

Aus der Klinik für Hand- und Unfallchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

**Die Auswirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und ROS-
abbauenden Enzymen auf die osteogene Differenzierung von humanen
adipogenen Stromazellen (ASCs) und deren Transkriptionsfaktoren
FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Maximilian Haack

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gez.: Maximilian Haack

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. med. Bernd Bittersohl

Tag der mündlichen Prüfung 30.07.2019

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, Elisabeth und Albrecht Haack, die mich stets unterstützt haben und meiner Freundin Daniela Dinnies, die mich immer motiviert hat.

I. Deutsche Zusammenfassung

Adipogene Stromazellen (ASCs) stellen aufgrund ihres multipotenten Differenzierungspotentials, ihrer effizienten Spenderzellgewinnung und der geringen Entnahmemorbidity eine vielversprechende Zellquelle für das *Tissue Engineering* dar. Deshalb sehen viele in ihnen ein großes Potential für neue hoffnungsvolle Therapieansätze von Knochendefekten kritischer Größe. In dieser Arbeit wurden die ASCs nach ihrer Kultivierung mithilfe eines osteogenen Differenzierungsmediums stimuliert. Hauptsächlicher Fokus bestand darin, die Auswirkungen einer zusätzlichen Behandlung mit Katalase auf Proliferation und osteogene Differenzierung der ASCs zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Apoptose und die intrazelluläre Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) während der osteogenen Differenzierung der ASCs analysiert. Zusätzlich sollte die Proteinexpression redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren, wie β -Catenin, FoxO 1 und FoxO 3a, unter (anti-) oxidativen Behandlungen untersucht werden. Dies sollte Aufschluss über den Einfluss antioxidativer Schutzmechanismen auf die osteogene Differenzierung der ASCs geben.

Es zeigte sich, dass Proliferation und osteogene Differenzierung der ASCs unter der Behandlung mit Katalase signifikant gesteigert waren. Interessanter Weise betrug die optimale Behandlungsdauer mit Katalase dabei nur 3 Tage. Eine weitere Behandlung mit Katalase brachte anschließend keine verstärkte osteogene Differenzierung. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Osteogenese der ASCs durch eine Behandlung mit inaktivierter Katalase ähnlich stark gesteigert werden konnte, wie durch eine Behandlung mit aktiver Katalase. Außerdem konnte die intrazelluläre ROS-Konzentration durch eine Behandlung mit Katalase tendenziell gemindert werden. Auch die Apoptose der ASCs mit Katalase-Behandlung war in den ersten 3 Tagen verringert. Die Untersuchung der Proteinexpression zeigte, dass nach 6 Tagen osteogener Differenzierung eine deutlich erhöhte Lokalisation aller Transkriptionsfaktoren in der nukleären Fraktion zu detektieren war. Dabei war besonders die Population betroffen, die zusätzlich mit H_2O_2 behandelt wurde, sodass von einer antioxidativen Schutzreaktion der Zellen auf die erhöhte ROS-Belastung ausgegangen werden kann. Außerdem war die Expression von β -Catenin in der zytoplasmatischen Fraktion am Tag 3, durch eine zusätzliche Behandlung mit Katalase am stärksten gesteigert. Die damit verbundene erhöhte Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges korreliert mit einer vermehrten osteogenen Differenzierung und damit mit den Ergebnissen aus der quantitativen Messung der Osteogenese nach 3 Tagen.

II. Englische Zusammenfassung

Adipose derived stromal cells (ASCs) feature a wide potential for differentiation, are efficient to harvest and provide little sampling morbidity. Therefore, they are a promising cell source in the field of tissue engineering and many see great potential in ASCs for sufficient therapeutic approaches of critical sized bone defects.

In this work ASCs were cultivated and then stimulated by a particular medium to differentiate into the osteogenic lineage. The Analysis on the effects of additional application of catalase on proliferation and osteogenic differentiation was the main topic of this work. In addition, apoptosis and intracellular concentration of reactive oxygen species (ROS) was investigated throughout osteogenic differentiation. Furthermore, the expression of FoxO 1, FoxO 3a and β -Catenin was investigated under different (anti-) oxidative treatments. This should give further insights into the influence of antioxidative buffering systems on osteogenesis of ASCs.

The results showed that under additional application of catalase, proliferation and osteogenic differentiation were significantly increased. Interestingly a 3-day treatment with catalase lead to sufficient osteogenic differentiation of ASCs. Any further treatment with catalase did not make a difference on the enhancing effect on osteogenic differentiation. Furthermore, it was shown that the application of inactivated catalase in comparison with active catalase lead to the same increase of osteogenesis. Additionally, the intracellular ROS-concentration was decreased under catalase treatment. The same trend was shown for ASC apoptosis, in the first three days of differentiation. The analysis of the protein expression showed that the localisation of all transcription factors was much higher in the nuclear fraction 6 days into osteogenic differentiation. The population most affected, was the one treated with H₂O₂, which could indicate an antioxidative response of the ASCs to increased ROS-levels. In addition, it was shown that the treatment with catalase lead to an increase of β -Catenin expression mainly on day 3. Thus, the application of catalase enhances canonical Wnt signalling pathway and thereby osteogenesis, which correlates with the quantitative results of osteogenic differentiation mentioned earlier.

III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	µMol/Liter
µm	Mikrometer
A	Ampère
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> ; destilliertes Wasser
ASC	Adipose-derived Stromal Cells; adipogene Stromazellen
ATA	3-Amino-1,2,4-Triazol
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Zytoplasma/zytoplasmatische Fraktion
cm	Zentimeter
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
d	Tag(e)
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
DCFDA	2',7'-Dichlorhydrofluorescein Diacetat

DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
et al.	<i>et alii/et alia</i> ; fast mehrere Autoren zusammen
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell-Scanning</i>
FBS	<i>Fetal Bovine-Serum</i> ; fötales Rinderserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FoxO1	<i>Forkhead-Box O1</i>
FoxO3	<i>Forkhead-Box O3</i>
H	H ₂ O ₂ -Behandlung
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i. d. R.	in der Regel
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus; beispielsweise in Zellkultur, oder im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	innerhalb des lebenden Organismus
K	Katalase-Behandlung
kDa	kiloDalton
M	Mol/Liter
MSC	<i>Mesenchymal Stromal Cell</i> ; mesenchymale Stromazellen
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar

N	Nukleus/nukleäre Fraktion
n	Stichprobenanzahl
nm	Nanometer
NR	<i>Nonresponder</i>
O ₂	molekularer Sauerstoff
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OM	osteogenes Differenzierungsmedium
ON	<i>over night</i> ; über Nacht
P	Passage
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PE	Phycoerythrin
R	<i>Responder</i>
rel.	relativ; relative Einheit
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay-Buffer</i>
ROS	<i>reactive Oxygen-Species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt-related Transcription Factor 2</i>
sec	Sekunde(n)
SOD	Superoxiddismutase
sog.	so genannt
T175	Zellkulturflaschen mit 175 cm ² Wachstumsfläche
T75	Zellkulturflaschen mit 75 cm ² Wachstumsfläche

TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> ; Trisgepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit 1 % Tween
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
U	<i>Units</i> ; Einheit(en)
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
WB	Western-Blot-Analyse
WNT	Wingless und Int-1

IV. **Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1 **Enchondrale Ossifikation**
- Abb. 2 **Grundlegendes Prinzip des *Tissue Engineerings***
- Abb. 3 **Einfluss von ROS auf Osteogenese und Adipogenese**
- Abb. 4 **Struktur des Häm B**
- Abb. 5 **Drei Formen des Wnt-Signalweges**
- Abb. 6 **Der Einfluss von ROS und FoxOs auf das *Wnt-Signaling***
- Abb. 7 **Immunphänotypische Charakterisierung der ASCs**
- Abb. 8 **Makroskopische Kontrolle der osteogenen Differenzierung, anhand der Alizarin-Rot-S-Färbung**
- Abb. 9 **Lichtmikroskopische Analyse der osteogenen Differenzierung**
- Abb. 10 **Evaluation der optimalen Katalase-Konzentration**
- Abb. 11 **Einfluss der Katalase-Behandlung auf die Zellviabilität**
- Abb. 12 **Einfluss der Katalase-Behandlung auf die Zellteilung**
- Abb. 13 **Analyse des DNA-Gehalts nach Katalase-Behandlung**
- Abb. 14 **Bestimmung der intrazellulären ROS-Konzentration**
- Abb. 15 **Relative Anzahl apoptotischer Zellen während der osteogenen Differenzierung**
- Abb. 16 **Optimale Dauer der Katalase-Behandlung für die osteogene Differenzierung**
- Abb. 17a/b **Einfluss der Katalase-Behandlung auf die Zellzahl**
- Abb. 18 **Proliferation unter Behandlung mit aktiver und inaktiver Katalase**
- Abb. 19 **Osteogene Differenzierung unter Behandlung mit aktiver und inaktiver Katalase**
- Abb. 20 **FoxO 1-Expression unter Katalase-Behandlung**

- Abb. 21** **FoxO 3a-Expression unter Katalase-Behandlung**
- Abb. 22** **β -Catenin-Expression unter Katalase-Behandlung**
- Abb. 23** **Proteinexpression von FoxO 1**
- Abb. 24** **Proteinexpression von FoxO 3a**
- Abb. 25** **Proteinexpression von β -Catenin**

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Geräte
Tabelle 2	Verwendetes Verbrauchsmaterial
Tabelle 3	Verwendete Chemikalien und Substanzen
Tabelle 4	Verwendete Kits
Tabelle 5	Verwendete Primärantikörper Western Blot
Tabelle 6	Verwendete Sekundärantikörper Western Blot
Tabelle 7	Verwendete Antikörper zur Charakterisierung von ASC
Tabelle 8	Verwendete Sekundärantikörper Durchflusszytometrie
Tabelle 9	Verwendete Medien, Puffer und Lösungen
Tabelle 10	Verwendete Software
Tabelle 11	BSA-Standardverdünnung für die Proteinbestimmung

VI. Inhaltsverzeichnis

I.	Deutsche Zusammenfassung.....	i
II.	Englische Zusammenfassung.....	ii
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	iii
IV.	Abbildungsverzeichnis.....	vii
V.	Tabellenverzeichnis	ix
VI.	Inhaltsverzeichnis	x
1.	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen der Knochenbildung	2
1.1.1	Knochenremodellierung und Frakturheilung.....	3
1.2	<i>Bone Tissue Engineering</i>	4
1.3	Adipogene Stromazellen	7
1.3.1	Mechanismen der <i>In-vitro</i> -Osteogenese von ASCs.....	8
1.4	Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies	9
1.4.1	Physiologische Quellen und Nutzen von ROS	9
1.4.2	ROS in der Osteogenese von ASCs.....	10
1.4.3	Katalase - ein antioxidatives Enzym mit Auswirkungen auf die Osteogenese von ASCs	11
1.5	Molekulare Mechanismen der Osteoblastogenese	12
1.5.1	Die Bedeutung des Wnt-Signalweges in der osteogenen Differenzierung.....	13
1.5.2	Die Bedeutung von <i>Forkhead-Box</i> -Proteinen bei Zellhomöostase und deren Wechselwirkungen mit dem Wnt-Signalweg unter dem Einfluss von ROS während der Osteogenese	15
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2.	Material.....	19
2.1	Geräte	19
2.2	Verbrauchsmaterial	21

2.3	Substanzen.....	24
2.4	Kits	26
2.5	Antikörper	27
2.5.1	Western Blot	27
2.5.2	Durchflusszytometrie.....	28
2.6	Medien, Puffer und Lösungen.....	29
2.7	Software	31
3.	Methoden	33
3.1.1	Isolation von humanen adipogenen Stromazellen (ASCs)	33
3.1.2	Zellkulturpflege	33
3.1.3	Passagieren der ASCs	34
3.1.4	Kryokonservierung von ASCs	35
3.1.5	Auftauen der ASCs	35
3.1.6	Osteogene Differenzierung der ASCs.....	36
3.2	Visualisierung und Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und Cetylpyridiniumchlorid-Rücklösung.....	36
3.3	Zellviabilitäts-Messung.....	37
3.4	Bestimmung der Zellproliferation mithilfe des BrdU-Assays	37
3.5	Quantifizierung des DNA-Gehalts mittels NanoDrop™	38
3.6	Bestimmung der intrazellulären ROS-Konzentration	38
3.7	Immunphänotypische Charakterisierung der ASCs mittels Durchflusszytometrie.....	39
3.8	Bestimmung der Apoptose mittels PI/Hoechst im Durchflusszytometer	39
3.9	Bestimmung der Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse.....	40
3.9.1	Auftrennung der Proteine in eine zytoplasmatische und nukleäre Fraktion	40
3.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	40

3.9.3	Die <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (SDS-PAGE)	41
3.9.4	Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran.....	44
3.9.5	Nachweis des Transfers auf die Nitrozellulosemembran mittels Ponceau-S-Färbung	44
3.9.6	Immunmarkierung und Quantifizierung der Proteinexpression	44
3.9.7	Strippen der Membran	45
3.10	Statistische Auswertung	46
3.11	Ethikvotum.....	46
4.	Ergebnisse.....	47
4.1	Immunphänotypische Charakterisierung der ASCs.....	47
4.2	Visualisierung der osteogenen Differenzierung adipogener Stromazellen mittels Alizarin-Rot-Färbung.....	48
4.3	Ermittlung der optimalen Katalase-Konzentration	50
4.4	Vergleich der Proliferation unter Einfluss von Katalase.....	52
4.5	Der Einfluss der Katalase auf die intrazelluläre ROS-Konzentration in der frühen Phase der Osteogenese	56
4.6	Bestimmung der Apoptose während der osteogenen Differenzierung	57
4.7	Ermittlung der optimalen Behandlungsdauer mit Katalase	58
4.8	Ein Vergleich zwischen der Behandlung mit aktiver vs. inaktiver Katalase ...	62
4.9	Bestimmung der Aktivierung der Proteinexpression von FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin im Verlauf der osteogenen Differenzierung.....	64
4.10	Analyse der Proteinexpression von FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin in der zytoplasmatischen und der nukleären Fraktion unter verschiedenen Behandlungen .	67
5.	Diskussion.....	71
5.1	Auswirkungen antioxidativer Enzyme (Katalase) und reaktiver Sauerstoffspezies (H_2O_2) auf die Proliferation und osteogene Differenzierung der ASCs	71

5.1.1	Evaluation der optimalen Katalase-Konzentration für die osteogene Differenzierung der ASCs	75
5.1.2	Ein Vergleich zwischen aktiver und inaktiver Katalasebehandlung	75
5.1.3	Die intrazelluläre ROS-Konzentration in der frühen Phase der Osteogenese	78
5.1.4	Die Apoptose von ASCs während der osteogenen Differenzierung.....	79
5.2	Einfluss von antioxidativen Enzymen (Katalase) und reaktiven Sauerstoffspezies (H ₂ O ₂) auf die Proteinexpression von FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin unter verschiedenen Behandlungen.....	81
5.2.1	Analyse der Proteinexpression an vorher festgelegten Messzeitpunkten und Rückschlüsse auf die Aktivität und Interaktion zwischen FoxO und <i>Wnt-Signaling</i>	81
5.3	Schlussfolgerungen und Abschlussbetrachtung.....	83
5.4	Ausblick	85
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis	88

1. Einleitung

Aufgrund der demographischen Entwicklung stellen Erkrankungen des menschlichen Skeletts ein immer größeres Problem dar. Insbesondere degenerative Gelenkveränderungen und Osteoporose sind bedeutende und kostenintensive Volkserkrankungen der Industrienationen, deren Inzidenz immer weiter ansteigt. Laut der „Gesundheitsberichterstattung des Bundes“ des Jahres 2015, einer Datenbank des Robert-Koch-Institut und dem Statistischen Bundesamt, belaufen sich die Kosten von arthrotischen Erkrankungen allein in Deutschland im Jahr 2015 auf 8,708 Mrd. € und die der Osteoporose im gleichen Jahr auf 1,964 Mrd. € [1]. Häufig sind die entsprechenden Therapiemöglichkeiten allerdings nicht suffizient, oder verschaffen nur eine symptomatische Besserung.

Kurative Therapieansätze stützen sich bei degenerativen Gelenkerkrankungen in der Regel auf eine endoprothetische Versorgung des entsprechenden Gelenks. Dabei sind die postoperativen Komplikationen, wie z. B. Infektionen, Dislozieren der Implantate, oder Versteifung des Gelenks und verminderte Mobilität des Patienten keine Seltenheit. Die Behandlung der Osteoporose hingegen setzt sich aus einer Vielzahl von symptomatischen und supportiven Maßnahmen, wie z. B. ausgewogene Ernährung, Bewegung, Schmerzbewältigung und Sturzprävention zusammen. Therapieansätze in kurativer Intention sehen oftmals den Einsatz von Kalzium- und Vitamin-D-Präparaten sowie Bisphosphonaten vor. Damit soll einerseits der Knochenaufbau gefördert und andererseits die Resorption der Knochenmatrix verhindert werden. Bei postmenopausalen Frauen werden oftmals Östrogen-Analoga/-Rezeptormodulatoren eingesetzt, um somit dem Östrogen-Mangel und dem damit verbundenen Knochenabbau entgegen zu steuern. Außerdem kann Denosumab eingesetzt werden, ein monoklonaler Antikörper, welcher spezifisch an RANKL bindet und somit die Reifung von Osteoklasten verhindert [2]. Darüber kann dann der Knochenabbau reduziert werden. Des Weiteren wird bei einer Verschlechterung der Symptomatik und mehrfachen Wirbelkörperfrakturen manchmal Teriparatid eingesetzt, welches als rekombinantes Parathormon-Fragment die Bildung und Aktivität von Osteoblasten fördern kann [3]. Auch wenn die Wirksamkeit dieses Präparates sehr gut ist, beschränken die Nebenwirkungen und das osteokarzinogene Potenzial die maximale Behandlungsdauer derzeit auf 2 Jahre [4]. Weitere vielversprechende Therapeutika stellen Sclerostin-Antikörper dar. Sclerostin ist ein Glycoprotein, das vermehrt bei Immobilisation, Adipositas und postmenopausalen

Frauen ausgeschüttet wird und den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg hemmt [5]. Romosozumab, als monoklonaler Sclerostin-Antikörper zeigte bereits in Phase 2 und 3 Studien gute Ergebnisse. Dabei war die Knochendichte signifikant erhöht und die Frakturneigung deutlich reduziert [5]. Daher sehen viele auch im Bereich des *Bone Tissue Engineering* eine große Hoffnung für eine erfolgreiche kausale Therapie der Osteoporose.

Auch die Sanierung von diversen Knochendefekten stellt eine große Herausforderung dar, wenn der Defekt zu groß, oder die Frakturierung zu kompliziert ist (beispielsweise Trümmerfrakturen). Ursachen für solche Knochendefekte sind vielfältig und können unter anderem durch schwere Traumata, Zysten, Atrophien, systemische Erkrankungen, Missbildungen, Tumoren, Infektionen, oder Implantatversagen bedingt sein. In vielen Fällen kann der Defekt durch artifizielle Materialien zum Knochenersatz (wie z. B. Knochenzement, Implantate aus Metall, oder Keramik) ausgefüllt werden. Außerdem gibt es die Möglichkeit eines autologen, oder heterologen Knochentransplantates. Dabei wird dem Spender Spongiosa entnommen, die dem Empfänger in den Defekt implantiert wird, sodass sich dort neues Knochengewebe bilden kann. Allerdings stellen das oftmals nicht suffiziente Einwachsen, Abstoßung oder Infektion des Transplantates und die erhöhte Morbidität von Spender und Empfänger limitierende Faktoren dieses Therapiekonzeptes dar. Eine effektive kurative Therapie für die genannten Defekten könnte das *Tissue Engineering and regenerative Medicine* (TERM) liefern. Hierbei wird versucht Gewebsdefekte mit einer synergistischen Kombination aus meist abbaubaren, biomimetischen Stützgerüsten (sogenannte *Scaffolds*), nanomedizinischen Materialien, differenzierten Stammzellen, Effektorproteinen und Wachstumsfaktoren zu beheben [6].

1.1 Grundlagen der Knochenbildung

Aus embryologischer Sicht kann die Bildung von Knochengewebe prinzipiell in eine direkte/desmale, oder indirekte/enchondrale Ossifikation eingeteilt werden. Bei Letzterer wird zunächst Knorpelgewebe gebildet, welches in der weiteren Entwicklung mineralisiert und zu Knochengewebe umgebaut wird (Abb. 1). Nur bei der Ausbildung des Schlüsselbeinschaftes, des Schädeldaches, oder des Gesichtsschädels geschieht die Osteogenese auf direktem Wege. Das restliche Skelett entwickelt sich mittels enchondraler Ossifikation [7].

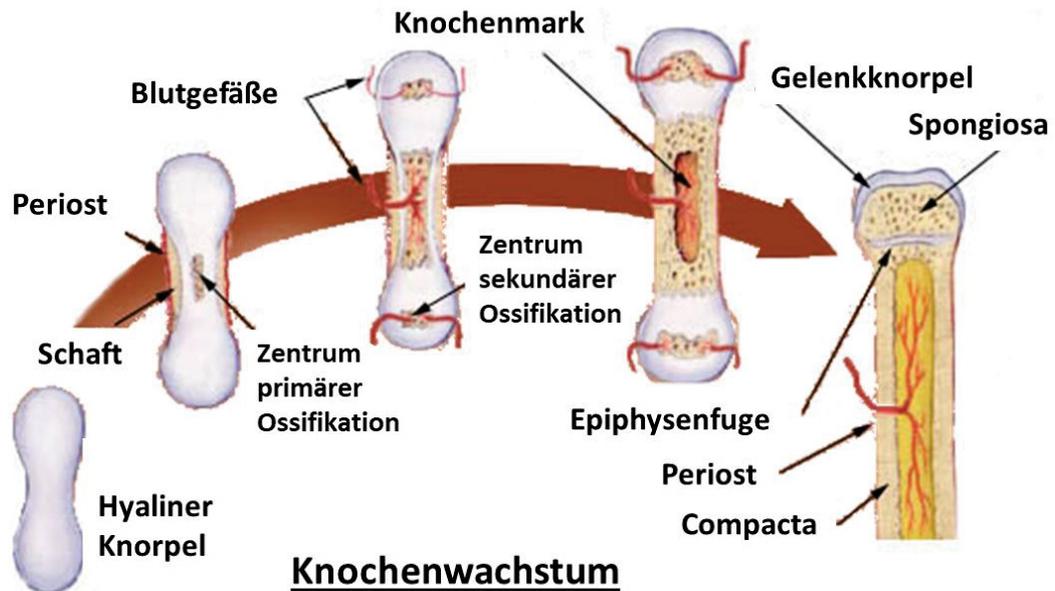


Abb. 1 Enchondrale Ossifikation. Hier sind die Stadien der enchondralen Ossifikation dargestellt, die bei der Entstehung des Hauptteils des menschlichen Skeletts eine bedeutende Rolle spielen [modifiziert nach [8]].

1.1.1 Knochenremodellierung und Frakturheilung

Auch die Frakturheilung verläuft in der Regel enchondral und kann in 4 Stadien unterteilt werden. Kurz nach der Fraktur entwickelt sich eine nicht-spezifische Entzündungsreaktion im Frakturspalt und umliegenden Gewebe. Durch die Blutung aus den Frakturändern bildet sich ein Hämatom, welches sich durch einschwemmende Thrombozyten, Makrophagen und andere Immunzellen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) zu einem Fibrinthrombus entwickelt [9]. Das Ausschütten von Zytokinen und Wachstumsfaktoren lockt weitere Zellen an und fördert die Kapillarbildung im Entzündungsherd. Somit entsteht ein Granulationsgewebe. Unter den Zellen, die von den verschiedenen Zytokinen angelockt werden, sind auch MSC, die aus dem umliegenden Periost, Knochenmark und Bindegewebe, sowie dem zirkulierenden Blut entstammen [9]. Im zweiten Schritt der Frakturheilung differenzieren einige MSCs zu Knorpelzellen, die dann, durch die Sekretion von Kollagen Typ 2, eine Knorpelmatrix bilden [10]. Die Stellen, an denen eine Knorpelbildung nicht möglich ist, werden von Fibroblasten mit fibrösem Bindegewebe ausgefüllt. Somit entsteht der s. g. weiche Kallus. Letztlich hypertrophieren die Chondrozyten und mineralisieren die Extrazellulärmatrix um danach in Apoptose überzugehen [9]. Durch pro-angiogenetische Faktoren und Zytokine wird die Gefäßneubildung und -verflechtung im Kallus weiter gefördert [11]. In der dritten Phase der Frakturheilung differenzieren Osteoprogenitorzellen und MSCs in der

Peripherie des Kallus zu Osteoblasten. Diese proliferieren und beginnen den weichen Kallus von der Peripherie zum Zentrum hin zu mineralisieren. Somit wird die Knorpelmatrix ersetzt und es entsteht allmählich der harte Kallus [11]. Dieser Prozess kann allerdings nur während mechanischer Stabilität erfolgen, sodass eine Ruhigstellung der Fraktur zwingend erforderlich ist [9]. Im letzten Schritt wird die noch ungleichmäßig geflochtene Knochenstruktur des harten Kallus umstrukturiert, sodass eine physiologische Matrix aus kortikalen und laminaren Anteilen entsteht [11]. Für die Knochenumstrukturierung sind Osteoklasten maßgeblich verantwortlich. Sie können an bestimmten Stellen Knochengewebe abbauen, wonach Osteoblasten anschließend an statisch relevanten Stellen Knochensubstanz auffüllen. Dieses Zusammenspiel führt letztendlich zu der Knochenstruktur, die den späteren Belastungen standhält. Osteoklasten entstammen allerdings aus der hämatopoetischen Zelllinie und differenzieren aus myeloischen Vorläuferzellen [12].

1.2 Bone Tissue Engineering

Da es sich beim Knochen um ein Stützgewebe handelt, welches einerseits sehr rigide und druckstabil, aber andererseits auch elastisch und zugfest ist, sind die Anforderungen im Bereich des *Bone Tissue Engineering* enorm und die Entwicklung eines solch komplexen Gewebes anspruchsvoll. Während sich in den letzten drei Jahrzehnten zwar die konservativen und operativen Methoden und Materialien zur Therapie von Knochendefekten deutlich verbessert haben, konnte seit der Einführung des *Bone Tissue Engineerings*, aufgrund immenser Kosten und geringer Daten bisher kein kommerziell erhältliches Therapiekonzept hervorgebracht werden [13]. Allerdings gibt es erste klinische Studien mit MSCs, die vielversprechende Ergebnisse für eine Behandlung solcher Knochendefekte zeigen. Die Arbeitsgruppe um Berner et al. konnte bereits eine experimentelle *in vivo* Therapie an Schafen etablieren, bei der *bone marrow derived stem cells* (BMSCs) in Kombination mit einem Stützgerüst zur Regeneration von Knochendefekten kritischer Größe führte [14]. Dabei wurden die Stützgerüste direkt nach Entstehung des Knochendefektes eingebracht und nach 4 Wochen erfolgte die Beimpfung des Gerüsts mit den BMSCs. Diese Strategie führte zu einem verbesserten Anwachsen und Stabilisierung des autologen Stammzelltransplantates, da die Neovaskularisierung in den 4 Wochen bis zur Beimpfung die Nährstoffversorgung deutlich optimieren konnte [14]. Die biomechanischen und histomorphologischen Analysen der Implantate zeigten

Eigenschaften, die mit einem allogenen Knochentransplantat zu vergleichen sind [14]. Als weiteres Beispiel der Anwendung von *Bone Tissue Engineering* wurden in der Arbeit von Sandor et al. 13 klinische Studien analysiert, bei denen Knochendefekte an Schädel- und Gesichtsknochen, sowie dem Oberkiefer mithilfe von *Scaffolds* therapiert wurden, welche mit ASCs beimpft waren [15]. Bei 10 von 13 Patienten zeigte sich ein erfolgreiches Einwachsen des Konstruktes in das jeweils umliegende Knochengewebe nach 12-52 Monaten (verschiedene *follow-up* Zeitpunkte der einzelnen Studien). Auch wenn diese Ergebnisse vielversprechend sind, reicht die Datenlage nicht aus, um eine standardisierte Therapie beim Menschen anbieten zu können. Die folgende Abbildung soll zur Veranschaulichung ein grundsätzliches Therapiekonzept des *Bone Tissue Engineering*s darstellen.

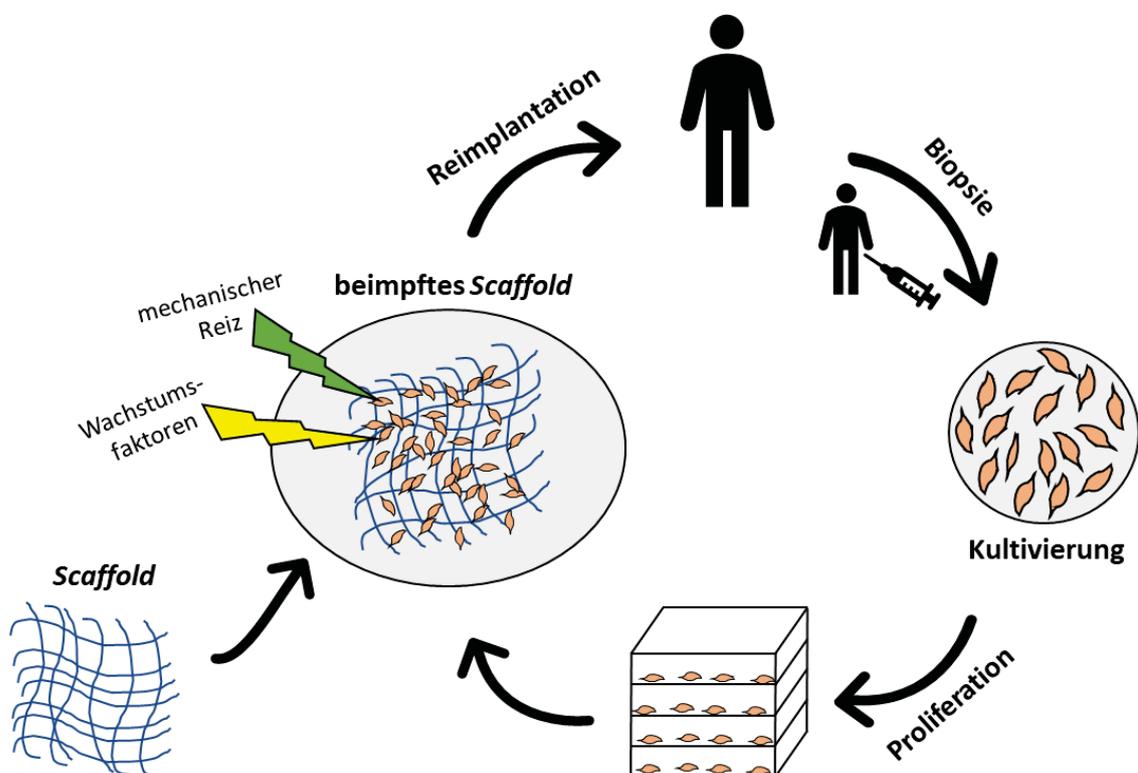


Abb. 2 Grundlegendes Prinzip des *Tissue Engineerings*. Vereinfachtes Modell des *Tissue Engineerings* [modifiziert nach [16]]

Der *Scaffold* (Leitgerüst, oder Stützstruktur), welcher beim *Bone Tissue Engineering* in den Defekt implantiert werden soll, stellt eine Schlüsselkomponente dar und sollte Eigenschaften für Stabilität und Osteoinduktivität haben. Einerseits dient er dazu, den Defekt auszufüllen, um das Infektionsrisiko dieses Raumes zu vermindern und andererseits eine Grundstabilität zu gewährleisten, sodass die Frakturrenden nicht dislozieren können. Dabei ist das Gerüst wegen der strukturellen Beschaffenheit

allerdings nicht voll belastbar. Denn um möglichst gute Bedingungen für Adhärenz, Nährstoffversorgung und Proliferation der Stammzellen schaffen zu können, benötigen die *Scaffolds* viele verzweigte Poren mit einer großen und rauen Oberfläche. Geeignete Materialien für solche Gerüste sind Keramik, natürliche oder synthetische Polymere, oder Komposit Materialien [17]. Diese Materialien sind allerdings nicht so druck- und zugstabil wie vitaler Knochen oder Metallimplantate, was ihre Belastbarkeit in den ersten Wochen begrenzt. Außerdem sollten Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle vorhanden sein, die das Wachstum und die osteogene Differenzierung der Zellen, sowie die Neoangiogenese in das sich neu formende Gewebe fördern. Gerade das Ausbilden neuer Gefäße stellt eine große Herausforderung dar, da die Nährstoffe mithilfe von Diffusion nur ca. 100-200 μm überbrücken können [18]. Neben osteoinduktiven Wachstumsfaktoren wie z. B. BMP-2 könnte der *Scaffold in vivo* ebenfalls mit angiogenetischen Faktoren wie VEGF, oder HIF-1 α beschichtet sein, um neben der suffizienten Osteogenese auch eine gute Angiogenese im Transplantat zu erreichen [19, 20]. Für eine optimale *in vitro* Differenzierung könnten sich sogenannte Bioreaktoren eignen. Diese sind in der Lage, über die Einstellung des pH-Wertes, der Temperatur, Sauerstoffsättigung und Nährstoffzusammensetzung sowie der Zirkulation des Mediums, physiologische Bedingungen für eine osteogene Differenzierung zu erreichen [17]. Eine weitere Möglichkeit für suffiziente Vaskularisierung im *Scaffold* könnten Mikrokapillaren sein, die durch Photolithographie im Gerüst eingearbeitet sind. Diese Technologie, welche ursprünglich in der Mikroelektronik, Automobilindustrie und Luftfahrt eingesetzt wird, könnte für den nötigen Blutstrom sorgen und damit die Nährstoffversorgung gewährleisten, bis sich eigene Blutgefäße ausgebildet haben [21]. Des Weiteren konnten Liu et al. bereits zeigen, dass eine Co-Inkubation von MSCs mit Endothelvorläuferzellen eine verbesserte Vaskularisierung des sich neu formenden Knochengewebes bewirkt [19].

