

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

**Untersuchung des osteogenen Differenzierungspotenzials
dedifferenzierter Fettzellen im Vergleich zu adipogenen
Stammzellen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Hans Christian Sons

2019

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

gez:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcke

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. Miriam Margherita Cortese-Krott

1 Zusammenfassung

Die Regeneration von Knochen nach einem Trauma oder bei Pathologien wie Osteoporose, Osteonekrose oder Knochentumoren ist manchmal begrenzt. Manche Läsionen erreichen eine kritische Größe, die es dem Körper erschwert bzw. unmöglich macht, komplett zu verheilen. Eine Möglichkeit solche Defekte zu heilen, liegt darin, speziell gezüchtete Gewebstransplantate aus Stammzellen zu transplantieren. Als Materialquelle dafür eignen sich „adipose-derived stromal cells“ (ASCs), die aus Fettgewebe isoliert werden können. Eine weitere Möglichkeit liegt bei dedifferenzierten Fettzellen (DFATs) vor, welche ebenfalls das Potenzial besitzen, sich in osteogener, adipogener und chondrogener Richtung zu entwickeln. Bei der osteogenen Differenzierung der ASCs in vitro können sich einige Spender nur unzureichend zu Knochengewebe differenzieren. Eine mögliche Ursache könnte eine Osteoporose Erkrankung bei meist älteren Spenderinnen sein. Beim Alterungsprozess des Menschen fallen in den Mitochondrien mehr Oxidanzien an und stellen somit eine Ursache für degenerative Veränderungen und Erkrankungen des alten Menschen dar. Reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 penetrieren und schaden den Zellen bzw. greifen sogar in Signalkaskaden ein, was zu einer Veränderung in der Knochenmatrix führt durch Steigerung der Osteoklastenaktivität. Anscheinend trägt erhöhter oxidativer Stress somit zu einer Veränderung der Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung von ASCs bei. Eine Ursache könnte Osteoporose bzw. erhöhter oxidativer Stress sein. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, in wieweit DFAT Zellen desselben Spenders wie ASCs ebenfalls von oxidativen Stress beeinflusst werden. Stellen sie eine alternative Stammzellquelle für die Herstellung von Knochenimplantaten dar? Wie wirken sich unterschiedliche H_2O_2 -Konzentrationen auf die osteogene Differenzierung aus? ASCs und DFATs wurden aus humanem Fettgewebe von mehreren Spendern gewonnen. Zunächst wurden die Oberflächenproteine der Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) charakterisiert und Stammzeleigenschaften nachgewiesen. Zudem scheinen DFATs eine homogenere Population von mesenchymalen Stammzellen darzustellen als ASCs.

Außerdem wurde das osteogene Differenzierungspotenzial beider Zellarten in vitro verglichen und der Einfluss von H_2O_2 und Katalase in unterschiedlichen Konzentrationen auf den osteogenen Differenzierungsprozess bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von H_2O_2 vor allem bei ASCs die osteogene Differenzierung negativ beeinflussen. Dieser Effekt wurde reduziert durch die Zugabe von Katalase. Die alleinige Zugabe von Katalase förderte die osteogene Differenzierung erheblich. DFAT Zellen wurden zwar auch durch H_2O_2 geschädigt, differenzierten dabei aber noch bei deutlich höheren H_2O_2 Konzentrationen osteogen als ASCs. Des Weiteren wurden Western-Blot-Analysen für verschiedene Proteine des Fett- und Knochenstoffwechsels im Zusammenhang mit reaktiven Sauerstoffspezies analysiert. Es besteht also Hoffnung, dass DFATs eine bessere Alternative zu ASCs für Knochenimplantate vor allem bei älteren Osteoporosepatienten darstellen.

2 Abstract

Regeneration of bone lesions after trauma or pathologies like osteoporosis and bone tumors is often limited. Some of these reach a critical size defect and need special treatment to heal. One option to solve this problem could be bone graft transplants from stem cells. Next to adipose-derived stromal cells (ASCs), extracted from fatty tissue, there is another option in Dedifferentiated adipocyte-derived progeny cells (DFATs). These cells can also differentiate in osteogenic, adipogenic and chondrogenic tissue. In osteogenic differentiation there is a common problem, that ASCs sometimes cannot differentiate to osteogenic tissue. One reason could be an osteoporotic disease of elderly donors. During aging more oxidants are accumulating in mitochondria, which could be one source of degenerative diseases of aging patients. Reactive oxygen species like H_2O_2 penetrate and damage cells and interact in cell signalling resulting in changes of bone formation and higher activity of osteoclasts. Apparently oxidative stress reduces the ability of ASCs for osteogenic differentiation.

Aim of this study was to examine, if DFAT cells of the same donor as ASCs are influenced by oxidative stress in the same way. Are they a possible alternative for bone graft materials? How do different H_2O_2 concentrations influence osteogenic differentiation?

ASCs and DFATs were extracted from fatty tissue of multiple donors. At first the cells were characterised by FACS. DFATs seem to be more homogeneous population of mesenchymal stem cells than ASCs. Furthermore we compared the potential of osteogenic differentiation of both cell types under the influence of H_2O_2 and catalase in different concentrations. The addition of H_2O_2 had a negative effect on osteogenic differentiation especially in ASCs. This effect was reduced by adding catalase. The exclusive addition of catalase resulted in much better osteogenic differentiation. DFATs were also harmed by H_2O_2 , but differentiation was still happening in higher H_2O_2 concentrations than in ASCs. In addition

Western-Blot analyses were performed with different proteins of the fat- and bone metabolism.

DFATs could be the better alternative to ASCs for bone graft materials in elderly patients.

3 Abkürzungen:

ALK	Activin receptor like kinase
ALP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	adipose-derived stromal cells
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DFAT	dedifferenzierte Fettzellen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
FoxO1	Forkhead-Box-Proteine Isoform 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HLA	Human Leukocyte Antigen
mnSOD	Manganese-dependent superoxide dismutase
NOX4	NADPH Oxidase 4
ODM	Osteogenes Differenzierungsmedium
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
RIPA	Radio immunoprecipitation assay

SDS-Page

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

TEMED

Tetramethylethyldiamin

TGF

Transforming growth factor

4 Inhalt

1	Zusammenfassung.....	3
2	Abstract	5
3	Abkürzungen:	7
4	Inhalt.....	9
5	Einführung	11
6	Materialien und Methoden	16
6.1.1	Materialien	16
6.1.2	Geräte	16
6.1.3	Geräte und Materialien zur Zellpflege	17
6.1.4	Substanzen	18
6.1.5	Medien	20
6.2	Methoden.....	22
6.2.1	Isolation	22
6.2.1.1	Isolation mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe und Liposuktionsfett (ASCs) 22	
6.2.1.2	Isolation dedifferenzierter Fettzellen aus Fettgewebe und Liposuktionsfett (DFATs) 24	
6.2.2	Passagenwechsel / Splitten der Zellen	25
6.2.3	Ausplattieren von Zellen / Bestimmung der Zellzahl	26
6.2.4	Charakterisierung von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen	28
6.2.5	CellTiter-Blue® Viability Assay	30
6.2.6	Osteogene Differenzierung von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen.....	31
6.2.7	Katalase und H ₂ O ₂ Zusätze	32
6.2.8	Alizarin-Rot-Färbung.....	33
6.2.9	Alizarin-Rot-Rücklösung.....	33
6.2.10	Alkalische Phosphatase Assay	34
6.2.11	Proteinbestimmung der Zelllysate	34
6.2.12	SDS-Page.....	38
6.2.13	Western-Blot-Analyse.....	39
6.2.14	Ponceau S – Färbung	40
6.2.15	Immunmarkierung.....	41
6.2.16	Detektion	41

6.3	Statistische Auswertung.....	42
6.4	Ethikvotum	42
6.5	Versuchsablauf	43
7	Ergebnisse.....	45
7.1	Stichprobenumfang.....	45
7.2	Durchflusszytometrie	46
7.3	Alizarin – Rot-Färbung und Alizarin – Rot – Rücklösung	48
7.4	Alkalische Phosphatase Assay	57
7.5	Mikroskopie der Alizarin – Rot – Färbung.....	60
7.5.1	ASC.....	60
7.5.2	DFAT	70
7.6	Western-Blotting	80
7.6.1	FoxO1.....	80
7.6.2	NOX4.....	82
7.6.3	mnSOD.....	83
7.6.4	Osteopontin.....	84
7.6.5	ALP.....	85
7.6.6	PPAR γ	86
8	Diskussion.....	89
9	Ausblick.....	100
10	Literaturverzeichnis.....	101

5 Einführung

Die Regeneration von Knochen nach einer traumatischen Verletzung oder bei Pathologien wie Osteoporose, Osteonekrosen oder Knochentumoren ist manchmal begrenzt. Manche Läsionen erreichen eine kritische Größe, die es dem Körper erschwert bzw. unmöglich macht, komplett zu verheilen. Eine Möglichkeit solche Defekte zu heilen, liegt darin, speziell gezüchtete Gewebstransplantate aus Stammzellen zu transplantieren. Als Materialquelle dafür stehen „adipose-derived stromal cells“ (ASCs), die aus Fettgewebe isoliert werden können, zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit liegt bei dedifferenzierten Fettzellen (DFATs) vor, welche ebenfalls das Potenzial besitzen, sich in osteogener, adipogener und chondrogener Richtung zu entwickeln. Während des Dedifferenzierungsprozesses kommen diese Zellen einem Fibroblasten-like-Phänotyp [1] sehr nahe und exprimieren typische mesenchymale Stammzellmarker.

Nach etwa 5 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ teilen sich die Fettvesikel innerhalb der adulten Adipozyten in kleinere Tröpfchen und die Zellen verlieren ihre runde Form. Im weiteren Verlauf der Dedifferenzierung fällt der Fettgehalt rapide ab und die Zellen ändern ihr Erscheinungsbild in flache Zellen mit mehreren Ausläufern. Zum Ende des Differenzierungsprozesses haben die Adipozyten ein fibroblasten-ähnliches Erscheinungsbild angenommen und ihre Fettvesikel komplett verloren [2].

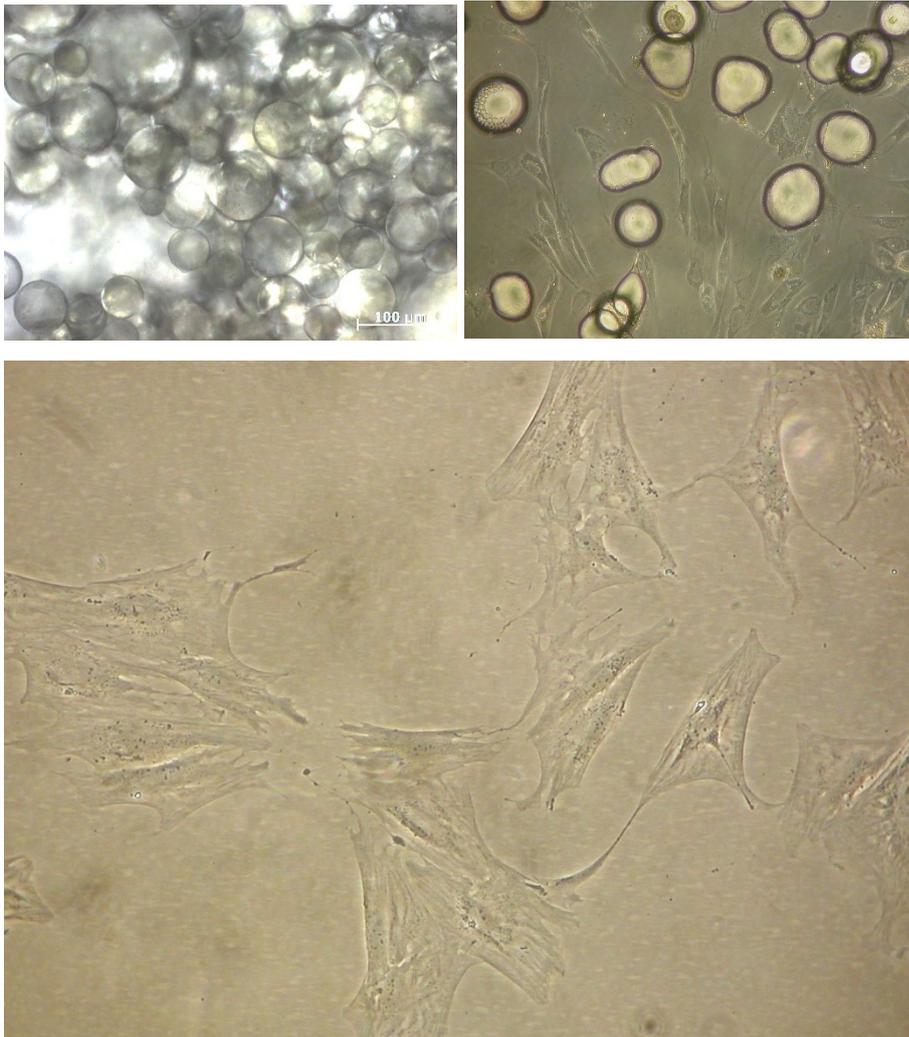


Abbildung 1: Dedifferenzierung von Adipozyten zu DFATs im Zeitverlauf

Gewonnen werden die dedifferenzierten Fettzellen mit der sog. „ceiling culture method“ aus adulten Fettzellen [3] [4] [5].

Dazu wird Spenderfettgewebe fein zerkleinert und durch Kollagenaselösung angedaut. Nach mehreren Filtrations- und Zentrifugationsschritten kommt es zu folgender Phasentrennung. Oben bildet sich neben einer flüssigen Ölschicht eine Ansammlung an Fettzellen. Diese wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in eine mit Proliferationsmedium vollständig gefüllte Flasche überführt. Bei horizontaler Positionierung auf dem eigentlichen Flaschenrücken schwimmen die adulten Adipozyten aufgrund der geringeren Dichte des Fettanteils oben. Nach einwöchiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wird das Medium entfernt, die Flasche gedreht. Inzwischen ist es zum Dedifferenzierungsprozess gekommen.

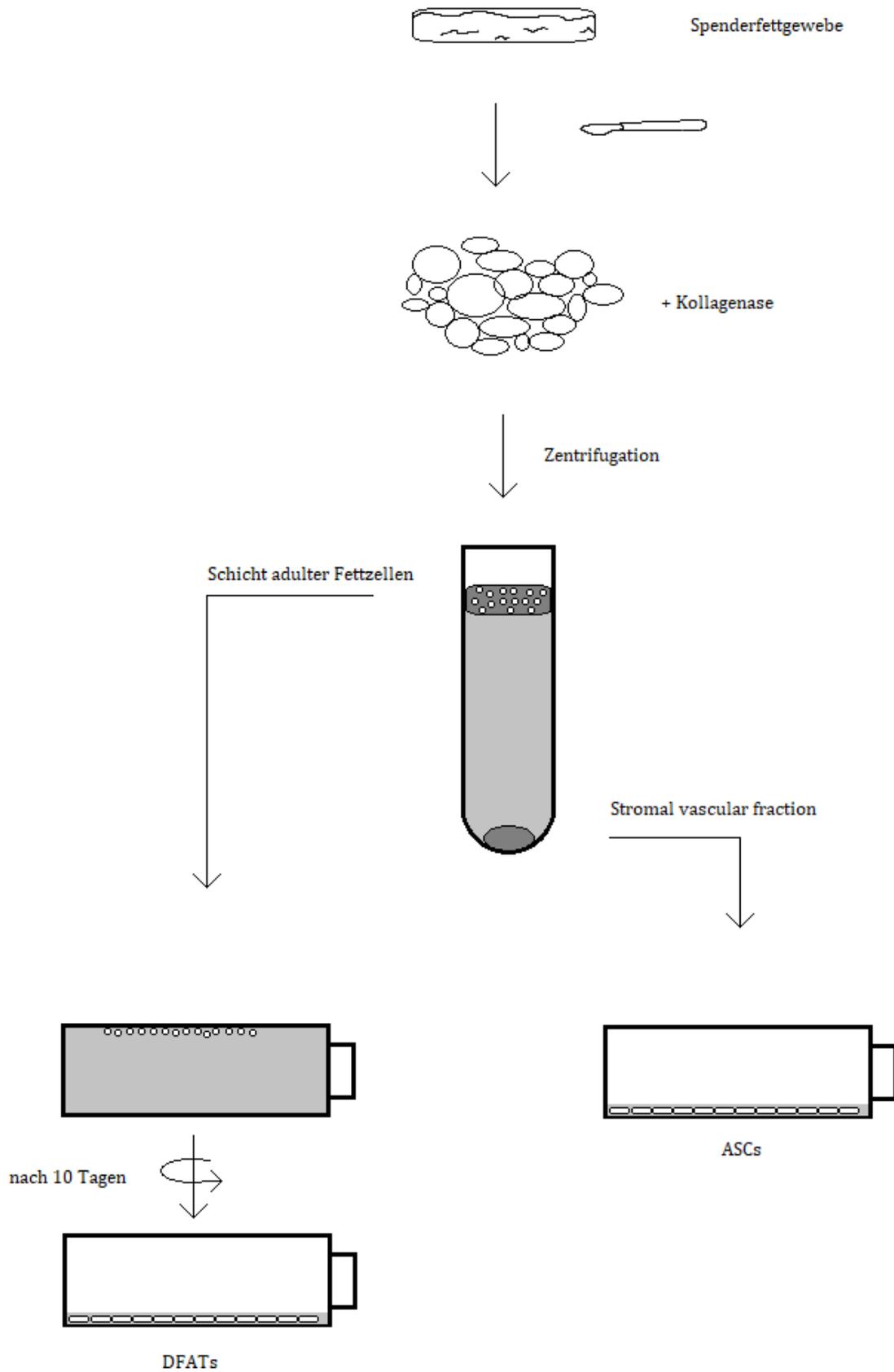


Abbildung 2 Schematische Darstellung der „ceiling culture method“

Bei der osteogenen Differenzierung der ASCs in vitro kommt es immer wieder zu einem bestimmten Problem, dass sich einige Spender in normalem osteogenem Differenzierungsmedium nur unzureichend zu Knochengewebe differenzieren. Eine mögliche Ursache könnte eine Osteoporoseerkrankung bei meist älteren Spenderinnen sein. Beim Alterungsprozess des Menschen fallen in den Mitochondrien mehr Oxidanzien an und stellen somit eine Ursache für degenerative Veränderungen und Erkrankungen des alten Menschen dar [6, 7].

Bei der Osteoporose kommt es einerseits zu einem vermehrten Abbau von Knochensubstanz, andererseits ist auch die osteoblastische Aktivität geringer [8]. Einer der Hauptgründe für Osteoporose ist oxidativer Stress, wie in einem Tierversuch an Mäusen gezeigt wurde [9]. Reaktive Sauerstoffspezies, wie H_2O_2 , penetrieren und schaden den Zellen bzw. greifen sogar in Signalkaskaden ein, was zu einer Veränderung in der Knochenmatrix durch Steigerung der Osteoklastenaktivität führt [10, 11]. Des Weiteren wird erhöhter oxidativer Stress mit einer Vielzahl weiterer Erkrankungen des älteren Menschen in Verbindung gebracht, wie Diabetes [12], Bluthochdruck [13], neurodegenerative Erkrankungen und dem Alterungsprozess allgemein [14, 15]. Anscheinend trägt erhöhter oxidativer Stress somit zu einer Veränderung der Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung von ASCs bei.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu untersuchen, in wieweit DFAT Zellen desselben Spenders, aus dem auch ASCs isoliert wurden, ebenfalls von oxidativen Stress beeinflusst werden. Stellen sie eine alternative Stammzellquelle für die Herstellung von Knochenimplantaten dar? Wie wirken sich unterschiedliche H_2O_2 - Konzentrationen auf die osteogene Differenzierung aus?

ASCs und DFATs wurden aus humanem Fettgewebe von mehreren Spendern gewonnen, die sich einer plastischen Schönheitschirurgie unterzogen haben.

Zunächst wurden durchflusszytometrisch Stammzeleigenschaften bei den isolierten ASCs und DFATs nachgewiesen. Das osteogene

Differenzierungspotenzial beider Zellarten wurde in vitro verglichen. Der Einfluss von H_2O_2 und Katalase auf den Differenzierungsprozess wurde bestimmt.

Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von H_2O_2 vor allem bei ASCs die osteogene Differenzierung negativ beeinflussen. Dieser Effekt wurde reduziert durch die Zugabe von Katalase, welche auch die Osteogenese deutlich steigerte. DFAT Zellen wurden zwar auch durch H_2O_2 geschädigt, differenzierten dabei aber noch bei deutlich höheren H_2O_2 Konzentrationen osteogen, als ASCs.

Es besteht also Hoffnung, dass DFATs eine bessere Alternative zu ASCs für Knochenimplantate vor allem bei älteren und an Osteoporose erkrankten Patienten darstellen.

6 Materialien und Methoden

6.1.1 Materialien

6.1.2 Geräte

Abzug	MC 6, Waldner Laboreinrichtungen GmbH
Autoklav	Systeme DX-90
Blotter	Bio Rad Mini-Proteam® Tetra-System
Brutschrank	Thermo Electron Corporation HERAcell® 150i
FACS	BD Biosciences FACSCalibur
FACS- Software	Cellquest Pro
Fluoreszenzlicht	Zeiss NAG-f HBO 50
Geldokumentationsanlage	Bio Rad Universal Hood II
Geltransferapparatur	Bio Rad Trans-Blot Turbo
Heizblock	Fisher Scientific dry bath FR15101
Magnetrührer	VWR Stirrer
Mikroskop	Zeiss Axiovert 40
	Zeiss Axiovert 200
Mikroskopkamera	Axiocam MRC
Mikroskopsoftware	Axiovision Rel. 4.8
Multipipette	Eppendorf Multipipette® plus
Photometer	Eppendorf Bio Photometer
Pipetboy	Omega Pipettor
Pipetten	Eppendorf Research® fix 10 - 100 µl µl
	Eppendorf Research® fix 100 - 1000
	Eppendorf Research® fix 0,5 - 10 µl
Taumel-Rollenmischer	RM 5K30, M. Zipperer GmbH
Ultraschallprozessor	Hielscher Ultrasonic Processor UP50H
Victor	Perkin Elmer VICTOR3™ V Multilabel Counter model 1420
Vortexer	VWR International Vortexer
Waage	ABJ 220-4M, Kern & Sohn GmbH
Wärmedrehschrank	Biometra OV 3
Wasserbad	Lauda Aqualine AL 12
Werkbank	Thermo Electron Corporation HERAsafe®
	CleanAir Euroflow EF 15
Zentrifuge	Thermo Electron Corporation Heraeus Fresco 17 Centrifuge
	Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R
	Thermo Scientific Heraeus Megafuge 1.0R
	Eppendorf Mini Spin

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

6.1.3 Geräte und Materialien zur Zellpflege

0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 0,5ml
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 1,5ml
2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 2ml
6-Well Platten	GREINER 6-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
12-Well Platten	GREINER 12-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
24-Well Platten	GREINER 24-Well CELLSTAR® Tissue Culture Plates
96-Well Platten	GREINER bio-one microplate 96-well
15-ml Falcons	greiner bio-one Art.-Nr.: 188171
50-ml Falcons	greiner bio-one Art.-Nr.: 227261
Einfrierröhrchen	greiner bio-one Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™
Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH + CO KG Pasteurpipetten ISO7712
Skalpell	Feather disposable scalpel No. 21
Sterilfilter 0,2 µm	Millex-gs filter unit 0,22 µm
Stripetten, 2 ml	Costar® 2mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Stripetten, 5 ml	Costar® 5mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Stripetten, 10 ml	Costar® 10mL Shorty Stripette® Serological Pipets
Stripetten, 25 ml	Costar® 25mL Shorty Stripette® Serological Pipets
T-25er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 25 cm ² red filter cap
T-75er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap
T-175er Flaschen	CELLSTAR® Cell Culture Flasks 175 cm ² red filter cap
Zählkammer	Neubauer Zählkammer
Zellschaber	Greiner BioOne Cell Scraper, blue, 40cm

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien zur Zellpflege.

6.1.4 Substanzen

1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	VWR® 1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat TECHNICAL
2-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH® 2-Mercaptoethanol M7154 for electrophoresis , St. Louis, USA ; Steinheim, D.
4-Nitrophenol Solution, 10mM	SIGMA 4-Nitrophenol Solution, 10mM N7660
Acrylamid	Bio-Rad 30% Acrylamide/Bis Solutions
Alizarin-Rot	Merck KGaA 106278 Alizarin red S mono sodiumsalt (C.I. 58005
ALK 3	RD-Systems anti-hBMPr-IA / ALK 3 PE, Minneapolis, USA.
ALK 6	RD Systems ; anti-hBMPr-IB / ALK 6 APC
Aqua dest. (steril)	Fresenius Kabi Ampuwa 1000ml Plastipur
BSA	Roth GmbH Albumin Fraktion V
CellTiter Blue	Promega CellTiter-Blue® Cell Viability Assay
Cellwash	BD Biosciences Cellwash
CD 14	BD Biosciences FITC (MoP9) CD 14
CD 19	BD Biosciences FITC Mouse anti-human CD 19
CD 26	Thermo Scientific Pierce™ CD 26/DPP4 Antibody, APC
CD 29	Immunotools anti-human CD 29 PE
CD 31	BD Biosciences PE Mouse anti-human CD 31
CD 34	RD Systems anti-h CD 34 FITC
CD 44	BD Biosciences APC Mouse anti-human CD 44
CD 45	BD Biosciences FITC Mouse anti-human CD 45
CD 73	BD Biosciences PE Mouse anti-human CD 73
CD 90	
CD 105	BD Biosciences APC Mouse anti-human CD 105
CD 146	MACS Miltenyi Biotech CD 146-APC human
DMEM (4,5 g/l Glucose)	Gibco DMEM (1x) 500ml (+4,5g/l D-Glucose, L-Glutamin)
Ethanol zur Desinfektion	
FBS	PAA Fetal Bovine Serum Gold
FGF	Immunotools
HLA-DR	Biosciences FITC Mouse anti-human HLA-DR
Katalase	SIGMA-ALDRICH® Catalase from bovine liver C30-100MG
Kollagenase Typ I	Biochrom AG Collagenase Typ I, CLS I 330 U / mg
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	SIGMA-ALDRICH® L-Ascorbic acid 2 – phosphate sesquimagnesium salt hydrate

PBS	PAN Biotech Phosphate Buffered Saline (Dulbecco) PBS-Lösung mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺
	SIGMA-ALDRICH® PBS without Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Penicillin / Streptomycin	PAN Biotech Penicillin / Streptomycin 10000 U / ml Penicillin – 10 mg / ml Streptomycin
Runx2	Santa Cruz Biotechnology® runx2 M-70
SDS	
β-Glycerophosphat	SIGMA-ALDRICH® β-Glycerophosphate disodium salt hydrate G9422 BioUltra, suitable for cell culture, suitable for plant cell culture, ≥99.0% (titration
TGF β RI	RD Systems anti-h TGF-β RI / ALK-5 APC-conjugated
TGF β RII	RD Systems anti-h TGF-β RII PE-conjugated
Triton	SIGMA-ALDRICH® Triton™ X - 100
Trypsin/EDTA	Biowest Trypsin – EDTA 10x
Tween	SIGMA-ALDRICH® Tween®20

Tabelle 3: Verwendete Substanzen.

6.1.5 Medien

Proliferationsmedium für ASCs

- 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 4,5 mg / l Glucose
- 10 % FCS
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 2 ng / ml FGF-2

Proliferationsmedium für DFATs

- 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 4,5 mg / l Glucose
- 10 % FCS
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 2 ng / ml FGF-2

Osteogenes Differenzierungsmedium (ODM)

- 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 4,5 mg / l Glucose
- 10 % FCS
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 10 mM β -Glycerophosphat
- 50 μ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat
- 100 nM Dexamethason

RIPA-Puffer modifiziert nach Abcam für Proteinbestimmung

- 150 mM NaCl
- 50 mM Tris bei pH=8
- 1 % NP-40
- 0,5 % MaDesoxycholat
- 0,1 % SDS

Western Blot Sammelgel

- 3 ml H₂O
- 1,25 ml 4-fach Sammelgelpuffer
- 650 µl 30 % Acrylamid
- 25 µl 10 % APS
- 10 µl TEMED

12% Trenngel

- 2,625 ml H₂O
- 3 ml 30 % Acrylamid
- 1,875 ml 4-fach Trenngelpuffer
- 25 µl 10 % APS
- 10 µl TEMED

6.2 Methoden

6.2.1 Isolation

Alle Arbeiten zur Zellisolation und Zellpflege wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (Thermo Electron Corporation HERAsafe® und CleanAir Euroflow EF 15) durchgeführt.

Gelagert wurden die Zellkulturen bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 100% in einem Brutschrank der Firma Thermo Electron Corporation HERAccl® 150i.

6.2.1.1 Isolation mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe und Liposuktionsfett (ASCs)

Zur Isolation mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe und Liposuktionsfett wurde zunächst eine Kollagenaselösung angesetzt aus je 10ml PBS w Ca²⁺ MG²⁺ mit Zusatz von 0,15 g BSA Fraktion V und 0,02 g Kollagenase Typ 1. Diese Lösung wurde vor Gebrauch durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert.

Währenddessen wurde bereits das Schüttelbad bzw. der Wärmedrehschrank auf 37° C vorgeheizt.

Als Materialquelle wurde Spenderfettgewebe und Liposuktionsfett aus der Schönheitschirurgie, welches uns aus der Abteilung für Plastische Chirurgie des Klinikums Köln-Merheim zur Verfügung gestellt wurde, verwendet.

Wir erhielten jeweils Spritzen mit Liposuktionsfett und in Plastiktüten abgepacktes Fettgewebe aus Reduktionsplastiken. Das Liposuktionsfett wurde in 50ml Falcons gegeben und bei 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Dabei ließ sich folgende Phasenbildung beobachten: eine flüssige Ölschicht, eine Fettgewebsschicht und eine untere flüssige Phase. Die flüssige obere Ölschicht wurde vorsichtig mit einer 5 ml oder 10 ml Pipette abgesaugt und verworfen. Die mittlere Schicht aus Fettgewebe wurde mit einer 25 ml Pipette abgenommen und in ein neues 50 ml

Falcon überführt. Das Falcon durfte dabei maximal bis zur Hälfte gefüllt werden. Die untere flüssige Phase wurde nicht mit aufgenommen und wurde verworfen. Die steril filtrierte Kollagenase-Lösung wurde im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und die Falcons 45 Minuten im vorgeheizten Schüttelbad bzw. Wärmedrehschrank bei 37° C inkubiert.

Das Fettgewebe wurde zunächst vorsichtig mit PBS abgewaschen und anschließend in einer Petrischale mittels Schere, Skalpell und Pinzette steril präpariert. Zunächst wurde die Haut abpräpariert und sichtbares Bindegewebe sowie Blutgefäße entfernt. Das zurückbleibende subkutane Fettgewebe wurde in ca. 0,5 cm große Stücke zerkleinert und in 50 ml Falcons, welche bis zur Hälfte gefüllt wurden, überführt. Die steril filtrierte Kollagenase-Lösung wurde ebenfalls im Verhältnis 1:1 zum Fettgewebe hinzugegeben. Nun wurden die gefüllten Falcons 45 – 60 Minuten im vorgeheizten Schüttelbad bzw. Wärmedrehschrank bei 37° C inkubiert.

