therapien zur Behandlung großer Knochendefekte legen, welche die bisher gängigen Therapieformen, wie den Einsatz von *Scaffolds* unterstützen oder gar ersetzen könnte.

Summary

The use of mesenchymal stem cells in regenerative medicine has grown in significance recently, especially in the field of tissue engineering. While up until the last few years, bone marrow cells were largely used for autogenic stem cell therapy, harvesting stem cells from fat tissue has grown in popularity, mainly due to the fact that gathering these cells is a relatively minimally-invasive procedure with a low risk of complications. Nevertheless, as with all autogenic stem cell therapies, cell senescence presents a difficulty that cannot be underestimated. In doing so, both the deterioration resulting from the advanced age of a donor, as well as the deterioration arising from the culture in which the cells are grown, must be considered, as the necessity of having an adequate amount of cells for treatment often requires cells to be kept in a culture for a certain amount of time in order to proliferate until the number of cells required for the particular therapy is reached. For cell multiplication to occur, the stem cells must be allocated (“passaged”) to new growth culture plates at regular intervals so that the cells gain enough space for further divisions. In this dissertation I showed that cells that have been passaged for ten times have a significantly reduced differentiation potential.

This dissertation also showed a high variability of osteogenic stem cells differentiation variances among individual donors. I showed that, as the age of the stem cell donor increased, osteogenic cell differentiation severely declined or even disappeared completely. I classified cells that were capable of good osteogenic differentiation as responder cells and those with a reduced osteogenic differentiation potential as non-responder cells.

In addition, I was able to show that cell treatment with concentrated hydrogen peroxide also significantly reduces the differentiation potential of cells. Treatment of cells with catalase, which converts hydrogen peroxide to water and oxygen, leads in contrast to a significant increase in cell osteogenesis. This applied to the responder and non-responder cells alike. On the other hand, treatment with other antioxidants showed no significant effect on the osteogenic differentiation potential of stem cells. The molecu-

lar mechanism behind the significant positive effect of catalase on osteogenic differentiation of fat stem cells as described in this paper remains a topic for further research.

The observation that cell osteogenesis can be significantly improved with the help of stem cell treatment through catalase could, following the elucidation of underlying molecular causes, lay the foundation for developing new forms of therapy to treat large bone defects – which could support or entirely replace established forms of therapy such as the use of scaffolds.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	
Die wichtigsten Stammzellquellen des menschlichen Körpers.....	3
Abbildung 2:	
Isolation, Kultivierung und klinische Anwendung mesenchymaler Stammzellen.	9
Abbildung 3:	
Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies.	12
Abbildung 4:	
Glutathion	14
Abbildung 5:	
Katalasereaktionen.	15
Abbildung 6:	
Enchondrale Ossifikation.	17
Abbildung 7:	
Aufbau des Western Blots.	46
Abbildung 8:	
Fettstämmige Stammzellen	57
Abbildung 9:	
FACS-Analyse der Oberflächenantigenexpression.....	59
Abbildung 10:	
Photografische Dokumentation der adipogenen Differenzierung	62
Abbildung 11:	
Quantifizierung der adipogenen Differenzierung.....	63
Abbildung 12:	
Photografische Dokumentation der chondrogenen Differenzierung.....	64
Abbildung 13:	
Quantifizierung der Stärke der Chondrogenese	65
Abbildung 14:	
Differenzierungsverhalten nach osteogener Induktion von Nonresponderzellen.	66
Abbildung 15:	
Alizarinrot S-gefärbte Zellen eines Responders nach osteogener Differenzierung	66
Abbildung 16:	
Quantifizierung der Stärke der Osteogenese nach osteogener Induktion	67
Abbildung 17:	
Messung der alkalischen Phosphataseaktivität nach osteogener Induktion	68
Abbildung 18:	
Messung der Runx2-Proteinexpression (Western Blot) von Nonresponder- und Responderzellen.....	69
Abbildung 19:	
Messung der Osterix-Proteinexpression (Western Blot) von Nonresponder- und Responderzellen.....	70
Abbildung 20:	
Messung der BMP2-Proteinexpression (Western Blot) von Nonresponder- und Responderzellen.....	71

Abbildung 21:	Abnahme der Fähigkeit der Zellen, mit zunehmendem Spenderalter osteogen zu differenzieren.....	73
Abbildung 22:	Grundexpression Reaktiver Sauerstoffspezies in Responder- und Nonresponderzellen.	74
Abbildung 23:	ROS-Expression in Responder- und Nonresponderzellen während der Osteogenese. ...	75
Abbildung 24:	Messung der alkalischen Phosphataseaktivität in Responder- und Nonresponderzellen nach osteogener Induktion.	76
Abbildung 25:	Kalzifizierungsgrad der EZM von Responder- und Nonresponderzellen.	77
Abbildung 26:	Quantifizierung der Kalzifizierung der EZM von Responder- und Nonresponderzellen nach osteogener Induktion.	78
Abbildung 27:	Überlebensrate nicht-konfluenter Zellen nach Behandlung mit verschiedenen H ₂ O ₂ -Konzentrationen.	80
Abbildung 28:	Überlebensrate konfluent gewachsener Zellen nach Behandlung mit verschiedenen H ₂ O ₂ -Konzentrationen.	81
Abbildung 29:	Immunhistochemische Darstellung des phosphorylierten Histonproteins H2AX nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen H ₂ O ₂ -Konzentrationen.	82
Abbildung 30:	Überlebensrate nicht konfluent gewachsener Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen UVA-Dosen.	83
Abbildung 31:	Überlebensrate konfluent gewachsener Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen UVA-Dosen.	84
Abbildung 32:	γH2AX-Färbung zur Detektion von Doppelstrangbrüchen in UVA-bestrahlten Zellen.	85
Abbildung 33:	Quantifizierung der Kalzifizierung der EZM osteogen differenzierter ASCs bei gleichzeitiger Behandlung mit verschiedenen H ₂ O ₂ -Konzentrationen.	87
Abbildung 34:	Auswirkung verschiedener H ₂ O ₂ -Konzentrationen auf die Osteogenese.....	87
Abbildung 35:	Auswirkung einer H ₂ O ₂ -Behandlung auf die Osteogenese.	88
Abbildung 36:	Einfluss von H ₂ O ₂ in verschiedenen Konzentrationen auf die Osteogenese von ASCs.....	89
Abbildung 37:	Einfluss von H ₂ O ₂ in verschiedenen Konzentrationen auf die Adipogenese von ASCs nach osteogener Differenzierung..	90
Abbildung 38:	Auswirkung von UVA in verschiedenen Dosen auf die Osteogenese.	91

Abbildung 39:	
Einfluss von UVA in verschiedenen Dosen auf die Osteogenese von ASCs.	92
Abbildung 40:	
Einfluss von UVA in verschiedenen Dosen auf die Adipogenese von ASCs nach osteogener Differenzierung.	93
Abbildung 41:	
Alizarinrot-S-färbung der Nonresponder- und Responderzellen nach Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium (ODM) und der Zugabe verschiedener Antioxidantien.	94
Abbildung 42:	
Quantifizierung der Kalzifizierung der EZM nach osteogener Differenzierung unter Anwesenheit verschiedener Antioxidantien.	95
Abbildung 43:	
Quantifizierung der Katalaseproteinexpression während der osteogenen Differenzierung.	96
Abbildung 44:	
MnSOD-Proteinexpression in Responder- und Nonresponderzellen während der Osteogenese.	97
Abbildung 45:	
Quantifizierung der EZM der Zellen nach Induktion der Osteogenese unter Anwesenheit verschiedener H ₂ O ₂ -Konzentrationen und Katalase.	99
Abbildung 46:	
Quantifizierung der Kalzifizierung der EZM der Zellen nach Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium und ATA.	100
Abbildung 47:	
Quantifizierung der kalzifizierten Matrix nach osteogener Differenzierung der Zellen unter Zusatz von Katalase, ATA und Thymol.	101
Abbildung 48:	
Verifizierung des stammzellähnlichen Charakters der isolierten Zellen.	104
Abbildung 49:	
Differenzierung der ASCs in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung in einer frühen und einer späten Passage.	107
Abbildung 50:	
Auswirkungen der Induktion von ROS während der osteogenen Differenzierung von Responder- und Nonresponderzellen.	114
Abbildung 51:	
Auswirkungen eines osteogenen Differenzierungsstimulus in Kombination mit dem Enzym Katalase und dessen Substrat Wasserstoffperoxid.	116
Abbildung 52:	
Mögliche Erklärungsansätze, wie Katalase die Osteogenese der ASCs positiv beeinflussen könnte.	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	
Auflistung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Geräte	23
Tabelle 2:	
Auflistung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 3:	
Auflistung der im Rahmen der Arbeit eingesetzten Substanzen	25
Tabelle 4:	
Auflistung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper	28
Tabelle 5:	
Auflistung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Software	28
Tabelle 6:	
Rezept für das osteogene Differenzierungsmedium	37
Tabelle 7:	
Rezept für das chondrogene Differenzierungsmedium	39
Tabelle 8:	
Zusammensetzung Hauner-Medium für die adipogene Differenzierung	41
Tabelle 9:	
BSA-Standard - Pipettierschema	43
Tabelle 10:	
Empfohlene Gel-Konzentrationen bei den jeweiligen Molekülgrößen der nachzuweisenden Proteine	44
Tabelle 11:	
In der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper	48

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μm	Mikrometer
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASC	Adipose tissue derived stem cells (Fettgewebstammige Stammzellen)
ATA	Aurintricarboxylic acid
BCA	Biocinonic Assay
BMP2	Bone morphogenic Protein 2
BMSC	Bone marrow derived stem cells (Knochenmarkstammige Stammzellen)
BSA	Bovine serum albumine
Ca ²⁺	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Stickstoff
Cu	Kupfer
kDa	Kilodalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein diacetate

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	extrazelluläre Matrix
et al	<i>et alia</i>
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	γ -glutamyl-cysteinyl-glycin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – antigen D Related
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IFATS	International Federation for Adipose Therapeutics
ISCT	International Society for Cellular Therapy
J	Joule
M	Mol
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MnSOD	Mangan Superoxiddismutase
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer

O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OD	Optische Dichte
ODM	osteogenes Differenzierungsmedium
OH ⁻	Hydroxylradikal
Osx	Osterix
p	Passage
PBS	Phosphate Buffered Solution (Phosphat gepufferte Lösung)
PFA	Paraformaldehyd
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren gamma
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay (Lysispuffer für Western Blot)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	round per minute
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/o	without
γ H2AX	gamma H2AX (Histonprotein)

1 Einleitung

1.1 Stammzellen

1.1.1 Allgemeine Charakterisierung von Stammzellen

Die Idee der Stammzelle als Ursprungszelle, welche die Fähigkeit besitzt, in andere Zelltypen zu differenzieren wurde bereits 1906 von Alexander A. Maximow anhand der Hämatopoese entwickelt. Maximow konnte nachweisen, dass alle Blutzellen von einer einzigen Vorläuferzelle abstammen (R. S. Wong, 2011). Im Gegensatz zu allen anderen Zellen besitzen Stammzellen die Fähigkeit zur sogenannten asymmetrischen Teilung, d. h. eine Tochterzelle behält ihren Stammzellcharakter (Selbsterhaltung) während die andere Zelle ausdifferenziert und zur Aufrechterhaltung des jeweiligen Zielgewebes oder dessen Wachstum beiträgt (Atari *et al.*, 2012; Khan, Rayan, Dhinsa, & Marsh, 2012). Es wird dabei zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden.

Abhängig von ihrem jeweiligen Differenzierungspotential wird zwischen totipotenten, pluripotenten, multipotenten und unipotenten Stammzellen unterschieden (Visvader & Lindeman, 2011). Nach der Befruchtung wird die Oozyte zur totipotenten Zygote, welche die Fähigkeit hat, in alle Zelltypen des embryonalen (Organismus) und extraembryonalen Gewebes (Placenta und Nabelschnur) zu differenzieren. Nach den ersten Zellteilungen (8-Zell-Stadium) wird die Zygote zur Blastozyste, welche in ihrer inneren Zellmasse pluripotente Zellen enthält. Diese sind in der Lage, alle drei Keimblätter zu bilden, können aber nicht mehr in extraembryonales Gewebe differenzieren. Aus der asymmetrischen Teilung der Pluripotenten Stammzellen gehen Vorläuferzellen hervor, deren Differenzierungspotential im Verlauf weiterer Zellteilungen immer weiter eingeschränkt wird, bis sie terminal differenziert sind: Mesenchymale Stammzellen weisen ein bereits deutlich reduziertes Differenzierungspotential auf, besitzen aber noch die Fähigkeit, in mehrere Zelltypen zu differenzieren (Sobhani *et al.*, 2017). Unipotente Stammzellen sind die direkten Vorläuferzellen der ausdifferenzierten Zellen. Im Gegensatz zu vollständig differenzierten Zellen

besitzen sie immer noch ihre Teilungsfähigkeit, können aber nur noch in einen Zelltyp ausdifferenzieren. Beispiel hierfür sind die Satellitenzellen der Skelettmuskulatur (Dulak, Szade, Szade, Nowak, & Jozkowicz, 2015).

Die meisten adulten Stammzellen sind multipotent. Beispiele dafür sind mesenchymale, hämatopoetische und neuronale Stammzellen. Neben den multipotenten Stammzellen finden sich aber auch im adulten Organismus noch pluripotente Stammzellen, wie beispielsweise in der Zahnpulpa (Tataria, Perryman, & Sylvester, 2006). Die Stammzellen befinden sich in den meisten Geweben in sogenannten Stammzellnischen, aber einige Gewebe weisen, soweit bisher bekannt, keine gesonderten Stammzellnischen auf (ein Beispiel hierfür ist das Fettgewebe). Nach ihrer Teilung bleibt eine der Tochterzellen in der Stammzellnische, während die andere Zelle aus der Nische wandert und ausdifferenziert. (Krunner & Roeder, 2014).

1.1.2 Funktionen mesenchymaler Stammzellen im Organismus

Die Kernfunktionen mesenchymaler Stammzellen sind Aufrechterhaltung, Reparatur und Wachstum des Zielgewebes (Krunner & Roeder, 2014). Aus diesem Grund haben sie sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, als auch die zur Differenzierung in Zellen des mesenchymalen Gewebes, wie beispielsweise in Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten, vaskuläre Zellen und Myozyten (Bianco, 2014; Pittenger *et al.*, 1999; Qi, Li, Zhang, & Melino, 2017; Vater, Kasten, & Stiehler, 2011).

Anfang der 60er Jahren wurden das erste Mal Stammzellen im Knochenmark von Mäusen identifiziert. Entsprechend ihrem Herkunftsort wurden sie als knochenmarkstämmige Stammzellen (Bone Marrow Derived Stem Cells (BMSCs)) bezeichnet. Innerhalb kürzester Zeit wurden mesenchymale Stammzellen zu einem festen Bestandteil der regenerativen Medizin (Bajek *et al.*, 2015). Ihre Gewinnung ist jedoch nicht unproblematisch, da eine Knochenmarkpunktion nicht nur schmerzhaft ist, sondern auch gesundheitliche Risiken birgt. Dazu zählen neben Schmerzen und Blutergüssen an der Aspirationsstelle auch massive, zu Anämien führende Blutungen. Vereinzelt treten auch Schmerzen in der Brust und In-

fektionen durch Staphylokokken auf (Bosi & Bartolozzi, 2010; Martino *et al.*, 2012). Auch ist die Zahl der durch diese Methode erhaltenen Zellen normalerweise gering. Aus diesen Gründen wurde nach alternativen Stammzellquellen gesucht, welche ein ähnliches Potential haben, deren Gewinnung aber mit einer geringeren gesundheitlichen Belastung einhergeht (Choudhery, Badowski, Muise, Pierce, & Harris, 2014). Der rasche Fortschritt in der regenerativen Medizin und in der Stammzellforschung führten dazu, dass kontinuierlich neue Stammzellnischen entdeckt und die Isolation der Zellen aus diesen Nischen etabliert und immer weiter verbessert wurde. In der heutigen Zeit ist es möglich, mesenchymale Stammzellen aus fast jedem Gewebe des menschlichen Körpers zu isolieren (Nordberg & Lobo, 2015; Qi *et al.*, 2017) (Abbildung 1).

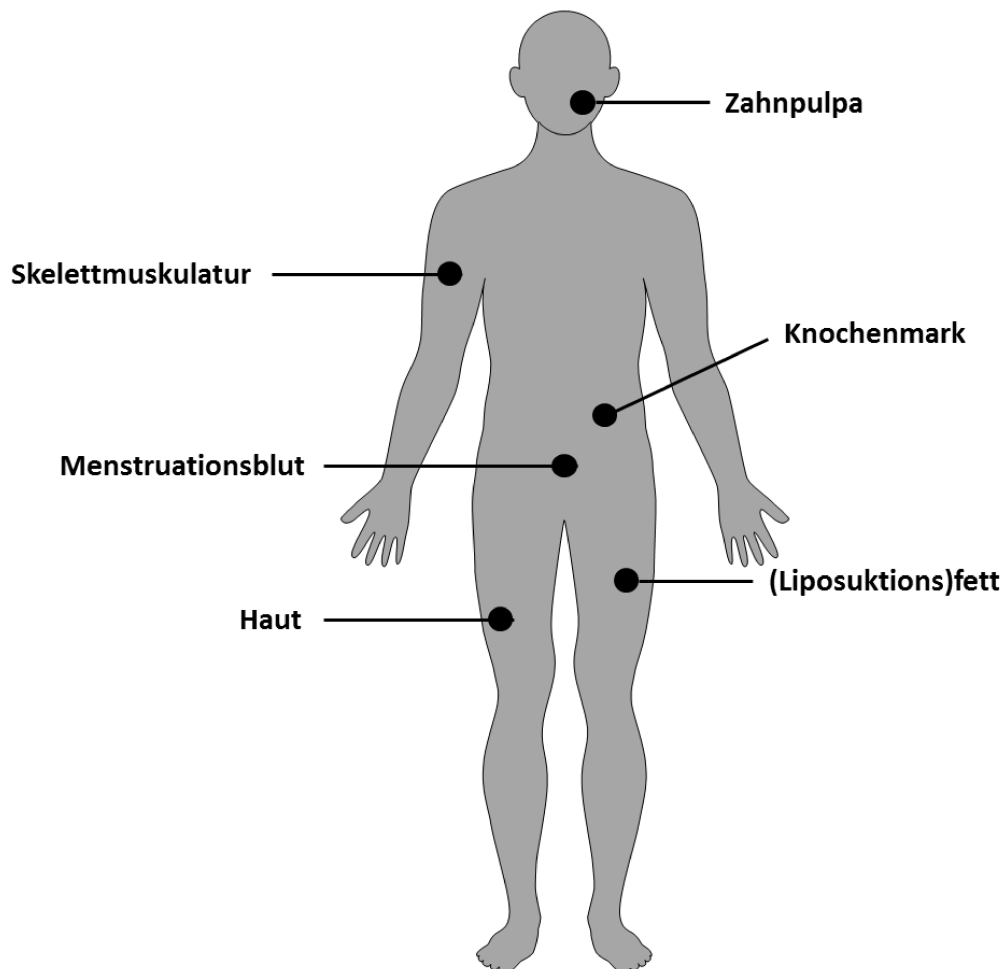


Abbildung 1: Die wichtigsten Stammzellquellen des menschlichen Körpers. Mesenchymale Stammzellen können aus nahezu jedem Gewebe des menschlichen Körpers isoliert werden. Prominente Beispiele dafür sind, neben dem Knochenmark, das Fettgewebe, die Zahnpulpa, die Haut, die Skelettmuskulatur und die Haut, aber auch das Menstruationsblut. Daneben existieren noch weitere, weniger prominente Stammzellquellen, wie beispielsweise die Tränendrüse oder der Harn.

1.1.3 Das Fettgewebe als Stammzellquelle

Auch wenn es in der heutigen Zeit möglich ist, viele Gewebe des menschlichen Körpers für die Isolation von Stammzellen zu nutzen, so unterscheiden sich die Zellen der einzelnen Gewebe doch sowohl qualitativ als auch quantitativ stark voneinander. Auch die Isolation der Zellen aus den einzelnen Geweben geht mit unterschiedlich hohen gesundheitlichen Risiken einher. Eine Alternative zu knochenmarkstämmigen Stammzellen stellen die Stammzellen des Fettgewebes dar (Choudhery, Badowski, Muise, Pierce, & Harris, 2014). Diese werden, nach ihrem Herkunftsort auch als Adipose derived Stem cells, kurz ASCs, bezeichnet.

Fettgewebe ist eine spezialisierte Form des Bindegewebes und wird in weißes und braunes Fettgewebe unterteilt. Dabei bildet weißes Fettgewebe den Hauptteil des Fettgewebes. Weißes Fettgewebe besitzt vorrangig eine Speicherfunktion: Ausgereifte Fettzellen (Adipozyten) besitzen eine Fettvakuole, in welcher Energie, die vor allem aus Glukose und Fettsäuren gewonnen wird, in Form von Triglyceriden gespeichert wird. Weißes Fettgewebe wird deshalb auch als univakuoläres Fettgewebe bezeichnet. In Form von freien Fettsäuren wird die Energie bei Bedarf wieder an den Körper abgegeben. Unter normalen Bedingungen ändert sich die Anzahl der Adipozyten im Körper nicht, lediglich ihr Volumen kann bis um den Faktor 100 verändert werden, je nach dem jeweiligen Speicher- oder Energiebedarf. Bei ausgeprägter Fettleibigkeit (Adipositas) kann jedoch auch die Anzahl der Fettzellen zunehmen. Adipozyten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen (ASCs). Diese befinden sich, anders als die meisten anderen multipotenten Stammzellen nicht in speziellen Nischen (siehe auch Kapitel 1.1.1). Wie bei allen multipotenten Stammzellen verläuft die Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle über Vorläuferzellen, welche hier als Präadipozyten bezeichnet werden. Präadipozyten sind noch teilungsfähig, ausdifferenzierte Adipozyten hingegen nicht mehr. Diese schrittweise Vordifferenzierung und damit weitere Einschränkung des Differenzierungspotentials findet bei allen multipotenten Stammzellen statt. Bei der Differenzierung spielen vor allem Proteine der PPAR-Familie (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) eine entscheidende

Rolle. Während seiner Differenzierung zur univakuolären Fettzelle lagert der (Prä)Adipozyt kleine Fetttröpfchen ein (plurivakuoläre Zwischenstufe), welche im weiteren Verlauf zu einer großen Fettvakuole verschmelzen.

Vom weißen Fettgewebe abzugrenzen ist das braune Fettgewebe, welches plurivakuolär bleibt. Im Gegensatz zum weißen Fettgewebe ist die Aufgabe des braunen oder plurivakuolären Fettgewebes die Wärme-
produktion. Aus diesem Grund ist braunes Fettgewebe sehr reich an Mitochondrien. Der daraus resultierende hohe Cytochromgehalt verleiht dem Fettgewebe seine charakteristische Farbe. Es kommt vor allem im Bereich des Schultergürtels, der Achselhöhlen und des Nierenhilums bei Neugeborenen vor (Schutz vor Auskühlung aufgrund nicht ausreichender, selbstständiger Bewegungsfähigkeit). Beim Erwachsenen befindet sich braunes Fettgewebe sehr reduziert noch im Bereich des Mediastinums, der Achselhöhlen und des Nackens. Die Vorläuferzellen der plurivakuolären Fettzellen sind Fibroblasten, die sehr zytoplasmareich sind.

Adipogene Stammzellen befinden sich vor allem im weißen, univakuolären Fettgewebe. Als Quelle für diese Stammzellen kommt zum einen Fettgewebe (beispielsweise aus Abdominoplastiken) in Frage oder aber Liposuktionsfett. Eine Liposuktion ist nicht nur mit deutlich geringeren Risiken behaftet als eine Knochenmarkpunktion, die Anzahl der auf diese Weise erhaltenen Zellen ist ebenfalls deutlich höher (Bajek *et al.*, 2015). Vorteilhaft in diesem Zusammenhang ist auch, dass Fettgewebe regelmäßig als „Abfallprodukt“ bei Operationen verworfen und im Rahmen von Abdominoplastiken und Liposuktionen entnommen wird (Bajek *et al.*, 2015; Bourin *et al.*, 2013; Kern, Eichler, Stoeve, Kluter, & Bieback, 2006; Nordberg & Lobo, 2015; Y. Zhu *et al.*, 2008). Es konnte sogar gezeigt werden, dass ASCs ein größeres osteogenes Differenzierungspotential als BMSCs aufweisen (Smieszek, Donesz-Sikorska, Grzesiak, Krzak, & Marycz, 2014).

1.1.4. Nachweis des mesenchymalen Stammzellcharakters

Lange Zeit war die Frage umstritten, welche Zellen als mesenchymale Stammzellen (MSCs) zu definieren sind. Aus diesem Grund wurden im Jahre 2006 durch die ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) Minimalkriterien festgelegt, die erfüllt sein müssen, damit eine Zelle als mesenchymale Stammzellen definiert werden darf. Als erstes Kriterium wurde die Plastikadhärenz der Zellen definiert. Diese Fähigkeit der Zelle ist erfüllt, wenn sie sich auf unbeschichteten oder anderweitig behandelten Plastikoberflächen anheften kann. Desweiteren sollten die Zellen positiv für die Cluster of Differentiation (CD) CD105, CD73 und CD90 sein und negativ für CD45, CD34, CD14 (oder CD11b), CD19 (oder CD79α) und HLA-DR. Trugen mehr als 95 % der Zellen das Antigen, wurde die Zellpopulation als positiv für das Antigen gewertet. Wiesen weniger als 2 % der Zellen das Antigen auf, wurde die Zellpopulation als negativ gewertet. Als drittes Kriterium wurde die Differenzierbarkeit der Zellen in die wichtigsten mesenchymalen Zelltypen (Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten) definiert. Mithilfe dieser Mindestanforderungen an die isolierten Zellen sollte eine einheitlichere Charakterisierung der MSCs ermöglicht werden (Dominici *et al.*, 2006).

Die aus dem Liposuktionsfett gewonnenen Zellen stellen keine homogene Population dar. Sie besteht unter anderem aus adipogenen Stromazellen, hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und Perizyten (Bourin *et al.*, 2013; Cawthorn, Scheller, & MacDougald, 2012; McIntosh *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wird die aus dem Fettgewebe isolierte und in Zellkulturschalen aus Plastik adherent gewordene „Stammzellfraktion“ als *Adipose Tissue derived stromal cells* (ASCs) bezeichnet (Bourin *et al.*, 2013; J. Han *et al.*, 2010).

ASCs sind multipotente Zellen, die ein ähnliches Differenzierungspotential aufweisen wie die BMSCs (Bourin *et al.*, 2013). 2013 brachte die ISCT gemeinsam mit der IFATS (International Federation for Adipose Therapeutics) ein Positionspaper heraus, welches, ähnlich der Publikation von 2006 für MSCs, Minimalkriterien im Umgang und in der Arbeit mit

ASCs und SVFs festlegen sollte: Neben der Plastikadhärenz nach der Isolation, sollten die Zellen Positiv für die Marker CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD49, CD73, CD90 und CD105 und negativ für CD31 (Marker für Endothelzellen) CD45 (Marker für Leukozyten) und CD235 (Marker für Glycophorin A) sein (Bourin *et al.*, 2013; J. Han *et al.*, 2010).

Für die Charakterisierung der ASCs empfiehlt die ISCT ähnliche Richtlinien wie Dominici *et al* 2006 für MSCs. Demnach sollten ASCs positiv für die Oberflächenantigene CD73, CD90, CD13, CD105, CD36 und CD106 und negativ für CD45 und CD31 sein. (Dominici *et al.*, 2006).

Trotz der Bestrebung einer Charakterisierung der ASCs weist die ISCT jedoch auch darauf hin, dass es sich bei ASC-Populationen stets um heterogene Zellpopulationen handeln wird, weshalb in der vorliegenden Arbeit auch nicht von Stammzellen im eigentlichen Sinne sondern von Zellen Adipogenen Stromazellen ausgegangen wird. Stromazellen sind für die Erhaltung und Regeneration des Gewebes oder Organs, in welchem sie sich befinden, verantwortlich. Ihr Differenzierungspotential reicht jedoch über das, für das Gewebe benötigte Potential hinaus. So können beispielsweise Stromazellen aus dem Fettgewebe unter anderem auch in Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren (Bourin *et al.*, 2013).

1.1.5 Mesenchymale Stammzellen im „*Tissue Engineering*“

Die regenerative Medizin ist eines der sich am schnellsten entwickelnden Disziplinen im Bereich der medizinischen Forschung. Untrennbar damit verknüpft ist die Stammzellforschung, wobei insbesondere die Gewinnung, Kultivierung und der Einsatz autologer Stammzellen im Mittelpunkt des Interesses steht, da diese Zellen in Kombination mit verschiedenen Trägermaterialien (*Scaffolds*) in den Körper reimplantiert werden können, ohne dass es zu Abstoßungsreaktionen kommt. Darüber hinaus weisen mesenchymale Stammzellen immunmodulatorische und immun-suppressive Eigenschaften auf, welches sie ebenfalls ideal für den Einsatz im Rahmen der regenerativen Medizin macht (Abumaree, Al Jumah, Pace, & Kalionis, 2012).

Abbildung zwei zeigt exemplarisch, welche Schritte eine autologe Stammzelltherapie (hier eine Therapie basierend auf fettstammigen Stammzellen) umfasst: Die Zellen werden aus einer geeigneten Stelle des Körpers entnommen und das Fettgewebe durch einen Kollagenaseverdau zerstört. Die mesenchymalen Stammzellen, die nun „frei“ in der durch den Kollagenaseverdau entstandenen Zellsuspension vorliegen, werden auf Zellkulturschalen aufgebracht. Die von mesenchymalen Stammzellen gezeigte Fähigkeit, sich auf unbeschichteten Zellkulturschalen aus Plastik anzuheften, ermöglicht eine Separation von den anderen in der Zellsuspension enthaltenen Zellen (vorwiegend Erythrozyten) welche sich nicht anheften und im Überstand verbleiben. Diese Zellen werden durch Waschschrte entfernt, nachdem sich die Stammzellen angeheftet haben. Mithilfe geeigneter Zellkulturmedien werden die Zellen nun so lange kultiviert, bis die erforderliche Zellmenge vorhanden ist. Die Zellen werden dann, je nach klinischem Einsatzgebiet, mit verschiedenen Faktoren behandelt (hier wird die osteogene Differenzierung induziert) und die vorinduzierten Zellen werden anschließend in das Zielorgan eingebracht (hier ein großer Knochendefekt). Durch *Scaffolds* wird erreicht, dass die Zellen im Zielgewebe verbleiben. Gleichzeitig geben *Scaffolds* auch die benötigte Form vor und sind oftmals mit weiteren, den Heilungsprozess begünstigenden Faktoren ausgestattet.

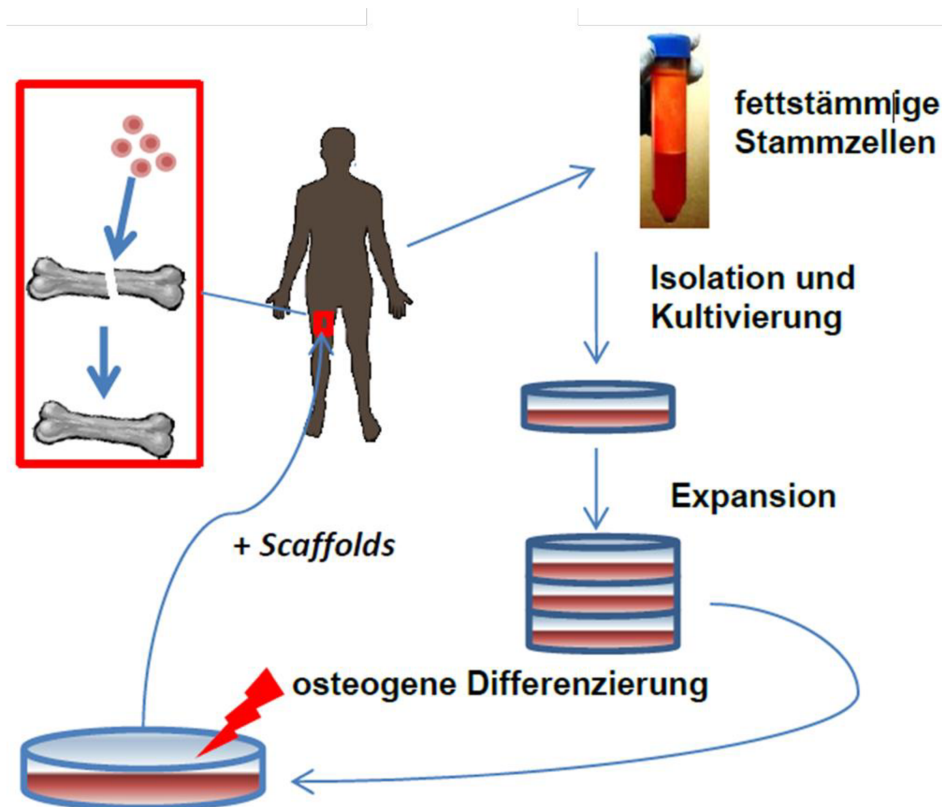


Abbildung 2: Isolation, Kultivierung und klinische Anwendung mesenchymaler Stammzellen. Nach der Gewebentnahme wird das stammzellhaltige Fettgewebe (gelb) von Blut und Lymphe separiert. Anschließend werden die Stammzellen aus dem Fettgewebe isoliert und *in vitro* kultiviert und expandiert. Ist für den erforderlichen Eingriff ausreichend Zellmaterial vorhanden, werden die Zellen, je nach Bedarf vorinduziert, damit sie in die gewünschte Richtung differenzieren (hier: osteogen). Anschließend werden die Zellen zusammen mit künstlichen Trägermaterialien, *Scaffolds* in das geschädigte Gewebe eingebracht. Die *Scaffolds* dienen dabei als Träger- und Stützmaterial, welches zudem meist Substanzen enthält, die die Zellen bei der weiteren Differenzierung und Adaption an das Zielgewebe unterstützen. Da die *Scaffolds* meist nach einer gewissen Zeit durch den Organismus abgebaut werden, ist der Defekt nach Abschluss der Therapie ausschließlich mit körpereigenem Gewebe aufgefüllt (Nordberg & Lobo, 2015).

Mesenchymale Stammzellen erlangten besonders in den letzten 25 Jahren große Bedeutung im Bereich des „*Tissue Engineering*“, der regenerativen Medizin und diverser immunomodulatorischer Anwendungen (Nordberg & Lobo, 2015). Ihre Bedeutung beruht vor allem darauf, dass sie, im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, ethisch unbedenklich sind und autolog eingesetzt werden können. Dies minimiert das Risiko von Abstoßungsreaktionen.

Laut des National Institutes of Health (clinicaltrials.gov) stieg die Zahl der klinischen Studien, die humane ASCs einsetzten von 18 (Januar 2010) auf 174 (Juli 2016) (Nordberg & Lobo, 2015). Die Einsatzgebiete für ASCs reichen dabei von Muskelatrophie, -dystrophie und -verletzungen

(Alexeev *et al.*, 2014; Pecanha *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015) über Ischämie (Park, Kang, Kang, Rhie, & Kim, 2014), der Behandlung von Weichteildefekten (Chen *et al.*, 2014), *Graft-versus Host*-Reaktionen (Crop *et al.*, 2010) und vielen weiteren.

1.1.6 Altersseneszenz mesenchymaler Stammzellen

Neben den Kulturbedingungen, der Kulturdauer und der Höhe der Passagen ist bereits bekannt, dass auch das Alter der Spender einen großen Einfluss auf die Differenzierungs- und Proliferationskapazität mesenchymaler Stammzellen hat (Charif *et al.*, 2017; Siegel *et al.*, 2013). Dabei konnte auch nachgewiesen werden, dass Stammzellen aus dem Knochenmark deutlich stärker durch das Alter der Spender negativ beeinflusst werden als Stammzellen des Fettgewebes (Choudhery, Badowski, Muise, & Harris, 2013; Zuk *et al.*, 2001). Doch auch adipogene Stammzellen unterliegen einer mit zunehmendem Alter der Spender deutlich stärker ausgeprägten Seneszenz und einer deutlich reduzierten Zellteilungsrate. Die Morphologie der Zellen war jedoch unverändert, ebenso die adipogene und neurogene Differenzierungskapazität. Allerdings war die osteogene und chondrogene Differenzierungskapazität deutlich herabgesetzt (Choudhery *et al.*, 2014). Dies ist besonders problematisch, da besonders ältere Patienten von einer autologen Behandlung mit Stammzellen profitieren könnten, beispielsweise im Hinblick auf angestrebte Osteoporose-Therapien. Die unterschiedliche Seneszenz und das damit zusammenhängende Differenzierungspotential liegt an der unterschiedlichen Reaktion der verschiedenen Gewebe auf Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).

1.2 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird durch Prozesse hervorgerufen, welche eine Erhöhung Reaktiver Sauerstoffspezies bedingen. Unter der Bezeichnung Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden hoch reaktive Moleküle zusammengefasst, welche sowohl geladen als auch ungeladen sein können. Beispiele für geladene Reaktive Sauerstoffspezies sind das Superoxidation (O_2^-) und das Hydroxylradikal (OH^\cdot) (Abbildung drei). Die wichtigste ungeladene Reaktive Sauerstoffspezies ist Hydrogenperoxid (H_2O_2). Su-

peroxidanionen entstehen vor allem in der Atmungskette in den Mitochondrien. Allerdings kommt es auch durch physiologische Prozesse wie zunehmendes Alter und hormonelle Veränderungen (Abnahme des Östrogengehaltes bei Frauen) zu einer erhöhten ROS-Produktion. Im Rahmen der Immunabwehr kommt es ebenfalls zu einem Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies, da diese von den Zellen der Immunabwehr (z. B. Makrophagen) genutzt werden, um Mikroorganismen unschädlich zu machen. Dieser Prozess wird als Oxidativer Burst bezeichnet. Neben diesen körpereigenen Mechanismen tragen Umweltfaktoren, wie UV-Strahlung und Luftverschmutzung zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses bei (Almeida *et al.*, 2007; Finkel & Holbrook, 2000; Lean, Jagger, Kirstein, Fuller, & Chambers, 2005; Sendur, Turan, Tastaban, & Serter, 2009, Al-Gubory, 2014). Die auf diese Weise entstandenen Superoxide werden von der Superoxiddismutase (SOD) zu dem deutlich reaktionsärmeren H_2O_2 umgewandelt (Abbildung drei). Dieses kann entweder durch die Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff abgebaut werden, oder durch die Glutathionperoxidase zu Wasser. Dabei wird das reduzierte Glutathion (GSH) in seine oxidierte Form (GSSG) umgewandelt. Allerdings kann H_2O_2 auch mit Wasser zu Hydroxylradikalen reagieren (Haber-Weiss-Reaktion). Hydroxylradikale gehören zu den reaktionsfreudigsten chemischen Stoffen, welche mit organischen Molekülen Reaktionsketten bilden. Dabei entstehen neben dem eigentlichen Reaktionsprodukt ein neues Radikal, wie Abbildung drei zeigt. Folgen können Protein- und Lipidperoxidation sowie schwerwiegende DNA-Schädigungen sein.

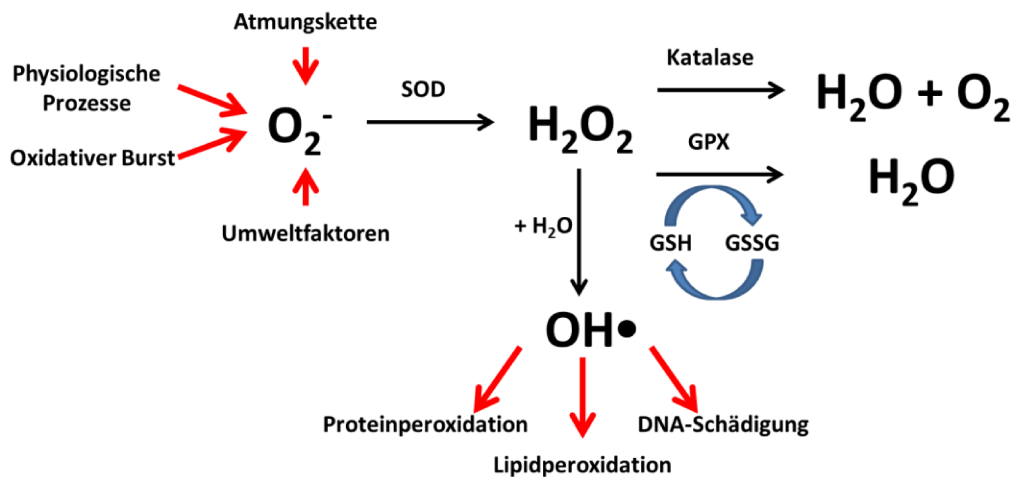


Abbildung 3: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies. Hier werden die verschiedenen physiologischen und Umweltfaktoren aufgezeigt, welche zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, besonders von Superoxiden (O_2^-) führen. Diese werden über die Superoxiddismutase (SOD) zu dem deutlich reaktionsärmeren Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. Dieses wird entweder durch die Katalase oder durch die Glutathionperoxidase (GPX) bei gleichzeitiger Oxidation von Glutathion (GSH) abgebaut. Bei einem H_2O_2 -Überschuss kann es allerdings auch zur Reaktion mit Wasser und zur Entstehung von Hydroxylradikalen kommen.

Ein kontrollierter Anstieg Reaktiver Sauerstoffspezies und besonders von H_2O_2 ist für die Funktionalität einer Reihe von Signalkaskaden essentiell, welche fundamentale zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Reparaturprozesse, Inflammation und Apoptose steuern (Catarzi *et al.*, 2011; Ray, Huang, & Tsuji, 2012). Wird das Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen jedoch zugunsten der oxidativen Prozesse gestört, bezeichnet man diesen Zustand als oxidativen Stress (Sies, 1997). Dies kann sowohl durch eine übermäßige Entstehung und/oder Aufnahme von Reaktiven Sauerstoffspezies bedingt sein, als auch durch den Ausfall wichtiger antioxidativer Funktionen im Organismus. Oxidativer Stress führt zur Peroxidation von Lipiden und Proteinen. Folgen davon sind strukturelle Veränderungen der Zellmembran, Schädigung der DNA durch Einzel- oder Doppelstrangbrüchen und Schädigung von Gewebe (Naka, Muraguchi, Hoshii, & Hirao, 2008; Perez-Rodriguez *et al.*, 2015; Yazici, Kose, Utas, Tanrikulu, & Taslidere, 2016). Auch sind viele Krankheiten wie beispielsweise neurodegenerativen Erkrankungen (Halliwell, 2006) und Herz-Kreislaufkrankungen (Angelini *et al.*, 2017; B. Li, Chi, Qin, & Guo, 2016) mit einem Ungleichgewicht von oxidativen und antioxidativen Prozessen assoziiert. Durch ihre proliferati-

onssteigernde Wirkung spielen ROS auch bei der Entstehung von Krebs eine wichtige Rolle (Diebold & Chandel, 2016; Halliwell, 2007).

1.2.1 Antioxidantien

Nicht-enzymatische Antioxidantien werden unterteilt in Substanzen, die zu den Thiolen gehören, mit Glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycin, GSH) als wichtigstem Vertreter, und Substanzen ohne Thiolgruppe, wie beispielsweise Vitaminen und anderen Radikalfängern.