Geeignete Zellquellen beim *Bone Tissue Engineering* sind unter anderem Stromazellen aus Knochenmark, adipogene Stromazellen, periostale Zellen, Osteoblasten und embryogene Stammzellen [13]. Bei der Wahl des Zelltyps ist eine niedrige Spendermortalität, gute Proliferations- und Differenzierungskapazität, kontrollierbare Induktion der Osteogenese und wirksames Einwachsen zu funktionellem Knochengewebe von Bedeutung [17]. Aufgrund dieser Anforderungen stellen sich die adipogenen Stromazellen als besonders interessante Zellquelle dar.

1.3 Adipogene Stromazellen

Adipogene Stromazellen (ASC) sind in die Gruppe der multipotenten mesenchymalen Stammzellen einzuordnen. ASCs haben die Möglichkeit adipogen, osteogen, chondrogen, myogen und endothelial zu differenzieren [22]. Neben ihrer unproblematischen Vermehrung *in vitro* ist die Gewinnung von ASCs unter den mesenchymalen Stammzellen mitunter am Einfachsten und Schonendsten [23]. Sie können aus Fettgewebe, oder Liposuktionsfett isoliert werden. Im Vergleich dazu ist die Gewinnung von BMSCs über eine Knochenmarkspunktion mit einer größeren Entnahmemorbidität verbunden. Außerdem ist die Ausbeute der ASCs im Vergleich zu den anderen Zelltypen hoch. Während bei der Isolation von BMSCs ca. 0,001 – 0,1 % des Aspirates „Stammzellen“ sind, sind es bei den ASCs 1 – 5 % [18]. Dadurch können in kürzerer Zeit mehr Zellen kultiviert und differenziert werden. Im *Bone Tissue Engineering* stellt dies einen bedeutenden Vorteil dar, weil bei größeren Knochendefekten große Mengen an MSCs benötigt werden.

Die bei der Isolation von ASCs gewonnene Zellsuspension enthält neben den ASCs hämatopoetische Stroma- und Vorläuferzellen, sowie Erythrozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Perizyten, Lymphozyten und weitere Zelltypen [24, 25]. Diese Zusammensetzung wird daher auch stromavaskuläre Fraktion (SVF) genannt. Durch mehrfaches Waschen der Zellkultur, werden die plastikadhärenten ASCs selektioniert. Allerdings könnte diese Vielzahl an verschiedenen Zellen auch genutzt werden. Gerade die Endothelzellen, welche in der SVF enthalten sind könnten von großem Vorteil für eine Verwendung der ASCs im *Bone Tissue Engineering* haben. Wie Liu et al. bereits an MSCs zeigen konnten, fördert die gleichzeitige Co-Kultivierung von Endothelvorläuferzellen mit MSCs die Vaskularisierung in das transplantierte *Scaffold* [19]. Würde man es also schaffen auch die Endothelzellen zu kultivieren und anschließend mit den differenzierten Osteoblasten, welche sich aus den ASCs entwickelt haben, in das *Scaffold* einzubringen, könnte man auch hier die Vaskularisierung steigern. Diesen Ansatz teilten Güven et al. ebenfalls und untersuchten das Potential der SVF aus humanem Fettgewebe als Zellquelle für die Verwendung im *Bone Tissue Engineering*. Dabei konnten sie zeigen, dass die SVF mit endothelialen und mesenchymalen Progenitorzellen zu einer verbesserten Formation und Einwachsen von Knochengewebe, sowie einer gesteigerten Vaskularisierung in das Stützgerüst führte [26]. Des Weiteren sind ASCs in der Lage *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) zu sezernieren,

welcher die Angiogenese fördert und die Vaskularisierung somit auch positiv beeinflusst [27].

Die osteogene Differenzierung der Adipogenen Stromazellen ist *in vitro* und *in vivo* erfolgreich durchführbar, was bereits mehrfach gezeigt werden konnte [18, 22, 27] und kann *in vitro* unter anderem durch die Zugabe von L-Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat, und Dexamethason zum Kulturmedium induziert werden [28]. Außerdem kann die Osteogenese der ASCs durch eine Zugabe von BMP-2 und FGF-2 gesteigert werden [27, 29]. Allerdings scheinen auch mechanische Einwirkungen einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung zu nehmen. Bodle et al. konnten zeigen, dass Zugbelastungen auf die ASCs einen osteoinduktiven Effekt hat. Auch die Scherkräfte eines konstant in Bewegung gehaltenen Kulturmediums (z. B. auf einem *Shaker*) förderten die osteogene Differenzierung der Zellen [22].

1.3.1 Mechanismen der *In-vitro*-Osteogenese von ASCs

Auch in dieser Arbeit wurde die osteogene Differenzierung der ASCs durch die Zugabe von Ascorbinsäure, Dexamethason und β -Glycerophosphat zum Proliferationsmedium induziert (siehe Tab. 9). Hier sollen nun einmal die osteoinduktiven Mechanismen dieser Zusätze erläutert werden.

Das Dexamethason induziert eine vermehrte FHL2-vermittelte (*Four and a half LIM domains protein 2*) Translokation von β -Catenin in den Nukleus, mit anschließender Bindung an TCF/LEF-1 und einer damit einhergehenden, gesteigerten Transkription von Runx2, alkalische Phosphatase und Kollagen Typ 1 [30]. Als weiterer Bestandteil des Differenzierungsmediums ist die Ascorbinsäure in der Lage den Transport von Kollagen Typ 1 aus der Zelle in den extrazellulären Raum zu fördern und somit zur Ausbildung des Osteoids beizutragen [31]. Die dadurch entstehende extrazelluläre Matrix (EZM) interagiert außerdem zunehmend mit bestimmten Integrinen, die über Rezeptoren an der Zellmembran die ERK1/2-vermittelte intrazelluläre MAPK-Signalkaskade stimulieren, welche wiederum die Aktivität von Runx2 erhöht [31]. β -Glycerophosphat als letzte Komponente des Differenzierungsmediums dient der EZM als Phosphat-Lieferant zur Ausbildung von Hydroxylapatitkristallen und damit zur Mineralisation der EZM, wodurch die *in-vitro* Osteogenese der ASCs komplettiert wird [31].

Es sollte allerdings beachtet werden, dass das Differenzierungspotential verschiedener Spenderzellen aufgrund von intra- bzw. interpersonellen Unterschieden sehr unterschiedlich sein kann. Dabei spielen mehrere Faktoren, wie z. B. das Alter des Spenders, die Passage der Zellen und die Konfluenz der Zellen im Kulturmedium eine entscheidende Rolle. Gerade MSCs oder ASCs junger Donoren und niedrige Passagen sind in der Lage eine suffiziente osteogene Differenzierung zu erreichen [32]. Abbildung 7 zeigt dazu einen Vergleich zwischen ASCs dreier Spender, die bei gleicher Behandlung, jedoch unterschiedlichen Alters verschiedene Resultate bezüglich der osteogenen Differenzierung erzielten (Kap. 4.2).

1.4 Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies sind chemische Verbindungen, die ein starkes Reaktionspotential haben und dadurch in höheren Konzentrationen viele Makromoleküle, wie z. B. die DNA, RNA, Lipide und Proteine schädigen können [33]. Unter oxidativem Stress wird allgemein ein Zustand beschrieben, bei dem Zellen einer vermehrten Konzentration an reaktiven Sauerstoffverbindungen/-spezies (ROS) ausgesetzt sind, als es unter physiologischen Bedingungen der Fall ist. Dadurch sind sie an der Entstehung verschiedener Pathologien, wie z. B. Diabetes Mellitus, rheumatoider Arthritis, Osteoporose, kardiovaskulärer Erkrankungen, neurodegenerativer Störungen und einiger Tumorentitäten beteiligt [33-35]. Auf der anderen Seite dienen ROS als *Second Messenger*, die u. a. Prozesse der Proliferation und Differenzierung modulieren können [36]. Darüber hinaus werden sie von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zur unspezifischen Abwehr von Mikroorganismen genutzt [37, 38]. Die Funktionen von reaktiven Sauerstoffspezies sind allerdings weitestgehend von ihrer Konzentration und Lokalisation abhängig. Um bei zu hohen ROS-Konzentrationen das physiologische Gleichgewicht wieder herzustellen, dienen vor allem die Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPX) und die Katalase als Puffersysteme [39].

1.4.1 Physiologische Quellen und Nutzen von ROS

Bei der intrazellulären Produktion von ROS spielen vor allem die Mitochondrien eine entscheidende Rolle. Dort fällt im Komplex I und III der Atmungskette das hochreaktive O_2^\bullet Superoxidanionradikal als Nebenprodukt an, welches durch die SOD zum weniger

reaktiven H_2O_2 umgewandelt wird [40]. Weitere Quellen für ROS stellen die Plasmamembran, Lysosomen, Peroxisomen und das endoplasmatische Retikulum dar [40]. Besonderes Merkmal sollte auch auf die NADPH-Oxidasen (NOX) gelegt werden. Diese sind in der Plasmamembran menschlicher Zellen zu finden, im Speziellen in der Membran von Phagosomen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen. Sie sind neben der Produktion von ROS in der Atmungskette der Mitochondrien maßgeblich an der Balance der ROS-Konzentration in der Zelle beteiligt und spielen als ROS-Produzent von Phagosomen und neutrophilen Granulozyten eine bedeutende Rolle in der Abwehr von Antigenen [41]. Durch Oxidation von NADPH zu NADP^+ wird ein Elektron durch die Membran auf ein intrazelluläres Sauerstoff-Molekül transferiert, wobei ein O_2^\bullet Superoxidanionradikal entsteht [42]. In weiteren Schritten wird dieses dann zu sogenannten sekundären ROS umgewandelt und es entsteht H_2O_2 , Hydroxylradikal ($^\bullet\text{OH}$), oder das Peroxinnitratianion (ONOO^-).

Neben den bereits oben erwähnten Schäden an diversen Makromolekülen, bei zu hohen Konzentrationen reaktive Sauerstoffspezies, werden ihnen mittlerweile eine Reihe von positiven Eigenschaften bei der Zellhomöostase, der Abwehr gegen Mikroorganismen und einigen Signal- und Transduktionswegen zugeschrieben [36]. Dabei verläuft die Aktivierung der Signalwege anders ab als bei klassischen Ligand-Rezeptor-Beziehungen mit spezifischen Bindungsstellen. Die ROS gehen dagegen eine chemische Reaktion mit verschiedenen funktionellen Gruppen des jeweiligen Makromoleküls ein, wobei die Funktion des Moleküls entscheidend verändert wird [43]. Aufgrund der hohen Reagibilität der ROS mit vielen Makromolekülen (vor allem Proteinen) erhöht sich das Wirkspektrum der ROS als Signalinduktor wesentlich und ist bis dato noch nicht ausreichend geklärt.

1.4.2 ROS in der Osteogenese von ASCs

Wie andere mesenchymale Stromazellen, haben auch die ASCs die Möglichkeit sich adipogen, osteogen, chondrogen, myogen und endothelial zu differenzieren [22]. Bei der Determinierung welche Differenzierungsrichtung ASCs einschlagen, sind reaktive Sauerstoffspezies maßgeblich beteiligt. In Phasen der Proliferation weisen die MSCs aufgrund des eher glykolytischen Stoffwechsels geringe Mengen an intrazellulärem ROS auf [44]. Bei höheren Konzentrationen an ROS sistiert das osteogene Differenzierungspotential und die MSCs schlagen eher eine adipogene Differenzierung

ein [siehe Abb. 3 [42]]. Viele Ergebnisse zeigen, dass MSCs unter zusätzlicher Applikation von antioxidativen Enzymen und einer damit verbundenen signifikanten Verminderung der ROS-Konzentration, vermehrt osteogen differenzieren [45]. Dabei werden die osteoinduktiven Signalwege von Wnt/ β -Catenin, MAPK (Nell-1) und Hedgehog vermehrt aktiviert, wodurch eine osteogene Differenzierung begünstigt wird [42].

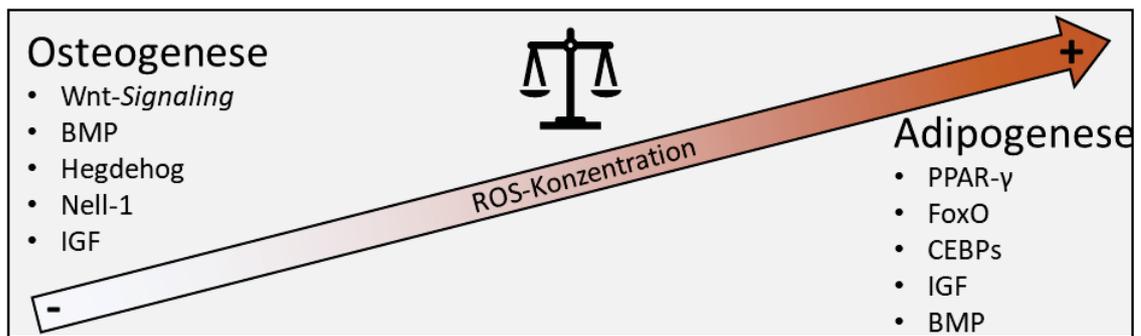


Abb. 3 Einfluss von ROS auf Osteogenese und Adipogenese. Bei höheren ROS-Konzentrationen differenzieren die MSCs bevorzugt adipogen, wohingegen geringere ROS-Konzentrationen eine osteogene Differenzierung begünstigen. Allerdings sind diese Verhältnismäßigkeiten vereinfacht dargestellt und geben nur Tendenzen in die jeweilige Richtung wieder. Wnt/ β -Catenin und Nell-1 bewirken hierbei die Osteogenese und PPAR- γ , FoxO und C/EBPs führen zu adipogener Differenzierung. BMP und IGF sind bei beiden Differenzierungswegen involviert. [modifiziert nach [42]]

1.4.3 Katalase - ein antioxidatives Enzym mit Auswirkungen auf die Osteogenese von ASCs

Katalase ist ein antioxidatives Enzym, das hauptsächlich in Peroxisomen in fast allen Zellen des Körpers vorkommt und die Degradierung von $2\text{H}_2\text{O}_2$ zu $2\text{H}_2\text{O}$ und O_2 in 2 Schritten katalysiert [46]. Es wurden 3 verschiedene Typen von Katalase beschrieben. Dabei stellt die Häm-basierte Katalase die am weitesten verbreitete und gründlichst untersuchte Art dar. Auf die anderen beiden, die Häm-basierte Katalase-Peroxidase und die Mangan-basierte Katalase soll hier nicht weiter eingegangen werden [46]. Die Häm-basierte Katalase besteht aus identischen tetrameren Untereinheiten, wobei jede davon ein Ferriprotoporphyrin mit einem Eisenion in seiner Mitte enthält (Abb. 4). Diese bilden zusammen als Protoporphyrinring mit 4 Eisenionen das aktive Zentrum des Enzyms [39]. Der Grund für die sehr schnelle und effiziente Reaktion der Katalase ist, dass es sich dabei um Elektronenverschiebungen handelt. Katalase ist somit in der Lage Millionen Moleküle Wasserstoffperoxid pro Sekunde zu disproportionieren [39].

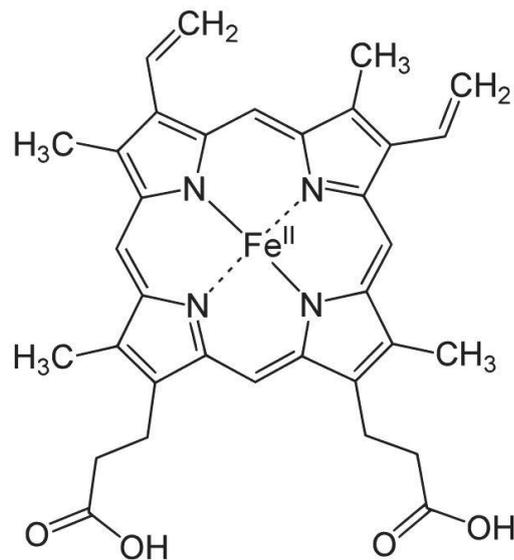
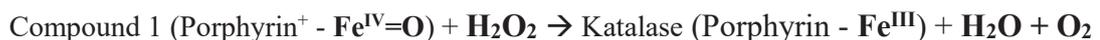


Abb. 4 Struktur des Häm B. Dargestellt ist das Häm B mit Porphyrin und zentralem Eisen-Ion. In jeder der 4 Untereinheiten der Häm-basierten Katalase befindet sich diese Struktur [47].

Im ersten Schritt überträgt ein zweiwertiges Eisenion 2 Elektronen auf jeweils ein Sauerstoffatom im ersten H_2O_2 , sodass ein Molekül H_2O entsteht. Das Eisen im Porphyrin ist temporär mit dem übrig gebliebenen Sauerstoff zu einem Complex (Compound I) verbunden und liegt nun oxidiert vor [46].



Im zweiten Schritt reagiert ein zweites H_2O_2 mit dem oxidierten Eisen, sodass jedes Sauerstoff-Atom je ein Elektron an das Eisen abgibt. Dadurch entsteht jeweils ein weiteres Molekül Wasser und Sauerstoff [46].



Aufgrund ihrer Effizienz und ihres Vorkommens im menschlichen Körper, sollte die Wirkung der Katalase als antioxidatives Enzym auf die osteogene Differenzierung von ASCs analysiert werden. Wie bereits beschrieben, stellen erhöhte ROS-Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf die Osteogenese dar und begünstigen eher eine adipogene Differenzierung [42, 48]. Eine Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies durch Katalase, könnte also die Osteogenese von ASCs fördern.

1.5 Molekulare Mechanismen der Osteoblastogenese

Bei der Osteoblastogenese ist eine Vielzahl an Signalkaskaden und Wirkmechanismen beteiligt, deren Abläufe und Interaktionen untereinander noch immer nicht vollständig

aufgeschlüsselt sind. Bestimmte biochemische und physikalische Bedingungen begünstigen die osteogene Reifung von mesenchymalen Stammzellen. Dabei stellen vor allem mechanische Belastungen (besonders Zug- und Scherkräfte), die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies und das Vorhandensein von osteoinduktiven Zusätzen (wie z. B. Dexamethason, L-Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat, BMP-2 und FGF-2) wichtige Parameter für die osteogene Differenzierung von MSCs dar [22, 28, 49, 50]. Ist eine Determinierung für die osteogene Zelllinie einmal erfolgt, laufen verschiedene Signalkaskaden ab, die die Aktivierung von osteogenen Transkriptionsfaktoren initiieren. Hier sind vor allem Runx2, Osterix (OSX), Osteopontin (OPN), SPARC/Osteonectin (*Secreted protein acidic and rich in cysteine*), alkalische Phosphatase (ALP) und Typ 1 Kollagen (COL1A1) zu nennen [51-54]. Für die Aktivierung dieser Faktoren ist der kanonische Wnt-Signalweg von essentieller Bedeutung. Daher soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden.

1.5.1 Die Bedeutung des Wnt-Signalweges in der osteogenen Differenzierung

Ähnlich der TGF- β -Superfamilie ist das *Wnt-Signaling* bei einer Vielzahl an Signalwegen der Zellregulation und -differenzierung involviert. Auch bei der osteogenen Differenzierung spielt es eine entscheidende Rolle. Auch der Wnt-Signalweg kann in einen kanonischen (abhängig von β -Catenin) und nicht-kanonischen (unabhängig von β -Catenin) unterteilt werden (Abb. 5). Wird der kanonische Signalweg nicht aktiviert, bindet Wnt nicht an den transmembranären Frizzled/Lrp5/6-Corezeptor-Komplex. Dadurch phosphoryliert der Protein-Komplex aus APC (*adenomatous polyposis coli*), Axin und GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) vermehrt β -Catenin, welches dann ubiquitiniert und im Proteasom degradiert wird [55]. Bindet jedoch Wnt an den Rezeptor Frizzled und LRP5/6, werden Axin, Frat-1 und Disheveled rekrutiert, wodurch GSK3 phosphoryliert und dadurch inhibiert wird. Somit wird β -Catenin nicht abgebaut, welches dann im Zytoplasma akkumuliert und vermehrt in den Nukleus transloziert [56]. Im Zellkern bindet es dann an den Protein-Komplex TCF/LEF-1 (*T cell factor/lymphoid enhancer binding factor*), der als Mediator u. a. die Expression der Zielgene Osterix und Runx2 aktiviert und damit die Osteoblastogenese fördert [52, 53]. Der nicht-kanonische Signalweg ist unabhängig von β -Catenin und hat eine weniger wichtige Bedeutung für die Osteogenese. Er kann noch einmal in einen Kalzium-abhängigen und einen Signalweg

eingeteilt werden, der über die Zell-Polarität aktiviert wird [57]. Ersterer wird letztlich durch eine vermehrte Ausschüttung von Kalzium aus dem Endoplasmatischen Reticulum aktiviert und spielt eine Rolle bei embryonischen Entwicklungsprozessen, Zellmigration und Tumorprogression [58, 59]. Letzterer wird durch die Änderung der Zell-Polarität aktiviert und ist an Prozessen der Migration, Motilität und Zellteilung beteiligt [60, 61].

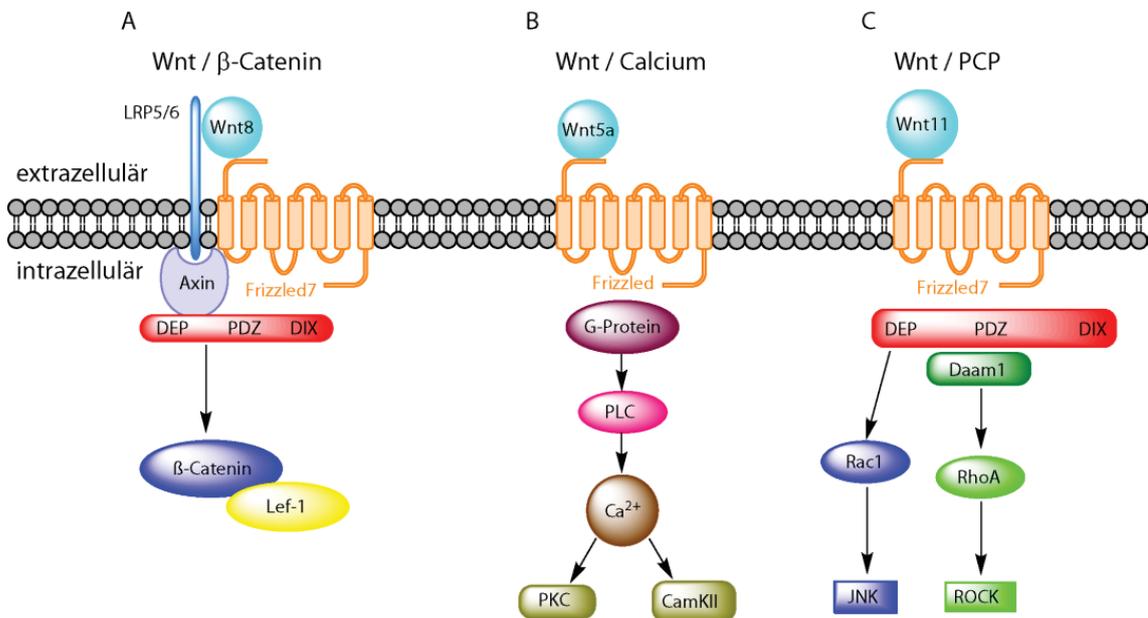


Abb. 5 Drei Formen des Wnt-Signalweges. Es werden die drei hauptsächlichsten Wnt-Signalwege dargestellt, die bei biologischen Signaltransduktionen eine Rolle spielen. A.) beschreibt den kanonischen Signalweg, B.) den nicht-kanonischen, Kalzium-abhängigen Signalweg und C.) den nicht-kanonischen Signalweg, der durch die Änderung der Zellpolarität aktiviert wird (PCP=*planar cell polarity*); [modifiziert nach [62]].

Aufgrund der großen Bedeutsamkeit des *Wnt-Signalings* in der Osteogenese von MSCs ist das Interesse an einem vollständigen Verständnis der vielen Wirkmechanismen, in denen Wnt-Proteine involviert sind, sehr hoch. Diese Aufklärung könnte die Entwicklung von therapeutischen Ansätzen für verschiedene Erkrankungen des Knochens, wie z. B. Osteoporose, *Osteogenesis imperfecta*, Knochendefekte kritischer Größe und Frakturheilung bedeutend fördern [57]. Mögliche Konzepte könnten einerseits die inhibierenden Faktoren hemmen, oder andererseits bestimmte Modulatoren des Wnt-Signalweges stimulieren, um so die osteoinduktive Wirkung des Wnt-Signalweges zu erhöhen. Als Beispiel der Hemmung von inhibierenden Faktoren ist das Romosozumab zu nennen. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Sclerostin-Antikörper. Sclerostin ist ein Glycoprotein, welches vermehrt bei postmenopausalen Frauen, Immobilisation und Adipositas ausgeschüttet wird und den kanonischen Wnt/β-Catenin-Signalweg hemmt [5]. In Phase 2 und 3 Studien konnten bereits vielversprechende

Ergebnisse gezeigt werden, bei denen die Knochendichte signifikant gesteigert und die Frakturneigung deutlich gemindert war [5]. Als weiterer hemmender Faktor des Wnt-*Signalings* sind erhöhte ROS-Konzentrationen zu nennen. Almeida et al. zeigten, dass reaktive Sauerstoffspezies in erhöhten Konzentrationen zu einer vermehrten Bindung von β -Catenin mit FoxO führen und dass der kanonische Wnt-Signalweg dadurch wesentlich gehemmt ist [48, 63]. Auch Atashi et al. beschrieben diese osteogene Hemmung durch ROS und formulierten das osteoinduktive Potenzial, welches durch eine Regulation der reaktiven Sauerstoffspezies erreicht werden könnte [42]. Aufgrund der Interaktion von FoxOs mit dem Wnt-Signalweg und ihrer ROS-abhängigen Inhibition, soll im Folgenden näher auf diese Wechselwirkungen eingegangen werden.

1.5.2 Die Bedeutung von *Forkhead-Box*-Proteinen bei Zellhomöostase und deren Wechselwirkungen mit dem Wnt-Signalweg unter dem Einfluss von ROS während der Osteogenese

Forkhead-Box-Proteine (Fox) sind charakterisiert durch eine gabelartige DNA-Bindestelle und sind in der Lage, abhängig von ihrer Phosphorylierung, zwischen Zytoplasma und Nukleus zu translozieren. Es gibt verschiedene Untergruppen, die an Zellhomöostase, Differenzierung, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur, sowie am Glucose- und Lipidstoffwechsel beteiligt sind. Durch ihre Funktion in der DNA-Reparatur, nehmen sie eine bedeutende Rolle in der Suppression onkogener Prozesse ein [64]. Außerdem regulieren sie oxidativen Stress, indem sie die Expression von Katalase und Superoxiddismutasen aktivieren [63]. Aufgrund der potenziell schädigenden Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies und ihrem damit verbundenen onkogenen Potenzial, wirken Fox-Proteine wegen ihrer antioxidativen Funktion der Entstehung von Tumoren entgegen [65]. Besonders interessant für diese Arbeit sind die Fox-Proteine der Untergruppe Typ O (FoxO). Sie sind in der Lage mit dem Wnt-Signalweg zu interagieren und diesen bei oxidativem Stress sogar zu inhibieren [66].

Wie bereits oben erläutert übernimmt der kanonische Wnt-Signalweg eine übergeordnete Bedeutung in der osteogenen Differenzierung von MSCs. Kommt es zu einer Aktivierung des Wnt-*Signalings*, wird der Transkriptionsfaktor β -Catenin nicht proteosomal degradiert, akkumuliert dadurch im Zytoplasma und transloziert somit vermehrt in den Nukleus. Dadurch bindet es häufiger an seine Zielpromotorregionen an der DNA, wodurch vermehrt u. a. Osterix und Runx2 (wichtige Transkriptionsfaktoren der

Osteogenese) aktiviert werden [67]. Diese Signalkaskade ist allerdings gestört, wenn eine hohe Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle ist. Die ROS aktivieren vermehrt die c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), welche wiederum *Forkhead-Box*-Proteine phosphoryliert. Diese translozieren dann vermehrt in den Nukleus und interagieren mit β -Catenin. Dadurch wird die Bindung des β -Catenin an seine Zielpromotorregion gestört, was zu einer geringeren osteogenen Differenzierung führt. Außerdem verbinden sich β -Catenin und FoxO zu einem Transkriptionsfaktorkomplex, welcher die Expression von antioxidativen Enzymen wie die SOD und Katalase induziert (Abb. 6) [63]. Gleichzeitig werden dadurch vermehrt Transkriptionsfaktoren aktiviert, die eine adipogene Differenzierung begünstigen [42]. Dies ist dadurch begründet, dass das *Wnt-Signaling* in der Regel die Expression adipogener Faktoren hemmt [68]. Als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Adipogenese ist der *Peroxisome proliferator-activated Receptor Y* (PPAR- γ) zu nennen, welcher den Steroidhormonrezeptoren zuzuordnen ist. Während der osteogenen Differenzierung ist der kanonische *Wnt*-Signalweg in der Lage, eine adipogene Differenzierung über die Inhibition der Expression von PPAR- γ -mikroRNA zu verhindern [69]. Auf der anderen Seite führt nicht-kanonisches *Wnt-Signaling* dazu, dass die Histon-Methyltransferase SETDB1 vermehrt aktiviert wird, wodurch Zielgene von PPAR- γ methyliert und damit inhibiert werden [68, 70].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Osteogenese und Adipogenese gegenseitig inhibieren und dass FoxOs bei oxidativem Stress dabei eine Schlüsselfunktion einnehmen. Die Erkenntnisse über ihre ROS-abhängige Inhibition des *Wnt*-Signalweges lassen vermuten, dass die antioxidative Schutzfunktion der FoxOs und das damit verbundene geringere osteogene Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen wesentlich an der Entstehung von Knochenmarksverfettung und altersbedingter Osteoporose beteiligt sind [53, 71].