Nach Inkubation wurde ein Glastrichter auf neue 50 ml Falcons gestellt und mithilfe zweier steriler Pinzetten der zugeschnittene 250 µm Filter (autoklaviert) hineingelegt und befestigt. Das angedaute Fettgewebe wurde durch den Filter gegossen und dieser am Ende mit Hilfe der Pinzetten ausgedrückt. Anschließend wurden die Falcons 10 Minuten bei 300g zentrifugiert. Die obere flüssige Ölschicht wurde mit Hilfe einer Glaspipette abgesaugt und verworfen.

Die nächste Phase (festes gelbes Fett) wurde mit einer 10 ml Pipette abgenommen und verworfen oder für die Isolation dedifferenzierter Fettzellen weiterverwendet. Die flüssige Phase wurde mit Hilfe einer Glaspipette bis zum Zellpellet abgesaugt. Das Zellpellet wurde in ca. 30 ml NaCl-Lösung 0,9 % resuspendiert und die Falcons erneut bei 300g 10 Minuten zentrifugiert.

Um verbleibende Erythrozyten zu entfernen, wurden die Pellets gepoolt und mit 10 ml Lyse-Lösung für 10 Minuten bei 4° C inkubiert und dann für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert.

Der flüssige Überstand aus den zentrifugierten Falcons wurde abgesaugt und das Pellet in Medium resuspendiert.

T-175 Zellkulturflaschen wurden mit 20 ml Proliferationsmedium befüllt und, abhängig von der Pelletgröße, die Zellsuspension hinzugegeben.

Die Flaschen wurden im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurde das Proliferationsmedium abgesaugt, die nicht adhärenen Zellen mit PBS abgewaschen und neues Proliferationsmedium hinzugegeben.

6.2.1.2 Isolation dedifferenzierter Fettzellen aus Fettgewebe und Liposuktionsfett (DFATs)

Die Isolation dedifferenzierter Fettzellen aus Fettgewebe und Liposuktionsfett läuft zu Beginn analog zu der zuvor beschriebenen Isolation mesenchymaler Stammzellen (ASCs) ab. Diese Art der Gewinnung wird als „Ceiling culture method“ bezeichnet [3] [4] (vgl. auch Abbildung 2). Nach Inkubation in Kollagenase-Lösung, Filtrieren durch den 250 µm Filter und erstem Zentrifugieren wurde die feste gelbliche Phase mit einer 10 ml Pipette abgenommen und jeweils 5 ml in stehende T25-Zellkulturflaschen überführt.

Die Flaschen wurden nun komplett bis oben mit Proliferationsmedium gefüllt und mit dem vorgesehenen Schraubverschluss verschlossen. Nun wurden die Flaschen so gedreht, dass sich die Fettschicht gleichmäßig an der Flaschendecke verteilt und schließlich mit nach oben zeigendem Boden in eine Petrischale gelegt, um ein Auslaufen und eine Kontamination des Brutschrankes zu verhindern. Es folgte die Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ für 10 Tage. Während dieser Zeit findet der Dedifferenzierungsprozess statt (vgl. Abbildung 1). Nach 10 Tagen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und versucht, übrig gebliebene Fettblasen auch zu entfernen. Nach Zugabe von 7 ml neuem Proliferationsmedium wurden die Zellkulturflaschen in normaler Lage, d.h. Boden auf Boden, weiter inkubiert.

6.2.2 Passagenwechsel / Splitten der Zellen

Adipogene Stammzellen und dedifferenzierte Fettzellen wachsen adhären auf Plastik-Oberflächen. Um größere Zellkulturen eines Spenders anzulegen bzw. die Zellkulturen in größere Flaschen bzw. höhere Zellpassagen zu überführen, ist es notwendig, diese von der Plastikoberfläche der Zellkulturflaschen abzulösen. Dazu wurde eine Trypsin / EDTA Lösung verwendet, welche 5 %ig in PBS verdünnt wurde. Zunächst wurde das alte Proliferationsmedium abgesaugt und die Zellen mit 9 ml pro T-175er- ; 5 ml pro T-75er- und 2,5 ml pro T-25er-Flaschen der 5 %igen Trypsin/ PBS- Lösung versetzt und für 5 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde lichtmikroskopisch (Zeiss Axiovert 40) überprüft, ob noch Zellen adhären sind. In diesem Fall wurde die Kulturflasche vorsichtig gegen die Hand geschlagen, um noch verbleibende adhären Zellen abzulösen. War dies nicht erfolgreich, konnte die Inkubation im Brutschrank um weitere 5 Minuten maximal verlängert werden. Abgestoppt wurde die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von Proliferationsmedium im Verhältnis 1:1 zur zugegebenen Trypsin-Menge.

Die Suspension wurde mit einer 25 ml Pipette aufgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt und bei 300g für 5 Minuten zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde mit einer Glaspipette bis zum Zellpellet abgesaugt. Das Pellet wurde mit Proliferationsmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt.

6.2.3 Ausplattieren von Zellen / Bestimmung der Zellzahl

Nach Passagieren und Heranwachsen einer homogenen Zellkultur wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen (T175) für die Versuche in 24-Well-Platten bzw. 6-Well Platten (für die Proteinbestimmung und Western-Blot-Analyse) überführt. Zunächst wurden die Zellen nach der zuvor beschriebenen Methode von der Plastik-Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelöst. Dies erfolgte mit 9 ml 5%iger Trypsin / PBS – Lösung und anschließender Inkubation im Brutschrank. Nach Ablösen aller Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Proliferationsmedium abgestoppt und die 19 ml Zellsuspension nach Schwenken mit einer 25 ml Pipette in ein 50 ml Falcon überführt. Bevor dieses für 5 Minuten bei 1200 U / min zentrifugiert wurde, entnahmen wir 20 µl der Suspension vorsichtig mit einer Pipette, ohne dabei den Rand des Falcons zu berühren und zu kontaminieren. Diese wurde in ein leeres Well einer 96-Well Platte gegeben und durch Auf- und Abpipettieren mit 20 µl Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt. 10 µl des Zell-Farbgemisches wurden nun gleichmäßig unter den Objektträger auf der Neubauer Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden nun alle vitalen Zellen in den vier Quadranten ausgezählt und mit folgender Formel die Zellzahl berechnet:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times 2 \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

Dabei wird durch 4 dividiert, wenn alle vier Felder der Zählkammer ausgezählt wurden, Faktor 2 ergibt sich durch die 1:1 Verdünnung mit dem Farbstoff Trypanblau. Um die Gesamtzahl der Zellen einer Zellkulturflasche zu bestimmen, wird das Ergebnis noch mit dem verbleibenden Volumen des zentrifugierten Falcons (in diesem Fall 19 ml) multipliziert.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand nun mit Hilfe einer Glaspipette abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 5 ml Proliferationsmedium resuspendiert und vermengt.

Für den Versuchsstart wurden in jedes Well der 24-Well Platten 50.000 Zellen in 0,5 ml Medium ausplattiert. Dazu wurde die Zellsuspension entsprechend dem benötigten Volumen verdünnt und mittels der Multipipette zur besseren Genauigkeit auf die Wells verteilt.

Bis zum Versuchsstart wurden die ausplattierten 24-Well Platten im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert.

Das Ausplattieren für die bei der Proteinbestimmung bzw. Western-Blot-Analyse benötigten 6-Well-Platten erfolgte nach gleichem Prinzip, allerdings mit 200.000 Zellen auf 2 ml Medium pro Well.

6.2.4 Charakterisierung von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen

Zur Charakterisierung der Oberflächenproteine von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen mittels Durchflusszytometrie wurde der FACSCalibur der Firma BD Biosciences verwendet. Für diese Untersuchung mussten die Zellen zunächst wieder aus den Zellkulturflaschen geerntet werden. Dies erfolgte wie im Abschnitt „Passagenwechsel / Splitting von Zellen“ beschrieben. Dann wurden die Zellen mit 1 % FCS haltigen Cellwash gewaschen und für 4 Minuten bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Cellwash (1 % FCS) resuspendiert und vorerst auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Beschriftung der 10 Analyseröhrchen (Tubes) je Spender mit Spender- und Tube-Nummer.

Die Aufteilung geschah wie folgt:

Tube	FL-4 APC	FL-2 PE	FL-1 FITC
1	ungefärbt		
2	CD 44	HLA-DR	CD 45
3	CD 90	CD 29	CD 14
4	CD 105	CD 13	CD 19
5	CD 146	CD 73	
6	ALK 6	ALK 3	
7	TGF β RI	TGF β RII	
8	PPARY	CD 31	CD 34
9	2. AK		
10	CD 26		CD 31

Tabelle 4: Verwendete Marker zur Durchflusszytometrie.

In jedes Röhrchen wurden 200 μ l der zu untersuchenden Zellsuspension überführt, in Tube 1 400 μ l, da an diesem Röhrchen zunächst die Grundeinstellung des FACS vorgenommen wurde.

In jedes Röhrchen wurden nun die Antikörperfarbstoffe nach Tabelle 4 hinzugefügt. Dabei wurden bei großen Flaschen (200 Tests) 5 μ l und bei kleinen Flaschen (100 Tests) 3 μ l Antikörperlösung hinzugegeben. Die Tubes wurden nun

für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert, dann mit je 4 ml Cellwash gewaschen und Minuten bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 300 µl Cellwash aufgenommen und am FACS gemessen.

Da es sich bei den Tubes 8 und 9 um intrazelluläre Antikörper z.T. handelte, erhielten diese Zellen vor Messung eine gesonderte Behandlung durch Fixierung und Permeabilisierung.

Die entsprechenden Zellen wurden mit 500 µl Cellfix (1:10 mit Wasser) für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschvorgang mit Cellwash und Zentrifugation für 4 Minuten bei 300g erfolgte das Permeabilisieren der Zellmembran mittels 0,2 % Triton haltigem Cellwash, welches ebenfalls 15 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur auf den Zellen verblieb. Nach Zentrifugation und Resuspension in 100 µl Cellwash (0,2 % Triton) wurde der primäre Rabbit α -PPARY Antikörper (0,5 µl) in Tube 8 gegeben und für 30 Minuten bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Es folgten 3 Waschdurchgänge mit Cellwash (0,2 % Triton) und die vierminütige Zentrifugation bei 300g. Nach erneutem Aufnehmen in 100 µl Cellwash (0,2 % Triton) erfolgte die Inkubation der Tubes 8 und 9 mit dem sekundären α -Rabbit-APC-Antikörper (1 µl) für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach erneutem einmaligen Waschen und Zentrifugieren wurden die Zellen in 200 µl Cellwash aufgenommen und gemessen.

Die Datenerfassung und Auswertung am FACSCalibur erfolgte durch das Programm „CellQuest Pro“ und Export in „Microsoft Office PowerPoint“. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse diente das Programm „GraphPad Prism V5“.

6.2.5 CellTiter-Blue® Viability Assay

Zur Überprüfung der ausplattierten Zellzahl wurde jeweils an Tag 0 jedes Versuchsdurchlaufes ein CellTiter-Blue Viabilitätstest durchgeführt. Dieser beruht darauf, dass vitale Zellen Resazurin in Resorufin reduzieren. Dieser Umsatz korreliert mit der Zellzahl und wurde ermittelt.

Dazu wurde CellTiter-Blue Farbstoff im Verhältnis 1:20 mit Proliferationsmedium gemischt. Das alte Proliferationsmedium der zu messenden Wells wurde sorgfältig unter Schräghalten abgesaugt, sodass kein Tropfen mehr verblieb. Nun wurden je Well 0,5 ml der verdünnten CellTiter-Blue Lösung hinzugegeben und die Zellen für 60 Minuten in Dunkelheit im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Inkubation wurde eine 96-Well Platte mit je 100 µl Probe je zu messenden Well bestückt. Zur höheren Genauigkeit wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Dabei war darauf zu achten, dass die Microwell-Kammern zur korrekten Messung blasenfrei sind. Eventuell entstandene Luftblasen wurden vor der Messung mit einer Kanüle entfernt.

Mittels Perkin Elmer VICTOR3™ V Multilabel Counter model 1420 wurde die Fluoreszenz bei 590 nm photometrisch bestimmt.

6.2.6 Osteogene Differenzierung von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen

Adipogene Stammzellen und dedifferenzierte Fettzellen lassen sich aufgrund Ihrer mesenchymalen Stammzeleigenschaften zu Knochengewebe differenzieren.

Zunächst wurde das Proliferationsmedium mit Hilfe einer Glaspipette abgenommen und bei 24-Well-Platten je Well 0,5 ml Differenzierungsmedium hinzugegeben, bei 6-Well-Platten je Well 2 ml.

Das osteogene Differenzierungsmedium setzte sich zusammen aus 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 4,5 mg / l Glucose , 10 % FCS , 1 % Penicillin / Streptomycin , 10 mM β -Glycerophosphat , 50 μ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und 100 nM Dexamethason.

Das Medium wurde an den Tagen 3, 7, 10 und 14 abgenommen und gegen frisches Differenzierungsmedium gewechselt.

6.2.7 Katalase und H₂O₂ Zusätze

Um den Einfluss von Katalase und H₂O₂ auf die osteogene Differenzierung beider Zellarten untersuchen zu können, wurde zu jedem Mediumwechsel ein frischer Ansatz Katalase-Lösung und H₂O₂-Lösung hergestellt.

Katalase wurde steril aus der Stock-Lösung (SIGMA-ALDRICH® Catalase from bovine liver C30-100MG) entnommen und 1:10 in PBS verdünnt, sodass für 250 U Katalase 4,3 µl der Katalase-Lösung auf 500 µl Differenzierungsmedium gegeben werden müssen.

Für die H₂O₂-Lösung wurde die 30 %ige Stock-Lösung 1:1000 mit Aqua dest. verdünnt.

Es gilt $m = M \times n$ $n = c \times v$

$$M(\text{H}_2\text{O}_2) = 34 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

30 %ige Stock-Lösung ist vorhanden => 300g auf 1000ml

$$n \frac{m}{M} = \frac{300 \text{g}}{34 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 8,823 \text{ mol}$$

$$c = \frac{n}{v} = \frac{8,823 \text{ mol}}{1 \text{ l}} = 8,823 \text{ mol/l}$$

$$\frac{100 \mu\text{M}}{8823529,4 \mu\text{M}} \times 1 \text{ ml} = 0,0000113 \text{ ml}$$

11,3 µl der verdünnten H₂O₂-Lösung entsprechen also einer Zugabe von 100 µM H₂O₂ auf 1 ml einer Lösung. Dies bedeutet für die Versuchsanordnung:

Zur Zugabe von 200 µM H₂O₂ müssen 11,3 µl der verdünnten H₂O₂-Lösung auf 500 µl Differenzierungsmedium gegeben werden.

6.2.8 Alizarin-Rot-Färbung

Alizarin –Rot ist ein Farbstoff, welcher sich durch Chelation an Calcium anlagert und unter dem Lichtmikroskop und makroskopisch rot erscheint. Alizarin-Rot eignet sich somit zum Nachweis der Ossifikation und korreliert mit dem Grad der osteogenen Differenzierung. Für die Färbelösung wurde Alizarin-Rot im Verhältnis 1 : 20 in destilliertes Wasser in ein Falcon gegeben und auf dem Taumel-Rollenmischer für 10 Minuten vermengt.

Zunächst wurde das Differenzierungsmedium mit einer Glaspipette unter der Sterilbank abgesaugt und die Wells anschließend mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen für 15 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd in PBS unter dem Abzug fixiert. Das Paraformaldehyd wurde mit einer Pasteurpipette entfernt und die Zellen mit jeweils 2 ml destilliertem Wasser gewaschen. Nach Absaugen des destillierten Wassers wurde in jedes Well 500 µl der zuvor angesetzten Alizarin-Rot-Lösung gegeben und die Zellen für 30 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation folgte ein viermaliges Waschen der Zell-Platten mit destilliertem Wasser, bis das Waschwasser makroskopisch keine Rotfärbung mehr zeigte. Das Ergebnis wurde nun lichtmikroskopisch beurteilt und fotografiert.

6.2.9 Alizarin-Rot-Rücklösung

Der Grad der osteogenen Differenzierung korreliert mit der Intensität der Alizarin-Rot-Färbung. Um diese quantitativ bestimmen zu können, wurde die Alizarin-Rot-Färbung rückgelöst. Dazu wurde Cetylpyridinium-Chlorid verwendet. Dieses wurde im Verhältnis 1: 10 in Wasser gelöst. Jedes Well wurde mit 500 µl der 10 % Cetylpyridinium-Chlorid-Lösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter regelmäßigem Schwenken inkubiert. Nach Inkubation und vollständiger Rücklösung wurde die Absorption des Überstandes bei 600 nm gemessen. Als Blank diente 1 ml der 10 % Cetylpyridinium-Chlorid-Lösung. Lag der gemessene Wert über 2, wurde mit Aqua dest. verdünnt und erneut gemessen.

6.2.10 Alkalische Phosphatase Assay

Zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase-Aktivität verwendeten wir p-Nitrophenol. P-Nitrophenolphosphat ist ein Substrat der Alkalischen Phosphatase und wird zu Nitrophenol und einem anorganischen Phosphatmolekül umgesetzt. Nitrophenol ist dabei ein gelbes lösliches Endprodukt, welches ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 405 nm hat und kolorimetrisch gemessen werden kann. Die Bildung des gelben Endproduktes ist proportional zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

Auch hier wurde zunächst das Differenzierungsmedium in den zu messenden Wells abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml PBS je Well gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurde je Well 300 µl der 10 mM 4-Nitrophenol Solution hinzugegeben und bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Ein leeres Well wurde gleichzeitig analog mitbehandelt und diente als Blank.

Nach Inkubation wurde je Well eine Doppelbestimmung in einer 1 : 11 Verdünnung auf einer 96-Well Platte am Victor (Perkin Elmer VICTOR3™ V Multilabel Counter model 1420) durchgeführt (10 µl je inkubiertem Well auf 100 µl Aqua dest.).

6.2.11 Proteinbestimmung der Zelllysate

Zur Proteinbestimmung verwendeten wir 6-Well Platten mit initial 200.000 ausplattierten Zellen. Zunächst wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums mit 1 ml PBS gewaschen, dieses wurde abgesaugt und anschließend 1 ml PBS erneut hinzugegeben. Zum Ablösen der Zellen wurde anstelle von Trypsin ein Zellschaber verwendet und der Inhalt jedes Well in ein entsprechend beschriftetes 2 ml – Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Proben mit 50 µl RIPA-Puffer versetzt und durch Invertieren vermischt. Anschließend wurden die Proben bei -80° C eingefroren und gelagert.

Nach Einfrieren aller Proben wurden diese zur Bestimmung der Proteinmenge im Eisbad wieder aufgetaut und anschließend mit je 10 Ultraschallstößen sonifiziert, durch Vortexen gut durchmischt und weiter auf Eis gelagert. Je 4 µl der Suspension pro Probe wurden mit 20 µl PBS verdünnt.

Der Proteingehalt wurde anhand eines Proteinstandards (BSA –Standard) ermittelt.

Konzentration in µg / µl	Probe	BSA-Standard in µl	PBS oder RIPA in µl
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 (Blank)	I	0	400

Tabelle 5: Konzentration des BSA-Standards.

Je 10 µl des Standards bzw. der Probe wurden nun in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert und 200 µl Working Reagenz dazu gegeben (50:1 Biocinonsäure und 4 % Kupfersulfat, Biocinonic Assay, Thermo Scientific). Die Platte wurde für 30 Sekunden auf dem Schüttler vermischt. Anschließend wurde die Platte zur Vermeidung von Verdunstung mit Folie abgeklebt und 30 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Der erste Schritt ist nun die Bildung eines Chelatkomplexes von Proteinen mit mindestens drei Aminosäuren und Kupfer im alkalischen pH-Bereich unter Entstehung eines hellblauen Farbstoffes. Diese Reaktion wird als Biuret-Reaktion bezeichnet. Im zweiten Schritt reagieren gebildete Kupfer-Kationen aus Schritt 1 mit Biocinonsäure zu einem roten Chelatkomplex. Der Biocinonsäure–Kupfer-Komplex ist wasserlöslich und zeigt eine zum Proteingehalt streng lineare Absorption bei 562 nm. Diese wurde nach erfolgter Inkubation gemessen. Durch die Proteinbestimmung wurde

sichergestellt, dass im Folgenden jede Probe 10 µg Protein enthielt auf einem Volumen von 16 µl je Probe.

$X \mu\text{l Proteinprobe} + (12 - X \mu\text{l Wasser}) + 4 \mu\text{l Laemmli} = 16 \mu\text{l Volumen}$

Die Proben wurden nach folgendem Schema auf 4 Gelansätze verteilt. Zwei Gele wurden für die Proben mit adipogenen Stammzellen (ASC) benötigt.

	Probennummer		gemessen	*20	10ug	H2O-12µl	Laemmli
Gel 1 ASC	1	V8 D7 7	0,046564	0,93	10,74	1,26	4µl
	2	V8 D7 1	0,0976333	1,95	5,12	6,88	4µl
	3	V8 D7 2	0,0986433	1,97	5,07	6,93	4µl
	4	V8 D7 3	0,0356903	0,71	14,01	0,00	4µl
	5	V8 D14 7	0,0747206	1,49	6,69	5,31	4µl
	6	V8 D14 1	0,203624	4,07	2,46	9,54	4µl
	7	V8 D14 2	0,204301	4,09	2,45	9,55	4µl
	8	V8 D14 3	0,0784195	1,57	6,38	5,62	4µl
	9	V9 D7 7	0,159484	3,19	3,14	8,86	4µl
	10	V9 D7 1	0,328294	6,57	1,52	10,48	4µl
	11	V9 D7 2	0,384418	7,69	1,30	10,70	4µl
	12	V9 D7 3	0,142742	2,85	3,50	8,50	4µl
Gel 2 ASC	13	V9 D14 7	0,47326	4,73	2,11	9,89	4µl
	14	V9 D14 1	0,498451	4,98	2,01	9,99	4µl
	15	V9 D14 2	0,270606	2,71	3,70	8,30	4µl
	16	V9 D14 3	0,531769	5,32	1,88	10,12	4µl
	17	V10 D7 7	0,168002	1,68	5,95	6,05	4µl
	18	V10 D7 1	0,409802	4,10	2,44	9,56	4µl
	19	V10 D7 2	0,40468	4,05	2,47	9,53	4µl
	20	V10 D7 3	0,100136	1,00	9,99	2,01	4µl
	21	V10 D14 7	0,239796	2,40	4,17	7,83	4µl
	22	V10 D14 1	0,20074	2,01	4,98	7,02	4µl
	23	V10 D14 2	0,569247	5,69	1,76	10,24	4µl
	24	V10 D14 3	0,213743	2,14	4,68	7,32	4µl

Tabelle 6: Proteinbestimmung und Zuordnung der ASC Proteinproben zu den Geltaschen.

Zwei weitere Gele wurden für die Proben mit dedifferenzierten Fettzellen (DFAT) benötigt.

	Probennummer		gemessen	*20	10ug	H2O-12µl	Laemmli
Gel 3 DFAT	25	V8 D7 8	0,113087	2,26	4,42	7,58	4µl
	26	V8 D7 4	0,129997	2,60	3,85	8,15	4µl
	27	V8 D7 5	0,125108	2,50	4,00	8,00	4µl
	28	V8 D7 6	0,0890769	1,78	5,61	6,39	4µl
	29	V8 D14 8	0,143496	2,87	3,48	8,52	4µl
	30	V8 D14 4	0,550898	11,02	0,91	11,09	4µl
	31	V8 D14 5	0,526683	10,53	0,95	11,05	4µl
	32	V8 D14 6	0,120775	2,42	4,14	7,86	4µl
	33	V9 D7 8	0,128787	2,58	3,88	8,12	4µl
	34	V9 D7 4	0,325517	6,51	1,54	10,46	4µl
	35	V9 D7 5	0,232359	4,65	2,15	9,85	4µl
	36	V9 D7 6	0,12583	2,52	3,97	8,03	4µl
Gel 4 DFAT	37	V9 D14 8	0,202479	2,02	4,94	7,06	4µl
	38	V9 D14 4	0,150783	1,51	6,63	5,37	4µl
	39	V9 D14 5	0,23909	2,39	4,18	7,82	4µl
	40	V9 D14 6	0,161433	1,61	6,19	5,81	4µl
	41	V10 D7 8	0,642034	6,42	1,56	10,44	4µl
	42	V10 D7 4	0,525575	5,26	1,90	10,10	4µl
	43	V10 D7 5	0,299802	3,00	3,34	8,66	4µl
	44	V10 D7 6	0,15693	1,57	6,37	5,63	4µl
	45	V10 D14 8	0,385634	3,86	2,59	9,41	4µl
	46	V10 D14 4	0,160537	1,61	6,23	5,77	4µl
	47	V10 D14 5	0,132926	1,33	7,52	4,48	4µl
	48	V10 D14 6	0,35079	3,51	2,85	9,15	4µl

Tabelle 7: Proteinbestimmung und Zuordnung der DFAT Proteinproben zu den Geltaschen.

Dabei stehen die Nummerierungen hinter Versuchsnummer (V) und Tag (D) stellvertretend für die verwendeten Zusätze bzw. Kontrollen.

1	ASC	"+ 250U Cat"
2	ASC	"+ 250U Cat + 50µM H2O2"
3	ASC	"+ 50µM H2O2"
4	DFAT	"+ 250U Cat"
5	DFAT	"+ 250U Cat + 50µM H2O2"
6	DFAT	"+ 50µM H2O2"
7	ASC	Kontrolle
8	DFAT	Kontrolle

Tabelle 8: **Legende für Tabellen 6 und 7**

6.2.12 SDS-Page

Zur Untersuchung der Unterschiede der osteogenen Differenzierung von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen wurden Zelllysate von differenzierten Zellen (Tag 7 und 14) auf die Proteine GAPDH (Novus Biologicals GAPDH Antibody 13H12 ,mouse anti-mouse), FoxO1 (Cell Signaling Technology FoxO1 C29H4 Rabbit mAb, mouse anti-rabbit), NOX4 (Santa Cruz Biotechnology Nox4 3H2G11: sc517188, mouse anti-human), mnSOD (StressMarq Biosciences Inc. Anti Mn SOD SPC-118C/D, rabbit anti-human), Osteopontin (Santa Cruz Biotechnology OPN FL-314: sc-20788, rabbit anti-human), ALP (Santa Cruz Biotechnology Alkaline Phosphatase A-10: sc-271431, mouse anti-human) und PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology PPAR γ H-100: sc-7196, rabbit anti-human) analysiert. Hierfür wurden 4 Gele gegossen, welche jeweils aus einem Sammel- und einem Trenngel bestanden. Mit Hilfe des Sammelgels werden die Proben in einer definierten Proteinbande gesammelt. Im Trenngel findet anschließend die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht statt.

Für die Untersuchungen wurden 12 %ige Gele verwendet, welche einen guten Kompromiss für die Größe der untersuchten Proteine darstellen.

2 BioRad-Glasplatten wurden durch einen Spacer auf 1 mm Abstand gestellt, das Trenngel gegossen und sofort mit Ethanol überschichtet. Nach 30 Minuten

Wartezeit wurde das Sammelgel hergestellt, das Ethanol vom Trenngel abgeschüttet und das Sammelgel eingefüllt. Sofort wurde ein 15er Kamm vorsichtig in das noch flüssige Sammelgel eingesteckt, um Geltaschen für die Proteinproben zu erhalten. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm entfernt und die Gele bis zur Verwendung am Folgetag in feuchten Zellstofftüchern im Kühlschrank bei 4° C gelagert.

Die zuvor durchgeführte Proteinbestimmung gewährleistet eine konstante Menge von genau 10 µg Protein pro Geltasche. Um eine problemlose Wanderung der Proteine durch das Gel und eine Auftrennung nach der Masse sicherzustellen, wurden die Proteine zuvor durch Zugabe des Laemmli Puffers und fünfminütiger Hitzedenaturierung bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Das im Laemmli Puffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken der Proteine. Natriumdodecylsulfat (SDS) stellt eine konstant negative Ladungsverteilung, welche linear zum Eigengewicht ist, sicher.

Anschließend wurden die Gele in die Laufapparatur gesteckt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Der verbleibende Kamm wurde vorsichtig entfernt und 2 µl eines Proteinstandards in die erste Geltasche gegeben. Dann wurden die restlichen Taschen des jeweiligen Gels mit Proben befüllt.

Zunächst wurde eine Spannung von 60 V angelegt, um die Proben an der Grenze von Sammel- und Trenngel zu sammeln und anschließend die Spannung auf 160 V erhöht und erst wieder vom Strom getrennt, bis der Marker anfing auszulaufen. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Proben das Gel durchlaufen und sind nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt worden.

6.2.13 Western-Blot-Analyse

Nun folgte die Übertragung der SDS-Page auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wurden die Gele aus der Laufapparatur entnommen, die Gelkammern geöffnet

und das Trenngel vorsichtig von Sammelgel und Glasplatte mit Hilfe eines Spatels getrennt. Das Sammelgel wurde verworfen, das abgelöste Trenngel in zuvor angesetztem Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurden zwei 2,5 mm Blotting-Papiere und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls kurz im Transferpuffer äquilibriert. Zum Transfer verwendeten wir das Trans-Blot Turbo Gerät (Bio-Rad), welches wie folgt - von unten nach oben - aufgebaut ist.

Auf die in der Apparatur unten liegende positiv geladene Anode wurde ein 2,5 mm Blotting Papier gelegt, darüber die Nitrocellulose-Membran, das Gel und ein weiteres 2,5 mm Blotting Papier. Die Apparatur wurde unter leichtem Druck mit der im Deckel befindlichen negativ geladenen Kathode verschlossen.

Die Transferzeit ist abhängig vom Wassergehalt der Gele und betrug bei den verwendeten 12 %igen Gelen 25 Minuten bei 2,5 Ampere und 25 Volt.

6.2.14 Ponceau S – Färbung

Zur Prüfung der erfolgreichen Übertragung von Protein auf die Nitrocellulosemembran, wurde die Ponceau S – Färbung angewendet. Der rote Farbstoff bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine.

Nach 3 – minütiger Inkubation mit Ponceau S – Färbelösung wurden rote Banden auf der Membran als Nachweis einer erfolgreichen Übertragung sichtbar. Die Färbelösung wurde abgenommen, die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit TBS / 0,1 % Tween entfärbt.

6.2.15 Immunmarkierung

Für die folgenden Wasch- und Färbeschritte wurde jede Membran in ein 50 ml Falcon gegeben und für die benötigte Inkubationszeit auf einen Taumelrollenmischer gegeben um die vollständige Benetzung der Membranen mit der jeweiligen Reagenz zu gewährleisten.

Zum Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen wurden die Membranen zunächst über Nacht bei 4° C mit TBS / 0,1% Tween + 5 % BSA inkubiert. Nach Abnehmen der Block-Lösung wurde dreifach mit TBS / 0,1 % Tween gewaschen. Anschließend wurde der Primärantikörper in der laut Hersteller-Data-Sheet empfohlenen Verdünnung in TBS / 0,1 % Tween + 1-5 % BSA hinzugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Es folgten drei fünfminütige Waschgänge mit TBS / 0,1 % Tween.

Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls nach Hersteller-Data-Sheet Angaben verwendet, die Art und Verdünnung war abhängig vom verwendeten Primärantikörper. Der Sekundärantikörper wurde eine Stunde bei Raumtemperatur und Dunkelheit mit TBS / 0,1 % Tween inkubiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper wieder aus den Falcons entfernt und erneut dreifach für je fünf Minuten mit TBS / 0,1 % Tween gewaschen.