1.2.1.1 Glutathion (GSH) und N-acetyl-cystein (NAC)

Glutathion (γ -glutamyl-cysteinyl-glycin, GSH) ist das häufigste und wichtigste nicht enzymatische Antioxidanz im menschlichen Körper, wodurch es den Redoxstatus der Zelle maßgeblich bestimmt. Es kommt in den Zellen in physiologischen Konzentrationen von 2-10 mM vor (Biswas & Rahman, 2009). In der Zelle liegt es im normalen Zustand vor allem in der biologisch aktiven, reduzierten Thiolform vor (Abbildung vier). Der Übergang des Monomers GSH in seine dimere Form (GSSG), welche die oxidierte Form darstellt, wird durch die Glutathion-Peroxidase katalysiert. Die Glutathion-Peroxidase reduziert H_2O_2 zu H_2O und oxidiert GSH zu GSSG. Wichtig bei dieser Reaktion ist die Sulfhydrylgruppe (-SH) des Cysteins. Diese wird bei der Reduktion des H_2O_2 oxidiert und verbindet sich mit einer ebenfalls oxidierten SH-Gruppe (Thiol Radikal) eines weiteren Glutathions zu einer Disulfidbrücke. Die Regeneration des GSSG geschieht durch Reduktion der Disulfidbrücke unter Verbrauch von NADPH, welches aus dem Pentosephosphatweg stammt. Diese Reaktion wird durch die Glutathionreduktase katalysiert. Das Verhältnis von GSH zu GSSG ist ein wichtiger Hinweis auf den Redoxstatus der Zelle. Dieser wird an der Ratio GSH/GSSG gemessen. Eine Erniedrigung der Ratio ist damit ein eindeutiger Hinweis auf eine Erhöhung des oxidativen Stress (Jones, 2002; Romagnoli *et al.*, 2013).

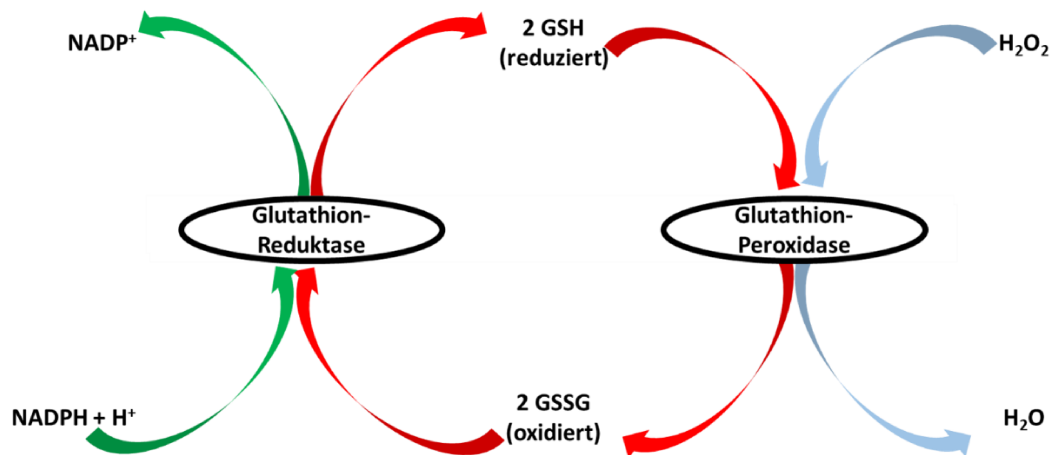


Abbildung 4: Glutathion liegt in der Zelle im normalen Zustand in seiner biologisch aktiven, reduzierten Thiolform (GSH) vor. Wird H_2O_2 durch die Glutathion-Peroxidase reduziert, wird gleichzeitig GSH zu GSSG oxidiert. Dabei kommt es zu der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den SH-Gruppen der Dysteine zweier GSH-Moleküle. Das damit in seiner Dimerform vorliegende GSSG wird durch die Glutathion-Reduktase regeneriert. Dies geschieht unter NADPH-verbrauch. Das benötigte NADPH stammt aus dem Pentosephosphatweg.

NAC (N-acetyl-cystein) ist ein Cysteinanalogon, welches als Medikament auf zahlreichen Gebieten therapeutische Anwendung findet. So wird es als schleimlösendes Medikament eingesetzt, spielt aber auch Antidot bei Überdosierungen eine wichtige Rolle und besitzt eine entzündungshemmende Wirkung. Zudem dient es als Cysteinquelle, aus welcher Glutathion synthetisiert werden kann, weshalb NAC auch als Antioxidanz gilt (Buckley, Whyte, O'Connell, & Dawson, 1999; Chalumeau & Duijvestijn, 2013; Hoffer, Baum, & Nahir, 2002; Origuchi *et al.*, 2000; Prescott, Park, Ballantyne, Adriaenssens, & Proudfoot, 1977).

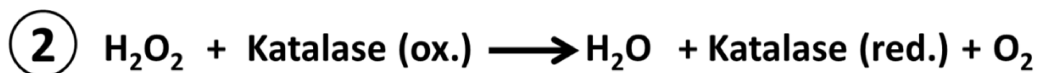
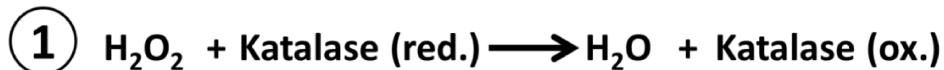
1.2.1.2 L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

L-Ascorbinsäure (die reduzierte Form des Vitamin C) wird für viele Prozesse im Körper benötigt. Es gilt als eines der wichtigsten Antioxidanzien des menschlichen Körpers (Covarrubias-Pinto, Acuna, Beltran, Torres-Diaz, & Castro, 2015) Aufgrund einer Mutation der L-gulon-1,4-lacton Oxidase ist der Mensch im Gegensatz zu den meisten anderen Säugetieren jedoch nicht in der Lage, Vitamin C selbstständig zu produzieren und muss deshalb mit der Nahrung zugeführt werden (Levine, 1986; Levine, Dhariwal, Welch, Wang, & Park, 1995; Sies & Stahl, 1995). L-Ascorbinsäure-2-Phosphat dient als Cofaktor für die Kollagen-Synthese,

wodurch es eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Funktion und im Gewebeerhalt von Knochen- und Knorpelgewebe sowie in der Zahnerhaltung einnimmt (Covarrubias-Pinto *et al.*, 2015).

1.2.1.3 Katalase

Katalase ist neben der Superoxiddismutase (SOD) und der Glutathion-Peroxidase das wichtigste antioxidative Enzym des menschlichen Körpers und in allen Zellen des Körpers vorhanden. Sie katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) und molekularem Sauerstoff (O_2) (siehe auch Abbildung fünf).



Summengleichung

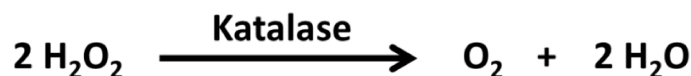


Abbildung 5: Katalasereaktionen. Im ersten Reaktionsschritt wird H_2O_2 zu Wasser reduziert, während das Enzym Katalase oxidiert wird. Im zweiten Schritt werden Wasser und das oxidierte Enzym Katalase reduziert, während Sauerstoff oxidiert wird, sodass als Produkt nicht nur Wasser, sondern auch molekularer Sauerstoff entsteht.

1.3 Osteogene Differenzierung *in vivo* und *in vitro*

Im Organismus finden zwei verschiedene Arten der Osteogenese statt: die desmale und die chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation werden mesenchymale Stammzellen direkt zu Osteoblasten differenziert. Diese geschieht an stark vaskularisierten Ossifikationspunkten. Die Osteoblasten bilden flächige Verbände. Das von ihnen sezernierte Osteoid, welches vor allem reich an Proteoglycanen, Glykoproteinen und Kollagen Typ I ist, kalzifiziert anschließend durch die Anlagerung von Hydroxylapatit. Das so entstehende Netzwerk aus Knochenbälkchen wird parallel zum Gefäßnetz angeordnet. Durch desmale Ossifikation entstehen unter anderem die flachen Schädelknochen.

Die meisten Knochen des menschlichen Körpers werden zunächst knorpelig angelegt. Der Knorpel wird kontrolliert durch Chondroklasten abgebaut. Gleichzeitig erfolgt der Aufbau des Knochengewebes (Abbildung sechs). Diese Art des Knochenaufbaus wird als chondrale Ossifikation bezeichnet, welche weiter in perichondrale und endchondrale Ossifikation unterteilt wird. Die Ossifikation beginnt stets mit der perichondralen Ossifikation. Dabei wird um den Schaft des noch knorpeligen Knochens eine Knochenmanschette angelagert. Diese Manschette entsteht aus direkter (desmaler) Ossifikation, da hier noch kein Knorpel ersetzt wird, sondern das Knochengewebe lediglich dem Knorpel aufgelagert wird. Innerhalb des von der Knochenmanschette umschlossenen Bereiches des Schaftes ordnen sich die Knorpelzellen in Säulen an (Säulenknorpel) und hypertrophieren anschließend (Blasenknorpel). Durch die Hypertrophie der Knorpelzellen wird die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix (EZM) angeregt und die Blasenknorpelzellen gehen aufgrund mangelnder Versorgung zugrunde. Anschließend wandern Blutgefäße in den verkalkten Blasenknorpel ein. Mit der Vaskularisierung beginnt die eigentliche enchondrale Ossifikation. Durch den Blutstrom wandern Chondroklasten und Osteoprogenitorzellen ein. Die Chondroklasten bauen die in der verkalkten Matrix eingeschlossenen Knorpelzellen ab. Die entstehenden Hohlräume werden von Gefäßen und Mesenchym besiedelt. Die eingewanderten Osteoprogenitorzellen differenzieren nach einer Phase der Proliferation zu Osteoblasten, die die freigelegte Knorpelhöhle auskleiden und Osteoid absondern, welches verkalkt. Dieser Prozess breitet sich in beide Seiten über den gesamten Schaft bis zur Epiphyse aus. Die Epiphysen bleiben oftmals bis Jahre nach der Geburt unverknöchert, um ein Mitwachsen des Skelettes zu ermöglichen.

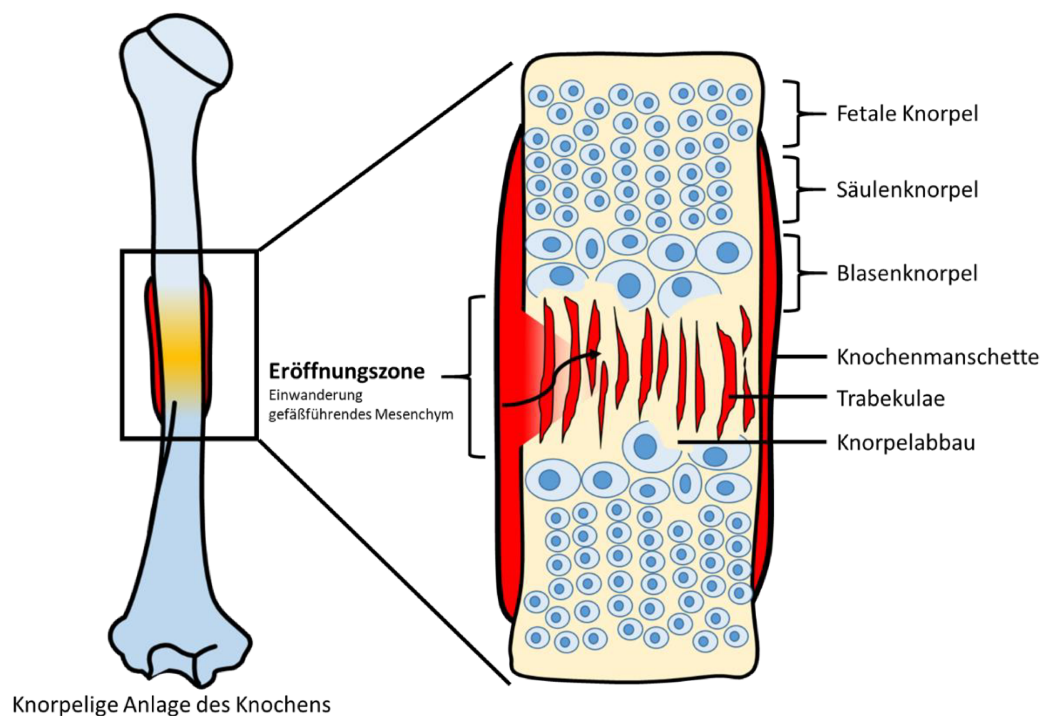


Abbildung 6: Enchondrale Ossifikation. Die osteogene Differenzierung des knorpelig angelegten Knochens beginnt stets in der Mitte des Knochens in der sogenannten Eröffnungszone, welche durch die äußere Anlagerung einer Knochenmanschette determiniert wird. Das Knorpelgewebe wandelt sich in diesem Abschnitt zunächst in Säulen und anschließend in Blasenknorpel um. Durch die gleichzeitig beginnende Vaskularisierung im Bereich der Knochenmanschette wandern Chondroklasten ein, welche den hypertrophierten Knorpel abbauen. Gleichzeitig beginnen die ebenfalls eingewanderten Osteoblasten mit der Bildung von Knochengewebe in Form von Trabekulae. Dabei wird das Knochengewebe in dem Maße aufgebaut, in welchem das Knorpelgewebe abgebaut wird. Die Verknöcherung setzt sich dann in Richtung beider Epiphysen fort, jedoch bleiben die Epiphysen selbst häufig noch bis Jahre nach der Geburt unverknöchert.

1.3.1 Molekulare Aspekte der Osteogenese

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, welches einem ständigen Auf- und Abbauprozess unterliegt. Die drei wichtigsten Zelltypen, die dabei eine Rolle spielen, sind Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten. Während Osteozyten den Knochenaufbau maßgeblich regulieren und die Kalzifizierung des neuen Knochengewebes steuern und Osteoblasten die Knochenmatrix produzieren, bauen Osteoklasten altes Knochengewebe ab. Wird das Zusammenspiel dieser drei Zelltypen gestört, sind schwerwiegende Knochendefekte die Folge, die bekannteste Erkrankung in diesem Zusammenhang ist die Osteoporose (Baron & Hesse, 2012; Feng & McDonald, 2011).

Die Osteogenese lässt sich in vier Phasen einteilen: In der ersten Phase findet eine verstärkte Zellproliferation statt. Diese Phase stellt sicher, dass genügend Zellmaterial zur Verfügung steht. In der zweiten Phase differenzieren die Zellen zu Osteoblasten aus. Erst die ausdifferenzierten Osteoblasten produzieren eine extrazelluläre Matrix (Phase 3), welche in Phase 4 durch Einlagerung von Calcium mineralisiert wird (Neve, Corrado, & Cantatore, 2011). Während der Proliferationsphase exprimieren die Präosteoblasten BMP-2 und BMP-5 (Yamaguchi *et al.*, 1991). BMPs fördern die Aktivität der alkalischen Phosphatase, sowie die Expression einer Reihe weiterer osteogener Markerproteine wie beispielsweise Runx2 und Osterix (Komori *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1991). Des Weiteren wird bereits in dieser Phase die Expression von Genen hochreguliert, welche einige der wichtigsten Matrixproteine (beispielsweise Kollagen Typ 1 und Fibronectin) kodieren (Neve *et al.*, 2011, Kogler *et al.*, 2004). Die Bindung an die extrazelluläre Matrix erfolgt durch die Interaktion von Kollagen Typ 1 und $\alpha\beta 1$ -Integrinen, dem Hauptrezeptor für Kollagen Typ 1 (Handschel *et al.*, 2010; Xiao, Wang, Benson, Karsenty, & Franceschi, 1998). Die Bindung der Integrinliganden aktiviert den MAPK-Signalweg, was zu einer Phosphorylierung von Runx2 führt (Mackie, Tatarczuch, & Mirams, 2011). Runx2 erhöht nun die Expression von osteoblastären Markergenen wie beispielsweise Osteocalcin, Kollagen Typ 1 und Bone Sialo Protein (Bruderer, Richards, Alini, & Stoddart, 2014). Die, unter anderem durch die Akkumulation von Matrixproteinen eingeleitete, postproliferative Phase ist ebenfalls durch die Expression verschiedener Proteine gekennzeichnet, die den osteoblastären Phänotyp kennzeichnen. Die Expression der alkalischen Phosphatase wird weiter hochreguliert. Dieses Enzym erhöht durch die unspezifische Spaltung von Phosphatesterne des Pyrophosphats den Anteil an Anorganischem Phosphat (P_i) (Gulseren *et al.*, 2015; Neve *et al.*, 2011; Price, Toroian, & Chan, 2009). Dies fördert die Bildung von Hydroxyapatit, was dazu führt, dass nun die Mineralisierung der während der proliferativen Phase gebildeten extrazellulären Matrix einsetzt (Boonrungsiman *et al.*, 2012; James, 2013). Neben Runx2 und der alkalischen Phosphatase spielt BMP2 eine entscheidende Rolle während der Osteogenese: BMP2 induziert die Induktion

in Osteoblasten und fördert auch die Bildung der osteoblastären Matrix (Susperregui *et al.*, 2008). Osterix leitet die osteogene Differenzierung von Osteochondroprogenitorzellen ein (Franceschi, Ge, Xiao, Roca, & Jiang, 2007).

1.3.2 Osteogenese *in vitro*

Bei der Osteogenese *in vitro* wird am ehesten der Prozess der desmalen Ossifikation simuliert, da hier keine Zwischendifferenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Knorpelgewebe erfolgt. Aber eigene Vorversuche zeigten, dass auch eine Umdifferenzierung von bereits chondrogen induzierten Stammzellen zu Osteoblasten *in vitro* möglich ist.

Um die Zellen *in vitro* in Osteoblasten zu differenzieren, werden die Zellen mit einem Medium behandelt, in welchem differenzierungsinduzierenden Faktoren enthalten sind. Diese Faktoren leiten die Osteogenese der Zellen ein. Dabei handelt es sich um das Glukokortikoidhormon Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und beta-Glycerophosphat (Pittenger *et al.*, 1999).

Bereits 1985 ermittelten Tenenbaum und Heersche die optimale Dexamethasonkonzentration (100 nM) für die Osteogenese von Periostzellen des Huhns (Tenenbaum & Heersche, 1985). Wong *et al.* wiesen 1990 nach, dass eine Behandlung von Knochenzellen mit Dexamethason die Expression der alkalischen Phosphatase erhöht (M. M. Wong *et al.*, 1990). Herbertson *et al.* zeigten 1995, den gleichen Effekt nach einer Behandlung von knochenmarkstämmigen Stammzellen mit Dexamethason und wiesen ferner eine Begünstigung der Bildung einer kalzifizierten Matrix nach (Herbertson & Aubin, 1995). Die osteogeneseinduzierende Wirkung von Dexamethason beruht auf der Förderung der Expression der osteogenen Markerproteine Osteocalcin und Runx2, letzteres über den WNT/ β -catenin-Signalweg (Hamidouche *et al.*, 2008; Schepmoes *et al.*, 1991).

L-Ascorbinsäure-2-Phosphat initiiert und erhöht die Bildung von Kollagen Typ 1, da es als Kofaktor der Enzyme dient, welche Prolin und

Lysin zu Prokollagen umwandeln (Franceschi, Iyer, & Cui, 1994; Vater *et al.*, 2011). Kollagen Typ 1 ist für die Osteogenese essentiell, da Osteoblasten mit einer kollagenhaltigen extrazellulären Matrix in Kontakt stehen müssen, bevor sie differenzieren (Kogler *et al.*, 2004). Die Bindung an die Extrazelluläre Matrix erfolgt durch die Interaktion von Kollagen Typ 1 und $\alpha 2\beta 1$ -Integrinen, dem Hauptrezeptor für Kollagen Typ 1 (Handschel *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 1998). Die Bindung der Integrinliganden aktiviert den MAPK-Signalweg, was zu einer Phosphorylierung von Runx2 führt (Mackie *et al.*, 2011). Runx2 erhöht nun die Expression von osteoblastären Markergenen wie beispielsweise Osteokalcin. Auch die Expression der alkalischen Phosphatase wird durch L-Ascorbinsäure-2-Phosphat stimuliert (Franceschi *et al.*, 1994).

β -Glycerophosphat dient als Phosphatquelle. Phosphat wird nicht nur benötigt, um das Hydroxylapatit für die extrazelluläre Matrix herzustellen, sondern es konnte auch bereits gezeigt werden, dass anorganisches Phosphat als intrazelluläres Signalmolekül fungiert, das die Expression einiger osteogener Gene, einschließlich Osteopontin und BMP2 reguliert (Fatherazi *et al.*, 2009; Foster *et al.*, 2006).

1.4 Osteogene Differenzierung und oxidativer Stress

Eine moderate Menge reaktiver Sauerstoffspezies ist für eine funktionierende Osteogenese unabdingbar. ROS aktivieren die Differenzierung von Präosteoklasten in Osteoklasten und fördern die Knochenresorption, unterstützen aber auch die Proliferation, das Wachstum und die Differenzierung der Osteoblasten, durch Aktivierung entsprechender Signalwege (Bonewald, 2011; Bonewald & Johnson, 2008; Henriksen, Neutzsky-Wulff, Bonewald, & Karsdal, 2009; Jilka, Noble, & Weinstein, 2013). Ein hoher Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies inhibiert jedoch die Aktivität der Osteoblasten und deren Differenzierung und damit auch die Osteogenese. Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen der Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten, welche eine Reihe von Erkrankungen des Gewebes, besonders die der bekanntesten, ROS-assoziierten Erkrankung des Knochens, die Osteoporose, fördern. Osteoporose ist durch eine geringe

Knochendichte und eine stark reduzierte Mineralisierung gekennzeichnet. Dies führt dazu, dass das Gewebe spröde und anfälliger für Frakturen wird (Baek *et al.*, 2010; Banfi, Iorio, & Corsi, 2008; Mann, Huber, Kogianni, Collins, & Noble, 2007; Manolagas, 2010).

Ferner konnte bei knochenmarkstämmigen Stammzellen mit zunehmendem Alter des Spenders eine Abnahme der Zellzahl, einhergehend mit einem geringen Proliferationspotential beobachtet werden, während verstärkt Anzeichen von Seneszenz und Apoptose zu beobachten waren (Stenderup, Justesen, Clausen, & Kassem, 2003). Dies ist insofern problematisch, als vor allem ältere Patienten von einer Therapie mit autologem Stammzellmaterial profitieren könnten.

Besonders hinsichtlich der osteogenen Differenzierung wirkt sich das mit dem Alter erhöhte intrazelluläre ROS negativ aus. Hinzu kommen bei älteren Patienten die akkumulierten, ROS-bedingten Schädigungen, die das Differenzierungspotential der adulten Stammzellen negativ beeinflussen (Kornicka, Marycz, Tomaszewski, Maredziak, & Smieszek, 2015). Aber auch ein veränderter Hormonstatus führen zu Erkrankungen des Knochengewebes, wie beispielsweise auch hier der Osteoporose. Postmenopausale Osteoporose, welche auf eine erniedrigte Östrogenproduktion zurückzuführen ist, geht ebenfalls stets mit einer gestiegenen Menge intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies einher. Vermutete Auslöser für die erhöhte Menge intrazellulärer ROS sind eine gesteigerte NADP-Oxidase-Aktivität oder eine erniedrigte Synthese antioxidativer Enzyme. Die GSH/GSSG-Ratio ist in Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose ebenfalls erniedrigt (Bellanti *et al.*, 2013; Lean *et al.*, 2005). Selbiges gilt für Patienten, die an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*, IBD) leiden, deren Spätfolge häufig ebenfalls die Osteoporose ist (Lean *et al.*, 2005; Sendur *et al.*, 2009; Sheweita & Khoshhal, 2007; Tilg, Moschen, Kaser, Pines, & Dotan, 2008).

2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss einer entweder bereits vor der Isolation *in vivo* vorhandenen, oder aber *in vitro* durch die Kulturbedingungen auftretenden Seneszenz auf das Differenzierungspotential fettstämmiger mesenchymaler Stammzellen aufgeklärt werden. Ferner war es Ziel dieser Arbeit, die molekularen Mechanismen aufzuzeigen, die eine Reduktion der Differenzierungsfähigkeit herbeiführen und wie diesen Mechanismen entgegengesteuert werden kann.

Demzufolge wurden folgende Aspekte analysiert:

1. Der Einfluss einer Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum auf das zelluläre Potential, osteogen, chondrogen und adipogen zu differenzieren.
2. Die Auswirkungen des Alters der Stammzellspenderin oder des Stammzellspenders auf das osteogene Differenzierungspotential.
3. Die molekularen Ursachen, welche zu einer Reduktion der osteogenen Differenzierbarkeit der Zellen führen.
4. Mögliche Ansätze, wie dieser Reduktion des Differenzierungspotentials entgegengesteuert werden kann.

Vor Beginn der eigentlichen Versuche verifizierte ich, dass die aus dem Fettgewebe isolierten Zellen den Kriterien der ISCT entsprachen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sollen erste Ansätze liefern, wie einem reduzierten Differenzierungspotential fettstämmiger Stammzellen entgegengewirkt werden kann und welche zellulären Mechanismen dabei eine Rolle spielen. Das längerfristige Ziel dieses Projektes ist es, auch älteren Menschen die Möglichkeit zu geben, von einer autologen Stammzelltherapie mit fettstämmigen Stammzellen profitieren zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Substanzen

Geräte

Tabelle 1: Auflistung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Geräte

Abzug	Waldner
Blottkammer	BioRad GelDoc
Brutschrank	Thermo Electron Corporation HERAc [®] 150
Kryo-Einfriergerät	Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen Cryo-Einfriergerät Mr. Frosty
Zentrifugen	Thermo Scientific Haraeus Pico 17 Microcentrifuge
	Thermo Scientific Haraeus Megafuge 16 R
Geldokumentationsanlage	BioRad GelDoc
Heizbad	Fisher Scientific drybath
Magnetrührer	IKA [®] RET control/t IKAMAG [®] safety contro
Mikroskope	Zeiss Axiovert 40
	Zeis Axioskop
Multipipette	Eppendorf Multipipette [®] plus
pH-Meter	HANNA instruments [®] HI 2211 Basic pH/ORP Benchtop Meter
Photometer	Eppendorf BioPhotometer plus
Pipettierhilfe	BRAND accu-jet [®] pro
Pipetten	Eppendorf Research [®] fix 10 - 100 µl
	Eppendorf Research [®] fix 100 - 1000 µl
	Eppendorf Research [®] fix 0,5 - 10 µl
	Thermo Scientific DH09306
Taumel-Rollenmischer	RM5-V 1750
	RM5-V80 1752
Multiplattenlesegerät	Perkin Elmer VICTOR3 [™] V Multilabel Counter

	model 1420
Waage	KenABJ Log NoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204 No WB1150494
	Ken 440-45
Werkbank	Thermo Electron Corporation HERAsafe®
Zentrifuge	Thermo Electron Corporation Haraeus Fresco 17 Centrifuge
	Thermo Scientific Haraeus Megafuge 16 R
	Thermo Scientific Haraeus Pico 17 Microcentrifuge
Power Supply	BioRad Power Pac HC
	VWR Power Source

Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Auflistung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 0,5 ml
1,5 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT Reagiergefäß 1,5 ml EASY CAP
1,5 ml Reaktionsgefäße (sa- fety lock)	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 1,5 ml
15-ml Reaktionsgefäße	GREINER bio-one Art.-Nr.: 188171
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 2 ml
50-ml Reaktionsgefäß	GREINER bio-one Art.-Nr.: 227261
Multiwellplatten	CytoOne 6-well TC plate
	GREINER 96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
	GREINER 12-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
Einfrierröhrchen	GREINER bio-one Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™
Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH + CO KG Pasteurpipetten ISO 7712
Stripetten	Costar® 10mL Shorty Stripette® Serological Pipets

	Costar® 2mL Shorty Stripette® Serological Pipets
	Costar® 25mL Shorty Stripette® Serological Pipets
	Costar® 5mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Zellkulturflaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 25 cm ² red filter cap
	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap
Zählkammer	Neubauer Zählkammer
Zellschaber	GREINER BioOne Cell Scraper, blue, 40cm

Substanzen

Tabelle 3: Auflistung der im Rahmen der Arbeit eingesetzten Substanzen

1- Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	VWR® 1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat TECHNICAL
2-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH® 2-Mercaptoethanol M7154 for electrophoresis
4-Nitrophenol Solution, 10mM	SIGMA 4-Nitrophenol Solution, 10 mM N7660
Acrylamid	Bio-Rad 30 % Acrylamide/Bis Solutions
Agarose	SIGMA-ALDRICH® Agarose A9539 - For routine use
Aggrecan	Santa Cruz Biotechnology® aggrecan 3H524
Alcianblau	Merck KGaA 101647 Alcianblau-Lösung für die Mikroskopie
Alizarinrot	Merck KGaA 106278 Alizarin red S mono sodiumsalt (C.I. 58005)
Aqua dest. (steril)	Aqua B. Braun, 1000 ml
Bad Stabil	neoLab-BAD Stabil®
BSA	PAA BSA Fraction V pH 7,0
CaCl ₂	SIGMA-ALDRICH® Kalzium chloride dihydrate C7902
CellTiter Blue	Promega CellTiter-Blue® Cell Viability Assay
Kollagen I Rat Tail 3 mg/ml	Gibco by Life Technologies

Dexamethason	SIGMA Dexamethasone D1756 - ≥98 % (HPLC), powder
Dispase II	ROCHE Dispase II (neutral protease grade II)
DMEM (4,5 g/l Glukose)	PAN P04-03500
DMEM/F12	PAN P04-41450
DMSO	SIGMA-ALDRICH® Dimethyl sulfoxide D2650 - Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7 %
Eisessig	Merck KGaA 100062 Essigsäure 96 % zur Analyse EMSURE®
Ethanol zur Desinfektion	Merck KGaA 100974 Ethanol denatured with about 1% methyl ethyl ketone for analysis EMSURE®
FCS	PAA Fetal Bovine Serum Gold
FGF-2	Immunotools
Fibronektin	Biochrom AG Fibronektin aus Humanplasma
Gelatine	SIGMA-ALDRICH® Gelatin from porcine skin G1890 - Type A, powder, BioReagent, suitable for cell culture
Glukose	SIGMA-ALDRICH® D-(+)-Glukose G7528 BioXtra, ≥99.5 % (GC)
Glycin	Merck KGaA 104201 Glycin zur Analyse
Hepes	SIGMA-ALDRICH® HEPES H3375 - ≥99.5 % (titration)
Insulin	SIGMA-ALDRICH® Insulin solution human
Isopropanol	Merck KGaA 818766 2-Propanol EMPLURA®
Kaliumchlorid	Carl Roth® Kaliumchlorid ≥99,5 %, p.a., ACS, ISO
Kollagenase Typ I	Biochrom AG Kollagenase Typ I, CLS I
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	SIGMA-ALDRICH® L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate A8960 - ≥95 %
L-Glutamin	Life Technologies™ L-Glutamine - 200 mM (100X), liquid
Methanol	Merck KGaA 106009 Methanol zur Analyse EMSURE® ACS,ISO, Reag. Ph Eur

Milchpulver	Carl Roth® Milchpulver T145.2
NaCl 0,9%	B. Braun NaCl 0,9 % Spüllösung
NaCl ₂	VWR® Natriumchlorid ACS, ISO, Reag.Ph.Eur. zur Analyse
Nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X), liquid
PBS	Biochrom AG PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco) PBS-Lösung mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Penicillin / Streptomycin	Gibco® Penicillin-Streptomycin 100X Solution (1000 units)
Ponceau S	SERVA Electrophoresis Ponceau S
Salzsäure	Salzsäure rauchend 37 % ROTIPURAN®, 37 %, p.a., ACS, ISO
SDS	VWR® Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Molekularbiologie
Sodium Pyruvat	Gibco® Sodium Pyruvate MEM 100 mM, liquid
Spitzenfiltervorsätze	neoLab Spitzenfiltervorsätze 0,22 µm
β-Glycerophosphat	SIGMA-ALDRICH® β-Glycerophosphate disodium salt hydrate G9422 BioUltra, suitable for cell culture, suitable for plant cell culture, ≥99.0 % (titration)
TEMED	VWR® N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Analyse
TGF-β1	ImmunoTools rh TGF-beta 1
TNF-α	PeproTech® Human TNF-α 50 µg
Tris	Carl Roth® TRIS PUFFERAN®, ≥99,3 %, Buffer Grade, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-Base	Merck KGaA 648310 Tris Base, Molecular Biology Grade Calbiochem®
Tris-HCl	Merck KGaA 648310648313 Tris, Hydrochloride, ULTROL® Grade Calbiochem®
Trypsin/EDTA	Biochrom AG Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺

Tween [®] 20	SIGMA-ALDRICH [®] Tween [®] 20 for molecular biology P9416
-----------------------	--

Antikörper

Tabelle 4: Auflistung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper

Kanninchen, anti-Human RUNX2 (#sc-10758)	Santa Cruz Biotechnology; Texas; Vereinigte Staaten
Maus anti-Human Catalase (#TA502564)	OriGene EU; Acris Antibodies GmbH; Herford; Deutschland
Maus anti-Human GAPDH (#IMG-6665A)	IMGENEX; Novus Biologicals; Cambridge; Großbritannien
Maus anti-Human α -Tubulin (#sc-8035)	Santa Cruz Biotechnology; Texas; Vereinigte Staaten
Maus anti-Human SOD-2 Antikörper (24): (#sc-130346)	Santa Cruz Biotechnology; Texas; Vereinigte Staaten
BMP2K anti-Human Antikörper (E-8): (#sc-514681)	Santa Cruz Biotechnology; Texas; Vereinigte Staaten
Maus anti-Human OSX Antikörper (E-6): (#sc-393060)	Santa Cruz Biotechnology; Texas; Vereinigte Staaten
Maus anti-Human PPAR γ 2 Antikörper (A-1): (#sc-166731)	Santa Cruz Biotechnology; Texas; Vereinigte Staaten
Sekundärantikörper: Polyklonal Ziege anti-Maus Immunoglobulins/HRP (#P0447); Polyklonal Ziege anti-Kaninchen Immunoglobulins/HRP (#P0449)	Agilent Technologies; Santa Clara; Vereinigte Staaten

Software

Tabelle 5: Auflistung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Software

Western-Blot-Analyse	Quantity One 4.6.5 Basic
Statistische Auswertung	GraphPad Prism 5.0
Durchflusszytometrische Messung (FACS)	CellQuestPro
Photometrische Messungen	Wallac 1420 Workstation

	Workout 2.0
Literaturverzeichnis	EndNote X7, Thomson Reuters
Schreiben der Arbeit	MS Office 2010

Zellen

Zellen der stromal vaskulären Fraktion wurden aus Liposuktionsfett von Abdominoplastiken gewonnen. Das Liposuktionsfett wurde uns freundlicherweise von der Arteo-Klinik in Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Mit Ausnahme des Alters, Geschlechtes und dem Ort der Entnahme wurden die Proben bereits durch die Klinik anonymisiert. Es wurde ausschließlich das Gewebe weiblicher Patienten verwendet. Die Patientinnen haben gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studiennummer: 3634) ihr Einverständnis erklärt, dass das von ihnen entnommene Gewebe zu Forschungszwecken verwendet werden darf.

3.2 Medien, Lösungen und Puffer

<u>Proliferationsmedium für ASCs:</u>	500 ml Dulbeccos MEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Glutamin
<u>osteogenes Differenzierungsmedium:</u>	DMEM (high Glukose) 10 %FCS 1 % Pen/Strep 500 nM Dexamethason 50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat 10 mM β-Glycerophosphat
<u>adipogenes Differenzierungsmedium:</u>	<u>Tag 1 – 7:</u> DMEM/F12 1 % Pen/Strep

2 mM L-Glutamin
1 μ M Dexamethason
0,5 mM IBMX
66 nM Insulin
1 nM Trijodthyronin
10 μ g/ml Transferrin
0,1 μ g/ml Pioglitazon

Tag 8 – 21:

DMEM/F12
1 % Pen/Strep
2 mM L-Glutamin
1 μ M Dexamethason
66 nM Insulin
1 nM Trijodthyronin
10 μ g/ml Transferrin

chondrogenes Differenzierungsmedium: DMEM (high Glukose)
1 % FCS
1 % Pen/Strep
8,81 ng/ml L-Ascorbinsäure-2
Phosphat
1,125 μ M Insulin
10 ng/ml TGF-beta

Medium zur Kryokonservierung: FCS
10 % DMSO

Kollagenase Puffer: 1 mM CaCl
5m M Glukose
100 mM HEPES

	120 mM NaCl ₂
	50 mM KCl
direkt vor dem Gebrauch hinzugeben:	1,5 % BSA
	0,2 % Kollagenase Typ I
<u>RIPA-Puffer nach Abcam:</u>	50 mM Tris, pH 8
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	0,5 % Na-deoxycholat
	0,1 % SDS
	Lagerung bei 4 °C unbegrenzt
direkt vor Gebrauch hinzugeben:	jeweils 1 Tablette Phosphatase- und Proteinaseinhibitor/7 ml Puffer -> Lagerung bei -20 °C.
<u>4x Trenngelpuffer:</u>	4 x Puffer:
	1,5 M Tris (pH 8,8)
	4 % SDS
	ad 500 ml H ₂ O
<u>4x Sammelgelpuffer:</u>	0,5 M Tris (pH 6,8)
	0,4 % SDS
	ad 100 ml H ₂ O
<u>10 % APS:</u>	10 % APS in Aqua dest.
	Lagerung der Aliquots bei -20 °C.
<u>10x Laufpuffer:</u>	0,25 M Tris (pH 8,3-8,8)
	1,92 M Glycin
	1% SDS
	ad 1000 ml H ₂ O
	gebrauchsfertiger Puffer:
	10x Puffer 1:10 in Aqua dest.
<u>25x Tris-Glycin Transferpuffer:</u>	0,3 M Tris Base
	2,4 M Glycin
	ad 500 ml H ₂ O

<u>Blotting Puffer:</u>	pro Transfer: 60 ml Tris-Glycin Transferpuffer 75 ml Methanol ad 750 ml H ₂ O
<u>10x TBS:</u>	77 mM Tris (pH 7,5) 1,5 M NaCl ad 1000 ml H ₂ O
<u>10x TBS-T:</u>	77 mM Tris (pH 7,5) 1,5 M NaCl 1 ml Tween 20 ad 1000 ml H ₂ O
<u>Ölrot-Färbelösung:</u>	Stocklösung: 0,5 % Ölrot in Isopropanol Gebrauchslösung: 6 ml Stocklösung + 4 ml A. dest. - > filtrieren
<u>Alizarin Rot S – Färbelösung:</u>	0,5 % Alizarin Rot in A. dest., pH: 4,1 – 4,3

3.3 Zellkultur

3.3.1 Allgemeines

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) durchgeführt. Alle für die Zellkultur benötigten Materialien und Substanzen wurden entweder steril erworben oder vor dem Gebrauch steril filtriert, bzw. autoklaviert. Die Lagerung der Medien erfolgte bei 4°C, die der anderen Substanzen entsprechend der Herstellervorgaben. Vor ihrem Gebrauch in der Zellkultur wurden Medien und Substanzen auf 37 °C, mindestens jedoch auf Raumtemperatur erwärmt.

3.3.2 ASC-Isolierung und Kultivierung der ASCs

Um die verschiedenen Phasen des Liposuktionsfettes voneinander zu separieren, wurde das Fettgewebe 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die oberste Phase (Öl) verworfen. Das Fett- und Bindegewebe, welche die mittlere Phase bildete, wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Die unterste Phase (hauptsächlich Blut) wurde ebenfalls verworfen. Das so separierte Fettgewebe wurde im Verhältnis 1:1 mit Kollagenase–Typ I-Lösung versetzt und für 45 Minuten bei 37 °C im Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch durch ein 250 µm Siebgewebe aus Nylon filtriert und das Filtrat 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das gebildete Zellpellet, bestehend aus der stromal vaskulären Fraktion, wurde in 30 ml 0,9 %iger NaCl resuspendiert und die Zellsuspension erneut 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Proliferationsmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Durch die Plastikadhärenz der Stammzellen konnten diese einen Tag später von Erythrozyten und anderen, nicht adhärenen Zellen, separiert werden. Die nicht adhärenen Zellen wurden am folgenden Tag durch Waschen entfernt und die Zellen in Proliferationsmedium weiter kultiviert.

Die Stammzellen wurden als Monolayerkulturen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit den jeweiligen Zusätzen) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Eine Passagierung der Zellen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 85 – 100 %.

3.3.3 Passagierung der Zellen

Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ durch Trypsin/EDTA vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die Inkubationszeit in der Trypsin/EDTA-Lösung betrug 2 – 5 Minuten und durfte 10 Minuten nicht überschreiten, da Trypsin zunächst nur die Oberflächenproteine, später aber auch weitere Proteine der Zelle angreift (Spaltung von Lysin und Argininresten) (McDowall 2012). Ab der zweiten Minute erfolgte deshalb eine regelmäßige Sichtkontrolle. Sobald sich ein Ablösen der Zellen zeigte, wurden die Zellen durch Klopfen gegen das

Zellkulturgefäß vollständig gelöst (*Shake off* Verfahren). Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von serumhaltigem Medium im Verhältnis von mindestens 1 : 1 beendet. Serum (hier: FCS) inaktivierte mit sofortiger Wirkung das Trypsin. Um die Trypsin/EDTA-Lösung aus dem Medium zu entfernen, wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1200 rpm, 5 Minuten) und die Zellen nach Bedarf entweder in frischem Proliferationsmedium oder Einfriermedium resuspendiert.

Als Passagierung wurde das Ablösen der adhärennten Zellen durch Trypsin-Verdau und das erneute Adhärennten der Zellen im neuen Kulturgefäß definiert. Mit jeder Passagierung erhöhte sich die Zahl der Passage um eins. Eine Passagierung erfolgte stets im Verhältnis 1:3.

3.3.4 Vitalitätstest und Lebendzellzahlermittlung

Die Zellvitalität wurde mittels TrypanBlau-Färbung ermittelt. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit TrypanBlau Färbelösung versetzt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Der saure Azofarbstoff Trypanblau konnte nur durch die Zellmembran toter Zellen, nicht aber durch die lebender Zellen diffundieren. Letale Zellen wurden dadurch blau angefärbt. Vitale Zellen erschienen vor dem blauen Hintergrund der Trypanblaulösung weiß. Dies ermöglichte sowohl eine Bestimmung des Anteils lebender Zellen in der Zellsuspension, als auch eine Bestimmung der Lebendzellzahl pro Milliliter. Der Mittelwert von vier ausgezählten Großquadraten der Neubauer-Zählkammer ergab, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor, die Zellzahl pro Milliliter:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Zahl der gezählten Zellen}}{4} \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 (\text{Kammerfaktor})$$

3.3.5 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst (siehe Kapitel 3.3.3) und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (5 Minuten, 1200 rpm)

wurde der Überstand vollständig abgenommen. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in Einfriermedium resuspendiert ($> 1 \times 10^6$ Zellen/ml). Ab hier wurde aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von DMSO bei Temperaturen > 0 °C ausschließlich auf Eis gearbeitet (Stubbendorf *et al.* 2009). Die in Einfriermedium resuspendierten Zellen wurden anschließend in Reaktionsgefäße zur Kryokonservierung gegeben. Mittels Kryoeinfriergeräten wurde eine gleichmäßige Absenkung der Temperatur um 1 °C / min gewährleistet. Für eine kurzzeitige Lagerung (< 3 Monate) wurden die Zellen in -80er Kühltruhen gelagert, für eine längerfristige Lagerung (> 3 Monate) wurden sie im Flüssigstickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

3.3.6 Auftauen der Zellen

Um die Zellen nach der Kryokonservierung erneut in Kultur zu nehmen, wurde die im Flüssigstickstoff gelagerten Zellsuspension im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend sofort in Proliferationsmedium aufgenommen (Verhältnis mindestens 1 zu 10 von in Einfriermedium gelagerter Zellsuspension zu Proliferationsmedium, um das DMSO auf eine subtoxische Konzentration zu verdünnen). Um das zytotoxische DMSO zu entfernen, wurden die Zellen pelletiert (Zentrifugation: 5 Minuten, 1100 rpm). Das Zellpellet wurde in Proliferationsmedium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß überführt. Um tote bzw. nicht adhärente Zellen und Zellbestandteile zu entfernen, wurden die aufgetauten Zellen nach 24 Stunden mit PBS wo Ca^{2+} w/o Mg^{2+} gewaschen und anschließend mit frischem Proliferationsmedium überschichtet.