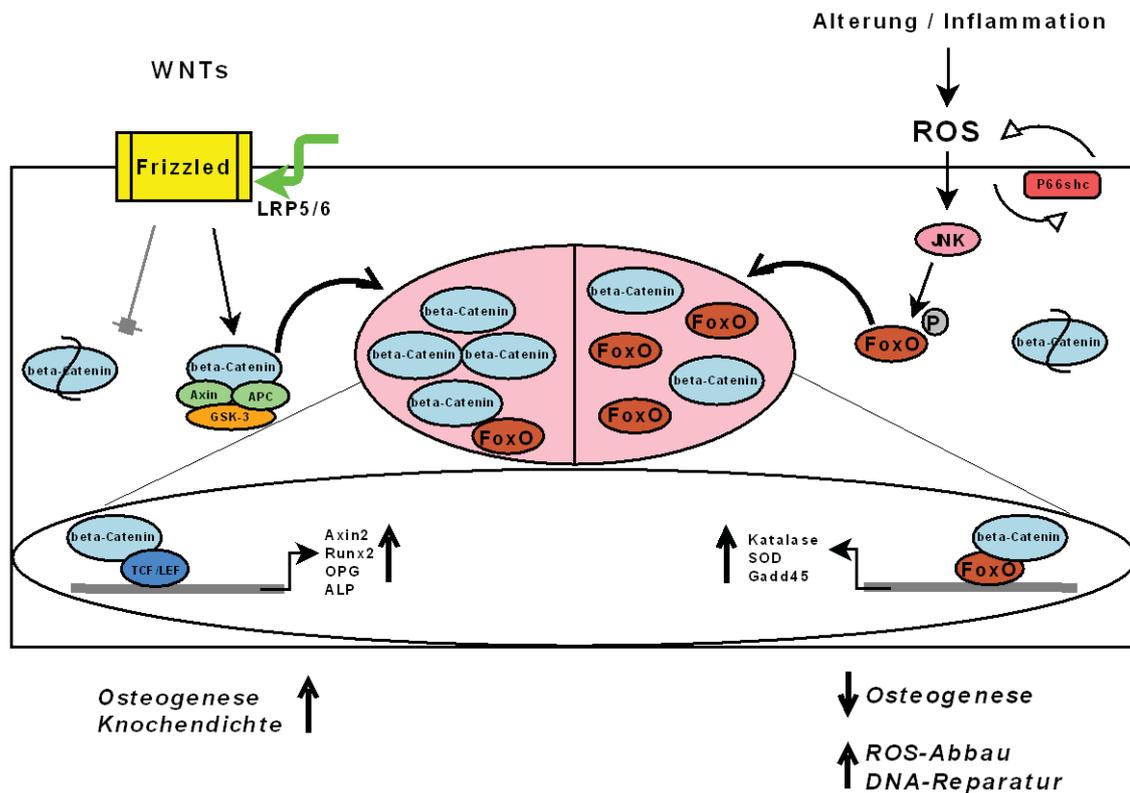


Abb. 6: Der Einfluss von ROS und FoxOs auf das Wnt-Signaling. Erhöhte ROS-Konzentrationen aktivieren FoxOs, welche mit dem Wnt-Signaling interagieren und somit die Osteogenese beeinflussen können. [modifiziert nach [48, 63]].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund ihres sehr guten Differenzierungspotentials, geringen Entnahmemorbidität, hohen Anzahl an Stammzellen im Isolat und der guten Verfügbarkeit, stellen Adipogene Stromazellen in der regenerativen Medizin eine vielversprechende Alternative zu konventionellen Therapiekonzepten dar. Allerdings können Faktoren wie das Alter des Spenders und ein Ungleichgewicht zu Gunsten reaktiver Sauerstoffspezies die osteogene Differenzierung maßgeblich inhibieren. Für das *Bone-Tissue-Engineering* ist es daher ein besonderes Interesse, ein vollständiges Verständnis der Prozesse und Störfaktoren zu erlangen, die bei der osteogenen Differenzierung von ASCs eine Rolle spielen. Somit könnten zukünftige Therapiekonzepte bestmöglich eingesetzt und sicher angewendet werden.

Daher wurde das Proliferations- und Differenzierungspotential der ASCs untersucht. Speziell der Vergleich zwischen einer Behandlung mit Proliferationsmedium und Differenzierungsmedium, sowie der jeweiligen zusätzlichen Applikation von Katalase als antioxidatives Enzym, sollte mithilfe von Zellviabilitätsmessungen (CellTiter-Blue®),

DNA-Quantifizierung (NanoDrop™) und Proliferations-ELISA (BrdU-ELISA) gemessen werden. Besonderes Merkmal bei der Untersuchung der osteogenen Differenzierung lag auf der Analyse der Differenzierungsfähigkeit unter dem Einfluss von ROS (repräsentativ wurde H₂O₂ als ROS verwendet) und einem antioxidativen Enzym (Katalase). Des Weiteren wurde das osteogene Differenzierungspotential unter Zugabe von aktiver und inaktiver Katalase verglichen, um die Funktion der Katalase als *Second Messenger* näher zu untersuchen. Die Quantifizierung der Osteogenese erfolgte mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und der Cetylpyridiniumchlorid-Rücklösung. Neben den genannten Versuchen wurde die Apoptose und die intrazelluläre ROS-Konzentration der ASCs während der osteogenen Differenzierung untersucht.

Im zweiten Abschnitt der vorgelegten Arbeit wurde außerdem die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und ROS-abbauenden Enzymen auf den WNT-Signalweg und auf die Forkhead-Box-Proteine (FoxO) 1 und 3a im Verlauf der Osteogenese untersucht. Bekannt ist, dass im Verlauf der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) abnimmt [42]. Außerdem zeigten erste Daten aus anfänglichen Versuchen zu dieser Arbeit, dass eine zusätzliche Applikation von Katalase (als ROS-abbauendes Enzym) im Verlauf der osteogenen Differenzierung zu einem verstärkten Aufbau einer kalzifizierten Matrix der Osteoblasten führt. Aufgrund der Initiierung der Expression von antioxidativen Enzymen, aber auch wegen ihres, zum Teil inhibierenden, Einflusses auf den Wnt-Signalweg, sollten die Auswirkungen der FoxOs, auch unter der Behandlung von Katalase, näher untersucht werden. Wegen der großen Bedeutung von β -Catenin, als Vermittler des Wnt-Signalweges, sollte der Einfluss von ROS und Katalase auf β -Catenin während der osteogenen Differenzierung genauer analysiert werden. Bereits in Kapitel 1.5.2 wurde auf die Interaktion von FoxOs mit β -Catenin und dessen Inhibition unter oxidativen Bedingungen eingegangen [72]. In welcher Form eine Applikation von Katalase die Induktion der FoxOs und des WNT-Signalweges während der osteogenen Differenzierung beeinflusst und wie die Behandlung mit Katalase Einfluss auf die Wechselwirkungen dieser beiden Faktoren einnimmt, war auch Ziel dieser Arbeit.

2. Material

2.1 Geräte

Tabelle 1 Verwendete Geräte

Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG; Wangen; Deutschland
Autoklav DX-90	Systec GmbH; Linden, Deutschland
Blotting-Transfersystem Semi Dry Blotter Trans- Blot® Turbo™	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
Fluoreszenzlampe NAG-f HBO 50	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Geldokumentationsanlage GelDoc	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Geltransferapparatur Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Heizblock	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Kryo-Einfrierbehälter	Schmidt Laborgeräte GJM Handel und Service GmbH; Wien; Österreich
Kühlschrank	Nalge Nunc International; Rochester (NY); USA
Magnetrührer (IKARET® control/t IKAMAG® safety control)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Mikroskop Axiovert 40	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland

Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Mikroskopkamera AxioCam MRC	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Mirkovolumen- Spektralphotometer NanoDrop™ ND-1000	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Multipipette® plus	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Multiplattenlesegerät VICTOR3™ Model 1420	Perkin Elmer; Waltham; USA
Biophotometer plus	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Pipettboy Accujet® pro	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Eppendorf Research® fix 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Eppendorf Research® fix 2 – 20 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Eppendorf Research® fix 10 – 100 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Eppendorf Research® fix 20 – 200 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Eppendorf Research® fix 100 – 1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Spannungsquelle PowerPac™	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland

Taumel-Rollenmischer (RM5-V 1750; RM5-V80 1752)	Labortechnik Fröbel GmbH; Lindau; Deutschland
Ultraschallprozessor UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH; Berlin; Deutschland
Vortex-Mixer No. 444- 1372	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Waage Kern ABJ-N	Kern & Sohn GmbH; Balingen; Deutschland
Waage Kern 440-45	Kern & Sohn GmbH; Balingen; Deutschland
Wärmedrehschrank	Biometra OV 3
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Zentrifuge Heraeus Pico 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Blotting-Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Einfrierröhrchen (bio-one Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Einmalhandschuhe (Micro-Touch® Nitra- Tex®)	Ansell GmbH; München; Deutschland
Falcons, 15 ml bio-one Art.-Nr.: 188171	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich

Falcons, 50 ml bio-one Art.-Nr.: 227261	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Filter (steril) 0,22 µM	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Flaschen (1000/500/250 ml)	Schott AG; Mainz, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik; Friedrichsdorf; Deutschland
Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2 µm)	Biotechnologie GmbH; Erlangen; Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas (ISO 7712)	BRAND GmbH + CO KG; Wertheim; Deutschland
Pasteurpipetten aus Plastik	Ratiolab-GmbH, Pasteur-Plast Pipetten 3 ml Makro, graduiert, 150 mM, unsterile, Box a 500 Art.-Nr.- 2600111
Pipettenspitze 10/20 µl (mit Filter)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH; Hamburg; Deutschland
Pipettenspitze 200 µl (mit Filter)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH; Hamburg; Deutschland
Pipettenspitze 1000 µl (mit Filter)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH; Hamburg; Deutschland
Reaktionsgefäß (Safe- Lock Tubes™ 0,5 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Reaktionsgefäß (Safe- Lock Tubes™ 1,5 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Reaktionsgefäß (Safe- Lock Tubes™ 2,0 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Stripette (Costar® 2 ml Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland

Stripette (Costar® 5 ml Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripette (Costar® 12 ml Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripette (Costar® 25 ml Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Zellkulturflasche (CELLSTAR® Cell Culture Flask 75cm ² red filter cap)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellkulturflasche (CELLSTAR® Cell Culture Flask 175cm ² red filter cap)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellkulturflasche (CELLSTAR® Cell Culture Flask 25cm ² red filter cap)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellkulturplatte (6-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellkulturplatte (24-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Zellkulturplatte (96-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich

Zellschaber (blau, 40cm)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
--------------------------	--

2.3 Substanzen

Tabelle 3 Verwendete Chemikalien und Substanzen

1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
2-Mercaptoethanol M7154	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Acrylamid 30 %	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Alizarin-Rot-S mono Sodiumsalz (C.I. 58005)	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
<i>Aqua dest.</i>	Aqua B. Brauch, 1000 ml
3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
BSA pH 7,0	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
Calcium Chlorid Dehydrat C7902	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
CellTiter-Blue®	Promega GmbH; Mannheim; Deutschland
Cellwash	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
Dexamethason D1756 - ≥ 98 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
DMEM (4,5 g/l Glucose)	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Dimethyl-Sulfoxid D2650 - ≥ 99,7 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Entwicklerlösungen	BIO RAD, Clarity™ Western ECL, Substrate 200 ml, Cat.-Number: #170-5060

	INTERCHIM UptiLight HS Western-Blot HRP Chemiluminescent Substrate
	Merck Millipore, Luminata™ Forte Western HRP Substrate
Ethanol EMSURE®	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
FACS clean #340345	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FACS Puffer Flow™ #342003	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FACS Rinse #340346	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FBS, Fetal Bovine Serum Gold	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
Glucose G7528 - ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Glycin	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
HEPES H3375 - ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Isopropanol EMPLURA®	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Kaliumchlorid ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Katalase aus Rinderleber C30-100MG	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Kollagenase Typ 1, CLS I 330 U7mg	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
L-Ascorbinsäure-2- Phosphat A8960 - ≥ 95 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies™ L-Glutamine – 200 mM (100X), liquid)
Methanol EMSURE®	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
NaCl	VWR® Chemicals; Radnor, USA

Milchpulver	Carl Roth® GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Paraformaldehyd 4 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
PBS-Lösung mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Ponceau-S	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg; Deutschland
Salzsäure 37 % ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	VWR® Chemicals; Radnor, USA
Schwefelsäure 1 mol/l	VWR® Chemicals; Radnor, USA
TEMED (N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin)	VWR® Chemicals; Radnor, USA
Tris - ≥ 99,3 %	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Tris-Base	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Tris-HCL	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
β-Glycerophosphat G9422 - ≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland

2.4 Kits

Tabelle 4 Verwendete Kits

Kit	Hersteller
-----	------------

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Reagents	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland

2.5 Antikörper

2.5.1 Western Blot

Tabelle 5 Verwendete Primärantikörper für die Western-Blot-Analyse

Primärantikörper	Hersteller, Bestellnr.	Verdünnung
anti-FoxO1 (C29H4), anti-Human, monoclonal, Rabbit	Cellsignaling, 2880	1:1000 in 5 % BSA TBS-T
anti-FoxO3a (75D8), anti-Human, monoclonal, Rabbit	Cellsignaling, 2497	1:1000 in 5 % BSA TBS-T
anti-GAPDH (13H12), anti-Human, monoclonal, Mouse	Novus Biologicals, NBP2-27103	1:10000 – 1:20000 in 5 % BSA TBS-T
anti-β-Catenin, anti-Human, polyclonal, Rabbit	Abcam, ab16051	1:2000 in 5 % BSA TBS-T

Tabelle 6 Verwendete Sekundärantikörper für die Western-Blot-Analyse

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat anti Mouse, polyclonal, Immunoglobuline	Dako, Denmark, A/S	1:1000 in TBS-T
Goat anti Rabbit, polyclonal, Immunoglobuline	Dako, Denmark, A/S	1:1000 in TBS-T

2.5.2 Durchflusszytometrie

Tabelle 7 Verwendete Antikörper zur Charakterisierung der ASC

Antikörper	Hersteller, Bestellnr.
CD13 PE-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	Immuno Tools, 21270134
CD14 FITC-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	Immuno Tools, 21279143
CD19 FITC-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	BD Bioscience, 555412
CD26 APC-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	Thermo Scientific, MA1-10158
CD29 PE-conjugated, anti-Human/Mouse/Porcine, monoclonal, Mouse	Immuno Tools, 21270294
CD31 FITC-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	BD Bioscience, 555445
CD34 FITC-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	R&D Systems, FAB3346F
CD44 APC-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	BD Bioscience, 559942
CD45 FITC-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	Immuno Tools, 21270453
CD73 PE-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	BD Bioscience, 550257
CD90 PE-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	Affymetrix eBioscience, 45-0909
CD105 APC-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	BD Bioscience, 562408

HLA-DR PE-conjugated, anti-Human, monoclonal, Mouse	BD Bioscience, 340689
---	-----------------------

2.6 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 9 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Blotting-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 40 ml 25 x Transferpuffer • 50 ml Methanol • ad 500 ml H₂O
Elektrophorese-Puffer (10 x)	<ul style="list-style-type: none"> • 30,3 g Tris (pH 8,3 – 8,8) (Endkonzentration in 1 x Puffer: 25 mM) • 144,2 g Glycin (Endkonzentration in 1 x Puffer: 192mM) • 10 g SDS (Endkonzentration in 1 x Puffer: 0,1 %) • ad 1000 ml H₂O <p>gebrauchsfertiger Puffer: 1:10 in <i>Aqua dest.</i> verdünnen</p>
FACS Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • Cellwash • 3 % FBS
Kollagenase-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 0,001 M CaCl • 0,005 M Glucose • 0,1 M HEPES • 0,12 M NaCl • 0,05 M KCL • 1,5 % BSA • 0,2 % Kollagenase Typ I
Laemmli-Puffer (4x)	<ul style="list-style-type: none"> • 252 mM Tris-HCL (pH 6,8) • 40 % Glycerol • 8 % SDS • 0,01 % Bromphenolblau

	<ul style="list-style-type: none"> • 20 % β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen) • ad 10 ml H₂O
Osteogenes Differenzierungsmedium	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (4,5 g/L Glucose) • 1 % Penicillin/Streptomycin • 10 % FBS • 1 % L-Glutamin • 500 nm Dexamethason • 50 μM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat • 10 mM β-Glycerophosphat
Ponceau-S-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 % Ponceau S • 3 % Trichloressigsäure • ad 500 ml H₂O
Proliferationsmedium	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM (4,5 g/L Glucose) • 1 % Penicillin/Streptomycin • 10 % FBS • 1 % L-Glutamin
RIPA-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Tris (pH 8) • 150 mM NaCl • 1 % NP-40 • 0,5 % Na-Deoxycholat • 0,1 % SDS • Proteaseinhibitor (1 Tablette auf 7 ml) • Phosphataseinhibitor (1 Tablette auf 7 ml)
Sammelgel-Lösung (12 %, 4 Gele)	<ul style="list-style-type: none"> • 12 ml H₂O • 2,6 ml 30 % Acrylamid • 5 ml 4x Sammelgelpuffer • 40 μl TEMED • 100 μl 10 % APS (Polymerisation beginnt sofort)
Sammelgel-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 M Tris (pH 6,8) • 0,4 % SDS

Stripping-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 62,5 mM Tris (6,8) • 2 % SDS • 100 mM β-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen)
TBS	<ul style="list-style-type: none"> • 7,7 mM Tris (pH 7,5) • 150 mM NaCl
TBS-T	<ul style="list-style-type: none"> • TBS • 1 % Tween 20
Trenngel-Lösung (12 %, 4 Gele)	<ul style="list-style-type: none"> • 10,5 ml H₂O • 12 ml 30 % Acrylamid • 7,5 ml 4x Trenngelpuffer • 40 μl TEMED • 100 μl 10% APS (Polymerisation beginnt sofort)
Trenngel-Puffer (4x)	<ul style="list-style-type: none"> • 1,5 M Tris (pH 8,8) • 0,4 % SDS
Tris-Glycin Transfer-Puffer (25 x)	<ul style="list-style-type: none"> • 18,2 g Tris-Base (Endkonzentration in 1 x Puffer: 12 mM) • 90 g Glycin (Endkonzentration in 1 x Puffer: 96 mM) • ad 500 ml H₂O

2.7 Software

Tabelle 10 Verwendete Software

Datenverarbeitung	Microsoft Excel 2016
FACS-Software	Cellquest Pro
Statistik/Graphische Darstellung	GraphPad Prism 5.01 2007
Mikroskopsoftware	Axiovision Rel. 4.8
Quantitative Auswertung Western Blot	BioRad Image Lab 4.0.1 build 6 2011

Textverarbeitung	Microsoft Word 2016
Flussdiagramme	Dia 0.97.2 Microsoft Power Point 2016

3. Methoden

3.1.1 Isolation von humanen adipogenen Stromazellen (ASCs)

3.1.1.1 Isolation von humanen ASCs aus Fettgewebe

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Das gespendete Fettgewebe wurde in einer Petrischale mit Skalpell, oder Scheren in kleinste Stücke präpariert und weitestgehend von Haut, Bindegewebe und Blutgefäßen befreit. Anschließend wurde es 1:1 mit der steril-filtrierte Kollagenase-Lösung (Tabelle (Tab.) 9) in 50 ml Falcons verdünnt. Nun wurde die Lösung mit den Gewebestücken unter konstanter Rotation (ca. 10 rpm) im Wärmedrehschrank bei 37°C für 1 h inkubiert, so dass das Gewebe durch die Kollagenase-Lösung besser enzymatisch verdaut werden konnte. Anschließend wurden übrig gebliebene Bindegewebsreste mithilfe eines Siebgewebes (250 µm Porengröße) entfernt und das Filtrat aufgefangen. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 min wurde jedes Zellpellet mit einer 10 ml Stripette aufgesaugt, der Überstand verworfen und mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate-buffered Saline*, PBS) resuspendiert und erneut bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Danach wurden die Überstände abgesaugt und das Zellpellet abhängig von der Zellzahl mit 25 ml Proliferationsmedium (Tab. 9) resuspendiert und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Somit konnten nicht-adhärente Zellen und Zelldebris entfernt werden. Anschließend wurde frisches Proliferationsmedium hinzugegeben und die Zellkulturflaschen wieder bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.1.1.2 Isolation von humanen ASCs aus Liposuktionsfett

Das gespendete Liposuktionsfett (meist vom Oberschenkel und Hüfte) wurde auf 50 ml Flacon verteilt und bei 1200 rpm für 10 min abzentrifugiert. Aus der mittleren der 3 Phasen wurde das Fettgewebe abgesaugt und in sterile 50 ml Falcons überführt. Ab hier wurde die Fettgewebslösung 1:1 mit der steril-filtrierte Kollagenaselösung (Tab. 9) verdünnt und weiter wie bei der Isolation aus Fettgewebe verfahren.

3.1.2 Zellkulturpflege

Die ASCs wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² (T175), oder 75 cm² (T75) bei 37°C und 5 % CO₂ in dem Proliferationsmedium (Tab. 9)

kultiviert. Dieses Medium wurde in regelmäßigen Abständen zwei - drei Mal in der Woche gewechselt, wobei es vor jedem Wechsel auf Raumtemperatur (RT) erwärmt wurde.

3.1.3 Passagieren der ASCs

Um die adhärennten Zellen schonend vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen, wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung (10 x Trypsin/EDTA 1:10 in PBS) verwendet. Trypsin ist eine Endopeptidase und führt zur Proteolyse von membrangebundenen Adhäsionsproteinen. Das EDTA wirkt als Chelatbildner und bindet zweiwertige Kationen (wie z. B. Ca^{2+}), welche die Membranproteine stabilisieren (Briand et al., 1997). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 - 15 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml (bei T175), oder 5 ml (bei T75) 1 x Trypsin/EDTA für 5 – 7 min bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Zwischendurch wurde die Kulturflasche leicht geschüttelt und abgeklopft (sogenanntes *shake-off*), um die Zellen schonend vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Das Ablösen wurde dabei mikroskopisch kontrolliert. Wenn der Großteil der Zellen danach immer noch adhärennt war, wurden sie mithilfe eines sterilen Zellschabers endgültig abgelöst. Um jedoch eine enzymatische Verdauung und damit Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurde nach spätestens 10 min Proliferationsmedium (mindestens 1:1) hinzugefügt. Das alpha-1-Antitrypsin aus dem fötalen Kälberserum (*Fetal-Bovine-Serum*, FBS) im Medium inhibiert die enzymatische Aktivität des Trypsins.

Die ASCs wurden bei einer Konfluenz von 80 - 90 % des Flaschenbodens gesplittet. Hierfür wurden sie trypsiniert (siehe Kapitel 4.1.3) und mit der doppelten Menge an Proliferationsmedium bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Proliferationsmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann entsprechend der Zellzahl (meist von 1:2, oder 1:3) aufgeteilt und mit Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Im Versuchsaufbau wurden stets Zellen der dritten Passage verwendet und dafür in 6-, oder 24-Well-Platten ausgesät. Dafür wurde das Zellpellet nach dem Trypsinieren und Zentrifugieren in der entsprechenden Menge Proliferationsmedium resuspendiert und auf die einzelnen Wells verteilt. Somit wurde 1,5 ml, bzw. 0,5 ml (entsprechend: 6- / 24-Well-Platte) Zellsuspension pro Well aufgeteilt. Die ASCs wurden dann bis zu einer

Konfluenz von annähernd 100 % mit Proliferationsmedium kultiviert, bevor die osteogene Differenzierung gestartet wurde.

3.1.4 Kryokonservierung von ASCs

In Lösung befindliche ASCs wurden mit Hilfe der Zählkammer (Neubauer, Tab. 2; Verdünnungsfaktor 10^4) ausgezählt. Dabei wurden die abgestorbenen Zellen durch Trypanblau angefärbt, welches in einem Verdünnungsverhältnis 1:1 eingesetzt wurde. Die nicht gefärbten, somit lebendigen Zellen wurden dann ausgezählt. So konnte die Menge des nötigen Einfriermediums (10 % DMSO in FBS) berechnet werden, sodass in jedem Kryoröhrchen 1×10^6 Zellen/ml/Vial eingefroren wurden. Dazu wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in dem Einfriermedium resuspendiert. Dabei wurden die Zellen bereits auf Eis gestellt, da das DMSO bei über 0°C zelltoxisch wirkt. Allerdings mindert es die Schädigung der Zellen durch Kristallisation beim Einfrieren [73]. Anschließend wurde je 1 ml der Einfrierzellsuspension auf jeweils ein Kryoröhrchen gegeben und in einem Kryo-Einfrierbehälter (Mr. Frosty, Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen), welcher mit Isopropanol gefüllt ist, bei -80°C gelagert. Somit wurde ein langsames Herunterkühlen ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) gewährleistet. Die Zellen konnten nach ca. 24 h in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

3.1.5 Auftauen der ASCs

Die Kryoröhrchen wurden in einem Wasserbad bei 37°C fast vollständig aufgetaut, sodass in der Mitte der Zellsuspension noch ein gefrorener Teil zu sehen war. Dann wurde die restliche Zellsuspension mit 1 ml Proliferationsmedium resuspendiert und somit vollständig aufgetaut. Dadurch konnte die zelltoxische Wirkung des DMSOs abgeschwächt werden. Das Medium sollte vorgelegt werden. Die Zellsuspension wurde nun in eine Zellkulturflasche überführt und anschließend wurde 25 ml Medium hinzugefügt. Die Kulturflasche wurde einige Male geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen, um dann bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert zu werden. Am nächsten Tag wurde das Medium mit den Überresten des DMSO abgesaugt und frisches Proliferationsmedium hinzugefügt.

3.1.6 Osteogene Differenzierung der ASCs

Für die Versuche wurden die ASCs in der dritten Passage ausplattiert und anschließend mit dem osteogenen Differenzierungsmedium (OM) behandelt. Die Zusammensetzung dieses Mediums bestand aus dem Proliferationsmedium (Tab. 9), Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und β -Glycerophosphat (siehe Tab. 9). Die osteoinduktiven Wirkungsweisen dieser Zusätze sind in Kapitel 1.3.1 erläutert. Das OM wurde erst auf die Zellen gegeben, wenn die Zellen zu 100 % konfluent waren. Die ASCs wurden 21 Tage mit OM behandelt und es wurde zweimal in der Woche ein Mediumwechsel durchgeführt. Je nach Versuchsaufbau wurden dem Medium zum Start des Versuchs, oder vor jedem Mediumwechsel 125 / 250 / 500 U/ml Katalase (K), 50 μ M H₂O₂, 500 μ M Aminotriazol (ATA) allein oder in Kombination hinzugefügt. Alle diese Substanzen wurden lichtgeschützt, steril und gekühlt (entweder 4 °C, oder -20°C) aufbewahrt und verwendet.

3.2 Visualisierung und Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und Cetylpyridiniumchlorid-Rücklösung

Zur Visualisierung der Matrixkalzifikation wurde vor jeder Messung eine 0,5 % Alizarin-Rot-S Stocklösung in *Aqua dest* angesetzt und auf einem Taumelroller (Tab. 1) in Lösung gebracht. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die ASCs mit 4 % Paraformaldehyd (PFA in PBS, pH 7,0) für 15 min bei Raumtemperatur (RT) unter dem Abzug fixiert. Anschließend wurde das PFA abgesaugt und die Zellen einmal mit *Aqua dest.* gewaschen. Nun wurde 0,5 ml von der Alizarin-Rot-S-Lösung auf die Zellen gegeben und die Platte bei 37°C für 20 min inkubiert. Danach wurde die Alizarin-Rot-S-Lösung abgesaugt und die Zellen 2-3 Mal mit *Aqua dest.* gewaschen, bis der Überstand farblos war. Anschließend wurde die angefärbte Matrixkalzifizierung durch mikroskopische Bilder (Zeiss Axiovert 40 und Zeiss Axioacam MRC; Tab. 1.) detektiert. Für die quantitative Analyse der osteogenen Differenzierung wurde eine 10 % Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (CPC) in *Aqua dest.* angesetzt und für ca. 1 – 2 h auf dem Taumelroller (Tab. 1) in Lösung gebracht. Es wurden 0,5 ml/Well von der CPC-Lösung hinzugefügt und die Zellen bei RT für 1 h inkubiert. Dabei wurde ein *Blank* in einer zusätzlichen Küvette mitgeführt und anschließend von den anderen

Werten abgezogen. Die OD₆₀₀ des rückgelösten Farbstoffes wurde anschließend photometrisch bestimmt (Eppendorf Biophotometer plus).

3.3 Zellviabilitäts-Messung

Zur Messung der Zellviabilität wurde der CellTiter-Blue[®]-Assay benutzt. Dieses Messverfahren stützt sich darauf, dass lebendige Zellen den blauen Redoxfarbstoff Resazurin zum violetten Fluoreszenzfarbstoff Resorufin reduzieren können, welcher sein Emissionsmaximum bei 590 nm hat. Somit kann die Anzahl an lebendigen Zellen in einer Zellkultur quantifiziert werden. Da es sich hierbei um nicht zelltoxische Farbstoffe handelt, können die Zellen anschließend für weitere Versuche verwendet werden [74].

Zunächst wurde eine 1:20 verdünnte CellTiter-Blue[®]-Stocklösung in Proliferationsmedium angesetzt und die Zellen (24-Well-Platte) mit 0,5 ml dieser Lösung überschichtet. Außerdem wurde mindestens ein zellfreies Well mit CellTiter-Blue[®]-Lösung mitgeführt, welches als *Blank* diente und später von den gemessenen Werten abgezogen wurde. Die ASCs wurden dann für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl des Kulturüberstandes als Doubletten in eine neue 96-Well-Platte (Flachboden) überführt und die Fluoreszenz bei 590 nm in einem Multiplattenlesegerät (VICTOR3[™] V Multilabel Counter Model 1420, Perkin Elmer) bestimmt. Nach Beendigung der Fluoreszenzmessung wurde die 96-Well-Platte verworfen, der restliche Kulturüberstand der 24-Well-Platte abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in Proliferationsmedium für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach konnten sie für eine Alizarin-Rot-S-Färbung weiterverwendet, oder für die Gewinnung von Proteinlysaten geerntet werden.

3.4 Bestimmung der Zellproliferation mithilfe des BrdU-Assays

Für die Bestimmung der Zellproliferation wurde das Cell Proliferation ELISA Kit (BrdU, colorimetric, SIGMA ALDRICH[®]) verwendet. Das Pyrimidin-Analogon 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) wird hierbei anstelle von Thymidin in die DNA sich teilender Zellen eingebaut und nachher mithilfe eines Immunkomplexes markiert. Dieser hat eine Peroxidase gebunden, welche das entsprechende Substrat umsetzt. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure wird der Farbumschlag bei 450 nm in einem Multiplattenlesegerät (VICTOR3[™] V Multilabel Counter Model 1420, Perkin Elmer)

photometrisch analysiert. Die Mengenangaben der Substanzen wurden für die Messung in einer 24-Well-Platte angepasst.

3.5 Quantifizierung des DNA-Gehalts mittels NanoDrop™

Als weitere Quantifizierungsmethode wurde der DNA-Gehalt mittels eines Mikrovolumen-Spektralphotometers (Thermo Scientific NanoDrop™) gemessen. Die Zellen wurden dafür geerntet, und das Zellpellet in RIPA-Puffer (Tab. 9) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Ultraschallprozessors lysiert und der DNA-Gehalt in 1 µl des Überstandes spektralphotometrisch quantifiziert. Als Blank diente der RIPA-Puffer.

3.6 Bestimmung der intrazellulären ROS-Konzentration

Die Bestimmung der intrazellulären ROS-Konzentration erfolgte mittels 2',7'-Dichlorohydrofluorescein-Diacetat (DCFDA) im Durchflusszytometer. DCFDA wird in der Zelle von Esterasen zu 2',7'-Dichlorohydrofluorescein (DCHF) hydrolysiert. Dies wird von H₂O₂, welches den hauptsächlichen Anteil an intrazellulären ROS ausmacht, oxidiert. Dadurch entsteht 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF), was bei einer maximalen Emissionswellenlänge von 529 nm fluoresziert [75].

Nach Absaugen des Mediums wurden die ASCs mit 1,5 ml/6-Well einer 1:200 verdünnten DCFDA-Lösung (50 µM in PBS) für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 1,5 ml Proliferationsmedium für 1 h im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde dann abgesaugt, die Zellen durch Trypsinierung (1 ml, 1 x Trypsin/EDTA) abgelöst und mit 2 ml Proliferationsmedium in ein FACS-Messröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 200 µl FACS-Puffer (Tab. 2.3) resuspendiert. Die Fluoreszenzintensität wurde dann im Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD) bestimmt. Dabei dienten Zellen, die nur mit Proliferationsmedium behandelt wurden als Negativkontrolle.