6.2.16 Detektion

Zur Detektion wurde eine Geldokumentationsanlage der Firma BioRad verwendet. Vor Auflegen der Membranen auf den Detektor wurden diese mit einer Luminol-haltigen Entwicklerlösung benetzt. Der Proteinstandard und die spezifischen Banden wurden sichtbar. Mit Hilfe des Proteinstandards konnten die entstandenen Banden zugeordnet werden und mit Hilfe des Programms „Image Lab 4.0.1“ ausgewertet und in Daten umgewandelt werden.

6.3 Statistische Auswertung

Zur Auswertung und Berechnung der erhobenen Daten wurden die Programme „Microsoft Excel 2010“ und „GraphPad Prism v5“ verwendet. Es wurde zur Prüfung auf Signifikanz der zweiseitige, gepaarte t-Test / Mann-Whitney U Test verwendet. P-Werte kleiner oder gleich 0,05 wurden mit einem Stern * als signifikant bezeichnet, p-Werte kleiner oder gleich 0,01 mit zwei Sternen ** als signifikant bezeichnet. Der Stichprobenumfang (= Spender und Spenderinnen) betrug $n = 8$.

6.4 Ethikvotum

Es liegt ein Ethikvotum vom 25.11.2015 unter dem Aktenzeichen 3634 zur Etablierung einer nicht-personenbezogenen Sammlung von Körpergeweben und Blutproben zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für wissenschaftliche Zwecke vor.

6.5 Versuchsablauf

Je Versuchsdurchlauf wurden initial 16 24-Well Platten mit 50.000 Zellen / Well bestückt und 5 Tage im Brutschrank inkubiert, bis sich unter dem Lichtmikroskop ein konfluenter Zellrasen aus adhärenenten Zellen zeigte. Vor Zugabe des Differenzierungsmediums wurde ein Cell-Titer Blue Viabilitätstest mit jeder 24-Well Platte zur Bestimmung der Zellzahl pro Well durchgeführt.

Es folgte die Zugabe von den vorbereiteten Katalase- und H₂O₂-Zusätzen und 0,5 ml Differenzierungsmedium je Well nach folgendem Schema für 4 Einzelplatten beider Zellarten. Dabei entsprach jedes Tabellenfeld einer Doppelbestimmung von 2 Wells der 24 - Well Platten.

250U Kat	250U Kat + 100µM H ₂ O ₂	250U Kat + 50µM H ₂ O ₂
125 U Kat	125 U Kat + 100µM H ₂ O ₂	125 U Kat + 50µM H ₂ O ₂
200 µM H ₂ O ₂	100 µM H ₂ O ₂	50 µM H ₂ O ₂
300 µM H ₂ O ₂	400 µM H ₂ O ₂	0

Dies entsprach folgenden Pipettiermengen:

4,3µl Kat	4,3µl Kat + 5,7µl H ₂ O ₂	4,3µl Kat + 2,8µl H ₂ O ₂
2,2µl Kat	2,2µl Kat + 5,7µl H ₂ O ₂	2,2µl Kat + 2,8µl H ₂ O ₂
11,3µl H ₂ O ₂	5,7µl H ₂ O ₂	2,8µl H ₂ O ₂
17µl H ₂ O ₂	22,6µl H ₂ O ₂	0

Das Differenzierungsmedium und die Zusätze wurden an den Tagen 3, 7 und 10 gewechselt. An den Tagen 7 und 14 wurden je Zellart an einer Platte eine Alizarin-Rot-Färbung mit folgender Fotodokumentation und anschließender Alizarin – Rot - Rücklösung durchgeführt. Außerdem wurde mit jeweils einer Platte ein Alkalische Phosphatase Assay vollzogen.

Zur Betrachtung von kleineren Zeitintervallen wurden zudem initial 8 weitere Platten, welche zur Hälfte jeweils ASCs und DFATs enthielten, mit 50.000 Zellen pro Well vorbereitet. Diese wurden nach folgendem Schema mit 0,5 ml

Differenzierungsmedium je Well und folgenden Zusätzen bestückt. Dabei entsprechen jedem Tabellenfeld 3 Wells der 24 – Well Platten.

250U Kat	250U Kat
250U Kat + 100µM H ₂ O ₂	250U Kat + 100µM H ₂ O ₂
100 µM H ₂ O ₂	100 µM H ₂ O ₂
0	0

Dies entsprach folgenden Pipettiermengen:

4,3µl Kat	4,3µl Kat
4,3µl Kat + 5,7µl H₂O₂	4,3µl Kat + 5,7µl H₂O₂
5,7µl H₂O₂	5,7µl H₂O₂
0	0

Das Differenzierungsmedium und die Zusätze wurden ebenfalls an den Tagen 3, 7 und 10 gewechselt. An denselben Tagen wurde vor dem Mediumwechsel jeweils eine Platte mittels Alizarin – Rot-Färbung, Fotodokumentation und Alizarin – Rot – Rücklösung; eine weitere Platte durch einen ein Alkalische Phosphatase Assay ausgewertet. Die letzten Platten wurden analog an Tag 14 ausgewertet.

Nach dem beschriebenen Ablauf wurden 8 Spenderinnen und Spender unterschiedlichen Alters untersucht.

7 Ergebnisse

7.1 Stichprobenumfang

Für die Versuche wurden adipogene Stammzellen und dedifferenzierte Fettzellen jeweils eines Spenders untersucht. Die Spender setzten sich zusammen aus zwei Männern (60 und 61 Jahren) und fünf Frauen (20 bis 48 Jahre) und einem unbekanntem Spender. Der Stichprobenumfang dieser Arbeit betrug also maximal acht Spender.

Tabelle 9: Spendernummer, Datum, Passage, Geschlecht und Alter der verwendeten Spender.

Spender	Datum	Passage	Geschlecht	Alter
1	14.09.2016	P4	weiblich	35
2	02.12.2016	P2	unbekannt	unbekannt
3	15.11.2016	P2	männlich	60
4	08.11.2016	P4	weiblich	unbekannt
5	08.12.2016	P3	weiblich	48
6	10.01.2017	P3	weiblich	33
7	15.02.2017	P3	männlich	61
8	21.02.2017	P3	weiblich	20

7.2 Durchflusszytometrie

Die Oberflächenproteine von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen wurden von jeweils 6 bzw. 3 verschiedenen Spendern mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Dabei wurden folgende Marker getestet: CD 44, HLA-DR, CD 90, CD 29, CD 14, CD 13, CD 19, CD 105, CD 73, CD 146, CD 31, ALK6, ALK 3, TGF- β 1, TGF- β 2, PPAR γ und CD 34. Ziel war es, Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Zellpopulationen zu erfassen und die dedifferenzierten Fettzellen besonders auf mesenchymale Stammzellmarker wie CD 44+, CD 90+, CD 105+, CD 34- und CD 45- zu überprüfen [16].

Abbildung 3 zeigt, dass beide verglichene Zellarten zu einem hohen Prozentsatz CD 44, CD 90, CD 13, CD 105 und PPAR γ exprimierten. Die Prozentzahlen unterschieden sich bei CD 44 und CD 90 kaum, während CD 105 ($90.562 \% \pm 11,399$) und CD 13 ($89.277 \% \pm 10,467$) bei den DFATs vermehrt exprimiert wurden. Ausgeprägter war der Unterschied bei CD 73. Während nur $18,413\% \pm 9,485$ der ASCs positiv auf CD 73 waren, war das Protein bei $41,818 \% \pm 27,715$ der DFATs vorhanden. Ebenso exprimierten ASCs etwas mehr PPAR γ ($68,053 \% \pm 15,22$) als DFATs ($64,343 \% \pm 21,705$). Außerdem zeigten sich größere Unterschiede in Bezug auf die Oberflächenproteine CD 29 und CD 34. Während CD 29 bei $21,302 \% \pm 24,3$ der DFATs positiv getestet wurde, waren nur $10,563 \% \pm 4,188$ der ASCs Träger. Bei CD 34 war das Verhältnis entgegengesetzt. Während $11,037 \% \pm 6,562$ der ASCs dieses Oberflächenprotein zeigten, lag der Anteil der DFATs bei einem Drittel ($3,490 \% \pm 2,064$). Die restlichen analysierten Oberflächenproteine wurden, wie aus der Abbildung 3 zu entnehmen ist, kaum exprimiert. Lediglich ALK 6 und TGF- β RI stachen leicht hervor. Dabei wurde ALK 6 mit $5,88\% \pm 2,22$ und TGF- β RI mit $6,14\% \pm 1,42$ bei den ASCs etwas mehr exprimiert als bei den DFATs (ALK 6 $4,373 \% \pm 2,307$ und TGF- β RI $5,271 \% \pm 3,519$).

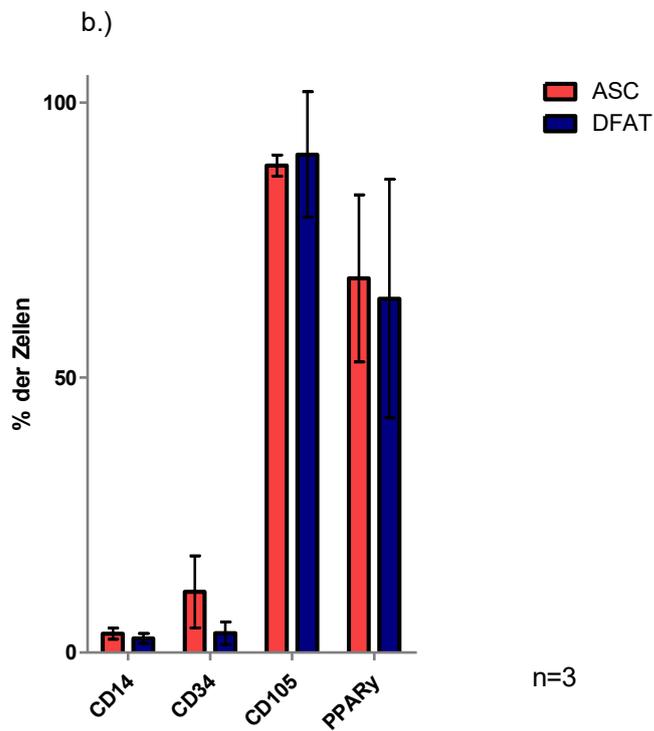
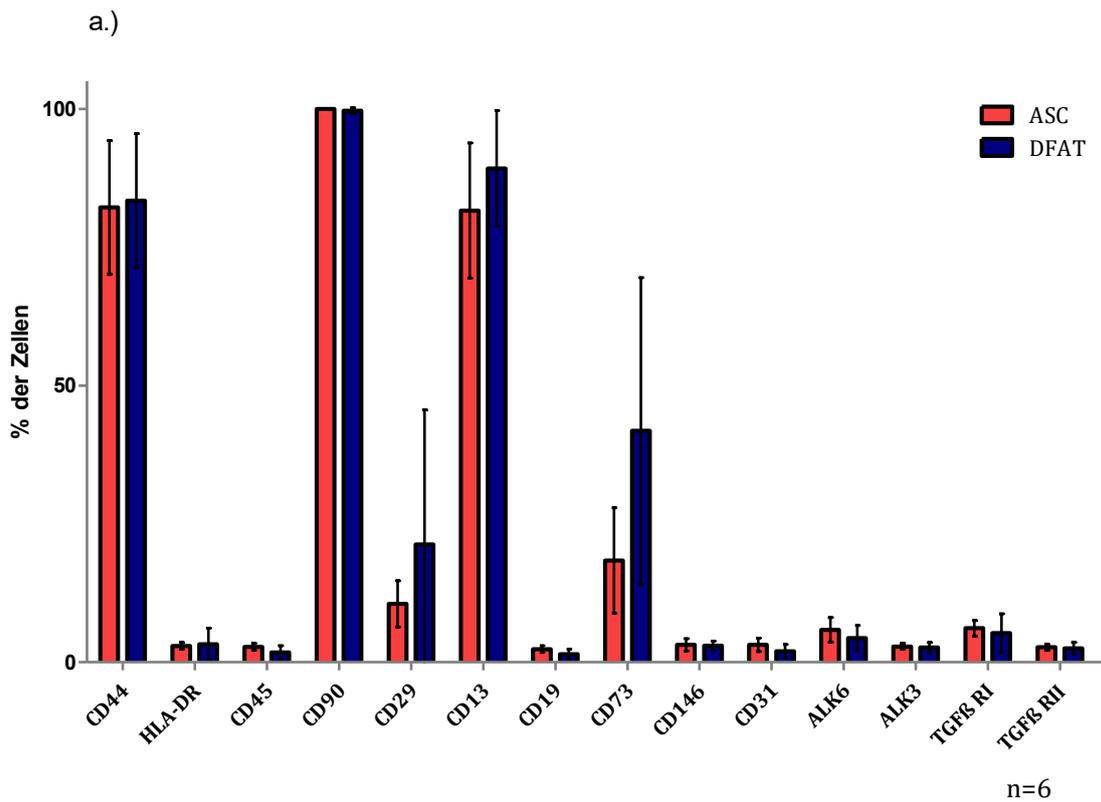


Abbildung 3: FACS-Analyse von Oberflächenproteinen bei ASCs und DFATs der gleichen Spender. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und deren Standardabweichung. a.) Analyse von CD44, HLA-DR, CD45, CD90, CD29, CD13, CD 73, CD 146, CD 31, ALK6, ALK3, TGF-β RI und TGF-β RII bei 6 Spendern. b.) Analyse von CD14, CD34, CD105 und PPARγ bei 3 Spendern.

7.3 Alizarin – Rot-Färbung und Alizarin – Rot – Rücklösung

Es wurden 8 Versuchsdurchläufe durchgeführt nach dem im Kapitel 6.5 beschriebenen Ablauf. Nach Ausplattieren und Kultivieren der Zellen wurde initial mit jeder Platte ein CellTiter-Blue Viabilitätstest durchgeführt (vgl. Kapitel 6.2.5.). Die Ergebnisse dieses Assays dienten als Grundlage für eine normierte Auswertung. Durch die Alizarin – Rot – Färbung und anschließende Alizarin – Rot – Rücklösung konnte das osteogene Differenzierungspotenzial von ASCs und DFATs auf den Einzelplatten nach sieben und nach 14 Tagen verglichen werden.

In Abbildung 4 wurden zunächst beide Zellarten für sich im Zeitverlauf nach sieben und 14 Tagen verglichen. Die relativen Alizarin – Rot- Extinktionen sind jeweils auf die ASC bzw. DFAT Kontrolle normiert worden.

In Abbildung 4a wurden die Alizarin – Rot – Extinktionen für ASCs zu beiden Zeitpunkten als Maß für die osteogene Differenzierung verglichen. Unter Zugabe von Katalase kam es zu einer Zunahme der Differenzierung an beiden gemessenen Zeitpunkten. An Tag 7 lag die relative Zunahme der osteogenen Differenzierung bei den Ansätzen mit 250 U Katalase im Bereich von 60,8 bis 68 Prozent. Bei den Ansätzen mit halbiertes Katalase Menge, also 125 U, zeigten sich größere, aber ähnliche Unterschiede. Die Zunahme der Differenzierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lag hier zwischen 45 und 70,9 Prozent. Betrachtet man den Effekt nach 14 Tagen zeigte sich ebenfalls bei allen Katalase enthaltenden Ansätzen eine weitere Steigerung der osteogenen Differenzierung. Je nach Spender streuten die Ergebnisse stärker, insgesamt kam es aber zu einer Zunahme der Differenzierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zwischen 121,5 bis 153,4 Prozent bei 250 U Katalase + H₂O₂-Zusätzen und 101,8 bis 151,9 Prozent bei 125 U Katalase + H₂O₂-Zusätzen.

Die Zugabe von H₂O₂ dagegen wirkte sich insgesamt negativ auf das Differenzierungsverhalten der ASCs aus. Bereits an Tag 7 fiel der Grad der Differenzierung mit steigenden H₂O₂-Konzentrationen deutlich ab. Bereits geringe

H₂O₂ Mengen von 50 µM bewirkten einen Abfall auf 69 Prozent des Ausgangswertes. Zu einem deutlichen Abfall kam es bei höheren Konzentrationen. Bei Zugabe von 200 bis 400 µM H₂O₂ betrug der Grad der Differenzierung nur noch 37,5 bis 17,8 Prozent. Mit zunehmender Dauer manifestierte sich die toxische Wirkung von höheren H₂O₂-Konzentrationen weiter. Während an Tag 14 bei Zugabe von 50 µM H₂O₂ der Grad der Differenzierung noch 68,6 Prozent des Ausgangswert betrug, ließen sich bei H₂O₂-Konzentrationen von über 200 µM keine vitalen differenzierten ASCs mehr nachweisen.

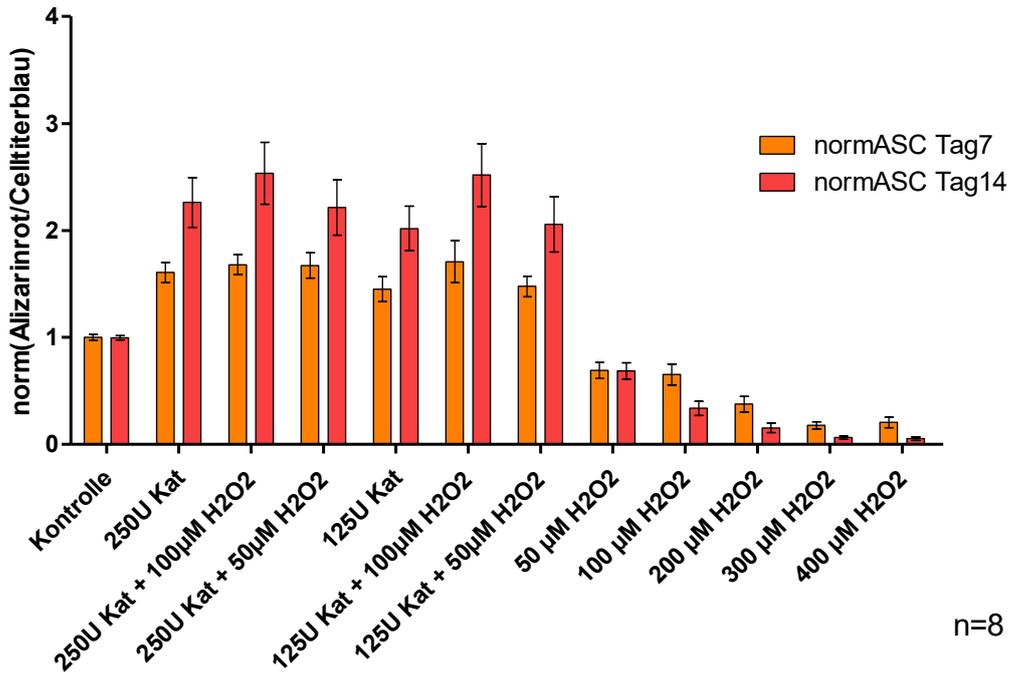
Abbildung 4b vergleicht den soeben für ASCs beschriebenen Zusammenhang für DFATs in Bezug auf ihre jeweilige DFAT Kontrolle ohne Zusätze. Nach 7 Tagen fiel die Zunahme der Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle vorerst deutlich geringer aus. Die Differenzierung bei Zusätzen mit 250 U Katalase + H₂O₂ stieg um 22,2 bis 27 Prozent, mit 125 U Katalase um nur 10,6 bis 25,8 Prozent. Die Ansätze 250 U Katalase + 50 µM H₂O₂ bzw. 125 U Katalase + 50µM H₂O₂ zeigten mit 22,2 bzw. 10,6 Prozent den geringsten Anstieg.

Betrachtet man nun den Effekt nach 14 Tagen zeigte sich ein deutlicher Anstieg bei den Katalase + H₂O₂ Ansätzen. Der Zusatz von 250 U Katalase + H₂O₂ bewirkte eine Zunahme der osteogenen Differenzierung von 150,7 bis 169,7 Prozent. Bei halbiertes Katalase-Menge + H₂O₂ lag der Anstieg im Bereich zwischen 167,4 und 187 Prozent.

Auch bei dedifferenzierten Fettzellen bewirkte die alleinige Zugabe von H₂O₂ eine Abnahme der Differenzierung bzw. den Untergang von Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Analog zu den ASCs war dieser Effekt an Tag 7 geringer ausgeprägt als an Tag 14. Mit steigender H₂O₂-Konzentration kam es zu einer Abnahme der osteogenen Differenzierung. Die Zugabe von 50 µM H₂O₂ bewirkte einen Abfall auf durchschnittlich 72,2 Prozent nach 7 Tagen und erholte sich bis Tag 14 auf 88,2 Prozent des Ausgangswertes der Kontrolle. Bei Zugabe von 100 µM bzw. 200 µM H₂O₂ hielt sich ebenfalls eine zwar geringere, aber konstante

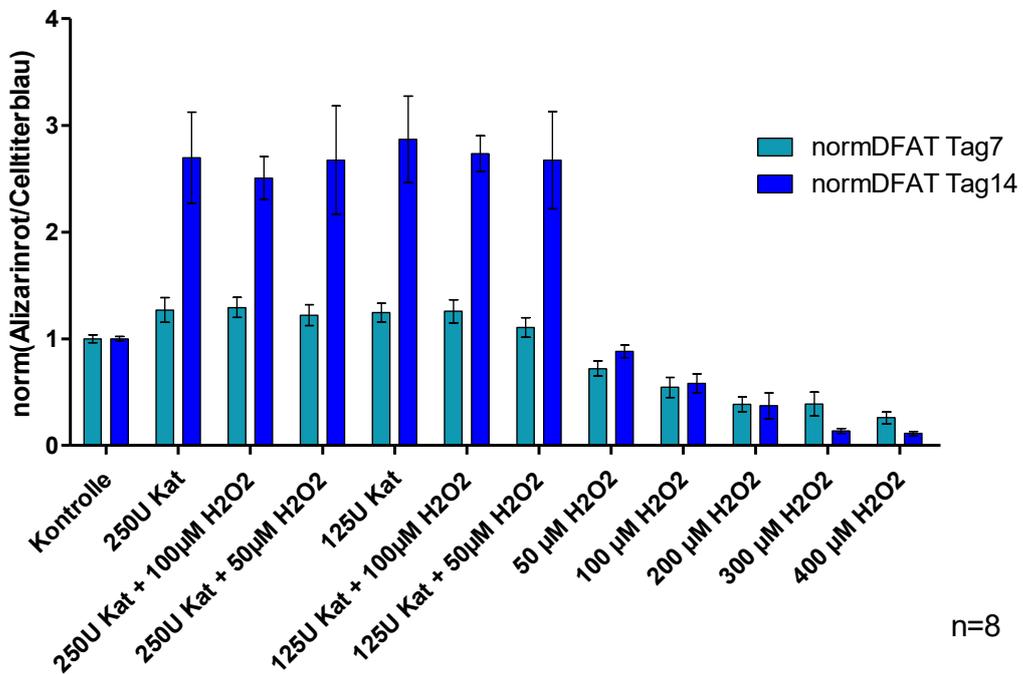
Population. Bei 100 μM H_2O_2 kam es zu einem Abfall nach 7 Tagen auf durchschnittlich 54,5 Prozent bzw. auf 58,3 Prozent nach 14 Tagen; bei 200 μM H_2O_2 nach 7 Tagen auf 38,6 Prozent bzw. auf 37,3 Prozent nach 14 Tagen. Bei noch höheren H_2O_2 -Konzentrationen überwog der toxische Effekt, sodass nach 14 Tagen nur noch durchschnittlich 13,6 bzw. 11,3 Prozent bei 300 μM H_2O_2 bzw. 400 μM H_2O_2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe verblieben.

a.)



n=8

b.)



n=8

Abbildung 4: Vergleich der Alizarin-Rot-Extinktionswerte von 8 Spendern normiert auf die jeweilige Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler der Mittelwerte. a.) Vergleich der Alizarin-Rot-Extinktionswerte von 8 ASC Spendern unter verschiedenen Katalase und H₂O₂ Zusätzen normiert auf die ASC Kontrolle an Tag 7 und Tag 14. b.) Vergleich von 8 DFAT Spendern unter selben Zusätzen normiert auf die DFAT Kontrolle an Tag 7 und 14.

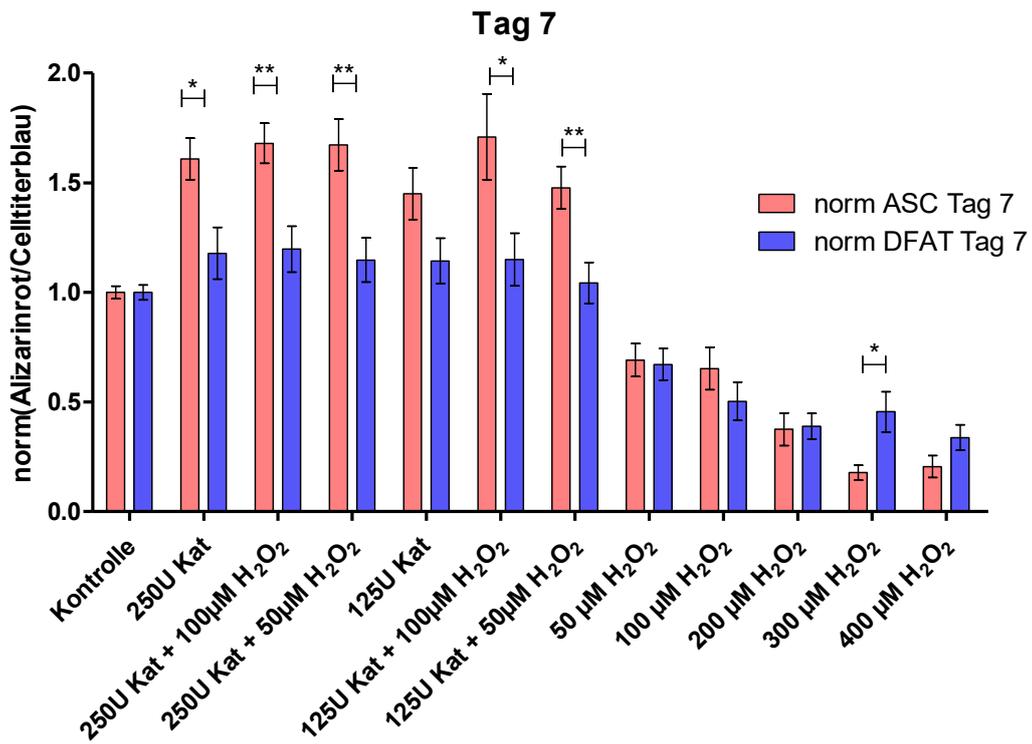
In Abbildung 5 wurden ASCs und DFATs direkt miteinander verglichen. Abbildungsteil a.) zeigt die Zu- bzw. Abnahme der Alizarin-Rot-Extinktion und somit der osteogenen Differenzierung unter verschiedenen Katalase und H₂O₂ Zusätzen an Tag 7, Abbildungsteil b.) an Tag 14.

Die Zugabe von Katalase zum Differenzierungsmedium bewirkte an Tag 7 in fast allen Ansätzen eine signifikante Steigerung der Alizarin-Rot-Extinktion bei ASCs im Vergleich zu DFATs. Lediglich die Ansätze mit jeweils 125 U Katalase zeigten keinen signifikanten Unterschied, es zeichnete sich – wie bereits in Abbildung 4 berichtet – jedoch eine Zunahme der Alizarin-Rot-Färbung gegenüber der Kontrolle ohne Zusätze ab. Bei den Ansätzen mit 250 U Katalase + 100 µM H₂O₂, 250 U Katalase + 50 µM H₂O₂ und 125 U Katalase + 50 µM H₂O₂ differenzierten die ASCs signifikant besser mit einem p-Wert < 0,01. Die Ansätze mit 250 U Katalase und 125 U Katalase + 100 µM H₂O₂ zeigten ebenfalls eine signifikant bessere osteogene Differenzierung der ASCs bei einem p-Wert < 0,05. Dagegen konnte bei den Ansätzen mit alleiniger Zugabe von H₂O₂ zum Differenzierungsmedium nur bei Zugabe von 300 µM H₂O₂ ein signifikanter Unterschied zugunsten der DFATs gezeigt werden. Die restlichen Ansätze mit unterschiedlicher H₂O₂-Konzentration zeigten zwar eine Abnahme der Alizarin-Rot-Extinktion und somit der osteogenen Differenzierung an, es bestand jedoch kein weiterer signifikanter Unterschied zwischen beiden Zellarten.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zu Tag 14 fanden sich in den Katalase enthaltenden Ansätzen keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen ASCs und DFATs. Allerdings kam es, wie schon in Abbildung 4 gezeigt, zu einer Verdopplung bis Verdreifachung der Alizarin-Rot-Extinktionswerte bei beiden Zellarten.

Die Zugabe von höheren Konzentrationen von H₂O₂ zeigte jedoch, dass DFATs diese signifikant besser kompensieren können und der Grad der osteogenen Differenzierung weniger stark abnimmt. Signifikante Unterschiede konnten in den Ansätzen mit 100 µM H₂O₂, 300 µM H₂O₂ und 400 µM H₂O₂ beobachtet werden.

a.)



a.)

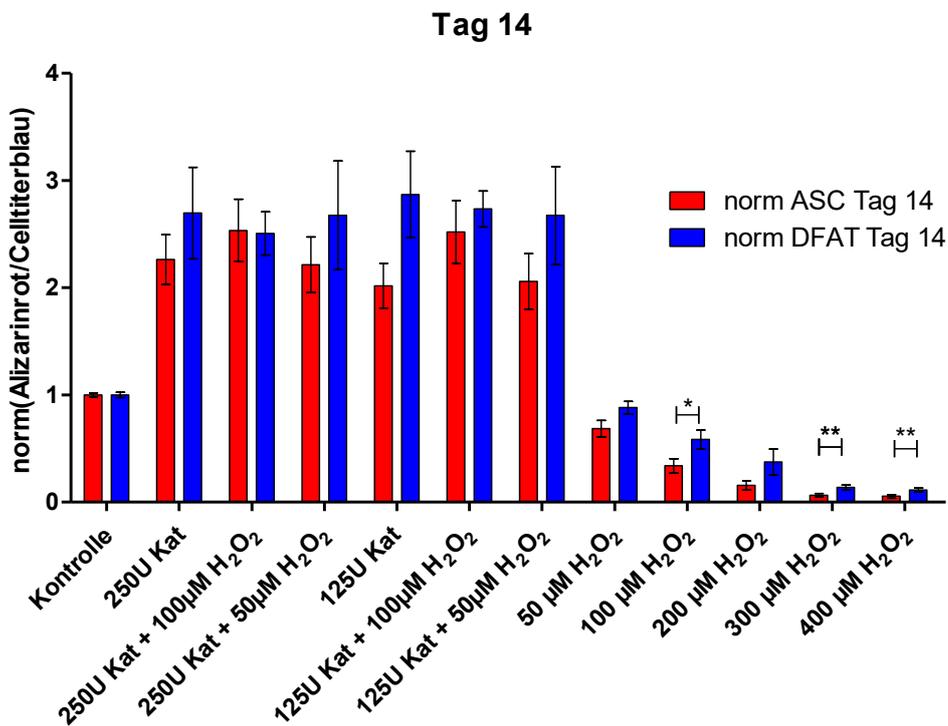


Abbildung 5: Vergleich der Alizarin-Rot-Extinktionswerte von 8 Spendern normiert auf die jeweilige Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. a.) Vergleich der Alizarin-Rot-Extinktionswerte von ASCs und DFATs von 8 Spendern unter verschiedenen Katalase und H₂O₂ Zusätzen normiert auf jeweilige Kontrolle an Tag 7 b.) Vergleich von ASCs und DFATs von 8 Spendern unter verschiedenen Katalase und H₂O₂ Zusätzen normiert auf die jeweilige Kontrolle an Tag 14. * = p ≤ 0,05 ; ** = p ≤ 0,01.