3.4 Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting* (FACS))

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst, die Reaktion mit 10 % FCS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellsuspension auf FACS-Röhrchen aufgeteilt. Nach zehnminütiger Zentrifugation (1200 rpm) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in *Cell Wash* (Bio-Plex Pro™ Cell Signaling Wash Buffer #171304515) mit 3 % FCS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 1200 rpm) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 50 μl FCS aufgenom-

men. Zur Erhöhung der Spezifität der Antikörper wurde die Zellsuspension für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe der jeweiligen Antikörper wurden die Zellen eine halbe Stunde lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit *Cell Wash* gewaschen, zentrifugiert (10 Minuten bei 1200 rpm), der Überstand entfernt und das Zellpellet in 400 µl *Cell Wash* aufgenommen. Anschließend folgte die Messung am FACS Calibur.

3.5 Differenzierung unter Standardbedingungen

3.5.1 Allgemeines

Die Differenzierung der Zellen erfolgte in 24-Loch-Platten. Die Zellen wurden in Proliferationsmedium in diesen Platten bis zum Erreichen einer 100 %-igen Konfluenz kultiviert. Es wurden Zellen in der dritten Passage verwendet. Nach dem Erreichen der Konfluenz und einer damit einhergehenden Wachstumsinhibition, wurde das Proliferationsmedium, in welchem die Zellen bisher kultiviert worden waren, gegen das jeweilige Differenzierungsmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden bis zu den angegebenen Zeitpunkten in diesem Medium kultiviert, das Medium wurde 2-mal wöchentlich vollständig gewechselt.

3.5.2 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der ASCs erfolgte durch Substanzen, die die osteogene Differenzierung *in vitro* induzieren: Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat. Das Glucocorticoid-Hormon Dexamethason interagiert mit spezifischen Glucocorticoidrezeptoren, die meist intrazellulär bzw. im Nukleus lokalisiert sind. Es regt die alkalische Phosphataseaktivität an, hemmt die Kollagen I – Synthese und stimuliert die Osteokalzinproduktion in postproliferativen Zellen. Auch die Osteopontinproduktion wird gesteigert. In osteoblastären Zellkulturen stimuliert Dexamethason darüber hinaus die Bildung von kalzifizierten Knötchen (Kögler 2005). Ascorbinsäure ist ein wichtiger Kofaktor für den Hydroxylaufbau und stabilisiert die Kollagen-Trippele Helix. Auch dient sie als Donor für anorganisches Phosphat (Beresford *et al.* 1993). β -

Glycerophosphat wird durch osteogen differenzierte Zellen zu löslichem Phosphat gespalten. Es verhindert eine unspezifische Mineralaufnahme.

Die osteogene Differenzierung der ASCs erfolgte mittels Proliferationsmedium (DMEM), welchem die oben beschriebenen Substanzen in folgenden Konzentrationen zugesetzt wurden:

Tabelle 6: Rezept für das osteogene Differenzierungsmedium

Substanz	Konzentration
DMEM 4,5 g Glukose/l	-
Fötale Kälberserum (FCS)	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
β-Glycerophosphat	0,5 μM
Dexamethason	50 μM
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	10 mM

3.5.3 Nachweis der osteogenen Differenzierung mittels Alizarinrot-S-Färbung

Für die Alizarinrot-S-Färbung wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ gewaschen und 15 Minuten mit 4 % PFA in PBS fixiert. Nach einmaligem Waschen mit Aqua dest. wurde der Zelllayer mit 0,5 %-iger Alizarinrot S-Färbelösung 20 Minuten bei 37 °C überschichtet. Nach Abnahme der Färbelösung wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen, bis der Überstand farblos war. Anschließend wurde das Ergebnis mittels Fotos dokumentiert.

Da die Färbung reversibel ist, wurde zur Quantifizierung die Menge des gebundenen Farbstoffes und damit indirekt die Menge des in die zelluläre Matrix eingelagerten Kalziums durch eine Cetylpyridiniumchloridlösung zurückgelöst: Der gefärbte Zelllayer wurde mit 10 %-iger Cetylpyridiniumchloridlösung (in Aqua dest.) überschichtet. Nach vollständiger Rücklösung des Alizarinrot-S wurde die Optische Dichte des Überstandes photometrisch bei OD₆₀₀ bestimmt.

3.5.4 Nachweis der osteogenen Differenzierung mithilfe des Alkalischen Phosphataseassays

Der alkalische Phosphataseassay wurde mit Hilfe der 10 mM 4-Nitrophenolsolution (Sigma) durchgeführt. Der Assay beruht auf der Umwandlung von p-Nitrophenylphosphat zu Nitrophenol und einem organischen Phosphatmolekül durch die alkalische Phosphatase. Liegt der pH-Wert im basischen Bereich, entsteht ein gelber Komplex, dessen Absorption bei 405 nm gemessen werden kann.

Die Zellen wurden 2-mal mit PBS w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+} gewaschen und anschließend 15 Minuten mit der 10 mM 4-Nitrophenolsolution von Sigma überschichtet. Der Überstand wurde anschließend in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte überführt und bei 405 nm gemessen.

Reilly *et al* zeigten 2007, dass es große, spenderabhängige Unterschiede zwischen der Expression dieses Enzyms gibt (Reilly *et al.* 2007). Deshalb wurden die gemessenen Ergebnisse der differenzierten Zellen stets auf die Werte der Kontrollzellen der jeweiligen Spenderin normiert.

3.5.5 Nachweis der osteogenen Differenzierung auf Proteinebene

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung auf Proteinebene, wurden die Proteine Osterix (45 kDa) und BMP-2 mittels Western Blot nachgewiesen. BMP-2 zeigt im Western Blot drei Banden. Die größte Bande bildet das Precursorprotein (60 kDa). Die mittlere Bande weist das Homodimer mit einer Größe von 30 kDa nach. Die kleinste Bande erscheint bei 18 kDa und zeigt das Monomer. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl das Precursor als auch das Homodimer detektiert.

Die Zellen wurden jeweils an den Tagen drei, sieben, 14 und 21 nach begonnener osteogener Differenzierung geerntet (siehe Kapitel 3.6.2) und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Kontrollzellen wurden an dem Tag geerntet, an welchem mit der osteogenen Differenzierung der übrigen Zellen begonnen wurde. Die Kontrollzellen wurden ausschließlich mit Proliferationsmedium behandelt. Es wurden jeweils 20 μg Protein im Western Blot eingesetzt.

3.5.6 Chondrogene Differenzierung

Die Chondrogene Differenzierung der ASCs erfolgte mittels Medium mit stark reduziertem FCS-Gehalt (1 % statt 10%). Des Weiteren wurden dem Medium Insulin, Ascorbinsäure-2-Phosphat und TGF- β zugegeben. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums.

Tabelle 7: Rezept für das chondrogene Differenzierungsmedium

	Konzentration
DMEM 4,5 g Glukose/l	-
Fötalis Kälberserum (FCS)	1 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	50 nM
Insulin	1,125 μ M
TGF- β	10 ng/ml

3.5.6.1 Coating der Zellkulturgefäße mit Kollagen Typ I

Um eine verbesserte Chondrogenese zu erreichen und ein vorzeitiges Ablösen der chondrogen differenzierten Zellen zu verhindern, wurden die Zellkulturgefäße zuvor mit Kollagen Typ I beschichtet (25 μ g/cm²). Die entsprechend vorverdünnte Kollagen-Lösung wurde in die einzelnen Wells der Multiwellplatten gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde der flüssige Überstand abgenommen und die nun mit Kollagen beschichtete Oberfläche 3-mal mit PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ gewaschen. Die Zellen wurden sofort nach dem letzten Waschschrift in den Wells ausplattiert.

3.5.7 Nachweis der chondrogenen Differenzierung mittels Alcianblau Färbung

Die Zellen wurden nach Abnahme des Mediums mit PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ gewaschen und 15 Minuten mit 4 % PFA in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 M HCl-Lösung gewaschen um den pH-Wert zu senken, womit die Bindungsspezifität des Farbstoffes erhöht

wurde. Anschließend wurde der Zellayer über Nacht mit Alcianblaulösung überschichtet. Am nächsten Morgen wurde der Farbstoff abgenommen und die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen, bis der Überstand klar war. Anschließend wurde das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

Um die Menge des gebundenen Alcianblaufarbstoffes und damit die Menge an vorhandenen Glycosaminoglykanen, welche charakteristisch für Chondroblasten sind, nachzuweisen, wurde der Farbstoff anschließend zurückgelöst. Dazu wurde der Zellayer mit einem Gemisch aus 2/3 37%-iger Salzsäure und 1/3 Isopropanol überschichtet. Der zurückgelöste Farbstoff wurde mittels Messung der Absorption bei einer optischen Dichte von 600 nm quantifiziert.

3.5.8 Nachweis der chondrogenen Differenzierung auf Proteinebene

Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurde Aggrecan mittels Western Blot detektiert. Die Zellen wurden an den Tagen drei, sieben, 14 und 21 nach begonnener chondrogener Differenzierung geerntet (siehe Kapitel 3.6.2) und bei -80 °C gelagert. Die Kontrollzellen wurden an dem Tag geerntet, an welchem mit der chondrogenen Differenzierung der übrigen Zellen begonnen wurde. Die Kontrollzellen wurden ausschließlich mit Proliferationsmedium behandelt. Es wurden jeweils 20 µg Protein im Western Blot eingesetzt.

3.5.9 Adipogene Differenzierung

Für die Adipogene Differenzierung wurden zwei Differenzierungsmedien kombiniert: Von Tag eins bis Tag sieben wurden die Zellen in Hauner I Medium kultiviert, ab diesem Zeitpunkt in Hauner II-Medium (siehe Tabelle 8). Hauner II-Medium enthielt im Gegensatz zu Hauner I kein Rosiglitazon und kein IBMX.

Tabelle 8: Zusammensetzung Hauner-Medium für die adipogene Differenzierung

	Hauner I (Tag 1 – 7)	Hauner II (Tag 8 – 21)
DMEM/F12	-	-
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 %
L-Glutamin	2 mM	2 mM
Dexamethason	1 µM	1 µM
IBMX	0,5 mM	-
Insulin	66 nM	66 nM
Trijodthyronin	1 nM	1 nM
Transferrin	10 µg/ml	10 µg/ml
Rosiglitazon	0,1 µg/ml	-

3.5.10 Nachweis der adipogenen Differenzierung mittels Ölrotfärbung

Für die Färbung mit Ölrot wurden die Zellen 1-mal mit PBS w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+} gewaschen und anschließend drei Minuten mit 4 %-iger PFA-Lösung (in PBS) fixiert. Nach einem Waschschrift mit Aqua dest. folgte eine 15-minütige Inkubation in der Gebrauchslösung bei Raumtemperatur. Nach Abnahme der Färbelösung wurden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen, bis der Überstand farblos war.

Zur Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs wurden die gefärbten Zellen mit 100 %-igem Isopropanol überschichtet und darin solange inkubiert, bis der gebundene Farbstoff vollständig im Isopropanol gelöst war. Die Messung der Absorption des Überstandes erfolgte bei 540 nm.

3.5.11 Nachweis der adipogenen Differenzierung auf Proteinebene

Zum Nachweis der adipogenen Differenzierung auf Proteinebene wurde PPAR γ (ca. 60 kDa) mittels Western Blot detektiert (siehe Kapitel 3.6). Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, am dritten, siebten, 14. und 21. Tag nach begonnener adipogener Differenzierung geerntet und bei -80 °C gelagert. Die Kontrollzellen wurden geerntet, nachdem sie eine 90-100%-ige Konfluenz erreicht hatten. Diese wurden nicht mit adipogenem Differenzierungsmedium behandelt. Es wurden jeweils 20 µg Protein im Western Blot eingesetzt.

3.6 Proteinnachweis mittels Western Blot

3.6.1 Basisreaktion der Proteinbestimmung

Die Messung des Proteingehaltes erfolgte durch den BCA (Biocinonic-) Assay von Thermo Scientific. Dieser beruht auf der Bildung eines hellblauen Chelatkomplexes von Cu^{1+} mit Proteinen mit drei oder mehr Aminosäureresten in alkalischer Umgebung (bekannt als Biuret-Reaktion). In einem zweiten Schritt reagiert die Biocinonsäure mit den in der ersten Stufe gebildeten reduzierten Kupferkationen. Es entsteht ein purpurfarbener Chelatkomplex, der aus zwei Molekülen Biocinonsäure und einem Kupferion entsteht. Dieser BCA/Kupfer Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm ist wasserlöslich. Die Farbintensität dieser zweiten Reaktion ist annähernd 100-fach stärker als die der ersten Reaktion.

3.6.2 Proteinlysate

Die Zellen wurden abgeschabt und die Zellsuspension fünf Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt: Das Zellpellet wurde in einer der Pelletgröße entsprechenden Menge RIPA-Puffer (Radio-Immunoprecipitation Assay-Puffer) resuspendiert (30 - 60 μl) und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die in RIPA-Puffer aufgenommenen Zellpellets bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren.

3.6.3 Proteinbestimmung

Vor der Proteinbestimmung wurden die Zellen mit 10 - 20 Ultraschallstößen sonifiziert. Ein Aliquot wurde danach 1:6 mit PBS verdünnt. Jeweils 10 μl des Proteinstandards (siehe Tabelle 9) bzw. 10 μl der verdünnten Proben wurden in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und anschließend mit 200 μl des Working Reagenzes (WR) versetzt. Das Working Reagenz besteht aus den Lösungen A (Biocinonsäure) und B (4 % Kupfersulfat) im Verhältnis 50 zu 1.

Tabelle 9: BSA-Standard - Pipettierschema

Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Probe (Bezeichnung)	BSA-Standard (μl)	PBS oder RIPA (μl)
2,0	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = BLANK	I	0	400

Nach der Zugabe des BCA Working Reagenzes wurde die Platte mit einer Folie abgedeckt und der Inhalt der Wells auf dem Schüttler für 30 Sekunden gemischt. Es folgte eine ½- bis 2-stündige Inkubation bei 37 °C. Die Absorption wurde bei 562 nm im Multilabel Counter (Perkin Elmer) gemessen.

3.6.4 SDS-Page

Die SDS-Page und der anschließende Western Blot ermöglichen die Detektion von Proteinen bekannter Größe.

Mittels des diskontinuierlichen SDS Gels können Proteingemische nach ihrer molaren Masse getrennt werden. Um eine Auftrennung zu gewährleisten, die nur von dem Molekulargewicht, nicht aber von der Struktur der Proteine abhängig ist, wurden die Proteine zuvor durch Aufkochen in Laemmli-Puffer hitzedenaturiert. Das im Laemmli-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken, während das ebenfalls enthaltene SDS (im Verhältnis 1,4 g SDS pro Gramm Protein) die Eigenladung der Proteine überdeckt und eine zum Molekulargewicht proportionale, negative Ladung gewährleistet.

Die Trennung des Proteingemisches erfolgt mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese. Dabei passieren die Proteine zunächst das großporige Sammelgel. Die im Sammelgelpuffer enthaltenen Chloridionen besitzen eine größere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit als die Proteine. Die sich im Elektrophoresepuffer befindenden und größtenteils ungeladenen Glycinionen hingegen wandern langsamer als die Proteine. Durch den dadurch entstehenden Feldstärkegradienten stapeln sich die Proteine der Probe zwischen den schneller wandernden Chloridionen und den langsamer laufenden Glycinionen. Dieser auch als „*stacking effect*“ bezeichnete Vorgang führt zur Bildung einer klar definierten Proteinbande an der Grenze zum Trenngel. Dort werden die größeren Proteine zunächst abgebremst, sodass die kleineren Glycinionen schneller durch das Gel wandern als die größeren Ionen. Durch den pH-Shift von 6,8 (Sammelgel) zu 8,8 (Trenngel) sind die Glycinionen zudem nun vollständig geladen. Dadurch wird der Feldstärkegradient aufgehoben und damit auch der „*stacking effect*“ der Proteine, sodass diese nun (ausschließlich nach ihrer Größe) aufgetrennt werden.

3.6.5 Herstellung der Gele

Die Prozentigkeit des Trenngels richtet sich nach der Größe des oder der zu untersuchenden Proteine (siehe Tabelle zehn).

Trenngel

Für 1 Gel

Tabelle 10: Empfohlene Gel-Konzentrationen bei den jeweiligen Molekülgrößen der nachzuweisenden Proteine

	%	30 % Acrylamid (ml)	H ₂ O (ml)
> 250kDa	5	1,25	4,375
250-120 kDa	7,5	1,875	3,75
120-40 kDa	10	2,5	3,125
40-15 kDa	12	3	2,625
< 20 kDa	15	3,75	1,875

Zu dem Acrylamid-Gel-Gemisch: 1,875 ml 4 x Trenngelpuffer
 10 µl TEMED
 25 µl 10 % APS

Nach Zugabe von APS wurde das angesetzte Trenngel zügig zwischen zwei zuvor mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. In das Sammelgel wurde nach dem Gießen luftblasenfrei ein Kamm gesteckt, der die für die Probenauftragung benötigten „Taschen“ formte.

Sammelgel

pro Gel: 650 µl 30 % Acrylamid
 3 ml H₂O
 1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer
 10 µl TEMED
 25 µl 10 % APS

3.6.6 Probenvorbereitung

Das Gesamtvolumen der aufzutragenden Proben pro Tasche wurde abhängig von der Gelstärke gewählt. Für Gele zwischen 0,75 und 1 mm Dicke wurde bei zehn Taschen pro Gel jeweils ein Gesamtvolumen von 24 µl eingesetzt. Dieses setzte sich aus 6 µl Laemmli-Puffer und der entsprechenden Menge Proteinlysate zusammen. Die Differenz wurde durch die Zugabe von Aqua dest. ausgeglichen. Die Proben wurden nach dem Zusatz von Laemmli-Puffer (mit β-Mercaptoethanol) 5 Minuten bei 95 °C gekocht (Hitzenaturierung) und anschließend sofort auf Eis gestellt. Bei Gelen mit mehr Taschen wurde das Gesamtvolumen dementsprechend angepasst. So wurde in Gelen, die 15 Taschen enthielten, ein Probengesamtvolumen von 16 µl gegeben.

3.6.7 SDS-Page

Die Gele wurden in die Kammer gehängt und die Kammer mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Der Kamm wurde gezogen und die Taschen mit

Laufpuffer ausgespült, um verbliebene Gelreste und Luft in den Taschen zu beseitigen. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Zuletzt wurden 3 µl einer Standardproteinmischung (Marker) in eine der Taschen gegeben. Die Kammer wurde mit dem Deckel verschlossen und an den Power Supplier angeschlossen. Um die Proben an der Grenze des Trenngels zu sammeln, wurde für 20 Minuten eine Spannung von 60 V angelegt. Zur Auftrennung der Proteine im Trenngel wurde die Spannung anschließend auf 110 – 120 V erhöht. Die Wanderung der Proteine durch das Gel wurde nach dem Auslaufen des Laufpuffers aus dem Gel gestoppt.

3.6.8 Blotting

Im Anschluss an die SDS-Page wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Vorbereitend dazu wurden für jedes Gel zwei Whatman Papiere und eine Nitrocellulose Membran in Größe des Gels in Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Auslaufen des Laufpuffers aus dem Gel wurde das Gel aus der Kammer genommen und das Sammelgel vom Trenngel getrennt (das Sammelgel wurde verworfen). Das Trenngel wurde ebenfalls in Laufpuffer äquilibriert und der Blot nach folgendem Schema in der Trans Blot Turbo Apparatur aufgebaut (Abbildung sieben).

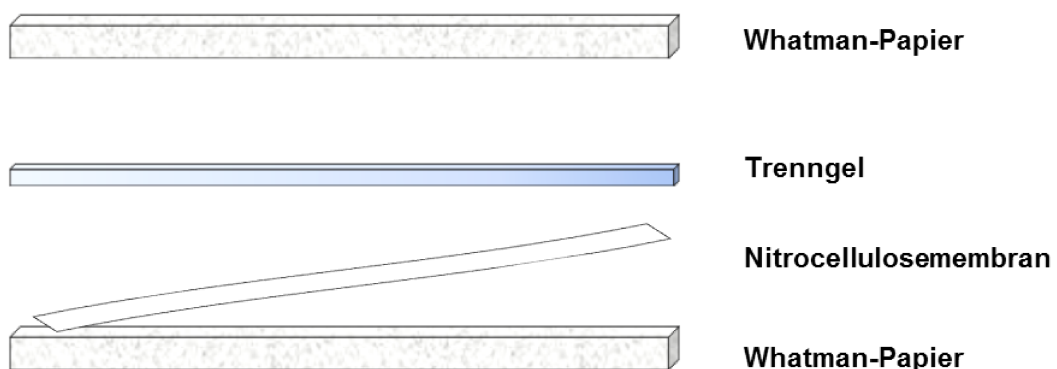


Abbildung 7: Aufbau des Western Blots.

Die Parameter des Blottings richteten sich dabei nach Geldicke und Anzahl der Gele:

Beispiel:

4 dicke Gele (1 - 1,5 mm): 2,5 A und 25 V für 40 Minuten

4 dünne Gele (0,75 mm): 1,0 A und 25 V für 40 Minuten

3.6.9 Ponceau-S-Färbung

Ponceau-S färbt unspezifisch die auf die Nitrocellulose Membran übertragenen Proteine. Dadurch kann die Effizienz des Blot-Vorganges (beispielsweise die luftblasenfreie Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose Membran) überprüft werden.

Nach Entnahme aus der Apparatur, wurde die Nitrocellulose Membran ein bis drei Minuten in Ponceau-S-Gebrauchslösung inkubiert. Nach Abnahme der Färbelösung wurde die Nitrocellulose Membran zur besseren Betrachtung mit Aqua dest. gespült.

Durch Waschen mit TBS-T (Tris Buffer Saline mit Tween) wurde die Ponceau-S-Färbung entfernt. Die Membran wurde anschließend entweder in TBS im Kühlschrank gelagert oder direkt weiter behandelt.

3.6.10 Blocken und Antikörperfärbung

Blocken

Vor der Antikörperfärbung wurden zunächst durch den als „Blocking“ bezeichneten Vorgang unspezifische Bindestellen auf der Nitrocellulose Membran abgesättigt, um ein unspezifisches Binden des Antikörpers an die Membran zu vermeiden: Die Membran wurde eine Stunde mit einer 10 %-igen Proteinlösung (Milchpulver oder BSA) überschichtet. Die Wahl des jeweiligen Blockinreagenzes richtete sich dabei nach den Herstellerempfehlungen des für den Proteinnachweis eingesetzten Primärantikörpers.

Antikörperfärbung

Die Inkubation der Nitrocellulose Membran in der Primärantikörperlösung erfolgte lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C und am nächsten Mor-

gen für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Blockingreagenz, Konzentration und Art des Sekundärantikörpers der eingesetzten Antikörper sind Tabelle 11 zu entnehmen. Die Antikörperlösung wurde nach Ende der Inkubationszeit abgenommen und die Membran im Anschluss dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Der Sekundärantikörper wurde in TBS-T verdünnt. Die Wahl des Sekundärantikörpers richtete sich danach, in welcher Spezies der Primärantikörper generiert wurde. Der Sekundärantikörper ist gegen konstante Bereiche des Erstantikörpers gerichtet und mit der Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Die HRP katalysiert die durch die Umsetzung des Luminols entstehende Chemilumineszenz.

Der Sekundärantikörper wurde 1:1000 in TBS-T verdünnt und auf die Nitrocellulose Membran gegeben. Die Detektion des Proteinstandards erfolgte mittels 1 µl Marker Detektion. Die Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt in dem den Sekundärantikörper und die Marker Detektion enthaltenden TBS-T inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung mit dem Sekundärantikörper und der Marker Detektion entfernt und die Nitrocellulose Membran dreimal mit TBS-T gewaschen. Anschließend konnte die Membran ausgewertet werden. Die Lagerung des Protein-Blots erfolgte lichtgeschützt in TBS bei 4 °C.

Tabelle 11: In der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper – wenn nicht anders angegeben, wurde der Primärantikörper in der gleichen Lösung aufgenommen, in der die Membran auch geblockt wurde.

Nachweis	Protein	Größe	Blockinreagenz	Verdünnung	Sekundär-AK
osteogene	BMP-2	Precursor: 60	5 % BSA	1:1000	Anti mouse

Differenzierung		kDa			
		Homodimer: 30 kDa			
		Monomer: 18 kDa			
	Runx2	53 kDa		1 : 1000	Anti mouse
	Osterix	45 kDa		1 : 1000	Anti rabbit
Adipogene Differenzierung	PPAR γ	54/57 kDa	5 % BSA	1 : 1000	Anti rabbit
Chondrogene Differenzierung	Aggrecan	200 kDa	5 % BSA	1 : 1000	Anti rabbit
Oxidativer Stress	Katalase	60 kDa	5 % Milchpulver	1 : 1000	Anti rabbit
	MnSOD	25 kDa	5 % BSA	1 : 1000	Anti rabbit
Ladungskontrolle	A-Tubolin	51 kDa	5 % BSA	1 : 1000	Anti rabbit
	GAPDH	38 kDa	5 % BSA	1:10000 in 3 % BSA	Anti mouse

3.6.11 Detektion der Banden

Mithilfe der Geldokumentationsanlage (BioRad) wurden die Bereiche auf der Nitrocellulose Membran, an welche der Primär- und damit auch der Sekundärantikörper gebunden war, visualisiert. Die Membran wurde in einer Luminol enthaltenden Entwicklerlösung inkubiert. Die HRP katalysiert in Gegenwart von H₂O₂ die Oxidation des Luminols. Die entstehende Chemilumineszenzreaktion wurde unter UV-Licht detektiert.

3.6.12 Densitometrische Auswertung

Zur Quantifizierung der detektierten Banden wurden sowohl die Banden des gesuchten Proteins, als auch die eines *Housekeeping*-Proteins, wie beispielsweise GAPDH oder α -Tubolin densitometrisch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms *Quantity One* – 4-6-5 Basic. Der erhaltene Wert der Bande des gesuchten Proteins wurde gegen das Houskeeping-Protein normiert.

3.7 Messung des intrazellulären ROS

Die intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies wurden mittels DCFDA (2'7'-Dichlorofluorescein Diacetat) detektiert. Nach seiner Diffusion in die Zelle wird DCFDA durch zelluläre Esterasen deacetyliert. Die

deacetylierte Form des DCFDA wird durch zelluläres ROS in das stark fluoreszierende 2', 7'- Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. DCF kann mittels Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden (maximale Exzitation: 495 nm, Emission 529 nm).

Die zu messenden Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/cm² ausgesät und nach 24 Stunden nach Abnahme des Mediums dreimal mit PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µM DCFDA-Lösung (in PBS) überschichtet und für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die DCFDA-haltige Lösung wurde anschließend entfernt und die Zellen erneute dreimal mit PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ gewaschen. Je nach Fragestellung wurde die Fluoreszenz entweder sofort gemessen, oder die Zellen wurden mit einer Substanz behandelt, deren ROS induzierende oder hemmende Wirkung nachgewiesen werden sollte. Wurden die Zellen nach Inkubation in der DCFDA-Lösung behandelt, so wurden die Zellen mit Wachstumsmedium überschichtet und die zu untersuchende Substanz zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ gewaschen. Die Zellen wurden anschließend trypsinisiert, in eiskaltem PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺ mit 1 % Formalin aufgenommen und am FACS-Gerät ausgewertet.

3.8 Induktion von ROS

3.8.1 H₂O₂

Um einen erhöhten intrazellulären oxidativen Stress zu induzieren, wurden die Zellen mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen behandelt. Die Behandlung erfolgte entweder mit H₂O₂ im Proliferationsmedium, um durch H₂O₂ induzierte, oxidative Schäden in der Zelle (Doppelstrangbrüche) nachzuweisen oder in osteogenem Differenzierungsmedium, um die Auswirkungen eines erhöhten oxidativen Stresses auf das osteogene Differenzierungspotential nachzuweisen.

Die ROS-Induktion in den Zellen erfolgte mittels H₂O₂, welches aufgrund seiner geringen Stabilität dem Medium täglich frisch hinzugegeben

wurde. Das Wasserstoffperoxid wurde dem Medium entweder direkt zugesetzt oder das Medium wurde zuerst mit H_2O_2 versetzt und dann sofort auf die Zellen gegeben. Ein Medienwechsel fand im Abstand von drei Tagen statt.

3.8.2 UVA

Um ROS mittels UVA-Strahlung zu induzieren, wurden die Zellen täglich mit verschiedenen Dosen UVA bestrahlt. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+} überschichtet. Anschließend wurden die Zellen so lange unter die UVA-Lampe gestellt, bis die erforderliche Strahlungsmenge pro Tag erreicht war. Die Zellen wurden mit Dosen zwischen 2,5 und 10 J/cm^2 behandelt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen erneut mit Medium überschichtet und in den Brutschrank gestellt.

3.9. Behandlung mit Antioxidantien und Inhibitoren

Um die Auswirkung von Reaktiven Sauerstoffspezies auf die osteogene Differenzierung zu untersuchen, wurden die Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen mit verschiedenen Antioxidantien behandelt:

3.9.1 Katalase

Katalase setzt sowohl intra- als auch extrazellulär H_2O_2 zu O_2 und H_2O um. Durch eine Behandlung der Zellen mit Katalase konnte zum einen untersucht werden, ob eine starke H_2O_2 -Reduktion die osteogene Differenzierung beeinflusst, zum anderen aber auch, ob sich eine erhöhte Konzentration von Sauerstoff im Medium (bedingt durch den Abbau von H_2O_2 zu O_2 und H_2O) auf die osteogene Differenzierung auswirkt.

Die Zellen wurden im Abstand von drei Tagen mit Medium behandelt, welches mit 500 U Katalase/ml versetzt war. Das Medium wurde sofort nach der Anreicherung mit Katalase auf die Zellen gegeben. Um zu verifizieren, dass die durch die Katalase verursachten Effekte tatsächlich auf dieses Enzym zurückzuführen sind und keine Artefakte darstellen, wurden die Zellen zusätzlich mit Katalase versetzt, welche über einen

Zeitraum von 20 Minuten auf 95 °C erhitzt wurde. Die hitzedeaktivierte Katalase wurde anschließend in der gleichen Konzentration auf die Zellen gegeben, wie die aktive Katalase.

3.9.2 MnSOD

MnSOD setzt Superoxidradikale zu H₂O₂ um. Durch eine Behandlung der Zellen mit MnSOD sollte untersucht werden, ob eine Steigerung der H₂O₂-Konzentration bzw. ein Abbau von Superoxidradikalen die Osteogenese beeinflusst.

Im Abstand von drei Tagen wurden die Zellen mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelt, welches 500 U MnSOD/ml enthielt. Um zu gewährleisten, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf die MnSOD-Aktivität zurückzuführen sind, wurden die Zellen als Negativkontrolle mit MnSOD-haltigem Medium behandelt, bei welchem die zugesetzte MnSOD zuvor über einen Zeitraum von 20 Minuten auf 95 °C erhitzt wurde.

3.9.3 NAC und Glutathion

Glutathion ist das häufigste im Körper vorkommende Antioxidans, NAC (N-Acetylcystein) ist eine synthetische Vorstufe von Glutathion. NAC und Glutathion wurden jeweils in der Konzentration von 1 mM ins Medium gegeben. Ein vollständiger Medienwechsel des NAC- oder Glutathionhaltigen Mediums fand nach jeweils drei Tagen statt.

3.9.4 Ascorbat

Ascorbat ist nicht nur ein Antioxidans, sondern ist auch für die Osteogenese relevant. Um einen Effekt des Ascorbats hinsichtlich osteogener Differenzierung und unter dem Gesichtspunkt der geminderten ROS-Konzentration zu untersuchen, wurde die Ascorbat-Konzentration im osteogenen Differenzierungsmedium auf das zehnfache erhöht (statt 10 mM (normale Konzentration im osteogenen Differenzierungsmedium) hier 100 mM).

3.9.5 ATA

ATA ist ein Inhibitor der Katalase. Zum einen konnte durch die Behandlung der Zellen mit osteogenem Differenzierungsmedium, welchem ATA in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt war, die Auswirkung einer vollständigen Inaktivierung der Katalaseaktivität auf die osteogene Differenzierung untersucht werden. Zum anderen konnte so zusätzlich überprüft werden, ob die Effekte, die bei einer Behandlung der Zellen mit Katalase beobachtet wurden, ausschließlich auf die Aktivität der Katalase zurückzuführen waren. Zu diesem Zweck wurde osteogenes Differenzierungsmedium verwendet, welchem sowohl 500 U/ml Katalase als auch 10 mM ATA zugesetzt wurden. Der letztgenannte Ansatz diente zudem der Verifizierung der Wirksamkeit des Inhibitors.

3.10 Nachweis von Doppelstrangbrüchen nach ROS-Induktion

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in *Chamber Slides* kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach 15 – 20 Minuten wurde das H_2O_2 -haltige Medium abgenommen und nach einmaligem Waschen mit PBS gegen H_2O_2 -freies Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden für eine halbe bis dreiviertel Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Für die UVA- und UVB-Bestrahlung wurden die Zellen mit PBS überschichtet und entsprechend der gewünschten Bestrahlungsintensität mit UVA bestrahlt. Für die Positivkontrolle (UVB-Strahlung) wurden die PBS-überschichteten Zellen 10 Minuten bestrahlt.

3.10.1 Immunfluoreszenzfärbung

Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen über einem Zeitraum von 30 Minuten in 4 %iger PFA in PBS-Lösung fixiert und danach für 10 Minuten in reinem Methanol bei -20 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen über 15 Minuten mit 0,3 %iger Triton X in PBS-Lösung permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde für 30

Minuten eine 5%-ige BSA in PBS-Lösung auf die Zellen gegeben, um unspezifischen Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren und anschließend der Primärantikörper (γ -H2AX, Verdünnung 1:200) auf den Zelllayer gegeben. Die Inkubation im Primärantikörper fand entweder bei Raumtemperatur für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C statt. Die Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper behandelt wurden, wurden über diesen Zeitraum weiterhin im Blockingreagenz inkubiert. Nach der Behandlung mit dem Primärantikörper wurden die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde lichtgeschützt in der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Kammer von den *Chamber Slides* abgelöst und die Zellen mit Eindeckmedium (DAKO *Mounting Medium*), welchem DAPI zugesetzt war, überschichtet. Die Lagerung der Objektträger erfolgte lichtgeschützt bei 4°C. Alle Schritte der Antikörperfärbung wurden unter beständigem, leichtem Schwenken durchgeführt. Gewaschen wurde pro Waschschrift jeweils dreimal mit PBS (w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}) für je zwei Minuten.

Mikroskopie

Die Zellen wurden nach Trocknen des Eindeckmediums am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40 FL) visualisiert und die Bilder anschließend ausgewertet.

3.11 Detektion des intrazellulären ROS mittels DCFDA

Vorbereitend wurde eine 10 mM DCFDA-Stocklösung angesetzt und nach lichtgeschützter Aliquotierung bei – 20 °C gelagert. Für die Gebrauchslösung wurde die DCFDA-Stocklösung in einer Verdünnung von 1 : 200 in Medium angesetzt.

Um die Expression reaktiver Sauerstoffspezies während der osteogenen Differenzierung zu bestimmen, wurden die Zellen einmal mit PBS (w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+}) gewaschen und mit der DCFDA-Gebrauchslösung überschichtet. Nach 45-minütiger Inkubation im Brutschrank (37 °C und 5 % CO_2) wurde die Lösung abgenommen, die Zellen einmalig mit PBS (w/o Ca^{2+} w/o Mg^{2+}) gewaschen und anschließend mit PBS überschichtet. Die

Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie (Exzitation: 500 nm, Emission: 536 nm). Es wurden pro Well einer 24-Well-Platte 16 Punkte gemessen. Um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu berücksichtigen, wurden als Blank Zellen gemessen, die nicht mit der DCFDA-Lösung behandelt worden waren.

3.12 Statistik

Die Daten wurden aufgrund des meist geringen Stichprobenumfanges von $n=3$ mit dem Student's t-Test ausgewertet. Die in den Graphen gezeigten Fehlerbalken entsprechen stets der Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis des Stammzellcharakters

Die von uns verwendeten Zellen wurden aus Liposuktionsfett von Abdominoplastiken weiblicher Patientinnen im Alter zwischen 30 und 60 Jahren gewonnen. Eine weitere Anamnese der Spenderinnen lag uns nicht vor.

Die Zellen wurden aus dem Liposuktionsfett isoliert und nach einer einmaligen Kryokonservierung in den Versuchen eingesetzt (siehe auch Methoden 3.3.2 und 3.3.5). Eine weitere Manipulation der Zellen wurde nicht durchgeführt, weshalb es sich bei den verwendeten Zellen um primäres Zellmaterial handelt. Dieser Umstand machte es notwendig, den Stammzellcharakter der verwendeten Zellen zu verifizieren. Die Verifizierung beruhte auf den Kriterien der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT). Die ISCT fordert für Zellen der stromal vaskulären Fraktion mit stammzellähnlichem Charakter, dass sie eine stark ausgeprägte Plastikadhärenz zeigen, die Oberflächenantigene CD79, CD90, CD105 exprimieren und keine Expression des Monozyten- und Makrophagenmarkers CD14, des B-Zellmarkers CD19, des pan-Leukozytenmarkers CD45 und des von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimierte CD34 und des nur von bereits stimulierten Zellen exprimierten HLA-DR zeigen (Dominici *et al.*, 2006). Außerdem müssen die Zellen die Fähigkeit aufweisen, in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren zu können.

Unterscheidung zwischen Responder- und Nonresponderzellen

Bei der Verifizierung des Stammzellcharakters fiel uns auf, dass die Zellen einiger Spender große Defizite in der Fähigkeit osteogen zu differenzieren zeigten, obwohl sie hinsichtlich ihrer Antigenexpression, ihrer chondrogenen und adipogenen Differenzierungsfähigkeit und auch bezüglich ihrer Plastikadhärenz den Kriterien der ISCT entsprachen. Um mittels weiterer Experimente eventuelle Unterschiede zwischen Zellen mit gutem und weniger gutem osteogenen Differenzierungsvermögen finden zu können, unterteilten wir die Zellen in Responder (Zellen mit gutem osteoge-

nen Differenzierungsvermögen) und Nonresponder (Zellen mit stark reduziertem bis nicht vorhandenem osteogenen Differenzierungsvermögen).

4.1.1 Plastikadhärenz

Das Liposuktionsaspirat wurde direkt nach dem operativen Eingriff zentrifugiert, um das Fettgewebe von Blut und dem im Rahmen der Liposuktion ebenfalls in das Gewebe eingebrachten Wasser zu trennen. Die Phase, die das Fettgewebe enthielt, wurde anschließend durch Kollagenase verdaut. Die durch den Enzymverdau erhaltene Zellsuspension wurde pelletiert und das Zellpellet in Wachstumsmedium aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden in unbeschichtete Zellkulturflaschen aus Plastik gegeben. Von allen Zellen der Zellsuspension, welche hauptsächlich aus Erythrozyten bestand, wurden nur die ebenfalls in der Suspension enthaltenen Zellen mit mesenchymalem Stammzellcharakter nach ein bis zwei Stunden auf der Plastikoberfläche adhären. Durch einen Waschschrift mit anschließendem Mediumwechsel am nächsten Tag wurden die nicht adhären gewordenen Zellen (hauptsächlich Erythrozyten und Adipozyten) entfernt (siehe auch Methoden 3.3.2). Das von der ISCT geforderte Kriterium der Plastikadhärenz war damit bei der weiteren Kultivierung der Zellen erfüllt. Abbildung acht zeigt die Zellen zwei Tage nach der Isolation (links) und nach Erreichen der Konfluenz (rechts). Deutlich erkennbar ist der fibroblastenähnliche Charakter der Zellen, welcher für mesenchymale Stammzellen in der Literatur stets beschrieben wird (Choudhery, Badowski, Muise, Pierce, & Harris, 2014).

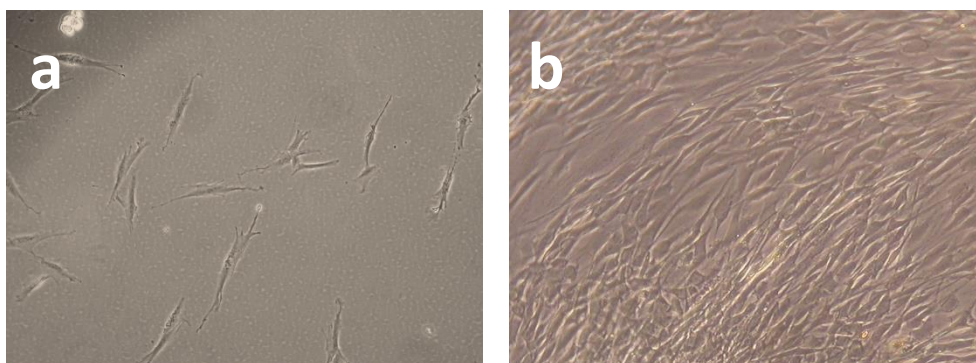


Abbildung 8: Fettstämmige Stammzellen a) zwei Tage nach der Isolation und b) 1 Woche nach der Isolation, die Zellen sind nach einer Woche konfluent gewachsen.

Da die Isolation der Zellen bereits gleichzeitig das erste, durch die ISCT geforderte Kriterium für mesenchymale Stammzellen, die Plastikadhärenz, erfüllte, konnten bereits während der Isolation einige der Zellen ausselektiert werden, die keine mesenchymalen Stammzellqualitäten zeigten. Um den Stammzellcharakter der verbliebenen Zellen zu verifizieren, wurde im nächsten Schritt das Expressionsmuster der Oberflächenantigene der Zellen untersucht.

4.1.2 Expression charakteristischer Oberflächenantigene

Im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen, besitzen mesenchymale Stammzellen kein Oberflächenantigen, welches charakteristisch für diesen Zelltyp steht. Aus diesem Grund hat die ISCT ein Cluster von Oberflächenantigenen vorgegeben, welches mindestens erfüllt sein muss, damit die Zellen als mesenchymale Stammzellen gelten dürfen. Danach müssen die Zellen positiv für die Oberflächenantigene CD13, CD73, CD90 und CD105 und negativ für die Oberflächenantigene CD31, CD45 und HLA-DR sein. Da es sich bei diesen Kriterien um Mindestkriterien handelte, wurden für die vorliegende Arbeit eine Reihe weiterer Oberflächenantigene untersucht. Wir analysierten die Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie (siehe Methoden 3.4). Sowohl die Responder- als auch die Nonresponderzellen waren positiv für die Oberflächenantigene CD44, CD73, CD90, CD13, CD105, CD26 und CD29 und negativ für CD45, CD34, HLA-DR, CD14, CD19, CD31 sowie für ALK3 und ALK6. Wiesen weniger als 2 % der Zellen ein bestimmtes Antigen auf, so wurde die jeweilige Zellpopulation als negativ für dieses Antigen definiert. Dementsprechend galten sowohl die Responder- als auch die Nonresponderzellen als positiv für CD13, CD26, CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105. Negativ waren sie für CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, ALK3, ALK6 und HLA-DR (Abbildung neun).