3.7 Immunphänotypische Charakterisierung der ASCs mittels Durchflusszytometrie

Zur phänotypischen Charakterisierung der ASCs wurde die Expression der Oberflächenantigene (Tab. 7) untersucht und diese im Durchflusszytometer bestimmt. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, abgeschabt und in Proliferationsmedium bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 600 µl FBS resuspendiert und je 100 µl der Zellsuspension auf einzelne FACS-Messröhrchen (vorgekühlt) aufgeteilt und für 10 min auf Eiswasser ruhen gelassen. Nach erneuter Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100 µl FACS-Puffer (3 % FBS in Cell-Wash) resuspendiert. Dazu wurden 3 – 5 µl der Antikörper-Lösungen hinzugegeben (siehe Herstellerangaben) und die ASCs für 30 min lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Letztlich wurden die ASCs in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer bestimmt. Als Negativkontrolle dienten nicht gefärbte Zellen.

3.8 Bestimmung der Apoptose mittels PI/Hoechst im Durchflusszytometer

Zur Bestimmung der Apoptose, wurden die Zellen mit Propidiumjodid / Hoechst (PI/Hoechst) angefärbt und im Durchflusszytometer detektiert. Hierbei bindet Hoechst vermehrt an das kondensierte Chromatin von allen Zellen und Propidiumjodid wirkt dabei als roter Fluoreszenzfarbstoff, welcher nur in abgestorbene Zellen eindringen kann und ein Emissionsmaximum bei 617 nm (wenn gebunden an DNA) hat.

Die Zellen wurden mit Proliferationsmedium vorsichtig abgeschabt, in vorgekühlte FACS-Messröhrchen auf Eis überführt und mit 1 ml PBS pro Röhrchen verdünnt. Nach Zentrifugation (1400 rpm, 4 min) wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet mit 500 µl PBS resuspendiert. Jedes Röhrchen wurde dann mit 4,5 ml 70 % Ethanol-Lösung aufgefüllt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen zentrifugiert (1400 rpm, 4 min), das Zellpellet mit 300 µl PI/Hoechst-Lösung (10 µg/ml, 1:100 in *Aqua dest.* verdünnt) resuspendiert und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit Kulturmedium behandelt wurden.

3.9 Bestimmung der Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse

Zur Bestimmung der Proteinexpression wurden die Proteine mittels SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) in einem diskontinuierlichen Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dort können sie mithilfe Inkubation spezifischer Antikörper markiert und später densitometrisch quantifiziert werden. Trennt man die Zellen vorher in ihre zytoplasmatische und nukleäre Fraktion auf, können Aussagen über die Lokalisation von Proteinen und Transkriptionsfaktoren in der Zelle gemacht werden, was auf deren Funktion rückschließen lässt.

3.9.1 Auftrennung der Proteine in eine zytoplasmatische und nukleäre Fraktion

Die ASCs wurden dafür auf Eis behandelt, um die Proteindegradation zu verhindern. Zunächst wurden die Zellen trypsiniert, auf Eis abgeschabt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min wurde der Überstand abgesaugt. Anschließend erfolgte die Isolation der zytoplasmatischen Fraktion nach den Herstellerangaben des entsprechenden Kits (NEPER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Reagents, Thermo Scientific). Nachdem die zytoplasmatische Fraktion in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde das verbliebene Pellet, welches die nukleäre Fraktion enthält, in 40 – 80 µl RIPA resuspendiert. Beide Fraktionen wurden dann bei -80 °C eingefroren. Für die Proteinanalyse im Western-Blot-Verfahren wurden die beiden Zellfraktionen vorher auf Eis aufgetaut und dann mithilfe eines Ultraschallprozessors mit jeweils 10 Pulsen lysiert. Dadurch wurden Zytoplasma- bzw. Kernmembranen aufgebrochen.

3.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der aufgetrennten Lysate wurde das Protein Assay Kit (Thermo Scientific) verwendet, welches auf der Biuret-Reaktion beruht. Dabei bilden Proteine mit mindestens drei Aminosäureresten mit Cu^{2+} einen hellblauen

Chelatkomplex. In einer Reaktion mit Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic Acid* (BCA)) entsteht ein violetter BCA/Kupfer-Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt [76].

Zunächst wurden die Proben aufgetaut und auf Eis 1:11 (bei kleineren Probenmengen 1:6) mit PBS verdünnt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Standardverdünnungen (BSA-Konzentrationsreihe, siehe Tab. 11), sowie der Proteinverdünnung in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Die Reagenzien A (enthält BCA) und B (enthält 4 % Kupfersulfat) wurden 50:1 verdünnt und jeweils 200 µl dieser Stocklösung zu jedem Well hinzugefügt. Der Ansatz wurde nun bei 37 °C für 30 min inkubiert und die Absorption anschließend bei 562 nm gemessen.

Tabelle 11 BSA-Standardverdünnung für die Proteinbestimmung

Konzentration [µg/ml]	Probenbezeichnung	BSA-Standard [µl]	PBS [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 = <i>Blank</i>	I	0	400

3.9.3 Die *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren, um Proteine in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse in einem Polyacrylamid (PAA)-Gel aufzutrennen. In Vorbereitung auf den Prozess des

Auftrennens werden die sonifizierte Proteine mit SDS komplexiert, wodurch ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis entsteht und die Proteine linearisiert werden. Zusätzlich führt das hinzugefügte β -Mercaptoethanol und das Aufkochen des Ansatzes bei 95 °C für 5 min dazu, dass vorhandene Disulfidbrücken, Wasserstoffverbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen reduziert werden. Das PAA ist in ein Sammelgel und ein Trenngel aufgeteilt. Das Sammelgel ist grobporiger, weist einen niedrigeren pH-Wert (6,8) auf und ist weniger leitfähig als das Trenngel. Beide Anteile des Gels enthalten Chlorid (Cl^-)-Ionen. Der umliegende Elektrophorese-Puffer enthält stattdessen Glycin.

Nachdem man die Probe in die jeweilige Tasche pipettiert und eine Spannung angelegt hat, bewegen sich nun die Chlorid-Ionen, SDS-Proteinkomplexe und Glycin-Ionen alle aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der Anode durch das Sammelgel. Da die Chlorid-Ionen die geringste Größe haben, wandern sie am schnellsten, gefolgt von den SDS-Proteinkomplexen. Die Glycin-Ionen folgen am langsamsten, da die Glycinmoleküle bei diesem niedrigen pH-Wert vermehrt in ungeladener Form vorliegen. Die SDS-Proteinkomplexe bewegen sich zwischen den Chlorid-Ionen und den Glycin-Molekülen. Dort herrscht aufgrund von fehlenden Ladungsträgern (außer SDS-Proteinkomplexe) ein immer stärkerer Feldstärkegradient, wodurch die Proteine unabhängig ihrer Größe beschleunigt werden, bis sie an der Chlorid-Ionen-Front wieder abgebremst werden. Dort finden sich wieder viele Ladungsträger und die Spannung auf die Proteine flacht ab. Somit werden die Proteine bis zur Grenze zum Trenngel fokussiert. Hier ändert sich der pH-Wert schlagartig auf 8,8, wodurch die Glycin-Moleküle hauptsächlich in ihre ionische Form übergehen und nun viel stärker beschleunigt werden. Sie überholen die SDS-Proteinkomplexe und heben die Fokussierung der Proteine auf. Dadurch wird die Geschwindigkeit der Proteine durch das feinporigere Trenngel nun wesentlich von ihrer Größe bestimmt, wodurch sie der Größe nach aufgetrennt werden und deutliche Banden entstehen [77]. Lässt man zusätzlich einen definierten Proteinstandard (Western-Marker) mitlaufen, bei dem man die molekularen Größen der Banden kennt, kann man anhand ihrer die Größe der zu analysierenden Proteine detektieren.

3.9.3.1 PAA-Gele gießen

Für die Untersuchung der nachzuweisenden Proteine wurden aufgrund ihrer molekularen Masse 12 %-ige Gele gegossen. Das Trenngel wurde wie in Tabelle 9 beschrieben

angesetzt, wobei das Ammoniumperoxodisulfat (APS) ganz zuletzt beigefügt wurde, um die Polymerisation zu beginnen. Die fertige Gel-Lösung wurde dann zügig zwischen zwei eingespannte, mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegeben, sodass diese ca. 5 cm hoch befüllt waren. Anschließend wurde der Rest mit Ethanol aufgefüllt, um Unebenheiten, Luftblasen und einem Austrocknen des Gels vorzubeugen. Nach ca. 20 min war das Gel auspolymerisiert und nachdem das Ethanol entfernt wurde, konnte die Trenngel-Lösung (Tab. 9) eingefüllt werden. Hier wurden Käbme mit 15 Taschen eingesteckt, sodass nach weiteren 20 min im auspolymerisierten Gel vorgeformte Taschen für die Proben eingelassen waren. Die Gele wurden bis zur Verwendung in H₂O-getränkten Papiertüchern in einer Tüte im Kühlschrank bei 4 °C kurzzeitig aufbewahrt.

3.9.3.2 Vorbereitung der Proben

Durch die Bestimmung der Proteinkonzentration konnte die nötige Menge der Proteinlösung ermittelt werden, um jeweils die gleichen Proteinmengen aufzutragen. Zusätzlich wurden den Proben jeweils 4 µl des 4x Laemmli-Puffers hinzugefügt, sodass das Gesamtvolumen jeder Probe nach Auffüllen mit H₂O nachher 16 µl betrug. Der Laemmli-Puffer wurde vor der Zugabe auf RT erwärmt und mehrfach geschüttelt, um das darin enthaltene SDS zu lösen. Die fertig pipettierten Proben wurden kurz zentrifugiert und anschließend für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Danach wurden sie sofort auf Eis gestellt.

3.9.3.3 Auftrennung der Proteine der Größe nach

Die vorher gefertigten PAA-Gele wurden in die Gelelektrophorese-Apparatur eingesteckt und mit Elektrophorese-Puffer (Tab. 9) befüllt, bis sie ganz überdeckt waren. Anschließend wurden die Käbme entfernt und die Taschen mit einer Pipette durchgespült. Danach konnten die, auf Eis gelegten, Proben in die jeweiligen Taschen pipettiert werden, wobei ein Western-Marker mitgeführt wurde. Zunächst wurde eine 60 V Spannung angelegt, bis sich die blaue Lauffpufferfront an der Grenze zum Trenngel gesammelt hatte. Letztlich wurde eine Spannung von 120 V angelegt, bis die Lauffront am unteren Ende des Gels auszulaufen begann.

3.9.4 Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran

Die Gele wurden zunächst von den Glasplatten abgelöst und in Transferpuffer (Tab. 9) gelagert, wobei das Sammelgel verworfen wurde. Anschließend wurden die Proteine im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dafür wurde die Membran passend für das Gel zugeschnitten und in Transferpuffer gelegt, sowie zwei Blottingpapiere. Danach wurden nacheinander ein Blottingpapier, die Nitrozellulosemembran, das Gel und das zweite Blottingpapier darübergerlegt und zwischen Anode und Kathode der Apparatur gelegt. Dabei wurden restliche Luftblasen ausgestrichen. Anschließend wurden die Proteine im *Semi Dry Transblotting* System (Life Technologies™) durch eine angelegte Spannung von 25 V mit einer Stromstärke von 2,5 A für 20 min auf die Membran übertragen.

3.9.5 Nachweis des Transfers auf die Nitrozellulosemembran mittels Ponceau-S-Färbung

Nach dem Semi-Dry-Blotting-Verfahren wurde die Membran einmal mit *Aqua dest.* gewaschen, um Rückstände des Gels zu entfernen. Anschließend wurde die Ponceau-S-Gebrauchslösung für ca. 1 - 2 min auf die Membran gegeben. Diese Färbelösung bindet unspezifisch an Proteine, wodurch erstmals die Banden nachgewiesen werden können. Danach wurde die Membran mehrere Male mit *Aqua dest.* überschichtet und die Übertragung der Proteine optisch kontrolliert. Die Membranen wurden dann mit PBS (oder *Aqua dest.*) gewaschen, um sie restlos zu entfärben. Anschließend lagerte man die Blots bei 4°C in TBS (*Tris Buffered Saline*), oder wurde weiter behandelt für die Immunmarkierung.

3.9.6 Immunmarkierung und Quantifizierung der Proteinexpression

Zur Detektion der zu untersuchenden Proteine auf der Membran wurden spezifische monoklonale und polyklonale Primärantikörper verwendet. Sichtbar können die Proteinbanden dann mithilfe eines polyklonalen Sekundärantikörpers gemacht werden, welcher eine *Horseradish*-Peroxidase (HRP) gebunden hat, die das Luminol der Entwicklerlösung unter Anwesenheit von H_2O_2 oxidiert, wobei ein chemisches Lumineszenzsignal emittiert wird. Dieses ist proportional zur Proteinexpression und kann mithilfe UV-Bestrahlung und eines Western-Blot-Scanners aufgenommen werden. Mit

dem entsprechenden Bildbearbeitungsprogramm kann die Bandendichte nachher densitometrisch quantifiziert werden.

Zunächst mussten die freien Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran abgesättigt werden, damit anschließend keine weiteren Proteine auf der Membran binden können und unerwünschte Antikörperbindungen erzeugen. Dazu wurde eine Blockierlösung angesetzt, welche für 1 h bei RT mit den Membranen auf einem Taumelroller inkubiert wurde (5 % Bovines Serumalbumin (BSA) in TBS mit 1 % Tween (TBS-T)). Die Verdünnung der Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben und wie in Tabelle 5 beschrieben in 3 - 5 % BSA, oder 5 % Milchpulver (in TBS-T) durchgeführt. Die Primärantikörper-Lösung wurde auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelroller inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und in -20 °C eingefroren (für einen weiteren Gebrauch) und die Membran drei Mal für jeweils 5 min mit TBS-T rollend gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 4 ml der entsprechenden Sekundärantikörper-Lösung (Tab. 6) und 1 µl anti-Western-Marker für 1 h bei RT auf dem Taumelroller inkubiert. Danach folgten drei Waschschrte mit TBS-T für je 10 min unter konstantem Rollen. Die Membranen wurden dann mit Entwicklerlösung überschichtet und die Banden detektiert (GelDoc, BioRad). Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte densitometrisch (Image Lab, BioRad) und im Vergleich mit dem *House-keeping* Gen.

3.9.7 Strippen der Membran

Das Membranstripping stellt ein Verfahren dar, gebundene Primär- und Sekundärantikörper von ihrer Bindung mit den Proteinen auf der Nitrozellulosemembran zu lösen, ohne möglichst die Proteine zu entfernen. Dies wird durch β -Mercaptoethanol, welches dem Stripping-Puffer (Tab. 9) zugesetzt wird, erreicht. Somit können Membranen mehrfach verwendet werden, um Proteine nachzuweisen, die sehr ähnliche Molekulargewichte haben und sich ansonsten überlagern würden.

Die Membran wird mit 20 ml Stripping-Puffer und 156 µl β -Mercaptoethanol für 30 min bei 60 °C unter ständigem Schütteln unter dem Abzug inkubiert und anschließend mehrmals mit PBS und danach mit TBS gewaschen. Für eine erneute Antikörperbehandlung muss die Membran erneut abgesättigt werden.

3.10 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism 5.01 2007 verwendet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mithilfe eines zwei-, bzw. einseitigen ANOVA-Tests durchgeführt, abhängig davon, ob die Daten gruppiert waren oder nicht. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,05$ gesetzt und mit einem Sternchen markiert. Bei höheren Signifikanzniveaus mit $p \leq 0,01$, oder $p \leq 0,001$ wurden zwei, bzw. drei Sternchen verwendet.

3.11 Ethikvotum

Laut der Sitzung der Ethikkommission vom 25.11.2015 bestanden keine Bedenken gegen die „Etablierung einer nicht personenbezogenen Sammlung von Körpergeweben und Blutproben zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für wissenschaftliche Zwecke“ unter dem Aktenzeichen 3634.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Proliferation und osteogene Differenzierung adipogener Stromazellen (ASCs) unter (anti-) oxidativen Bedingungen untersucht. Dabei sollte die Proliferation anhand von Zellviabilität, Zellteilung und DNA-Gehalt im Detail analysiert werden. Laborinterne Ergebnisse zeigten bereits einen positiven Einfluss einer Katalase-Behandlung auf die osteogene Differenzierung von adipogenen Stromazellen [78]. Daher sollte die antioxidative Behandlung der ASCs mit Katalase optimiert werden. Hierfür wurde die optimale Konzentration und Behandlungsdauer ermittelt. Weiterhin wurde die Apoptose und intrazelluläre ROS-Konzentration der Zellen, unter einer Applikation mit Katalase untersucht. Anschließend erfolgte ein Vergleich zwischen einer Behandlung mit nativer und denaturierter Katalase, um Aufschlüsse über die Wirkweise des positiven Effektes auf die Osteogenese von ASCs zu erhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten außerdem redox-sensitive Transkriptionsfaktoren der FoxO-Familie und des WNT-Signalwegs untersucht werden. Die genannten Transkriptionsfaktoren wurden unter (anti-) oxidativen Medienkonstellationen auf ihre Expression in der nukleären und der zytoplasmatischen Fraktion analysiert, um Rückschlüsse auf die Einflüsse und Wechselwirkungen der Faktoren während der osteogenen Differenzierung der ASCs zu geben.

4.1 Immunphänotypische Charakterisierung der ASCs

Die ASCs lassen sich in die Gruppe der mesenchymalen Stromazellen (MSC) einordnen. Laut des *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* werden MSCs nach folgenden Kriterien definiert. Die Zellen sollten in der Lage sein adhärent zu proliferieren und osteogen, adipogen und chondrogen zu differenzieren. Weiterhin ist die Expression folgender Oberflächenmarker, der sogenannten *Cluster of Differentiation* (CD), von Bedeutung. Dabei sollte die Expression von CD73, CD90 und CD105 bei über 95 % der Zellen vorhanden sein. Unter 2 % der Zellen sollten CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR exprimieren [79]. Aktuellere Kriterien schließen eine erhöhte Expression von CD13, CD26, CD29, und CD44 mit ein [25].

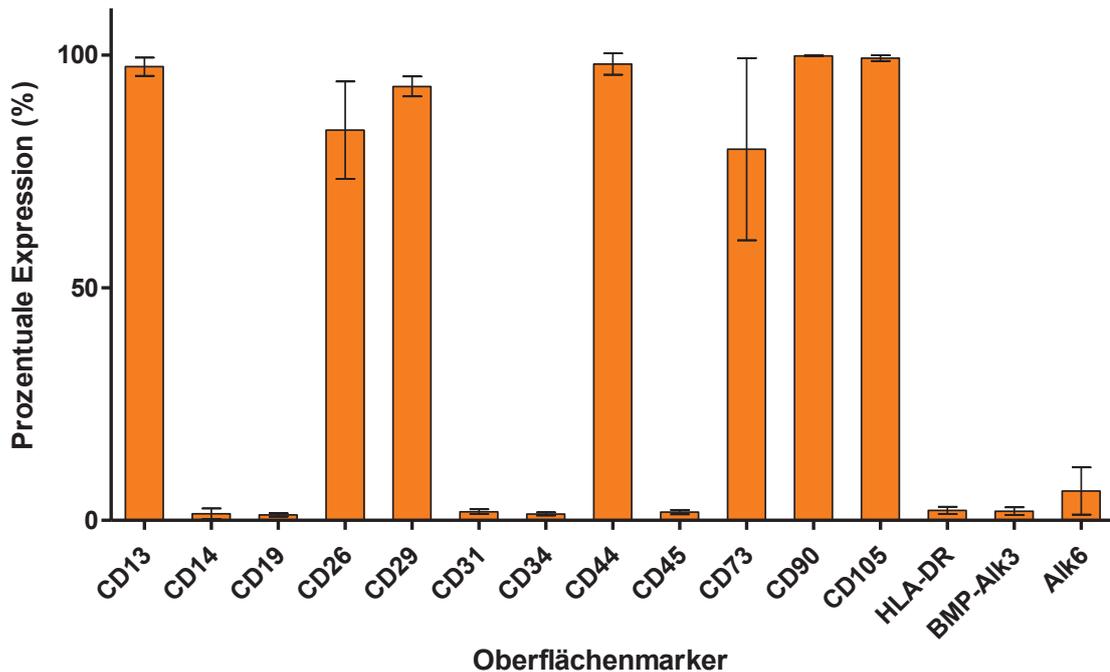


Abb. 7 Immunphänotypische Charakterisierung der ASCs. Es ist die prozentuale Expression der Oberflächenantigene dargestellt. Untersucht wurden ASCs in Passage 3 (n = 4).

Bei der phänotypischen Charakterisierung der ASCs lag die Expression von CD13, CD29, CD44, CD90 und CD105 bei über 90 %. Die Ausprägung von CD26 war mit 83,9 % und die von CD73 mit 79,8 % etwas geringer, aber dennoch deutlich erhöht im Vergleich zu den anderen Oberflächenantigenen. Auch die fehlende Expression von CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, HLA-DR und BMP-Alk3 entsprach mit jeweils unter 2 % der Zellen der Definition von mesenchymalen Stromazellen. Die Expression von Alk6 war in 6,3 % der Zellen leicht erhöht.

4.2 Visualisierung der osteogenen Differenzierung adipogener Stromazellen mittels Alizarin-Rot-Färbung

Anhand der folgenden Bilder soll der quantitative Nachweis der osteogenen Differenzierung makroskopisch, sowie lichtmikroskopisch veranschaulicht werden.

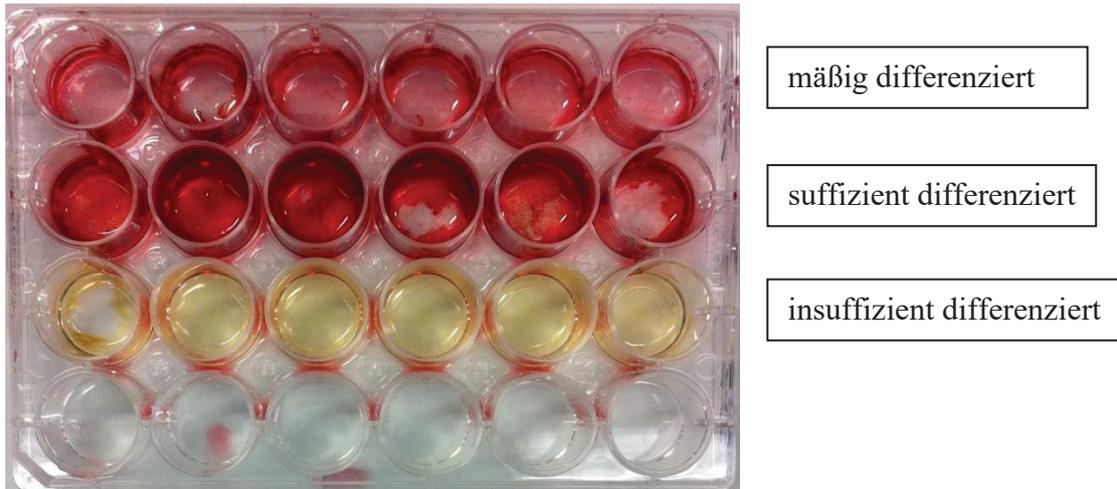


Abb. 8 Makroskopische Kontrolle der osteogenen Differenzierung, anhand der Alizarin-Rot-S-Färbung. Die jeweiligen Reihen zeigen unterschiedlich differenzierte Zellen nach 21 Tagen. Alle Zellen wurden über die ganze Zeit mit OM behandelt. Die dritte Reihe von oben zeigt Zellen, die nach 21 Tagen nicht suffizient osteogen differenziert waren. In der untersten Reihe waren keine Zellen. Der rote Farbstoff bindet an das Kalzium der extrazellulären Matrix der Zellen und färbt dessen kalzifizierte Anteile rot an.

Abbildung 7 zeigt drei verschiedene Spender, die über 21 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurden und anschließend mittels Alizarin-Rot-S-Färbung auf ihre Matrixkalzifizierung überprüft wurden. Der rote Farbstoff wird dabei in die extrazelluläre Matrix (EZM) deponiert, färbt dadurch dessen kalzifizierte Anteile rot und diente somit als Parameter für das Ausmaß der osteogenen Differenzierung. Es zeigen sich deutliche Unterschiede der osteogenen Differenzierung, unter den einzelnen Spendern. Gründe hierfür können Alter, Geschlecht, Kulturbedingungen und Passage der Zellen sein [32, 80].

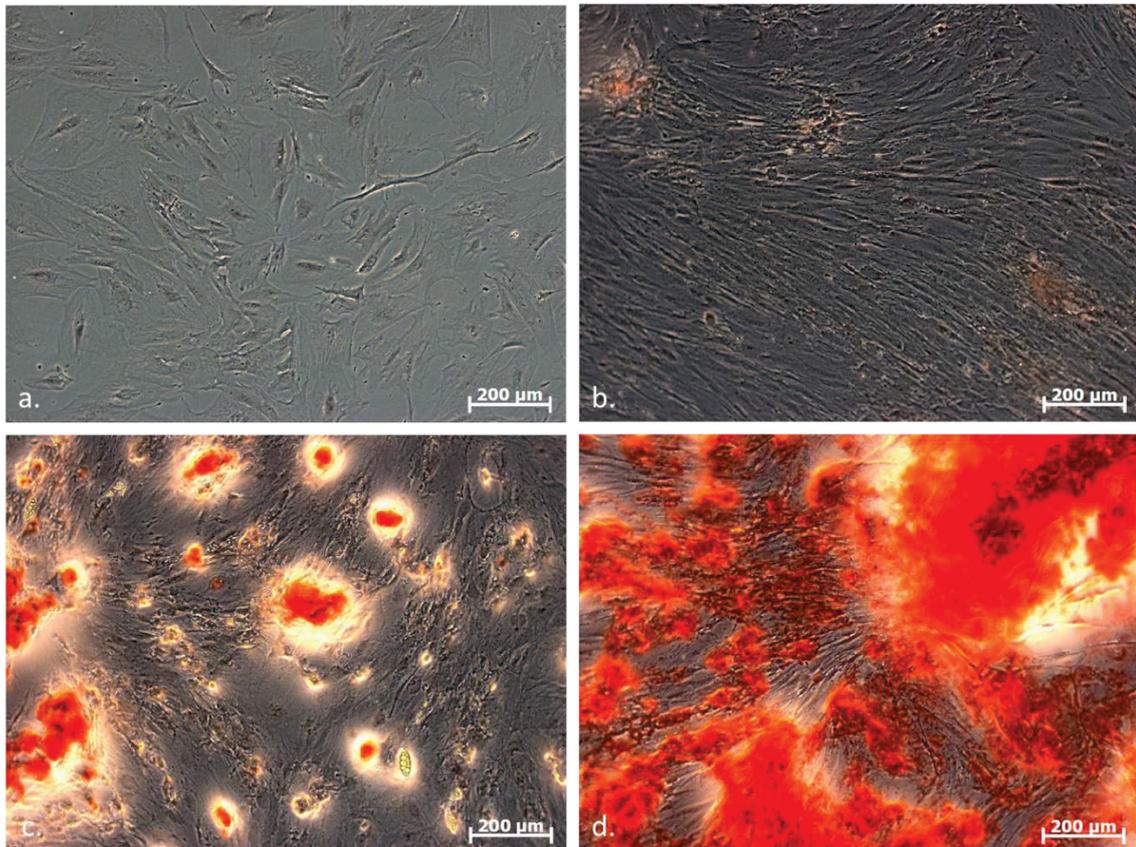


Abb. 9 Lichtmikroskopische Analyse der osteogenen Differenzierung. Gezeigt ist die lichtmikroskopische Auswertung verschiedener Stadien der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-S-Färbung. Dabei zeigt a.) ASCs, die unbehandelte Kontrolle an Tag 0; b.) ASCs, die zu ca. 100% konfluent sind und die osteogene Differenzierung eingeleitet haben; c.) ASCs, die einzelne kalzifizierte Matrixherde, als Zeichen voranschreitender Osteogenese, entwickelt haben; sowie d.) ASCs, die große Inseln kalzifizierter Matrix ausgebildet haben und eine weit fortgeschrittene Osteogenese aufweisen. Die Bilder wurden mit dem Zeiss Axiovert 40 in 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

Diese Abbildung zeigt anhand von vier unterschiedlichen Spenderzellen in jeweils unterschiedlichen Differenzierungsstadien, wie die Osteogenese der adipogenen Stromazellen ablaufen kann. Dabei bilden die Zellen im Laufe der osteogenen Differenzierung Herde kalzifizierter Matrix aus, die sich vergrößern und nach 2-3 Wochen eine konfluente extrazelluläre Matrix bilden. Dies zeigt sich nach der Alizarin-Rot-S-Färbung dann auch makroskopisch ab (siehe Abb. 8). Die Färbung dieser kalzifizierten EZM wurde anschließend mithilfe der Cetylpyridiniumchlorid-Lösung photometrisch quantifiziert.

4.3 Ermittlung der optimalen Katalase-Konzentration

Da in den vorherigen Arbeiten des Forschungslabors eine Applikation von 250 U Katalase eine verbesserte osteogene Differenzierung bewirkte, sollte dieser Effekt genauer untersucht werden. Es wurde eine Titrationsreihe angesetzt, wobei als Kontrolle

eine Zellpopulation diente, die nur mit OM behandelt wurde. Für die Unterscheidung, ob ein Spender sensitiv für die OM-Behandlung und damit für eine osteogene Differenzierung war, wurde ein *Cut-Off*-Wert bei der Rücklösung von $OD_{600} \geq 1$ festgelegt (hier dargestellt als gestrichelte Linie). Spenderzellen, die diesen Wert überschreiten konnten, wurden als Responder (R) bezeichnet. Zellen, die dies nicht erreichten, wurden als Nonresponder (NR) klassifiziert. Als Beispiel insuffizienter Osteogenese zeigt Abb. 8 das klassische makroskopische Bild eines Nonresponders nach 21 tägiger OM-Behandlung. In der folgenden Abbildung sind ausschließlich die Responder abgebildet.

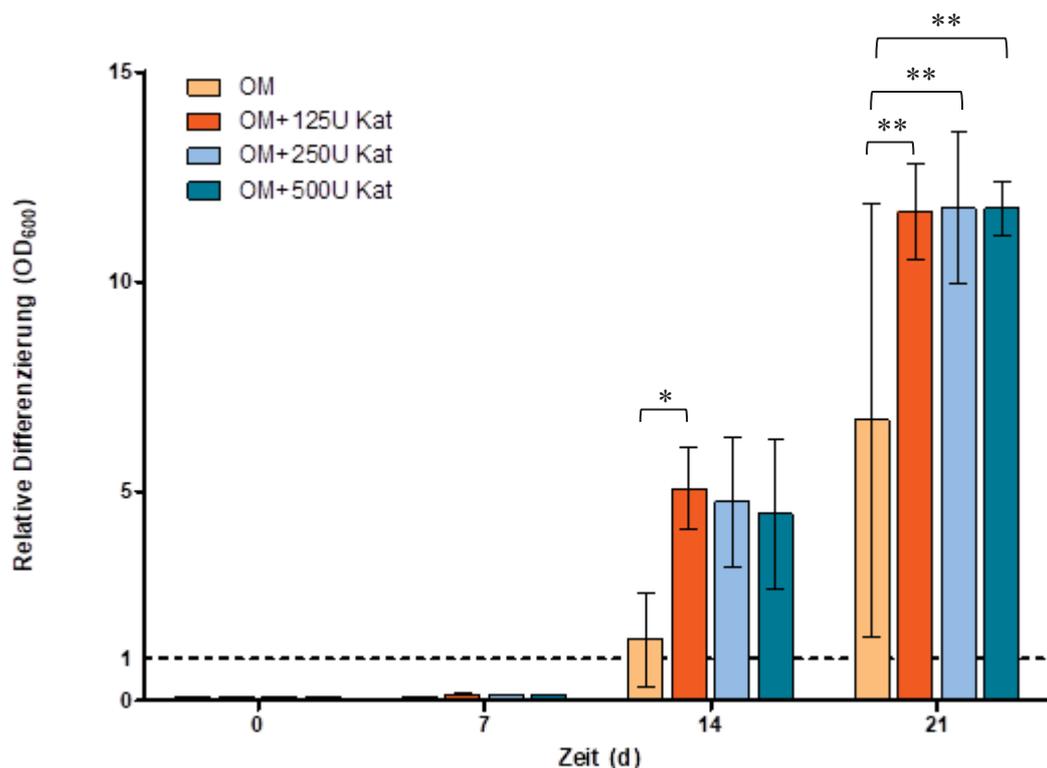


Abb. 10 Evaluation der optimalen Katalase-Konzentration. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung bei drei Spendern (P3) mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und CPC-Rücklösung. Die ASCs wurden mit OM und Katalase inkubiert und an den Messtagen 7, 14, 21 analysiert, wobei jeweils drei Konzentrationsstufen der Katalase verwendet wurden: 125 U/ml, 250 U/ml und 500 U/ml. Als unbehandelte Kontrolle dienten Zellen, die nur mit OM inkubiert wurden und unbehandelten ASCs von Beginn des Versuchs. Eine Verwendung von 125 U/ml ist für eine optimale osteogene Differenzierung ausreichend. Signifikanzniveaus bezogen auf OM des jeweiligen Messtages: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ ($n = 3$).