Zum direkten Vergleich und um detailliertere Aussagen zum Zeitverlauf treffen zu können, wurden ASC und DFAT desselben Spenders gemeinsam auf 24-Well Platten kultiviert und an den Tagen 3, 7, 10 und 14 ausgewertet. Zum genauen Ablauf vergleiche Kapitel 6.5.

In Abbildung 6a zeigte sich eine deutliche Zunahme der osteogenen Differenzierung der ASCs. Bis zu Tag 7 ließ sich kaum eine Differenzierung nachweisen. Alle Ansätze bewegten sich im Bereich zwischen 1,01 und 3,12. Bereits hier zeigte sich, dass die alleinige Zugabe von H_2O_2 einen toxischen bzw. hemmenden Einfluss auf die Differenzierung hat, da hier im Vergleich zur Kontrolle keine Zunahme der Alizarin-Rot-Extinktion zu verzeichnen war. Dagegen besonders förderlich für die Differenzierung schien die Zugabe von 250 U Katalase und 250 U Katalase + 100 μM H_2O_2 zu sein. Bis Tag 10 wurden Werte um 14,48 (\pm 17,26) bzw. 14,35 (\pm 17,06) erreicht, bis Tag 14 fand nochmals eine Verdopplung statt mit Werten von 31,86 bzw. 33,02. Eine Zunahme der osteogenen Differenzierung war ebenfalls in der Kontrollgruppe ohne Zusätze zu beobachten. Dort lag die Alizarin-Rot-Extinktion im Mittel an Tag 10 bei 8,55 (\pm 11,51) und an Tag 14 bei 18,14 (\pm 11,65). Weit darunter bestätigte sich der hemmende Einfluss von H_2O_2 mit einer Extinktion von nur 2,29 (\pm 1,82) im Mittel nach 14 Tagen.

Abbildung 6b zeigt die Alizarin-Rot-Extinktion der DFATs derselben Spender normiert auf die ASC Kontrolle zur besseren Vergleichbarkeit. Auch hier kam es bis zu Tag 7 nur zu geringer osteogener Differenzierung. Lediglich der Ansatz mit H_2O_2 lag etwas hinter den anderen Dreien zurück mit einer Extinktion von 0,98 (\pm 0,28) an Tag 7. Die Kontrolle lag an Tag 7 bei 2,11 (\pm 1,414), die Ansätze mit 250 U Katalase und 250 U Katalase + 100 μM H_2O_2 bei 2,92 (\pm 2,05) bzw. 2,79 (\pm 1,71). Bis zu Tag 10 hatte sich die Kontrolle nahezu verfünffacht (10,11 \pm 12,13), bis Tag 14 wurde ein Wert von 15,54 (\pm 13,01) erreicht. Auch die DFAT-Gruppe mit den Zusätzen 250 U Katalase bzw. 250 U Katalase + 100 μM H_2O_2 verzeichnete eine deutliche Zunahme. Bis zu Tag 10 stieg die Extinktion auf 15,41 (\pm 17,53) bzw. 16,98 (\pm 21,0) und an Tag 14 auf 33,9 (\pm 21,14) bzw. 33,98 (\pm 21,10).

Bei der alleinigen Zugabe von H_2O_2 überwog auch bei den DFAT der toxische Effekt deutlich. Die Extinktionswerte stiegen nur leicht von 1,02 ($\pm 0,28$) an Tag 7 über 1,62 ($\pm 0,99$) an Tag 10 auf ein Maximum von im Mittel 3,77 ($\pm 3,71$) an Tag 14, sie lagen damit aber höher als die der ASCs mit alleiniger Zugabe von H_2O_2 .

Insgesamt zeigten die DFATs also tendenziell eine geringfügig bessere osteogene Differenzierung, wobei der Hauptunterschied durch Zugabe von 100 μM H_2O_2 zu beobachten war. DFATs schienen also unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies noch osteogen zu differenzieren, während bei ASCs der toxische Effekt bereits überwog.

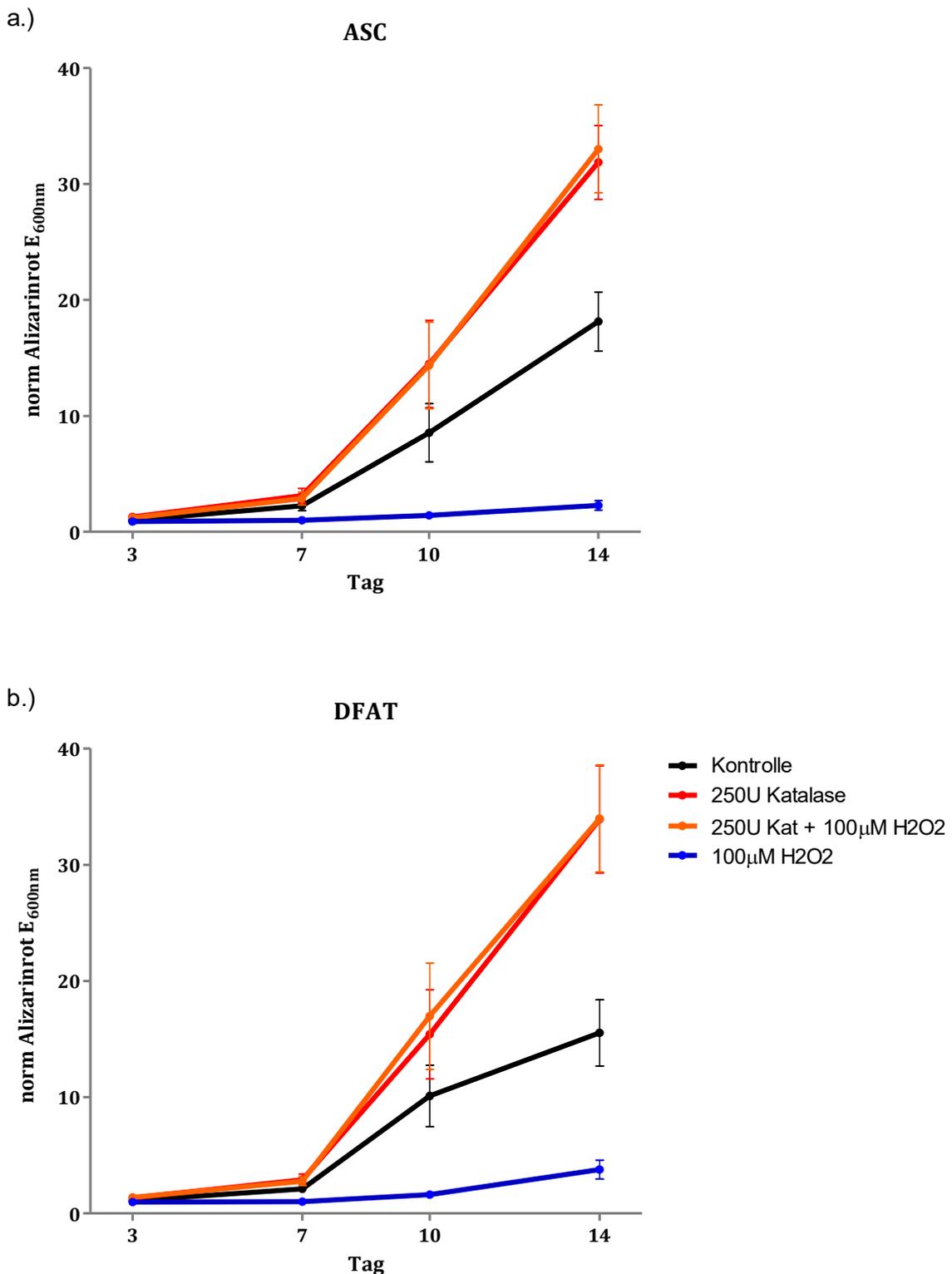


Abbildung 6: Vergleich der Alizarin-Rot-Extinktionswerte von 8 Spendern normiert auf die ASC Kontrolle der 24 Well-Platten mit Doppelbestückung. Dargestellt sind Mittelwert und deren Standardfehler. a.) Vergleich der Alizarin-Rot-Extinktionswerte von 8 ASC Spendern unter Zusatz von 250 U Katalase, 250 U Katalase + 100 µM H₂O₂, 100 µM H₂O₂ normiert auf die ASC Kontrolle an den Tagen 3, 7, 10 und 14. b.) Vergleich der Alizarin-Rot-Extinktionswerte von 8 DFAT Spendern normiert auf die ASC Kontrolle mit o.g. Zusätzen und an o.g. Zeitpunkten.

7.4 Alkalische Phosphatase Assay

Neben der Alizarin-Rot-Färbung und Rücklösung wurde ebenfalls ein Alkalischer Phosphatase Assay sowohl mit adipogenen Stammzellen als auch mit dedifferenzierten Fettzellen durchgeführt. Die Zeitpunkte und Wellanordnungen entsprachen dabei denen der Alizarin-Rot-Versuchsreihe und sind in Kapitel 6.5 beschrieben. Für die Methodik des Alkalischen Phosphatase Assays sei auf Kapitel 6.2.10 verwiesen.

In Abbildung 7 ist die Alkalische Phosphatase Aktivität von ASC und DFAT normiert auf die ASC Kontrolle des jeweiligen Tages dargestellt. Wie in Teil a.) der Abbildung zu sehen ist, änderte sich die Alkalische Phosphatase Aktivität bei den ASCs über den Betrachtungszeitraum nur in geringem Ausmaß. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die Proben mit 250 U Katalase eine leicht erhöhte Aktivität. An Tag 3 lag sie $14,9 \% \pm 3,03$ über der Kontrolle, stieg dann bis zu ihrem Höhepunkt an Tag 10 um $19,4 \% \pm 2,62$ und fiel bis Tag 14 auf $16,8 \% \pm 3$ über der Kontrolle. Der Ansatz mit 250 U Katalase und $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ verhielt sich nahezu analog zur Kontrolle und entwickelte erst an Tag 10 eine Dynamik und erreichte mit einer Aktivitätszunahme von $21,1 \% \pm 1,58$ an Tag 10 bzw. $16,8 \% \pm 3,22$ an Tag 14 Werte ähnlich des Ansatzes, welcher ausschließlich Katalase enthielt.

Lediglich die ASC Proben mit $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ wiesen eine geringere Alkalische Phosphatase Aktivität auf. Sie lag initial $20 \% \pm 2,46$ unterhalb der der Kontrolle, sank bis zum Tiefpunkt an Tag 10 weiter ab auf $26 \% \pm 2,68$ weniger als die Kontrolle und stieg zu Tag 14 wieder auf ein Niveau von $11,4 \% \pm 1,87$ geringer als die Kontrolle.

Abbildungsteil b.) zeigt die Alkalische Phosphatase Aktivität der DFATs im Vergleich zur ASC Kontrolle. Die unbehandelte DFAT Kontrolle zeigte dabei zu Beginn eine $4,7 \% \pm 11,3$ geringere Aktivität als die ASC Kontrolle, nahm aber bis zu Tag 14 stetig zu und lag dann $9,6 \% \pm 7,3$ über der ASC Kontrolle.

Der Ansatz mit 250 U Katalase zeigte an Tag 3 zunächst einen Aktivitätsanstieg um $16\% \pm 6,6$, fiel dann bis Tag 7 um $13,8\%$ ab. An Tag 10 nahm die Aktivität mit einem Anstieg von $7,5\% \pm 7,7$ wieder zu und erreichte mit $60\% \pm 13,4$ Zunahme gegenüber der ASC Kontrolle ihr Maximum an Tag 14.

Ebenfalls ließ sich eine Zunahme der Alkalischen Phosphatase Aktivität bei den Proben mit 250 U Katalase und $100\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{O}_2$ beobachten. An Tag 3 lag die Aktivität auf dem Niveau der Kontrolle, stieg dann aber deutlich an um $21\% \pm 8,8$ an Tag 7, erlitt einen Abfall auf $115\% \pm 10,0$ an Tag 10 und erreichte mit $133,1\% \pm 8,7$ an Tag 14 ihren Höhepunkt.

Schlechter fiel die Aktivität der Ansätze mit nur $100\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{O}_2$ aus. Hier lag die Aktivität zu Beginn an Tag 3 bei $74,1\% \pm 10,1$ von der Kontrolle. Nach einem kleinen Anstieg auf $78,1\% \pm 7,8$ an Tag 7, fiel sie ab auf den Tiefpunkt mit $57,8\% \pm 4,9$ an Tag 10 und erreichte mit $84,8\% \pm 3,6$ an Tag 14 zwar ihr Maximum, welches aber dennoch unter dem der ASC lag.

Die Ergebnisse des Alkalischen Phosphatase Assays beruhten auf einem geringeren Stichprobenumfang aufgrund einer Umstellung von einer fehlerhaften ursprünglichen Arbeitsanweisung des Labors. Daher betrug der Stichprobenumfang in diesem Versuchsteil nur $n=3$ anstelle von $n=8$. Da jedoch bei jedem Ansatz eine Dreifachbestimmung erfolgte, war eine statistische Aufarbeitung und Auswertung der Daten dennoch möglich.

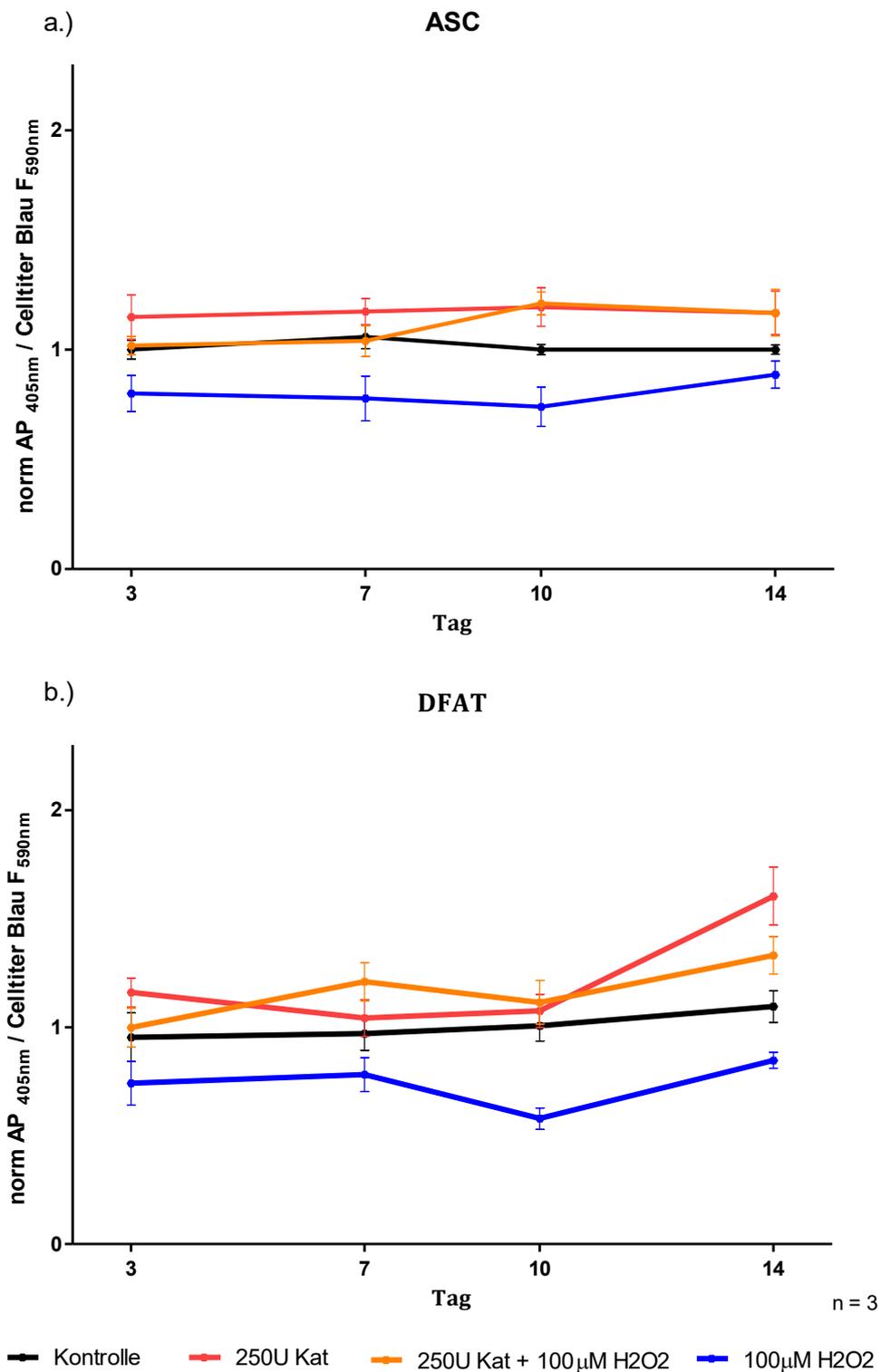


Abbildung 7: Vergleich der Alkalischen Phosphatase Expression normiert auf die ASC Kontrolle.
 Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. a.) Vergleich der Alkalischen Phosphatase Expression von drei ASC Spendern unter Zugabe von Katalase und H₂O₂ normiert auf die ASC Kontrolle an den Tagen 3, 7, 10 und 14. b.) Vergleich der Alkalischen Phosphatase Expression von drei DFAT Spendern unter o.g. Zusätzen an o.g. Zeitpunkten normiert auf die ASC Kontrolle.

7.5 Mikroskopie der Alizarin – Rot – Färbung

Im Folgenden sind exemplarisch mikroskopische Aufnahmen der Alizarin – Rot – Färbung von ASC und DFAT im Zeitverlauf der osteogenen Differenzierung unter den verschiedenen Zusätzen abgebildet. Die Abbildungen zeigen einen Durchschnittswert der Eindrücke von acht untersuchten Spendern.

7.5.1 ASC

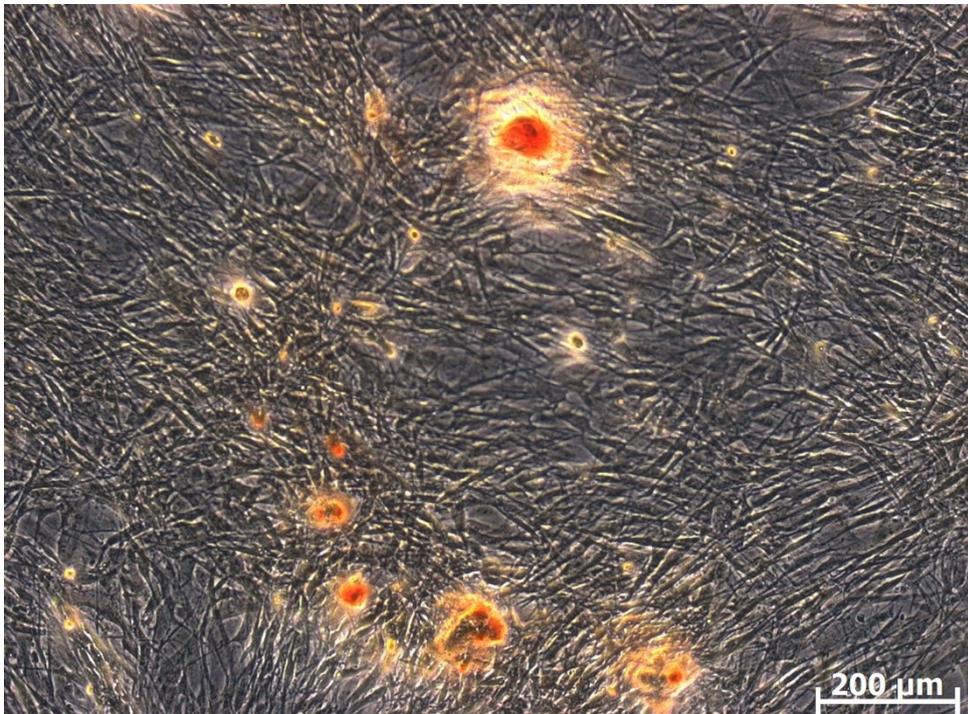


Abbildung 8: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 250 U Katalase, Tag 7, 10-fache Vergrößerung

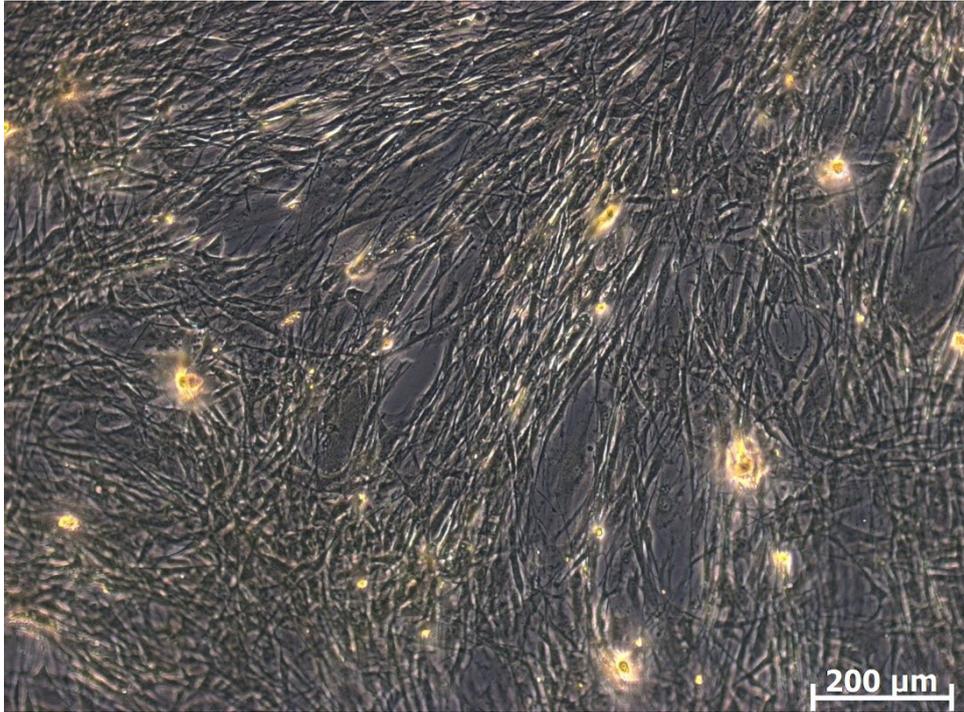


Abbildung 9: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 250 U Katalase + 100 μM H₂O₂, Tag 7, 10-fache Vergrößerung

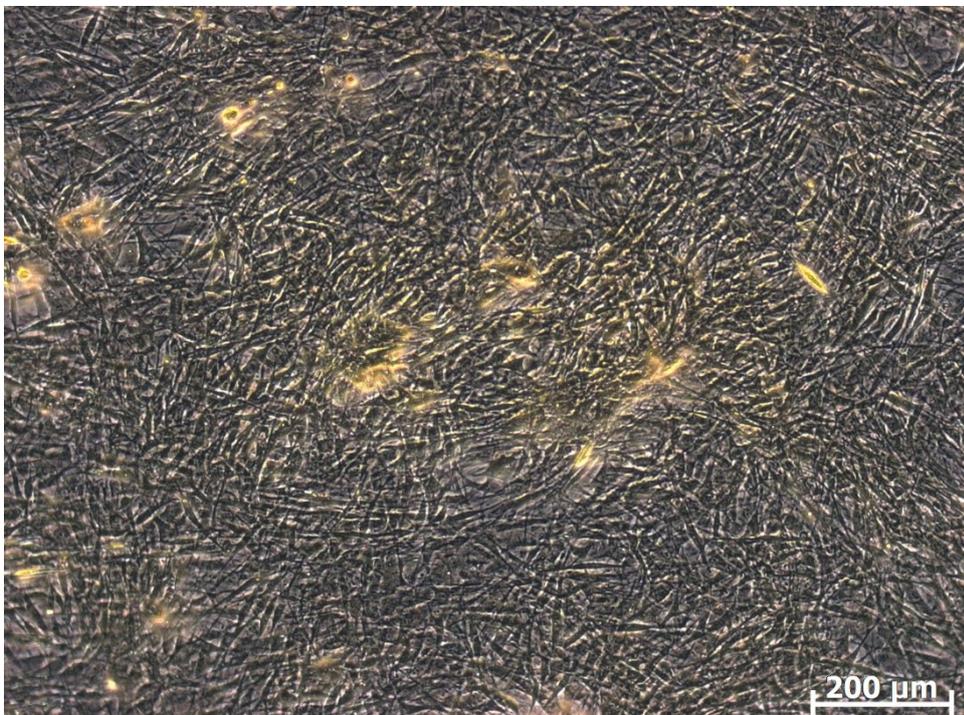


Abbildung 10: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 250 U Katalase + 50 μM H₂O₂, Tag 7, 10-fache Vergrößerung

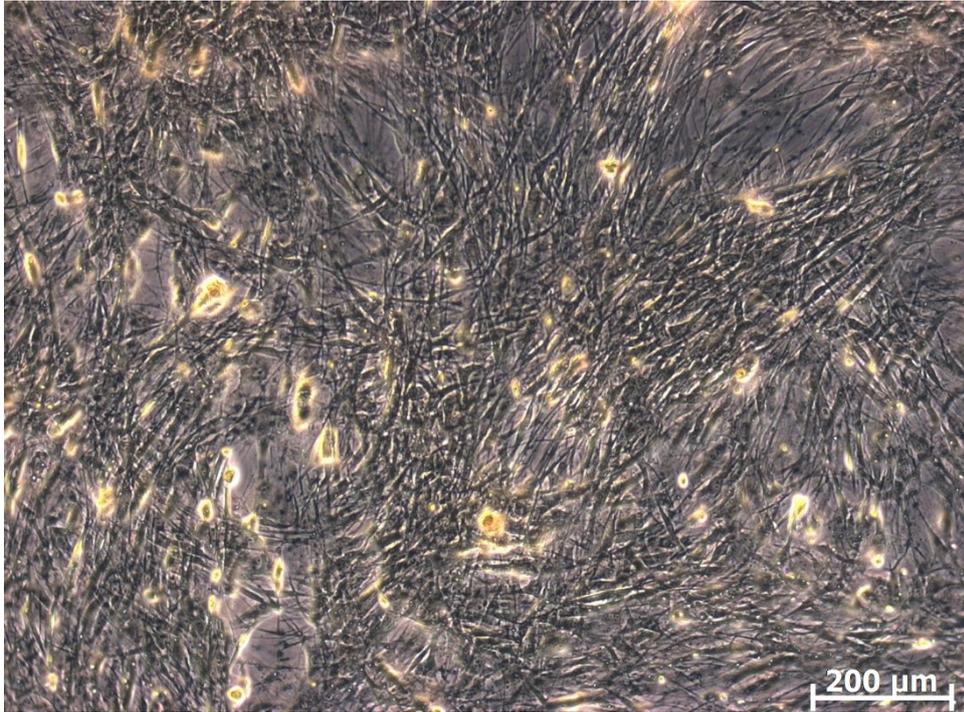


Abbildung 11: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 125 U Katalase, Tag 7, 10-fache Vergrößerung

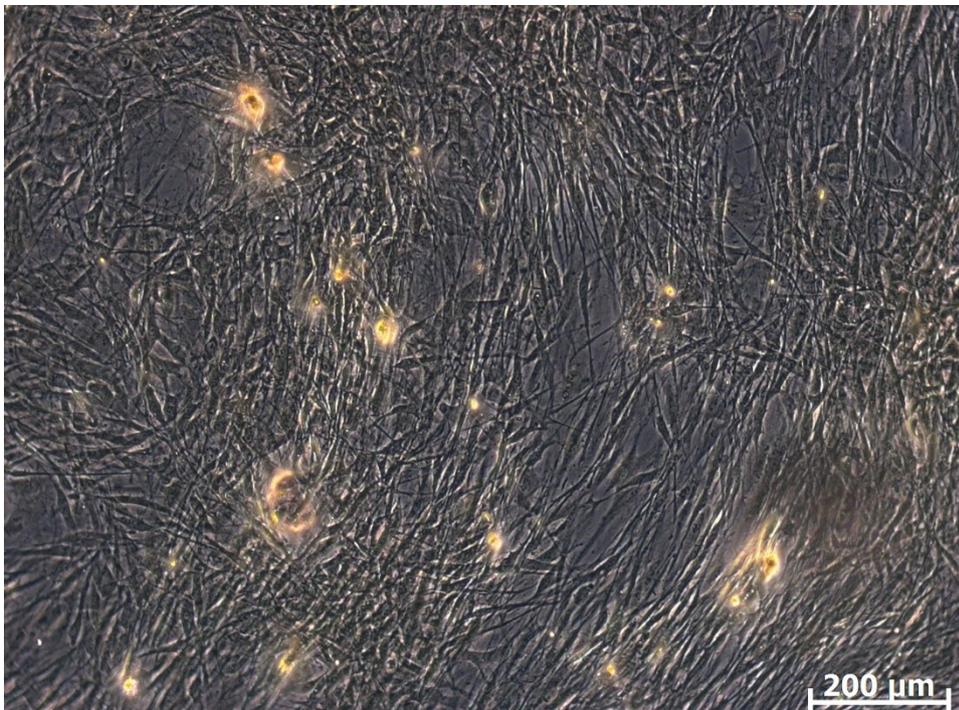


Abbildung 12: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 125 U Katalase + 100 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung

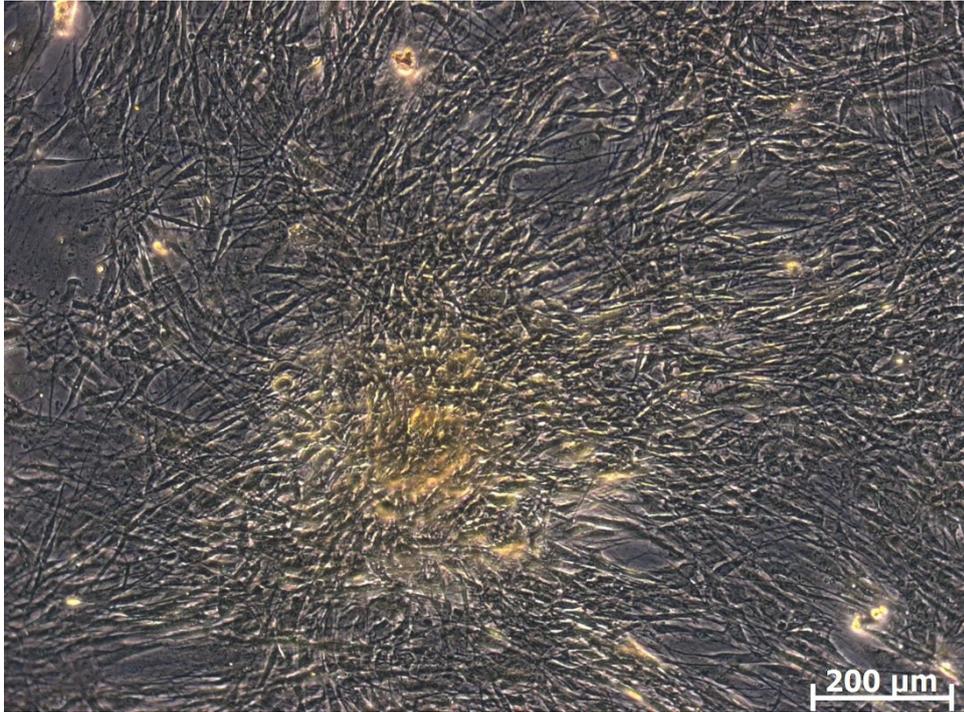


Abbildung 13: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 125 U Katalase + 50 μM H₂O₂, Tag 7, 10-fache Vergrößerung