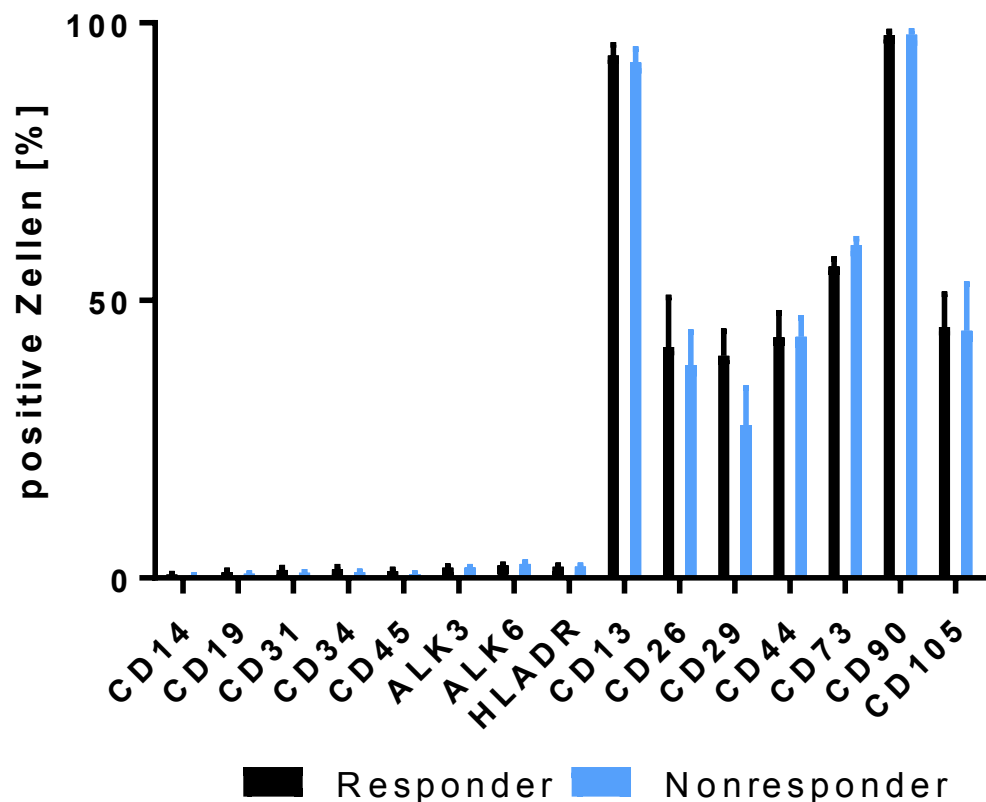


Abbildung 9: FACS-Analyse der Oberflächenantigenexpression von Nonresponder- und Responderzellen. Lag der Anteil der Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenantigen aufwiesen, über 2 %, so galt die Zellpopulation als positiv für diesen Marker. Lag der Anteil an Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenantigen aufwiesen, unter 2 %, so galt die Zellpopulation als negativ für dieses Antigen $p \leq 0,05$, $n=3$.

Das Muster der exprimierten Oberflächenantigene zeigt deutlich, dass der Prozentanteil der Zellen, welche die für mesenchymale Stammzellen nicht erwünschten Antigene zeigt, weder bei den Responder- noch bei den Nonresponderzellen überschritten wird. Die Toleranzgrenze wurde auf 2 % festgelegt und wurde lediglich durch das Antigen HLADR geringfügig überschritten (2,2 %). Dies ist jedoch zu erwarten, da HLADR nur von Zellen exprimiert wird, welche bereits vorinduziert waren. Da wir mit Stammzellen arbeiteten, welche aus dem Fettgewebe adulter Spenderinnen isoliert wurden, war zu erwarten, dass einige der Zellen bereits in Richtung Präadipozyt vorinduziert wurden, die Differenzierung hin zum Adipozyten jedoch noch nicht so weit fortgeschritten war, dass die Zellen dadurch ihre Fähigkeit, plastikadhärent zu werden, verloren haben.

Allerdings waren starke Schwankungen bei Responder- und Non-responderzellen hinsichtlich des Expressionsprofils der Antigene, die Voraussetzung dafür sind, dass eine Zelle als mesenchymale Stammzellen definiert werden darf, zu beobachten. So wurden CD13 und CD90 von nahezu 100 % der Responder- und Nonresponderzellen exprimiert. CD26, CD29, CD44 und CD105 wurden jedoch nur von annähernd 50 % der Responder- und Nonresponderzellen exprimiert. Der Prozentanteil der Zellen, der CD73 exprimiert lag etwas über 50 %. Als Grund dafür ist auch hier vorwiegend die Tatsache anzugeben, dass die Zellen aus einem adulten Organismus isoliert wurden, dementsprechend keine reine Stammzellfraktion vorlag, da die Zellen entweder bereits vorinduziert wurden oder aber bereits eine einsetzende Seneszenz der Stammzellen auftrat. Aufgrund dieser Daten wird in der vorliegenden Arbeit auch nicht von mesenchymalen Stammzellen, sondern von Zellen einer stromal vaskulären Fraktion ausgegangen. Im Gegensatz zu einer reinen mesenchymalen Stammzellpopulation weist die stromal vaskuläre Fraktion auch hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, Endothelzellen, Erythrozyten, Fibroblasten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Perizyten auf (Cawthorn *et al.*, 2012; Cousin, Andre, Arnaud, Penicaud, & Casteilla, 2003; J. Han *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2006).

Es ist jedoch zu beachten, dass die Analyse des Antigenexpressionsmusters keine signifikanten Unterschiede zwischen Responder- und Nonresponderzellen ergab.

4.1.3 Differenzierung in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung

Die Zellen wurden in Passage drei (p3) und in Passage zehn (p10) mit entsprechenden Differenzierungsmedien adipogen, chondrogen und osteogen differenziert. Um die Differenzierung zu verifizieren, wurden die differenzierten Zellen anschließend gefärbt und nach fotografischer Dokumentation wurde die Menge des gebundenen Farbstoffes quantifiziert um auch eine quantitative Aussage über das Differenzierungsverhalten der Zellen treffen zu können.

Um die adipogene Differenzierung zu verifizieren, wurden die differenzierten Zellen mit Ölrot gefärbt. Ölrot bindet an das in den Fettvakuolen der Adipozyten enthaltene Öl und färbt diese rot an. Rückgelöst wurde der Farbstoff durch Inkubation der Zellen in 100 %igem Isopropanol (siehe auch Methoden 3.5.10). Der durch das Isopropanol herausgelöste Farbstoff konnte anschließend durch eine Messung der Absorption des Überstandes (Wellenlänge 540 nm) erfasst und quantitativ bestimmt werden.

Die chondrogen differenzierten Zellen wurden mit Alcianblau gefärbt. Alcianblau bindet an die auf der Oberfläche der Chondrozyten sich befindenden Glycosaminoglykane. Auch diese Färbung konnte nach erfolgter fotografischer Dokumentation quantitativ bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen mit einem Gemisch aus rauchender Salzsäure und Isopropanol (siehe auch Methoden 3.5.7) überschichtet und die optische Dichte (OD_{600}) des Überstandes anschließend gemessen.

Als Endpunkt für die osteogene Differenzierung wird die Einlagerung von Calciumkristallen in die extrazelluläre Matrix betrachtet. Diese Kalzifizierung der EZM wurde mittels Färbung mit dem Farbstoff Alizarinrot S nachgewiesen, welcher spezifisch an Kalzium bindet (siehe Methoden 3.5.3). Auch hier erfolgte eine Quantifizierung des gebundenen Farbstoffes und damit indirekt auch eine Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Die Rücklösung des Farbstoffes wurde durch Überschichtung der Zellen mit einer 10 %igen Cetylpyridiniumchlorid-Lösung erreicht. Wie bereits bei der Quantifizierung des Alcianblau wurde auch hier die optische Dichte (OD_{600}) des Überstandes ermittelt.

Es wurden Zellen, welche bereits 3-mal in ein neues Zellkulturgefäß überführt wurden (Passage 3) Zellen gegenübergestellt, welche bereits 10-mal in ein neues Zellkulturgefäß überführt wurden (Passage 10). Ziel dabei war es, eine möglicherweise über die Zahl der Passagierungen steigende Abnahme des Differenzierungspotentials zeigen zu können.

4.1.3.1 Adipogene Differenzierung

Die Zellen wurden über drei Wochen in adipogenem Differenzierungsmedium inkubiert (siehe auch Methoden 3.5.9). Es war keine signifikante Varianz zwischen den Zellen verschiedener Spender zu beobachten ($n=3$). Allerdings war eine verzögert eintretende Differenzierbarkeit mit zunehmender Passagierung erkennbar. Bereits an Tag drei und an Tag sieben kam es zu signifikanten Unterschieden zwischen den Zellen in Passage drei und in Passage sieben, wie die Rücklösungswerte (Abbildung 11) zeigen. Wie Abbildung 10 zeigt, nahm die Zahl der detektierbaren Fettvakuolen der Zellen in Passage drei von Tag sieben zu Tag 14 sprunghaft zu, während die Zellen in Passage 10 zu diesem Zeitpunkt nahezu keine Fettvakuolen aufwiesen. An Tag 21 ging die Zahl der detektierbaren Fettvakuolen in den Zellen in Passage drei leicht zurück, was auf den Verlust der Adhärenz zurückzuführen ist, welcher nach der Ausdifferenzierung der Zellen zu Adipozyten auftritt. Jedoch war der Rückgang der Rücklösungswerte nicht signifikant. Zwischen Tag 14 und Tag 21 stieg die Zahl der Zellen in Passage 10, welche Fettvakuolen enthielten, sprunghaft an. Die Differenzierung der Zellen der höheren Passage war damit um eine Woche verzögert, verglichen mit den Zellen der niedrigeren Passage drei.

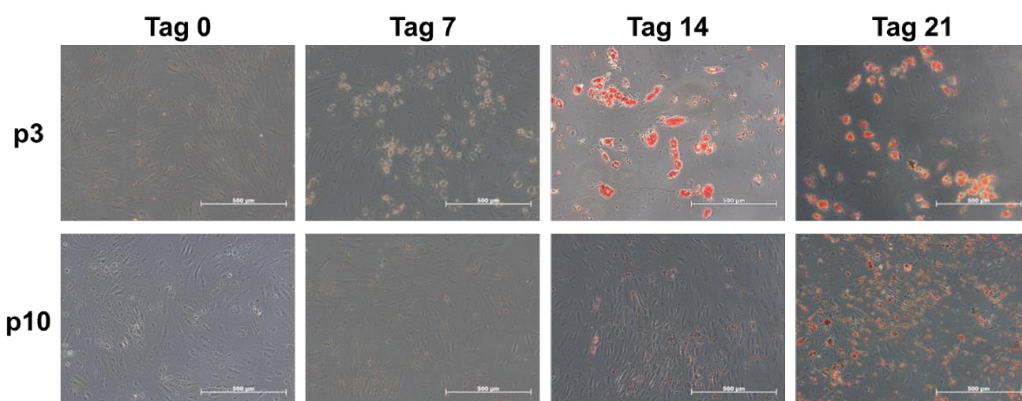


Abbildung 10: Fotografische Dokumentation der adipogenen Differenzierung adipogener Stromazellen über drei Wochen. Es sind exemplarisch sowohl Zellen aus der dritten Passage (p3, oben) als auch Zellen in der 10. Passage (p10) gezeigt. Die Zellen wurden mit Ölrot gefärbt.

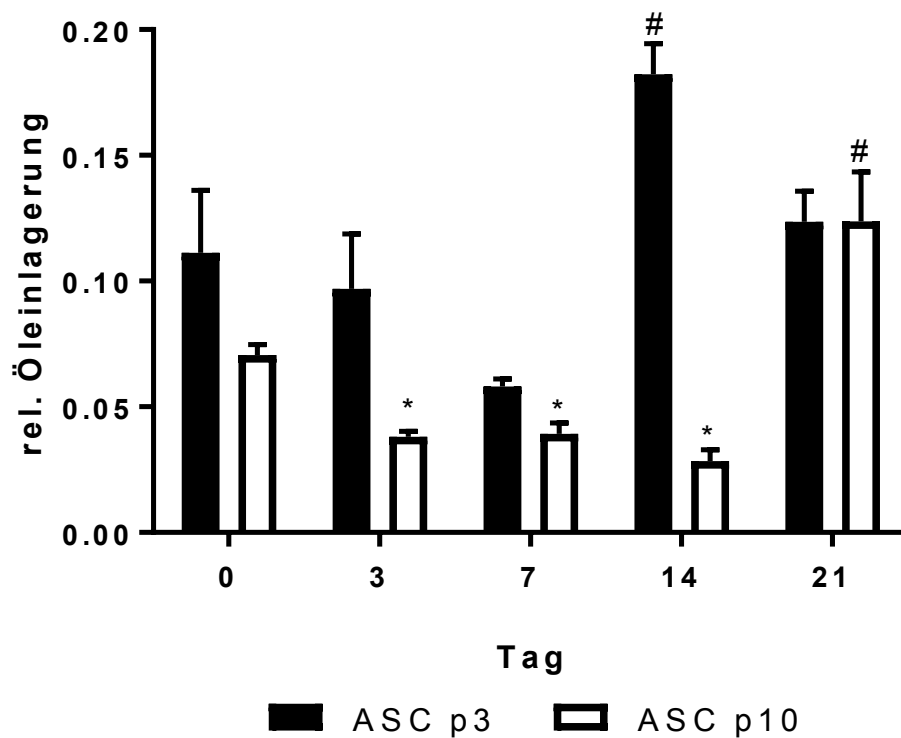


Abbildung 11: Quantifizierung der adipogenen Differenzierung über 3 Wochen, gemessen an der Menge der anfärbbaren Ölvakuolen in den Zellen. Der Farbstoff Ölrot wird in die Fettvakuolen eingelagert und kann mittels Isopropanol zurückgelöst werden. Die Absorption des zurückgelösten Farbstoffes kann dann bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden. Dies ermöglicht eine quantitative Darstellung des adipogenen Differenzierungsvermögens von Zellen einer frühen Passage (p3) verglichen mit Zellen einer späten Passage (p10). Deutlich erkennbar ist der signifikante Unterschied zwischen den Zellen in Passage 3 und den Zellen in Passage 10: Die Menge des gebundenen Ölrot als Detektor des in den Zellen eingelagerten Öls stieg in Zellen der 10. Passage erst ab Tag 14 an, während die in Passage 3 befindlichen Zellen bereits ab Tag 7 einen signifikanten Anstieg der gebildeten Fettvakuolen aufwiesen *: $p \leq 0,05$, Signifikanz p3 gegen p10; #: $p \leq 0,05$, Signifikanz gegen Tag 0 (Zeitpunkt vor Induktion der Differenzierung) $n=3$.

4.1.3.2 Chondrogene Differenzierung

Um die Fähigkeit der Zellen chondrogen zu differenzieren nachzuweisen, wurden die Zellen über einen Zeitraum von drei Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium (siehe auch Methoden 3.5.6) inkubiert. Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurden die Zellen mit Alcianblau gefärbt (Abbildung 12). Das Ergebnis wurde am Mikroskop fotografisch dokumentiert. Dabei zeigte sich, dass sich die Zellen in Passage 10 nicht sichtbar von denen in Passage drei unterschieden. Erst an Tag 21 zeigen die Zellen der dritten Passage eine deutlich stärkere Blaufärbung verglichen mit den Zellen in Passage 10.

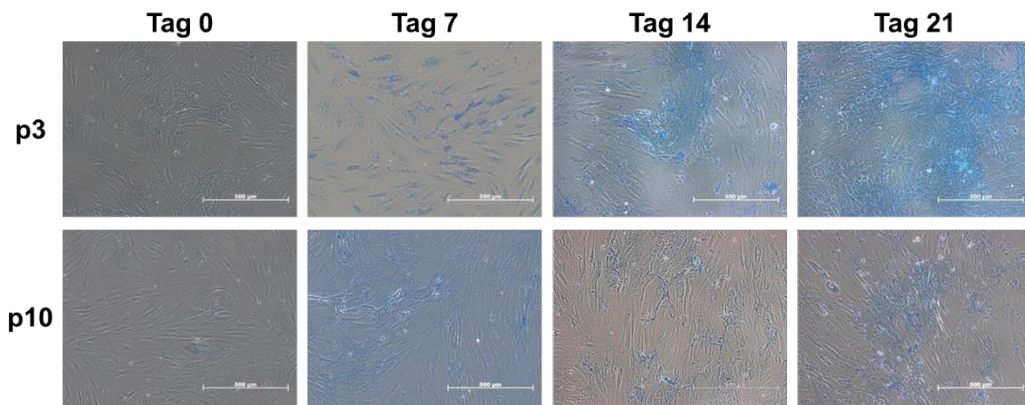


Abbildung 12: Fotografische Dokumentation der chondrogenen Differenzierung adipogener Stromazellen.

Mittels Rücklösung der Färbung wurde es möglich, das Ergebnis auch quantitativ darzustellen (Abbildung 13). Durch Messung des gebundenen Alcianblau wurde indirekt auch die Menge der sauren Proteoglycane und Polysacchariden bestimmt, welche einen Indikator für den Grad der chondrogenen Differenzierung darstellen, und an welche Alcianblau bindet. Die Unterschiede zwischen den Zellen in Passage drei und zehn waren hier zunächst nicht signifikant, an Tag 21 war die Färbung der Zellen in Passage 3 jedoch signifikant stärker als die der Zellen in Passage 10. Während die Zellen in Passage drei eine von Woche zu Woche zunehmende Differenzierung aufwiesen, stagnierte der Wert der Zellen in Passage zehn ab Woche zwei nahezu.

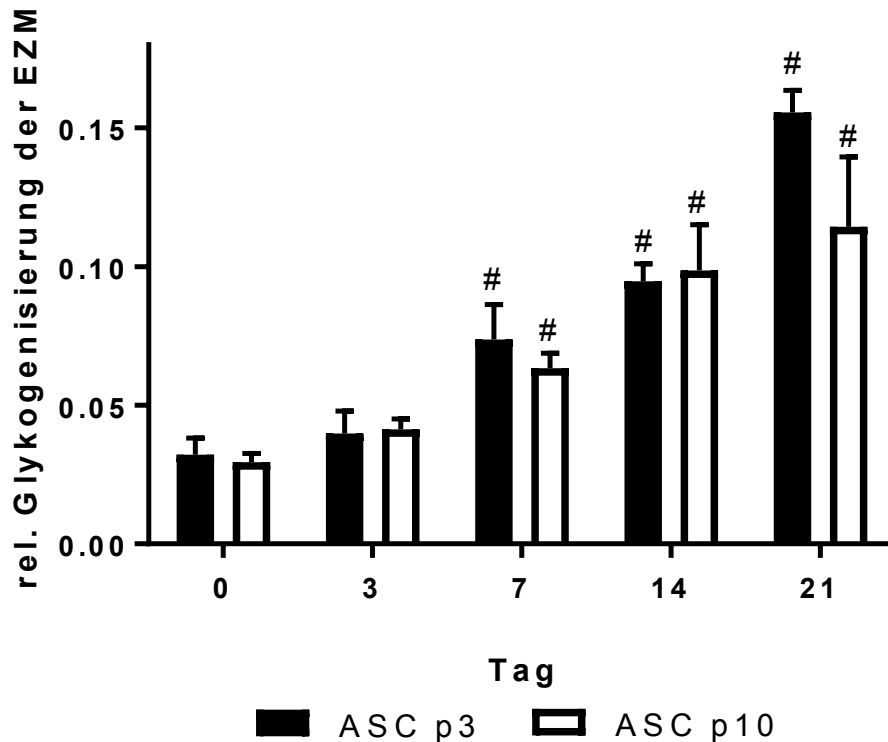


Abbildung 13: Quantifizierung der Stärke der Chondrogenese nach chondrogener Induktion über drei Wochen. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung der in der extrazellulären Matrix der Zellen vorhandenen Glykosaminoglykanen. Der Farbstoff Alcianblau bindet an diese Oberflächenproteine. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels rauchender Salzsäure und Isopropanol kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Dadurch kann hier quantitativ bestimmt werden, welche Auswirkungen eine Passagierung der Zellen auf ihre Fähigkeit hat, chondrogen zu differenzieren. EZM: extrazelluläre Matrix; #: $p \leq 0,05$, Signifikanz gegen Tag 0 (Zeitpunkt vor Induktion der Differenzierung) $n=3$.

4.1.3.3 Osteogene Differenzierung

Im Zuge der osteogenen Differenzierung der ASCs fiel, im Gegensatz zu den Differenzierungen in Adipozyten und Chondrozyten, die Notwendigkeit auf, die isolierten Zellen hinsichtlich ihrer osteogenen Differenzierbarkeit in sogenannte Responder und Non-Responder-Zellen unterteilen zu müssen. Als Responderzellen wurden die Zellen definiert, welche sehr gut auf den osteogenen Differenzierungsstimulus ansprachen. Als Nonresponderzellen wurden die Zellen definiert, welche am Tag 21 nach begonnener Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium keine oder eine sehr stark verringerte osteogene Differenzierbarkeit zeigten. Als Maß für die osteogene Differenzierbarkeit wurde dabei die Fähigkeit der Zellen, Kalzium in ihre extrazelluläre Matrix einzubauen, gewertet. Um

auswertbare Ergebnisse, hinsichtlich der Auswirkungen einer verstärkten Passagierung auf die osteogene Differenzierbarkeit der Zellen zu erhalten, wurden bei diesen Experimenten nur Responderzellen eingesetzt, welche in Passage 3 eine ausgeprägte Fähigkeit, osteogen zu differenzieren, zeigten. Da die Nonresponderzellen bereits in der dritten Passage keine signifikante Kalzifizierung der EZM zeigten, konnten bei diesen Zellen keine Aussagen zu einem weiteren Verlust des osteogenen Differenzierungspotentials mit zunehmender Passagierung getroffen werden (Abbildung 14).

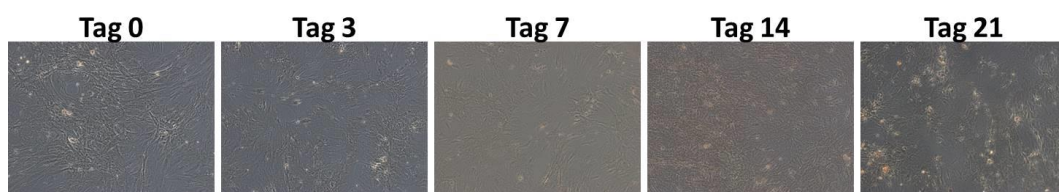


Abbildung 14: Differenzierungsverhalten nach osteogener Induktion von Nonresponderzellen über drei Wochen. Alizarinrot S-gefärbte Zellen eines Nonresponders (Passage drei) über einen Zeitraum von drei Wochen. Die Zellen wurden über diesen Zeitraum in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Tag 0 zeigt den Status der Zellen vor Beginn der Differenzierung.

Bei den Responderzellen wurde deutlich, dass sie ihre Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung mit der erhöhten Zahl an durchlaufenen Passagen fast vollständig verloren (Abbildung 15). Die zwischen Tag 14 und Tag 21 einsetzende Kalzifizierung der EZM war bei den Zellen in Passage 3 noch so stark ausgeprägt, dass die Zellschicht eine geschlossene „Decke“ an Kalzifizierung zeigten. In Passage 10 zeigten nur noch vereinzelte Zellen die Fähigkeit zur Kalzifizierung ihrer Matrix.

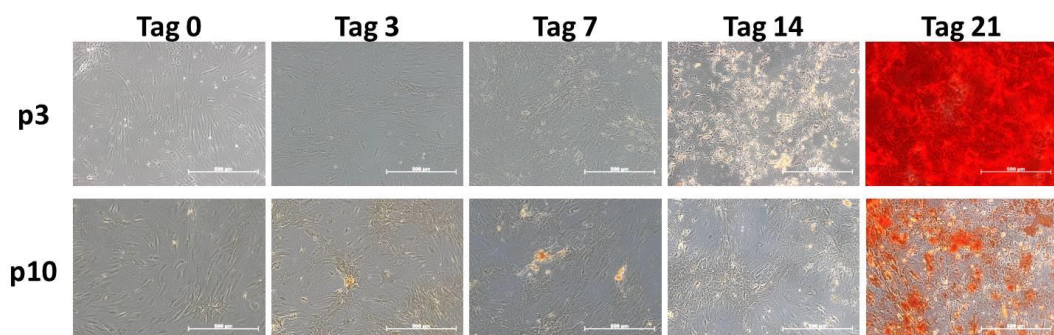


Abbildung 15: Alizarinrot S-gefärbte Zellen eines Responders nach osteogener Differenzierung über einen Zeitraum von 3 Wochen. Die Zellen wurden über diesen Zeitraum in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Tag 0 zeigt den Status der Zellen vor Beginn der Differenzierung. Die in Passage drei durchgeführte Differenzierung wurde in Passage zehn wiederholt.

Um die Kalzifizierung der EZM nicht nur darzustellen, sondern auch zu quantifizieren, wurde der gebundene Farbstoff Alizarinrot S mittels Cetylpyridiniumchloridlösung zurückgelöst und die optische Dichte des Überstandes bei 600 nm (OD_{600}) mittels der Absorptionsspektroskopie bestimmt (Abbildung 16). Dies ermöglichte eine indirekte Quantifizierung des in der zellulären Matrix gebundenen Kalziums. Die Einlagerung von Kalzium in die Matrix begann ungefähr an Tag 14. ASCs in Passage zehn wiesen eine signifikant reduzierte Einlagerung von Kalzium in ihre Matrix auf.

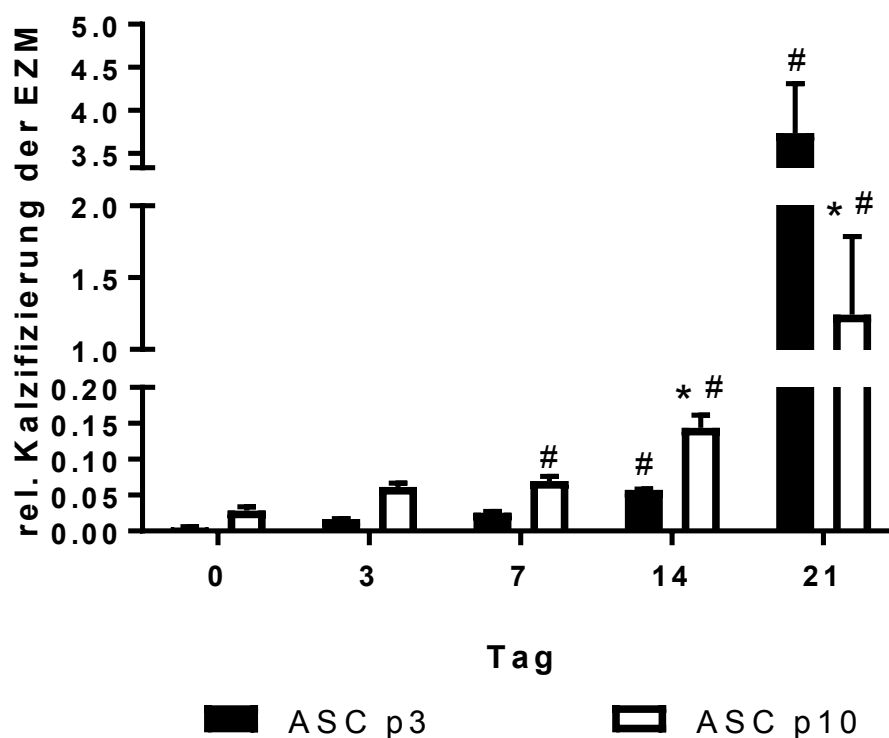


Abbildung 16: Quantifizierung der Stärke der Osteogenese nach osteogener Induktion über drei Wochen. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Dadurch kann hier quantitativ bestimmt werden, welche Auswirkungen eine Passagierung der Zellen auf ihre Fähigkeit, nach osteogenem Differenzierungsstimulus, Kalzium in ihre extrazelluläre Matrix einzulagern, hat. EZM: extrazelluläre Matrix; *: $p \leq 0,05$, Signifikanz p3 gegen p10; #: $p \leq 0,05$, Signifikanz gegen Tag 0 (Zeitpunkt vor Induktion der Differenzierung); $n=3$

Um nicht nur phänotypisch die induzierte Differenzierung zu zeigen, sondern diese auch auf molekularer Ebene darzustellen, wurde die Aktivi-

tät der alkalischen Phosphatase, eines Markerproteins der osteogenen Differenzierung, mittels des P-Nitrophenolphosphat-Assays von Sigma-Aldrich gemessen (siehe auch Methoden 3.5.4). Abbildung 17 zeigt die Aktivität der alkalischen Phosphatase der Zellen in Passage drei und zehn während der osteogenen Differenzierung. Dabei ist auffällig, dass bis einschließlich Tag 14 die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Zellen der zehnten Passage signifikant gegenüber der in den Zellen in Passage drei reduziert war. Erst an Tag 21 erreichte die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase in den Zellen der zehnten Passage die der Zellen der dritten Passage. Die Zellen aus Passage drei zeigten die AP-Aktivität in dieser Höhe bereits seit Tag 14, ab diesem Zeitpunkt stagnierte die Aktivität bei diesen Zellen.

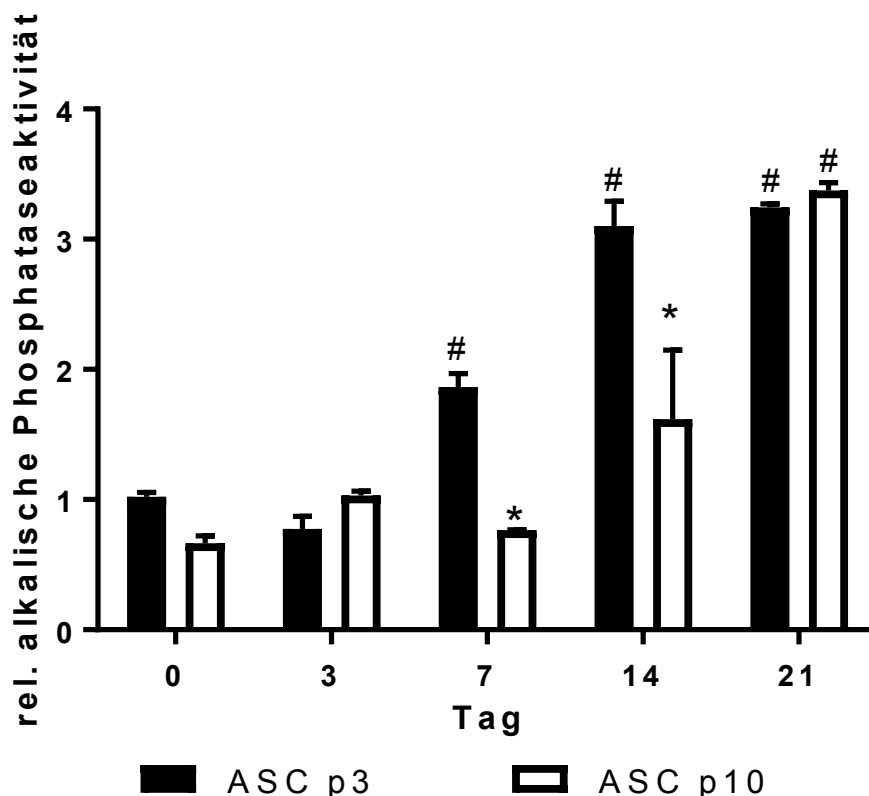


Abbildung 17: Messung der alkalischen Phosphataseaktivität nach osteogener Induktion über einen Zeitraum von drei Wochen. Gezeigt wird hier die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Zellen einer frühen (p3) und einer späten (p10) Passage. Die Alkalische Phosphatase gilt als eines der Markerenzyme der osteogenen Differenzierung. Ihre Expression und Aktivität wird während der osteogenen Differenzierung gesteigert. Gemessen wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase anhand der Absorption des von der alkalischen Phosphatase umgesetzten p-Nitrophenolphosphat (pNP) bei 405 nm. Hier ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Verlauf der Osteogenen Differenzierung zu sehen. *: $p \leq 0,05$, Signifikanz p3 gegen p10; #: $p \leq 0,05$, Signifikanz gegen Tag 0 (Zeitpunkt vor Induktion der Differenzierung); $n=3$

Um die Osteogenese auch auf Proteinebene nachweisen zu können, wurde die Proteinexpression von Runx2, Osterix und BMP-2 als einige der wichtigsten osteogenen Markerproteine gemessen (siehe auch Methoden 3.6 ff).

Abbildung 18 zeigt die Expression des osteogenen Markerproteins Runx2 während der Behandlung der Zellen mit osteogenem Differenzierungsmedium über drei Wochen. Die Responderzellen zeigen einen fortlaufenden Anstieg der Runx2-Expression bis zum 12. Tag. Die Runx2-Expression nimmt daraufhin wieder ab. Die Nonresponderzellen zeigen ebenfalls einen Anstieg, der jedoch erst zwischen Tag 12 und 15 beginnt und nicht wieder abnimmt. Die großen Standardabweichungen zeigen die ausgeprägte Heterogenität zwischen den Zellen der einzelnen Spender. Die Runx2-Expressionsanalyse durch Western Blot wurde gegen das Housekeeping-Protein GAPDH normiert, da die Expression von GAPDH im Gegensatz zu der von Runx2 nicht durch die Osteogenese der Zellen beeinflusst wird.

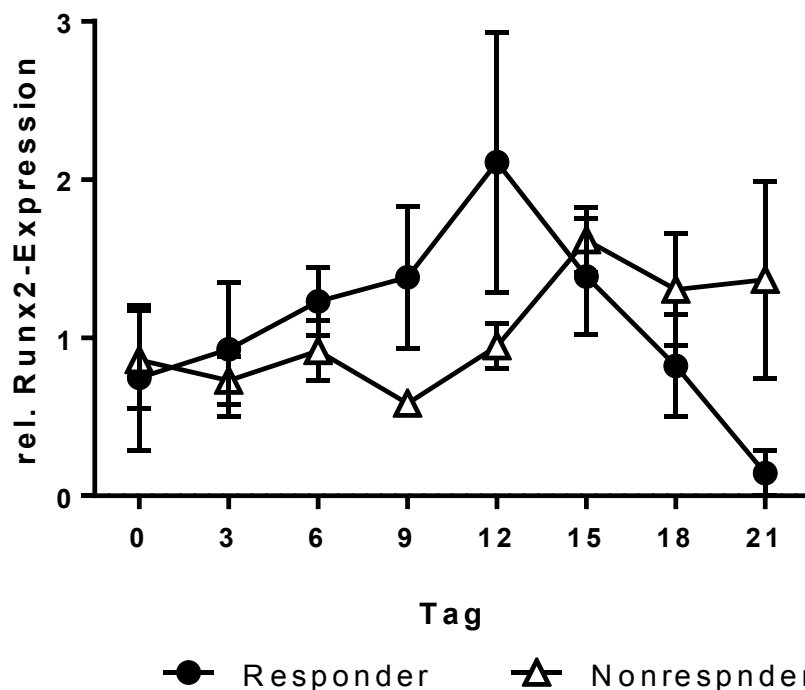


Abbildung 18: Messung der Runx2-Proteinexpression (Western Blot) von Nonresponder- und Responderzellen über einen Zeitraum von 21 Tagen bei gleichzeitiger Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium. Tag 0 zeigt die Runx2-Expression in den Zellen vor Beginn der Differenzierung. Die Proteinexpressionswerte wurden normiert gegen das Housekeeperprotein Gapdh; n=3

Ein Western Blot zum Nachweis des osteogenen Markerproteins Osterix zeigte, dass dieses Protein weder in den Responder- noch in den Nonresponderzellen während der Osteogenese hochreguliert wird. Während jedoch die Expression des Proteins bei den Responderzellen immer weiter sank, nahm sie bei den Nonresponderzellen an Tag 21 wieder zu. Die großen Standardabweichungen zeigen die stark ausgeprägte Heterogenität der Zellen hinsichtlich ihres Proteinexpressionsmusters (Abbildung 19).

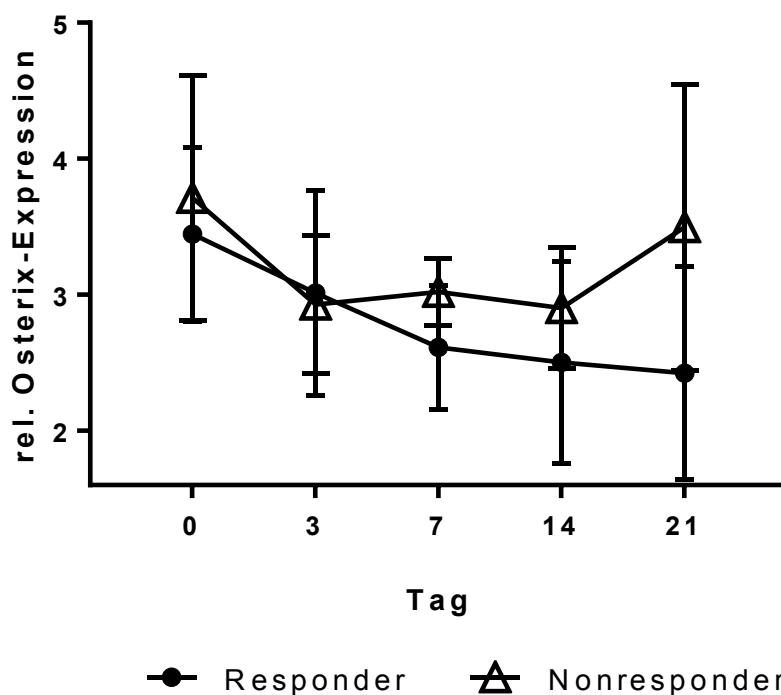


Abbildung 19: Messung der Osterix-Proteinexpression (Western Blot) von Nonresponder- und Responderzellen über einen Zeitraum von 21 Tagen bei gleichzeitiger Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium. Tag 0 zeigt die Osterix-Expression in den Zellen vor Beginn der Differenzierung. Die Proteinexpressionswerte wurden normiert gegen das Housekeeperprotein Gapdh; n=3

Die Quantifizierung der Expression des BMP-2-Precursorproteins (Abbildung 20) mittels Western Blot zeigte, dass die Responderzellen an Tag null und damit bereits vor einsetzender osteogener Differenzierung eine höhere BMP-2-Translation aufwiesen als die Nonresponderzellen. Während der Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium stieg die Expression sowohl in Responder- als auch in Nonresponderzellen bis zum siebten Tag der osteogenen Differenzierung kontinuierlich an, danach wurde sie in den Responderzellen stark herunterreguliert. In den Nonres-

ponderzellen war bis zum 14. Tag der osteogenen Differenzierung eine erhöhte BMP-2-Expression detektierbar, welche zwischen Tag 14 und 21 signifikant gegenüber Tag null hochreguliert war.

Die Expression des BMP-2-Homodimer (Abbildung 20) war in Responder- und Nonresponderzellen ebenfalls bis zum siebten Tag hochreguliert. Danach fiel die Expression in den Responderzellen stark ab während sie in den Nonresponderzellen bis zum 21. Tag konstant blieb.

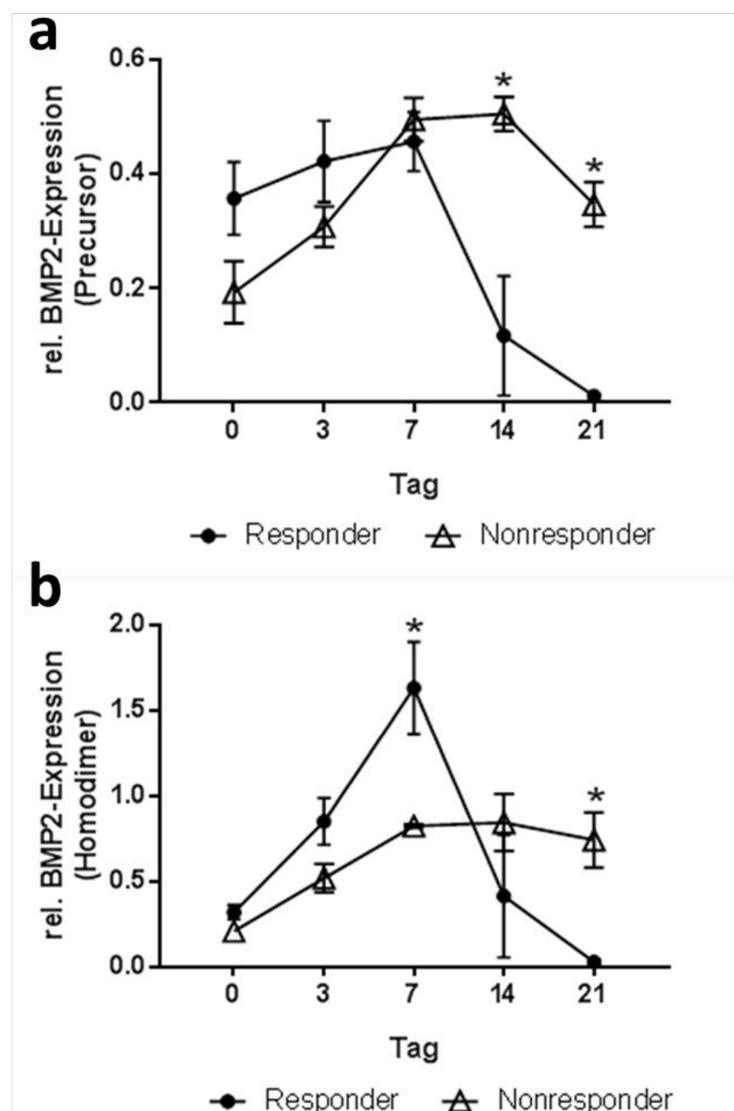


Abbildung 20: Messung der BMP2-Proteinexpression (Western Blot) von Nonresponder- und Responderzellen über einen Zeitraum von 21 Tagen bei gleichzeitiger Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium. Tag 0 zeigt die BMP2-Expression in den Zellen vor Beginn der Differenzierung. Die Proteinexpressionswerte wurden normiert gegen das Housekeeperprotein Gapdh. Gemessen wurde sowohl die Expression des Precursorproteins (a) als auch die des Homodimers (b) *signifikant gegenüber den Nonresponderzellen, *: $p \leq 0,05$, Signifikanz Responder gegen Nonresponderzellen; $n=3$

Die Experimente zur Verifizierung des Stammzellcharakters der isolierten Zellen zeigten, dass die Zellen zwar viele Kriterien der ISCT erfüllten (Plastikadhärenz, Differenzierbarkeit in die chondrogene und adipogene Richtung), hinsichtlich anderer Kriterien aber eine große Inhomogenität zwischen den Zellen der einzelnen Spender herrschte. So wiesen beispielsweise nicht alle osteogen induzierten Zellen die Fähigkeit zur Kalzifizierung ihrer EZM auf, zeigten aber dennoch auf molekularer Ebene eine Reaktion auf den osteogenen Differenzierungsstimulus. Auch exprimierten nicht alle Zellen die für Stammzellen erforderlichen Oberflächenantigene, wie beispielsweise CD26, CD73 und CD105. Diese Antigene waren nur bei ungefähr 50 % der Zellen zu detektieren, nicht bei über 90 % der Zellen, wie von der ISCT gefordert wird. Aus diesem Grund haben wir uns in der vorliegenden Arbeit dazu entschlossen, die von uns isolierten Zellen als multipotente adipogene stromale Zellen (Adipogenic stromal cells, ASCs) und nicht als multipotente Stammzellen zu bezeichnen. Dass es sich hier um Zellen der stromal vaskulären Fraktion handelt beinhaltet, dass die von uns isolierte Zellpopulation nicht nur mesenchymale Stammzellen, sondern auch zahlreiche Vorläuferzellen enthält.

4.2 Osteogene Differenzierung und die Expression Reaktiver Sauerstoffspezies

Die große Diskrepanz im osteogenen Differenzierungsverhalten zwischen den einzelnen Spendern warf die Frage nach den Ursachen auf. Da uns keine detaillierten Anamnesen der Patienten vorlag, konnten wir nur das Alter der Spender vergleichen. Dieser Vergleich zeigte, dass die Patienten, die Spender von Nonresponderzellen waren, signifikant älter waren als die Spender von Responderzellen (Abbildung 21). Es lag demnach ein Zusammenhang des Spenderalters mit der Fähigkeit der Zellen osteogen zu differenzieren vor. Unser nächstes Ziel war es nun, die Ursachen dafür zu ermitteln.