Es zeigt sich eine deutlich verbesserte Differenzierung unter Zugabe von Katalase, da schon am Tag 14 die Zellen, die zusätzlich mit Katalase behandelt wurden, eine um ca. das 3-fache gesteigerte Kalziumdeposition zeigten. Eine Konzentration von 125 U/ml war dabei ausreichend und höhere Konzentrationen boten keine zusätzliche Steigerung

der Differenzierung. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in den folgenden Versuchen stets eine Katalase-Konzentration von 125 U/ml verwendet.

4.4 Vergleich der Proliferation unter Einfluss von Katalase

Es sollte untersucht werden, ob die gesteigerte osteogene Differenzierung über eine verstärkte Proliferation der ASCs erreicht wurde. Dies sollte durch verschiedene Versuchsmodelle mit unterschiedlichen Behandlungen überprüft und weiter analysiert werden.

Der erste dargestellte Versuch bezieht sich dabei auf die Zellviabilität und lässt dementsprechend einen Rückschluss auf die Anzahl an lebenden Zellen in der Zellkultur zu.

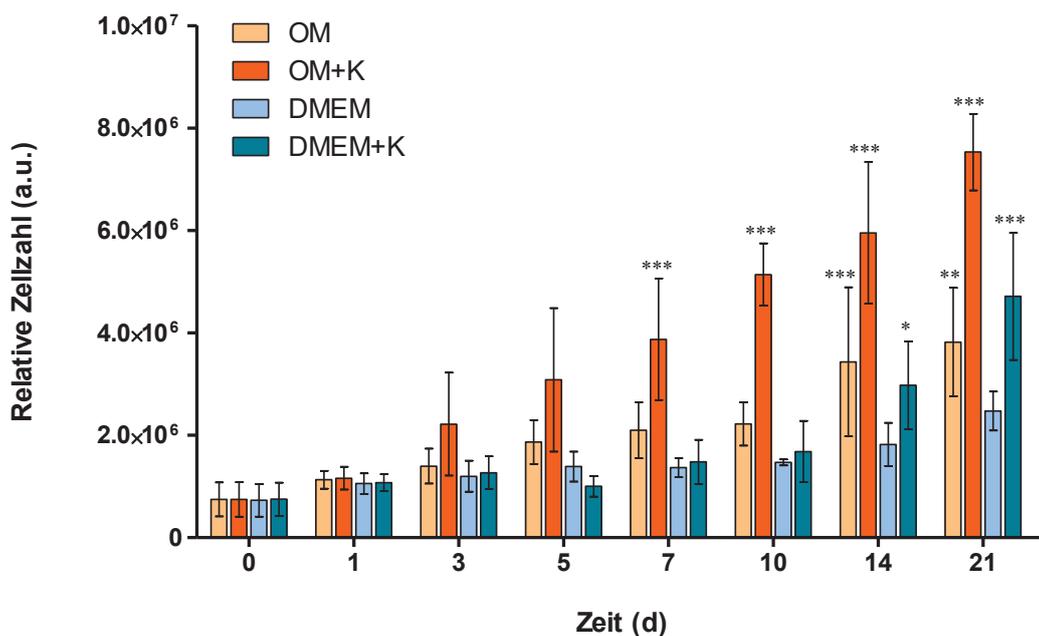


Abb. 11 Einfluss der Katalase-Behandlung auf die Zellviabilität. Dargestellt ist die relative Zellzahl, gemessen mittels CellTiter-Blue® über 21 Tage. OM: osteogenes Differenzierungsmedium; OM + K: OM mit Katalase (125 U/ml); DMEM: Proliferationsmedium; DMEM + K: DMEM mit Katalase (125 U/ml). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, Signifikanzniveaus jeweils bezogen auf DMEM des jeweiligen Messtages ($n = 9$).

Die Anzahl an lebenden Zellen (gemessen an der Zellviabilität), welche mit DMEM behandelt wurden steigt bis zum 21. Tag langsam an und erreicht das ca. Dreifache des

Ausgangswertes. Bis zum Tag 10 verhält sich die Zellpopulation, die zusätzlich Katalase erhalten hat, ähnlich. Jedoch steigt die Zellviabilität bis zum Tag 21 auf das Doppelte des Wertes von DMEM an Tag 21. Dagegen steigt die Anzahl der Zellen, die mit OM behandelt wurden stetig an, erreicht am Tag 21 aber einen etwas geringeren Wert als „DMEM + K“. Das bedeutet, dass die Zellviabilität durch DMEM + Katalase tendenziell im Vergleich zu OM + Katalase gesteigert ist. Schon ab dem dritten Tag scheint die Zellpopulation, die mit OM und Katalase behandelt wurde, mehr Zellen zu enthalten. Dieser Trend setzt sich bis zum Tag 21 fort und steigt auf das Doppelt- bis Dreifache, im Vergleich zu den anderen Gruppen an Tag 21. Die Behandlung mit OM scheint die Zellzahl, gemessen an der Zellviabilität, zu erhöhen. Die gleichzeitige Applikation mit Katalase verstärkt diesen Effekt zusätzlich.

Der nächste Versuch untersucht die Proliferation der Zellen mittels BrdU-ELISA, wobei hier teilende Zellen detektiert werden, was die Analyse der Proliferation präziser macht.

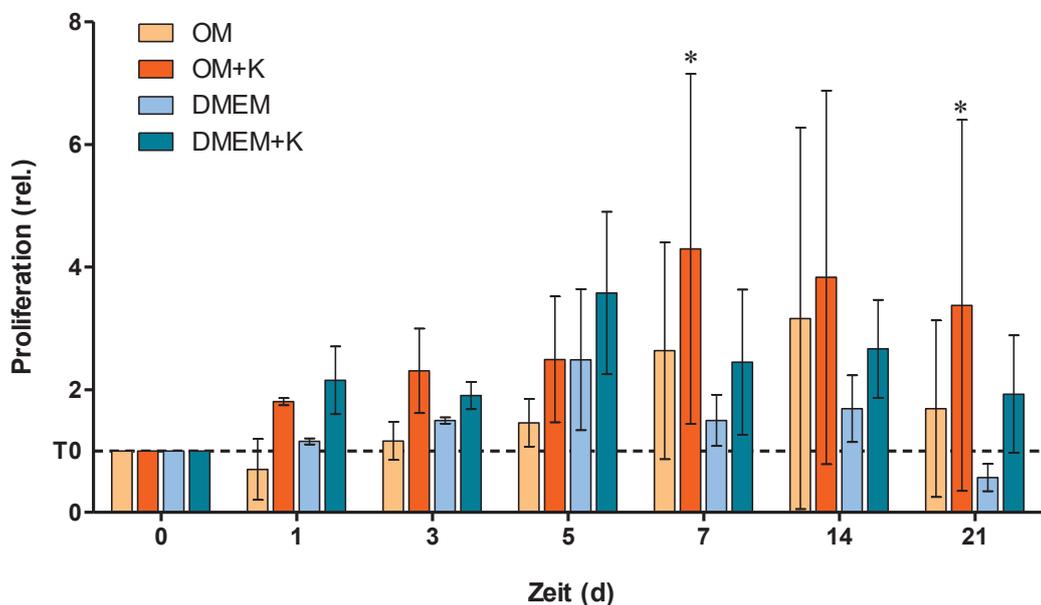


Abb. 12 Einfluss der Katalase-Behandlung auf die Zellteilung. Dargestellt ist die Zellproliferation gemessen mittels BrdU-ELISA über 21 Tage. OM: osteogenes Differenzierungsmedium; OM + K: OM mit Katalase (125 U/ml); DMEM: Proliferationsmedium; DMEM + K: DMEM mit Katalase (125 U/ml). * $p \leq 0,05$, Signifikanzniveaus jeweils bezogen auf DMEM des jeweiligen Messtages. Werte wurden auf T_0 normiert ($n = 6$).

Ähnlich zu den Ergebnissen des vorherigen Versuchs (Abb. 11), scheint die Proliferation der Zellen unter zusätzlicher Katalase-Behandlung gesteigert zu sein. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die Phase der höchsten Proliferation ca. am siebten Tag zu sein scheint. Danach sinkt die Proliferation der Zellen wieder etwas ab. Allerdings wird hier die Zellteilung und nicht die relative Zellzahl (gemessen an der Viabilität) analysiert. Der Zeitpunkt der stärksten Zellteilung am 7. Tag spiegelt sich mit den hohen Zellzahlen an den Tagen 14 und 21 des vorherigen Versuches wieder. Bis auf den 1. und den 5. Tag scheint die zusätzliche Katalase-Behandlung zu OM auch die höchste Proliferation zu verursachen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass auch die Behandlung mit alleinigem OM einen fördernden Effekt auf die Zellteilung der ASCs hat (im Vergleich zur Behandlung mit DMEM). Äquivalent zum vorherigen Versuch bewirkt die Behandlung mit DMEM anscheinend die geringste Steigerung der Proliferation zum Ende der Untersuchung am Tag 21. Allerdings bewirkt die zusätzliche Applikation mit Katalase in Kombination mit DMEM offenbar auch einen proliferationssteigernden Effekt über alle beobachteten Tage hinweg.

Des Weiteren wurde die Proliferation der ASCs am DNA-Gehalt der Zellen unter gleichen Behandlungen, wie bei den Versuchen vorher, über 21 Tage untersucht.

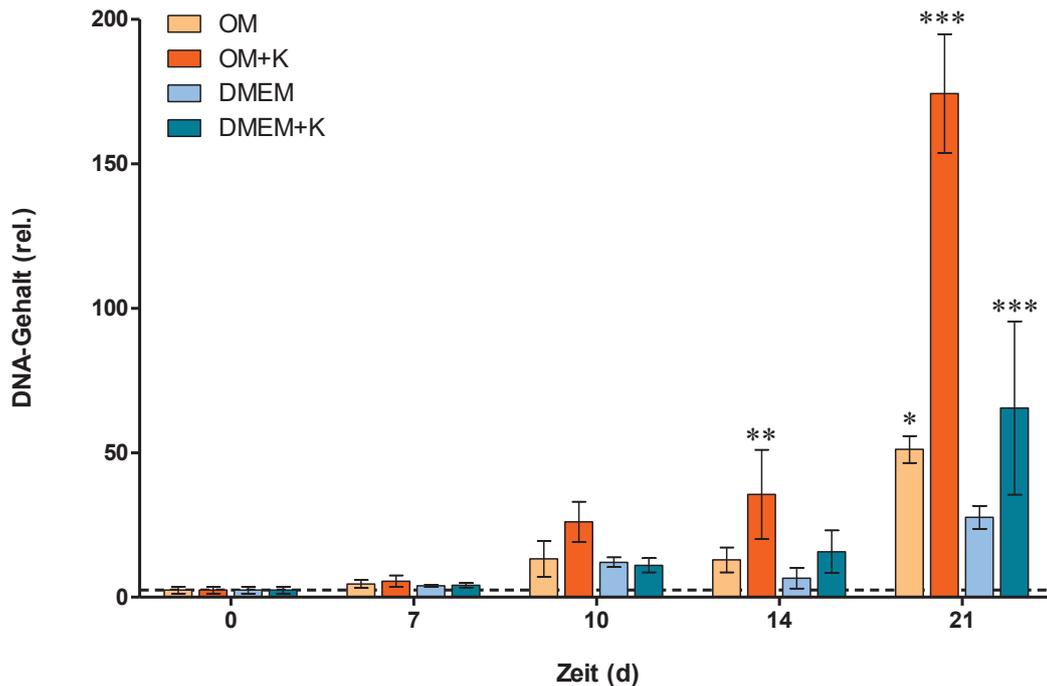


Abb. 13 Analyse des DNA-Gehalts nach Katalase-Behandlung. Dargestellt ist der DNA-Gehalt, gemessen mittels NanoDrop, über 21 Tage. OM: osteogenes Differenzierungsmedium; OM + K: OM mit Katalase (125 U/ml); DMEM: normales Nährmedium; DMEM + K: DMEM mit Katalase (125 U/ml). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, Signifikanzniveaus jeweils bezogen auf DMEM des jeweiligen Messtages. Werte auf T_0 normiert ($n = 3$).

Auch hier zeichnet sich der bereits beobachtete, proliferationssteigernde Effekt der Katalase ab (Abb. 11 und 12). Schon ab der ersten Woche hat die Gruppe, welche zusätzlich zu OM mit Katalase behandelt wurde, den höchsten DNA-Gehalt. Bis zum Tag 21 steigt dieser auf das 175-fache des Ausgangswertes an. Die Zellen, welche nur mit OM behandelt wurden, weisen am Tag 21 einen DNA-Gehalt auf, der doppelt so hoch ist, wie der von jenen Zellen, welche mit Proliferationsmedium behandelt wurden. Auch die Population, die zusätzlich zum Proliferationsmedium mit Katalase inkubiert wurde, weist am letzten Messtag einen ca. doppelt so hohen Wert auf, wie bei den Zellen, die keine zusätzliche Katalase erhalten haben. Somit konnte die proliferationsfördernde Wirkung der Katalase auch in diesem Experiment bestätigt werden.

4.5 Der Einfluss der Katalase auf die intrazelluläre ROS-Konzentration in der frühen Phase der Osteogenese

Reaktive Sauerstoffspezies scheinen einen inhibierenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung von ASCs zu haben. Im Laufe der Osteogenese nimmt die intrazelluläre Konzentration von ROS stetig ab [42]. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Applikation der Katalase einen kurzzeitigen Einfluss auf die intrazelluläre ROS-Konzentration der osteogenen Differenzierung hat.

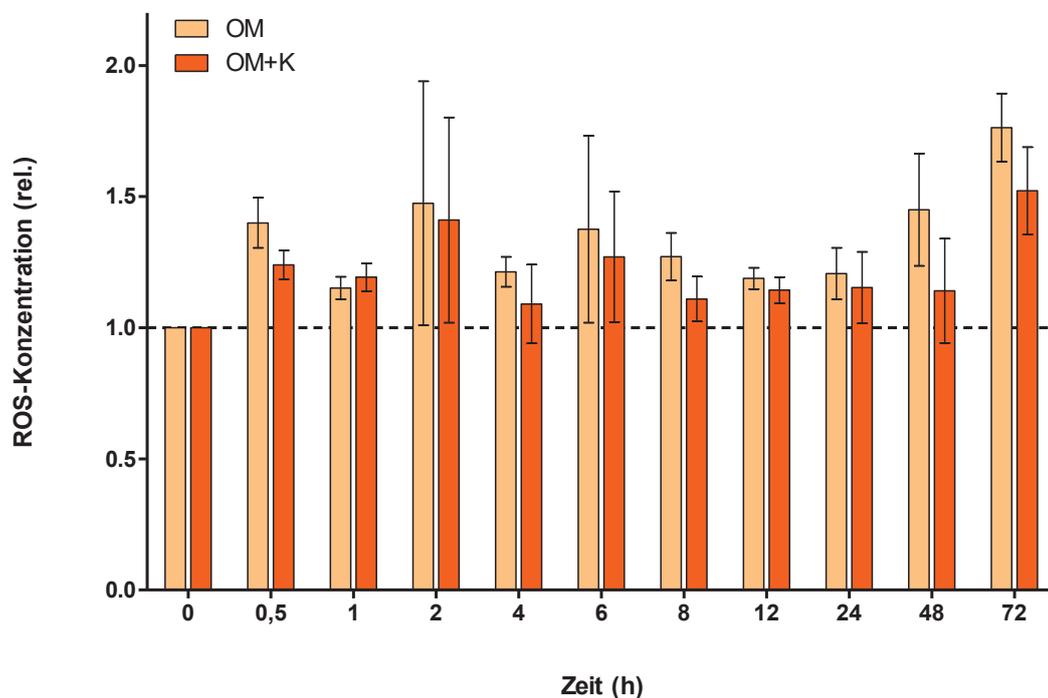


Abb. 14 Bestimmung der intrazellulären ROS-Konzentration. Es ist die intrazelluläre ROS-Konzentration während den ersten 72 h der osteogenen Differenzierung dargestellt. Gemessen mittels DCFDA im Durchflusszytometer. OM: osteogenes Differenzierungsmedium; OM + K: OM mit Katalase (125 U/ml). Werte wurden auf T_0 normiert ($n = 6$).

Es zeigte sich, dass die intrazelluläre ROS-Konzentration kurz nach der Zugabe von OM, im Vergleich zum Ausgangswert erhöht war. Dabei war die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies bei den mit OM behandelten Zellen zu allen Zeitpunkten tendentiell höher, als bei den Zellen, die eine Behandlung mit OM + Katalase erhielten. Nach 48 h und 72 h zeichnete sich ein leichter Anstieg der ROS-Konzentration in den mit OM behandelten Zellen ab. Und es ist festzuhalten, dass (außer nach 1 h der Behandlung) die

zusätzliche Applikation mit Katalase dabei einen geringeren Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration bewirkte.

4.6 Bestimmung der Apoptose während der osteogenen Differenzierung

Aufgrund von erhöhten Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies, kann oxidativer Stress zu Zellzyklusarrest und Zelltod führen [42]. Da die vorherigen Versuche einen proliferations- und differenzierungsfördernden Effekt der Katalase aufzeigten (Abb. 10-13), sollte im folgenden Versuch untersucht werden, ob die Katalase als ROS-abbauendes Enzym die Zellen vor der Apoptose schützte und es daher zu einer vermehrten Zellzahl und verstärkten osteogenen Differenzierung kommt. Dafür wurde der Anteil an apoptotischen Zellen der jeweiligen Population, mit der entsprechenden Behandlung untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die ausschließlich mit Proliferationsmedium behandelt wurden.

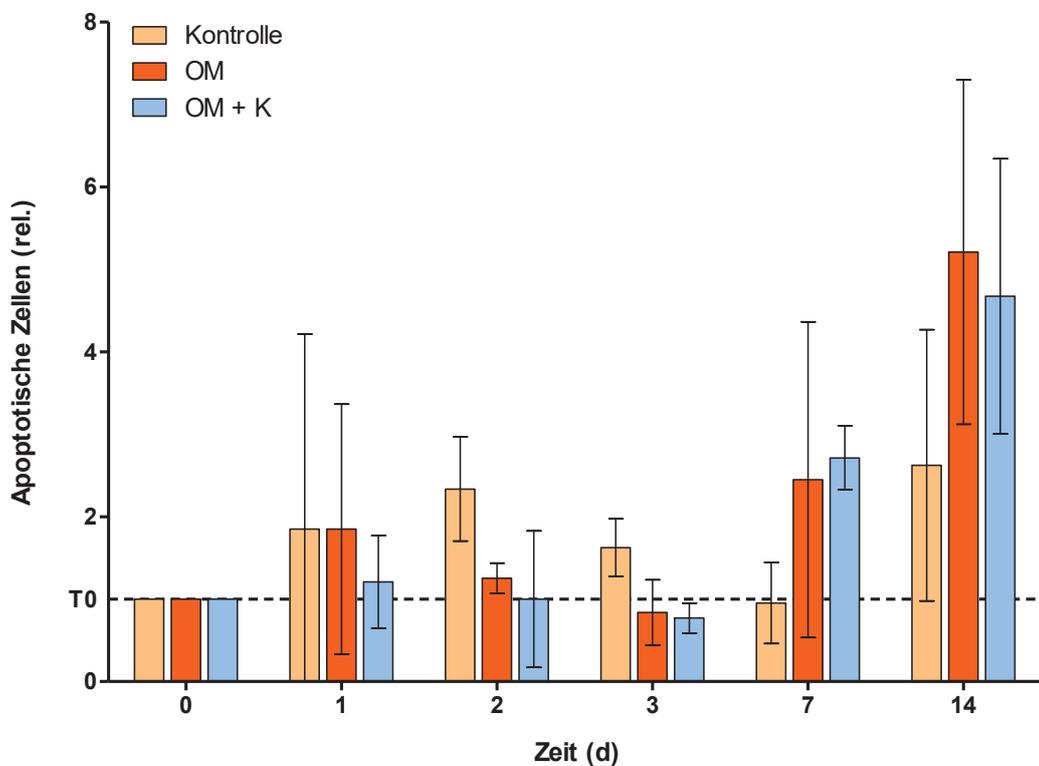


Abb. 15 Relative Anzahl apoptotischer Zellen während der osteogenen Differenzierung. Es ist der relative Anteil apoptotischer Zellen in den ersten 14 Tagen der osteogenen Differenzierung dargestellt.

Kontrolle: Zellen wurden mit DMEM behandelt; OM: osteogenes Differenzierungsmedium; OM + K: OM mit Katalase (125 U/ml) (n = 3).

In den ersten drei Tagen scheint die Zellpopulation, welche als Kontrolle nur mit DMEM behandelt wurde, die meisten apoptotischen Zellen aufzuweisen. Die Zellen, die mit OM und Katalase behandelt wurden, wiesen bis zum 3. Tag den geringsten Anteil verstorbenen Zellen auf. Wohingegen bis zum Tag 3 fast doppelt so viele Zellen in der DMEM-Population abstarben, sank der Anteil apoptotischer Zellen sogar tendenziell. Allerdings sank der apoptotische Anteil der DMEM-Population auch bis zum Tag 7 immer weiter ab und erreichte wieder seinen Ausgangswert von Tag 0. Dies verhielt sich bei den Zellen mit OM und OM + Katalase anders. Diese hatten ab Tag 7 eine deutlich erhöhte Fraktion von apoptotischen Zellen. Bis zum Tag 14 stieg diese auf das ca. 5-fache im Vergleich zu Tag 0 an. Dabei waren bei den Zellen, welche zusätzlich mit Katalase behandelt wurden allerdings weniger apoptotische Zellen als in der Population, die nur mit OM behandelt wurde. Auch bei den Zellen, welche mit DMEM behandelt wurden, stieg der apoptotische Anteil. Dieser erreichte bis zum Tag 14 einen ca. 2,5-fach erhöhten Wert, verglichen mit dem Ausgangswert an Tag 0. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Katalase die Zellen nur in den ersten Tagen der osteogenen Differenzierung (Tag 3) vor vermehrter Apoptose schützt. Ab Tag 14 kehrt sich dieser Effekt um, da die Behandlung mit Katalase zu einer deutlich erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen führt.

4.7 Ermittlung der optimalen Behandlungsdauer mit Katalase

Im folgenden Versuch sollte die optimale Behandlungsdauer mit Katalase, in Bezug auf die osteogene Differenzierung der ASCs ermittelt werden. Es sollte geklärt werden, für wie lange die zusätzliche Applikation mit Katalase ausreicht, um die Differenzierung zu fördern und inwiefern das mit dem proliferationsfördernden Effekt in Verbindung zu bringen ist. Es stellt sich ja die Frage, ob die gesteigerte Proliferation der Zellen durch eine Katalase-Behandlung nur mehr Zellen hervorbringt, die sich osteogen Differenzierung können, oder ob die Katalase einen verstärkten Effekt auf die Osteogenese hat.

Dabei wurde die Zellzahl (gemessen an der Zellviabilität), mithilfe des CellTiter-Blue[®] *Cell Viability Assay*, an jedem Messzeitpunkt einzeln und am Schluss des Beobachtungszeitraums gemessen. Die Analyse der Differenzierung erfolgte, indem die

Zellen bis zu den einzelnen Messtagen zusätzlich zum OM mit Katalase behandelt wurden und anschließend nur noch mit OM inkubiert wurden. Am Ende der Versuchsdauer an Tag 21 wurde die osteogene Differenzierung mithilfe der Alizarin-Rot-S-Färbung und CPC-Rücklösung quantifiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die über 21 Tage nur mit OM behandelt wurden. Diese sind hier als T₀ dargestellt.

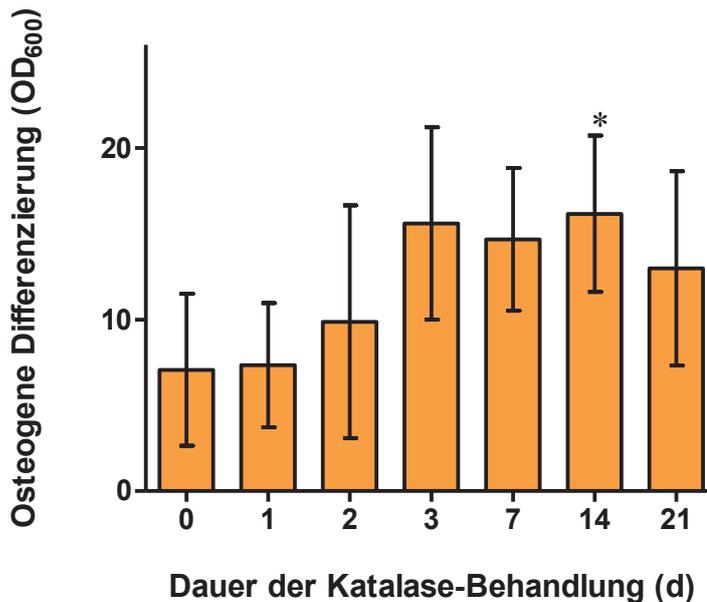


Abb. 16 Optimale Dauer der Katalase-Behandlung für die osteogene Differenzierung. Dargestellt ist die osteogene Differenzierung bei unterschiedlicher Dauer der Katalase-Behandlung (125 U/ml). Zum Zeitpunkt 0 haben die Zellen nur OM und keine Katalase erhalten und zum Zeitpunkt 21 wurden die Zellen 21 Tage zusätzlich mit Katalase behandelt. Bei allen Zellen wurde nach 21 Tagen die osteogene Differenzierung quantifiziert. Signifikanzniveaus beziehen sich auf T₀. * $p \leq 0,05$ (n = 7).

Die Ergebnisse zeigen, dass eine zusätzliche Applikation der Katalase für 2 Tage ausreicht, um eine verbesserte osteogene Differenzierung zu bewirken. Außerdem zeigt sich, dass eine 3-tägige Katalase-Behandlung schon vollends ausreicht (verglichen mit einer 7-, oder 14-tägigen Applikation), um eine optimale Differenzierung zu erzielen. Weiterhin überrascht, dass eine Katalase-Behandlung über 21 Tage keinen zusätzlichen Benefit gegenüber der dreitägigen Behandlung hat und dass die osteogene Differenzierung im Vergleich sogar etwas geringer ist.

Im nächsten Versuch sollte die Zellzahl unter gleichen Bedingungen untersucht werden. Hierfür wurden die ASCs wieder zusätzlich zu OM mit Katalase (125 U/ml) behandelt und zu den Messzeitpunkten entweder sofort (Abb. 17a) oder erst nach 21 Tagen zusammen gemessen (Abb. 17b). Dabei wurden die Zellen, die erst am T₂₁ gemessen wurden ab dem jeweiligen Zeitpunkt nur noch mit OM behandelt (Abb. 17b). Als Kontrolle für beide Versuchsmodelle dienten ASCs, die über 21 Tage nur mit OM inkubiert wurden.

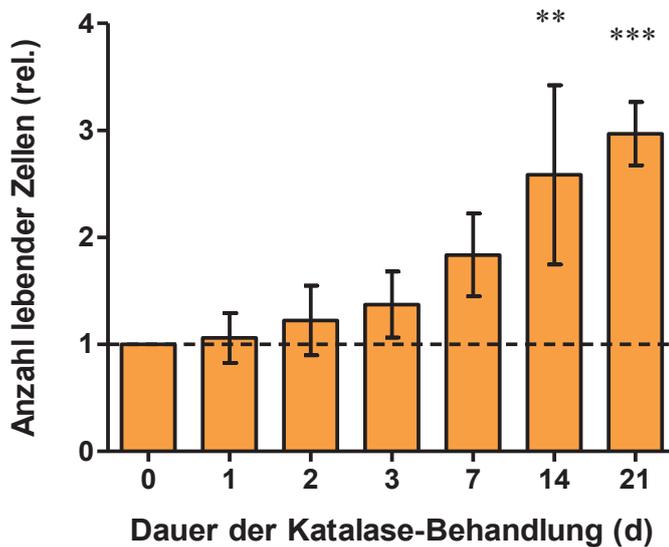


Abb. 17a Einfluss der Katalase-Behandlung auf die Zellzahl (direkte Analyse). Dargestellt ist die relative Zellzahl bei unterschiedlicher Dauer der Katalase-Behandlung (125 U/ml). Beim Zeitpunkt 0 haben die Zellen 21 Tage nur OM erhalten und wurden am T₂₁ analysiert. Zu den anderen Zeitpunkten wurden die ASCs bis zu den angegebenen Tagen zusätzlich mit Katalase behandelt und an dem **jeweiligen** Tag sofort gemessen. Die Werte wurden auf T₀ normiert. Signifikanzniveaus beziehen sich auf T₀. **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001 (n = 3).

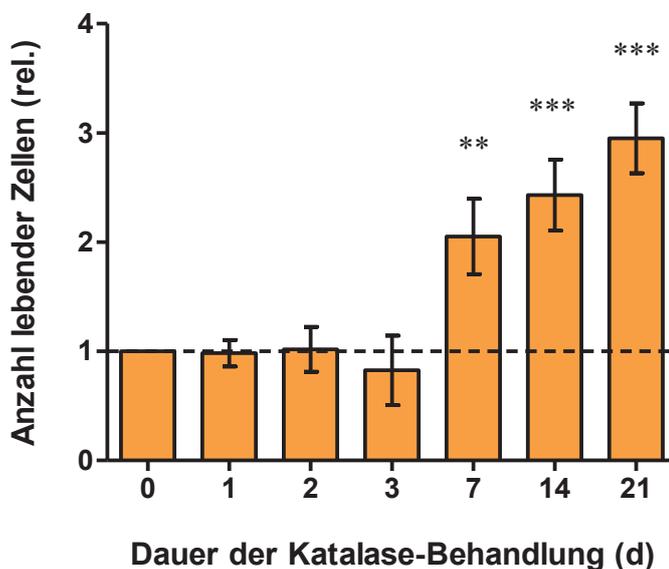


Abb. 17b Einfluss der Katalase-Behandlung auf die Zellzahl (Analyse am Tag 21). Dargestellt ist die relative Zellzahl bei unterschiedlicher Dauer der Katalase-Behandlung (125 U/ml). Beim Zeitpunkt 0 haben die Zellen 21 Tage nur OM erhalten. Bis zu den anderen Zeitpunkten wurden die Zellen zusätzlich mit Katalase und anschließend nur noch mit OM behandelt. Am Tag 21 wurden alle gemessen. Die Werte wurden auf T₀ normiert. Signifikanzniveaus beziehen sich auf T₀. **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001 (n = 3).

Die Ergebnisse des ersten Versuchs (Abb. 17a) zeigen, dass die Anzahl der Zellen bei einer alleinigen Behandlung mit OM über 21 Tage am geringsten ist. Während diese Zellen über 21 Tage mit OM inkubiert wurden, wurde die Zellzahl der Zellen, welche zusätzlich mit Katalase behandelt wurden an dem entsprechenden Messtag ausgewertet. Dennoch ist bei diesen Zellen schon nach einem Tag zusätzlicher Katalase-Applikation die Zellzahl höher. Dies setzt sich bis zum 21. Tag fort, bei dem ca. 3-mal so viele Zellen vorhanden sind. Die Zellzahl scheint somit mit der Dauer der Katalase-Behandlung anzusteigen.

Bei dem Experiment (Abb. 17b) zeigt sich, dass eine 3-tägige Behandlung mit Katalase keinen fördernden Effekt auf die Zellzahl der ASCs zu haben scheint, wenn sie im Anschluss noch weitere 18 Tage mit OM inkubiert werden. Erst nach 7 Tagen zeigt sich eine signifikante Verdopplung der Anzahl an Zellen und nach 21 Tagen erreichen die ASCs in diesem Versuchsmodell dann auch eine Verdreifachung an lebenden Zellen, wie es schon im ersten Versuchsmodell gezeigt werden konnte.