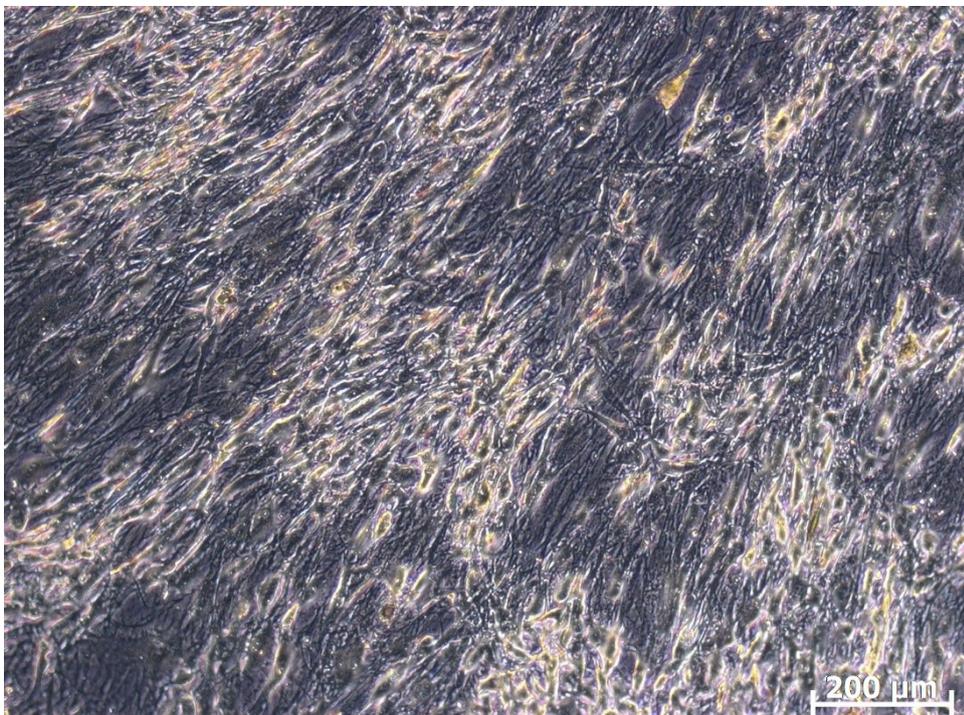


Abbildung 14: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 50 μM H₂O₂, Tag 7, 10-fache Vergrößerung

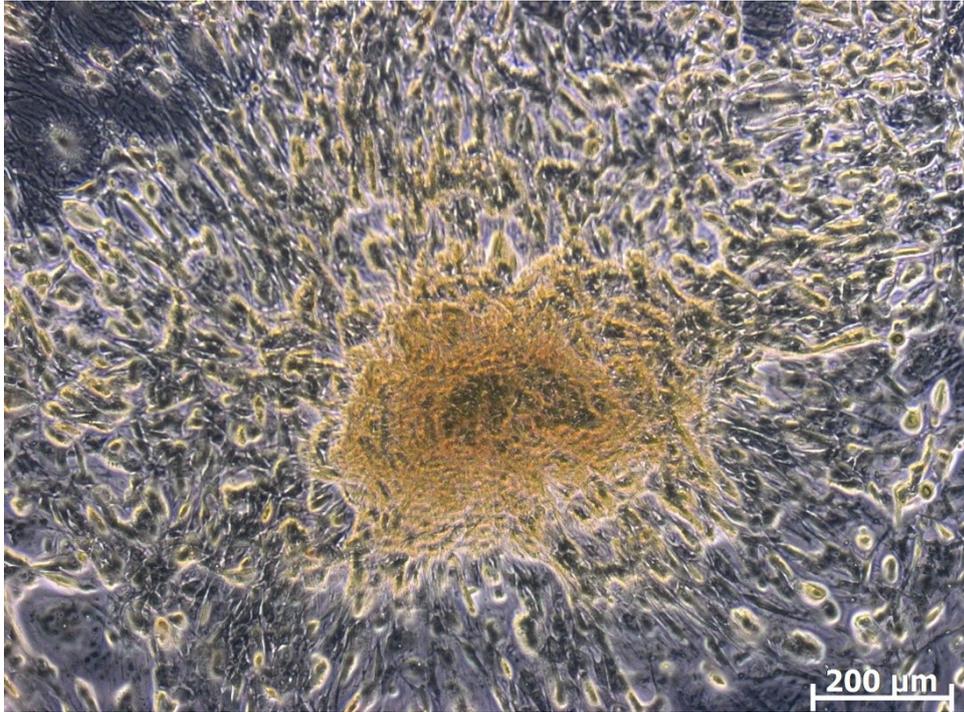


Abbildung 15: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 100 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung

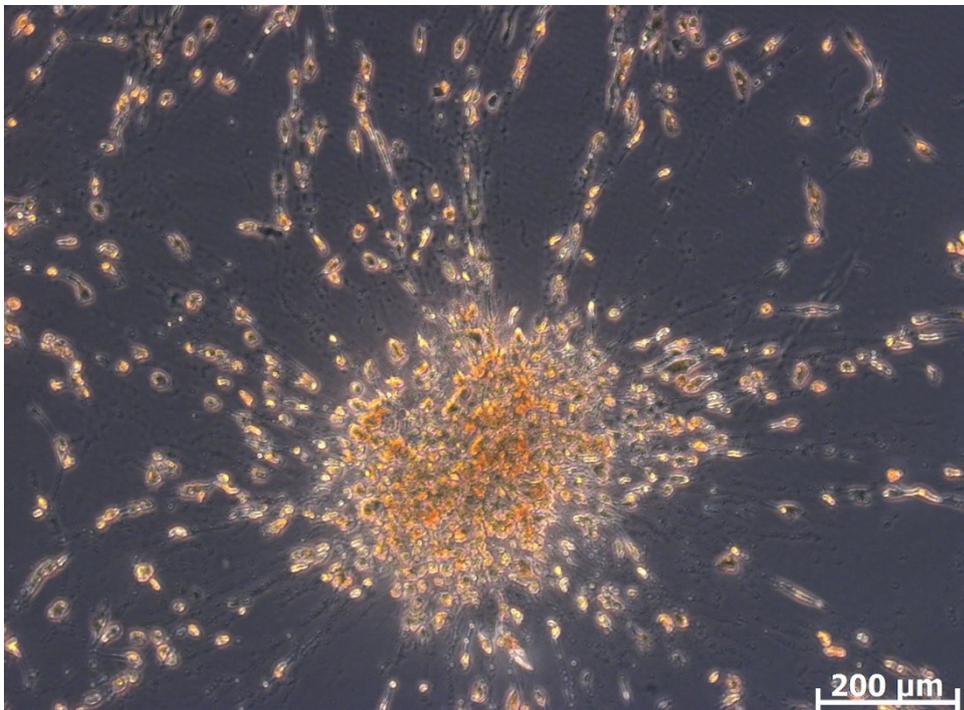


Abbildung 16: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 200 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung

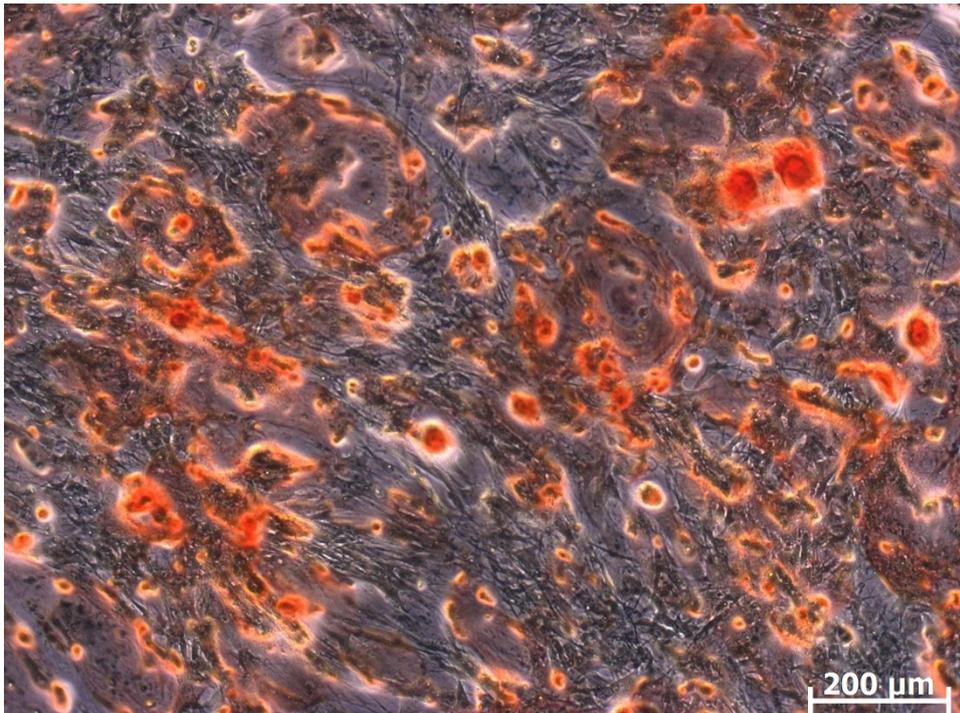


Abbildung 17: Alizarin – Rot – Färbung ASC Kontrolle (ODM + keine Zusätze), Tag 7, 10-fache Vergrößerung

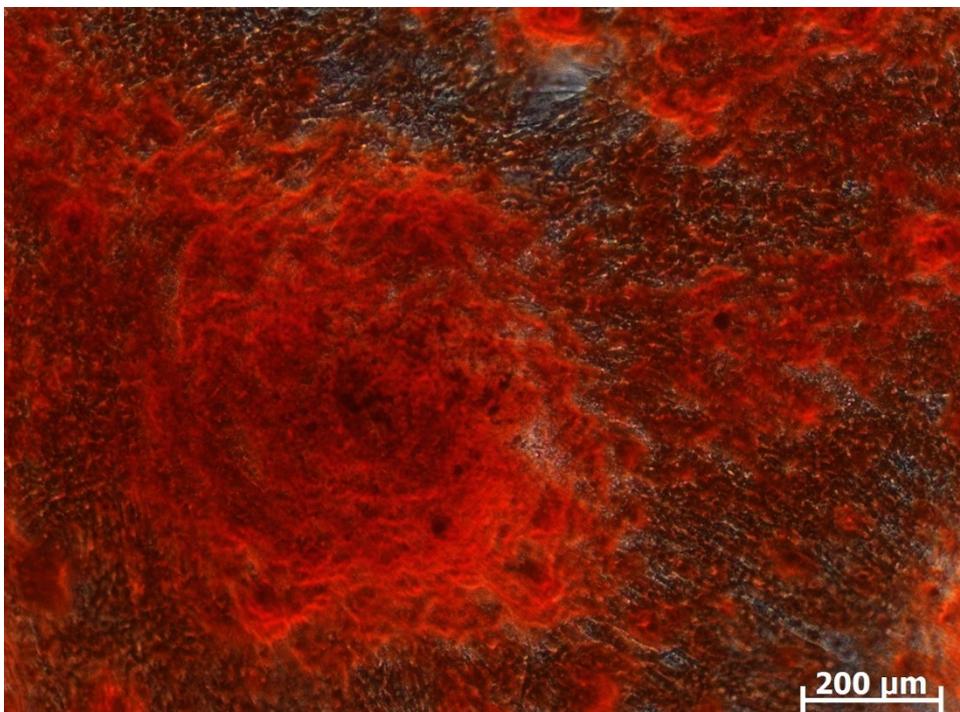


Abbildung 18: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 250 U Katalase, Tag 14, 10-fache Vergrößerung

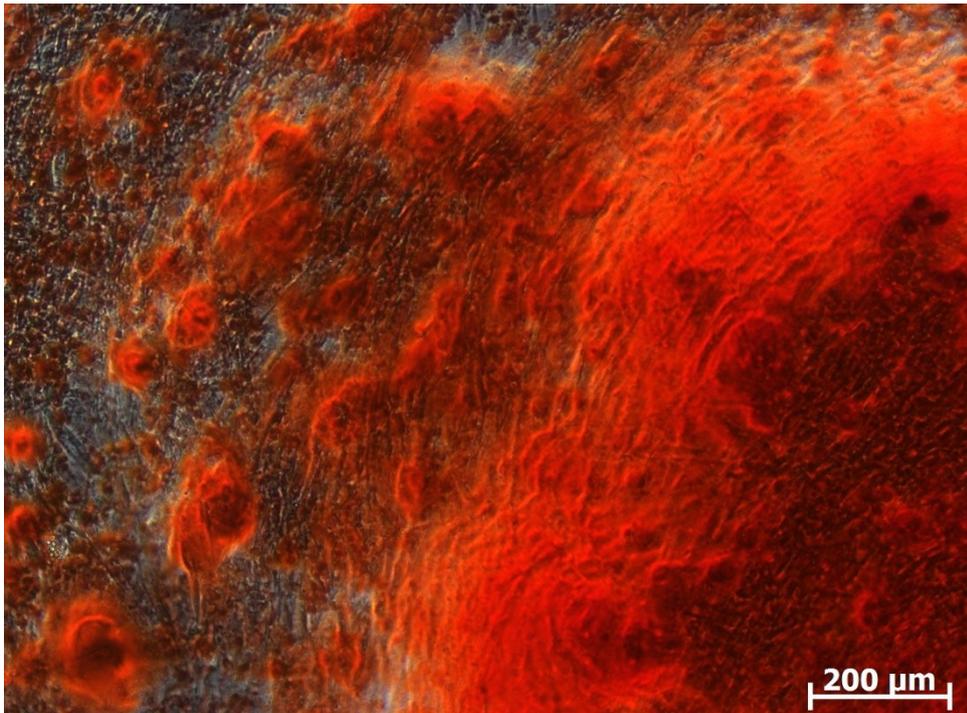


Abbildung 19: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 250 U Katalase + 100 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

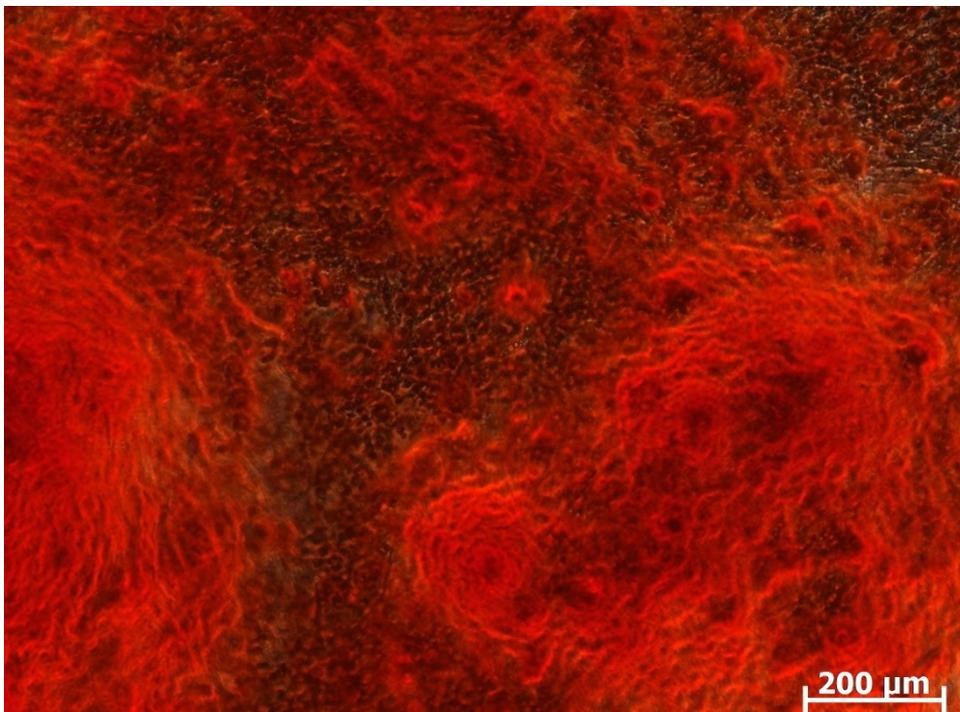


Abbildung 20: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 250 U Katalase + 50 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

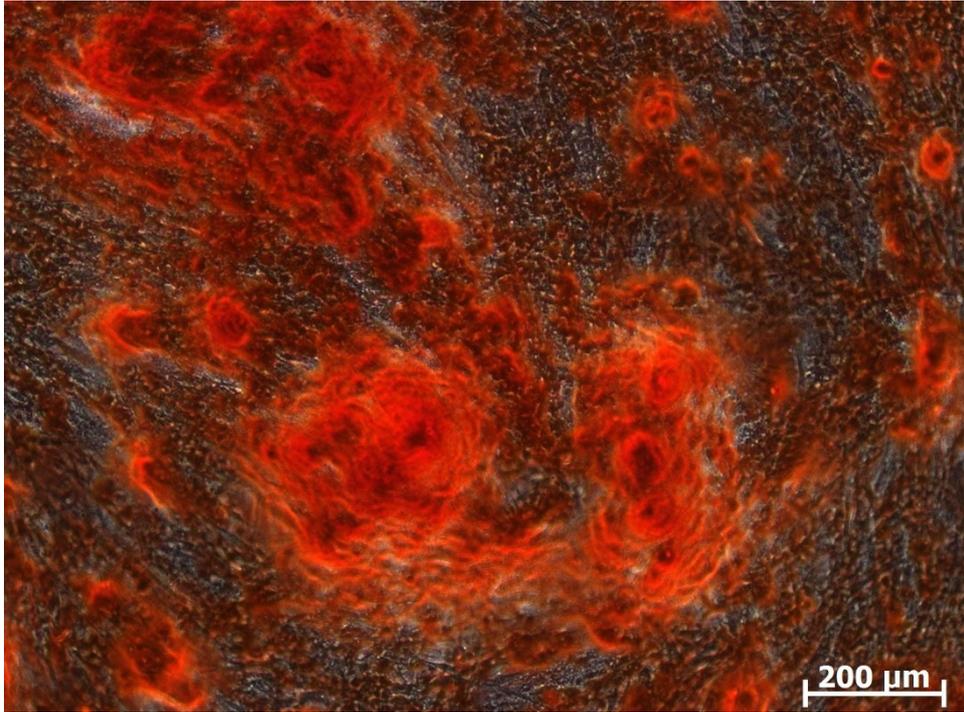


Abbildung 21: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 125 U Katalase, Tag 14, 10-fache Vergrößerung

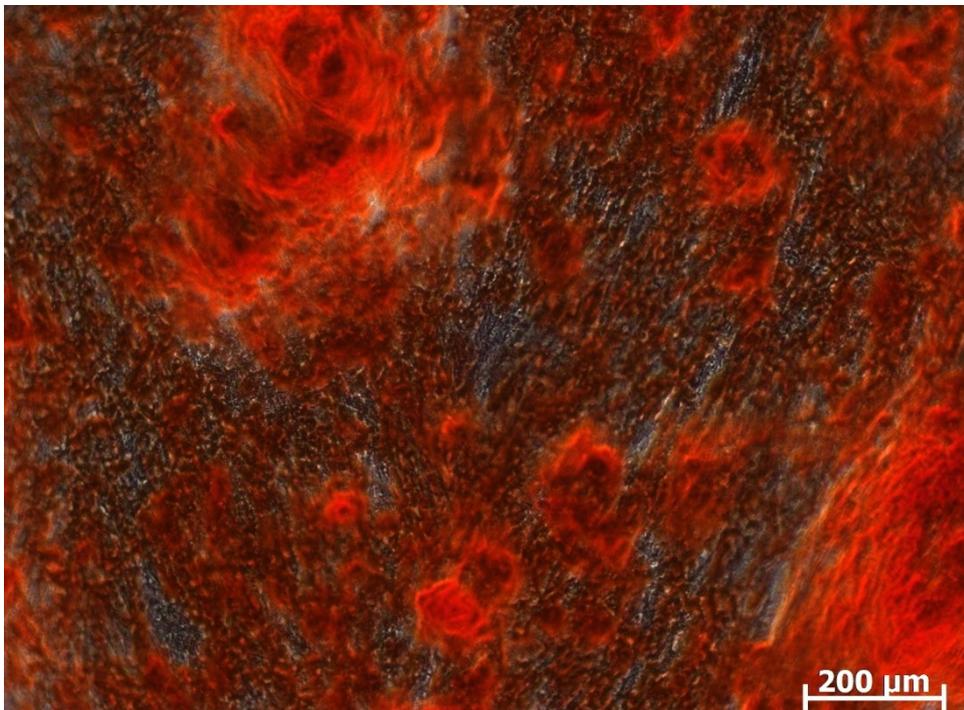


Abbildung 22: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 125 U Katalase + 100 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

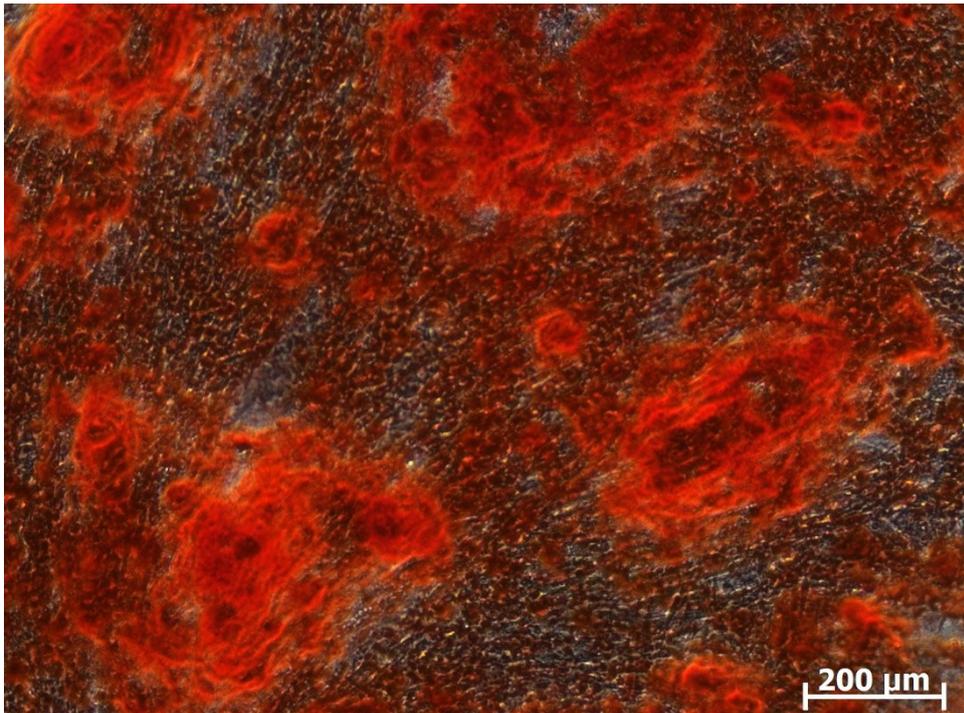


Abbildung 23: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 100 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

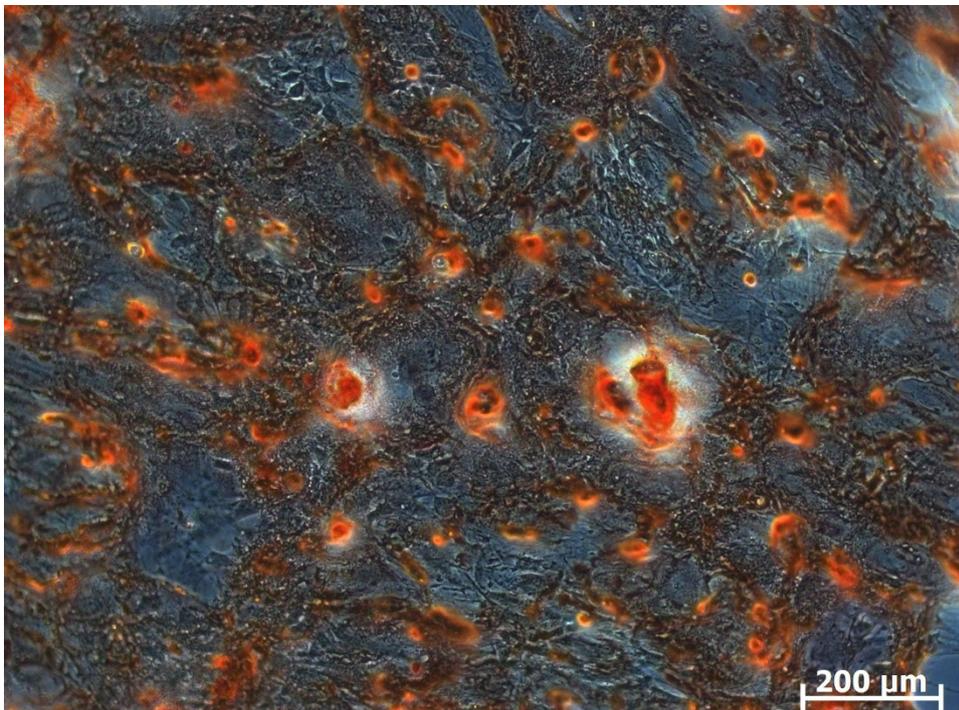


Abbildung 24: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 50 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

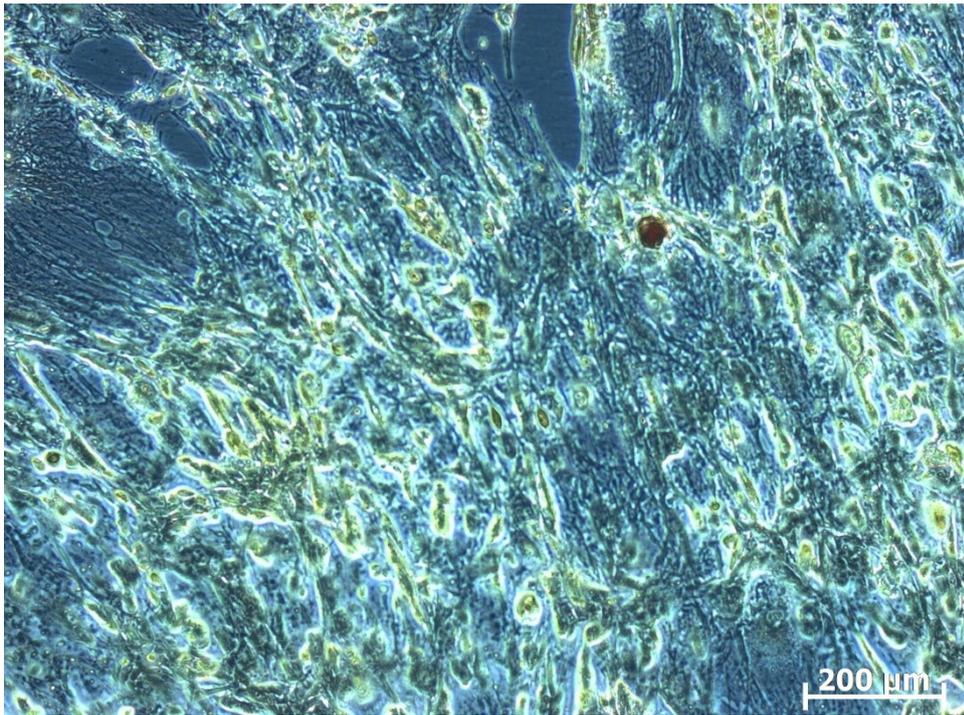


Abbildung 25: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 100 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

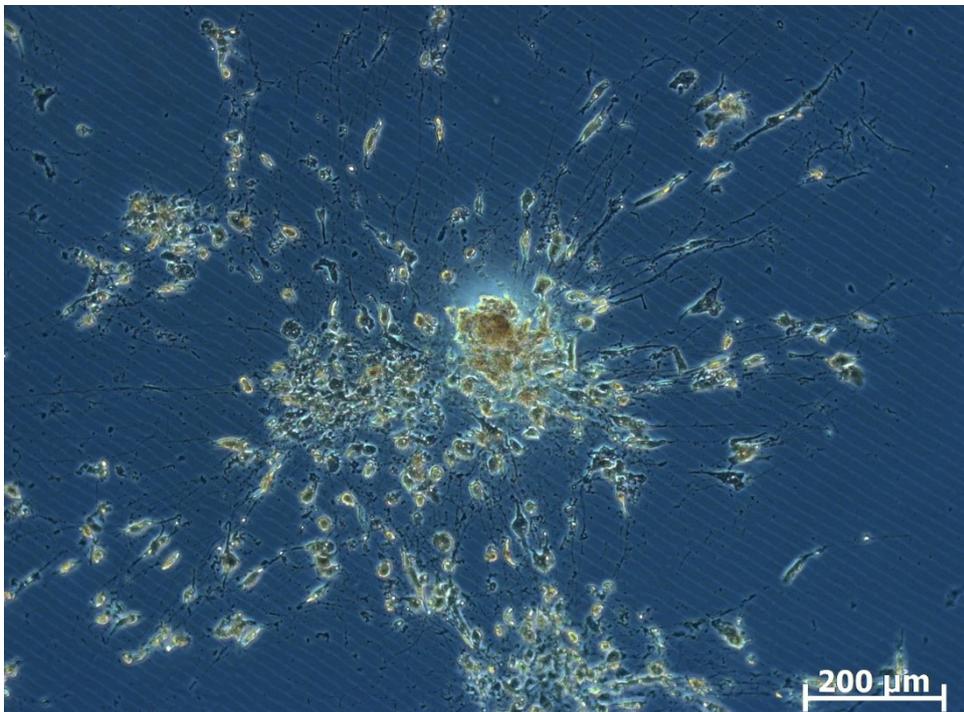


Abbildung 26: Alizarin – Rot – Färbung ASC ODM + 200 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

7.5.2 DFAT

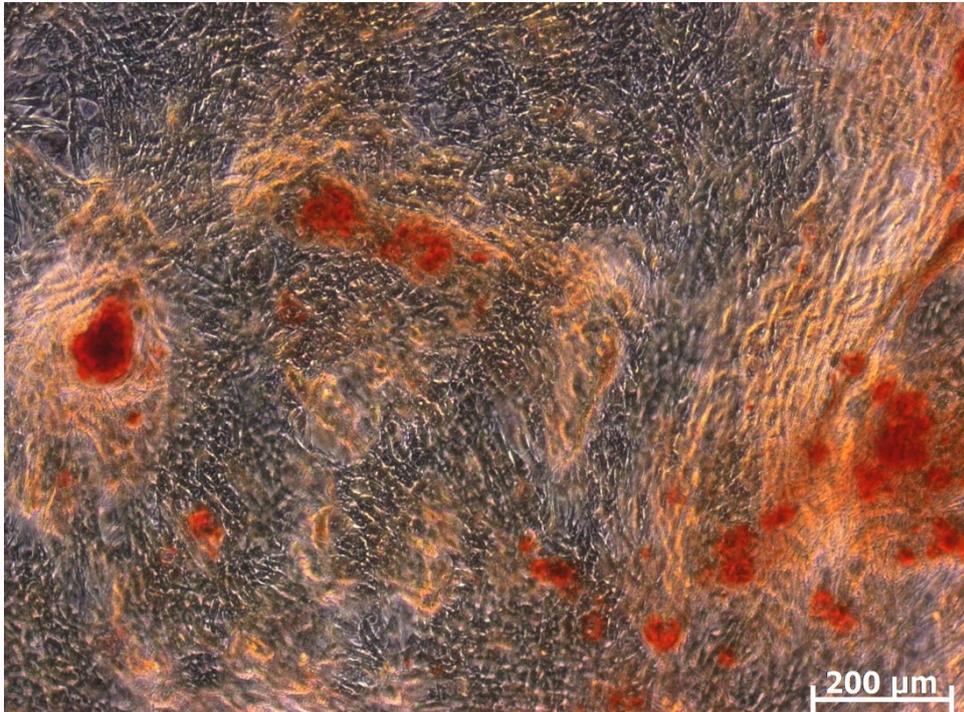


Abbildung 27: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 250 U Katalase, Tag 7, 10-fache Vergrößerung