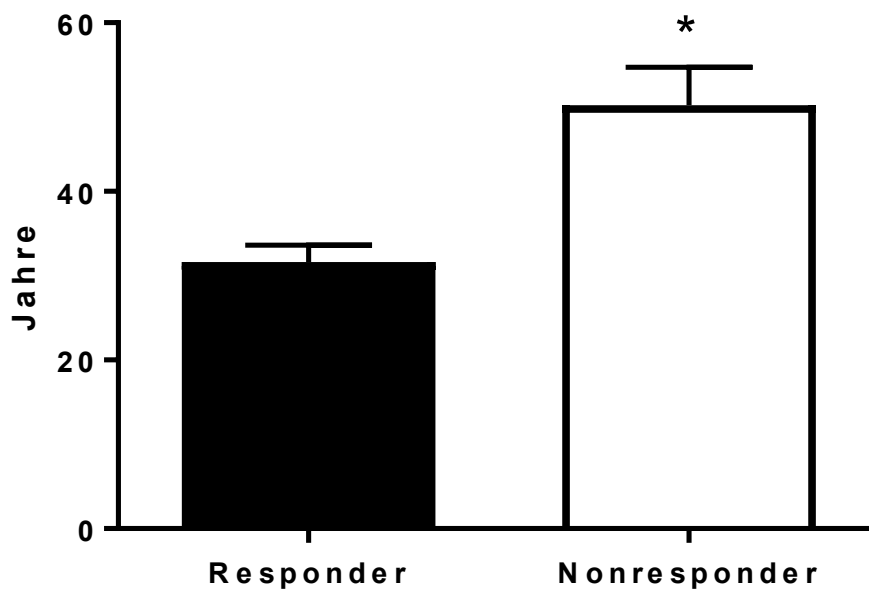


Abbildung 21: Abnahme der Fähigkeit der Zellen, mit zunehmendem Spenderalter osteogen zu differenzieren. Gezeigt ist hier das durchschnittliche Alter der Spender von Responderzellen verglichen mit dem Durchschnittsalter der Spender von Nonresponderzellen. Das Alter der Spender von Responderzellen lag signifikant unter dem Alter der Spender von Nonresponderzellen. *: $p \leq 0,05$, $n=32$

Verschiedene Studien zeigten bereits, dass zunehmendes Alter stets mit einer Zunahme der Menge an Reaktiven Sauerstoffspezies im Gewebe einhergeht. Aus diesem Grund quantifizierten wir mithilfe einer DCFDA-Färbung (siehe Methoden 3.1.1) die ROS-Menge in den Zellen von Responder- und Nonresponderpatienten. Es zeigte sich, dass Nonresponderzellen signifikant mehr ROS (verglichen mit den Responderzellen) aufwiesen (Abbildung 22). Damit erhielten wir einen ersten möglichen Hinweis darauf, weshalb die Nonresponderzellen schlechter osteogen differenzierten. Das nächste Ziel war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem veränderten Differenzierungspotential der Zellen und der Höhe der durch die Zellen gebildeten Reaktiven Sauerstoffspezies zu untersuchen, beziehungsweise zu evaluieren, ob Reaktive Sauerstoffspezies überhaupt einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung ausüben.

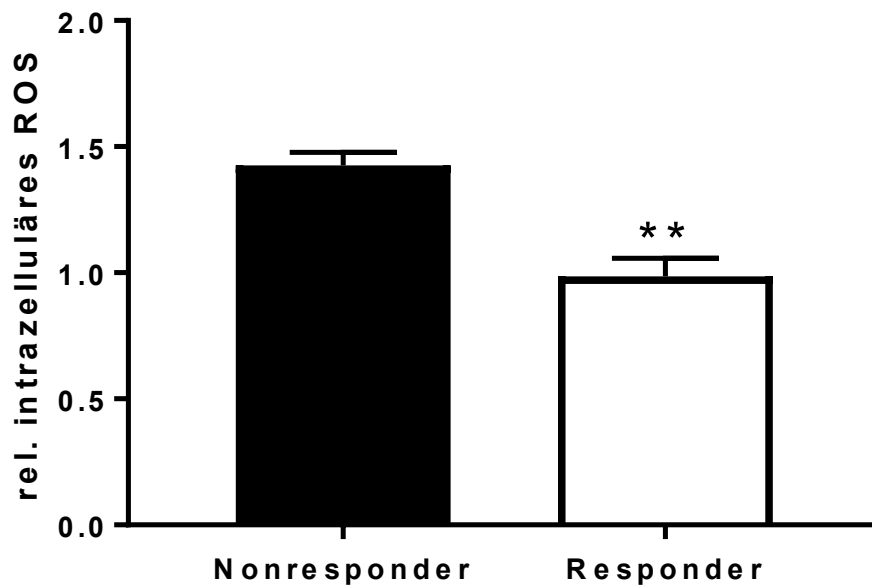


Abbildung 22: Grundexpression Reaktiver Sauerstoffspezies in Responder- und Nonresponderzellen. Gezeigt ist hier die ROS-Produktion in Responder- und Nonresponderzellen mithilfe des Farbstoffes DCFDA. Als Referenz wurden Zellen gemessen, welche nicht mit DCFDA-behandelt worden waren, um die Eigenfluoreszenz der Zellen herausrechnen zu können. Die gemessenen Werte spiegeln die auf die Eigenfluoreszenz der Zellen normierten Werte wieder. Deutlich ist anhand der Graphik abzulesen, dass die Nonresponderzellen eine deutlich höhere ROS-Produktion zeigten, verglichen mit den Responderzellen **: $p \leq 0,005$, $n=3$

4.2.1 ROS-Generierung während der Osteogenese

Um zu überprüfen, ob ROS während der Osteogenese eine entscheidende Rolle spielt, wurden sowohl Responder- als auch Nonresponderzellen über einen Zeitraum von drei Wochen osteogen differenziert. Dabei wurde im Abstand von zwei Tagen das zelluläre ROS mittels DCF-DA-Färbung detektiert (Abbildung 23). Die ROS-Expression erreichte ihren Höhepunkt zu dem Zeitpunkt (Tag zehn), zu welchem auch die Kalzifizierung der EZM einsetzte und die Aktivität der alkalischen Phosphatase als molekularer Indikator der osteogenen Differenzierung anstieg (Abbildung 24, 25 und 26). Diese Ergebnisse zeigten, dass ein osteogener Differenzierungsstimulus sowohl in den Responder- als auch in den Nonresponderzellen eine Erhöhung der intrazellulären ROS-Produktion auslöste. Auch wenn die Nonresponderzellen phänotypisch keine Anzeichen einer Osteogenese zeigten, so zeigte sich auf molekularer Ebene auch bei diesen Zellen ein Effekt.

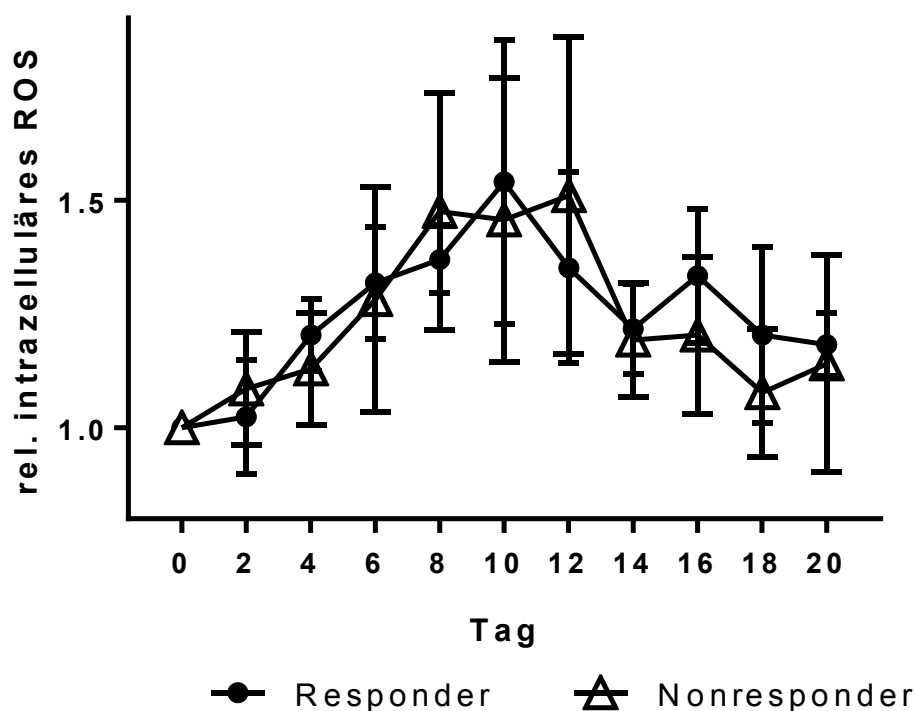


Abbildung 23: ROS-Expression in Responder- und Nonresponderzellen während der Osteogenese. Als Referenz wurden Zellen gemessen, welche nicht mit DCFDA-behandelt worden waren, um die Eigenfluoreszenz der Zellen herausrechnen zu können. Die gemessenen Werte spiegeln die auf die Eigenfluoreszenz der Zellen normierten Werte wieder. n=3

Abbildung 24 zeigt die Messung der alkalischen Phosphataseaktivität im Abstand von jeweils zwei Tagen, um den Aktivitätsverlauf des Enzymes über drei Wochen exakt messen zu können. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Nonresponderzellen nahezu stagnierte, während in den Responderzellen eine Erhöhung der Aktivität ab Tag 10 nach Beginn der osteogenen Differenzierung zu beobachten war. Vergleicht man den Aktivitätsanstieg der Alkalischen Phosphatase in den Responderzellen mit dem Verlauf der ROS-Produktion in Responder- und Nonresponderzellen, so wird deutlich, dass an Tag 10 die ROS-Produktion in den Zellen am höchsten ist und damit zu dem Zeitpunkt, an welchem auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Responderzellen ansteigt.

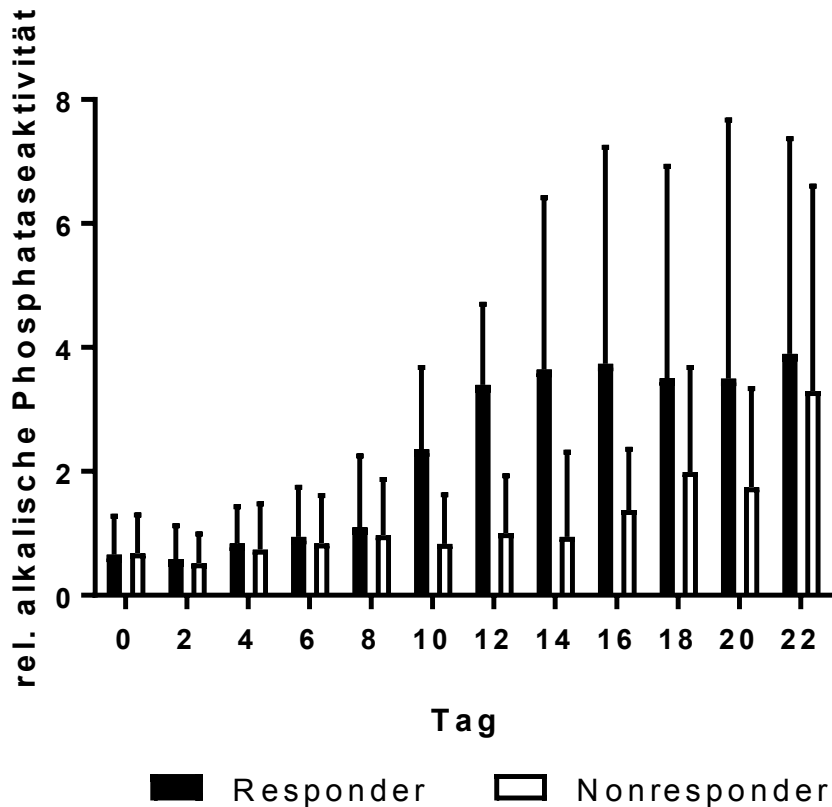


Abbildung 24: Messung der alkalischen Phosphataseaktivität in Responder- und Nonresponderzellen nach osteogener Induktion. Gezeigt wird hier die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Responder- und Nonresponderzellen. Die alkalische Phosphatase ist ein Markerenzyme der osteogenen Differenzierung. Ihre Expression und Aktivität wird während der osteogenen Differenzierung gesteigert. Gemessen wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase hier anhand der Absorption von p-Nitrophenolphosphat (pNP) bei 405 nm. Es ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Verlauf der Osteogenen Differenzierung dargestellt. Deutlich zeigt sich hier, dass die alkalische Phosphatase in den Responderzellen ihr Aktivitätsmaximum zwischen Tag 12 und 14 erreicht. n=3

Desweiteren wurde die extrazelluläre Matrix der Zellen mit Alizarinrot S gefärbt, um den Grad der EZM-Kalzifizierung bestimmen zu können. Der gebundene Farbstoff wurde durch Rücklösung anschließend quantifiziert. Abbildung 24 zeigt den Kalzifizierungsgrad der zellulären Matrix von Responder- und Nonresponderzellen über einen Zeitraum von 22 Tagen. Links ist der Differenzierungsverlauf der Responderzellen und rechts der Differenzierungsverlauf der Nonresponderzellen zu sehen. Dabei korrelierten die ROS-Expressionswerte der Nonresponderzellen mit denen der Responderzellen, obwohl die Nonresponderzellen zu diesem Zeitpunkt noch keine Anzeichen einer einsetzenden Osteogenese aufwiesen: die Matrixkalzifizierung setzte bei diesen Zellen geringfügig an Tag 20 ein

(Abbildung 25 und 26), die Aktivität der alkalischen Phosphatase stieg erst an Tag 18 leicht an (Abbildung 24).

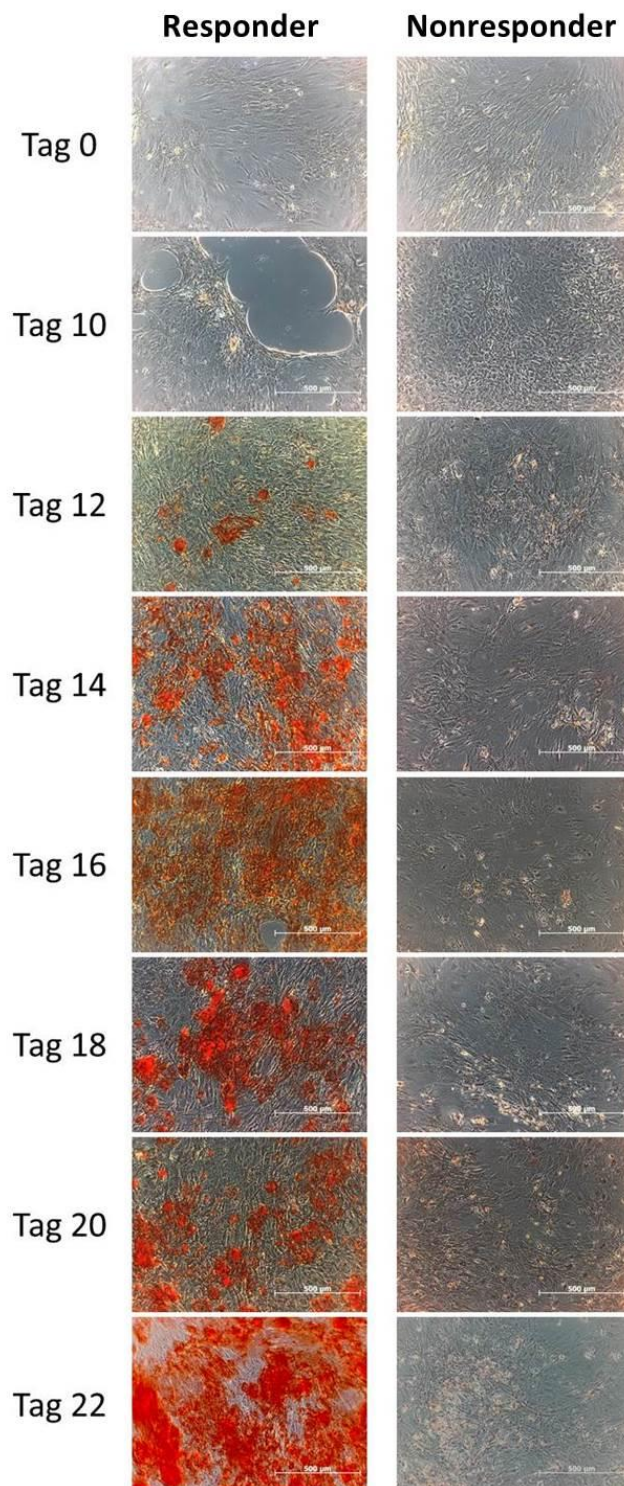


Abbildung 25: Kalzifizierungsgrad der EZM von Responder- und Nonresponderzellen über einen Zeitraum von 22 Tagen. Links ist exemplarisch die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix eines Responders, rechts die eines Nonresponders dargestellt.

Abbildung 26 zeigt die Quantifizierung des gebundenen Alizarinrot S-Farbstoffes und damit indirekt die Menge des in die Matrix der Zellen ein-

gelagerten Kalziums bei Responder- und Nonresponderzellen. Der signifikante Unterschied zwischen Nonresponder- und Responderzellen bezüglich der Fähigkeit, Kalzium in die Zellmembran einzulagern, wird auch hier wieder deutlich.

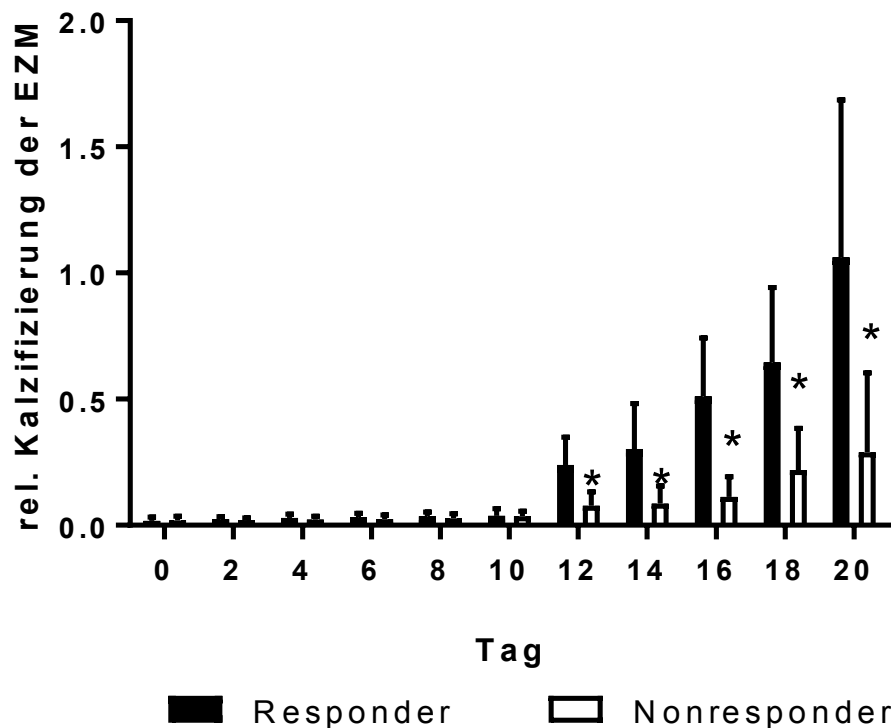


Abbildung 26: Quantifizierung der Kalzifizierung der EZM von Responder- und Nonresponderzellen nach osteogener Induktion. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Hier wird der Verlauf der Kalzifizierung der EZM während der Osteogenese von Responder- und Nonresponderzellen im Vergleich gezeigt *: $p \leq 0,05$, Signifikanz Responder- gegen Nonresponderzellen, EZM: extrazelluläre Matrix; $n=3$

Auch anhand dieser Ergebnisse lässt sich ein mit dem Anstieg der ROS-Produktion einhergehender Verlauf der Osteogenese der ASCs beobachten: die Kalzifizierung der EZM beginnt an Tag 12 und damit zwei Tage nach dem beginnenden Anstieg der Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Die ROS-Produktion erhöht sich damit zu dem Zeitpunkt zu welchem sich die Zellen nicht nur molekular, sondern auch morphologisch verändern. Damit stellten wir die Hypothese auf, dass Reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle bei der Osteogenese der ASCs spielen,

konnten jedoch noch nicht erklären, weshalb die Nonresponderzellen eine Retardation ihres osteogenen Differenzierungsverhaltens, beziehungsweise nicht die Fähigkeit zeigten, Kalzium in ihre extrazelluläre Matrix einzubauen.

Um die Hypothese zu verifizieren, dass Reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle im Rahmen der osteogenen Differenzierung der Zellen einnehmen, wurde zunächst untersucht, welche Auswirkungen die Induktion von ROS auf Adipogene Stromazellen hat. Dabei induzierten wir zum einen extrazellulär eine Erhöhung der ROS durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), zum anderen regten wir die intrazelluläre ROS-Produktion durch eine regelmäßige Bestrahlung der Zellen mit UVA an. Wir führten die Experimente sowohl mit bereits konfluent, als auch mit nicht konfluent gewachsenen Zellen durch, da nicht konfluent gewachsene Zellen eine höhere Sensibilität gegenüber Stressoren aufweisen. Untersucht wurde hier insbesondere das Proliferationsverhalten, da Zellen im Rahmen ihrer osteogenen Differenzierung ebenfalls zunächst eine Phase der Proliferation durchlaufen. Diese ist während der osteogenen Differenzierung eine kritische Phase, da hier das Zellmaterial bereitgestellt wird, welches später zum Aufbau des Knochens genutzt wird (siehe auch Kapitel 1.3). Im Gegensatz zu späteren Versuchen wurde bei diesen Experimenten noch nicht zwischen Responder- und Nonresponderzellen unterschieden, da hier weniger die osteogene Differenzierung als vielmehr die durch ROS allgemein verursachten Effekte im Vordergrund standen und davon ausgegangen werden konnte, dass die grundlegenden Mechanismen zur ROS-Produktion keine Unterschiede aufwiesen.

4.3 Toleranz konfluent und nicht konfluent gewachsener Zellen gegenüber ROS-Induktoren

4.3.1 Auswirkungen einer ROS-Induktion mittels H_2O_2

Um die Auswirkungen einer extrazellulären Induktion der Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies auf Adipogene stromale Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit H_2O_2 -Konzentrationen zwischen 0 μM und 100 μM H_2O_2 behandelt (siehe auch Methoden 3.8.1). Bei Zellen, welche

noch nicht konfluent gewachsen waren, konnten wir zeigen, dass bereits 10 μM H_2O_2 das Zellwachstum hemmte, Konzentrationen ab 25 μM H_2O_2 inhibierten die Proliferation der Zellen vollständig. Höhere Konzentrationen waren zytotoxisch (Abbildung 27).

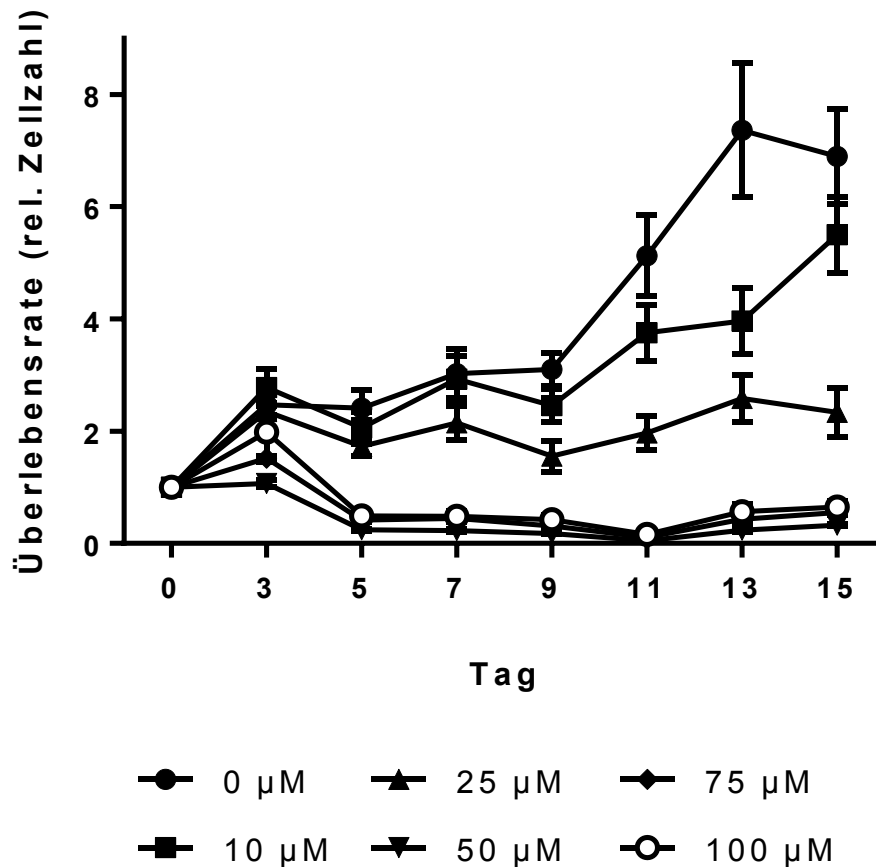


Abbildung 27: Überlebensrate nicht-konfluent gewachsener Zellen nach Behandlung mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen. Die Werte wurden auf die Zellzahl an Tag 0 normiert (entsprechend dem Zeitpunkt vor der H_2O_2 -Behandlung). Die Zellen wurden mit H_2O_2 behandelt, bevor sie die Konfluenz erreicht hatten, $n=3$

Konfluent gewachsene Zellen zeigten eine erwartungsgemäß niedrigere Sensibilität gegenüber der Behandlung mit Wasserstoffperoxid. Hier hemmten erst Konzentrationen zwischen 25 und 50 μM die Proliferation der Zellen, erst ab 75 μM waren zytotoxische Effekte zu beobachten (Abbildung 28).

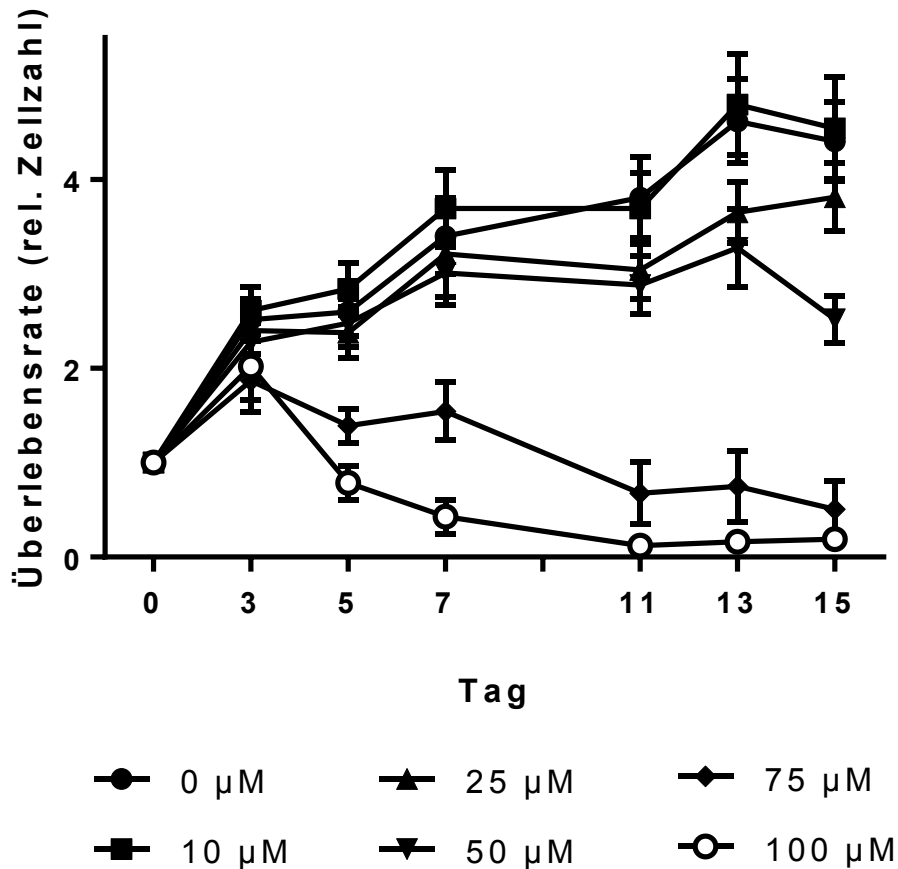


Abbildung 28: Überlebensrate konfluent gewachsener Zellen nach Behandlung mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen. Die Werte wurden auf die Zellzahl an Tag 0 normiert (entsprechend dem Zeitpunkt vor der H_2O_2 -Behandlung). Die Zellen wurden erst mit H_2O_2 behandelt, nachdem sie zu 100 % konfluent gewachsen waren; $n=3$

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe von H_2O_2 ins Medium die Proliferation der Zellen dosisabhängig inhibiert. Dabei waren für unser Versuche besonders die Ergebnisse für die konfluent gewachsenen Zellen relevant, da die Zellen für die osteogene Differenzierung ebenfalls in einem konfluenten Zellschicht vorliegen müssen. Durch eine γH2AX -Färbung konnten wir zeigen, dass ein Grund für die proliferationshemmende, beziehungsweise zytotoxische Wirkung der H_2O_2 -Behandlung die Induktion zahlreicher Doppelstrangbrüche ist. Liegt in der DNA ein Doppelstrangbruch vor, wird das nächstliegende H2AX-Histonprotein phosphoryliert (die phosphorylierte Form wird als γH2AX bezeichnet). Diese Phosphorylierung ist der Beginn einer Signalkaskade, welche an dieser Stelle zum Anheften des benötigten Reparaturkomplexes an die DNA führt. Durch eine immunhistochemische Färbung konnten wir das in der Zelle phospho-

rylierte γ H2AX sichtbar machen und so zeigen, dass eine Behandlung mit H_2O_2 Doppelstrangbrüche in der DNA induziert (Abbildung 29)

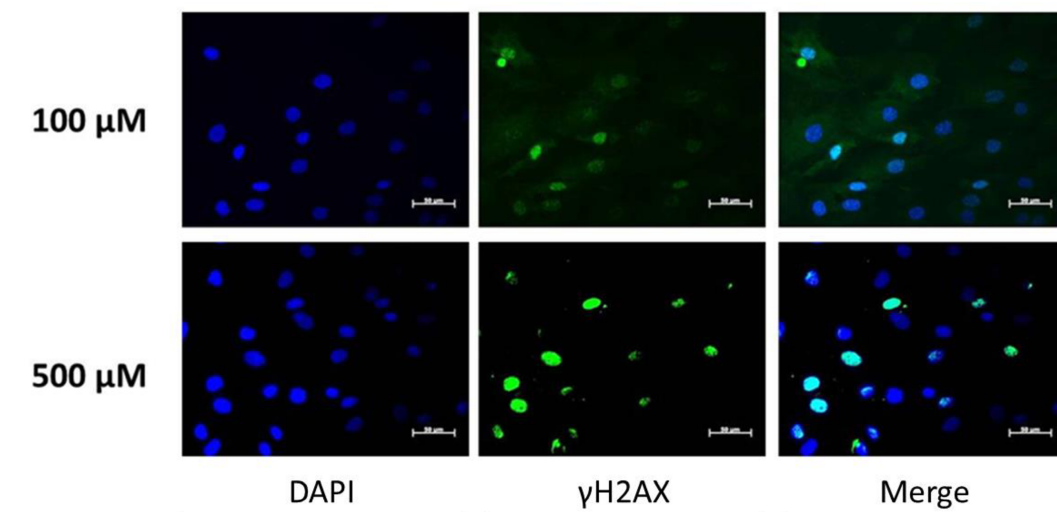


Abbildung 29: Immunhistochemische Darstellung des phosphorylierten Histonproteins H2AX nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen. Die phosphorylierte Form von H2AX wird als γ H2AX bezeichnet und ist ein Indikator für DNA-Doppelstrangbrüche. Die Doppelfärbung mit DAPI zeigt, dass ab einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 im Medium die DNA nahezu jeder Zelle zahlreiche Doppelstrangbrüche aufweist. Das Ausmaß der Schädigung nimmt mit einem weiteren Anstieg der H_2O_2 -Konzentration zu.

4.3.2 Auswirkungen einer ROS-Induktion mittels UVA

Um die Toleranz der Zellen gegenüber einer intrazellulär erhöhten ROS-Produktion zu messen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen UVA bestrahlt (siehe auch Methoden Kapitel 3.8.2). Wie bereits bei der ROS-Induktion durch H_2O_2 wurden auch hier zum einen bereits konfluent gewachsene Zellen als auch solche, welche noch nicht die Konfluenz erreicht hatten, behandelt. Ebenso wie bei der H_2O_2 -Behandlung war auch hier zu beobachten, dass die Zellen deutlich sensibler auf die Behandlung reagierten, wenn sie sich nicht in einem konfluenten Zellrasen befanden. So wirkte sich bereits eine Bestrahlung von $2,5 \text{ J/cm}^2$ leicht toxisch auf nicht konfluent gewachsene Zellen aus, während Dosen von 5 J/cm^2 oder mehr starke toxische Effekte hervorriefen. Eine 100 %ige Letalität trat hier jedoch, im Gegensatz zu einer Behandlung mit H_2O_2 , selbst bei hohen Dosen nicht auf. Zwischen Tag 5 und 7 schienen sich die Zellen an die tägliche Bestrahlung zu adaptieren und proliferierten wieder stärker (Abbildung 30).

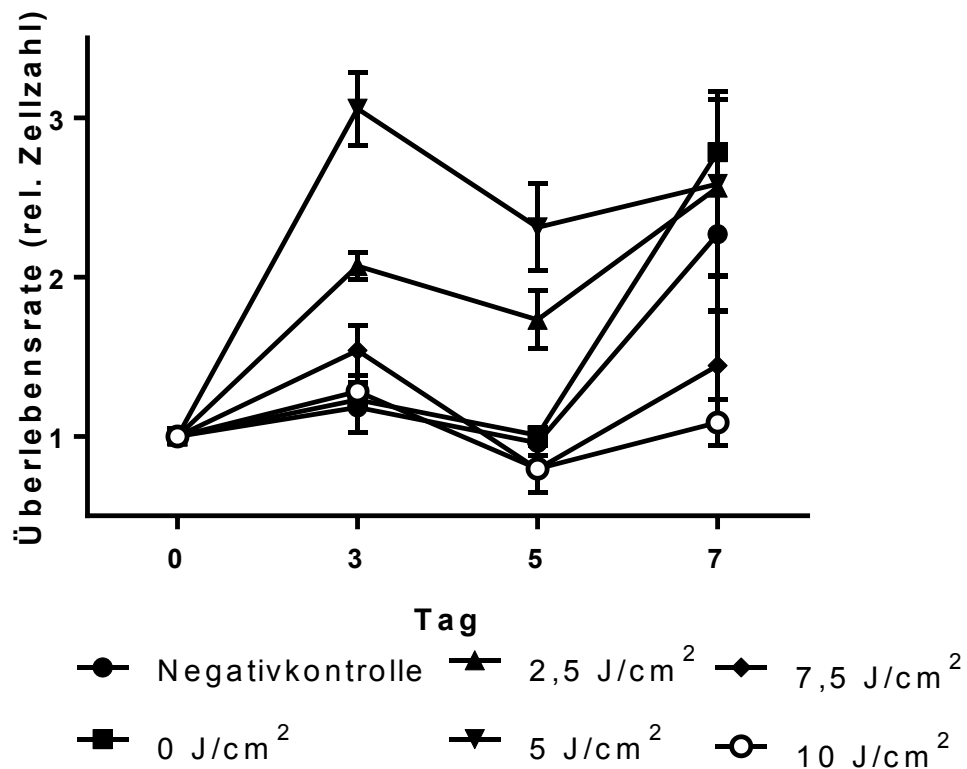


Abbildung 30: Überlebensrate nicht konfluent gewachsener Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen UVA-Dosen. Die Werte wurden auf die Zellzahl an Tag 0 normiert (entsprechend dem Zeitpunkt vor der H₂O₂-Behandlung). Die Zellen wurden bereits vor Erreichen ihrer Konfluenz bestrahlt. Zum Zeitpunkt des Experimentbeginns betrug die Zelldichte 1000 Zellen/cm²; n=3

Um den Effekt der Bestrahlung auch auf konfluent gewachsenen Zellen zu untersuchen, wurden Zellen, die bereits eine 100 %-ige Konfluenz erreicht hatten, mit UVA in verschiedenen hohen Dosen bestrahlt (Abbildung 31). Bedingt durch die bereits erreichte Konfluenz zeigten die Zellen eine deutlich höhere Toleranz bezüglich der Bestrahlung als die nicht konfluent gewachsenen Zellen. Selbst bei den höchsten Dosen traten keine signifikant toxischen Effekte auf.

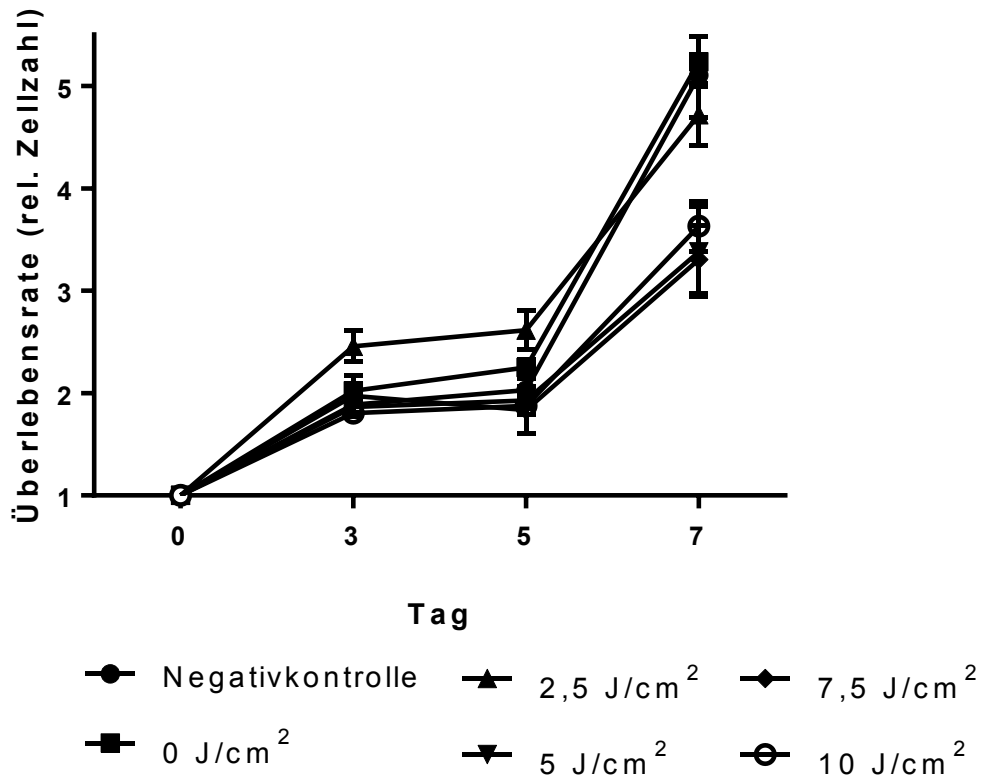


Abbildung 31: Überlebensrate konfluent gewachsener Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen UVA-Dosen. Die Werte wurden normiert auf die Zellzahl an Tag 0 (entsprechend dem Zeitpunkt vor der Bestrahlung). Die Zellen wurden erst nach dem Erreichen einer 100 %igen Konfluenz bestrahlt; n=3

Der Proliferationsinhibition durch UVA liegen jedoch andere zelluläre Mechanismen zugrunde als der durch Wasserstoffperoxid. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass UVA-Bestrahlungen Einzelstrangbrüche induzieren, während H_2O_2 -Doppelstrangbrüche induziert. Diese Aussagen konnten wir belegen. Abbildung 32 zeigt Zellen, welche mit hohen Dosen UVA bestrahlt wurde. Lediglich bei der höchsten Dosis ($10 J/cm^2$) traten vereinzelte Doppelstrangbrüche auf, wobei hier eher von nahe beieinander liegenden Einzelstrangbrüchen auszugehen ist, welche von der Zelle wie ein Doppelstrangbruch behandelt werden.

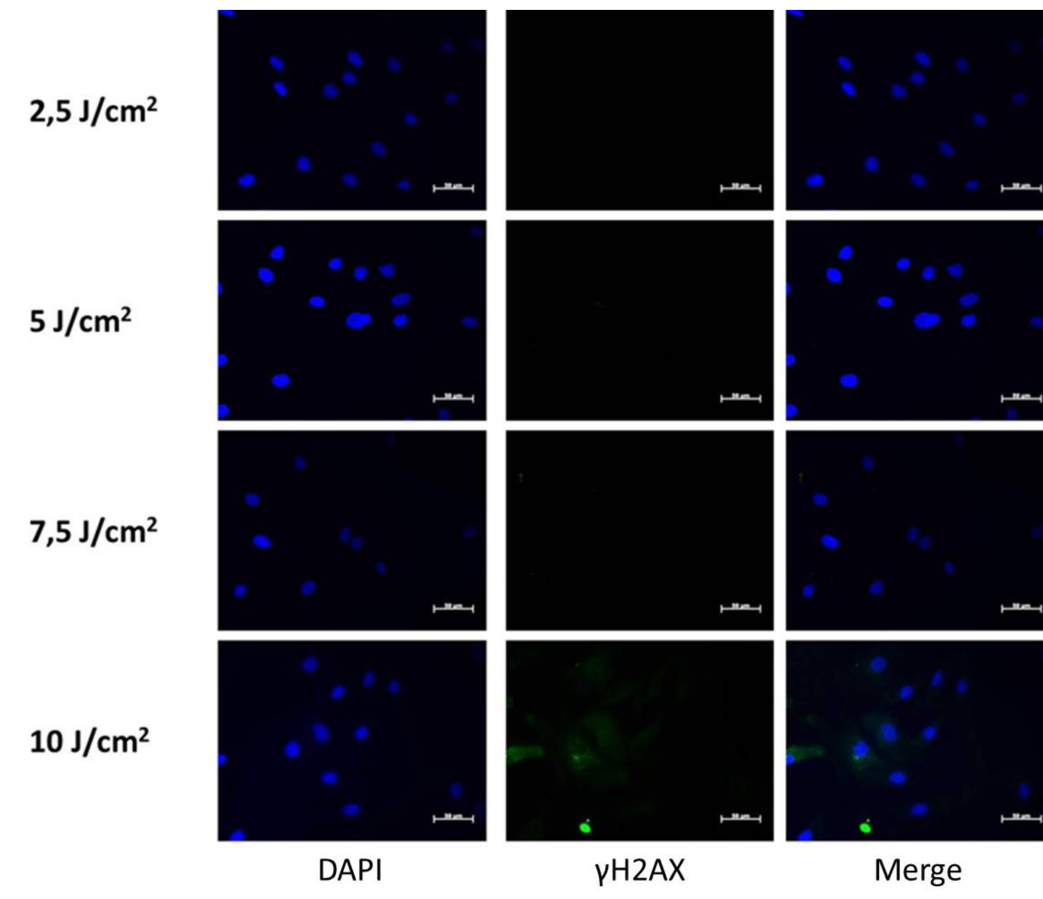


Abbildung 32: γ H2AX-Färbung zur Detektion von Doppelstrangbrüchen in UVA-bestrahlten Zellen. Die Zellen waren unterschiedlichen Dosen von $2,5 \text{ J/cm}^2$ bis 10 J/cm^2 ausgesetzt. Die phosphorylierte Form des Histonproteins H2AX wird als γ H2AX bezeichnet und ist ein Indikator für DNA-Doppelstrangbrüche. Die Doppelfärbung mit DAPI zeigt, dass ab einer Konzentration von 10 J/cm^2 die DNA in einigen Zellen Doppelstrangbrüche aufweist.