Die bereits mehrfach gezeigte, gesteigerte osteogene Differenzierung der Zellen, welche mit Katalase behandelt wurden, scheint somit nicht alleine durch die vermehrte Proliferation der ASCs, bedingt zu sein. Ansonsten würde die Differenzierung der Zellen proportional mit der vermehrten Proliferation der Zellen über die 21 Tage ansteigen. Vergleicht man die Versuche der osteogenen Differenzierung und der Zellzahl im gleichen Versuchsmodell (unterschiedliche Katalase-Behandlungsdauer, mit Analyse aller Zellen am Tag 21; Vergleich Abb. 16 zu Abb. 17b), bleibt die osteogene Differenzierung nach 3 Tagen Katalase-Behandlung unverändert, wohingegen die Zellzahl nach 2 und 3 Wochen weiter ansteigt. Außerdem wäre eine gesteigerte Proliferation am 3. Tag zu erwarten gewesen, wenn davon ausgegangen würde, dass das gesteigerte osteogene Differenzierungspotential ausschließlich durch die Erhöhung der Zellzahl zu erklären ist. Das Absinken der Zellzahl an Tag 3 des 2. Versuches lässt sich durch die vermehrte Apoptose von Osteozyten erklären, welche nach der Matrixkalzifizierung zu Grunde gehen.

4.8 Ein Vergleich zwischen der Behandlung mit aktiver vs. inaktiver Katalase

Um den Einfluss der Katalase auf die Zellzahl und osteogene Differenzierung der ASCs genauer zu untersuchen, wurde auch die Wirkung von aktiver und inaktiver Katalase analysiert. Somit sollte geprüft werden, ob die enzymatische Funktion der Katalase für die proliferations- und differenzierungsfördernden Effekte verantwortlich ist.

Die ASCs wurden einerseits mit OM und Katalase (125 U/ml), andererseits mit OM und denaturierter Katalase (125 U/ml; 95°C für 20min in Aqua dest.) behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit OM behandelt wurden.

Zunächst wurde die Proliferation anhand der Anzahl an lebendigen Zellen in der jeweiligen Zellpopulation mithilfe des CellTiter-Blue® *Cell Viability Assay* analysiert.

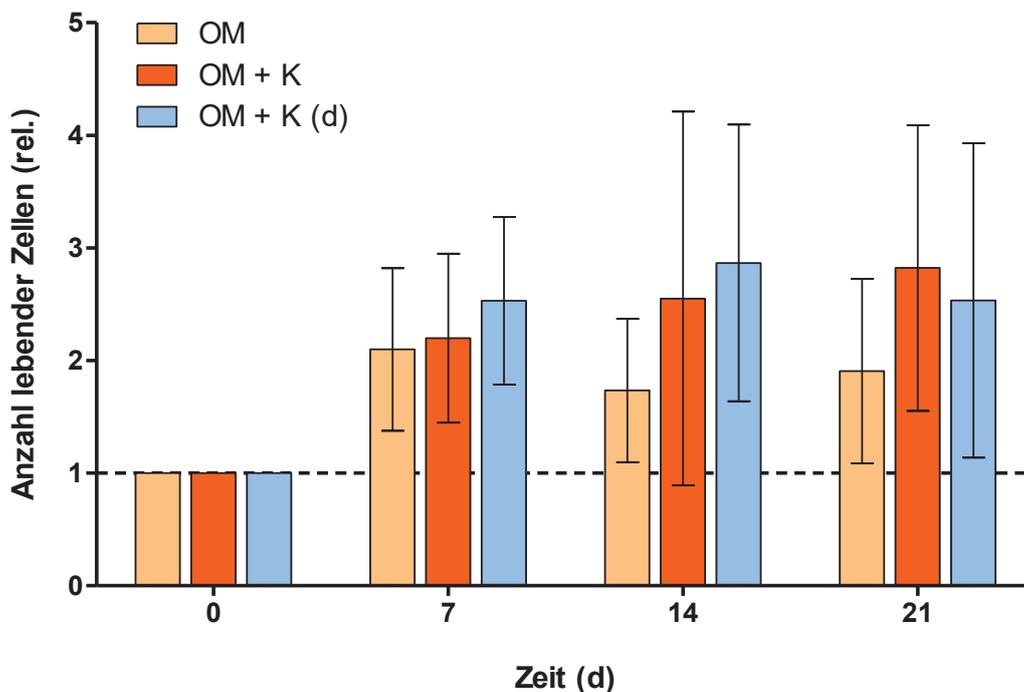


Abb. 18 Proliferation unter Behandlung mit aktiver und inaktiver Katalase. Dargestellt ist die relative Zellzahl, bei zusätzlicher Applikation mit aktiver und inaktiver Katalase (125 U/ml). Kontrolle waren ASCs, die nur mit OM behandelt wurden. Die Werte wurden auf Tag 0 normiert (n = 5).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die relative Zellzahl in den jeweiligen Versuchsgruppen nach 7 Tagen in etwa verdoppelt, bis 2,5-fach erhöht hat. Dabei unterschieden sich die Versuchsgruppen nur gering. Die Population, die zusätzlich mit denaturierter Katalase inkubiert wurde, wies dabei leicht erhöhte Werte zu den anderen beiden Gruppen auf.

Nach 14 Tagen unterschieden sich die Populationen deutlicher. Dabei war die Anzahl lebendiger Zellen, welche nur mit OM behandelt wurden ca. 1,7-fach zum Ausgangswert erhöht. Außerdem war die Proliferation der Versuchsgruppe, die zusätzlich mit aktiver Katalase und inaktiver Katalase behandelt wurde, um das ca. 2,5-fache bzw. 2,9-fache höher, als der jeweilige Startwert. Ein ähnliches Bild zeigen die Ergebnisse von Tag 21. Auch hier waren weniger Zellen in der Zellpopulation, die nur mit OM behandelt wurde (1,9-mal mehr als T_0). Anders als an Tag 14 war die Zellzahl, der mit aktiver Katalase behandelten Zellen, mit 2,8-facher Erhöhung zum Ausgangswert etwas höher, als bei der Population die mit denaturierter Katalase inkubiert wurde (2,5-fach zu T_0 erhöht). Überraschenderweise lässt sich festhalten, dass deutliche Unterschiede in der Anzahl lebendiger Zellen nur in der Behandlung mit oder ohne Katalase zu finden sind, weniger in der Behandlung von aktiver zu inaktiver Katalase.

Im nächsten Versuch wurde der Einfluss der inaktivierten Katalase auf die osteogene Differenzierung der Zellen untersucht.

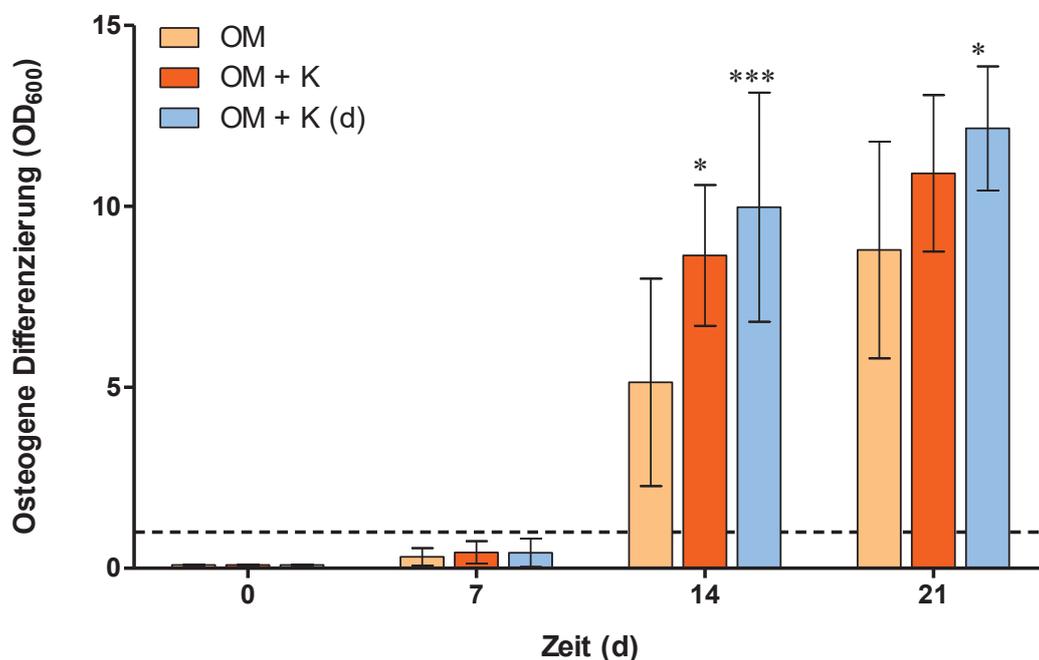


Abb. 19 Osteogene Differenzierung unter Behandlung mit aktiver und inaktiver Katalase. Dargestellt ist die osteogene Differenzierung der ASCs unter zusätzlicher Applikation mit aktiver und inaktiver Katalase (125 U/ml). Kontrolle waren Zellen, die nur mit OM behandelt wurde. Signifikanzniveaus beziehen sich auf OM des jeweiligen Messzeitpunktes. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ ($n = 5$).

Hierbei lässt sich erkennen, dass die Zellen nach 7 Tagen kaum differenziert waren und sich nur leicht von T_0 unterschieden. Dies änderte sich nach 14 Tagen. Nun war die OD_{600} aller Zellpopulationen über dem Schwellenwert von 1. Dabei waren die Zellen, welche nur mit OM behandelt wurden an Tag 14 und 21 geringer differenziert als die Zellen, welche additiv mit Katalase behandelt wurden. Die ASCs, die zusätzlich mit denaturierter Katalase behandelt wurden, waren an Tag 14 und 21 sogar stärker differenziert als die, die mit aktiver Katalase inkubiert wurden.

4.9 Bestimmung der Aktivierung der Proteinexpression von FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Im nächsten Versuch sollte analysiert werden, wann es zu einer verstärkten Proteinexpression der drei Transkriptionsfaktoren FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin, im Verlauf der osteogenen Differenzierung, im Vergleich zu einer zusätzlichen Applikation von Katalase (125 U/ml) kommt. Die Daten sollten einen Rückschluss auf die Bedeutung dieser Faktoren im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung liefern.

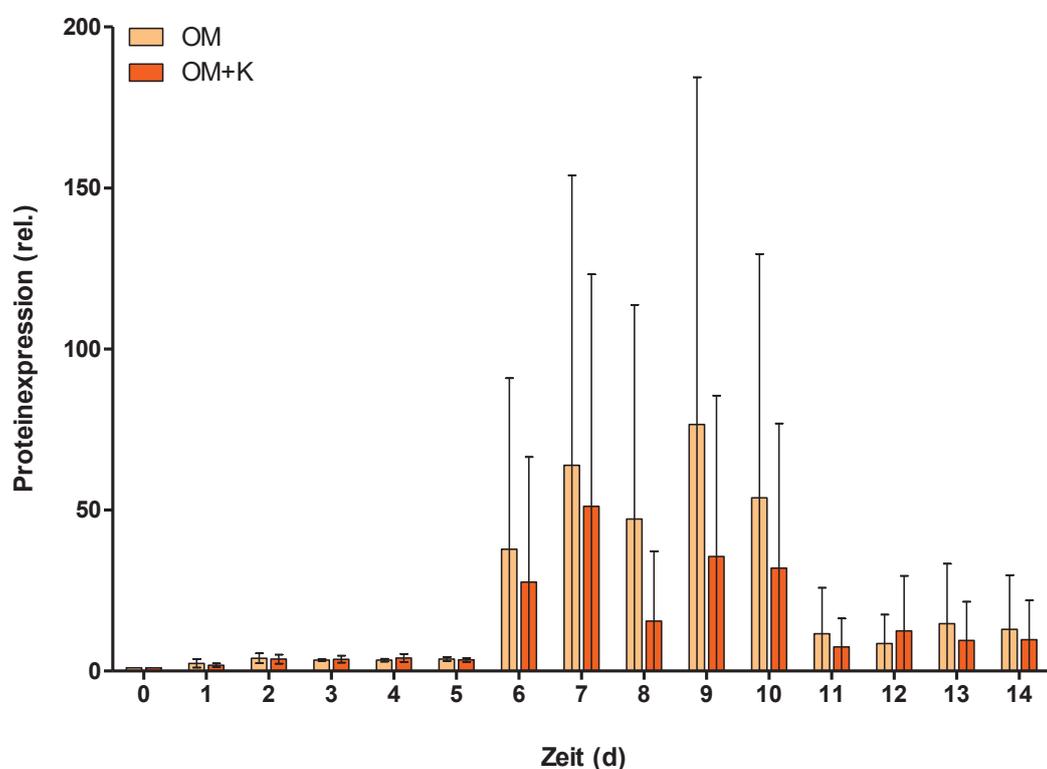


Abb. 20 FoxO 1-Expression unter Katalase-Behandlung. Es ist die Proteinexpression von FoxO 1 unter OM-Behandlung und zusätzlicher Katalase-Applikation (125 U/ml) über 14 Tage dargestellt. Anschließend

erfolgte die Proteinanalyse aller Proben im Western-Blot-Verfahren. Die Werte wurden auf T_0 normiert ($n = 2$).

Es zeigt sich eine vermehrte Proteinexpression um die Tage 6 bis 10. Dabei scheint die Expression von FoxO 1 bei den Zellen höher zu sein, welche nur mit OM inkubiert wurden. Der höchste Ausschlag der Proteinexpression findet sich am 9. Tag. Dagegen war die stärkste Expression von FoxO 1, bei den zusätzlich mit Katalase behandelten Zellen, am 7. Tag tendenziell am höchsten. Eine zusätzliche Applikation mit Katalase scheint die Expression von FoxO 1 also tendenziell zu verringern.

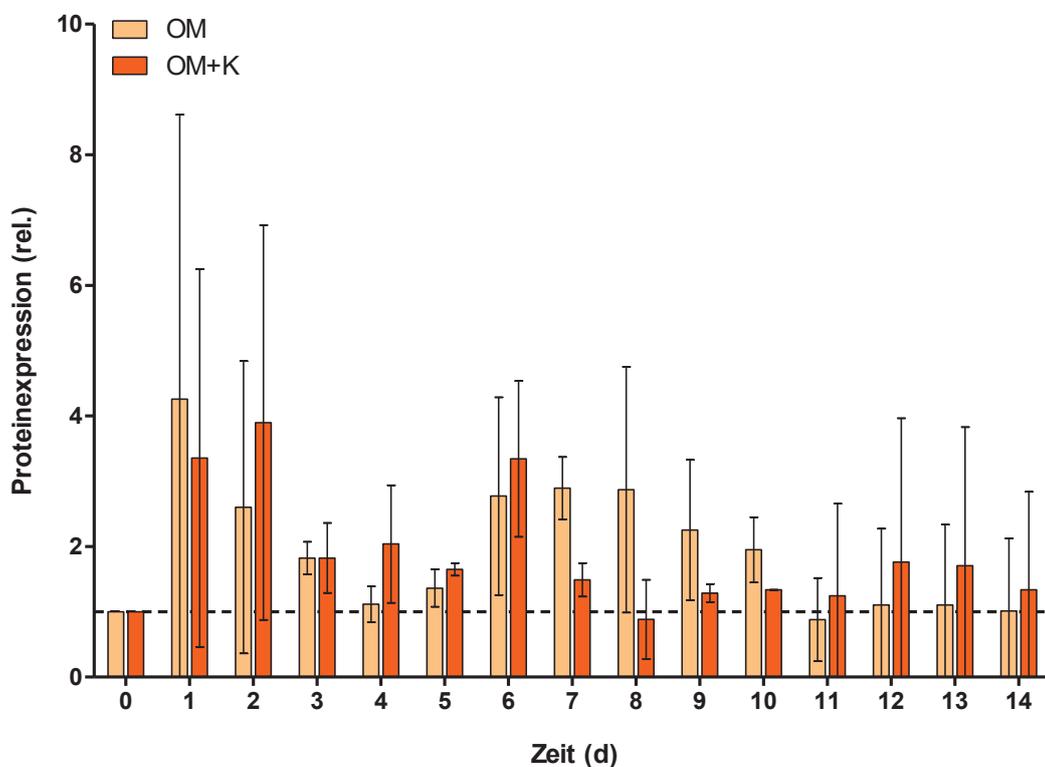


Abb. 21 FoxO 3a-Expression unter Katalase-Behandlung. Es ist die Proteinexpression von FoxO 3a unter OM-Behandlung und zusätzlicher Katalase-Applikation (125 U/ml) über 14 Tage dargestellt. Anschließend erfolgte die Proteinanalyse aller Proben im Western-Blot-Verfahren. Die Werte wurden auf T_0 normiert ($n = 2$).

Die Ergebnisse der Analyse von FoxO 3a zeigen eine starke Expression in den ersten 2 Tagen der Behandlung. Wohingegen die höchste Proteinexpression am 1. Tag noch die Zellen hatten, welche nur mit OM behandelt wurden, war es am 2. Tag umgekehrt. Bis zum Tag 6 schien sich die Expression von FoxO 3a nicht allzu stark vom Ausgangswert

an T_0 zu unterscheiden. Allerdings wiesen die Zellen am 6. Tag einen erneuten *Peak* der Expression auf. Dabei hatte die Katalase-Population mit einer ca. 3,3-fachen Erhöhung zum Ausgangswert eine stärkere Ausprägung als die, die nur mit OM behandelt wurde (ca. 2,8). Wohingegen die Proteinexpression von FoxO 3a bei der OM-Population anschließend bis zum Tag 11 langsam auf Höhe des Ausgangswertes abfiel, sank die Expression bei den Zellen, die mit Katalase behandelt wurden nach dem 6. Tag abrupt ab und blieb annähernd (bis auf eine leichte Erhöhung zum Ende der Betrachtung) auf diesem Level.

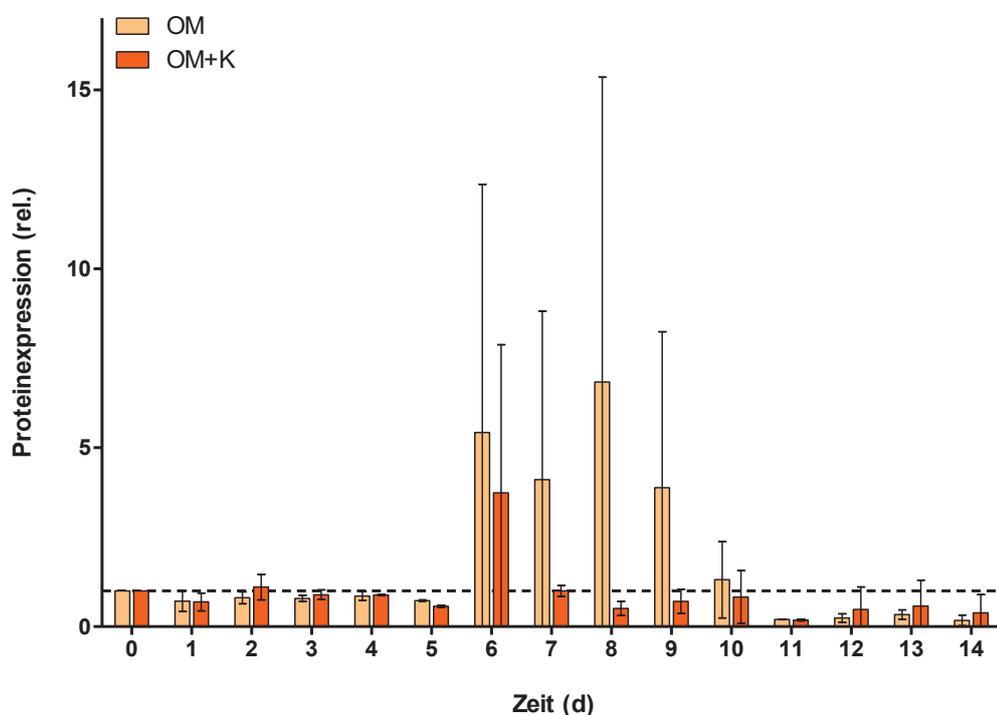


Abb. 22 β -Catenin-Expression unter Katalase-Behandlung. Es ist die Proteinexpression von β -Catenin unter OM-Behandlung und zusätzlicher Katalase-Applikation (125 U/ml) über 14 Tage dargestellt. Anschließend erfolgte die Proteinanalyse aller Proben im Western-Blot-Verfahren. Die Werte wurden auf T_0 normiert ($n = 2$).

Auch bei β -Catenin (wie bei FoxO 1) war eine vermehrte Proteinexpression vom 6. bis zum 9. Tag bei den ASCs zu beobachten, die mit OM behandelt wurden. Die höchste Ausprägung der Expression an Tag 9 hatte eine ca. 6,8-fache Erhöhung zum Ausgangswert an T_0 . Dagegen war die höchste Proteinexpression der Zellen, die zusätzlich mit Katalase behandelt wurden, nur am 6. Tag um das ca. 3,7-fache (zu T_0) erhöht.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Messzeitpunkte für die Evaluation der Expression der Transkriptionsfaktoren im Zellkern und die damit wahrscheinlich verbundene Aktivierung an Tag 3, 6 und 14 der osteogenen Differenzierung durchgeführt. Dabei sollte der 3. Tag die frühe Expression von FoxO 3a und der 6. Tag die deutliche Proteinexpression von FoxO 1 und β -Catenin einschließen. Außerdem wurde Tag 3 einbezogen, um die frühe osteoinduktive Wirkung der Katalase, welche sich in vorherigen Versuchen zeigte (Abb. 16), auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren weiter zu analysierten.

4.10 Analyse der Proteinexpression von FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin in der zytoplasmatischen und der nukleären Fraktion unter verschiedenen Behandlungen

In diesem Versuch sollte die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin unter (anti-) oxidativen Bedingungen untersucht werden. Dies sollte Rückschlüsse über deren Einfluss auf die Aktivierung von Zielgenen liefern, die für die Regulation antioxidativer, oxidativer und osteogener Mechanismen von Bedeutung sind. Dafür wurden die Proteine anhand ihrer Lokalisation in der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion getrennt analysiert.

Außer bei einer Kontrolle, die ausschließlich mit OM behandelt wurde, wurden den 3 restlichen Versuchsgruppen zusätzlich verschiedene Medienzusätze hinzugefügt. Diese bestanden aus einer zusätzlichen Applikation von Katalase (125 U/ml), H_2O_2 (50 μ M), oder einer Kombination aus Katalase (125 U/ml) und 3-Amino-1,2,4-Triazol (ATA; 500 nM), einem Katalase-Inhibitor.

Die Zellen wurden mit den jeweiligen Medienkonstellationen inkubiert und an den Tagen 0, 3, 6, 14 geerntet, sowie in die zytoplasmatische und nukleäre Fraktion aufgetrennt. Anschließend wurden die Zellysate weggefroren und die Proteinproben später mittels Western-Blot-Verfahren analysiert.

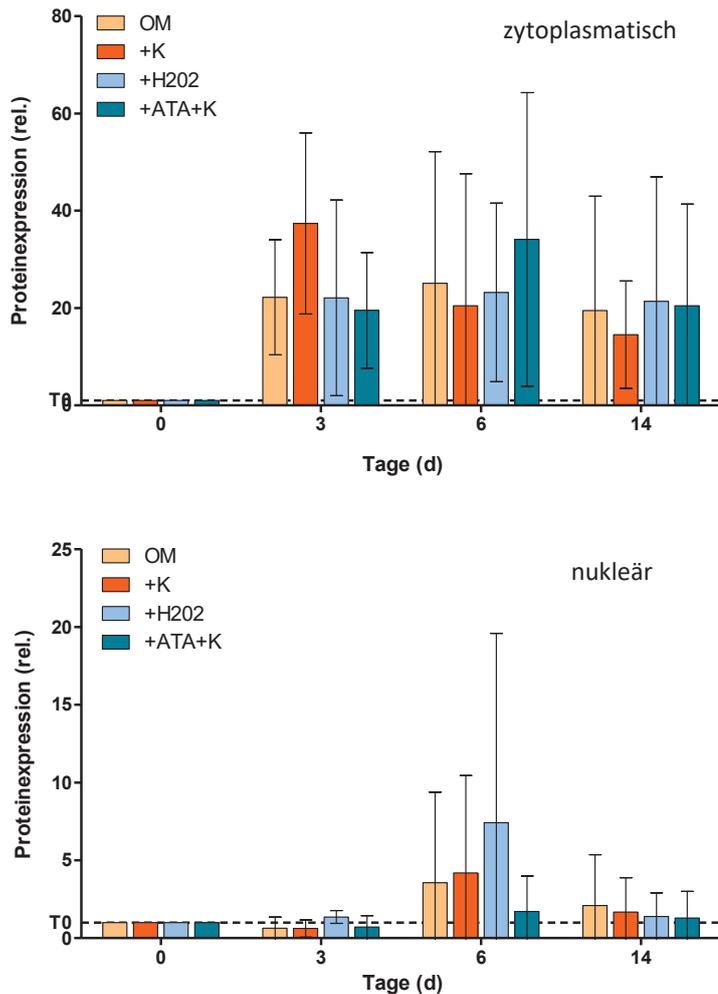


Abb. 23
Proteinexpression von FoxO 1. Dargestellt ist die relative Proteinexpression des Transkriptionsfaktors FoxO 1 in der zytoplasmatischen (oben) und nukleären Fraktion (unten). Die Zellen wurden mit OM allein, sowie zusätzlich mit Katalase (125 U/ml), H₂O₂ (50 µM), oder einer Kombination aus Katalase (125 U/ml) und ATA (500 nM) behandelt. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte später mittels Western-Blot-Verfahren. Die Werte wurden auf T₀ normiert (n = 3).

Grundsätzlich zeigte sich eine vermehrte Lokalisation von FoxO 1 im Zytoplasma, bei allen Behandlungsformen während der osteogenen Differenzierung. Dabei führte die Behandlung mit Katalase an Tag 3 zur höchsten Steigerung des Proteins im Zytoplasma (ca. 40-fach zum Ausgangswert). Interessant ist, dass die inhibierte Katalase (durch ATA) am Tag 6 zu einer ähnlich starken Erhöhung von FoxO 1 im Zytoplasma führte (ca. 34-fache zum Ausgangswert). Die Applikation von H₂O₂ führte, wie die reine Behandlung mit OM, über alle Messzeitpunkte zu einer stetigen Erhöhung um das ca. 20-fache zum Ausgangswert.

Interessant ist auch, dass das generell vermehrte Aufkommen von FoxO 1 im Zytoplasma durch alle Behandlungsformen, nur an Tag 6 zu einer stärkeren Lokalisierung im Nukleus führte. Dabei bewirkte die Applikation von H₂O₂ die höchste Ausprägung (mit 7,4-fach zum Ausgangswert) von FoxO 1 im Zellkern. Die mit Katalase behandelten Zellen zeigten an diesem Tag allerdings eine etwa halb so starke Expression von FoxO 1 im Nukleus, wie die ASCs, welche mit H₂O₂ behandelt wurden. Durch die isoliert vermehrte

Lokalisation von FoxO 1 im Zellkern, lässt sich eine Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Nukleus ableiten, welcher am stärksten durch eine Behandlung mit H₂O₂ hervorgerufen wird.

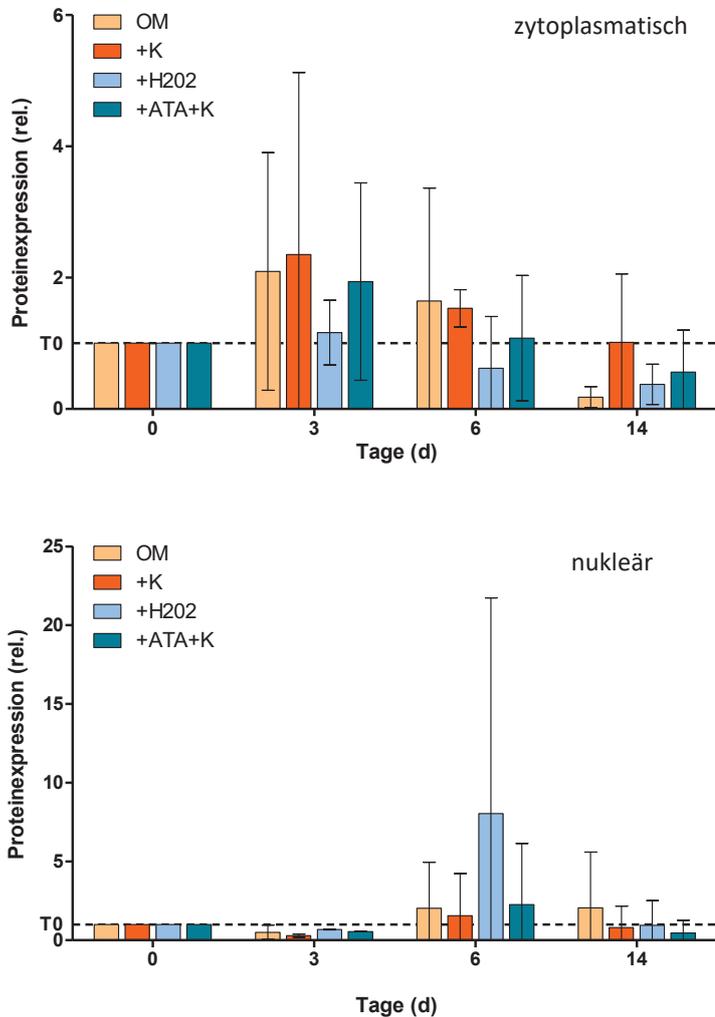


Abb. 24
Proteinexpression von FoxO 3a. Dargestellt ist die relative Proteinexpression des Transkriptionsfaktors FoxO 3a in der zytoplasmatischen (oben) und nukleären Fraktion (unten). Die Zellen wurden mit OM allein, sowie zusätzlich mit Katalase (125 U/ml), H₂O₂ (50 µM), oder einer Kombination aus Katalase (125 U/ml) und ATA (500 nM) behandelt. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte später mittels Western-Blot-Verfahren. Die Werte wurden auf T₀ normiert (n = 3).

Ähnlich wie bei FoxO 1 bewirkte die Applikation mit Katalase eine erhöhte Lokalisation von FoxO 3a im Zytoplasma, am 3. Tag der osteogenen Differenzierung (ca. 2,4-fach zum Ausgangswert). Etwas weniger stark fiel die Ausprägung von FoxO 3a, durch die Behandlungen mit OM und OM/ATA aus (um das ca. 2-fache zum Ausgangswert). Außerdem sank FoxO 3a im Zytoplasma im Verlauf der osteogenen Differenzierung stetig ab. Interessant ist vor allem, dass die Applikation mit H₂O₂ zu einer deutlichen Steigerung von FoxO 3a im Nukleus führt. An Tag 6 war FoxO 3a in etwa 8-fach zum Ausgangswert erhöht. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Translokation von FoxO 3a in den Zellkern noch deutlicher nachvollziehen als bei FoxO 1.