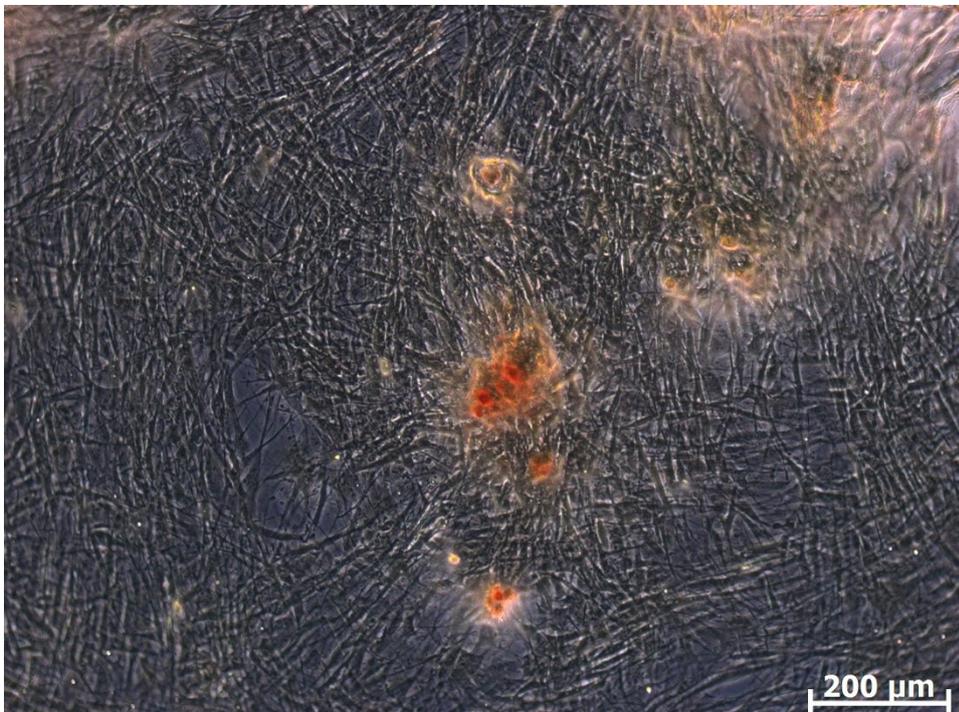


Abbildung 28: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 250 U Katalase + 100 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung



Abbildung 29: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 250 U Katalase + 50 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung

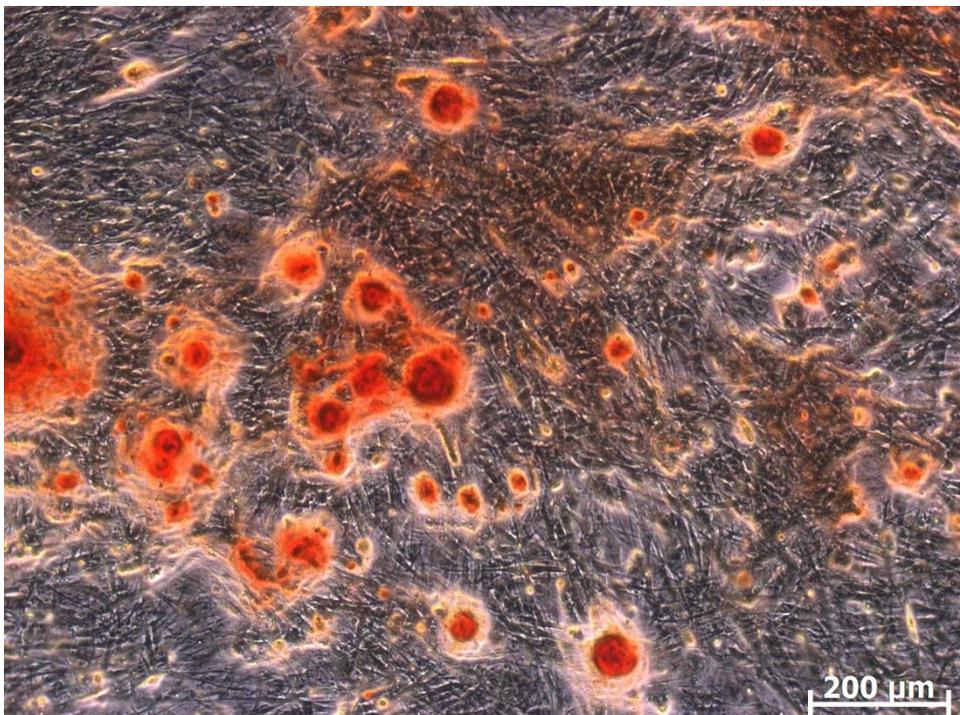


Abbildung 30: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 125 U Katalase, Tag 7, 10-fache Vergrößerung

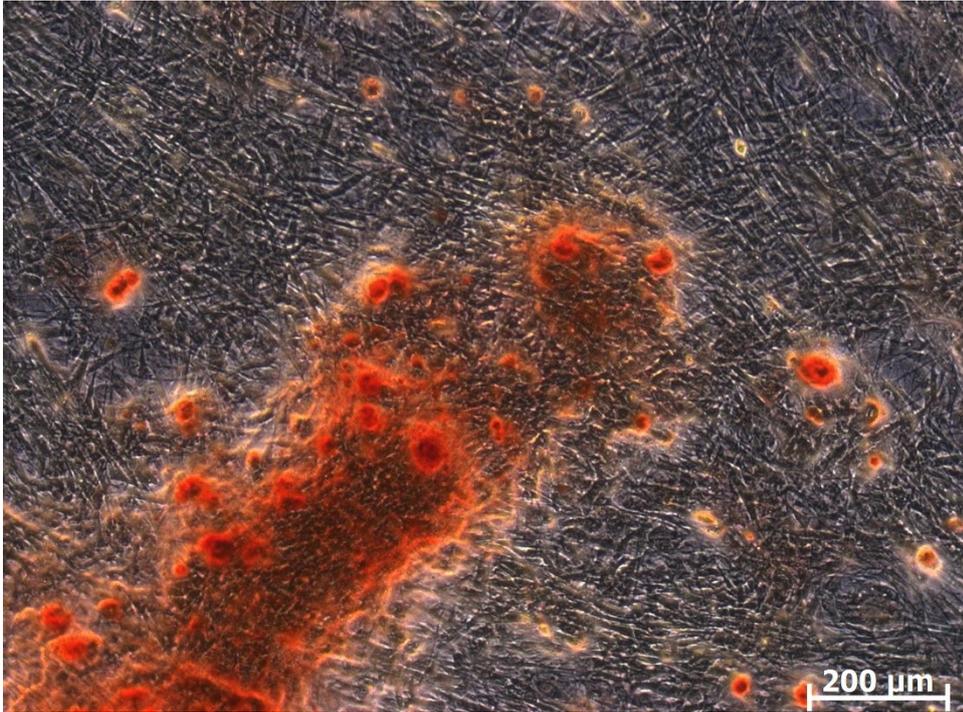


Abbildung 31: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 125 U Katalase + 100 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung

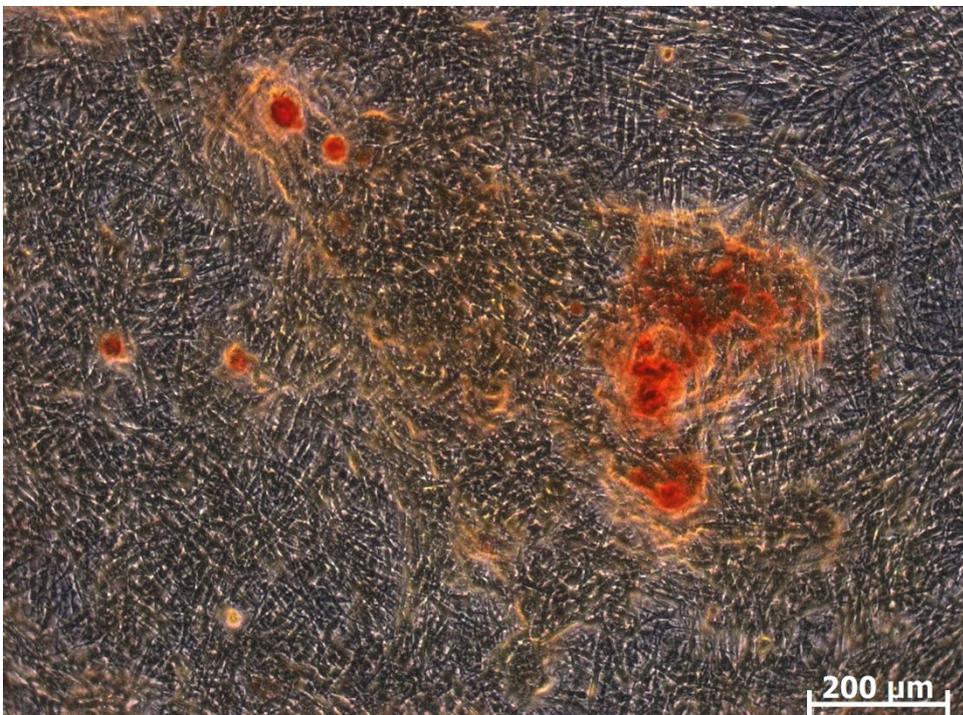


Abbildung 32: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 125 U Katalase + 50 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung



Abbildung 33: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 50 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung

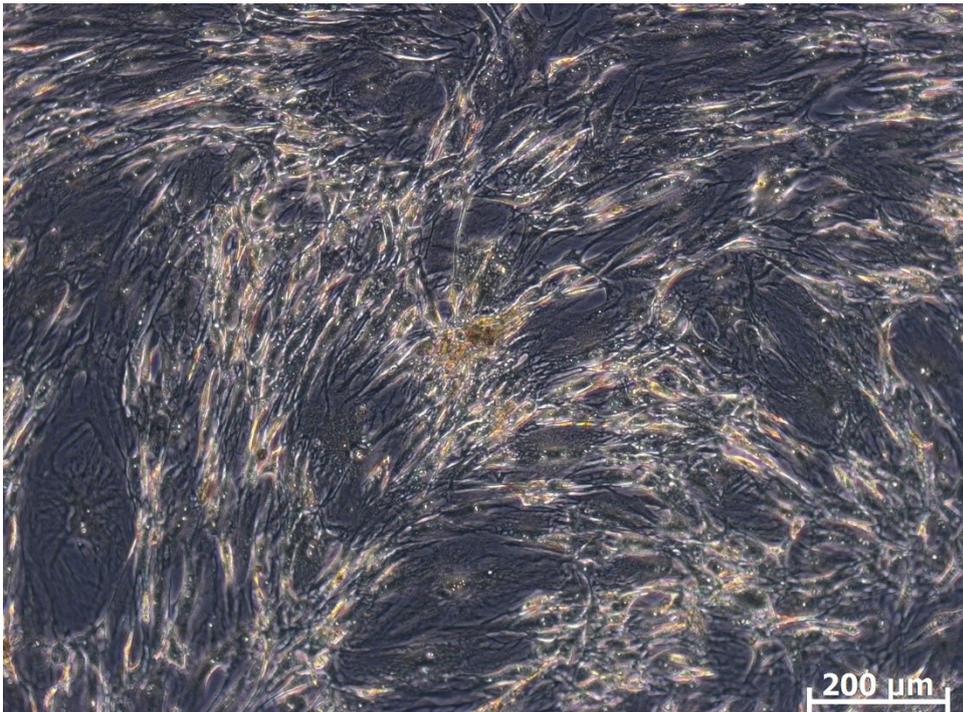


Abbildung 34: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 100 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung

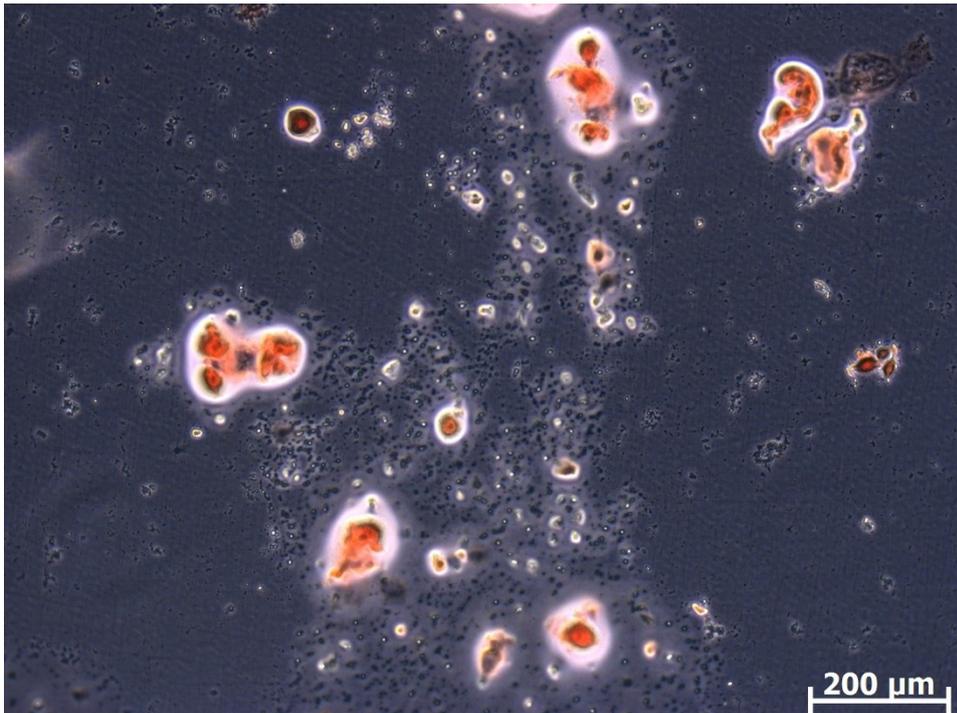


Abbildung 35: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 200 μM H_2O_2 , Tag 7, 10-fache Vergrößerung

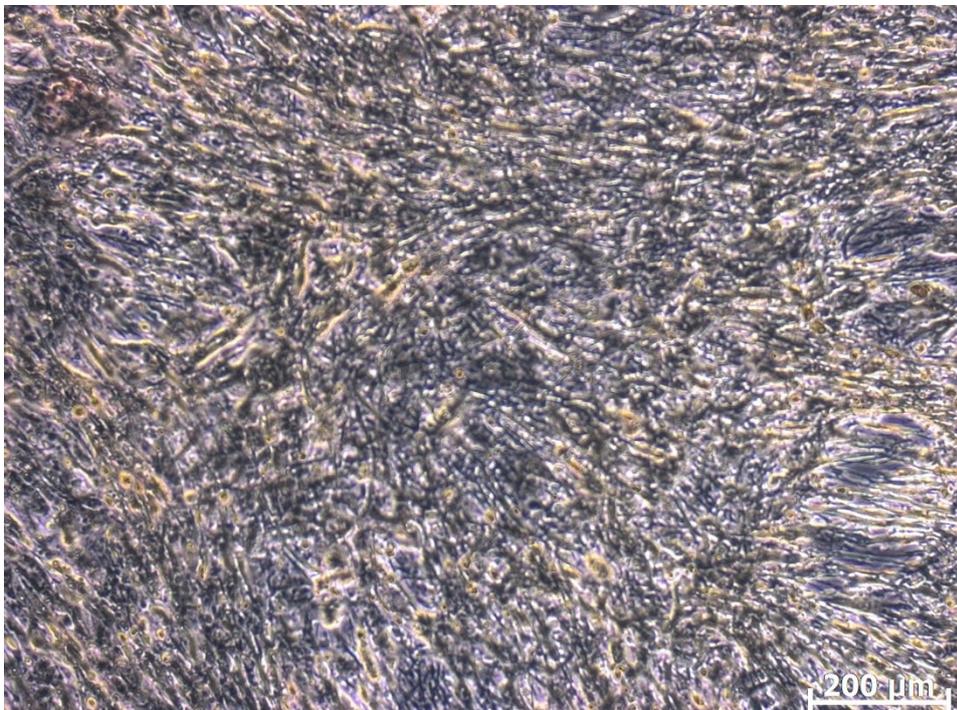


Abbildung 36: Alizarin – Rot – Färbung DFAT Kontrolle (ODM + keine Zusätze), Tag 7, 10-fache Vergrößerung

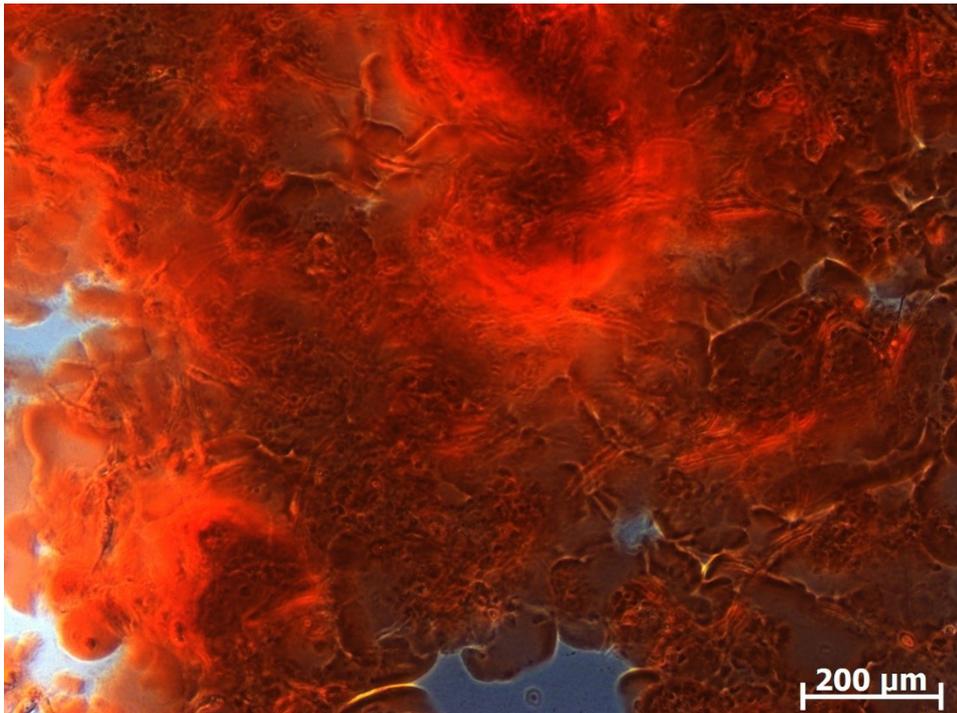


Abbildung 37: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 250 U Katalase, Tag 14, 10-fache Vergrößerung

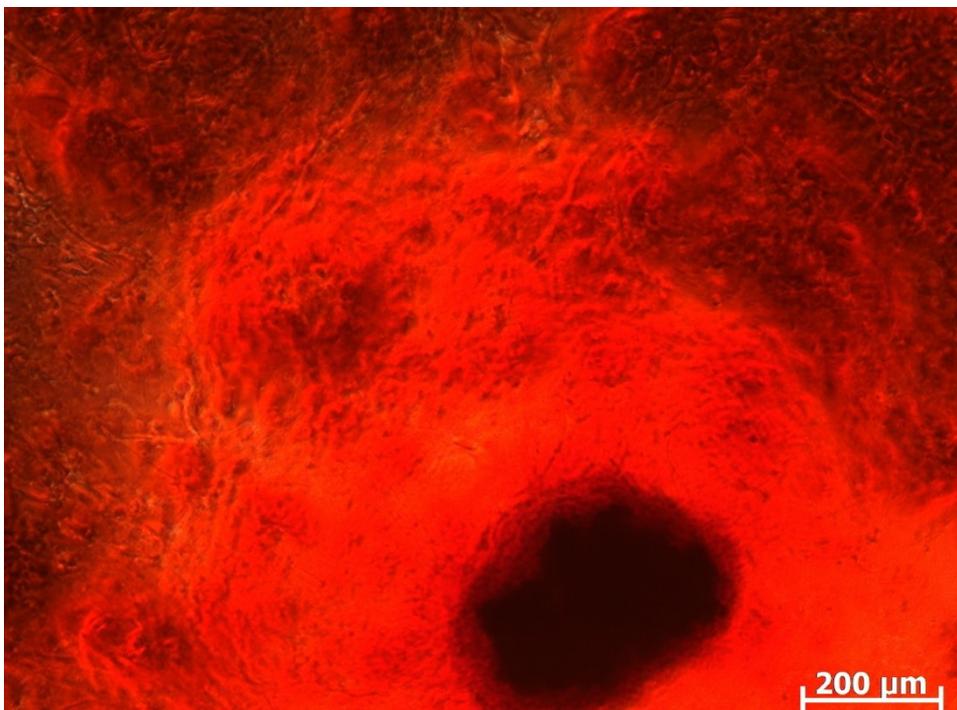


Abbildung 38: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 250 U Katalase + 100 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

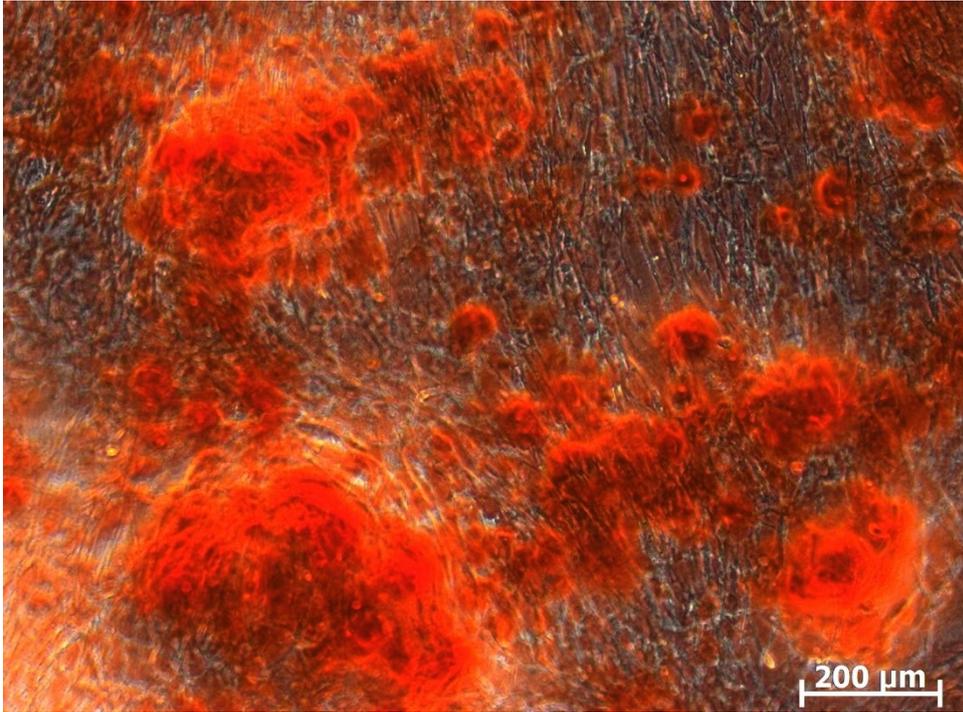


Abbildung 39: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 250 U Katalase + 50 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

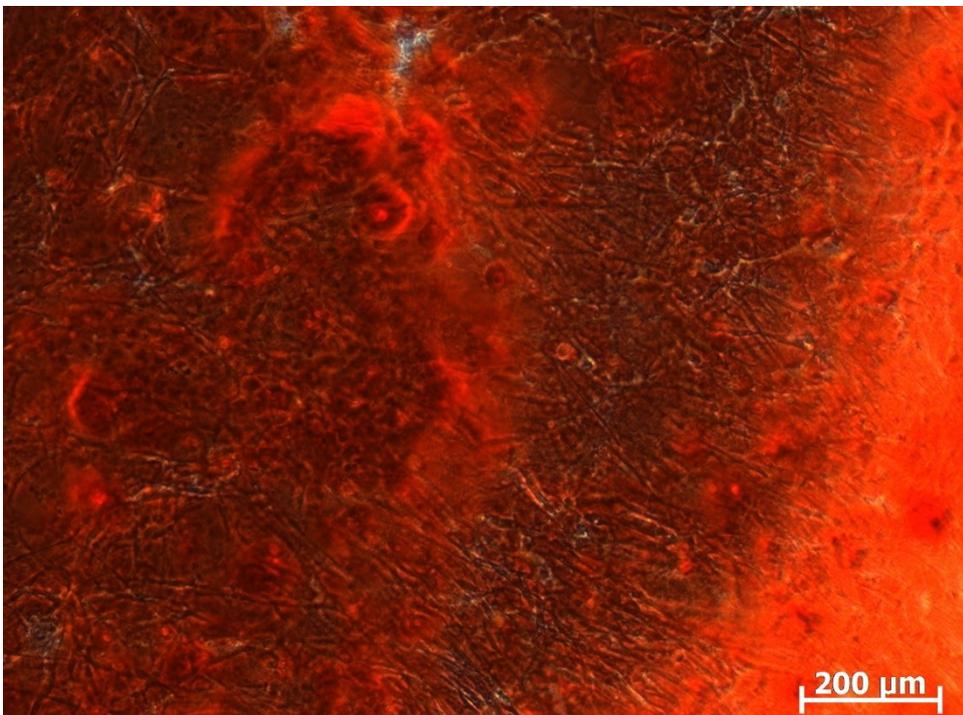


Abbildung 40: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 125 U Katalase, Tag 14, 10-fache Vergrößerung

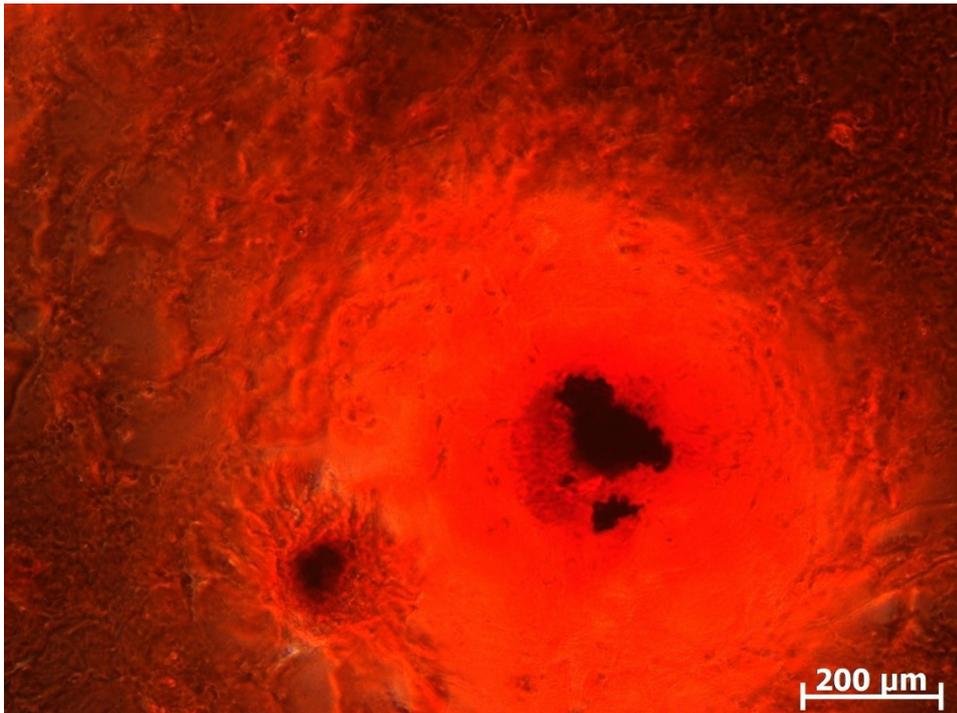


Abbildung 41: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 125 U Katalase + 100 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

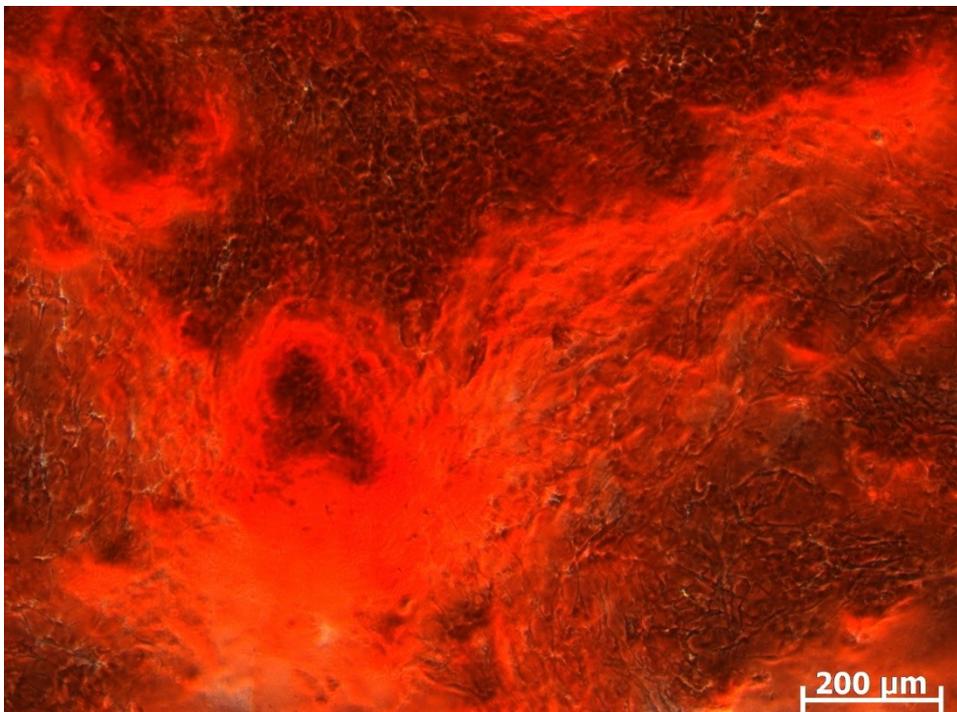


Abbildung 42: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 125 U Katalase + 50 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