Zusammengefasst konnten wir mit den vorliegenden Experimenten zeigen, dass sowohl extrazellulär bedingte Erhöhungen der ROS-Produktion (Wasserstoffperoxid) als auch eine durch Strahlung induzierte Erhöhung der Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies zu einer Beeinflussung des Proliferationsverhaltens führte, auch wenn sich die dahinter stehenden zellulären Mechanismen voneinander unterschieden.

4.4 Effekte einer ROS-Induktion auf die Osteogenese

Nachdem wir zeigen konnten, dass ROS während der Osteogenese hochreguliert wird, untersuchten wir die Auswirkungen einer osteogenen Differenzierung der Zellen bei gleichzeitiger Zugabe von Reaktiven Sauerstoffspezies via H_2O_2 . Wir untersuchten sowohl die Zellen von Respondern als auch die Zellen von Nonrespondern. Das osteogene Differenzie-

rungsmedium (siehe auch Methoden 3.5.2) wurde mit H_2O_2 -Konzentrationen zwischen 5 μM und 100 μM H_2O_2 versetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, welchen mit wasserstoffperoxidfreiem Medium behandelt wurden. Abbildung 33 zeigt, dass die Zugabe geringer Konzentrationen von H_2O_2 das osteogene Differenzierungspotential von Responderzellen sogar signifikant steigerte. Auch bei Nonresponderzellen war dies tendenziell erkennbar, jedoch nicht auf einem signifikanten Niveau. Die beste Osteogenese konnte bei den Responderzellen erreicht werden, wenn die Zellen gleichzeitig mit 10 μM H_2O_2 behandelt wurden. H_2O_2 Konzentrationen von mehr als 10 μM führen zu einer geringeren Kalzifizierung der Matrix. Ab Konzentrationen von 25 μM ist die EZM-Kalzifizierung geringer als bei Zellen, die nur mit osteogenem Differenzierungsmedium ohne Zugabe von H_2O_2 behandelt wurden. Die Nonresponderzellen bildeten unter keiner der in den Abbildungen 33 und 34 gezeigten Differenzierungsansätzen eine Kalzifizierte Matrix aus.

Auch die fotografische Dokumentation der Ergebnisse am Mikroskop zeigt deutlich den zunächst erfolgten Anstieg der EZM-Kalzifizierung, wenn dem osteogenen Differenzierungsmedium bis zu 10 μM H_2O_2 hinzugegeben wurde. Bei höheren Konzentrationen sinkt die Menge des eingelagerten Kalziums signifikant (Abbildung 33). Abbildung 34 zeigt die fotografische Dokumentation der Differenzierung von Responderzellen unter Anwesenheit verschiedener H_2O_2 -Konzentrationen. Da die Nonresponderzellen nicht osteogen differenzierten, werden für diese Zellen lediglich die Rücklösungswerte (siehe Abbildung 33) gezeigt.

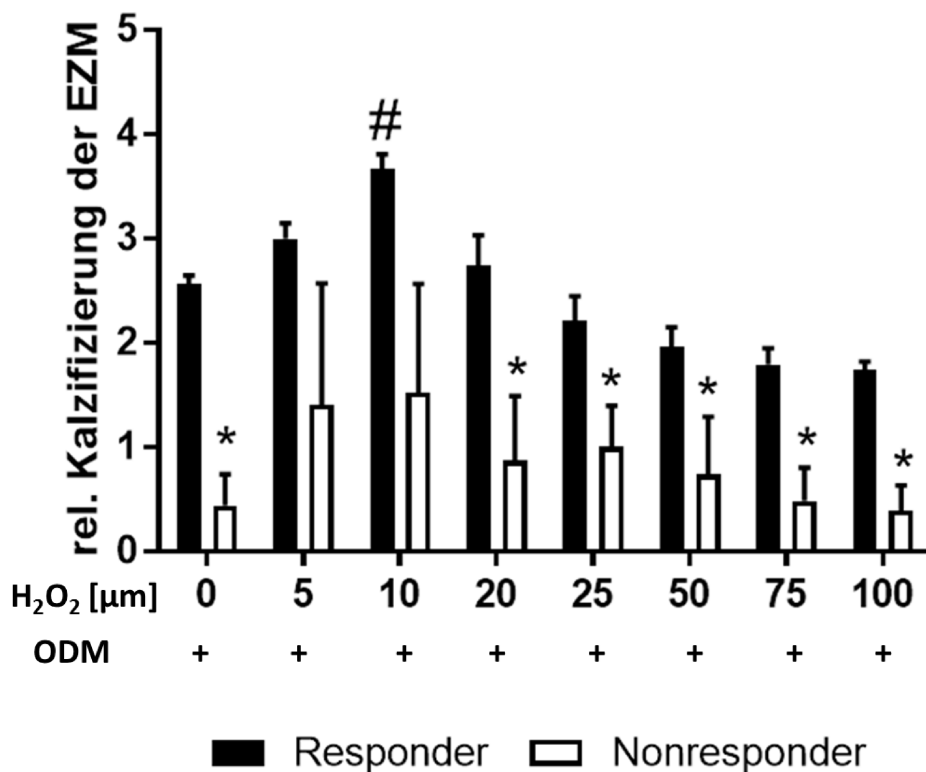


Abbildung 33: Quantifizierung der Kalzifizierung der EZM osteogen differenzierter ASCs bei gleichzeitiger Behandlung mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Quantifiziert wurde hier das in die zelluläre Matrix eingelagerte Kalzium der Responder- und Nonresponderzellen, welche, zusätzlich zu dem osteogenen Differenzierungsstimulus, H₂O₂ in Konzentrationen von 0 - 100 µM erhielten, ODM: osteogenes Differenzierungsmedium; *: p ≤ 0,05, Signifikanz Responder- gegen Nonresponderzellen; #: p ≤ 0,05, Signifikanz gegenüber ODM mit 0 µM H₂O₂; n=3

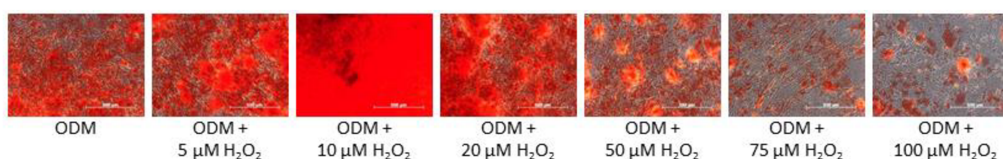


Abbildung 34: Auswirkung verschiedener H₂O₂-Konzentrationen auf die Osteogenese. Fotografische Dokumentation der Ergebnisse der Färbung mit Alizarinrot bei den Zellen eines Responders nach gleichzeitiger Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂. ODM: osteogenes Differenzierungsmedium

Während der Differenzierungsexperimente bei gleichzeitiger H₂O₂-Exposition wurde deutlich, dass die Zellen eine erhöhte Toleranz gegenüber hohen H₂O₂-Konzentrationen zeigten, wenn sie gleichzeitig osteogen differenziert wurden. In den Proliferationsversuchen mit H₂O₂ konnten wir eine Toxizität des Wasserstoffperoxids ab 75 µM beobachten (siehe auch

Kapitel 4.3.1). Dieser Effekt blieb hier aus. Auch nach einer Behandlung mit 100 μM H_2O_2 blieb der Zellschicht vollständig intakt (siehe auch Abbildung 34)

Bei den Zellen vieler Spender war, neben einem signifikanten Rückgang der osteogenen Differenzierung, eine gleichzeitig auftretende und mit höheren H_2O_2 -Konzentrationen proportional ansteigende adipogene Differenzierung zu beobachten (Abbildung 35). Dieser Effekt trat sowohl bei den Responder- als auch den Nonresponderzellen auf. Bei Letzteren jedoch nur in stark abgeschwächter Form, kongruent mit dem reduzierten osteogenen Differenzierungspotential. Um die adipogene Differenzierung darzustellen, wurden die Zellen mit Ölrot gefärbt.

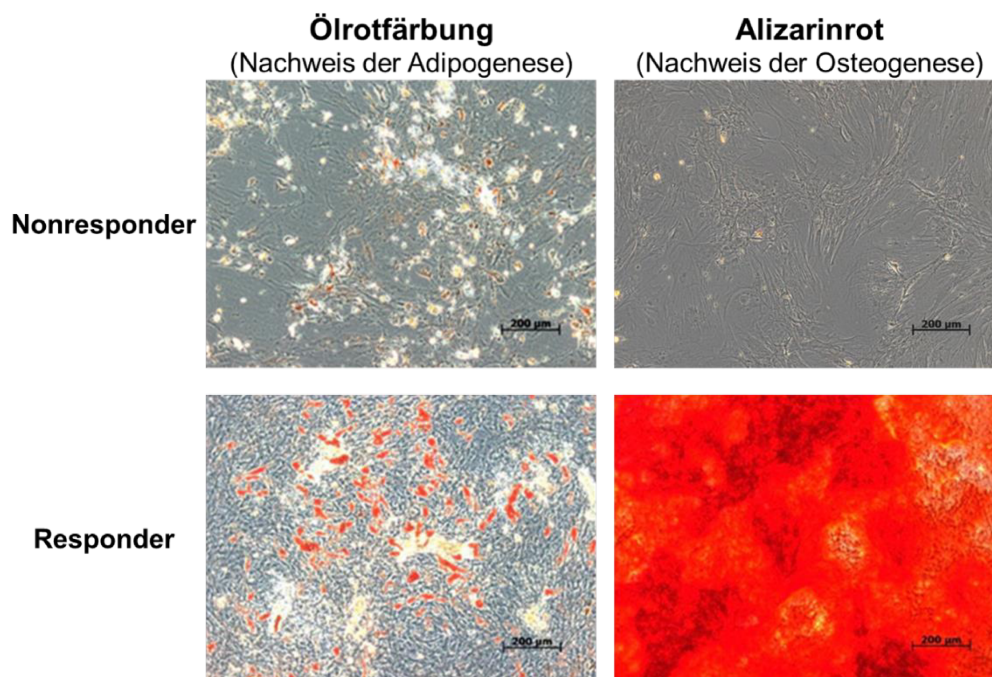


Abbildung 35: Auswirkung einer H_2O_2 -Behandlung auf die Osteogenese. Gezeigt wird hier die adipogene und osteogene Differenzierung der Nonresponder- und Responderzellen nach 3-wöchiger Inkubation in 50 μM H_2O_2 -haltigem osteogenem Differenzierungsmedium.

Ebenso wie die Alizarinrot S-Färbung wurde auch die Ölrotfärbung zurückgelöst und damit das Ausmaß der adipogenen Differenzierung quantifiziert. Abbildung 36 und 37 zeigen die Quantifizierung des gebundenen Alizarinrot S und des in die Fettvakuolen eingelagerten Ölrot. H_2O_2 -Konzentrationen von 50 μM und mehr führten zu einer signifikanten Reduktion des in die zelluläre Matrix eingelagerten Kalziums, gleichzeitig aber zu einem Anstieg der adipogenen Differenzierung und damit der Ein-

lagerung von Fettsäuren in zelluläre Vakuolen, an welche Ölrot bindet. Dieser Effekt war jedoch nur bei den Responderzellen signifikant ausgeprägt. Die Nonresponderzellen zeigten keine oder nur eine sehr schwache Reaktion.

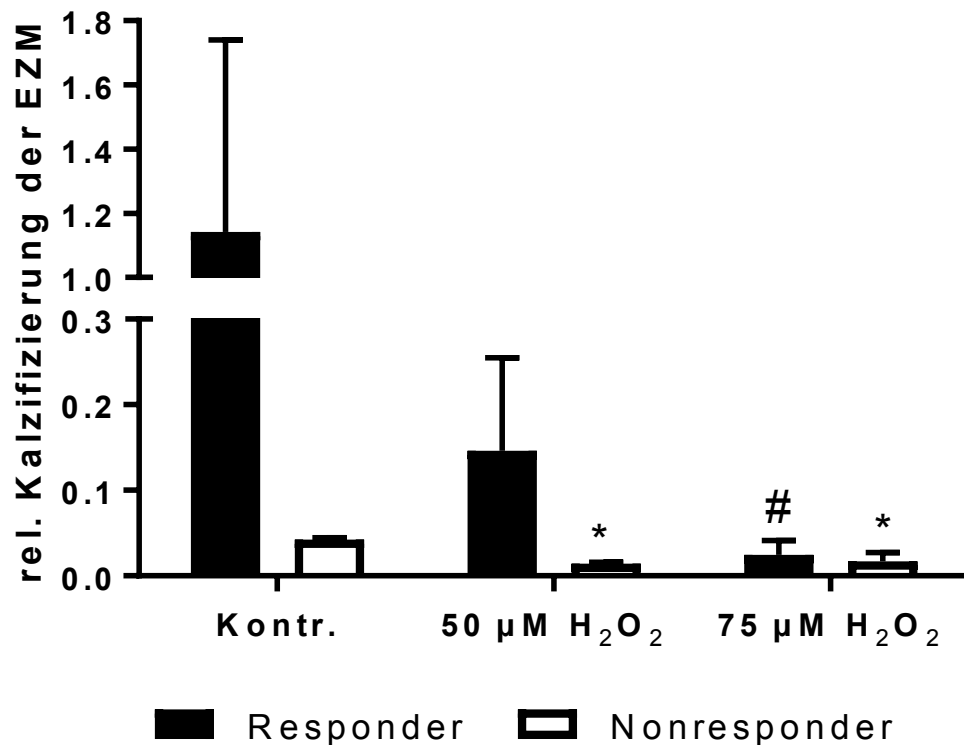


Abbildung 36: Einfluss von H₂O₂ in verschiedenen Konzentrationen auf die Osteogenese von ASCs. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Dadurch kann hier die Fähigkeit der Zellen, welche in osteogenem Differenzierungsmedium mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen inkubiert werden, eine kalzifizierte Matrix zu bilden, quantitativ bestimmt werden. EZM: extrazelluläre Matrix; *: p ≤ 0,05, signifikant gegen Responderzellen; #: p ≤ 0,05, signifikant gegen Kontrolle (Kontr.); n=3.

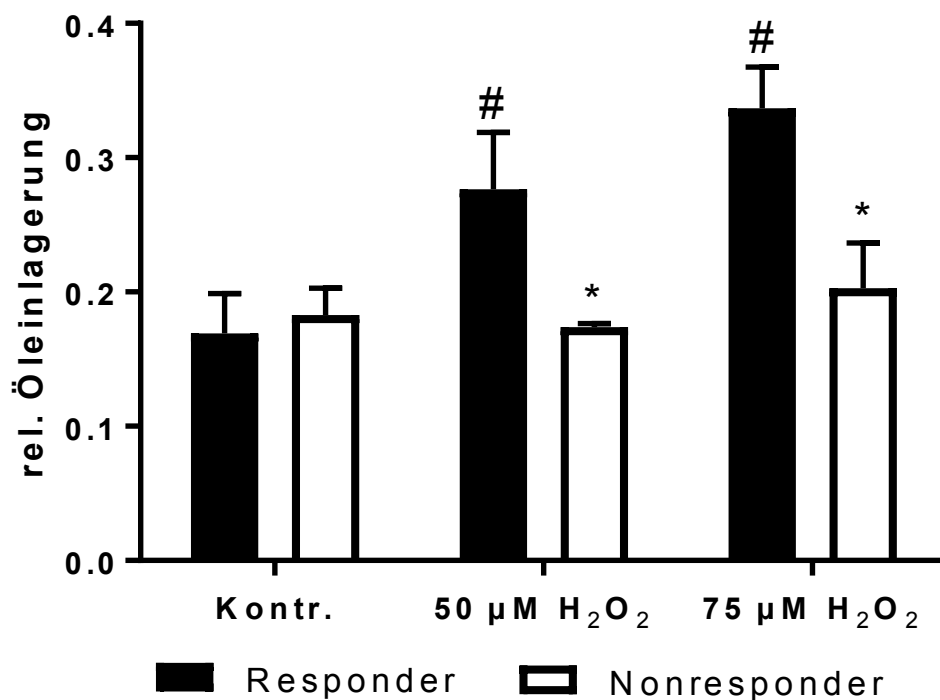


Abbildung 37: Einfluss von H₂O₂ in verschiedenen Konzentrationen auf die Adipogenese von ASCs nach osteogener Differenzierung. Quantifizierung der adipogenen Differenzierung anhand der Absorption des zurückgelösten Farbstoffes Ölrot bei 540 nm nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung in Gegenwart von H₂O₂ * p ≤ 0,05, signifikant gegen Responderzellen; #: p ≤ 0,05, signifikant gegen Kontrolle (Kontr.); n=3.

Um auch die Auswirkungen einer intrazellulären Steigerung der ROS-Produktion auf die Osteogenesefähigkeit der Zellen zu untersuchen, inkubierten wir die ASCs in osteogenem Differenzierungsmedium. Zeitgleich wurden die Zellen täglich mit verschiedenen Dosen UVA bestrahlt (siehe auch Kapitel 3.8.2). Ähnlich wie bei der Behandlung der Zellen mit H₂O₂ kam es mit steigenden UVA-Dosen ebenfalls zu einer Verringerung des osteogenen Differenzierungspotentials. Die Neigung der Zellen, statt osteogen, adipogen zu differenzieren, nahm in den Responderzellen mit steigender Bestrahlungsdosis immer weiter zu, die Nonresponderzellen zeigten keine signifikant darzustellenden Unterschiede in ihrem Differenzierungsverhalten: Die Fähigkeit, Kalzium in die Extrazelluläre Matrix einzulagern, änderte sich ebenso wenig wie die Zahl der gebildeten Fettvakuolen (Abbildung 38).

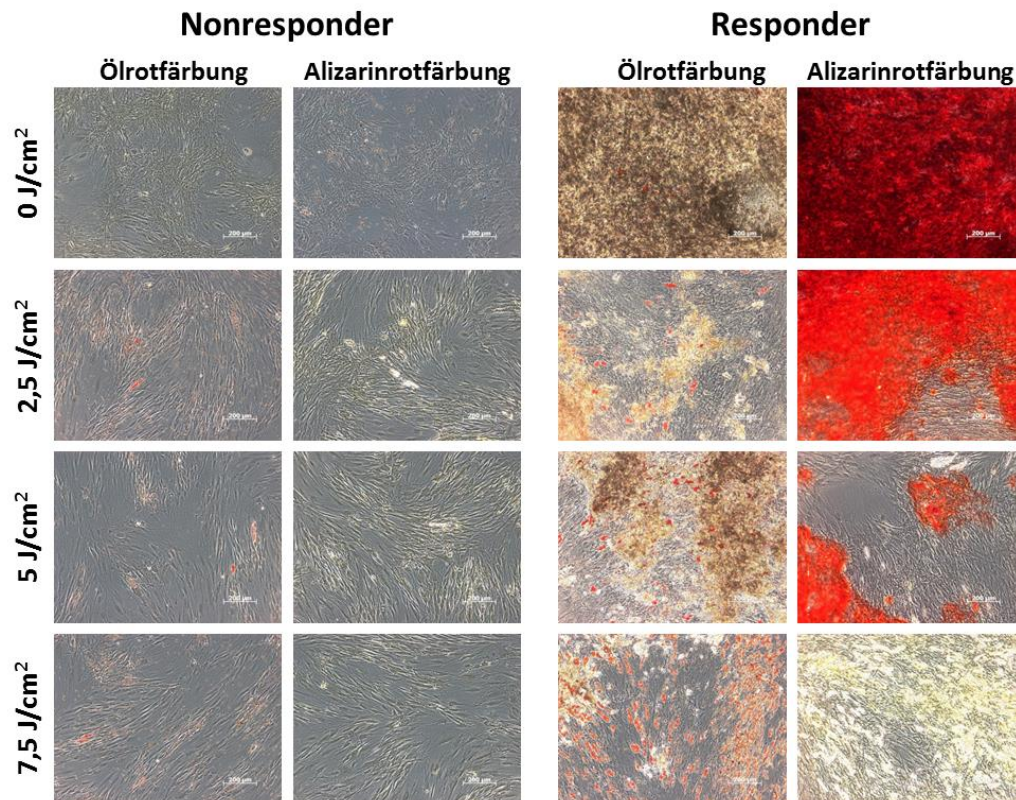


Abbildung 38: Auswirkung von UVA in verschiedenen Dosen auf die Osteogenese. Fotografische Dokumentation der Ergebnisse der Färbung von Responder- und Nonresponderzellen nach kombinierter osteogener Differenzierung und Bestrahlung mit UVA in verschiedenen Dosen.

Abbildung 39 zeigt die Menge des in die extrazelluläre Matrix der Zellen eingelagerten Kalziums. Mit zunehmender Erhöhung der Bestrahlungsdosis nahm die Fähigkeit der Responderzellen, osteogen zu differenzieren, immer weiter ab. Die Nonresponderzellen zeigten hinsichtlich der Kalzifizierung der EZM keinerlei Reaktion.

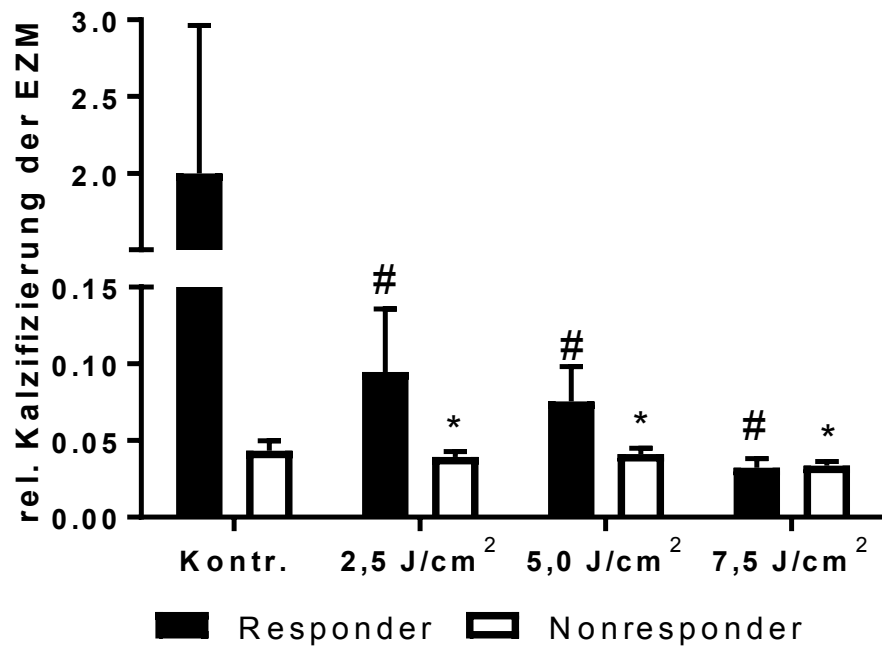


Abbildung 39: Einfluss von UVA in verschiedenen Dosen auf die Osteogenese von ASCs. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Dadurch kann hier die Fähigkeit der Zellen, welche in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert werden, während einer regelmäßigen UVA-Bestrahlung eine kalzifizierte Matrix zu bilden, quantitativ bestimmt werden. EZM: extrazelluläre Matrix; *: $p \leq 0,05$, signifikant gegen Responderzellen; #: $p \leq 0,05$, signifikant gegen Kontrolle (Kontr.); $n=3$.

Abbildung 40 zeigt die Quantifizierung der in den Zellen entstandenen Fettvakuolen. Während die unbestrahlten Responderzellen nur sehr wenige Fettvakuolen aufwiesen, nahm die Zahl der Fettvakuolen mit steigenden Bestrahlungsdosen immer stärker zu. Im gleichen Maße nahm die Fähigkeit der Zellen, osteogen zu differenzieren, ab. Bei den Nonresponderzellen waren keine signifikanten Änderungen in der Ausprägung der adipogenen Differenzierung messbar.

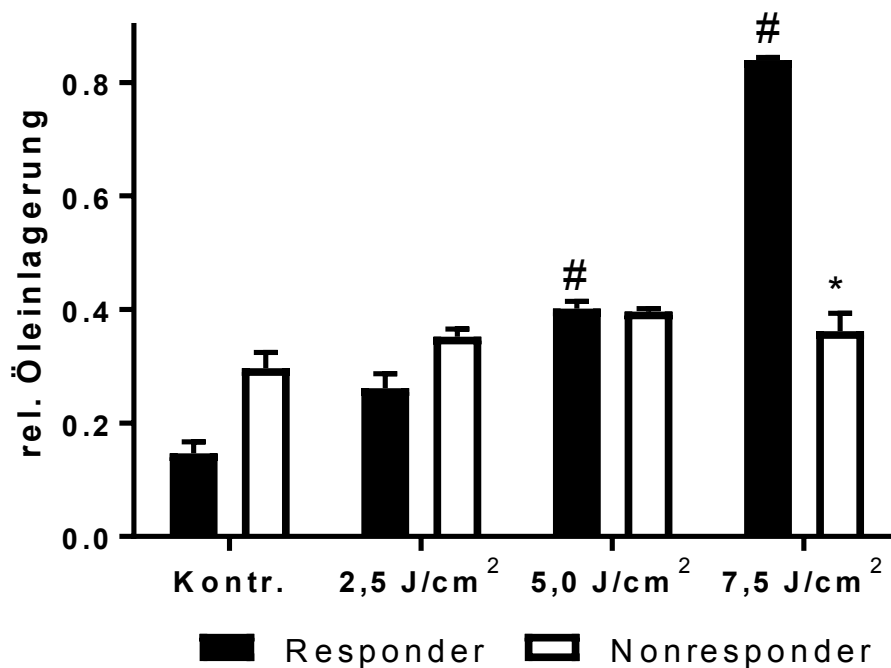


Abbildung 40: Einfluss von UVA in verschiedenen Dosen auf die Adipogenese von ASCs nach osteogener Differenzierung. Detektion der Stärke der adipogenen Differenzierung, gemessen an der Menge der anfärbbaren Ölvakuolen in den Zellen. Der Farbstoff Ölrot wird in die Fettvakuolen eingelagert und kann mittels Isopropanol zurückgelöst werden. Die Absorption des zurückgelösten Farbstoffes kann anschließend bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden. Dies ermöglicht die Quantifizierung der von den Zellen gebildeten Fettvakuolen nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung bei gleichzeitiger regelmäßig durchgeführter UVA-Bestrahlung *: $p \leq 0,05$, signifikant gegen Responderzellen; #: $p \leq 0,05$, signifikant gegen Kontrolle (Kontr.); $n=3$.

4.4.1 Osteogene Differenzierung unter Zugabe verschiedener Antioxidantien

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden überprüft, ob durch ein gezieltes Senken der Reaktiven Sauerstoffspezies durch den Einsatz von Antioxidantien, die Osteogenese der Zellen verbessert und die Verschiebung in Richtung Adipogenese gehemmt werden kann. Dafür wurden die Zellen zusätzlich zum osteogenen Differenzierungsstimulus mit verschiedenen Antioxidantien behandelt. Es wurden die Antioxidantien Trolox, Glutathion, NAC und Katalase eingesetzt. Die Behandlung der Zellen mit Trolox zeigte keinerlei Effekte. Auch die Behandlung der Zellen mit Glutathion und NAC zeigte keine signifikanten Auswirkungen. Wurden die Zellen jedoch mit Katalase behandelt, so lagerten die Nonresponderzellen signifikant mehr Kalzium in ihre Matrix ein, als die nur mit osteogenem Dif-

ferenzierungsmedium behandelten Responderzellen. Die Responderzellen, die gleichzeitig mit Katalase inkubiert wurden, lagerten ebenfalls signifikant mehr Kalzium ein als die Responderzellen, die ohne Antioxidantien oder mit einem der anderen Antioxidantien behandelt wurden. Es gab bei den Zellen, die entweder nicht mit einem Antioxidanz oder mit NAC, Glutathion oder Trolox behandelt wurden, einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Kalzifizierung der EZM von Responder- und Nonresponderzellen. Wurden die Zellen jedoch gleichzeitig mit Katalase behandelt, so war der Unterschied zwischen Responder- und Nonresponderzellen nicht mehr signifikant (Abbildung 41 und 42).

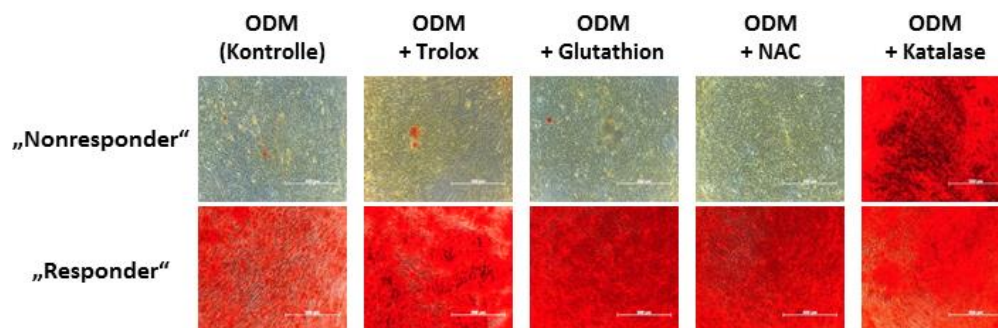


Abbildung 41: Alizarinrot-S-Färbung der Nonresponder- und Responderzellen nach Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium (ODM) und der Zugabe verschiedener Antioxidantien.

Abbildung 42 zeigt die indirekte Quantifizierung der kalzifizierten Matrix durch die Rücklösung des Alizarinrot S-Farbstoffs. Wurden die Zellen ausschließlich mit osteogenem Differenzierungsmedium oder Differenzierungsmedium mit Trolox behandelt, so bestand ein hoch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Quantität des eingelagerten Kalziums zwischen Responder- und Nonresponderzellen. Die Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium und den Antioxidantien NAC, Glutathion oder Ascorbat zeigten keinen Effekt auf die osteogene Differenzierung, so dass der signifikante Unterschied zwischen Responder- und Nonresponderzellen bestehen blieb. Die Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium und Katalase hob diesen signifikanten Unterschied auf. Ferner war die osteogene Differenzierung nach Zugabe von Katalase signifikant gegenüber den Zellen erhöht, die nur mit Differenzierungsmedium behandelt wurden. Dies traf sowohl auf die Responder- als auch auf die Nonresponderzellen zu.

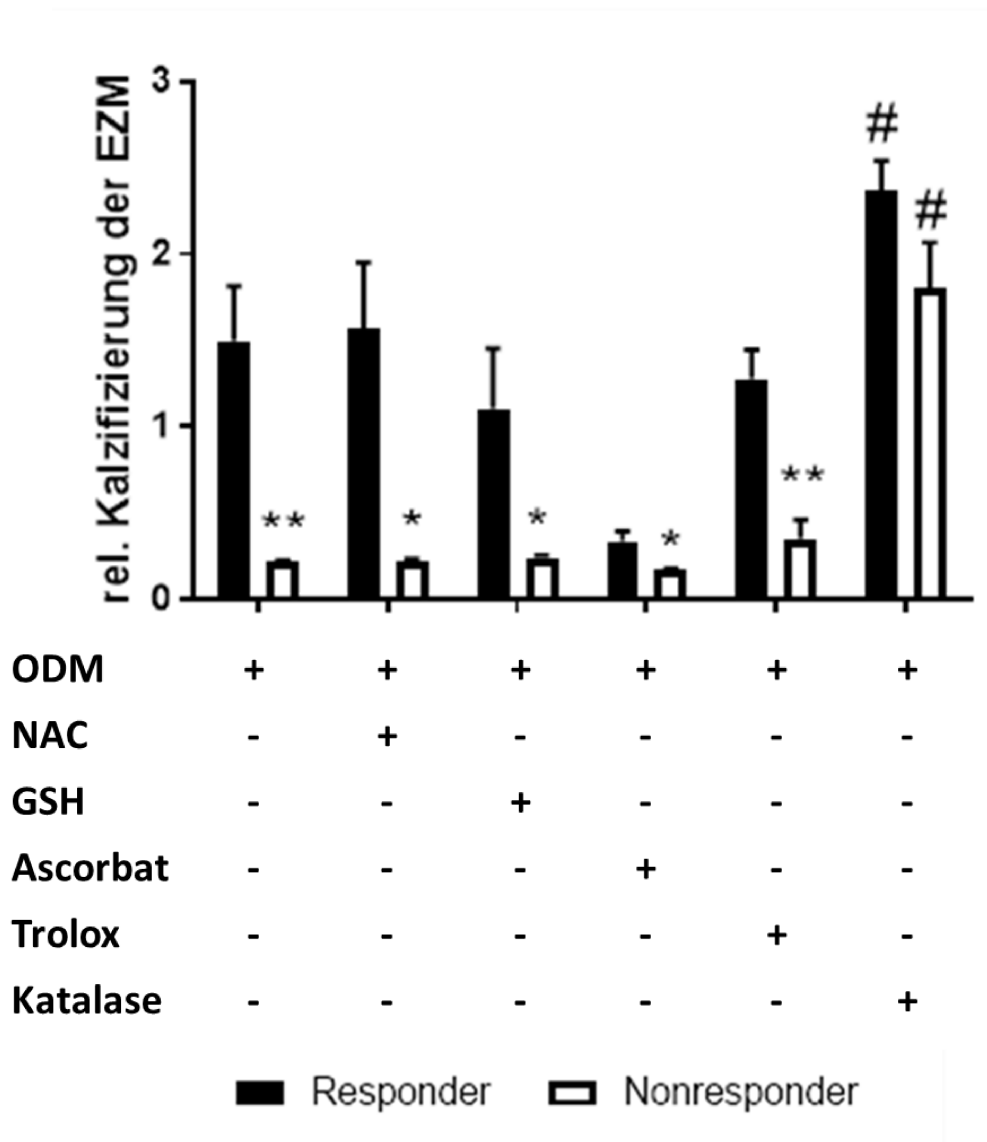


Abbildung 42: Quantifizierung der Kalzifizierung der EZM nach osteogener Differenzierung unter Anwesenheit verschiedener Antioxidantien. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Dadurch können die Auswirkungen verschiedener Antioxidantien in Kombination mit osteogenem Differenzierungsmedium (ODM) auf die Fähigkeit der Zellen, eine kalzifizierte Matrix zu bilden, gemessen werden. n=3, * signifikant gegen Responderzellen; ODM: osteogenes Differenzierungsmedium* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; # signifikant gegen die ODM-Kontrolle # $p \leq 0,05$, n=3

Mittels Western Blot wurde die zelluläre Katalasekonzentration im Verlauf der osteogenen Differenzierung von Responder- und Nonresponderzellen bestimmt (Abbildung 43). In beiden Zelltypen stieg die Katalasetranslation nach Beginn der Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium an. Die Katalasetranslation in den Responderzellen war an Tag 12 am höchsten und damit zu dem Zeitpunkt, an welchem auch die Kalzi-

fizierung der EZM einsetzte. Die Translation der Katalase in den Responderzellen nahm danach ab und sank auf einen Wert, der unter dem Ausgangswert an Tag 0 und damit vor Beginn der osteogenen Differenzierung lag. Die in den Nonresponderzellen translatierte Katalase nahm bis zu Tag 12 zu und sank danach nur geringfügig. An Tag 21 war ein signifikanter Unterschied zwischen der Katalaseexpression in den Responder- und den Nonresponderzellen detektierbar.

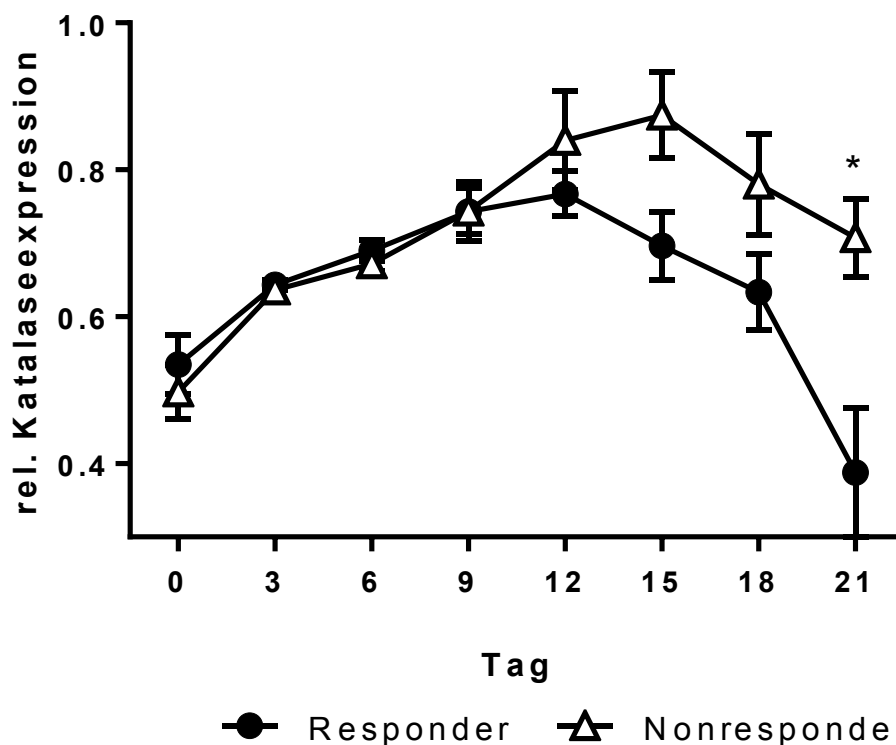


Abbildung 43: Quantifizierung der Katalaseproteinexpression während der osteogenen Differenzierung. *: $p \leq 0,05$, Signifikant gegen Responder, $n=3$

Auch die MnSOD-Translation wurde gemessen. MnSOD liefert der Katalase, die H_2O_2 zu Wasser und molekularem Sauerstoff umsetzt, das Substrat, indem sie aus Superoxidanionen Wasserstoffperoxid generiert. Wie die Katalasetranslation so stieg auch die MnSOD-Translation sowohl in Responder- als auch in Nonresponderzellen bis zum Tag 12 (Responderzellen) beziehungsweise 15 (Nonresponderzellen) nach Beginn der osteogenen Differenzierung an. Nach einer leichten Abnahme an Tag 18 nahm der intrazelluläre MnSOD-Gehalt bis Tag 21 wieder zu, die Quantität in den Nonresponderzellen sank ab Tag 15 hingegen kontinuierlich (Abbildung 44).

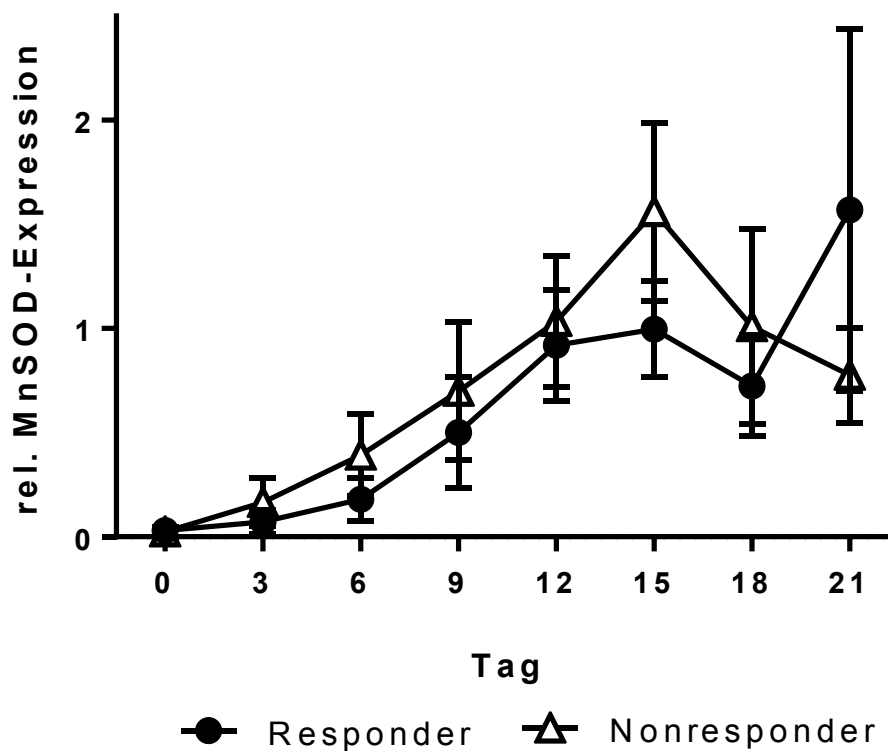


Abbildung 44: MnSOD-Proteinexpression in Responder- und Nonresponderzellen während der Osteogenese. n=3

Die Verläufe der Katalase- und MnSOD-Translation legen nahe, dass beide Enzyme eine wichtige Rolle während der osteogenen Differenzierung spielen, da sie im Verlauf der selben hochreguliert werden. Bei den Responderzellen nimmt die Katalasetranslation nach Tag 12 ab. Ab Tag 12 beginnen die Zellen mit der Bildung einer kalzifizierten extrazellulären Matrix. Mit der Bildung dieser Matrix gilt die Differenzierung als abgeschlossen, das bedeutet, auch Proteine, welche für die osteogene Differenzierung benötigt werden, werden ab diesem Zeitpunkt nicht mehr gebraucht. Dazu passt auch, dass die Nonresponder eine ab Tag 12 gleichbleibende Katalasetranslation zeigen, welche im weiteren Verlauf nicht herunterreguliert wird. In diesen Zellen ist die osteogene Differenzierung noch nicht abgeschlossen. Die Translation der MnSOD hingegen wird ab Tag 15 sowohl in den Responder- als auch den Nonresponderzellen herunterreguliert.

Aufgrund der durch die Katalase hervorgerufenen Effekte auf die osteogene Differenzierung und den Unterschieden auf Proteinebene, sollte nun gezeigt werden, ob die Katalase selbst Auslöser für diese Effekte war, oder ob das Produkt der Katalase, der molekulare Sauerstoff, verantwortlich für diesen Effekt war. Aus diesem Grund wurden Zellen mit katalasehaltigem, osteogenem Differenzierungsmedium behandelt, welchem das Substrat der Katalase, H_2O_2 , in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde. Die dahinterstehende Annahme war, dass eine gesteigerte H_2O_2 -Konzentration der Katalase notwendigerweise auch mehr Substrat liefert. Als Folge davon wird mehr H_2O_2 in O_2 umgewandelt. Ist tatsächlich der Sauerstoff die Ursache für die verbesserte Differenzierung der Zellen, so sollte der positive Effekt auf die Differenzierung mit steigenden H_2O_2 -Konzentrationen immer weiter zunehmen. Wie in Abbildung 45 deutlich zu sehen ist, war ein Anstieg der Matrixkalzifizierung bei den Responder- und Nonresponderzellen, kongruent zur Erhöhung der H_2O_2 -Konzentrationen, signifikant detektierbar.