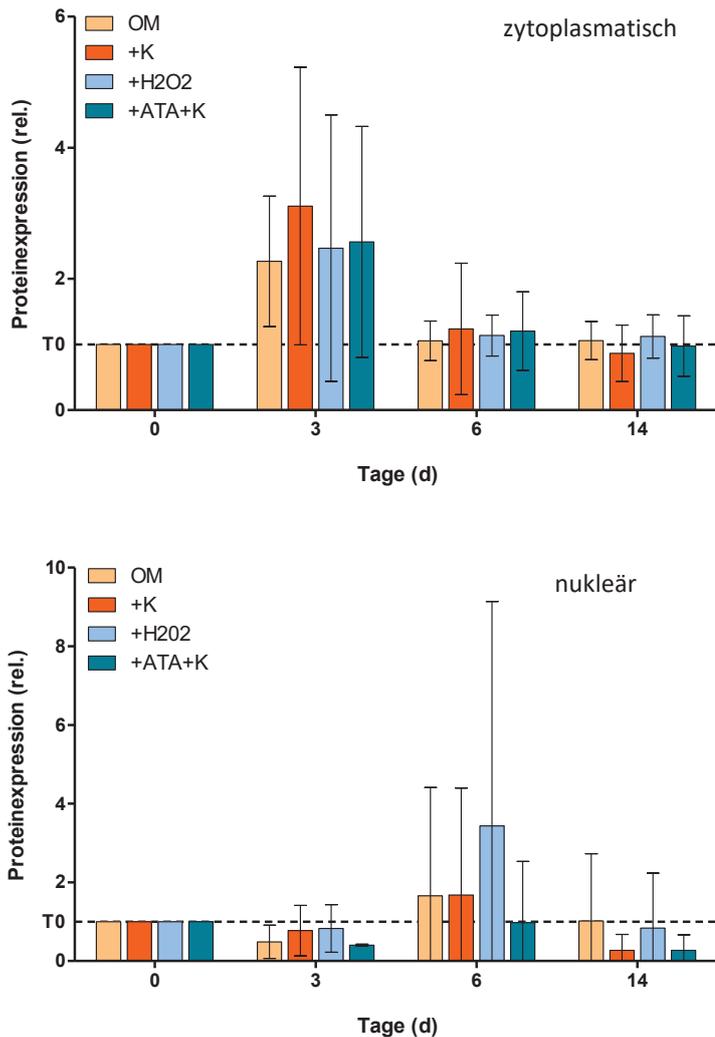


Abb. 25
Proteinexpression von β -Catenin. Dargestellt ist die relative Proteinexpression des Transkriptionsfaktors β -Catenin in der zytoplasmatischen (oben) und nukleären Fraktion (unten). Die Zellen wurden mit OM allein, sowie zusätzlich mit Katalase (125 U/ml), H_2O_2 (50 μ M), oder einer Kombination aus Katalase (125 U/ml) und ATA (500 nM) behandelt. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte später mittels Western-Blot-Verfahren. Die Werte wurden auf T_0 normiert (n = 3).

Auch hier zeigt sich die stärkste Ausprägung von β -Catenin am 3. Tag der osteogenen Differenzierung. Erneut führte dabei die Behandlung mit Katalase, tendenziell zu dem höchsten Aufkommen des Proteins (ca. 3,1-fach zum Ausgangswert). Die anderen Applikationen bewirkten, mit einer ca. 2,5-fachen Erhöhung zu Tag 0, eine etwas geringere Lokalisierung von β -Catenin im Zytoplasma. Dies spiegelt die Ergebnisse aus vorherigen Versuchen wieder, in denen die osteogene Differenzierung durch Katalase besonders an Tag 3 der Osteogenese gesteigert war (Abb. 16). Überraschender Weise führte die Inkubation mit H_2O_2 am 6. Tag der osteogenen Differenzierung auch zu einer erhöhten Lokalisation von β -Catenin im Nukleus (ca. 3,4-fache Erhöhung zum Ausgangswert).

5. Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies und antioxidativer Enzyme in Bezug auf Proliferation und osteogene Differenzierung von ASC analysiert werden. Insbesondere die Wirkung der Katalase im Zusammenhang mit Proliferation und Osteogenese wurde dabei im Detail untersucht. Aufgrund der beobachteten osteoinduktiven Wirkung der Katalase auf die ASCs (Abb. 10) sollte zunächst die optimale Behandlungsdauer und -konzentration für die Zellen ermittelt werden. Außerdem wurde der Einfluss der Katalase auf Apoptose und intrazelluläre ROS-Konzentration der ASCs während der osteogenen Differenzierung analysiert. Anschließend sollte der zugrundeliegende Mechanismus der pro-osteogenen Wirkung der Katalase auf die ASCs näher untersucht werden. Dadurch konnte die *in vitro* Osteogenese von ASCs, als vielversprechende Zellquelle im *Bone Tissue Engineering*, durch die Ergebnisse dieser Arbeit optimiert werden.

Des Weiteren wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Box Familie untersucht, die bei der Osteogenese und Aktivierung von antioxidativen Schutzmechanismen eine Rolle spielen. Außerdem sollte die Aktivität von β -Catenin, als wesentlicher Mediator des Wnt- Signalweges, auf die Einflüsse von ROS und antioxidativen Enzymen (wie Katalase) untersucht werden. Aufgrund der inhibierenden Wirkung von FoxOs auf den kanonischen Wnt-Signalweg unter oxidativem Stress, sollten die wechselseitigen Einflüsse der Transkriptionsfaktoren unter (anti-) oxidativen Bedingungen analysiert werden.

5.1 Auswirkungen antioxidativer Enzyme (Katalase) und reaktiver Sauerstoffspezies (H_2O_2) auf die Proliferation und osteogene Differenzierung der ASCs

Neben der schon lange bekannten, schädlichen und als oxidativen Stress bezeichneten Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf Zellen und Makromoleküle des menschlichen Körpers [81, 82], deuten mehrere Arbeiten auf ihre physiologische Wirkung in verschiedenen Regelkreisen der Zellhomöostase hin, wenn die Konzentration der ROS reguliert bleibt [43, 83, 84]. Unter anderem sind antioxidative Enzyme, wie Katalase, Glutathion-Peroxidase oder verschiedene Superoxiddismutasen für die Degradierung von erhöhten ROS-Konzentrationen verantwortlich. Andererseits gibt es

ROS-Lieferanten, wie die Atmungskette in den Mitochondrien, oder die NADPH-Oxidasen, welche aktiv reaktive Sauerstoffspezies produzieren [33, 40, 42]. Diese Tatsache unterstreicht somit die physiologische Notwendigkeit von reaktiven Sauerstoffspezies.

Aufgrund ihres multipotenten Differenzierungspotenzials ist die Verwendung adipogener Stromazellen im Bereich des *Tissue Engineerings* besonders vielversprechend. Einige Forschungsgruppen untersuchten bereits den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Differenzierung von ASCs. Die Arbeitsgruppen um Atashi und Denu konnten eine vermehrte inhibitorische Wirkung auf Proliferation und osteogene Differenzierung bei mesenchymalen Stammzellen unter oxidativem Stress beobachten. Die Zellen differenzierten unter diesen Bedingungen eher adipogen und stellten zudem ihr Wachstum ein [42, 49]. Sie konnten auch zeigen, dass eine reduzierte ROS-Konzentration zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung führte (Abb. 3). Auch die Arbeiten um Almeida und Chen konnten ein deutlich verringertes osteoinduktives Potenzial von MSCs unter dem Einfluss erhöhter ROS-Konzentrationen feststellen. Zudem formulierten sie einen Zusammenhang zwischen altersbedingtem, oxidativem Stress und der Pathogenese von Osteoporose, durch das verringerte osteogene Differenzierungspotenzial von BMSCs und Osteoprogenitorzellen [45, 48, 71, 85]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine zusätzliche Behandlung der ASCs mit Katalase als antioxidatives Enzym durchaus erfolgsversprechend für eine optimierte osteogene Differenzierung.

Der Effekt einer Katalase-Behandlung auf die Proliferation der ASCs wurde in dieser Arbeit durch verschiedene Ansätze im Detail analysiert. Zu Beginn wurde die Zellviabilität, als Maß für die Zellzahl (CellTiter-Blue®-Assay, Abb. 11), untersucht. Um auszuschließen, dass eine zusätzliche Katalase-Behandlung nur den Stoffwechsel der Zellen erhöht, wurde konkret die Zellteilung der ASCs untersucht (BrdU-ELISA, Abb. 12). Schlussendlich wurde auch der DNA-Gehalt bestimmt (NanoDrop™-Verfahren, Abb. 13). Im Endeffekt konnte ein proliferationsfördernder Effekt der Katalase auf die ASCs nachgewiesen und durch die verschiedenen Ansätze validiert werden. Interessant ist dabei, dass eine kombinierte Behandlung von osteogenem Differenzierungsmedium und Katalase die Proliferation synergistisch steigerte. Dies sogar stärker als eine kombinierte Behandlung mit regulärem Zellkulturmedium und Katalase, welches die Proliferation der Zellen erreichen soll. Nennenswert ist dabei auch, dass dieser Effekt schon nach 3 Tagen erste Auswirkungen zeigt und ab 7 Tagen deutlich

gesteigert ist (Abb. 11 und 12). Außerdem wurde die Proliferation der Zellen durch das osteogene Differenzierungsmedium allein stärker gefördert, als durch das Kulturmedium. Unter den verschiedenen Medienzusätzen führt das Dexamethason im OM, über eine FHL-2-vermittelte Translokation von β -Catenin in den Zellkern, unter anderem zu einer verstärkten Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges und damit zu einer erhöhten Runx2-Expression [31]. Dadurch wird die Osteogenese der ASCs gefördert und die Proliferation im Umkehrschluss eigentlich inhibiert. Außerdem wurde die osteogene Differenzierung der Zellen erst bei einer vollständigen Konfluenz induziert, sodass die Proliferation der Zellen auch aufgrund der Kontaktinhibition, durch eine Aktivierung des RhoA- und ROCK-Signalings (*Ras homolog gene family, member A* (RhoA); *Rho-associated proteinkinase* (ROCK)), hätte sistieren müssen, um eine osteogene Differenzierung möglich zu machen [86-89].

Nun stellt sich die Frage, was diesen positiven Effekt der Katalase auf die Proliferation der ASCs verursacht. Eine Erklärung könnten verringerte ROS-Konzentrationen nach der Applikation von Katalase sein. Wie bereits erwähnt und durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, sind erhöhte ROS-Konzentrationen für eine Inhibition der Proliferation verantwortlich [90]. Daher könnte eine Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies folgerichtig zu einer verbesserten Proliferation der ASCs führen. Um dieser Begründung nachzugehen, sollte in dieser Arbeit auch die intrazelluläre ROS-Konzentration unter dem Einfluss von Katalase analysiert werden (Abb. 14). Neben der enzymatischen Funktion wäre allerdings auch eine direktere Wirkung der Katalase auf die ASCs denkbar, indem sie eventuell als Effektorprotein die Zellteilung positiv beeinflussen könnte. Bisher gibt es keine Publikationen, die einen solchen Effekt beschreiben, daher sollte dieses Phänomen weiter aufgeschlüsselt werden.

Bei der Analyse der osteogenen Differenzierung zeichnet sich der positive Effekt der Katalase noch deutlicher ab (Abb. 10 und 16). In der Literatur wird oftmals ein Zusammenhang zwischen der Regulation von intrazellulären ROS-Konzentrationen und dem osteogenen Differenzierungspotenzial der Zellen dargestellt. Dabei führen erhöhte Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies bei ASCs zu einer adipogenen (Abb. 3), wogegen niedrigere ROS-Konzentrationen eher die osteogene Differenzierung induzieren [42, 49]. Daher erscheint eine antioxidative Behandlung der ASCs während der osteogenen Differenzierung plausibel. Allerdings liefern die Versuche, die den Einfluss der Katalase auf die Osteogenese der ASC untersuchten, interessante neue

Erkenntnisse. Dabei reichte eine additive Behandlung der ASCs mit Katalase für 3 Tage aus, um eine signifikant gesteigerte osteogene Differenzierung zu bewirken, im Vergleich zu den Zellen, die für 21 Tage mit Katalase behandelt wurden (Abb. 16). Eine längere Applikation der Katalase konnte die Osteogenese der ASCs somit nicht weiter steigern. Diese Beobachtungen hinterfragen die Wirkung der Katalase und lassen einen osteoinduktiven Effekt vermuten, der nicht alleine durch die enzymatische Funktion zu erklären ist. Ansonsten würde die osteogene Differenzierung der ASCs proportional zur Behandlungsdauer der Katalase ansteigen. Diese Erkenntnisse legen die Annahme nahe, dass die ASCs durch eine Behandlung mit Katalase früh osteoinduktiv angeregt werden und anschließend nicht mehr von einer weiteren Applikation profitieren. Dies könnte damit erklärt werden, dass zu diesem Zeitpunkt osteogene Zielgene aktiviert worden sind und die Differenzierung somit eingeleitet ist. Ab diesem Zeitpunkt wäre der Prozess der osteogenen Differenzierung unabhängig von einer weiteren Katalase-Behandlung.

Die beobachtete osteoinduktive Wirkung der exogen zugeführten Katalase könnte auch durch die Ergebnisse der Gruppe um Mody *et al.* und Chen *et al.* erklärt werden. Sie beobachteten eine deutlich erhöhte Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies (H_2O_2 und O_2^\bullet) bei MSCs bis zum zweiten Tag der osteogenen Differenzierung, was die Osteogenese der Zellen inhibieren könnte. Außerdem zeigte sich bereits nach zwei Tagen der osteogenen Induktion eine drastische Reduktion an intrazellulärem ROS [45, 91]. Zudem konnten Chen *et al.* eine deutlich gesteigerte Expression von endogener Katalase und Mn-Superoxiddismutase am Tag 14 der Osteogenese zeigen. Übertragen auf die ASCs, könnte eine frühe Applikation mit Katalase während der osteogenen Differenzierung die hohen ROS-Konzentrationen in den ersten 2 Tagen reduzieren. Anschließend wäre eine exogene Behandlung mit Katalase nicht mehr notwendig, da die ROS-Konzentrationen dann nicht mehr so hoch sind und die Zellen vermutlich eigene antioxidative Schutzmechanismen aktiviert haben.

Zusammengefasst könnte die additive Behandlung mit Katalase die hohen Konzentrationen an ROS zum Beginn der osteogenen Induktion abpuffern, wodurch eine deutlich frühere Determinierung zur osteogenen Zelllinie und damit eine effizientere Osteogenese von ASCs erreicht werden könnte. Außerdem führt die Katalase-Applikation zu einer stärkeren osteogenen Aktivität der ASCs in den ersten Tagen der Differenzierung, was sich an der vermehrten Matrixkalzifizierung widerspiegelt

(Abb. 16). Im Vergleich dazu bleibt die Aktivität der Zellen in den späteren 2 Wochen in etwa auf dem gleichen Niveau.

5.1.1 Evaluation der optimalen Katalase-Konzentration für die osteogene Differenzierung der ASCs

Neben der Untersuchung des osteoinduktiven Effektes einer zusätzlichen Katalase-Behandlung, sollte auch die dafür optimale Konzentration der Katalase ermittelt werden. Es sollte eine Titrationsreihe angesetzt werden. Die osteogene Differenzierung wurde jeweils wöchentlich analysiert. Es zeigte sich, dass die Konzentration von 125 U/ml ausreichte, um eine optimale Differenzierung zu bewirken (Abb. 10). Nach 2 Wochen war die photometrische Auswertung der Osteogenese bei 125 U/ml sogar tendenziell höher als bei den Vergleichsgruppen. Somit wurden für alle Versuche eine Katalase-Konzentration von 125 U/ml verwendet.

Leider gibt es kaum andere Arbeiten, welche die osteogene Differenzierung von MSCs unter einer exogen applizierten Katalase-Behandlung untersuchten. Bisher wurde nur der negative Einfluss hoher ROS-Konzentrationen auf die osteogene Differenzierung von MSCs und ähnlichen Zellen beschrieben und dass die Zellen daraufhin die Expression von Katalase erhöhen [42, 45]. Die Arbeitsgruppe um Alund et al konnten außerdem zeigen, dass bei genetisch modifizierte Mäusen, die Katalase überexprimierten, die Knochenmasse, die Dicke der Kortikalis und das Volumen der Knochen trabekel signifikant gesteigert waren [92].

Auch wenn die Ergebnisse eindeutig erscheinen und die Konzentrationen alle zu einer signifikant gesteigerten Differenzierung im Vergleich zur alleinigen OM-Behandlung führten, wurden geringere Konzentrationen nicht getestet, sodass die wahre optimale Konzentration eventuell noch niedriger liegt. Daher sollte die Titrationsreihe um geringere Konzentrationen ergänzt und wiederholt werden, um somit die Konzentration für eine optimale Osteogenese von ASCs bestimmen zu können.

5.1.2 Ein Vergleich zwischen aktiver und inaktiver Katalasebehandlung

Aufgrund der beschriebenen osteoinduktiven Wirkung der Katalase auf die ASCs, sollte analysiert werden, ob der pro-osteogene Effekt durch die enzymatische, antioxidative Funktion bedingt ist. Dazu wurden die Zellen einerseits mit dem aktiven Enzym und

andererseits mit denaturierter und damit inaktiverter Katalase behandelt. Anschließend wurde wöchentlich die Proliferation mittels CellTiter-Blue[®]-Assay analysiert und die osteogene Differenzierung, gemessen an der Kalziumdeposition in die Matrix, visualisiert und quantifiziert. Die Ergebnisse für Proliferation und Osteogenese der ASCs stellten sich als durchaus überraschend dar. Beide Verabreichungsformen führten zu einer deutlich gesteigerten Zellzahl und osteogenen Differenzierung nach 14 und 21 Tagen (Abb. 18 und 19). Interessant ist daran vor allem, dass der positive Einfluss der Katalase auf die osteogene Differenzierung bisher nur durch die enzymatische Funktion vermutet wurde. Da die Katalase bereits bei ca. 55-65°C denaturiert [93], verliert sie ihre Funktion als Enzym schon bei weit geringeren Temperaturen, als in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden, um das Protein zu denaturieren. Nun stellt sich die Frage, wie die denaturierte Katalase die Proliferation und osteogene Differenzierung steigern konnte. Die Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass die osteoinduktive Wirkung der Katalase auf die ASCs, auch durch eine *Second-Messenger*-Funktion bedingt sein könnte. Allerdings wird bei den Temperaturen in diesem Versuch vermutlich nicht nur die Sekundär-/Tertiärstruktur des Proteins aufgelöst, sondern eventuell auch die Primärstruktur. Das würde bedeuten, dass die Aminosäurekette aufgebrochen wird und das Enzym somit irreversibel hydrolysiert ist. Damit ist es unwahrscheinlich, dass die Überreste des Enzyms noch eine Funktion als *Second Messenger* einnehmen können, oder sich rekonstitutionieren. Es gibt allerdings thermophile Bakterienstämme, welche Temperaturen von über 90°C überleben können, bei denen auch die Enzyme noch nicht denaturiert sind. Beispielsweise wurde ein Bakterienstamm in hydrothermalen Felder der pazifischen Tiefsee charakterisiert (*Geobacillus* sp. EPT3), der eine Mangan-Superoxid-Dismutase besitzt, welche diesen Temperaturen standhält und bei 90°C sogar noch zu 57% funktionsfähig ist [94]. Der menschliche Organismus ist jedoch nicht an die thermischen und hyperbaren Bedingungen angepasst, wodurch die Enzyme nicht annähernd so hitzestabil sind.

Möglich wäre auch, dass die gebundenen Eisenatome der Katalase eine bedeutende Rolle in der Förderung von Proliferation und Osteogenese spielen. Wie das Hämoglobin des menschlichen Organismus, besteht auch die Katalase aus 4 gleichen Untereinheiten in dessen Mitte sich ein Porphyrinring mit Eisenatomen befindet (siehe Kap. 1.4.3 und Abb. 4). Durch die Denaturierung bei diesen hohen Temperaturen verliert das tetramere Protein nicht nur seine Tertiär- und Sekundärstruktur, wahrscheinlich wird es dabei hydrolysiert. Die Tatsache, dass die Katalase-Lösung nach dem Denaturierungsprozess

in einen braunen Feststoff umschlag, lässt die Vermutung zu, dass sich die Eisenatome herauslösten. Aufgrund ihrer schwachen, koordinativen Bindung zum Häm werden sie durch die Hitze aus dem Protein gelöst und verbinden sich mit dem restlichen Wasser zu Eisen-Hydroxid. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich dabei um einen *Browning* Effekt (s.g. *Maillard*-Reaktion) handelt, da sonst eine bräunliche Flüssigkeit hätte entstehen müssen. Bei dieser Reaktion bewirkt die Hitzeeinwirkung die Entstehung von neuen Aminverbindungen, s.g. Melanoidine, die als schwarzbraune Pigmente u.a. für die Bräunung von proteinhaltigen Lebensmitteln und die Entstehung von Röstaromen verantwortlich sind [95].

Es wird also vermutet, dass es sich bei dem bräunlichen Niederschlag um Eisen-Hydroxid handelt. Daher stellt sich nun die Frage, ob eine damit erhöhte Eisen-Konzentration im Differenzierungsmedium die Osteogenese positiv beeinflussen könnte. Da die Katalase nur 4 Eisenatome pro Enzym besitzt, müssten die Eisen-Konzentrationen aufgrund der hier verwendeten, geringen Mengen an Katalase relativ niedrig und die Wirkung des Eisens auf die osteogene Differenzierung damit sehr stark sein. Eine isolierte Inkubation von OM mit zwei- bzw. dreiwertigem Eisen könnte zeigen, ob das Eisen tatsächlich für den osteoinduktiven Effekt verantwortlich ist. Einige Arbeiten deuten allerdings auf einen negativen Effekt erhöhter Eisenkonzentrationen auf die Osteogenese hin. Dabei wird oftmals eine inhibitorische Wirkung auf die BMP-2 induzierte Osteogenese beschrieben. Diese Arbeiten formulieren zudem einen Zusammenhang zwischen erhöhten Eisen-Konzentrationen und der Entstehung von Osteoporose [96, 97]. Die Gruppe um Qing et al. untersuchte dabei die osteogene Differenzierung von murinen Präosteoblasten u. a. unter dem Einfluss von Eisensulfat (5, 20 und 50 μM). Die Ergebnisse zeigten eine signifikant schlechtere osteogene Differenzierung der Präosteoblasten zur Kontrollgruppe, mit steigender Konzentration des Eisensulfates [97]. In anderen Arbeiten wurde eine Verbindung zwischen der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und freien Eisensalzen beschrieben. In dem als Fenton-Reaktion bezeichneten Prozess, werden organische Substrate durch Eisensalze oxidiert, wodurch ROS entstehen [98]. Dadurch erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies könnten die osteogene Differenzierung ebenfalls hemmen. Da leider nur vermutet werden kann, wieviel Eisenionen in der denaturierten Katalase-Lösung dieser Arbeit enthalten waren, kann man eine inhibitorische Wirkung des freien Eisens auf die osteogene Differenzierung der ASCs nicht beweisend formulieren. Sollte der osteoinduktive Effekt allerdings tatsächlich durch die Eisenionen begründet sein, wären nur sehr geringe Konzentrationen dazu in der

Lage, da eine signifikante Inhibition der Osteogenese bei murinen Präosteoblasten bereits ab 5 μ M festzustellen war [97].

Interessant wäre auch, ob eine Inkubation mit einer pharmakologisch inhibierten Katalase auch eine gesteigerte Osteogenese hervorrufen würde. Zum Vergleich dazu würde eine Behandlung mit freiem Eisen und OM zeigen, ob freie Eisen-Ionen, oder die Katalase als *Second-Messenger* diesen Effekt bewirken. Für die Inaktivierung des Enzyms könnte ein Substrat verwendet werden, welches die Katalase über eine irreversible Bindung an ihr aktives Zentrum inhibiert. Das Enzym würde darüber seine Tertiärstruktur behalten und die Eisenatome gingen nicht in die Lösung über. Ein solcher Inhibitor ist 3-Amino-1,2,4-triazole (ATA), welcher in einigen Arbeiten zur Inhibition von Katalase eingesetzt wurde [99, 100]. Die Ergebnisse von Walton und Pizzitelli zeigten eine ca. 80%-ige Reduktion der Katalase-Aktivität 4h nach einer Applikation von ATA. [101]. Da im vorher gezeigten Titrationsversuch für die effizienteste Katalase-Konzentration keine geringeren Dosen des Enzyms getestet wurden (Abb. 10), könnte auch eine niedrigere Dosis für ähnliche osteoinduktive Ergebnisse sorgen. Daher stellt sich die Frage, ob die verbleibenden 20% an aktiver Katalase ausreichen würden um die Osteogenese weiterhin zu steigern. Dadurch wäre eine Unterscheidung zwischen der enzymatischen Wirkung und einer anderweitigen Funktion als *Second Messenger* nicht abschließend möglich. Trotzdem wäre diese Untersuchung sicherlich interessant und könnte Ergebnisse liefern, die zu einem genaueren Verständnis der Zusammenhänge des positiven Effektes einer Katalase-Behandlung auf Proliferation und Osteogenese führen.

5.1.3 Die intrazelluläre ROS-Konzentration in der frühen Phase der Osteogenese

Wie bereits erwähnt und durch Mody *et al.* und Chen *et al.* beschrieben, ist bei MSCs eine deutlich erhöhte intrazelluläre ROS-Konzentration in den ersten Tagen der osteogenen Differenzierung zu detektieren [45, 91]. Dies wird dadurch begründet, dass mesenchymale Stammzellen im Vergleich zu Osteoblasten stärker auf einen glycolytischen Stoffwechsel angewiesen sind und vermehrt Lactat produzieren, was zu einem erhöhten oxidativen Milieu führt [102, 103]. Bekannt ist außerdem, dass gesteigerte ROS-Konzentrationen eine osteogene Differenzierung inhibieren und die Zellen dadurch eher adipogen differenzieren [48]. Unterstützt wird diese Vermutung von dem Ergebnis, dass in den ASCs, welche mit Katalase behandelt wurden, tendenziell zu

jedem Messzeitpunkt weniger ROS nachzuweisen waren (Abb. 14). Es sollte der Effekt einer Katalase-Behandlung auf die Konzentration an ROS untersucht werden, um somit den gezeigten, pro-osteogenen Effekt der Katalase-Behandlung in der frühen Phase der osteogenen Induktion detaillierter zu analysieren.

Die Ergebnisse decken sich teilweise mit den Beobachtungen der bereits genannten Arbeiten. Schon nach wenigen Minuten stieg die ROS-Konzentration an, sank dann jedoch unter einer Behandlung mit Katalase, im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit OM, wieder ab (Abb. 14). Allerdings konnte nicht beobachtet werden, dass der ROS-Gehalt nach 2 Tagen deutlich abfiel, wie es Chen et al. beschrieb. Vielmehr blieb die Konzentration auch nach 3 Tagen osteogener Differenzierung, im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt, in beiden Populationen (mit und ohne Katalase-Behandlung) weiter erhöht. Dennoch zeigte sich eine antioxidative Wirkung der Katalase-Behandlung über den gesamten Zeitraum der Beobachtungen. Aufgrund der bereits genannten negativen Wirkung erhöhter ROS-Konzentrationen auf die osteogene Differenzierung vom MSCs [48], begünstigt dieser hier gezeigte antioxidative Effekt der Katalase vermutlich die Osteogenese von ASCs.

Leider ist die Aussagekraft der Ergebnisse, aufgrund der kurzen Beobachtungsdauer und fehlender Unterscheidung zwischen Respondern (also den Spenderzellen, die auf eine osteoinduktive Behandlung durch das Differenzierungsmedium ansprechen) und Nonrespondern (die Zellen, welche nicht auf das osteoinduktive Medium ansprechen) eingeschränkt.

5.1.4 Die Apoptose von ASCs während der osteogenen Differenzierung

Wie bereits erwähnt können reaktive Sauerstoffspezies in erhöhter Konzentration humane Zellen schädigen [81, 82] und Zellzyklusarrest sowie Apoptose initiieren [42]. Allerdings können sich die Zellen dagegen schützen, indem sie die Expression von antioxidativen Enzymen hochregulieren. Die Gruppe der *Forkhead*-Box-Proteinen ist bekannterweise maßgeblich daran beteiligt [65, 104]. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von antioxidativen Enzymen die Proliferation der Zellen positiv beeinflusst (Abb. 10,11 und 12).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Katalase die Apoptose der ASCs im Verlauf der osteogenen Differenzierung vermindert (Abb. 15). Die

Forschungsgruppe um Wang *et al.* untersuchte den Einfluss verschiedener Serum- und Mediumbedingungen auf die Apoptose von MSCs während der Chondrogenese. Sie stellten u. a. fest, dass eine Inhibition der Apoptose zu einer verminderten Expression osteogener Zielgene zur Folge hatte [105]. Wenn man beachtet, dass sich bei der enchondralen Ossifikation Chondro- und Osteoblasten unter physiologischen Bedingungen in Lamellen mit mineralisierter Matrix einmauern und anschließend entweder zu Osteozyten ausdifferenzieren, oder in den Zelltod gehen, scheint eine gewisse Rate von Apoptose in der Osteogenese physiologisch zu sein [7, 9, 106].

In den ersten drei Tagen konnte die Apoptoserate, durch die zusätzliche Behandlung mit Katalase, deutlich reduziert werden (Abb. 15). Interessant war, dass selbst eine Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium zu einer geringeren Apoptose führte, als die Kultivierung mit normalem Proliferationsmedium. Aufgrund der Analyse der intrazellulären ROS-Konzentration (Abb. 14) ließe sich vermuten, dass die vermehrte Apoptose bei den Zellen, welche nicht mit Katalase behandelt wurden, durch die vermehrte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies bedingt sei. Schlussendlich lässt sich anhand dieser Daten bisher noch keine direkte Korrelation zwischen erhöhten intrazellulären ROS-Konzentrationen und einer vermehrten Apoptose der ASCs ableiten. Die erhöhte Apoptoserate könnte allerdings auch in einer vermehrten Apoptose von Präosteoblasten bedingt sein, welche nur bei einer osteoinduktiven Behandlung mit Katalase, oder OM weiter differenzieren und somit lebendig bleiben würden.

Interessanter Weise zeigten sich nach einer und zwei Wochen der Behandlung mit OM und OM+Katalase deutlich mehr apoptotische Zellen, als dies bei der Inkubation mit Proliferationsmedium der Fall war (Abb. 15). Aufgrund der, zu diesem Zeitpunkt sehr guten, Differenzierungsergebnisse der gezeigten ASCs, unter diesen Behandlungen (Abb. 10, 16 und 19), ist eine osteogene Enddifferenzierung zu Osteozyten wahrscheinlich. Somit könnte die vermehrte Apoptose der Zellen zu diesem späten Zeitpunkt dadurch begründet werden, dass in diesem Zeitrahmen schon einige, zu Osteozyten differenzierte Zellen nach der Ausbildung der Knochenmatrix physiologischer Weise apoptotisch werden.

Die Ergebnisse dieses Versuches geben den Entwicklungszyklus der ASCs bei der osteogenen Differenzierung wieder. Zunächst differenzieren die ASC-Präosteoblasten zu Osteoblasten, wofür die antioxidative Therapie mit Katalase und der damit einhergehenden Degradierung von ROS förderlich ist (Abb. 14), sodass sie auch nicht

adipogen differenzieren [42, 107]. In den späteren Phasen der Osteogenese sezernieren diese Zellen vermehrt Matrixproteine, kalzifizieren das Interstitium und bauen somit das Osteoid auf [106]. Dies lässt sich durch die Ergebnisse der Alizarinrot-S-Färbung demonstrieren (Abb. 8 und 9). Anschließend differenzieren einige Zellen zu Osteozyten, welche die Matrixbildung weiter vorantreiben. Als Abschluss eines vollständigen Differenzierungsprozesses werden die Osteozyten apoptotisch [108, 109].

5.2 Einfluss von antioxidativen Enzymen (Katalase) und reaktiven Sauerstoffspezies (H₂O₂) auf die Proteinexpression von FoxO 1, FoxO 3a und β -Catenin unter verschiedenen Behandlungen.

Wie bereits erwähnt initiieren Proteine der *Forkhead-Box*-Familie die Expression von antioxidativen Enzymen und konkurrieren dafür mit β -Catenin um die gleiche Bindungsstelle am TCF/LEF-1 Proteinkomplex im Nukleus. Dieser dient unter anderem als Mediator für Zielgene des Wnt-Signalweges (u. a. Osterix und Runx2) und beeinflusst somit die Osteogenese [48, 110]. Wegen dieser kompetitiven Bindung wird die osteogene Differenzierung von MSCs bei oxidativem Stress vermindert. Daher sollte untersucht werden, wann und in welchem Maße die Transkriptionsfaktoren, unter den verschiedenen Behandlungen, in den Zellkern translozieren. So sollten neue Erkenntnisse über diese konkurrente Bindung und die Aktivität von FoxO und β -Catenin während der osteogenen Differenzierung gewonnen und die Bedeutung der einzelnen Faktoren für eine optimierte Osteogenese der ASCs weiter aufgeschlüsselt werden.

5.2.1 Analyse der Proteinexpression an vorher festgelegten Messzeitpunkten und Rückschlüsse auf die Aktivität und Interaktion zwischen FoxO und Wnt-Signaling

Zunächst sollte ein Überblick über die Expression der Faktoren gewonnen werden. Dafür wurden die Zellen über 14 Tage mit OM und OM+Katalase behandelt. Aufgrund des Trends, welcher sich bei der Auswertung der ersten Analyse der Transkriptionsfaktoren abzeichnete (Abb. 20, 21 und 22), der zuvor gezeigten optimalen Katalase-Behandlungsdauer von 3 Tagen und den Beobachtungen von Chen *et al.* und Mody *et al.* legte man sich auf die Messzeitpunkte Tag 0, 3, 6 und 14 fest [45, 91].