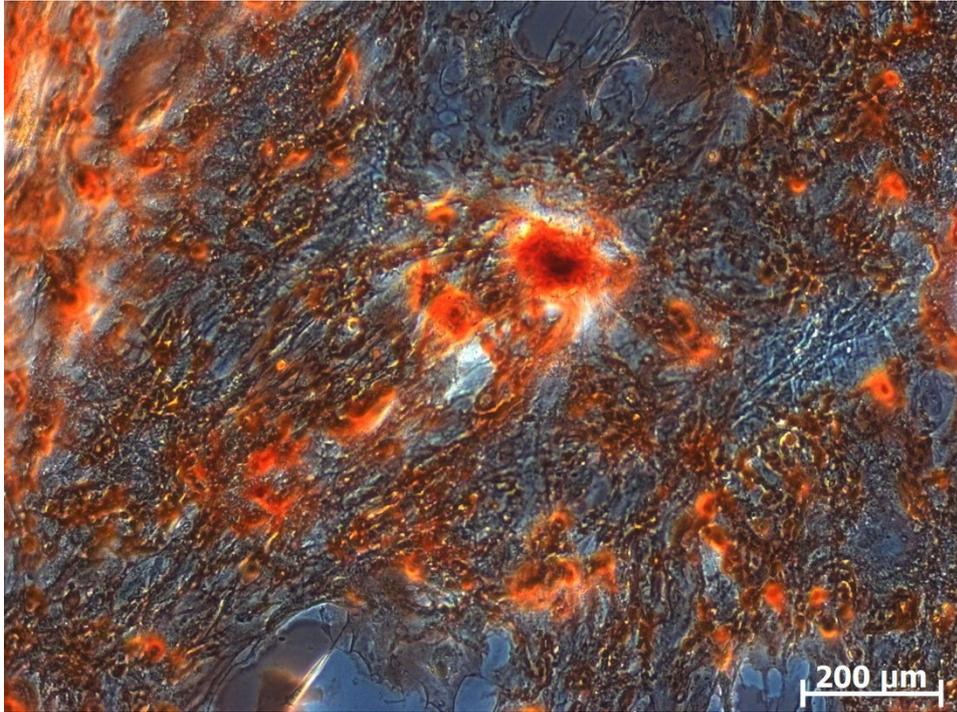


Abbildung 43: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 50 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

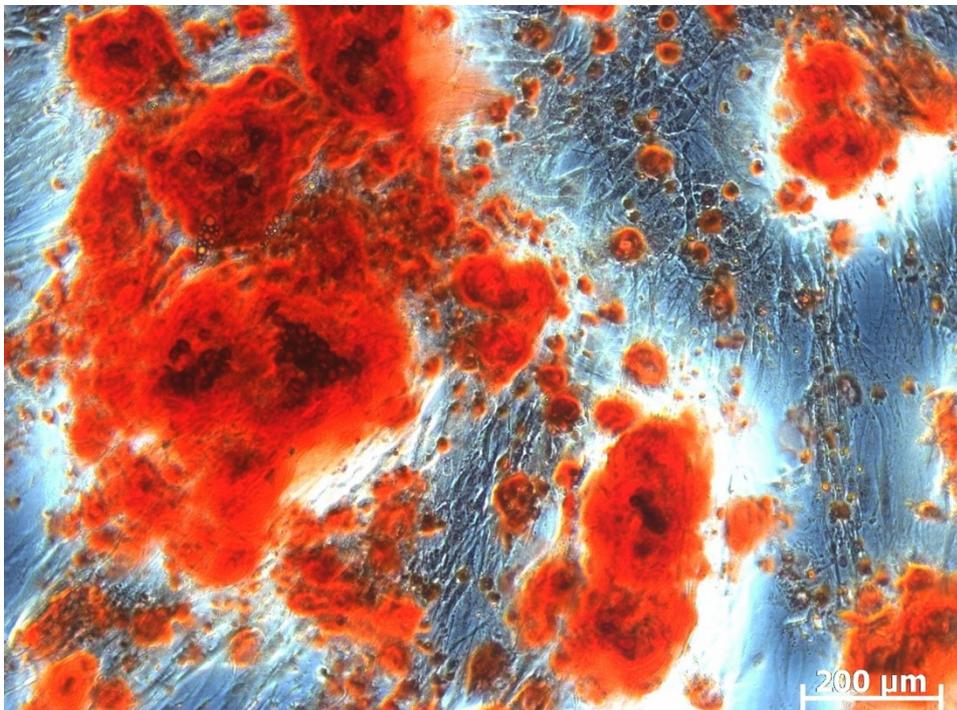


Abbildung 44 Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 100 μM H_2O_2 , Tag 14, 10-fache Vergrößerung

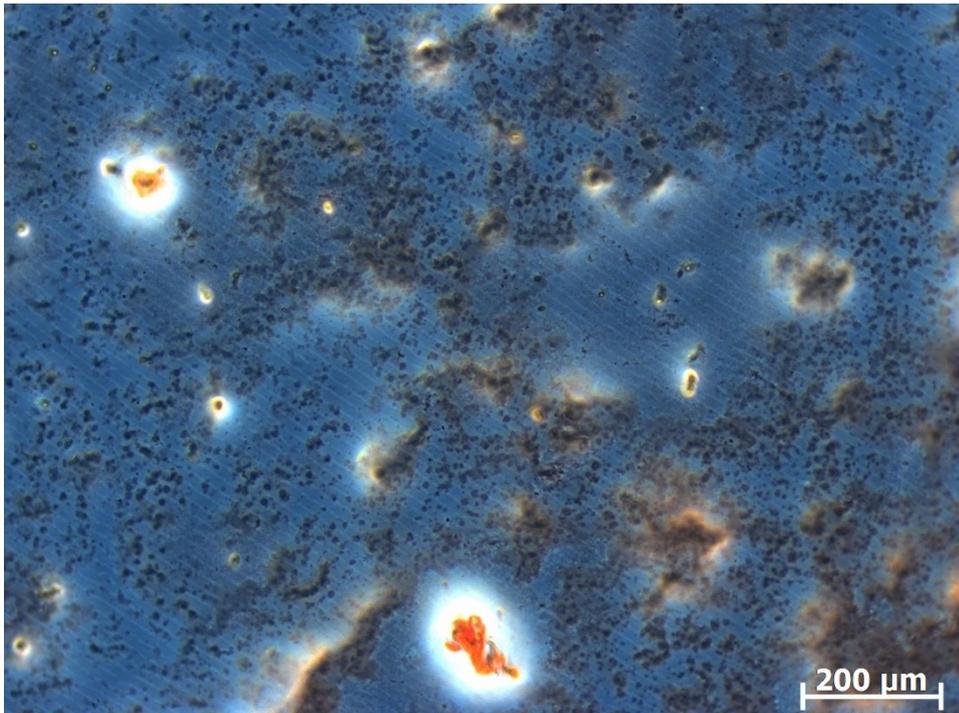


Abbildung 45: Alizarin – Rot – Färbung DFAT ODM + 200 μM H₂O₂, Tag 14, 10-fache Vergrößerung

7.6 Western-Blotting

Zur Untersuchung der Unterschiede der osteogenen Differenzierung von adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen wurden Zelllysate von differenzierten Zellen (Tag 7 und 14) auf die Proteine GAPDH (Novus Biologicals GAPDH Antibody 13H12, mouse anti-mouse), FoxO1 (Cell Signaling Technology FoxO1 C29H4 Rabbit mAb, mouse anti-rabbit), NOX4 (Santa Cruz Biotechnology Nox4 3H2G11: sc517188, mouse anti-human), mnSOD (StressMarq Biosciences Inc. Anti Mn SOD SPC-118C/D, rabbit anti-human), Osteopontin (Santa Cruz Biotechnology OPN FL-314: sc-20788, rabbit anti-human), ALP (Santa Cruz Biotechnology Alkaline Phosphatase A-10: sc-271431, mouse anti-human) und PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology PPAR γ H-100: sc-7196, rabbit anti-human) analysiert. Auf GAPDH wurde normiert, da dieses Protein als Referenzmarker diente.

7.6.1 FoxO1

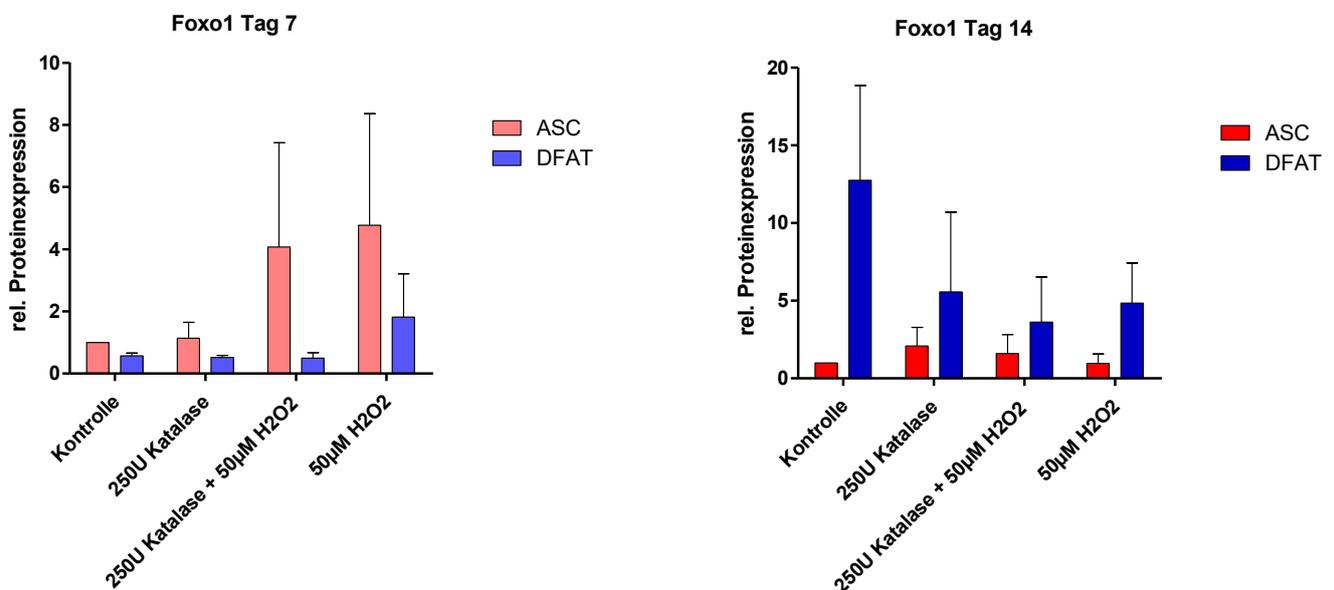


Abbildung 46: Western-Blot: FoxO1 Proteinexpression in ASCs und DFATs an den Tagen 7 und 14. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. Normiert wurde auf GAPDH. n=3.

Beide Zellarten wurden auf die Isoform FoxO1 der Forkhead-Box-Proteine, welche eine Rolle bei der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies in Knochen spielt und die osteogene Differenzierung fördert [17, 18], untersucht. Es zeigten sich besonders im Zeitverlauf einige Unterschiede. An Tag 7 betrug die relative Proteinexpression von FoxO1 bei der DFAT Kontrolle etwa die Hälfte der Werte, die bei der ASC Kontrolle erreicht wurden. Die Zugabe von 250 U Katalase veränderte die Expression nur minimal. In ASCs stieg sie um 13,7 %, in DFATs fiel sie um ca. 5 Prozent ab. Eine große Veränderung fand bei Zugabe von H₂O₂ statt. Bei ASCs kam es zu einer Vervierfachung der Proteinexpression trotz Zugabe von 250 U Katalase zu den 50 µM H₂O₂. Bei den DFAT blieb dieser Effekt aus und die Proteinexpression war sogar leicht vermindert. Bei alleiniger Zugabe von H₂O₂ stieg die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors um den Faktor 4,7 bei ASCs und bei DFATs immerhin um den Faktor 1,8.

Betrachtete man die Proteinexpression von FoxO1 an Tag 14 zeigten sich deutliche Unterschiede. Im Vergleich zur ASC Kontrolle war die Expression bei der DFAT Kontrolle 12 Mal höher. Ebenso war bei den Ansätzen mit 250 U Katalase, 250 U Katalase + H₂O₂ und nur 50 µM H₂O₂ eine Erhöhung zu beobachten. Bei den ASCs dagegen war dieser Effekt an Tag 14 geringer ausgeprägt. Die doppelte und damit höchste Proteinexpression bei ASCs war im Vergleich zur ASC Kontrolle an Tag 14 bei Zugabe von 250 U Katalase zu beobachten, gefolgt von Katalase + H₂O₂ mit dem Faktor 1,6.

7.6.2 NOX4

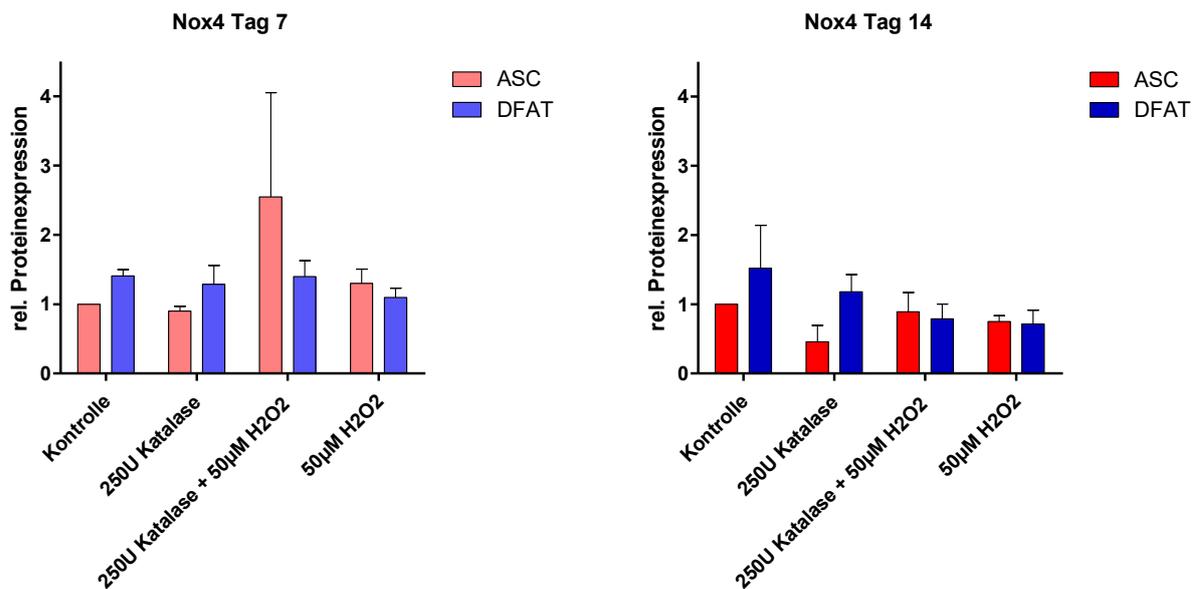


Abbildung 47: Western-Blot: NOX4 Proteinexpression in ASCs und DFATs an den Tagen 7 und 14. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. Normiert wurde auf GAPDH. n=3.

NOX4 ist ein Teil des NADPH Oxidase-Komplexes und spielt eine Rolle bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies als Teil von verschiedenen biologischen Funktionen wie Signaltransduktion, Zelldifferenzierung und weiteren [19, 20].

Nox4 war im Vergleich zu ASCs in DFATs meist höher exprimiert. Die DFAT Kontrolle zeigte 40 % mehr NOX4 Expression an Tag 7, an Tag 14 sogar 52,1 %. Auch bei Zugabe von 250 U Katalase überwog die Proteinexpression in den DFATs (1,284 an Tag 7 bzw. 1,181 an Tag 14). Bei Zugabe von 250 U Katalase + 50µM H₂O₂ kam es bei ASCs an Tag 7 zu einem deutlichen Anstieg um Faktor 2,549, bei DFATs dagegen nur um 1,394. Die alleinige Zugabe von 50 µM H₂O₂ bewirkte in beiden Zellarten nur einen geringeren Anstieg um 29,8 % in ASCs und 9.8 % in DFATs.

An Tag 14 kam es zur Herabregulation der NOX4 Expression bei Zugabe von sowohl 250 U Katalase + 50µM H₂O₂ (0,891 bei ASCs; 0,791 bei DFATs) als auch von 50 µM H₂O₂ alleine (0,75 bei ASCs; 0,713 bei DFATs).

7.6.3 mnSOD

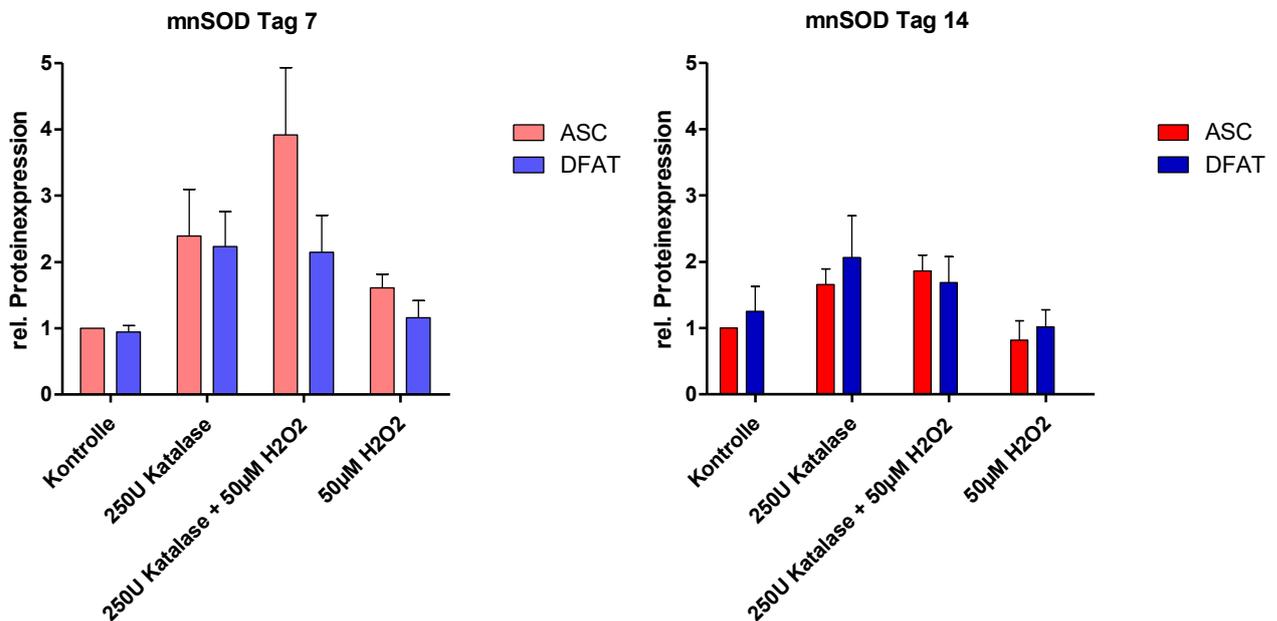


Abbildung 48: Western-Blot: mnSOD Proteinexpression in ASCs und DFATs an den Tagen 7 und 14. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. Normiert wurde auf GAPDH. n=3.

MnSOD gehört zu der Superoxid Dismutase Gruppe und wirkt durch den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies unter anderem antioxidativ und antiapoptotisch [21, 22].

Die Untersuchungen zeigten in beiden Zellarten und zu beiden Betrachtungszeitpunkten eine erhöhte Expression von mnSOD im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dabei unterschieden sich die Werte zwischen beiden Zellarten bis auf zwei Ausnahmen kaum. Die Zugabe von 250 U Katalase bewirkte an Tag 7 eine mehr als verdoppelte Proteinexpression mit dem Faktor 2,391 (Tag 7) bei ASCs und 2,232 (Tag 7) bei DFATs. An Tag 14 überwog die Expression in DFATs mit 2,061 gegenüber 1,656 bei ASCs. Die Zugabe von 250 U Katalase + 50 µM H₂O₂ vervierfachte die mnSOD Expression in ASCs, in DFATs kam es zu einer Verdopplung. An Tag 14 nahm die Proteinexpression Werte zwischen 1,862 (ASC) und 1,683 (DFAT) an. Die alleinige Zugabe von 50 µM H₂O₂ hatte erstaunlicherweise den geringsten Effekt. An Tag 7 wurde mnSOD bei ASCs um

Faktor 1,61, bei DFATs um 1,16 mehr exprimiert. An Tag 14 fiel sie dagegen sogar bei ASCs auf 0,816 gegenüber der Kontrolle. Bei den DFATs hielt sie sich mit 1,019 auf dem Niveau der ASC Kontrolle.

7.6.4 Osteopontin

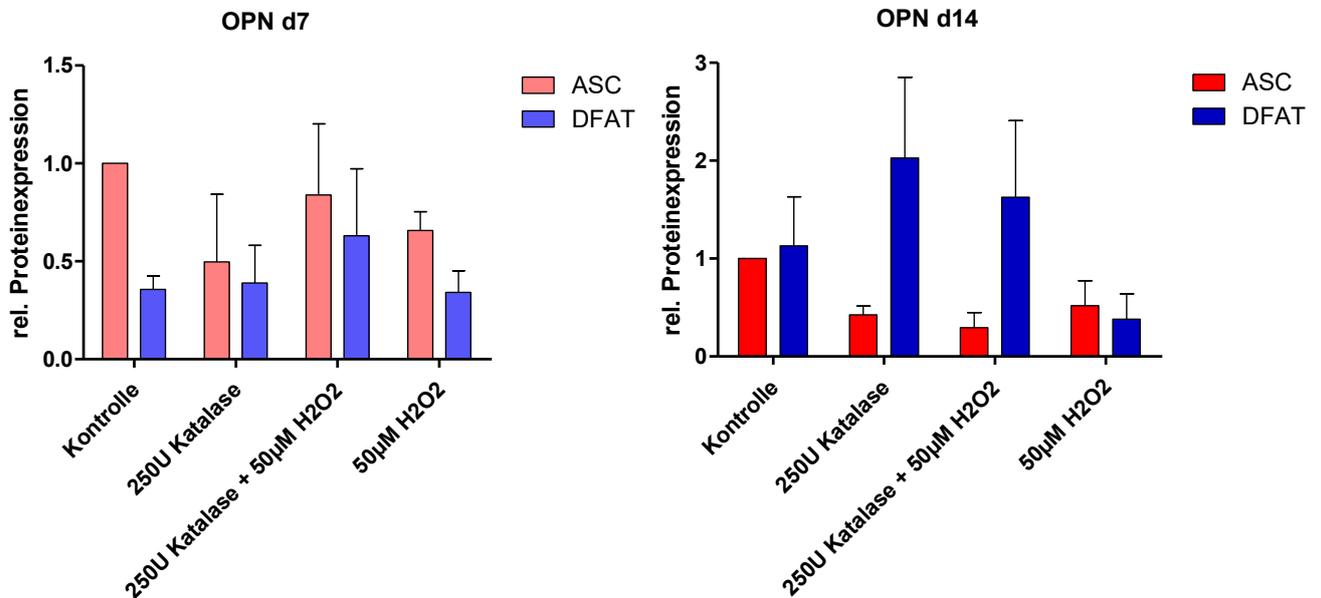


Abbildung 49: Western-Blot: Osteopontin (OPN) Proteinexpression in ASCs und DFATs an den Tagen 7 und 14. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. Normiert wurde auf GAPDH. n=3.

Osteopontin spielt eine Rolle bei der Verankerung von Osteoblasten an die mineralisierte Knochenmatrix. Zudem ist das Protein an der Immunmodulation und Chemotaxis beteiligt und besitzt antiapoptotische Eigenschaften [23].

An Tag 7 fiel die Expression bei allen untersuchten Ansätzen geringer aus als bei der ASC Kontrolle, die DFAT Kontrolle lag im Vergleich nur bei 35,7 %. Den höchsten Wert mit 84 % des Ausgangswertes erreichte der ASC Ansatz mit Zugabe von 250 U Katalase + 50 µM H₂O₂ (DFAT 63,1 %), gefolgt von dem Ansatz mit alleiniger H₂O₂ Zugabe. Dort wurden bei ASCs 65,8 % und bei DFATs 34,2 % der Kontrolle erreicht.

An Tag 14 dagegen überwog bis auf den Ansatz mit 50 μM H_2O_2 die Osteopontin-Expression bei den DFATs. Die höchsten Werte wurden mit Faktor 2,026 bei Zugabe von 250 U Katalase und bei der Kombination von 250 U Katalase + 50 μM H_2O_2 mit Faktor 1,627 erreicht. Bei ASCs kam es zu einer Herabregulation der Proteinexpression an Tag 14 auf unter 50 % des Ausgangswertes.

7.6.5 ALP

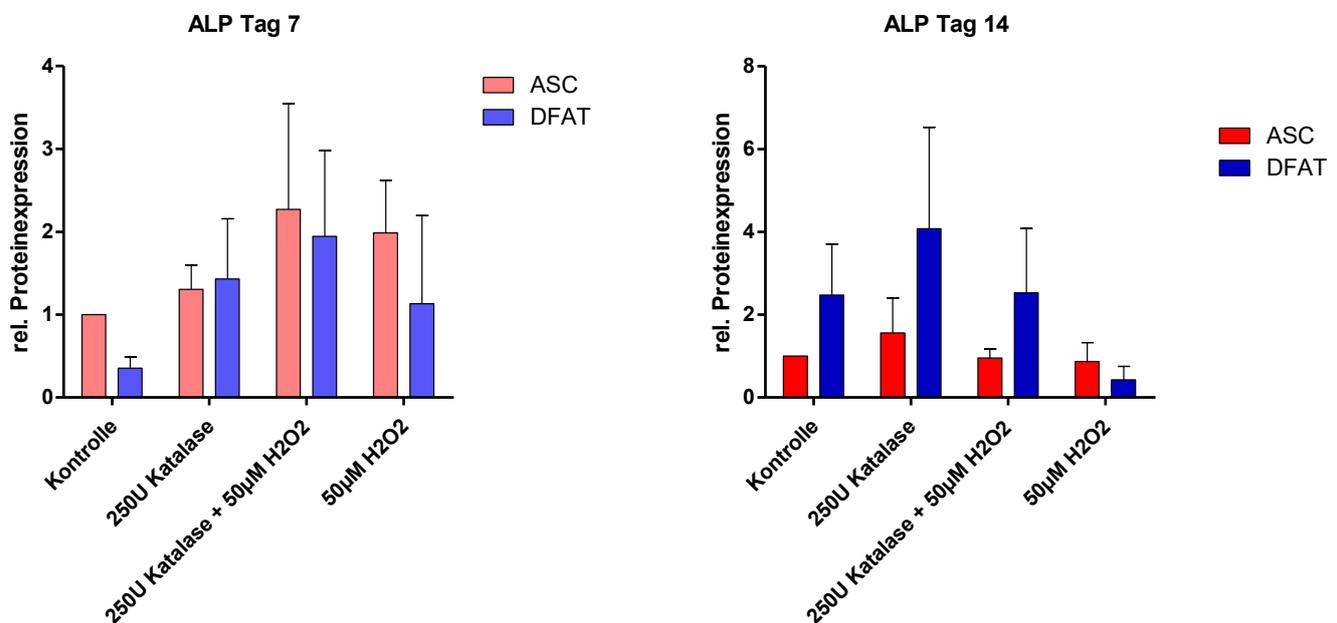


Abbildung 50: Western-Blot: ALP Proteinexpression in ASCs und DFATs an den Tagen 7 und 14. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. Normiert wurde auf GAPDH. n=3.

Die Alkalische Phosphatase ist Teil einer Proteinfamilie, die in mehreren Geweben vorkommt. Die gewebunspezifische Variante ist ein membrangebundenes Glykoenzym, welches eine Rolle bei der Knochenmineralisation spielt. An Tag 7 lag ALP bei der DFAT Kontrolle mit 35,4 % vermindert vor. Bei den anderen Ansätzen zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Proteinexpression. Bei Zugabe von 250 U Katalase stieg die ALP Expression in ASC um 30,7 %, bei DFATs um 43,1 %. Die Zugabe von 250 U Katalase + 50 μM H_2O_2 bewirkte in ASCs eine Zunahme um

Faktor 2,27 und in DFATs um 1,944. Die alleinige Zugabe von 50 μM H_2O_2 hatte an Tag 7 bei ASCs eine verdoppelte ALP Expression zur Folge, bei DFATs dagegen stieg sie nur um 12,9 %.

An Tag 14 dagegen überwog weitestgehend die Proteinexpression bei DFATs. Bei der DFAT Kontrolle stieg sie um den Faktor 2,478, bei Zugabe von 250 U Katalase vervierfachte sie sich (1,561 bei ASCs), bei der Zugabe von Katalase + H_2O_2 ließ sich eine Steigerung um Faktor 2,572 (0,957 bei ASCs) verzeichnen. Lediglich bei alleiniger Zugabe von H_2O_2 überwog die ALP Expression mit 87 % der Kontrolle bei ASCs gegenüber 42,4 % bei DFATs.

7.6.6 PPAR γ

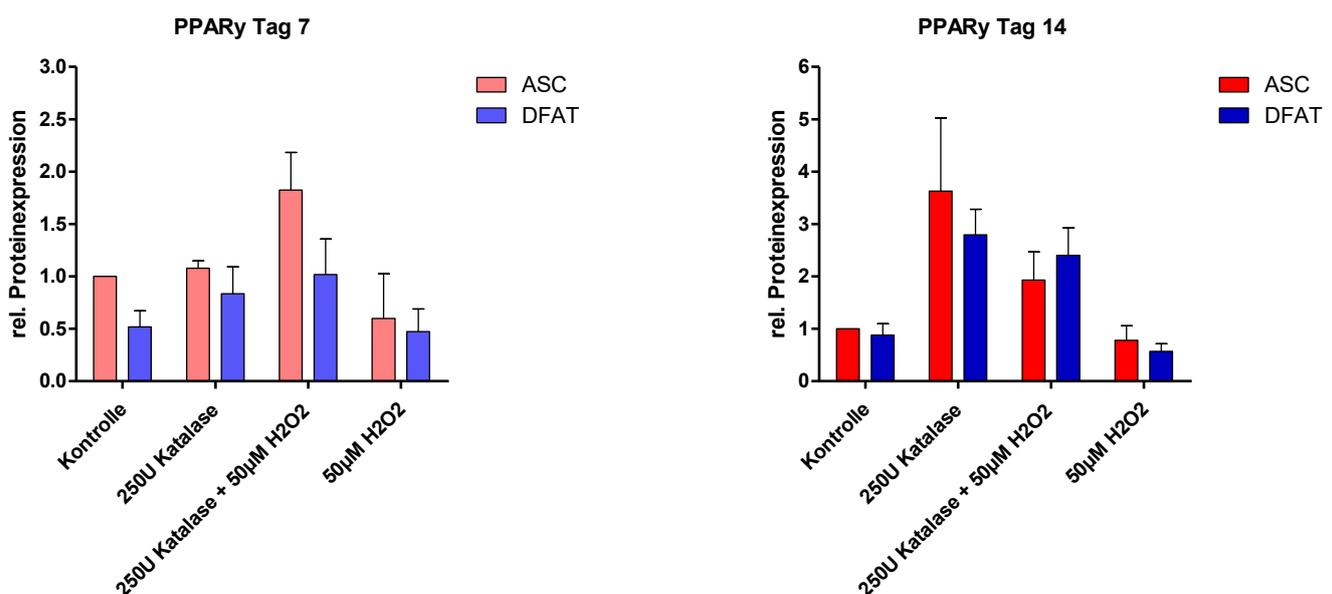


Abbildung 51: Western-Blot: PPAR γ Proteinexpression in ASCs und DFATs an den Tagen 7 und 14. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. Normiert wurde auf GAPDH. n=3.

PPAR γ ist ein Subtyp der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren-Familie und wird ubiquitär exprimiert. Das Protein ist ein Regulator der Adipozyten-differenzierung [24]. Des Weiteren verbessert eine Aktivierung den Glukosemetabolismus und bewirkt eine Insulin-Sensitivierung [25].

An Tag 7 war PPAR γ in ASCs stärker exprimiert als in DFATs. Die Zugabe von 250 U Katalase + 50 μ M H₂O₂ bewirkte eine Steigerung in ASCs um Faktor 1,824, während in DFATs gerade einmal Werte um das Niveau der ASC Kontrolle erreicht wurden. Bei Zugabe von 50 μ M H₂O₂ alleine kam es in beiden Zellarten zu einer verminderten Expression von PPAR γ (60 % bei ASCs, 47,4 % bei DFATs).