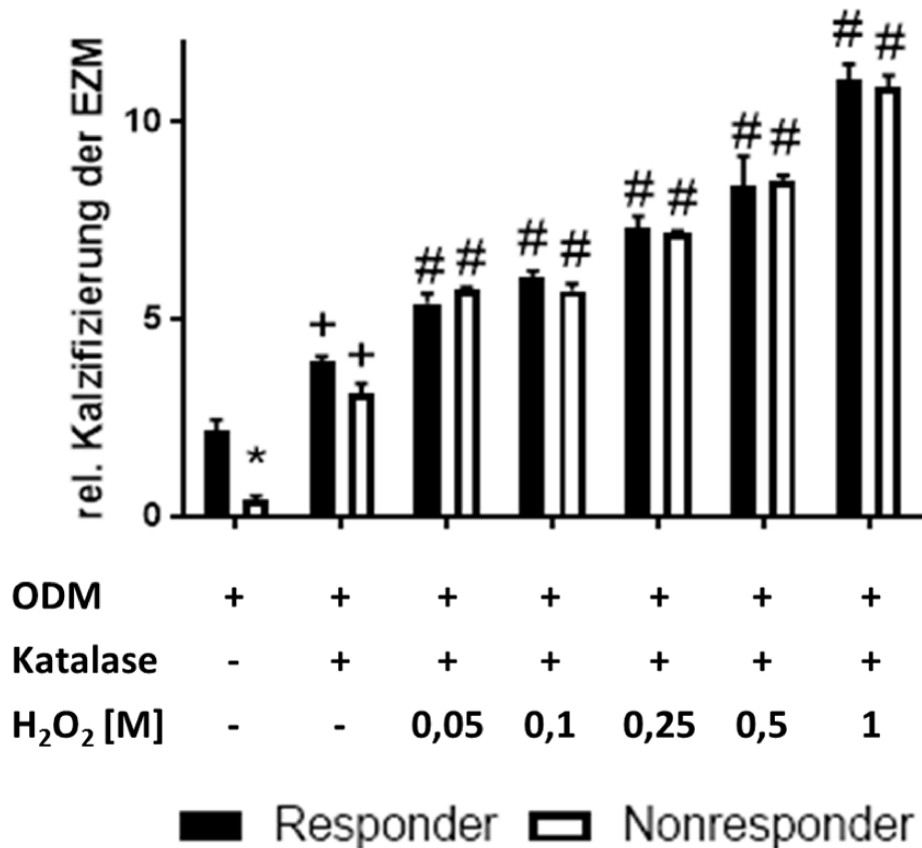


Abbildung 45: Quantifizierung der EZM der Zellen nach Induktion der Osteogenese unter Anwesenheit verschiedener H₂O₂-Konzentrationen und Katalase. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Dadurch können hier die Auswirkungen der Inkubation von ASCs in katalasehaltigem osteogenem Differenzierungsmedium nach Zugabe von Wasserstoffperoxid in verschiedenen Konzentrationen quantitativ bestimmt werden. ODM: osteogenes Differenzierungsmedium; *: $p \leq 0,05$, Signifikanz Responder- gegen Nonresponderzellen; +: $p \leq 0,05$, Signifikanz gegenüber den nur mit ODM behandelten Zellen; #: $p \leq 0,05$, Signifikanz gegenüber den nur mit ODM behandelten Zellen und gegenüber den mit ODM und Katalase behandelten Zellen; n=3

ATA ist ein Inhibitor der Katalase. Wir behandelten die Zellen mit verschiedenen ATA-Konzentrationen, um die Auswirkung einer vollständigen Inaktivierung der Katalase auf die osteogene Differenzierung zu untersuchen. Abbildung 46 zeigt, dass eine Behandlung der Zellen mit verschiedenen ATA-Konzentrationen nicht zu einer Reduktion der osteogenen Differenzierung führte.

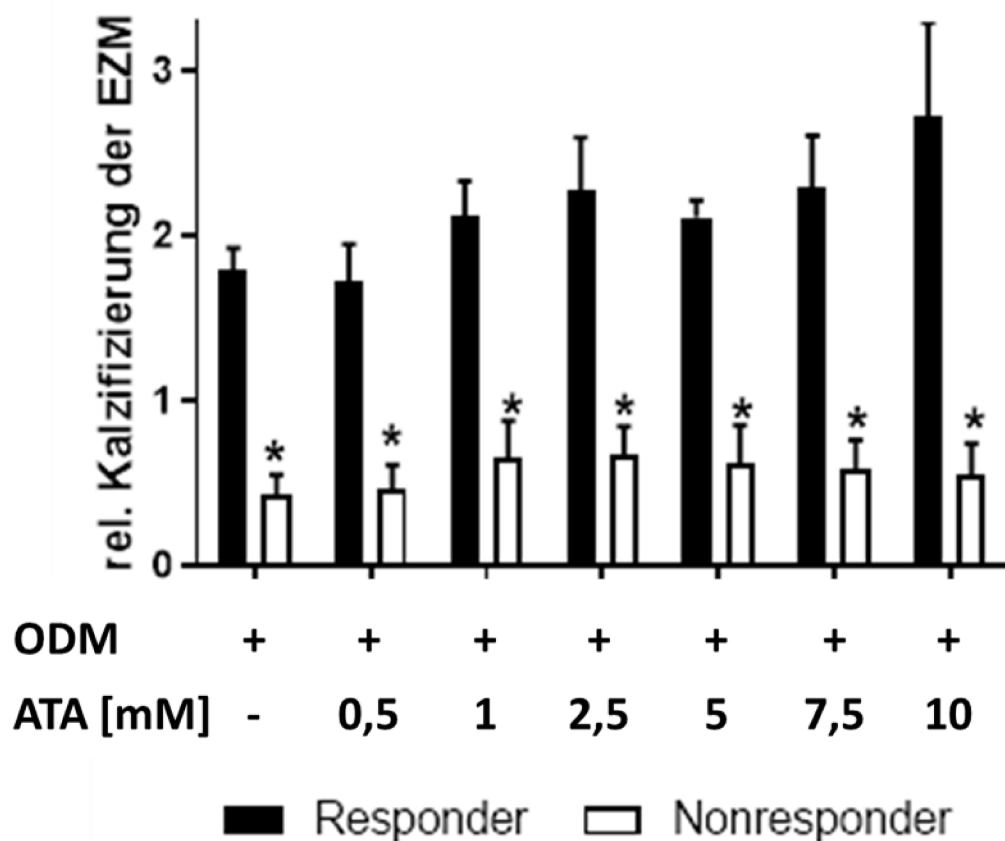


Abbildung 46: Quantifizierung der Kalzifizierung der EZM der Zellen nach Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium und ATA. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Gezeigt wird hier die Auswirkungen einer Behandlung von Responder- und Nonresponderzellen mit verschiedenen ATA-Konzentrationen auf die Fähigkeit der Zellen, Kalzium in ihre extrazelluläre Matrix einzulagern; ODM: osteogenes Differenzierungsmedium * $p \leq 0,05$, Signifikanz Nonresponder gegen Responder, $n=3$

Das in Abbildung 46 gezeigte Ergebnis warf die Frage nach der Funktionsfähigkeit des Katalaseinhibitors ATA auf. Um nachzuweisen, dass der Katalaseinhibitor ATA die Katalase vollständig inhibierte, wurden die Zellen sowohl mit 10 mM ATA als auch mit 500 U/ml Katalase behandelt (Abbildung 47). Außerdem wurden die Zellen mit Thymol behandelt. Thymol war in der von uns eingesetzten Katalaselösung der Firma Sigma Aldrich als Bakterizid und Fungizid beigemischt. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auf das Thymol zurückzuführen waren, wurden die Zellen ebenfalls mit 10 mM Thymol behandelt.

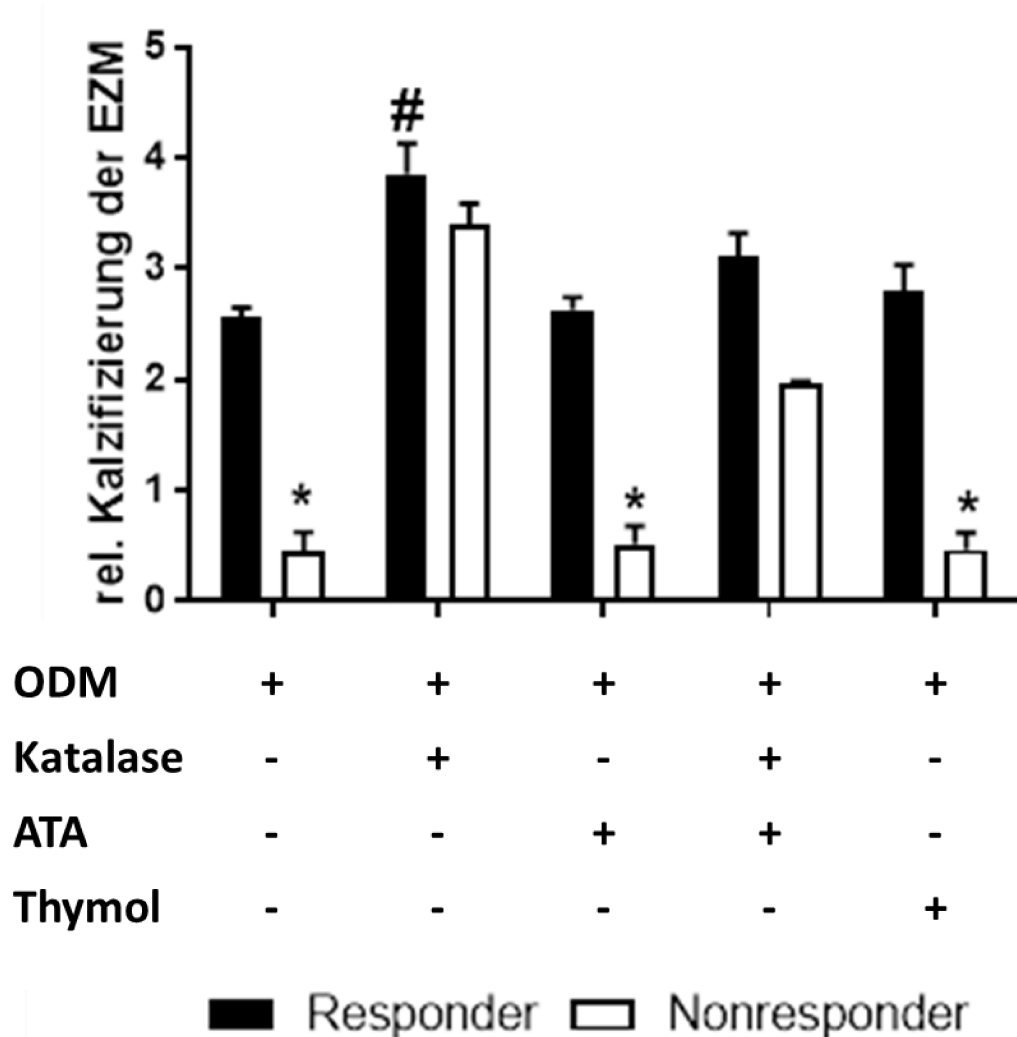


Abbildung 47: Quantifizierung der kalzifizierten Matrix nach osteogener Differenzierung der Zellen unter Zusatz von Katalase, ATA und Thymol. Gezeigt wird hier die indirekte Quantifizierung des von der extrazellulären Matrix der Zellen gebundenen Kalziums. Der Farbstoff Alizarinrot S bindet an das in die extrazelluläre Matrix eingelagerte Kalzium. Durch Rücklösung des Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid (CPC) kann der gebundene Farbstoff durch Messung der optischen Dichte (OD) des Überstandes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden. Gezeigt wird hier die Auswirkung einer Behandlung der Responder- und Nonresponderzellen mit osteogenem Differenzierungsmedium, Katalase, 10 mM ATA, mit einer Kombination aus Katalase und ATA und mit Thymol; ODM: osteogenes Differenzierungsmedium, *: $p \leq 0,05$, Signifikanz Nonresponder gegen Responder, #: $p \leq 0,05$, Signifikanz gegenüber ODM

Abbildung 47 zeigt, dass die Differenzierung von Zellen von Responder- und Nonresponderpatienten weder durch die Zugabe von ATA noch durch die Zugabe von Thymol beeinflusst wird. Eine unveränderte osteogene Differenzierung nach einer kombinierten Zugabe von Katalase und ATA weist nach, dass der Inhibitor ATA die Aktivität der Katalase vollständig hemmte.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zellen mit stammzellähnlichem Charakter aus dem humanen Fettgewebe zu isolieren und die isolierten Zellen hinsichtlich ihres Potentials, in die wichtigsten mesenchymalen Gewebe (Knochen, Knorpel, Fett) zu differenzieren, zu untersuchen. Wie bereits in der Literatur beschrieben, ist dieses Potential von einer Reihe von Faktoren abhängig. Zu den wichtigsten Faktoren zählen sicherlich das Alter der Stammzellspenderin/des Stammzellspenders. Es zeigte sich, dass insbesondere dieser Faktor einen großen Einfluss auf das osteogene Differenzierungsvermögen der Zellen hatte. Aus diesem Grund war das weiterführende Ziel, die molekularen Ursachen für eine mit dem Alter assoziierte Abnahme des osteogenen Differenzierungspotentials zu ermitteln und darauf aufbauend Ansätze zu entwickeln, wie dieser Reduktion des Differenzierungspotentials mit zunehmendem Alter entgegengewirkt werden kann.

Um die Eigenschaften der von uns isolierten Zellen zu ermitteln, charakterisierten wir die Zellen zunächst entsprechend den Kriterien der ISCT (*International Society for Cellular therapy*). Diese fordert, dass die Zellen, die als mesenchymale Stammzellen definiert werden, unter Standardkulturbedingungen plastikadhärent werden und die Marker CD105, CD73 und CD90 exprimieren, während sie negativ für die Marker CD 45, CD 34, CD 14 oder CD11b, CD79 α oder CD 19 und HLA-DR sind. Die geforderte Plastikadhärenz wurde bereits während der Isolation sichergestellt, da die Zellen über ihre Fähigkeit, plastikadhärent zu werden, von den anderen Zellen der stromal vaskulären Fraktion getrennt wurden (Abbildung 8). Die Expression einiger der wichtigsten Marker zum Nachweis der mesenchymalen Stammzellidentität, insbesondere CD26, CD29, CD44 und CD105 zeigten jedoch nur durchschnittlich 50 % der Zellen (Abbildung 9). Dies ist damit erklärbar, dass die von uns isolierten Zellen aus adultem, menschlichem Gewebe isoliert wurden und dementsprechend teilweise bereits vorinduziert waren. Auch könnte das teilweise bereits fortgeschrittene Alter der Stammzellspenderinnen und –spender zu einer Reduktion des Stammzellpotentials führen. Die Marker CD13 und

CD90 wurden von annähernd 100 % der isolierten Zellen exprimiert. Aufgrund dieser Daten wird in der vorliegenden Arbeit auch nicht von mesenchymalen Stammzellen, sondern von Zellen einer stromal vakulären Fraktion ausgegangen. Im Gegensatz zu einer reinen, mesenchymalen Stammzellpopulation weist die stromal vakuläre Fraktion auch hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, Endothelzellen, Erythrozyten, Fibroblasten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Perizyten auf (Cawthorn *et al.*, 2012; Cousin, Andre, Arnaud, Penicaud, & Casteilla, 2003; J. Han *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2006). Auch wurde bereits mehrfach in der Literatur gezeigt, dass fettstämmige Stammzellen eine per se höhere Heterogenität aufweisen, verglichen beispielsweise mit Stammzellen aus dem Knochenmark (Erickson *et al.*, 2002; Gronthos *et al.*, 2001; H. Li *et al.*, 2011; Planat-Benard *et al.*, 2004; Zuk *et al.*, 2002; Zuk *et al.*, 2001). Nur weniger als zwei Prozent der von uns isolierten Zellen zeigten die Expression der Oberflächenantigene CD31, ALK3 und ALK6. CD31 und CD45 sind klassische Endothelzellmarker (Abbildung 9). Wir konnten zeigen, dass die Zellen zu weniger als 2 % positiv für CD31 und CD45 waren, sodass die von uns isolierte Stammzellfraktion als endothelzellular bewertet werden kann. CD34 gilt als endothelialer- und als hämatopoetischer Zellmarker. Auch für CD34 waren die Zellen zu weniger als 2 % positiv. Durch den Nachweis, dass die Zellen auch für CD14 und CD19 negativ waren, wurde sichergestellt, dass auch Monozyten und Makrophagen sowie B-Lymphozyten erfolgreich aus der stromal vaskulären Fraktion entfernt wurden (Wang, Wei, & Liu, 2012; Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993).

Die ISCT fordert, neben den oben beschriebenen Kriterien Plastikadhärenz und dem für mesenchymale Stammzellen als charakteristisch definierten Antigenmuster, eine Differenzierbarkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten (Dominici *et al.*, 2006). Wir konnten die Fähigkeit der Zellen nachweisen, osteogen, chondrogen und adipogen zu differenzieren (Abbildung 10 - 20).

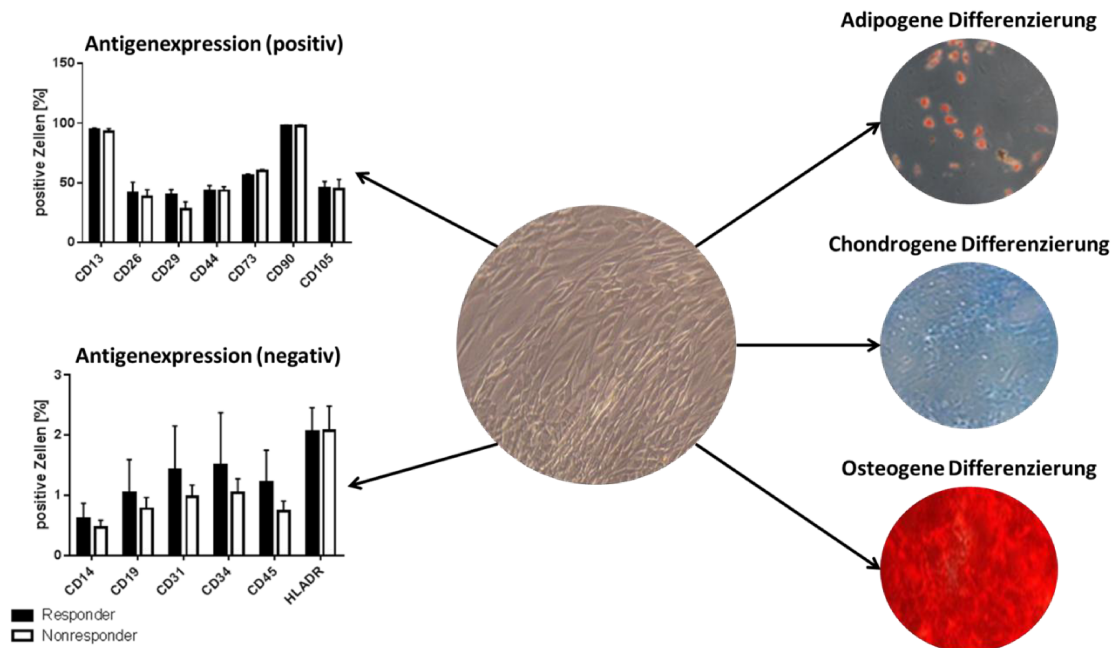


Abbildung 48: Verifizierung des stammzellähnlichen Charakters der isolierten Zellen. Der stammzellähnliche Charakter der aus dem Fettgewebe isolierten Zellen wurde den Kriterien der ISCT folgend, überprüft. Die geforderte Plastikadhärenz wurde bereits durch die Art der Isolation sichergestellt. Das Antigenexpressionsmuster zeigte, dass eine Mehrzahl der Zellen positiv für CD13, CD26, CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 und negativ für CD14, CD19, CD31, CD34, CD45 und HLADR war. Auch war eine Differenzierung der Zellen in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung möglich.

Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass mehrfache Passagierung zu einer zellulären Seneszenz und einer Abnahme des Stammzellcharakters führt (Choi *et al.*, 2015; Hayflick, 1965). Ob und ab wann sich Passagierungen negativ auf das Differenzierungsverhalten der von uns isolierten Zellen auswirkten, untersuchten wir durch Differenzierung der Zellen in den Passagen drei und zehn. Dabei wurden die Auswirkungen einer zehnfachen Passagierung sowohl auf die osteogene als auch auf die chondrogene und adipogene Differenzierung überprüft.

Die Adipogenese wurde durch die Ölrot-Färbung nachgewiesen (Abbildung 10). Da ausdifferenzierte Adipozyten jedoch häufig ihre Adhärenz verlieren, ist dieser Nachweis nur über einen kurzen Zeitraum anwendbar, da durch das Ablösen der ausdifferenzierten Zellen das Ergebnis fälschlicherweise nach unten korrigiert wird. Dies zeigt sich auch bei der Quantifizierung des gebundenen Ölrot (Abbildung 11). Die Menge an zurückgelöstem Ölrot stieg bei Zellen aus Passage drei bis zum Tag 14 an, anschließend nahm die Menge des gebundenen Ölrotes ab, was auf

den zuvor beschriebenen Verlust der ausdifferenzierten Zellen zurückzuführen ist. Die Zellen in Passage 10 zeigten bis Tag 14 eine signifikant reduzierte Adipogenese, verglichen mit den Zellen, die sich in Passage drei befanden. Erst an Tag 21 war kein Unterschied zwischen den Zellen aus den beiden Passagen detektierbar, wobei aber berücksichtigt werden muss, dass sich viele in Passage drei befindlichen Zellen zu diesem Zeitpunkt aufgrund der nachlassenden Plastikadhärenz bereits abgelöst hatten, und die Menge des rücklösbaren Ölrotes deshalb gegenüber Tag 14 reduziert war. Dies bestätigt Angaben aus der Literatur, wonach bereits Zellen in Passage fünf und sieben eine signifikante Reduktion des adipogenen Differenzierungspotentials aufwiesen (Lo Surdo, Millis, & Bauer, 2013). Bereits vor Beginn der adipogenen Differenzierung war eine tendenziell höhere Bildung von Fettvakuolen bei Zellen aus Passage drei detektierbar, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass sich in der adipogenen Stromazellfraktion noch Präadipozyten befinden, welche ausdifferenzieren können (S. Han, Sun, Hwang, & Kim, 2015). Diese werden jedoch mit zunehmender Passagierung herausselektiert, da sie nach erfolgter Differenzierung nicht adhärent bleiben und bereits als Präadipozyten nicht mehr teilungsfähig sind. Demzufolge ist eine erhöhte Präadipozytenzahl in Passage drei gegenüber Passage zehn zu erwarten.

Die erfolgreiche Chondrogenese wurde mittels Alcianblau-Färbung verifiziert (Abbildung 12). Alcianblau bindet an Glucosaminoglycane, welche spezifisch für die chondrogene Matrix sind (Aleksander-Konert, Padaszynski, Zajdel, Dzierzewicz, & Wilczok, 2016). Bereits 2013 konnten Lee *et al.* eine Abnahme der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen des Hundes nach mehrmaliger Passagierung zeigen (Lee *et al.*, 2013). Wir konnten zwar zeigen, dass die Menge an gebundenem Alcianblau sowohl bei Zellen aus Passage drei als auch bei Zellen aus Passage zehn stetig anstieg, einen signifikanten Unterschied zu Zellen der zehnten Passage konnten wir jedoch erst an Tag 21 nachweisen (Abbildung 13).

Die Osteogenese wurde mittels Alizarinrot S-Färbung nachgewiesen (Abbildung 15). Alizarinrot bindet an Kalzium und weist damit den

Endpunkt der Osteogenese nach, an welchem Kalzium in die extrazelluläre Matrix eingelagert wird (Danti *et al.*, 2013). Die Kalzifizierung der EZM stieg sowohl bei Zellen in Passage drei als auch bei denen in Passage zehn über die dreiwöchige osteogene Differenzierung kontinuierlich an. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Kalzifizierung der EZM von Zellen aus Passage zehn bis zum 14. Tag stärker ausgeprägt war, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine signifikant unterschiedliche EZM-Kalzifizierung trat erst an Tag 21 auf, wobei hier jedoch die Kalzifizierung der EZM von Zellen aus Passage drei signifikant höher war (Abbildung 16). Da erst hier eine Signifikanz auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede in den ersten Tagen auf spenderspezifische Schwankungen zurückzuführen sind, die Osteogenesefähigkeit der Zellen aus Passage zehn jedoch reduzierter ist, weshalb mit fortschreitender Dauer der Differenzierung die Zellen aus Passage drei mehr Kalzium einlagern können, während die Kalziumeinlagerung in die zelluläre Matrix der Zellen in Passage zehn immer stärker stagniert. Eine abnehmende Osteogenesefähigkeit der Zellen mit zunehmender Passagierung wurde auch in der Literatur bereits mehrfach gezeigt (Elkhenany, Amelse, Caldwell, Abdelwahed, & Dhar, 2016).

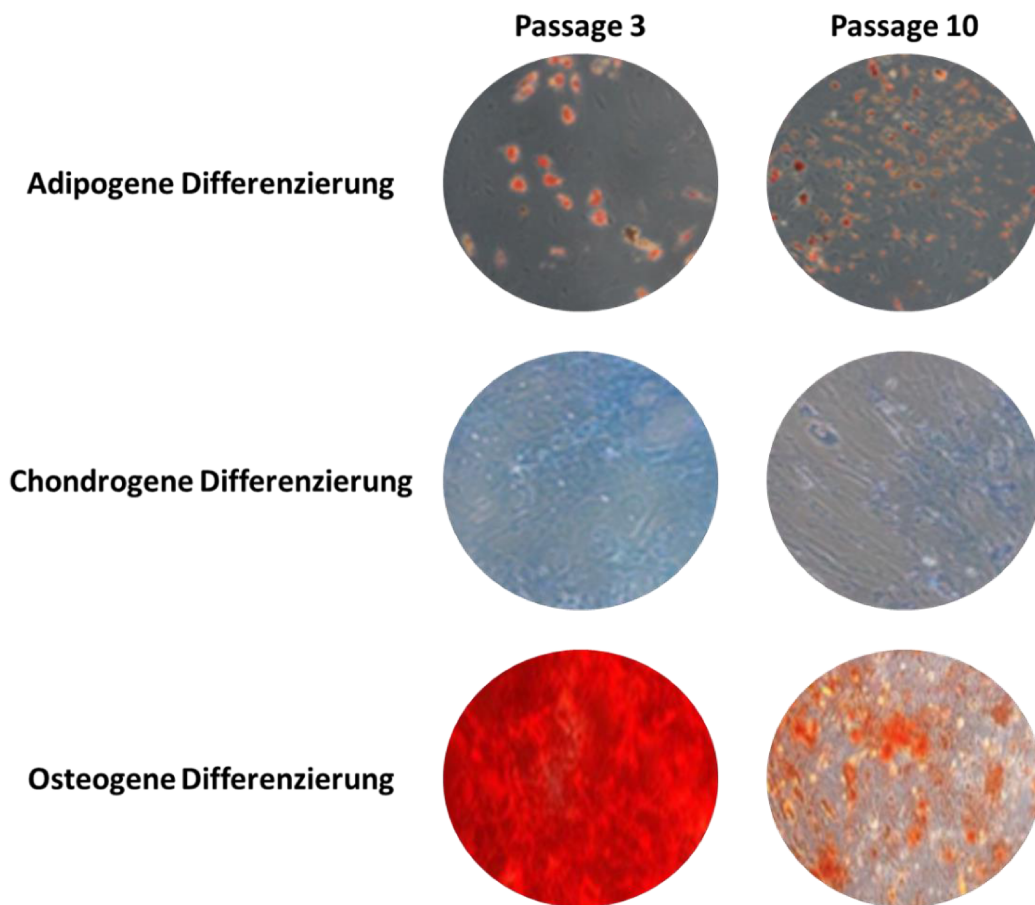


Abbildung 49: Differenzierung der ASCs in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung in einer frühen und einer späten Passage. Die isolierten Zellen wurden sowohl in einer frühen (Passage 3) als auch einer späten (Passage 10) differenziert. Dabei zeigte sich bereits nach der Färbung der Zellen mit einem die jeweilige Differenzierung nachweisenden Farbstoff, dass das Differenzierungspotential mit zunehmender Passagierung abnahm. Während die Ölrotfärbung nach adipogener Differenzierung zeigte, dass die Fettvakuolen in Passage 10 deutlich kleiner blieben und nicht mehr verschmolzen, zeigte die Alcianblaufärbung nach chondrogener Differenzierung, dass die glykogenisierte Matrix bei den Zellen in Passage 10 deutlich weniger stark ausgeprägt war. Die Alizarin S Färbung nach osteogener Differenzierung zeigte eine deutlich schwächer ausgeprägte Kalzifizierung der EZM der Zellen in Passage 10.

Im Gegensatz zur adipogenen und chondrogenen Differenzierung war es hier notwendig, zwischen Responder- und Nonresponderzellen zu unterscheiden. Die Zellen einiger Spender, die ansonsten alle stammzell-spezifischen Merkmale aufwiesen, wiesen eine starke Reduktion der Bildung kalzifizierter Matrix auf (Abbildung 14). Für die Versuche wurden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Passagen drei und zehn zu gewährleisten, deshalb ausschließlich Zellen von Spendern verwendet, welche in Passage drei eine gute Differenzierungskapazität aufwiesen.

Als weiterer Marker für die Osteogenese wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase, einem Markerenzym der Osteogenese, nachge-

wiesen (Siffert, 1951) (Abbildung 17). Allerdings ist eine Grundaktivität der alkalischen Phosphatase auch in undifferenzierten Zellen nachweisbar, da sie verschiedene Funktionen im zellulären Stoffwechsel hat (Lowe & John, 2017). Unsere Messungen zeigten, dass Zellen der Passage drei im undifferenzierten Zustand eine tendenziell höhere alkalische Phosphataseaktivität aufweisen, verglichen mit Zellen aus Passage zehn. Ab Tag sieben der osteogenen Differenzierung ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase der Zellen der zehnten Passage signifikant niedriger, verglichen mit der Messung in Zellen in Passage drei, was ebenfalls auf ein verringertes osteogenes Differenzierungspotential von Zellen nach erfolgter, mehrmaliger Passagierung hindeutet. Die alkalische Phosphataseaktivität der Zellen aus Passage drei stagnierte ab Tag 14, während die der Zellen aus Passage zehn bis zu Tag 21 weiter anstieg und an Tag 21 ein Aktivitätsniveau erreichte, welches denen der Zellen aus Passage drei entsprach. Dies zeigt, dass die Zellen nach mehrmaliger Passagierung keinesfalls ihre osteogene Differenzierungskapazität verlieren, die dafür nötigen Signalwege jedoch erst nach einiger Verzögerung eingeschaltet werden und langsamer ablaufen. Der Aktivitätsanstieg bis zur zweiten Woche mit anschließender Stagnation oder Abnahme wurde bereits mehrfach in der Literatur gezeigt (Arpornmaeklong, Brown, Wang, & Krebsbach, 2009)

Eine Verzögerung des Einsetzens der osteogenen Differenzierung zeigte auch die Expression der osteogenen Markerproteine Runx2, Osterix und BMP2: Die Runx2-Expression (Abbildung 18) wurde in den Zellen der dritten Passage ab Tag drei hochreguliert und erreichte ihr Maximum an Tag 14. Danach nahm die Expression wieder ab. In den bis Passage zehn passagierten Zellen stieg die Runx2-Expression zwischen Tag neun und zwölf an und stagnierte ab Tag 15. Dabei erreichte das Expressionsniveau nie das der Zellen aus Passage drei. Eine Veränderung der Osterixexpression während der osteogenen Differenzierung war weder bei den Responder- noch bei den Nonresponderzellen detektierbar (Abbildung 19). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Osterix *in vivo* vor allem den Differenzierungsweg der Osteochondroprogenitorzelle hin zum Osteoblasten reguliert (Franceschi *et al.*, 2007). Da wir die Zellen jedoch direkt aus mesenchymalen Stammzellen und nicht über die Zwischendiffe-

renzung zum Chondroblasten differenzierten, ist die Funktion dieses Proteins bei unserer Art der Differenzierung nicht nötig. Dies könnte erklären, weshalb wir keinen Anstieg der Osterixexpression detektieren konnten. Während ein Anstieg der Runx2-Expression zwischen Tag neun und zwölf detektiert wurde, erreichte die BMP2-Expression in den Responder- und Nonresponderzellen bereits am siebten Tag ihr Expressionsmaximum. Danach stagnierte die Expression in den Nonresponderzellen und nahm erst an Tag 21 wieder ab, während die Expression in den Responderzellen nach dem siebten Tag kontinuierlich abnahm (Abbildung 20). Es ist bereits aus der Literatur bekannt, dass BMP2 Runx2 in der Signalkaskade der osteogenen Differenzierung vorgeschaltet ist. Auch verstärkt BMP2 die alkalische Phosphataseexpression (Sun, Li, Li, & Yu, 2015). Ein Anstieg der BMP2-Expression vor Anstieg der alkalischen Phosphatase- und Runx2-Expression war demnach zu erwarten. Während die Expression des BMP2-Precursorproteins in den Responderzellen nach dem siebten Tag sehr schnell abfiel, stagnierte die Expression in den Nonresponderzellen zunächst und fiel erst an Tag 21 leicht ab. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Osteogenese der Nonresponderzellen stark retardiert ist, sodass folglich die erhöhte Translation von BMP2 von der Zelle länger aufrechterhalten wird, bis die auf BMP2-folgenden Proteine in der Signalkaskade ebenfalls hochreguliert worden sind. Das Expressionsprofil des BMP2-Homodimers entsprach dem des Precursorproteines mit dem Unterschied, dass hier die Responderzellen eine stärkere Expression an Tag sieben zeigten, verglichen mit den Nonresponderzellen. Da das Homodimer die eigentliche, aktive Form des BMP2-Proteins darstellt, könnte einer der Gründe, weshalb die Osteogenesefähigkeit der Nonresponderzellen herabgesetzt ist, auch eine nicht ausreichend hergestellte Form der aktiven Form des BMP2-Proteins sein.

Um zu evaluieren, weshalb es, im Gegensatz zur adipogenen und chondrogenen Differenzierung, große spenderabhängige Unterschiede in der osteogenen Differenzierung der Stammzellen einzelner Spender gab, verglichen wir das Spenderalter von Zellen, welche gut osteogen differenzierten (Responder) mit denen von Zellen, welche nur eine sehr reduzierte bis keine Fähigkeit zeigten, eine kalzifizierte Matrix zu bilden (Nonrespon-

der). In diesem Zusammenhang wurde deutlich, dass die ASCs älterer Spender eine signifikant reduzierte osteogene Differenzierungskapazität aufwiesen (Abbildung 21). Dies widerspricht zwar den Befunden von Dufrane, welcher darlegt, dass das Alter der Spender keinen Einfluss auf die osteogene Differenzierungskapazität der Zellen hat (Dufrane, 2017), aber ein abnehmendes Potential mesenchymaler Stammzellen mit zunehmendem Donoralter wurde bereits mehrfach beschrieben (Bruna *et al.*, 2016; Y. Li *et al.*, 2014).

Ein abnehmendes osteogenes Differenzierungspotential ist häufig mit einer Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies assoziiert (Davalli, Mitic, Caporali, Lauriola, & D'Arca, 2016; Liochev, 2013; Tan *et al.*, 2015). Aus diesem Grund maßen wir die ROS-Bildung in Zellen von Responder- und Nonresponderzellspendern. Es zeigte sich, dass Nonresponderzellen eine signifikant höhere ROS-Produktion aufwiesen (Abbildung 22). Misst man die ROS-Expression während der Osteogenese über einen Zeitraum von 20 Tagen so zeigt sich, dass sowohl in den Responder- als auch in den Nonresponderzellen die ROS-Expression zunimmt. Ihren Höhepunkt erreicht sie zu dem Zeitpunkt (zwischen Tag zehn und zwölf), an welchem bei Responderzellen die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix einsetzt (Abbildung 23 und 25). Danach sinkt die ROS-Expression wieder bis auf den Ausgangswert (Abbildung 23). Laut gängigen Literaturangaben führt jedoch ein Anstieg des Gehaltes an Reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Reduktion des osteogenen Differenzierungspotentials (Almeida *et al.*, 2007; Basu, Michaelsson, Olofsson, Johansson, & Melhus, 2001). Ferner zeigten Responder- und Nonresponderzellen eine identische Regulation der ROS-Expression, obwohl die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix bei den Nonresponderzellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht begonnen hat. Die Fähigkeit der Zellen Kalzium zu binden war ab Tag zwölf der osteogenen Differenzierung bei den Nonresponderzellen signifikant geringer als bei den Responderzellen (Abbildung 25 und 26). Neben der sehr ähnlichen und zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlichen ROS-Produktion zeigte auch die Messung der alkalischen Phosphataseaktivität über 22 Tage keinen signifikanten Unterschied zwischen Responder- und Nonresponderzellen (Abbildung 24). Dies legt die Vermutung nahe, dass

weniger die molekularen Prozesse bei den Nonresponderzellen gestört sind, als dass vielmehr die Fähigkeit der Zellen, Kalzium einzulagern bei den Zellen älterer Spender vermindert ist. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb das Osteoporoserisiko bei älteren Patienten deutlich erhöht ist. Auch hier sinkt die Kalzifizierung der Knochen, wodurch die Brüchigkeit zunimmt (Banfi *et al.*, 2008; Lean *et al.*, 2005; Manolagas, 2010).

Um die Effekte reaktiver Sauerstoffspezies auf die osteogene Differenzierung zu evaluieren, wurden die Zellen mit zwei ROS-induzierenden Stimuli behandelt: Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zur externen Applikation von reaktiven Sauerstoffspezies und UVA um die intrazelluläre Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies zu erhöhen. Um die Toleranz der Zellen gegenüber diesen ROS-Induktoren zu ermitteln, wurden zunächst konfluente und nicht konfluente Zellen mit H_2O_2 behandelt. Es zeigte sich, dass die Toleranz der Zellen gegenüber H_2O_2 deutlich höher war, wenn die Zellen bereits eine 100 %ige Konfluenz aufwiesen (Abbildung 28). Während bei nicht konfluent gewachsenen Zellen bereits H_2O_2 -Konzentrationen ab 25 μM zu einer stagnierenden Zellzahl führten (Abbildung 27), wirkten sich bei den konfluent gewachsenen Zellen erst Konzentrationen von 75 μM oder mehr toxisch auf die Zellen aus.

Um zu überprüfen, ob die Toxizität des H_2O_2 (auch) auf die Induktion von Doppelstrangbrüchen zurückzuführen war, wurden die mit H_2O_2 -behandelten Zellen immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen γH2AX gefärbt. Das Histonprotein H2AX wird bei Entstehung eines Doppelstrangbruches phosphoryliert (γH2AX) und ermöglicht die Rekrutierung und Anbindung weiterer DNA-Reparaturproteine an der Bruchstelle (Greve *et al.*, 2012). Durch die Immunfluoreszenzfärbung konnten wir deutlich zeigen, dass es ab einer Konzentration von 75 μM H_2O_2 zum stark gehäuften Auftreten von Doppelstrangbrüchen in allen Zellen kam (Abbildung 29). Als Hauptgrund für die Toxizität von H_2O_2 kann also hier eine irreparable Anhäufung von Doppelstrangbrüchen angenommen werden. Die Induktion von Doppelstrangbrüchen durch Wasserstoffperoxid ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden (Ye *et al.*, 2016).

Die UVA-Bestrahlung von nicht konfluent (Abbildung 30) und konfluent (Abbildung 31) gewachsenen Zellen zeigte, dass die Zellen gegenüber einer induzierten intrazellulären Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies toleranter waren, wenn sie zuvor konfluent gewachsen waren: So waren bei den nicht konfluent gewachsenen Zellen bereits Dosen ab $7,5 \text{ J/cm}^2$ toxisch, während bei konfluent gewachsenen Zellen auch Dosen von 10 J/cm^2 zwar zu einer leichten Abnahme der Proliferation führten, aber nicht toxisch waren. Im Gegensatz zu Greinert *et al.* welche 2012 postulierten, dass UVA-Strahlung zu Doppelstrangbrüchen führt und Cadet und Douki, welche 2018 zeigten, dass UVA-Bestrahlung ausschließlich DNA-Einzelstrangbrüche induziert, konnten wir zeigen, dass nur hohe Dosen von 10 J/cm^2 in vereinzelt Zellen zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen (Abbildung 32) (Cadet & Douki, 2018; Greinert *et al.*, 2012).

Um zu untersuchen, wie sich verschiedene H_2O_2 -Konzentrationen und damit eine exogene ROS-Erhöhung auf die Osteogenese der ASCs auswirkt, wurden die Zellen mit Differenzierungsmedium behandelt, welches H_2O_2 -Konzentrationen von 0 –100 μM enthielt. Überraschenderweise kam es bei der Inkubation der Zellen in Medium, welchem nur geringe H_2O_2 -Konzentrationen zugesetzt waren (5 und 10 μM) zu einem tendenziellen Anstieg der Kalzifizierung der EZM gegenüber den Zellen, welche ohne H_2O_2 -Zusatz differenziert wurden. Konzentrationen ab 25 μM führten zu einer Verringerung der Kalzifizierung der EZM (Abbildung 33 und 34). Kongruent mit steigenden H_2O_2 -Konzentrationen verringerte sich die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix, es kam jedoch zu keinen apoptotischen Ereignissen. Dies steht im Gegensatz zu den Vorversuchen, in welchen H_2O_2 -Konzentrationen ab 75 μM stark toxische Effekte auf die Zellen zeigten. Ab einer H_2O_2 -Konzentration von 50 μM kam es jedoch zu einer Verschiebung von der osteogenen hin zur adipogenen Differenzierung (Abbildung 35). Dies wurde bereits von Atashi *et al.* 2015 beschrieben (Atashi, Modarressi, & Pepper, 2015). Während sich H_2O_2 -Konzentrationen von 50 und 75 μM gleichermaßen hemmend auf die Kalzifizierung der EZM der Zellen auswirkte (Abbildung 36), kam es nur bei den Responderzellen zu einem signifikanten Anstieg der Adipogenese. Der Anteil der adipogen differenzierten Zellen im Rahmen der osteogenen

Differenzierung stagnierte bei den Nonresponderzellen auf dem der Höhe der Zellen, welche ohne H_2O_2 osteogen differenziert wurden (Abbildung 37). Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass durch die H_2O_2 -Behandlung nicht nur der osteogene sondern auch der adipogene Signalweg bei den Nonresponderzellen beeinträchtigt wurde, eine ausreichende Verschiebung hin zur adipogenen Differenzierung also ebenfalls nicht mehr gegeben war.

Einen ähnlichen, wenn auch nicht ganz so stark ausgeprägten Effekt hatte die UVA-Bestrahlung der Zellen, welche gleichzeitig mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurden. Auch hier kam es mit zunehmender Erhöhung der Dosen zu einem Anstieg der adipogenen Differenzierung und einer Abnahme der osteogenen Differenzierung (Abbildung 38 – 40). Zellen, welche mit $10 J/cm^2$ bestrahlt wurden, zeigten ausschließlich eine adipogene Differenzierung. Hier war es auffällig, dass die Nonresponderzellen nicht osteogen differenzierten, es aber dennoch mit steigenden UVA-Dosen zu einem Anstieg der adipogenen Differenzierung kam. Da Osteogenese und Adipogenese den gleichen kontrollierenden Signalkaskaden unterliegen, legt diese Beobachtung die Vermutung nahe, dass die Signalkaskaden, die zu einer osteogenen Differenzierung der Zellen führen, nicht gestört sind, sehr wohl aber die Fähigkeit der Zellen Kalzium zu binden durch die Bestrahlung stark reduziert wird. Andernfalls könnten die Signalwege, welche sowohl bei der adipogenen als auch der osteogenen Differenzierung angeschaltet werden, nicht durch die erhöhte ROS-Expression so moduliert werden, dass eine Verschiebung zugunsten der Adipogenese erfolgt. Folglich müsste also auch die Adipogenese in diesen Zellen gestört sein.