Die Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren wurde anschließend an den genannten Zeitpunkten unter verschiedenen Behandlungen analysiert. Die Zellen wurden mit OM, OM+H₂O₂, OM+Katalase und OM+Katalase+3-Amino-1,2,4-Triazol (ATA) behandelt. Das ATA (500 nM) diente dabei als Katalaseinhibitor, um die enzymatische Funktion zu hemmen [111]. Nach Inkubation mit den jeweiligen Zusätzen wurde die zytoplasmatische und die nukleäre Fraktion aufgetrennt, um die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren in den jeweiligen Kompartimenten zu beurteilen.

Betrachtet man ins besondere die Ergebnisse der zytoplasmatischen Fraktion, fällt auf, dass gerade die zusätzliche Behandlung mit Katalase zu einem verminderten Abbau des β -Catenins führt. Diese erhöhte Expression ist besonders an Tag 3 zu beobachten (Abb. 25). Interessant sind diese Beobachtungen im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der Analyse der osteogenen Differenzierung und der optimalen Behandlungsdauer mit Katalase (Kap. 4.7, Abb. 16). Die Steigerung der β -Catenin-Expression durch die Katalase-Behandlung korreliert mit der am stärksten geförderten Osteogenese an Tag 3. Erklären lässt sich dies, durch eine vermehrte Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges durch die Applikation der Katalase, wodurch der stetige Abbau von β -Catenin im Zytoplasma verhindert wird. Dadurch akkumuliert es vermehrt im Zytoplasma und kann vermehrt in den Zellkern translozieren, wo es über seine Bindungsstelle mit TCF/LEF pro-osteogene Zielgene initiiert [53]. Der pro-osteogene Effekt der Katalase am 3. Tag der Differenzierung zeichnet sich also auch auf Ebene der Transkriptionsfaktoren des Wnt-Signalweges ab. Interessant ist hierbei, dass auch die Applikation von inhibierter Katalase (durch ATA) einen ähnlichen Effekt zeigt. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Katalase den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren kann, dann ist hierdurch fraglich, ob sie dies über ihre enzymatische Funktion, oder über eine Wirkung als Effektorprotein tut. Vielleicht kann die Katalase auch mit intrazellulären Molekülen der Signalkaskade des Wnt-Signalings interagieren und somit auch ohne eine primäre Bindung über den Frizzled-Rezeptor die osteogene Differenzierung der ASCs aktivieren.

Leider zeichnen sich diese Ergebnisse nicht in einer erhöhten Lokalisation von β -Catenin im Zellkern ab. Interessanter Weise sorgt jedoch vor allem eine Behandlung mit H₂O₂ zu einer deutlichen Vermehrung von β -Catenin am Tag 6 im Nukleus (Abb. 25). Gleichzeitig war auch das Aufkommen der FoxOs am 6. Tag im Zellkern, unter einer H₂O₂-Behandlung, erhöht (Abb. 23 und 24). Dies ließe sich durch die vermehrte Bindung von

FoxO mit β -Catenin unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies erklären [112]. Dabei wird die Aktivität der FoxOs durch die Bindung von β -Catenin gesteigert und die FoxO-vermittelte Expression von antioxidativen Enzymen gefördert [48, 72]. Im Umkehrschluss wird dadurch die osteogene Differenzierung inhibiert, da sich β -Catenin weniger mit der TCF/LEF-1-Promotorregion verbinden und keine osteoinduktiven Zielgene aktivieren kann [63, 72]. Der zuvor schon beobachtete, inhibierende Effekt von oxidativem Stress auf die osteogene Differenzierung von ASCs (Abb. 3) könnte hiermit auf molekularbiologischer Ebene erklärt werden. Allerdings stellte sich die Analyse der nukleären Faktoren aufgrund der geringen Proteinausbeute als problematisch dar und auch die geringe Stichprobenzahl verringerte die Aussagekraft der Ergebnisse.

Die Daten von FoxO 3a im Zytoplasma passen zu den genannten Beobachtungen von FoxO 1, unter einer Behandlung mit H_2O_2 (Abb. 24). Es zeigt sich eine Abnahme des Transkriptionsfaktors unter das Ausgangsniveau. Dies könnte ein Hinweis für die vermehrte Translokation in den Nukleus sein. FoxO 3a könnte somit auch an der Aktivierung von Zielgenen beteiligt sein, die antioxidative Schutzmechanismen initiieren. Allerdings verringert sich die Lokalisation von FoxO 3a im Zytoplasma auch bei einer antioxidativen Behandlung mit Katalase. Außerdem spiegelt sich das Absinken der FoxOs in der zytoplasmatischen Fraktion nur bedingt in einem Ansteigen derselbigen im Nukleus wieder. Da stellt sich die Frage, ob sie vielleicht vermehrt proteasomal degradiert wurden und das Aufkommen des Proteins im Zytoplasma deshalb bei allen Behandlungen im Verlauf des Beobachtungszeitraumes absank.

Vielleicht inhibieren die hohen Konzentrationen der FoxOs die osteogene Differenzierung der ASCs zu Beginn der Osteogenese, über eine kompetitive Bindung an β -Catenin. Allerdings zeichnet sich auch bei diesem Versuch die bereits beschriebene Problematik der Analyse der nukleären Fraktion ab. Geringe Proteinmengen und geringe Stichprobenzahlen führen zu starken Abweichungen der Daten.

5.3 Schlussfolgerungen und Abschlussbetrachtung

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einige neue Erkenntnisse, bezüglich der *in vitro* Osteogenese von ASCs. Besonders der osteoinduktive Effekt einer zusätzlichen Applikation mit Katalase konnte im Detail analysiert und mehrfach untermauert werden. Dabei wurde die optimale Dauer und Konzentration einer Katalase-Behandlung

untersucht (Abb. 10, 16 und 19). Zudem wurde der positive Effekt der Katalase auf Proliferation und Osteogenese der ASCs, durch einen Vergleich zwischen denaturierter und nativer Katalase näher analysiert, um die dabei relevanten Wirkweisen weiter aufzuschlüsseln (Abb. 18 und 19). Außerdem wurde der Einfluss einer Katalase-Behandlung auf die intrazelluläre ROS-Konzentration und die Apoptose der ASCs in der frühen Phase der Osteogenese untersucht (Abb. 14 und 15).

Die Tatsache, dass eine dreitägige Behandlung mit Katalase für eine optimale osteogene Differenzierung ausreicht (Abb. 16), ist sicherlich aus wissenschaftlicher und therapeutischer, aber auch aus ökonomischer Sicht bedeutend. Außerdem konnte eine optimale Konzentration der Katalase (125 U/ml) für die osteogene Differenzierung von ASCs ermittelt werden (Abb. 10). Diese Ergebnisse könnten Behandlungskosten von späteren Therapiekonzepten des *Bone Tissue Engineerings* reduzieren und die Behandlung selbst effizient und zugänglich machen. Gleiches gilt für die Proliferation der Zellen. Es konnte demonstriert werden, dass die Katalase die Proliferation der ASCs deutlich steigern kann. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, eine ausreichende Zellmenge zur Therapie großer Knochendefekte in kürzerer Zeit zu erhalten. Die Analyse der Proliferation der ASCs unter einer Behandlung mit Katalase wurde anhand verschiedener Parameter analysiert. Neben der Zellviabilität, wurde auch der DNA-Gehalt und die Zellteilung direkt untersucht (Abb. 11, 12, 13 und 18). Die dabei zum Teil hoch signifikanten Daten und die Analyse unterschiedlicher Proliferationsmarker, deuten auf eine hohe Aussagekraft dieser Ergebnisse.

Auch die Ergebnisse über die Applikation von denaturierter Katalase werfen Fragen über die Wirkmechanismen der Katalase-Behandlung auf und erfordern weitreichende Analysen diesbezüglich (Abb. 18 und 19). Es ist möglich, dass eine Denaturierung der Katalase die Eisenionen aus dem Protein zu lösen scheint. Ein Hinweis dafür war der bräunliche Ausfall der Katalaselösung nach der Denaturierung. Die dadurch erhöhte Eisenkonzentration könnte für die gesteigerte Osteogenese verantwortlich sein. Allerdings zeigen einige Arbeiten, dass erhöhte Eisenkonzentrationen, über eine Hemmung der BMP-2 induzierten Osteoblastogenese sowie der alkalischen Phosphatase, zu einem verringerten osteogenen Potential führt [96, 97]. Die Arbeitsgruppe um Qing et al. zeigte dabei eine signifikant verschlechterte osteogene Differenzierung von murinen Präosteoblasten bei steigenden Konzentrationen von Eisensulfat (5, 20 und 50 μM) [97]. Deren Daten deuten sogar auf ein gesteigertes Osteoporose-Risiko hin, welches durch

erhöhte Eisenkonzentrationen bedingt sein soll. Eine Behandlung mit OM und zwei- bzw. dreiwertigem Eisen könnte die Frage, ob das Eisen auch für eine gesteigerte osteogene Differenzierung bei humanen ASCs verantwortlich ist, abschließend beantworten.

Es konnten einige interessante Ergebnisse beobachtet werden, die die vorher akquirierten Daten teilweise auf molekularbiochemischer Ebene erklären können. Insbesondere die Wirkung der Katalase als osteoinduktiver Mediator kann mit der gesteigerten Lokalisation von β -Catenin (als wichtiger Faktor des kanonischen Wnt-Signalweges und damit der Osteogenese) am 3. Tag der Differenzierung erklärt werden (Abb. 25). Hierbei führte eine Inhibition der Katalase mit ATA auch zu einem äquivalent gesteigerten β -Catenin-Aufkommen, wie bei der Behandlung mit aktiver Katalase. Interessant dabei ist, dass sich die positive Wirkung der inhibierten Katalase auf die osteogene Differenzierung der ASCs damit auch auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren widerspiegelt. Somit führt sie tatsächlich zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung und nicht nur zu einer gesteigerten Matrixmineralisierung. Eventuell würde eine zusätzliche Analyse der Expression osteoinduktiver Zielgene, wie z. B. Osterix und Runx 2, zu einer weiteren Validierung dieser Daten führen.

5.4 Ausblick

Das Feld des *Bone Tissue Engineerings* ist bisher noch in einer experimentellen Phase und es gibt bereits vielversprechende Ergebnisse in ersten klinischen Studien [14, 15, 113]. Allerdings wird es sicherlich noch etwas Zeit dauern, bis es ein verfügbares, breit angebotenes, kosteneffizientes und medizinisch erfolgreiches Therapiemodell geben wird. Noch limitieren einige grundlegende Problematiken die sichere therapeutische Anwendung dieser Konzepte. Auch die Vaskularisation stellt dabei eine große Herausforderung für die suffiziente Transplantatversorgung dar. Mittlerweile gibt es bereits poröse Stützgerüste die mit Stammzellen beimpft werden, sodass die Nährstoffversorgung für alle Zellen gewährleistet ist [114]. Des Weiteren gibt es vielversprechende Ansätze, bei denen die Neoangiogenese, mithilfe einer gleichzeitigen Kultivierung der osteogenen Stammzellen mit Endothelzellen gefördert werden soll [19]. Außerdem werden Bioreaktoren entwickelt, die optimale physikalische und molekulare Bedingungen (z. B. pH-Wert, O₂-Sättigung, Temperatur, Scherkräfte und Nährstoffzusammensetzung) bei der *in vitro* Kultivierung zur Verfügung stellen, um die osteogene Differenzierung der Stammzellen weiter zu fördern [18].

Eine weitere, sehr bedeutsame Hürde stellen auch die hohen Entwicklungskosten dar. Wenige Forschungseinrichtungen können sich die, bisweilen sehr teuren, Materialien und die anschließenden klinischen Studien leisten. Gerade dieser Aspekt verlangsamt natürlich die Entwicklung erfolgsversprechender Konzepte. Gerade deshalb sind die Ergebnisse dieser Arbeit äußerst interessant, da neue Erkenntnisse über die osteogene Differenzierung von ASCs gewonnen werden konnten, sodass die Behandlung der Zellen für den Gebrauch im *Bone Tissue Engineering* bedeutend optimiert werden konnte.

Viele erhoffen sich von der regenerativen Medizin zukünftige Therapieoptionen für die Behandlung von degenerativen Erkrankungen wie z. B. Arthrose, Osteoporose und Demenz [115]. Die suffiziente Differenzierung von autologen Stammzellen zu vitalen Knorpelzellen, mit anschließender Beimpfung der degenerierten Knorpelflächen, könnte eine Alternative zur Endoprothetik bieten. Auch die Osteoporose, als relevante Volkserkrankung, könnte durch ein grundlegendes Verständnis der Ätiologie und einer gezielten Behandlung durch osteoinduktive Mediatoren zur Verringerung des Knochenabbaus und Vermehrung der Knochendichte führen. Dadurch wäre die Osteoporose erstmals kurativ behandelbar.

Das *Tissue Engineering* beschränkt sich nicht nur auf die Behandlung von muskuloskelettalen Erkrankungen. Vielleicht wird es bald nicht mehr nötig sein, jahrelang auf ein Spenderorgan zu warten. Stattdessen könnte es bald Therapiekonzepte geben, die auf eine *in vivo* Differenzierung von Stammzellen für parenchymatöse Organen zugeschnitten sind, sodass eine Regeneration des Organs im Körper gewährleistet ist. Solche Therapieansätze könnten Erkrankungen, wie z. B. Leber- und Niereninsuffizienz, Diabetes Mellitus Typ 1, oder auch neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz behandeln [115]. Auch die Problematik der Minderversorgung von transplantationsfähigen Organen würde dadurch bedeutend verbessert.

Ein weiterer Aspekt im Bereich des *Tissue Engineerings* befasst sich mit der Herstellung von alternativen Fleischprodukten. Immer mehr Menschen ernähren sich aus der Überzeugung heraus, dass das Töten von Tieren ethisch-moralisch verwerflich ist, vegetarisch oder vegan. Durch diese Bewegung sind experimentelle Versuche zur künstlichen Züchtung von Fleisch entstanden [116]. Es gibt auch schon einige vielversprechende Ergebnisse in dieser Richtung. Momentan sind es zwar eher strukturferne Fleischprodukte, wie z. B. Hackfleisch, Hähnchen-*Nuggets*, oder Pasteten [117]. Doch es gibt bereits Forschungen, die die Entstehung einer Maserung von Fleisch

untersuchen und dies versuchen nachzustellen [116]. Außerdem werden verschiedene pflanzliche Proteine untersucht, die u. a. als Wachstumsfaktoren in Nährmedien dienen sollen, sodass kein Tiereserum für die Kultivierung der Stammzellen verwendet werden muss [117]. Ob diese Alternative allerdings ethisch-moralische Akzeptanz in der Gesellschaft finden wird, bleibt abzuwarten. Die *in vitro* Produktion von Fleisch könnte auch zur Lösung der globalen Nahrungsmittelversorgung beitragen. Man bräuchte dabei keine großen Flächen und zusätzlichen Ressourcen für die Aufzucht von Nutztieren. Allerdings ist fraglich, ob diese Konzepte in nächster Zeit so kosteneffizient und ertragsreich werden, dass man damit Fleischprodukte für die Entwicklungsländer produzieren könnte.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. *Krankheitskosten in Mio. € für Deutschland. Gliederungsmerkmale: Jahre, Alter, Geschlecht, ICD10*. 2015 14.03.2018 [cited 2018 14.03.2018]; Available from: <http://www.gbe-bund.de/gbe10/i?i=63:25933377D>.
2. Hanley, D.A., et al., *Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes*. Int J Clin Pract, 2012. **66**(12): p. 1139-46.
3. Blick, S.K., S. Dhillon, and S.J. Keam, *Teriparatide: a review of its use in osteoporosis*. Drugs, 2008. **68**(18): p. 2709-37.
4. Stroup, J., M.P. Kane, and A.M. Abu-Baker, *Teriparatide in the treatment of osteoporosis*. Am J Health Syst Pharm, 2008. **65**(6): p. 532-9.
5. McClung, M.R., *Sclerostin antibodies in osteoporosis: latest evidence and therapeutic potential*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2017. **9**(10): p. 263-70.
6. Salgado, A.J., et al., *Tissue engineering and regenerative medicine: past, present, and future*. Int Rev Neurobiol, 2013. **108**: p. 1-33.
7. Mackie, E.J., L. Tatarczuch, and M. Mirams, *The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification*. J Endocrinol, 2011. **211**(2): p. 109-21.
8. Chaldor. *Bone Growth*. 2008 [cited 2018 28.07.]; Die Abbildung zeigt die enchondrale Ossifikation]. Available from: https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Bone_growth.png.
9. Schindeler, A., et al., *Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(5): p. 459-66.
10. Z, A.I.-A., et al., *Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis*. J Dent Res, 2008. **87**(2): p. 107-18.
11. Gerstenfeld, L.C., et al., *Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation*. J Cell Biochem, 2003. **88**(5): p. 873-84.
12. Yavropoulou, M.P. and J.G. Yovos, *Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2008. **8**(3): p. 204-16.
13. Henkel, J., et al., *Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective*. Bone Research, 2013. **1**: p. 216.
14. Berner, A., et al., *Delayed minimally invasive injection of allogenic bone marrow stromal cell sheets regenerates large bone defects in an ovine preclinical animal model*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(5): p. 503-12.
15. Sandor, G.K., et al., *Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects*. Stem Cells Transl Med, 2014. **3**(4): p. 530-40.
16. Zehr, P.E. *Iron Man, Extremis, and Tissue Engineering*. 2013 [cited 2018 28.07.]; Die Abbildung zeigt das grundlegende Prinzip des Tissue Engineering]. Available from: <http://www.warrenellis.com/?p=14814>.
17. Marolt, D., M. Knezevic, and G.V. Novakovic, *Bone tissue engineering with human stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2010. **1**(2): p. 10.
18. Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, *Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges*. Crit Rev Biomed Eng, 2012. **40**(5): p. 363-408.
19. Liu, Y., J.K. Chan, and S.H. Teoh, *Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(2): p. 85-105.

20. Roux, B.M., M.H. Cheng, and E.M. Brey, *Engineering clinically relevant volumes of vascularized bone*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(5): p. 903-14.
21. Santos, M.I. and R.L. Reis, *Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges*. Macromol Biosci, 2010. **10**(1): p. 12-27.
22. Bodle, J.C., A.D. Hanson, and E.G. Lobo, *Adipose-Derived Stem Cells in Functional Bone Tissue Engineering: Lessons from Bone Mechanobiology*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17**(3): p. 195-211.
23. Im, G.I., *Adipose stem cells and skeletal repair*. Histol Histopathol, 2013. **28**(5): p. 557-64.
24. Mitchell, J.B., et al., *Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 376-85.
25. Bourin, P., et al., *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, 2013. **15**(6): p. 641-648.
26. Guven, S., et al., *Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue*. Biomaterials, 2011. **32**(25): p. 5801-9.
27. Bhattacharya, I., C. Ghayor, and F.E. Weber, *The Use of Adipose Tissue-Derived Progenitors in Bone Tissue Engineering - a Review*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(5): p. 336-43.
28. Grottkau, B.E. and Y. Lin, *Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells*. Bone Res, 2013. **1**(2): p. 133-45.
29. Sumi, Y., et al., *Transplantation of inbred adipose-derived stromal cells in rats with plasma gel containing fragmin/protamine microparticles and FGF-2*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2013. **101**(5): p. 784-91.
30. Hamidouche, Z., et al., *FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression*. Faseb j, 2008. **22**(11): p. 3813-22.
31. Langenbach, F. and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(5): p. 117.
32. Banfi, A., et al., *Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy*. Exp Hematol, 2000. **28**(6): p. 707-15.
33. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
34. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
35. Banfi, G., E.L. Iorio, and M.M. Corsi, *Oxidative stress, free radicals and bone remodeling*. Clin Chem Lab Med, 2008. **46**(11): p. 1550-5.
36. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13659.
37. Niki, E., *Free radicals in the 1900's: from in vitro to in vivo*. Free Radical Research, 2000. **33**(6): p. 693-704.
38. Yamamoto, A., et al., *Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed Staphylococcus aureus*. Clinical and Experimental Immunology, 2002. **129**(3): p. 479-484.

39. Ighodaro, O.M. and O.A. Akinloye, *First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid*. Alexandria Journal of Medicine, 2017.
40. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1245049.
41. de Oliveira-Junior, E.B., et al., *The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes*. Scand J Immunol, 2011. **73**(5): p. 420-7.
42. Atashi, F., A. Modarressi, and M.S. Pepper, *The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review*. Stem Cells Dev, 2015. **24**(10): p. 1150-63.
43. D'Autreaux, B. and M.B. Toledano, *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 813-24.
44. Shyh-Chang, N., G.Q. Daley, and L.C. Cantley, *Stem cell metabolism in tissue development and aging*. Development (Cambridge, England), 2013. **140**(12): p. 2535-2547.
45. Chen, C.T., et al., *Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(4): p. 960-8.
46. Chelikani, P., I. Fita, and P.C. Loewen, *Diversity of structures and properties among catalases*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2004. **61**(2): p. 192-208.
47. Yikrazuul. *Heme B Structure*. 2010 [cited 2018 26.07.2018]; Die Abbildung zeigt die Struktur des Häm B]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heme_b.svg.
48. Almeida, M., et al., *Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 27298-305.
49. Denu, R.A. and P. Hematti, *Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 2989076.
50. Chen, Q., et al., *Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?* Cell Death Differ, 2016. **23**(7): p. 1128-39.
51. Lian, J.B. and G.S. Stein, *Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation*. Iowa Orthop J, 1995. **15**: p. 118-40.
52. Gaur, T., et al., *Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33132-40.
53. Manolagas, S.C., *Wnt signaling and osteoporosis*. Maturitas, 2014. **78**(3): p. 233-7.
54. Rosset, E.M. and A.D. Bradshaw, *SPARC/osteonectin in mineralized tissue*. Matrix Biol, 2016. **52-54**: p. 78-87.
55. Krishnan, V., *Regulation of bone mass by Wnt signaling*. 2006. **116**(5): p. 1202-9.
56. Hay, E., et al., *Interaction between LRP5 and Frat1 Mediates the Activation of the Wnt Canonical Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(14): p. 13616-13623.
57. Kim, J.H., et al., *Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2013. **5**(1): p. 13-31.

58. Kuhl, M., *The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 967-74.
59. De, A., *Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011. **43**(10): p. 745-56.
60. Vldar, E.K., D. Antic, and J.D. Axelrod, *Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(3): p. a002964.
61. Rao, T.P. and M. Kuhl, *An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more*. Circ Res, 2010. **106**(12): p. 1798-806.
62. Wallkamm, V., *Unterschiede und Gemeinsamkeiten der nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt11*, in Fakultät für Chemie und Biowissenschaften 2014, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich.
63. Manolagas, S.C. and M. Almeida, *Gone with the Wnts: β -Catenin, T-Cell Factor, Forkhead Box O, and Oxidative Stress in Age-Dependent Diseases of Bone, Lipid, and Glucose Metabolism*. Molecular Endocrinology, 2007. **21**(11): p. 2605-2614.
64. Lam, E.W.F., et al., *Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony*. Nature Reviews Cancer, 2013. **13**: p. 482.
65. Storz, P., *Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(4): p. 593-605.
66. Iyer, S., et al., *FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling*. J Clin Invest, 2013. **123**(8): p. 3409-19.
67. Van Der Heide, L.P., M.F.M. Hoekman, and M.P. Smidt, *The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 2): p. 297-309.
68. Georgiou, K.R., S.K. Hui, and C.J. Xian, *Regulatory pathways associated with bone loss and bone marrow adiposity caused by aging, chemotherapy, glucocorticoid therapy and radiotherapy*. Am J Stem Cells, 2012. **1**(3): p. 205-24.
69. Yuan, Z., et al., *PPARgamma and Wnt Signaling in Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2016. **11**(3): p. 216-25.
70. Takada, I., A.P. Kouzmenko, and S. Kato, *Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(8): p. 442-7.
71. Almeida, M., *Aging and oxidative stress: A new look at old bone*. IBMS BoneKEy, 2010. **7**(10): p. 340-352.
72. Hoogeboom, D., et al., *Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 9224-30.
73. Pegg, D.E., *The history and principles of cryopreservation*. Semin Reprod Med, 2002. **20**(1): p. 5-13.
74. Rampersad, S.N., *Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays*. Sensors (Basel), 2012. **12**(9): p. 12347-60.
75. Bilski, P., A.G. Belanger, and C.F. Chignell, *Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(7): p. 938-46.
76. Christen, E.H., et al., *Evaluation of bicinehoninic acid as a ligand for copper(I)-catalyzed azide-alkyne bioconjugations*. Org Biomol Chem, 2012. **10**(33): p. 6629-32.

77. Nowinski, R.C., et al., *The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ecotropic murine leukemia viruses.* Virology, 1979. **93**(1): p. 111-26.
78. Suschek, C., et al., *Catalase essentially promotes the osteogenic differentiation potential of regular as well as osteogenically dysfunctional adipose tissue-derived stem cells.* German Congress of Orthopaedics and Traumatology (DKOU 2016), 2016.
79. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.* Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
80. Choudhery, M.S., et al., *Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation.* J Transl Med, 2014. **12**: p. 8.
81. Harman, D., *Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry.* Journal of Gerontology, 1956. **11**(3): p. 298-300.
82. Beckman, K.B. and B.N. Ames, *The free radical theory of aging matures.* Physiol Rev, 1998. **78**(2): p. 547-81.
83. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
84. Guzik, T.J. and D.G. Harrison, *Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies.* Drug Discov Today, 2006. **11**(11-12): p. 524-33.
85. Almeida, M., et al., *Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids.* J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 27285-97.
86. Abo-Aziza, F.A.M., *The Impact of Confluence on Bone Marrow Mesenchymal Stem (BMMSC) Proliferation and Osteogenic Differentiation.* 2017. **11**(2): p. 121-32.
87. Jeon, Y., M.S. Lee, and Y.P. Cheon, *Decreased Contact Inhibition in Mouse Adipose Mesenchymal Stem Cells.* Dev Reprod, 2012. **16**(4): p. 329-38.
88. Arnsdorf, E.J., et al., *Mechanically induced osteogenic differentiation--the role of RhoA, ROCKII and cytoskeletal dynamics.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 4): p. 546-53.
89. Wang, Y.K., et al., *Bone morphogenetic protein-2-induced signaling and osteogenesis is regulated by cell shape, RhoA/ROCK, and cytoskeletal tension.* Stem Cells Dev, 2012. **21**(7): p. 1176-86.
90. Sart, S., L. Song, and Y. Li, *Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation.* Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 105135.
91. Mody, N., et al., *Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells.* Free Radic Biol Med, 2001. **31**(4): p. 509-19.
92. Alund, A.W., et al., *Reactive Oxygen Species Differentially Regulate Bone Turnover in an Age-Specific Manner in Catalase Transgenic Female Mice.* J Pharmacol Exp Ther, 2016. **358**(1): p. 50-60.
93. Riccardi, C.M., et al., *Toward "stable-on-the-table" enzymes: improving key properties of catalase by covalent conjugation with poly(acrylic acid).* Bioconjug Chem, 2014. **25**(8): p. 1501-10.
94. Zhu, Y., et al., *Cloning and characterization of a new manganese superoxide dismutase from deep-sea thermophile Geobacillus sp. EPT3.* World J Microbiol Biotechnol, 2014. **30**(4): p. 1347-57.
95. Hodge, J.E., *Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1953. **1**(15): p. 928-943.
96. Beom-Jun, K., et al., *Iron overload accelerates bone loss in healthy postmenopausal women and middle-aged men: A 3-year retrospective*

- longitudinal study*. Journal of Bone and Mineral Research, 2012. **27**(11): p. 2279-2290.
97. Qing, Y., et al., *Inhibitory effects of iron on bone morphogenetic protein 2–induced osteoblastogenesis*. Journal of Bone and Mineral Research, 2011. **26**(6): p. 1188-1196.
 98. Winterbourn, C.C., *Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction*. Toxicol Lett, 1995. **82-83**: p. 969-74.
 99. Ruiz-Ojeda, F.J., et al., *Impact of 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT)-Derived Increase in Hydrogen Peroxide Levels on Inflammation and Metabolism in Human Differentiated Adipocytes*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0152550.
 100. Walton, P.A. and M. Pizzitelli, *Effects of Peroxisomal Catalase Inhibition on Mitochondrial Function*. Frontiers in Physiology, 2012. **3**: p. 108.
 101. Walton, P.A. and M. Pizzitelli, *Effects of Peroxisomal Catalase Inhibition on Mitochondrial Function*. Front Physiol, 2012. **3**.
 102. Molavian, H.R., M. Kohandel, and S. Sivaloganathan, *High Concentrations of H(2)O(2) Make Aerobic Glycolysis Energetically More Favorable for Cellular Respiration*. Front Physiol, 2016. **7**.
 103. Liemburg-Apers, D.C., et al., *Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism*. Arch Toxicol, 2015. **89**(8): p. 1209-26.
 104. Bartell, S.M., et al., *FoxO proteins restrain osteoclastogenesis and bone resorption by attenuating H2O2 accumulation*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3773.
 105. Wang, C.Y., et al., *Apoptosis in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells: effect of serum and medium supplements*. Apoptosis, 2010. **15**(4): p. 439-49.
 106. Franz-Odenaal, T.A., B.K. Hall, and P.E. Witten, *Buried alive: how osteoblasts become osteocytes*. Dev Dyn, 2006. **235**(1): p. 176-90.
 107. Tan, J., et al., *Decreased osteogenesis of adult mesenchymal stem cells by reactive oxygen species under cyclic stretch: a possible mechanism of age related osteoporosis*. 2015. **3**: p. 15003.
 108. Neve, A., A. Corrado, and F.P. Cantatore, *Osteoblast physiology in normal and pathological conditions*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(2): p. 289-302.
 109. Xiao, W., et al., *Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling*. Front Oral Biol, 2016. **18**: p. 9-16.
 110. Cadigan, K.M. and M.L. Waterman, *TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(11).
 111. Chilumuri, A., M. Odell, and N.G. Milton, *Benzothiazole aniline tetra(ethylene glycol) and 3-amino-1,2,4-triazole inhibit neuroprotection against amyloid peptides by catalase overexpression in vitro*. ACS Chem Neurosci, 2013. **4**(11): p. 1501-12.
 112. Essers, M.A., et al., *Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling*. Science, 2005. **308**(5725): p. 1181-4.
 113. Berner, A., et al., *Scaffold-cell bone engineering in a validated preclinical animal model: precursors vs differentiated cell source*. J Tissue Eng Regen Med, 2017. **11**(7): p. 2081-2089.
 114. Roseti, L., et al., *Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **78**: p. 1246-1262.
 115. Wobma, H. and G. Vunjak-Novakovic, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review*. Tissue Eng Part B Rev, 2016. **22**(2): p. 101-13.
 116. Post, M.J., *Cultured meat from stem cells: challenges and prospects*. Meat Sci, 2012. **92**(3): p. 297-301.

117. Schuler, M. "*Clean Meat*" *Echtes Fleisch - nur künstlich* 2018 [cited 2018 12.07.2018]; Available from: <https://www.tagesschau.de/ausland/clean-meat-101.html>.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek, für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Außerdem danke dem gesamten Forschungslabor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf um Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek und Frau Dr. rer. nat. Vera Grotheer für die Möglichkeit zur Promotion, der guten Organisation und Planung, sowie der tatkräftigen Unterstützung und Anleitung durch die medizinisch-technischen Assistentinnen. Besonderer Dank gilt dabei Jutta Schneider, Christa Wilkens und Samira Seghrouchni, die mir zu jeder Zeit Hilfe und Unterstützung boten.

Grundsätzlich danke ich meinen Eltern Elisabeth und Albrecht Haack, sowie meinen Geschwistern Cassandra, Alexander und Helena Haack für den tollen Familienverbund, der mich immer wieder erdigt und den nötigen Ausgleich bringt.

Zu tiefster Dankbarkeit bin ich meiner Freundin Daniela Dinnies verpflichtet, die mich immer wieder motiviert und emotional unterstützt hat und mir oft wertvolle Tipps bei der Erstellung meiner Dissertation gegeben haben. Ohne sie wäre die Dissertation wahrscheinlich noch immer nicht fertig.