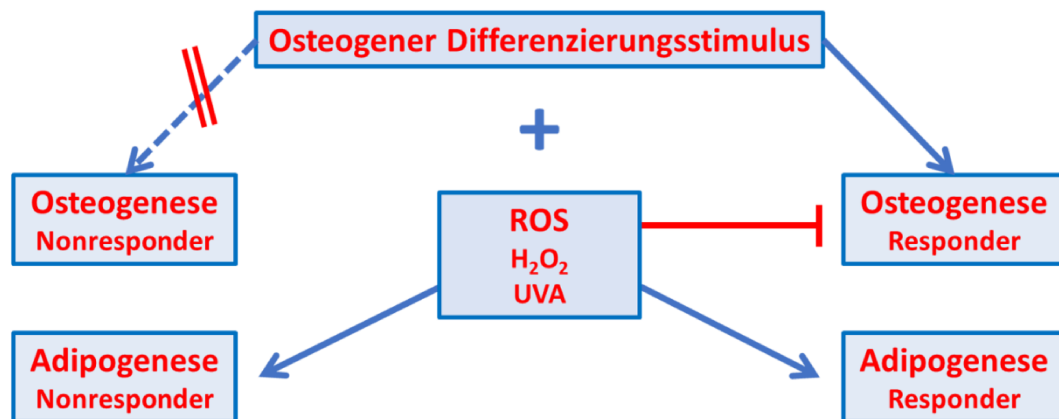


Abbildung 50: Auswirkungen der Induktion von ROS während der osteogenen Differenzierung von Responder- und Nonresponderzellen. Wurden die Zellen ausschließlich mit einem osteogenen Differenzierungsstimulus (osteogenem Differenzierungsmedium) behandelt, so differenzierten die Responderzellen osteogen. Wurde neben der osteogenen Induktion, ROS in den Zellen induziert (exogen durch die Behandlung mit H_2O_2 , intrazellulär durch Bestrahlung mit UVA), so wurde statt der osteogenen, die adipogene Differenzierung angeregt. Dies traf nicht nur auf die Responder-, sondern auch auf die Nonresponderzellen zu.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass ROS einen stark modulierenden Einfluss auf die Osteogenese adipogener mesenchymaler Stammzellen hat. Um zu untersuchen, ob und wie die verminderte Osteogenese der Nonresponderzellen durch die Zugabe von ROS-inhibierenden Substanzen positiv beeinflusst werden kann, wurden die Zellen mit verschiedenen Antioxidantien behandelt. Während Trolox, Glutathion und NAC weder das EZM-Kalzifizierungspotential der Responder-, noch der Nonresponderzellen beeinflusste, hatte die Zugabe von 500 U/ml Katalase einen starken Effekt auf die Osteogenese beider Zelltypen: Die Zugabe von Katalase in das osteogene Differenzierungsmedium führte nicht nur dazu, dass die Kalzifizierung der EZM der Responderzellen signifikant gesteigert wurde, sondern vor allem dazu, dass die Nonresponderzellen keinen signifikanten Unterschied zu Responderzellen aufwiesen, welche mit katalasehaltigem osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurden (Abbildung 41 und 42).

Obwohl eine Funktion der Katalase im Rahmen der osteogenen Differenzierung bisher nicht beschrieben wurde, konnten wir zeigen, dass die Katalase während der Osteogenese hochreguliert wird. Am Tag zwölf erreichte die Katalaseexpression ihr Maximum. Dies traf sowohl auf die

Responder- als auch auf die Nonresponderzellen zu. Während bis zum zwölften Tag die Expression in beiden Zelltypen nahezu deckungsgleich verlief, unterscheidet sich die Expression nach dem zwölften Tag in den Nonresponderzellen deutlich von der in den Responderzellen. Die Katalaseexpression in den Responderzellen nimmt ab diesem Zeitpunkt stark ab, während die Katalaseexpression in den Nonresponderzellen bis zu Tag 15 nahezu stagniert und danach auch nur leicht abfällt (Abbildung 43). Damit ähnelt der Expressionsverlauf dem von osteogenen Markerproteinen, was darauf hindeuten könnte, dass die Katalase ebenfalls eine Rolle in einem der osteogenen Signalwege spielt.

Im Organismus wandelt die MnSOD Superoxidationradikale zu Wasserstoffperoxid um und liefert so der Katalase ihr Substrat. Aus diesem Grund untersuchten wir auch, ob sich die MnSOD-Expression während der osteogenen Differenzierung ändert. Im Gegensatz zur Katalase und zu osteogenen Markerproteinen nahm die MnSOD-Expression in den Responderzellen während der gesamten Zeit zu, während die Expression in den Nonresponderzellen ab Tag 15 stark verringert war (Abbildung 44). Einen direkten Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung konnten wir aus diesem Grund nicht feststellen, der beständige Expressionsanstieg in den Responderzellen ließe sich hier auch mit der Erhöhung des Gehaltes an Reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle während der Osteogenese erklären, da die MnSOD im Gegensatz zur Katalase nicht auf eine beendete Osteogenese und beginnende Kalzifizierung der Matrix reagiert.

Da die unspezifischen Radikalfänger Glutathion und NAC keinen Einfluss auf die Kalzifizierung der EZM der Zellen zeigten, lag die Vermutung nahe, dass weniger die reaktiven Sauerstoffspezies, als vielmehr die Katalase oder ihr Produkt, der molekulare Sauerstoff, diesen Effekt bewirkten. Durch eine Erhöhung des Substrats (H_2O_2) für das Enzym müsste demzufolge auch eine Steigerung des Effektes auf die Osteogenese erwartet werden können. Aus diesem Grund wurden Responder und Nonresponderzellen mit osteogenem Differenzierungsmedium, welchem Katalase und H_2O_2 -Konzentrationen zwischen $50 \mu M$ und $1 M H_2O_2$ zugesetzt wurden, behandelt. Es zeigte sich, dass durch die zusätzliche Substrater-

höhung der Katalase, der Effekt nochmals signifikant gesteigert werden konnte. Die Zellen, welchen Katalase und 50 μM H_2O_2 zugesetzt wurden, zeigten eine signifikant stärkere Osteogenese verglichen mit den Zellen, welche nur mit Katalase behandelt wurden. Mit zunehmenden H_2O_2 -Konzentrationen stieg auch die Kalzifizierung proportional an (Abbildung 45).

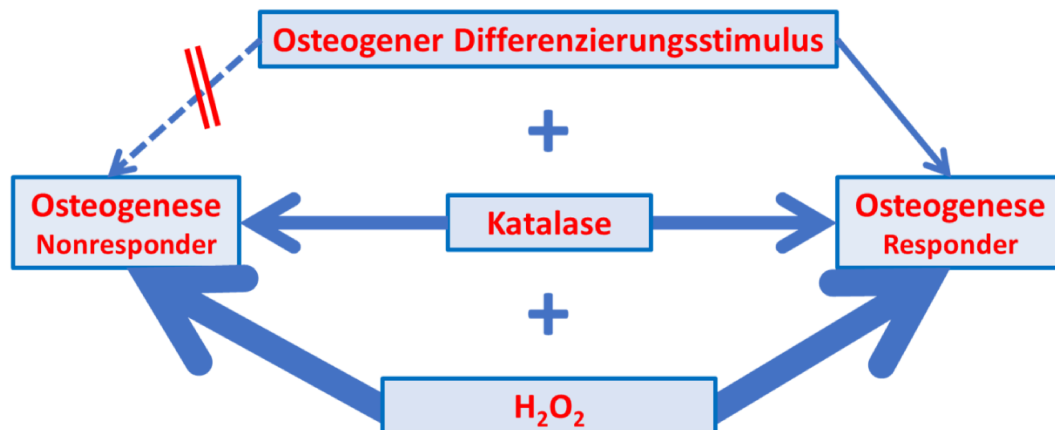


Abbildung 51: Auswirkungen eines osteogenen Differenzierungsstimulus in Kombination mit dem Enzym Katalase und dessen Substrat Wasserstoffperoxid. Werden die Zellen durch osteogenes Differenzierungsmedium osteogen differenziert, so reagieren ausschließlich die Responderzellen auf diesen Stimulus. Die Nonresponderzellen zeigen keine Reaktion. Wird dem Medium Katalase zugesetzt, so wird die osteogene Differenzierung in den Responderzellen verstärkt. Die Nonresponderzellen differenzieren nun ebenso stark wie die Responderzellen. Wird der Katalase darüber hinaus zusätzliches Substrat (H_2O_2) zur Verfügung gestellt, so erhöht sich die Stärke der Osteogenen Differenzierung erneut. Dies trifft in gleichem Maße auf die Responder und die Nonresponderzellen zu.

Wurden die Zellen jedoch mit dem Katalaseinhibitor ATA behandelt (Abbildung 46), so zeigte sich selbst bei hohen Konzentrationen von 10 mM keine Reduktion der osteogenen Differenzierung, es war sogar eine tendenzielle Steigerung bei hohen ATA-Konzentrationen zu beobachten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Katalase zumindest nicht essentiell für eine Osteogenese der Zellen ist. Allerdings zeigten Kontrollversuche, bei welchen die Zellen sowohl mit ATA als auch mit Katalase behandelt wurden, dass die osteogene Differenzierung gegenüber den Kontrollzellen, welche nur mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurden, erhöht war. Allerdings war die Kalzifizierung der Matrix nicht so

stark ausgeprägt, wie es bei den Zellen der Fall war, welche ausschließlich mit Katalase behandelt wurden. Denkbar sind hier entweder Effekte durch ATA selbst (in Abbildung 46 ist ersichtlich, dass offensichtlich auch sehr hohe ATA-Konzentrationen die Osteogenesefähigkeit der Zellen tendenziell steigern konnten) oder, dass der Katalaseinhibitor ATA die Katalase nicht vollständig inhibieren konnte. Geht man aber von einer korrekten Funktionsweise des Inhibitors aus, so muss in Betracht gezogen werden, dass die beobachteten Effekte hinsichtlich der Osteogenese nicht auf die Katalase selbst, sondern auf Artefakte im Zusammenhang mit der Katalasebehandlung zurückzuführen sind. Dabei ist jedoch auszuschließen, dass das in der Katalaselösung als Bakterizid und Fungizid eingesetzte Thymol diese Effekte hervorrief, da eine Behandlung der Zellen mit diesem Stoff zu keiner Veränderung hinsichtlich der Osteogenese, verglichen mit den Zellen, welche ausschließlich osteogenes Differenzierungsmedium erhielten, führte (Abbildung 47).

So könnte es ein Erklärungsansatz sein, dass weniger die antioxidative Wirkung der Katalase, als vielmehr ihre Fähigkeit, aus H_2O_2 molekularen Sauerstoff herzustellen, dazu führt, die Differenzierungsfähigkeit fettstämmiger mesenchymaler Stammzellen zu verbessern (Abbildung 48). Diese Vermutung wird auch durch bereits publizierte positive Behandlungserfolge durch hyperbare Sauerstofftherapien bei Knochendefekten unterstützt: Durch den in speziellen Kammern erzeugte Überdruck erhöht sich die Löslichkeit von Gasen im Blut. Dies ermöglicht die Aufnahme von höheren Sauerstoffkonzentrationen, was wiederum positive Effekte auf die Zielorgane, hier das Knochengewebe, hat. Ein weiterer, jedoch weniger naheliegender Erklärungsansatz wäre, dass die Katalase direkt in osteogene Signalwege eingreift und diese zugunsten einer stärkeren Kalzifizierung der extrazellulären Matrix modifiziert.

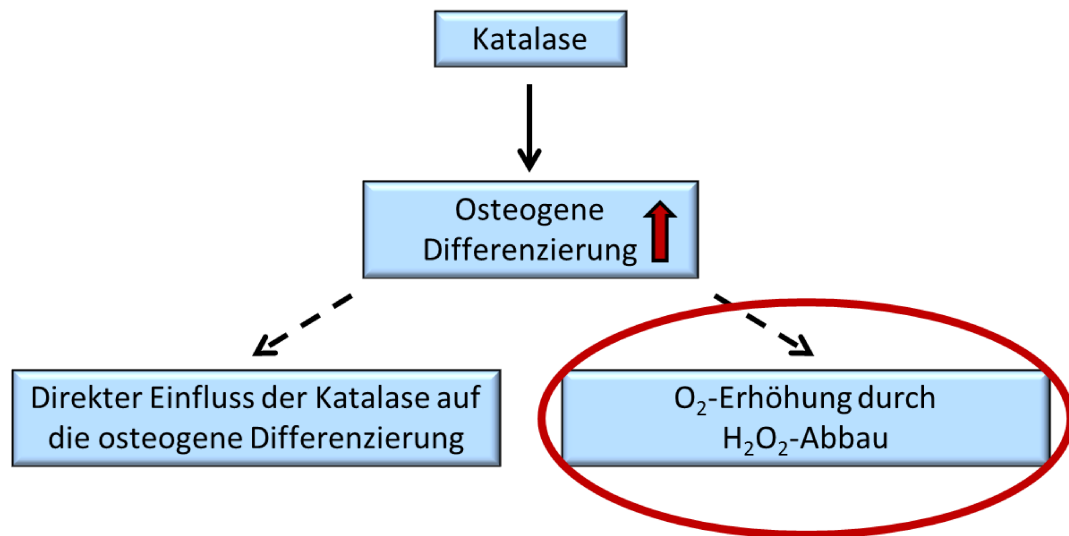


Abbildung 52: Mögliche Erklärungsansätze, wie Katalase die Osteogenese der ASCs positiv beeinflussen könnte. Die in dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass durch die Zugabe von Katalase in das osteogene Differenzierungsmedium die Osteogenese der Zellen, insbesondere die Kalzifizierung der Zellen, signifikant gesteigert wird. Damit könnte die Katalase entweder direkten Einfluss auf osteogene Signalwege nehmen, oder das Produkt der Katalase (O_2) wirkt auf Osteogenese. Da ein positiver Effekt von Sauerstoff auf die osteogene Differenzierung der Zellen bereits gezeigt werden konnte und die Wirkung der Katalase verstärkt wurde, wenn mehr Substrat (H_2O_2) zur Verfügung gestellt wurde, gilt dieser Erklärungsansatz als wahrscheinlicher

5.1 Kritische Betrachtung der Ergebnisse und klinische Verwendbarkeit

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse legen auf den ersten Blick die Vermutung nahe, dass die Katalase durch ihr Produkt, den molekularen Sauerstoff, die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen signifikant positiv beeinflussen kann. Paradoxerweise wurde jedoch die osteogene Differenzierung der ASCs durch die Zugabe des Katalaseinhibitors ATA nicht negativ beeinflusst. Auch zeigte sich eine zumindest tendenzielle Steigerung des osteogenen Differenzierungspotentials, wenn die Zellen während der osteogenen Differenzierung zugleich mit Katalase und ATA behandelt wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beobachteten Effekte der exogen zugesetzten Katalase nicht, oder nur in einem nicht signifikanten Maße auf die Redoxspezifität der antioxidativen Wirkung der Katalase zurückzuführen sind. Die Wirkung der Katalase muss demnach auf einen anderen, bislang unbekanntem molekularen Mechanismus zurückzuführen sein. Weiterführende Versuche in der Arbeitsgruppe zeigten, dass selbst eine Behandlung mit nachweislich

inaktivierter und enzymverdauter Katalase eine identische, proosteogene Wirkung auf mesenchymale Stammzellen hat. Die in diesem Zusammenhang naheliegendste Erklärung ist, dass das in der Katalase gebundene Eisen die osteogene Differenzierung anregt. Erste Untersuchungen an knochenmarkstämmigen Stammzellen wiesen nach, dass die Behandlung der Zellen mit exogen zugesetzten Eisenionen zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Generierung von Hydroxylradikalen führt. Ein Abfangen der OH-Radikale durch den Einsatz des OH-Radikalscavengers Mannitol hob die proosteogene Wirkung des Eisens nicht auf, sodass auch die OH-Radikalbildung als Ursache für eine verbesserte osteogene Differenzierung ausscheidet. Auch war es bisher nicht möglich, einen differenziellen Unterschied in der Expression oder Aktivität spezieller ROS-Metabolismus-relevanter Proteine (NOX4, SOD1, SOD2, FOXO1, Nrf2, GPX, p53, Akt) bei Responder- und Nonresponderzellen zu detektieren, sodass auch hier kein Hinweis auf einen Eisenionen-abhängigen Mechanismus zu finden war.

Obwohl die molekularen Mechanismen, welche zu der Steigerung der osteogenen Differenzierung durch exogene Zugabe des Enzyms Katalase noch nicht geklärt werden konnten, belegt die vorliegende Arbeit jedoch bereits, dass eine Anreicherung des osteogenen Differenzierungsmediums mit Katalase zu einer signifikanten Steigerung der Kalzifizierung der EZM führt. Können die *in vitro* erzielten Effekte auch *in vivo* bestätigt werden, so wäre eine therapeutische Anwendung denkbar, bei welcher Patienten, deren Knochenheilung gestört ist, entweder systemisch oder lokal mit Katalase behandelt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abumaree, M., Al Jumah, M., Pace, R. A., & Kalionis, B. (2012). Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*, 8(2), 375-392. doi: 10.1007/s12015-011-9312-0
- Al-Gubory, K. H. (2014). Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reprod Biomed Online*, 29(1), 17-31. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.03.002
- Aleksander-Konert, E., Padiuszynski, P., Zajdel, A., Dzierzewicz, Z., & Wilczok, A. (2016). *In vitro* chondrogenesis of Wharton's jelly mesenchymal stem cells in hyaluronic acid-based hydrogels. *Cell Mol Biol Lett*, 21, 11. doi: 10.1186/s11658-016-0016-y
- Alexeev, V., Arita, M., Donahue, A., Bonaldo, P., Chu, M. L., & Igoucheva, O. (2014). Human adipose-derived stem cell transplantation as a potential therapy for Kollagen VI-related congenital muscular dystrophy. *Stem Cell Res Ther*, 5(1), 21. doi: 10.1186/scrt411
- Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Roberson, P. K., Manolagas, S. C. (2007). Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem*, 282(37), 27285-27297. doi: 10.1074/jbc.M702810200
- Angelini, F., Pagano, F., Bordin, A., Milan, M., Chimenti, I., Peruzzi, M., De Falco, E. (2017). The Impact of Environmental Factors in Influencing Epigenetics Related to Oxidative States in the Cardiovascular System. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2712751. doi: 10.1155/2017/2712751
- Arpornmaeklong, P., Brown, S. E., Wang, Z., & Krebsbach, P. H. (2009). Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 18(7), 955-968. doi: 10.1089/scd.2008.0310
- Atari, M., Gil-Recio, C., Fabregat, M., Garcia-Fernandez, D., Barajas, M., Carrasco, M. A., . . . Giner, L. (2012). Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci*, 125(Pt 14), 3343-3356. doi: 10.1242/jcs.096537
- Atashi, F., Modarressi, A., & Pepper, M. S. (2015). The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*, 24(10), 1150-1163. doi: 10.1089/scd.2014.0484
- Baek, K. H., Oh, K. W., Lee, W. Y., Lee, S. S., Kim, M. K., Kwon, H. S., Kang, M. I. (2010). Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcif Tissue Int*, 87(3), 226-235. doi: 10.1007/s00223-010-9393-9
- Bajek, A., Gurtowska, N., Gackowska, L., Kubiszewska, I., Bodnar, M., Marszalek, A., Drewa, T. (2015). Does the liposuction method influence the phenotypic characteristic of human adipose-derived stem cells? *Biosci Rep*, 35(3). doi: 10.1042/BSR20150067
- Banfi, G., Iorio, E. L., & Corsi, M. M. (2008). Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med*, 46(11), 1550-1555. doi: 10.1515/CCLM.2008.302
- Baron, R., & Hesse, E. (2012). Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(2), 311-325. doi: 10.1210/jc.2011-2332
- Basu, S., Michaelsson, K., Olofsson, H., Johansson, S., & Melhus, H. (2001). Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun*, 288(1), 275-279. doi: 10.1006/bbrc.2001.5747

- Bellanti, F., Matteo, M., Rollo, T., De Rosario, F., Greco, P., Vendemiale, G., & Serviddio, G. (2013). Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol*, *1*, 340-346. doi: 10.1016/j.redox.2013.05.003
- Bianco, P. (2014). "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *30*, 677-704. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013132
- Biswas, S. K., & Rahman, I. (2009). Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med*, *30*(1-2), 60-76. doi: 10.1016/j.mam.2008.07.001
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, *26*(2), 229-238. doi: 10.1002/jbmr.320
- Bonewald, L. F., & Johnson, M. L. (2008). Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, *42*(4), 606-615. doi: 10.1016/j.bone.2007.12.224
- Boonrungsiman, S., Gentleman, E., Carzaniga, R., Evans, N. D., McComb, D. W., Porter, A. E., & Stevens, M. M. (2012). The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(35), 14170-14175. doi: 10.1073/pnas.1208916109
- Bosi, A., & Bartolozzi, B. (2010). Safety of bone marrow stem cell donation: a review. *Transplant Proc*, *42*(6), 2192-2194. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.05.029
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Gimble, J. M. (2013). stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, *15*(6), 641-648. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006
- Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*, *28*, 269-286.
- Bruna, F., Contador, D., Conget, P., Erranz, B., Sossa, C. L., & Arango-Rodriguez, M. L. (2016). Regenerative Potential of Mesenchymal stromal Cells: Age-Related Changes. *Stem Cells Int*, *2016*, 1461648. doi: 10.1155/2016/1461648
- Buckley, N. A., Whyte, I. M., O'Connell, D. L., & Dawson, A. H. (1999). Oral or intravenous N-acetylcysteine: which is the treatment of choice for acetaminophen (paracetamol) poisoning? *J Toxicol Clin Toxicol*, *37*(6), 759-767.
- Cadet, J., & Douki, T. (2018). Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem Photobiol Sci*. doi: 10.1039/c7pp00395a
- Catarzi, S., Romagnoli, C., Marcucci, G., Favilli, F., Iantomasi, T., & Vincenzini, M. T. (2011). Redox regulation of ERK1/2 activation induced by sphingosine 1-phosphate in fibroblasts: involvement of NADPH oxidase and platelet-derived growth factor receptor. *Biochim Biophys Acta*, *1810*(4), 446-456. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.01.005
- Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., & MacDougald, O. A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*, *53*(2), 227-246. doi: 10.1194/jlr.R021089
- Chalumeau, M., & Duijvestijn, Y. C. (2013). Acetylcysteine and carbocysteine for acute upper and lower respiratory tract infections in paediatric patients without chronic broncho-pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*(5), CD003124. doi: 10.1002/14651858.CD003124.pub4
- Charif, N., Li, Y. Y., Targa, L., Zhang, L., Ye, J. S., Li, Y. P., de Isla, N. (2017). Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine. *Biomed Mater Eng*, *28*(s1), S57-S63. doi: 10.3233/BME-171624
- Chen, Y., Niu, Z., Xue, Y., Yuan, F., Fu, Y., & Bai, N. (2014). Improvement in the repair of defects in maxillofacial soft tissue in irradiated minipigs by a mixture of adipose-

- derived stem cells and platelet-rich fibrin. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 52(8), 740-745. doi: 10.1016/j.bjoms.2014.06.006
- Choi, J. S., Lee, B. J., Park, H. Y., Song, J. S., Shin, S. C., Lee, J. C., Jung, J. S. (2015). Effects of donor age, long-term passage culture, and cryopreservation on tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*, 36(1), 85-99. doi: 10.1159/000374055
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., & Harris, D. T. (2013). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytotherapy*, 15(3), 330-343. doi: 10.1016/j.jcyt.2012.11.010
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., & Harris, D. T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*, 12, 8. doi: 10.1186/1479-5876-12-8
- Cousin, B., Andre, M., Arnaud, E., Penicaud, L., & Casteilla, L. (2003). Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(4), 1016-1022.
- Covarrubias-Pinto, A., Acuna, A. I., Beltran, F. A., Torres-Diaz, L., & Castro, M. A. (2015). Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci*, 16(12), 28194-28217. doi: 10.3390/ijms161226095
- Crop, M. J., Baan, C. C., Korevaar, S. S., Ijzermans, J. N., Pescatori, M., Stubbs, A. P., Hoogdijjn, M. J. (2010). Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, 162(3), 474-486. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04256.x
- Danti, S., Serino, L. P., D'Alessandro, D., Moscato, S., Danti, S., Trombi, L., Petrini, M. (2013). Growing bone tissue-engineered niches with graded osteogenicity: an *in vitro* method for biomimetic construct assembly. *Tissue Eng Part C Methods*, 19(12), 911-924. doi: 10.1089/ten.TEC.2012.0445
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3565127. doi: 10.1155/2016/3565127
- Diebold, L., & Chandel, N. S. (2016). Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic Biol Med*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.198
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905
- Dufrane, D. (2017). Impact of Age on Human Adipose Stem Cells for Bone *Tissue Engineering*. *Cell Transplant*, 26(9), 1496-1504. doi: 10.1177/0963689717721203
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Jozkowicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*, 62(3), 329-337. doi: 10.18388/abp.2015_1023
- Elkhenany, H., Amelse, L., Caldwell, M., Abdelwahed, R., & Dhar, M. (2016). Impact of the source and serial passaging of goat mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation potential: implications for bone *tissue engineering*. *J Anim Sci Biotechnol*, 7, 16. doi: 10.1186/s40104-016-0074-z
- Erickson, G. R., Gimble, J. M., Franklin, D. M., Rice, H. E., Awad, H., & Guilak, F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(2), 763-769. doi: 10.1006/bbrc.2001.6270
- Fatherazi, S., Matsa-Dunn, D., Foster, B. L., Rutherford, R. B., Somerman, M. J., & Presland, R. B. (2009). Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res*, 88(1), 39-44. doi: 10.1177/0022034508328072

- Feng, X., & McDonald, J. M. (2011). Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*, 6, 121-145. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130203
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. doi: 10.1038/35041687
- Foster, B. L., Nociti, F. H., Jr., Swanson, E. C., Matsa-Dunn, D., Berry, J. E., Cupp, C. J., Somerman, M. J. (2006). Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate *in vitro*. *Calcif Tissue Int*, 78(2), 103-112. doi: 10.1007/s00223-005-0184-7
- Franceschi, R. T., Ge, C., Xiao, G., Roca, H., & Jiang, D. (2007). Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*, 1116, 196-207. doi: 10.1196/annals.1402.081
- Franceschi, R. T., Iyer, B. S., & Cui, Y. (1994). Effects of ascorbic acid on Kollagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 9(6), 843-854. doi: 10.1002/jbmr.5650090610
- Greinert, R., Volkmer, B., Henning, S., Breitbart, E. W., Greulich, K. O., Cardoso, M. C., & Rapp, A. (2012). UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res*, 40(20), 10263-10273. doi: 10.1093/nar/gks824
- Greve, B., Bolling, T., Amler, S., Rossler, U., Gomolka, M., Mayer, C., . . . Schmezer, P. (2012). Evaluation of different biomarkers to predict individual radiosensitivity in an inter-laboratory comparison--lessons for future studies. *PLoS One*, 7(10), e47185. doi: 10.1371/journal.pone.0047185
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., & Gimble, J. M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189(1), 54-63. doi: 10.1002/jcp.1138
- Gulseren, G., Yasa, I. C., Ustahuseyin, O., Tekin, E. D., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2015). Alkaline Phosphatase-Mimicking Peptide Nanofibers for Osteogenic Differentiation. *Biomacromolecules*, 16(7), 2198-2208. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00593
- Halliwel, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97(6), 1634-1658. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
- Halliwel, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*, 401(1), 1-11. doi: 10.1042/BJ20061131
- Hamidouche, Z., Hay, E., Vaudin, P., Charbord, P., Schule, R., Marie, P. J., & Fromiguet, O. (2008). FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB J*, 22(11), 3813-3822. doi: 10.1096/fj.08-106302
- Han, J., Koh, Y. J., Moon, H. R., Ryoo, H. G., Cho, C. H., Kim, I., & Koh, G. Y. (2010). Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 115(5), 957-964. doi: 10.1182/blood-2009-05-219923
- Han, S., Sun, H. M., Hwang, K. C., & Kim, S. W. (2015). Adipose-Derived stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 25(2), 145-152.
- Handschel, J., Naujoks, C., Langenbach, F., Berr, K., Depprich, R. A., Ommerborn, M. A., . . . Meyer, U. (2010). Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells *in vivo*. *Tissue Eng Part A*, 16(8), 2475-2483. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0546
- Hayflick, L. (1965). The Limited *in Vitro* Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 37, 614-636.

- Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A. V., Bonewald, L. F., & Karsdal, M. A. (2009). Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*, *44*(6), 1026-1033. doi: 10.1016/j.bone.2009.03.671
- Herbertson, A., & Aubin, J. E. (1995). Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. *J Bone Miner Res*, *10*(2), 285-294. doi: 10.1002/jbmr.5650100216
- Hoffer, E., Baum, Y., & Nahir, A. M. (2002). N-Acetylcysteine enhances the action of anti-inflammatory drugs as suppressors of prostaglandin production in monocytes. *Mediators Inflamm*, *11*(5), 321-323. doi: 10.1080/09629350210000015737
- Huang, J. I., Kazmi, N., Durbhakula, M. M., Hering, T. M., Yoo, J. U., & Johnstone, B. (2005). Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res*, *23*(6), 1383-1389. doi: 10.1016/j.orthres.2005.03.008.1100230621
- Im, G. I., Shin, Y. W., & Lee, K. B. (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, *13*(10), 845-853. doi: 10.1016/j.joca.2005.05.005
- James, A. W. (2013). Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*, *2013*, 684736. doi: 10.1155/2013/684736
- Jilka, R. L., Noble, B., & Weinstein, R. S. (2013). Osteocyte apoptosis. *Bone*, *54*(2), 264-271. doi: 10.1016/j.bone.2012.11.038
- Jones, D. P. (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*, *348*, 93-112.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, *24*(5), 1294-1301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342
- Khan, W. S., Rayan, F., Dhinsa, B. S., & Marsh, D. (2012). An osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic tissue-engineered product for trauma and orthopaedic surgery: how far are we? *Stem Cells Int*, *2012*, 236231. doi: 10.1155/2012/236231
- Kim, S. P., Ha, J. M., Yun, S. J., Kim, E. K., Chung, S. W., Hong, K. W., Bae, S. S. (2010). Transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma requires activation of both protein kinase A and Akt during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, *399*(1), 55-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.038
- Kogler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., . . . Wernet, P. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*, *200*(2), 123-135. doi: 10.1084/jem.20040440
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., . . . Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, *89*(5), 755-764.
- Kornicka, K., Marycz, K., Tomaszewski, K. A., Maredziak, M., & Smieszek, A. (2015). The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. *Oxid Med Cell Longev*, *2015*, 309169. doi: 10.1155/2015/309169
- Krinner, A., & Roeder, I. (2014). Quantification and modeling of stem cell-niche interaction. *Adv Exp Med Biol*, *844*, 11-36. doi: 10.1007/978-1-4939-2095-2_2

- Lean, J. M., Jagger, C. J., Kirstein, B., Fuller, K., & Chambers, T. J. (2005). Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology*, *146*(2), 728-735. doi: 10.1210/en.2004-1021
- Lee, K. S., Cha, S. H., Kang, H. W., Song, J. Y., Lee, K. W., Ko, K. B., & Lee, H. T. (2013). Effects of serial passage on the characteristics and chondrogenic differentiation of canine umbilical cord matrix derived mesenchymal stem cells. *Asian-Australas J Anim Sci*, *26*(4), 588-595. doi: 10.5713/ajas.2012.12488
- Lefterova, M. I., Haakonsson, A. K., Lazar, M. A., & Mandrup, S. (2014). PPARgamma and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab*, *25*(6), 293-302. doi: 10.1016/j.tem.2014.04.001
- Levine, M. (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med*, *314*(14), 892-902. doi: 10.1056/NEJM198604033141407
- Levine, M., Dhariwal, K. R., Welch, R. W., Wang, Y., & Park, J. B. (1995). Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *Am J Clin Nutr*, *62*(6 Suppl), 1347S-1356S.
- Li, B., Chi, R. F., Qin, F. Z., & Guo, X. F. (2016). Distinct changes of myocyte autophagy during myocardial hypertrophy and heart failure: association with oxidative stress. *Exp Physiol*, *101*(8), 1050-1063. doi: 10.1113/EP085586
- Li, H., Zimmerlin, L., Marra, K. G., Donnenberg, V. S., Donnenberg, A. D., & Rubin, J. P. (2011). Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg*, *128*(3), 663-672. doi: 10.1097/PRS.0b013e318221db33
- Li, Y., Charif, N., Mainard, D., Bensoussan, D., Stoltz, J. F., & de Isla, N. (2014). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Biomed Mater Eng*, *24*(1 Suppl), 47-52. doi: 10.3233/BME-140973
- Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med*, *60*, 1-4. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011
- Lo Surdo, J. L., Millis, B. A., & Bauer, S. R. (2013). Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, *15*(12), 1527-1540. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.04.010
- Lowe, D., & John, S. (2017). Alkaline Phosphatase *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Mackie, E. J., Tatarczuch, L., & Mirams, M. (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol*, *211*(2), 109-121. doi: 10.1530/JOE-11-0048
- Mann, V., Huber, C., Kogianni, G., Collins, F., & Noble, B. (2007). The antioxidant effect of estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in the inhibition of osteocyte apoptosis *in vitro*. *Bone*, *40*(3), 674-684. doi: 10.1016/j.bone.2006.10.014
- Manolagas, S. C. (2010). From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev*, *31*(3), 266-300. doi: 10.1210/er.2009-0024
- Martino, M., Console, G., Russo, L., Messina, G., D'Arro, B. L., Irrera, G., & Barreca, G. (2012). Internal iliac artery perforation following bone marrow aspiration in a patient with no previously identified risk factors: a case report and review of the literature. *Acta Haematol*, *127*(1), 23-25. doi: 10.1159/000331487
- McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Mitchell, J. B., Floyd, Z. E., Hammill, L., Gimble, J. M. (2006). The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes *in vitro*. *Stem Cells*, *24*(5), 1246-1253. doi: 10.1634/stemcells.2005-0235
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Gimble, J. M. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in

- stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24(2), 376-385. doi: 10.1634/stemcells.2005-0234
- Naka, K., Muraguchi, T., Hoshii, T., & Hirao, A. (2008). Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal*, 10(11), 1883-1894. doi: 10.1089/ars.2008.2114
- Neve, A., Corrado, A., & Cantatore, F. P. (2011). Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res*, 343(2), 289-302. doi: 10.1007/s00441-010-1086-1
- Nordberg, R. C., & Lobo, E. G. (2015). Our Fat Future: Translating Adipose Stem Cell Therapy. *Stem Cells Transl Med*, 4(9), 974-979. doi: 10.5966/sctm.2015-0071
- Origuchi, T., Migita, K., Nakashima, T., Honda, S., Yamasaki, S., Hida, A., Eguchi, K. (2000). Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human osteoblastic cells by N-acetylcysteine. *J Lab Clin Med*, 136(5), 390-394. doi: 10.1067/mlc.2000.110369
- Park, I. S., Kang, J. A., Kang, J., Rhie, J. W., & Kim, S. H. (2014). Therapeutic effect of human adipose-derived stromal cells cluster in rat hind-limb ischemia. *Anat Rec (Hoboken)*, 297(12), 2289-2298. doi: 10.1002/ar.22961
- Pecanha, R., Bagno, L. L., Ribeiro, M. B., Robottom Ferreira, A. B., Moraes, M. O., Zapata-Sudo, G., Saar Werneck-de-Castro, J. P. (2012). Adipose-derived stem-cell treatment of skeletal muscle injury. *J Bone Joint Surg Am*, 94(7), 609-617. doi: 10.2106/JBJS.K.00351
- Perez-Rodriguez, L., Romero-Haro, A. A., Sternalski, A., Muriel, J., Mougeot, F., Gil, D., & Alonso-Alvarez, C. (2015). Measuring oxidative stress: the confounding effect of lipid concentration in measures of lipid peroxidation. *Physiol Biochem Zool*, 88(3), 345-351. doi: 10.1086/680688
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
- Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., Andre, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Casteilla, L. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109(5), 656-663. doi: 10.1161/01.CIR.0000114522.38265.61
- Prescott, L. F., Park, J., Ballantyne, A., Adriaenssens, P., & Proudfoot, A. T. (1977). Treatment of paracetamol (acetaminophen) poisoning with N-acetylcysteine. *Lancet*, 2(8035), 432-434.
- Price, P. A., Toroian, D., & Chan, W. S. (2009). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase is required for the calcification of Kollagen in serum: a possible mechanism for biomineralization. *J Biol Chem*, 284(7), 4594-4604. doi: 10.1074/jbc.M803205200
- Qi, K., Li, N., Zhang, Z., & Melino, G. (2017). Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. *Cell Immunol*. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.11.010
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24(5), 981-990. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008
- Romagnoli, C., Marcucci, G., Favilli, F., Zonefrati, R., Mavilia, C., Galli, G., Vincenzini, M. T. (2013). Role of GSH/GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like SaOS-2 cells. *FEBS J*, 280(3), 867-879. doi: 10.1111/febs.12075
- Schepmoes, G., Breen, E., Owen, T. A., Aronow, M. A., Stein, G. S., & Lian, J. B. (1991). Influence of dexamethasone on the vitamin D-mediated regulation of osteocalcin gene expression. *J Cell Biochem*, 47(2), 184-196. doi: 10.1002/jcb.240470212

- Sendur, O. F., Turan, Y., Tastaban, E., & Serter, M. (2009). Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. *Joint Bone Spine*, 76(5), 514-518. doi: 10.1016/j.jbspin.2009.02.005
- Sheweita, S. A., & Khoshhal, K. I. (2007). Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab*, 8(5), 519-525.
- Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., & Schafer, R. (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med*, 11, 146. doi: 10.1186/1741-7015-11-146
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82(2), 291-295.
- Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, 62(6 Suppl), 1315S-1321S.
- Siffert, R. S. (1951). The role of alkaline phosphatase in osteogenesis. *J Exp Med*, 93(5), 415-426.
- Smieszek, A., Donesz-Sikorska, A., Grzesiak, J., Krzak, J., & Marycz, K. (2014). Biological effects of sol-gel derived ZrO₂ and SiO₂/ZrO₂ coatings on stainless steel surface-*In vitro* model using mesenchymal stem cells. *J Biomater Appl*, 29(5), 699-714. doi: 10.1177/0885328214545095
- Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadi, S., & Sargolzaei Aval, F. (2017). Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*, 55(1), 6-23.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., & Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), 919-926.
- Sun, J., Li, J., Li, C., & Yu, Y. (2015). Role of bone morphogenetic protein-2 in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*, 12(3), 4230-4237. doi: 10.3892/mmr.2015.3954
- Susperregui, A. R., Vinals, F., Ho, P. W., Gillespie, M. T., Martin, T. J., & Ventura, F. (2008). BMP-2 regulation of PTHrP and osteoclastogenic factors during osteoblast differentiation of C2C12 cells. *J Cell Physiol*, 216(1), 144-152. doi: 10.1002/jcp.21389
- Tan, J., Xu, X., Tong, Z., Lin, J., Yu, Q., Lin, Y., & Kuang, W. (2015). Decreased osteogenesis of adult mesenchymal stem cells by reactive oxygen species under cyclic stretch: a possible mechanism of age related osteoporosis. *Bone Res*, 3, 15003. doi: 10.1038/boneres.2015.3
- Tataria, M., Perryman, S. V., & Sylvester, K. G. (2006). Stem cells: tissue regeneration and cancer. *Semin Pediatr Surg*, 15(4), 284-292. doi: 10.1053/j.sempedsurg.2006.07.008
- Tenenbaum, H. C., & Heersche, J. N. (1985). Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum *in vitro*. *Endocrinology*, 117(5), 2211-2217. doi: 10.1210/endo-117-5-2211
- Tilg, H., Moschen, A. R., Kaser, A., Pines, A., & Dotan, I. (2008). Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. *Gut*, 57(5), 684-694. doi: 10.1136/gut.2006.117382
- Vater, C., Kasten, P., & Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*, 7(2), 463-477. doi: 10.1016/j.actbio.2010.07.037
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2011). The unmasking of novel unipotent stem cells in the mammary gland. *EMBO J*, 30(24), 4858-4859. doi: 10.1038/emboj.2011.415
- Wang, K., Wei, G., & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, 1(1), 36. doi: 10.1186/2162-3619-1-36

- Wong, M. M., Rao, L. G., Ly, H., Hamilton, L., Tong, J., Sturtridge, W., Murray, T. M. (1990). Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. *J Bone Miner Res*, 5(8), 803-813. doi: 10.1002/jbmr.5650050803
- Wong, R. S. (2011). Mesenchymal stem cells: angels or demons? *J Biomed Biotechnol*, 2011, 459510. doi: 10.1155/2011/459510
- Wu, S. H., Huang, S. H., Lo, Y. C., Chai, C. Y., Lee, S. S., Chang, K. P., Kwan, A. L. (2015). Autologous adipose-derived stem cells attenuate muscular atrophy and protect spinal cord ventral horn motor neurons in an animal model of burn injury. *Cytotherapy*, 17(8), 1066-1075. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.03.687
- Xiao, G., Wang, D., Benson, M. D., Karsenty, G., & Franceschi, R. T. (1998). Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J Biol Chem*, 273(49), 32988-32994.
- Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J. M., Rosen, V., Wang, E. A., Yoshiki, S. (1991). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. *J Cell Biol*, 113(3), 681-687.
- Yazici, C., Kose, K., Utas, S., Tanrikulu, E., & Taslidere, N. (2016). A novel approach in psoriasis: first usage of known protein oxidation markers to prove oxidative stress. *Arch Dermatol Res*, 308(3), 207-212. doi: 10.1007/s00403-016-1624-0
- Ye, B., Hou, N., Xiao, L., Xu, Y., Xu, H., & Li, F. (2016). Dynamic monitoring of oxidative DNA double-strand break and repair in cardiomyocytes. *Cardiovasc Pathol*, 25(2), 93-100. doi: 10.1016/j.carpath.2015.10.010
- Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Fan, X., Ma, X., & Cui, Z. (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*, 26(6), 664-675. doi: 10.1002/cbf.1488
- Zhu, Z., Xu, L., Cai, T., Yuan, G., Sun, N., Lu, C., & Qian, R. (2017). Clock represses preadipocytes adipogenesis via GILZ. *J Cell Physiol*. doi: 10.1002/jcp.26420
- Ziegler-Heitbrock, H. W., & Ulevitch, R. J. (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*, 14(3), 121-125. doi: 10.1016/0167-5699(93)90212-4
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12), 4279-4295. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2), 211-228. doi: 10.1089/107632701300062859

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Suschek und Herrn Professor Dr. Windolf für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation im Forschungslabor der Unfall- und Handchirurgie anfertigen zu dürfen. Frau Professor Freifrau Gall danke ich auf das Herzlichste, dass sie sich dazu bereit erklärt hat, das Korreferat für die vorliegende Arbeit zu übernehmen!

Frau Dr. Grotheer und der gesamten Arbeitsgruppe, allen voran den Technischen Assistentinnen Samira Seghrouchni, Christa Wilkens und Jutta Schneider danke ich für eine schöne und lehrreiche Zeit! Es hat immer sehr viel Spaß mit euch gemacht!

Ein wirklich ganz besonderer Dank gilt Dir, Beryl! Dir für alles im Einzelnen zu danken würde den Rahmen dieser Danksagung sprengen. Deshalb danke ich Dir für Alles und einfach für Dich und das Du mir so unfassbar Vieles ermöglicht hast, sowohl beruflich als auch privat! Ohne Dich wäre ich nicht da, wo ich heute bin!

Auch danke ich Frau Professor Freifrau Gall und meinen neuen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Anatomie II für meine herzliche Aufnahme! Es macht großen Spaß mit euch!

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter für alles was sie für mich getan hat und dass sie stets auf meiner Seite stand!

Wissenschaftliche Beiträge

Vorträge

Deutscher Kongress der Orthopädie und Unfallchirurgie 2016

„Catalase essentially promotes the osteogenic differentiation potential of regular as well as osteogenically dysfunctional adipose tissue-derived stem cells“

B. Sahlender, C. V. Suschek, V. Grotheer, J. Windolf

Deutscher Kongress der Orthopädie und Unfallchirurgie 2015

„Einfluss von oxidativem Stress auf das osteogene Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen des Fettgewebes“

B. Sahlender, C. V. Suschek, J. Windolf

19. Chirurgische Forschungstage 2015

„Catalase Treatment Improves the Osteogenic Differentiation Potential of Adipose Derived Stem Cells in vitro“

B. Sahlender, C. V. Suschek, J. Windolf

Poster

8th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, 2015

“Osteogenic Differentiation is negatively influenced by Hydrogen Peroxide”

B. Sahlender, J. Windolf, C. V. Suschek

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, 28.09.2018

Benita Annabella Friederike Sahlender