An Tag 14 war PPAR γ stärker in DFATs exprimiert. Bereits bei der Kontrolle lag die Proteinexpression bei DFATs 62,2 % höher. Durch Zugabe von 250 U Katalase stieg die Expression von PPAR γ um den Faktor 3,629, bei DFATs sogar um den Faktor 6,5. Bei Zugabe von 250 U Katalase + 50 μ M H₂O₂ fiel die Steigerung mit Faktor 1,928 bei ASCs und 5,955 bei DFATs etwas geringer aus. Bei Zugabe von 50 μ M H₂O₂ kam es bei beiden Zellarten ebenfalls zu einer verminderten Expression (78,1 % bei ASCs, 84,9 % bei DFATs).

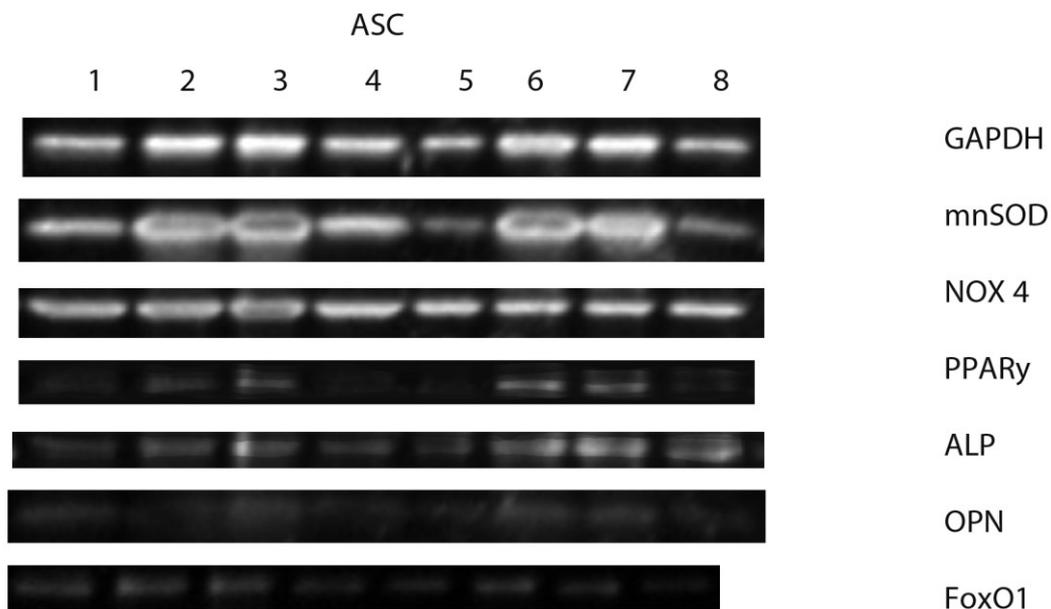


Abbildung 52: Western-Blot Banden repräsentativ für einen Versuchsdurchlauf von ASCs nach Proteinen sortiert. Dargestellt sind die Banden für die einzelnen Proteine mit folgender Zuordnung: 1: ASC d7 Kontrolle ; 2: ASC d7 ODM+ 250 U Katalase ; 3: ASC d7 ODM + 250 U Katalase + 50 μ M H₂O₂ ; 4:ASC d7 ODM + 50 μ M H₂O₂ ; 5: ASC d14 Kontrolle ; 6: ASC d14 ODM + 250 U Katalase ; 7: ASC d14 ODM + 250 U Katalase + 50 μ M H₂O₂ ; 8: ASC d14 ODM + 50 μ M H₂O₂.

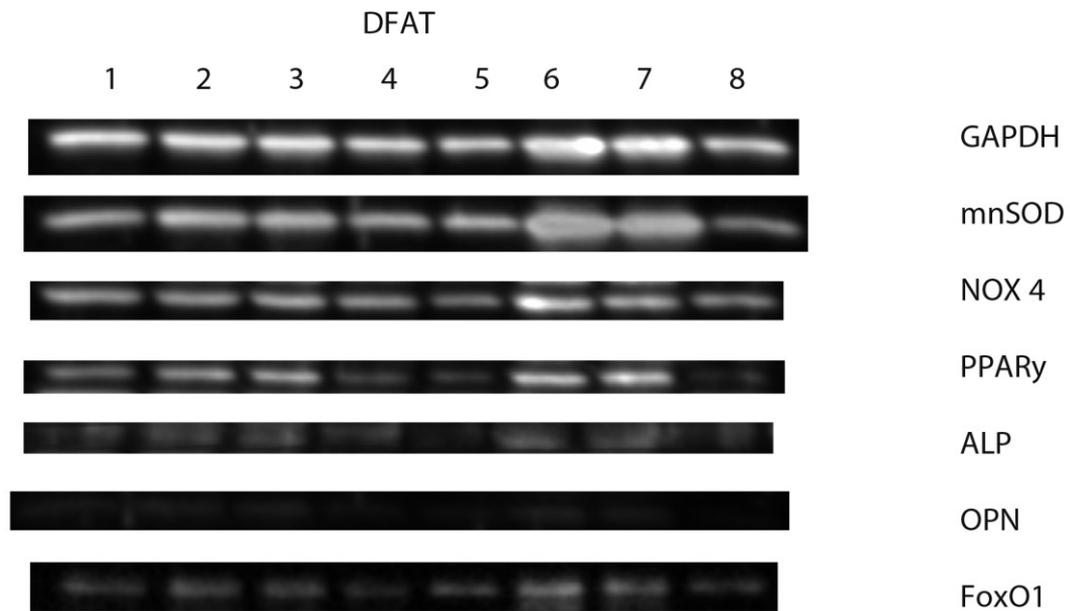


Abbildung 53: Western-Blot Banden repräsentativ für einen Versuchsdurchlauf von DFATs nach Proteinen sortiert. Dargestellt sind die Banden für die einzelnen Proteine mit folgender Zuordnung: 1: DFAT d7 Kontrolle ; 2: DFAT d7 ODM+ 250 U Katalase ; 3: DFAT d7 ODM + 250 U Katalase + 50 μM H_2O_2 ; 4:DFAT d7 ODM + 50 μM H_2O_2 ; 5: DFAT d14 Kontrolle ; 6: DFAT d14 ODM + 250 U Katalase ; 7: DFAT d14 ODM + 250 U Katalase + 50 μM H_2O_2 ; 8: DFAT d14 ODM + 50 μM H_2O_2 .

8 Diskussion

In dieser Arbeit wurden mehrere Untersuchungen zu den Unterschieden zwischen adipogenen Stammzellen und dedifferenzierten Fettzellen desselben Spenders bei der osteogenen Differenzierung durchgeführt. Dazu zählten eine durchflusszytometrische Untersuchung auf die Expression verschiedener Oberflächenproteine, die Differenzierbarkeit zu Knochengewebe unter dem Einfluss von Katalase und Wasserstoffperoxid als Beispiel für oxidativen Stress sowie das Western-Blotting auf mehrere Proteine, welche bei oxidativem Stress und der Differenzierung von Stammzellen eine Rolle spielen. Ziel war es auch, der Frage nachzugehen, ob dedifferenzierte Fettzellen eine gleichwertige oder vielleicht sogar bessere Quelle für zukünftige Knochenimplantate darstellen. Die dedifferenzierten Fettzellen wurden nach der etablierten sogenannten „Ceiling culture Methode“ aus Fettgewebe gewonnen [4].

Um nachzuweisen, dass die isolierten ASCs und DFATs desselben Spenders über Stammzeleigenschaften verfügen, wurden sie durchflusszytometrisch auf bestimmte Oberflächen-Antigene untersucht.

Dominici, M. et al. definierten verschiedene Kriterien für mesenchymale Stammzellen (MSCs). Demnach sollten MSCs die Cluster of Differentiation (CD) 44, CD 73, CD 90 und CD 105 exprimieren. Dagegen müssen CD 14, CD 34 und CD 45 negativ sein [26].

Hinzu kommen weitere Kriterien, wie Plastikadhärenz in der Kultur und Differenzierbarkeit in verschiedene Gewebe wie Knochen, Knorpel und Fett [26].

Diese Kriterien wurden durch die vorliegenden Ergebnisse (vgl. 7.2) erfüllt, sodass von dem tatsächlichen Vorliegen von Stammzellen nach den genannten Kriterien ausgegangen werden konnte.

Die eigenen durchflusszytometrischen Ergebnisse glichen weitgehend den Resultaten anderer Arbeitsgruppen. Kono, S. et al. untersuchten DFATs und ASCs aus omentalem Fettgewebe von 24 Katzen auf CD 44+, CD 90+ und CD 105+. Negativ dagegen waren bei ihnen ebenfalls CD 34- und CD 45- [16].

Kishimoto, N. et al. führten eine Charakterisierung an ASCs und DFATs aus menschlichem bukkalen Fettgewebe (n=1) durch und wiesen Stammzeleigenschaften nach [27]. Beide Zellarten waren auch positiv für CD 90 und CD 105 und negativ für die hämatopoetische Zelllinie CD 11b (monocyte marker), CD 34 (hematopoietic progenitor cell marker) und CD 45 leukocyte common antigen) und erfüllten die genannten Kriterien für Stammzeleigenschaften [26, 28, 29].

Die Studie von Song, N., et al. an DFATs aus humanem bukkalen Fettgewebe, entnommen bei maxillofazialen Eingriffen, bestätigte neben CD 105+ und CD 34-, dass die Endothelzell-Marker CD 31(platelet endothelial cell adhesion molecule) [30] und CD 146 (melanoma cell adhesion molecule) [31] bei DFATs nicht exprimiert wurden [2].

Bei den Arbeiten von Watson, J.E. et al. [32] und Gao, Q. et al. [3] zeigten sich geringe Unterschiede. Bei Watson exprimierten 19 % der ASCs und 17,9 % der DFATs den mesenchymalen Stammzellmarker CD 105 [32], bei Gao war dieser annähernd komplett negativ [3]. Dies könnte an dem geringen Stichprobenumfang in beiden Studien mit n=1 oder aber an fehlerhaften Antikörpern gelegen haben.

Matsumoto, T. et al. führten ebenfalls eine Charakterisierung von ASCs und DFATs aus menschlichem subkutanen Fettgewebe durch und zeigten gleiche Ergebnisse [33] wie von uns gefunden. Demnach waren beide Zellarten positiv für CD44, CD 90, CD 29 (Integrin β 1), CD 13 (Aminopeptidase N) und CD 105. Nicht exprimiert wurden C 45, HLA-DR, CD 31 und CD 34. Zusätzlich untersuchten Matsumoto, T. et al. beide Zellarten auf CD 11b und CD 106 („vascular cell adhesion molecule -1“), welche auch negativ waren [33].

Interessanterweise zeigten sich bei ASCs zum Teil höhere Expressionswerte von negativen Markern als bei DFATs. CD 45, CD 31, CD 14 und besonders CD 34 wurden bei ASCs mehr exprimiert. Dies unterstützt die These, dass ASCs eine heterogenere Ausgangspopulation darstellen, welche noch glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Mastzellen und weitere Vorläuferzellen enthalten kann [34, 35].

Auch bei Matsumoto, T. et al. exprimierten 12,8 % der ASCs CD 45, die DFATs dagegen waren negativ [33]. In dieser Studie befanden sich alle untersuchten Zellen in Passage eins. Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz für die heterogenere Ausgangspopulation der ASCs sein. Durch zunehmende Passagenwechsel könnte es zu einer reineren Population bei ASCs kommen. Die in dieser Arbeit untersuchten drei bzw. sechs Spender stammten aus den Passagen zwei und drei.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sich bei beiden untersuchten Zellarten Stammzeleigenschaften nachweisen ließen. Zudem schienen DFATs eine homogenere Population von mesenchymalen Stammzellen darzustellen als ASCs.

Es haben bereits mehrere Autoren gezeigt, dass oxidativer Stress die osteogene Differenzierung verhindert. Mody, N. et al. zeigten, dass oxidativer Stress, in Form von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Xanthin/Xanthin-Oxidase, die Differenzierung von Knochenzellen verhinderte und gleichzeitig die Differenzierung von kalzifizierenden Gefäßzellen förderte [36].

Chen, C.T. et al. untersuchten die Veränderungen an Mitochondrien und antioxidativen Enzymen wie Katalase und der Superoxid Dismutase bei der osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (BM-MSCs). Exogene H_2O_2 Zufuhr bremste die Osteogenese. Eine gesteigerte Expression der Enzyme Katalase und Superoxid Dismutase führte zu einem Abfall der ROS-Konzentration [37].

In dieser Arbeit wurde das osteogene Differenzierungspotential von ASCs und DFATs von 8 Spendern unter dem Einfluss von H_2O_2 und Katalase umfassend untersucht und mittels Alizarin-Rot-Färbung und Rücklösung quantifiziert. Watson, J.E. et al. ließen ASCs und DFATs eines Spenders über 4 Wochen osteogen differenzieren [32]. Das Differenzierungsmedium war identisch zum von uns verwendeten. Alle 5 Tage wurde das Medium gewechselt und nach 4 Wochen eine Alizarin-Rot-Färbung durchgeführt. Es zeigte sich, dass DFATs über 50% größere Alizarin-Rot-Anreicherungen aufwiesen als ASCs, was für ein größeres osteogenes Differenzierungspotential der DFATs spricht [32].

Ließ sich diese Beobachtung bestätigen? Wie beeinflussten H_2O_2 und Katalase das osteogene Differenzierungspotenzial? H_2O_2 diente dabei als Beispiel für oxidativen Stress und Katalase als körpereigener Gegenspieler. Katalase ist ein Enzym, das Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser umsetzt.

Wie in Abschnitt 7.3 bereits vorgestellt zeigten sich deutliche Unterschiede im Differenzierungspotenzial bei den verschiedenen Ansätzen, jedoch nicht so gravierende Unterschiede zwischen den beiden Zellarten, wie die Arbeit von Watson, J.E., et al. es vermuten ließ.

Die Zugabe von Katalase zum osteogenen Differenzierungsmedium bewirkte sowohl bei ASCs als auch bei DFATs eine starke Zunahme des Alizarin-Rot-Gehalts (vgl. Absatz 7.3). Dabei spielte es weniger eine Rolle, ob 250 U Katalase hinzugesetzt wurden oder mit nur 125 U Katalase die halbe Menge (vgl. Abbildung 4a; Abbildung 5; Abbildung 6; Abbildung 9; Abbildung 12). Die vorhandene Katalasemenge im Ansatz schien zudem die zugesetzte Menge H_2O_2 abzupuffern. An Tag 7 lag die relative Zunahme der osteogenen Differenzierung bei den Ansätzen mit 250 U Katalase im Bereich von 60.8 bis 68 Prozent (vgl. auch Abbildung 9 und Abbildung 10). Bei den Ansätzen mit halbierter Katalase Menge, also 125 U, zeigten sich geringfügige, aber nicht signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen Zellart. Die Zunahme der Differenzierung im Vergleich zur

unbehandelten Kontrolle lag hier zwischen 45 und 70,9 Prozent (vgl. auch Abbildung 12 und Abbildung 13). Jedoch signifikant besser war die osteogene Differenzierung von ASCs im Vergleich zu DFATs an Tag 7.

Bei Betrachtung des Effekts nach 14 Tagen wurde eine deutliche Steigerung der Osteogenese bei beiden Zellarten sichtbar. Hier war kein signifikanter Unterschied bei den Zusätzen mit Katalase und H_2O_2 feststellbar, jedoch zeigte sich der Trend, dass die Kombination von Katalase + $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ einen Boostereffekt auf die osteogene Differenzierung hatte. Dabei schien es nicht relevant zu sein, ob 125 U oder 250 U Katalase zugesetzt wurden (vgl. Abbildung 18 bis Abbildung 23). Ebenfalls nicht mehr signifikant verschieden waren die Zunahmen der osteogenen Differenzierung bei den Katalase (+ H_2O_2) enthaltenden Ansätzen.

Bei alleiniger Zugabe von H_2O_2 überwog mit dessen steigender Konzentration ein negativer, toxischer Effekt auf die osteogene Differenzierung. Dabei tolerierten die ASCs nur Konzentrationen von $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ über beide Messpunkte, also Tag 7 und Tag 14, mit einem Abfall auf ca. 70% des Ausgangswerts. Dies zeigte sich auch in Abbildung 14 und Abbildung 24. Die fibroblasten-ähnliche Zellstruktur schien weitgehend erhalten zu sein und an Tag 14 war eine weitere Anreicherung von Alizarin-Rot in Abbildung 24 erkennbar. Bei höheren Konzentrationen überwog der toxische Effekt im Zeitverlauf und die Zellen gingen zugrunde. Diese Entwicklung wurde in Abbildung 15, Abbildung 16 bzw. Abbildung 25 und Abbildung 26 deutlich. Eine signifikant bessere Tolerierung hoher H_2O_2 Konzentrationen zeigte sich bei DFATs bei H_2O_2 Konzentrationen von $300 \mu\text{M}$ an Tag 7 und von $100 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{M}$ und $400 \mu\text{M}$ an Tag 14 (vgl. Abbildung 5).

Kelvin J. A. Davies untersuchte das Verhalten von Säugetierzellen auf bestimmte Konzentrationen von H_2O_2 . Dabei stellte er ein breites Spektrum an Reaktionen auf unterschiedliche H_2O_2 -Konzentrationen bei proliferierenden Zellen fest. Niedrige H_2O_2 -Mengen von bis zu $20 \mu\text{M}$ bewirkten sogar einen mitogenen, proliferativen Effekt. H_2O_2 -Konzentrationen von bis zu $150 \mu\text{M}$ hatten einen temporären

Wachstumsstop zur Folge. Im Laufe der Zeit kam es zu einer Adaptation an die oxidativen Verhältnisse [38]. Höhere H₂O₂-Konzentrationen von 250 µM bis 400 µM führten zu einem permanenten Wachstumsstop. Die Zellen überlebten diese Bedingungen zwar, jedoch war keine Proliferation mehr möglich. Eine weitere Steigerung der H₂O₂-Konzentrationen resultierte in Apoptose und sogar in Auflösung des Zellverbandes mit Nekrosen [39]. DFATs schienen diesen schädigenden Einfluss durchaus signifikant besser zu tolerieren als ASCs (vgl. Abbildung 5) Ein mitogener Effekt durch niedrige H₂O₂-Mengen schien ebenfalls vorzuliegen, da es bei den Ansätzen mit Katalase und verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen (100 µM oder 50 µM) zu einem gleichen, wenn nicht leicht höherem osteogenen Differenzierungsverhalten kommt als bei den nur Katalase enthaltenden Ansätzen. Dafür spräche ebenfalls, dass die alleinige Zugabe von 50 µM H₂O₂, welche das 2,5-fache von Davies erwähnten 20 µM H₂O₂ entspricht, nur eine marginal abfallende Differenzierung zu Folge hatte. Weitere Untersuchungen mit kleinschrittigerer H₂O₂ Zugabe müssten jedoch folgen.

Dedifferenzierte Fettzellen verzeichneten eine stärkere Osteogenese erst zwischen 7 und 14 Tagen. In diesem Zeitraum kam es bei den Ansätzen mit 250 U Katalase und H₂O₂ zu einer Zunahme der osteogenen Differenzierung von 150,7 bis 169,7 Prozent. Bei halbiertem Katalase-Menge + H₂O₂ lag der Anstieg im Bereich zwischen 167,4 und 187 Prozent. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Ansätzen. Die generell weiter fortgeschrittene osteogene Differenzierung zeigte sich auch auf den beispielhaften mikroskopischen Photographien, wo sich eine, in die Höhe wachsende, dichte angefärbte Knochenmatrix zeigte (vgl. Abbildung 37, Abbildung 38, Abbildung 41 und Abbildung 42).

Diese Beobachtung wurde auch gestützt von der Western-Blot-Analyse des osteoblastischen Differenzierungsmarkers Osteopontin (OPN). Wie in Abbildung 49 dargestellt, kam es zu einer deutlichen Expressionssteigerung von OPN bei DFATs zwischen Tag 7 und 14. Osteopontin spielt eine Rolle bei der Verankerung

von Osteoblasten an die mineralisierte Knochenmatrix. Zudem ist das Protein an der Immunmodulation und Chemotaxis beteiligt und besitzt antiapoptotische Eigenschaften [23].

Die alleinige Zugabe von H_2O_2 bei DFATs hatte, wie bereits beschrieben, einen leicht geringeren toxischen Effekt auf die osteogene Differenzierung als bei ASCs. Dies zeigte sich auch durch die Betrachtung und den Vergleich der mikroskopischen Bilder. Vergleicht man Färbeintensität und Zellstrukturen der ASCs an Tag 7 + 50 μM H_2O_2 (vgl. Abbildung 14) und Tag 7 + 100 μM H_2O_2 (vgl. Abbildung 15) zu Tag 14 + 50 μM H_2O_2 (vgl. Abbildung 24) und Tag 14 + 100 μM H_2O_2 (vgl. Abbildung 25), zeigte sich bei 50 μM eine geringe Zunahme des Alizarin-Rot-Gehalts bei gleichzeitiger Abnahme der Zelldichte. Bei 100 μM H_2O_2 dagegen waren kaum noch gefärbte Zellanteile an Tag 14 zu beobachten und die Zellen waren weniger adhären und teilweise zerstört.

Betrachtet man dagegen dieselben Ansätze der DFATs lassen sich die zuvor gemachten Aussagen ebenfalls bestätigen. An Tag 7 + 50 μM H_2O_2 (vgl. Abbildung 33) und Tag 7+ 100 μM H_2O_2 (vgl. Abbildung 34) hatte noch annähernd keine Osteogenese eingesetzt. An Tag 14 dagegen zeigte sich sowohl bei 50 μM H_2O_2 (vgl. Abbildung 43) als auch bei 100 μM H_2O_2 (vgl. Abbildung 44) eine deutlich erkennbare osteogene Matrix. Diese mikroskopischen Aufnahmen bestätigten auch die signifikant höhere Toleranz von DFATs gegenüber höherer H_2O_2 Konzentrationen als ASCs (vgl. Abbildung 5).

Neben Watson, J.E. et al. kam auch eine Studie von Kishimoto, N. et al. , welche die osteogene Differenzierungsfähigkeit dedifferenzierter Fettzellen, gewonnen aus menschlichem bukkalen Fettgewebe, untersucht hatte, zu dem Schluss, dass DFATs ein höheres osteogenes Differenzierungspotenzial besitzen als ASCs [27, 32].

Kou, L. et al. dagegen kamen zu einem anderen Schluss. Sie wiesen zwar ebenfalls die multipotenten Eigenschaften der dedifferenzierten Fettzellen durch adipogene

und osteogene Differenzierung nach, beobachteten aber ein geringeres osteogenes Differenzierungspotenzial als Adipozyten in vitro [40]. Es wurde ein ähnliches osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason und β -Glycerophosphat [41] verwendet und nach dreiwöchiger Inkubation eine Alizarin-Rot-Färbung durchgeführt. Dort zeigte sich eine limitierte Differenzierung in Osteoblasten und teilweise sogar eine gleichzeitige Redifferenzierung in Adipozyten. Diese Redifferenzierung in Adipozyten wurde bereits von Nobusue, H. und K. Kano beobachtet [42].

Die vorliegende Arbeit hat drei Limitationen. Erstens war der Stichprobenumfang mit acht Spendern relativ gering. Zweitens zeigte sich bei der Alizarin-Rot-Färbung das Problem, dass bei den vier Waschvorgängen (vgl. Abschnitt 6.2.8) manchmal bei einigen Wells Teile der angefärbten Zellrasenfläche trotz größter Sorgfalt aus den 24 Well-Platten herausbrachen. Diese gingen somit beim Waschen verloren und waren nicht Teil der quantitativen Analyse bei der Alizarin-Rot-Rücklösung mit Cetylpyridinium-Chlorid. Dieses Problem wurde durch die Doppel- bzw. Dreifachbestimmung von Wells der einzelnen Ansätze zwar kompensiert, trug aber zur größeren Streuung der Werte bei.

Das dritte Problem zeigte sich bei dem Alkalischen Phosphatase-Assay. Auf Grund einer fehlerhaften Arbeitsanweisung des Labors zur Durchführung des Assays, mussten die Ergebnisse aus fünf Versuchsreihen ausgeklammert werden und sind nicht Teil dieser Auswertung. Nach Umstellung auf ein anderes Protokoll konnte der Alkalische Phosphatase-Assay mit den restlichen drei Spendern durchgeführt werden. Statistisch verwertbare Ergebnisse konnten durch Dreifachkontrollen der jeweiligen Versuchsansätze für diese drei Spender erreicht werden.

Die Alkalische Phosphatase spielt eine Rolle bei der Knochenmatrix-Reifung und wird in dieser Phase am meisten exprimiert [43]. Wie in Abbildung 7 dargestellt ist, nahm die alkalische Phosphatase Aktivität bei beiden Zellarten unter osteogener Differenzierung im Zeitverlauf von 3 bis 14 Tagen zu. Bis auf den Ansatz mit 100 μM H_2O_2 stieg die Expression der alkalischen Phosphatase bei DFATs stärker an als bei ASCs. An Tag 14 wurden mit Ausnahme des H_2O_2 -Ansatzes (vgl. blaue Kurve, Abbildung 7) höhere Werte als in der ASC-Vergleichsgruppe erreicht. Dabei hatte sowohl Katalase, als auch die Kombination von Katalase mit H_2O_2 einen positiven Effekt auf die Aktivität. Besonders bei DFATs kam es an Tag 14 zu einem starken Anstieg. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass beide Zellarten von der Zugabe von Katalase (mit und ohne Kombination von H_2O_2) profitierten und die osteogene Differenzierung verstärkt wurde im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusätze. Auch zeigte der alleinige Zusatz von 100 μM H_2O_2 einen negativen Effekt auf die osteogene Differenzierung ohne signifikanten Unterschied zwischen ASCs und DFATs, abweichend von der Alizarin-Rot-Färbung. Dort zeigten sich besonders an Tag 14 signifikante Unterschiede einer geringeren toxischen H_2O_2 Wirkung auf DFATs im Vergleich zu ASCs (vgl. Abbildung 5).

Sakamoto, F. et al. hatten ebenfalls das osteogene Differenzierungspotential von DFATs mit hMSCs verglichen. Die Alkalische Phosphatase-Aktivität war bei beiden Zellarten unter osteogenem Differenzierungsmedium höher als in Wachstumsmedium, außerdem war ebenfalls die ALP Aktivität bei DFATs höher [44].

Auch die Western-Blot-Analyse beider Zellarten zu Tag 7 und 14 lieferte interessante Ergebnisse (vgl. Abbildung 50). An Tag 7 exprimierten die ASCs vermehrt die Alkalische Phosphatase. Auffallend war hier im Vergleich zu den vorher berichteten Ergebnissen mit 100 μM H_2O_2 , dass bei halbiertes Menge, also 50 μM H_2O_2 , die relative Proteinexpression sowohl bei ASCs als auch bei DFATs oberhalb der ASC Kontrolle lag. Bei ASCs wurde doppelt so viel ALP exprimiert, bei DFATs nahezu die dreifache Menge im Vergleich zur DFAT Kontrolle. An Tag 14

exprimierten die DFATs deutlich mehr ALP. Auch hier überwog die ALP Menge bei den Ansätzen mit 250 U Katalase mit bis zu vervierfachen Werten im Vergleich zur ASC Kontrolle. Dass die alleinige Zugabe von H_2O_2 eine verminderte ALP-Expression zur Folge hatte, deckte sich mit den Beobachtungen von Chen, C.T. et al. Sie beobachteten eine reduzierte ALP-Aktivität bei gesteigerter Menge von H_2O_2 bzw. dessen exogener Zugabe [37]. Auch diese Ergebnisse deuteten auf eine bessere Knochenmatrix-Reifung bei DFATs hin und unterstrichen den positiven Effekt von Katalase auf die Differenzierung.

Interessant war auch die Betrachtung der Expression der Isoform FoxO1, der Forkhead-Box-Proteine. Während an Tag 7 die Expression bei ASCs bis ca. vierfach gesteigert war, überwog sie an Tag 14 deutlich bei den DFATs (vgl. 7.6.1). Beim Vergleich der Proteinexpression mit der Zunahme der osteogenen Differenzierung schien FoxO eine gesteigerte Expression im Zeitraum der größten Zunahme an Knochenmasse zu verzeichnen. Gerade bei den DFATs lief die Osteogenese v.a. im Betrachtungszeitraum zwischen Tag 7 und 14 ab (vgl. Abbildung 4).

In der Literatur fanden sich verschiedene Forschungsergebnisse. Rached, M.T et al. bewerteten FoxO1 als positiver Regulator der Osteogenese durch gesteigerte Proteinsynthese und gesteigerter Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress [17].

Iyer S, et al. kamen dagegen zu dem Ergebnis, dass FoxOs die Knochenbildung durch Unterdrückung des Wnt-Signalweges dämpfen [45].

Um entstandene reaktive Sauerstoffspezies, beispielsweise produziert von Peroxisomen und Mitochondrien abzufangen, reguliert FoxO die Transkription von Antioxidantien wie mnSOD und Katalase hoch [46, 47]. Des Weiteren induziert FoxO den Zellzyklusarrest (in Abwesenheit von Insulin) und versetzt die Zellen in einen Ruhezustand [48, 49].

Außerdem wirkt sich FoxO negativ auf die Adipogenese aus durch Unterdrückung der Expression von PPAR γ [50]. PPAR γ ist ein Subtyp der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren-Familie und wird ubiquitär exprimiert. Das Protein ist ein Regulator der Adipozytendifferenzierung [24] und ist somit ein Schlüsselenzym der Adipogenese und gleichzeitig Suppressor der Osteogenese [51]. Demnach wäre eine supprimierte PPAR γ Expression zu erwarten. Jedoch zeigte sich sowohl an Tag 7 als auch an Tag 14 eine Zunahme der Expression besonders bei Zugabe von 250 U Katalase bzw. 250 U Katalase + 50 μ M H₂O₂ (vgl. 7.6.6). Möglicherweise kam es parallel durch oxidativen Stress zur Induktion von Adipogenese. Highuchi M, et al. berichteten von induzierter Adipogenese durch künstlich erzeugten oxidativen Stress durch Zugabe von exogenem H₂O₂ [52]. Außerdem beobachteten sie die Hochregulation von Antioxidantien wie SOD und Katalase während der Adipogenese in ASCs.

In der Tat war während des Beobachtungszeitraumes die Expression von mnSOD sowohl in ASCs als auch in DFATs gesteigert, interessanterweise fiel der Effekt bei alleiniger Zugabe von 50 μ M H₂O₂ am Geringsten aus (vgl. 7.6.3)

Chen CT, et al berichteten von drei- bis vierfach gesteigerten Expression von antioxidativen Enzymen wie mnSOD und Katalase 14 Tage nach osteogener Induktion von humanen bone marrow-derived MSCs [37]. Ein derartig starker Effekt ließ sich nicht bestätigen.

Arbeitsgruppen von Almeida, M. et al. untersuchten in Tierversuchen die Entwicklung von reaktiven Sauerstoffspezies und dessen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel in alternden Mäusen. Es zeigte sich, dass es aufgrund von erhöhtem oxidativen Stress zu reduzierter Knochenbildung und Knochenmineralisierung sowie vermehrter Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten kam. Zudem stieg der ROS-Gehalt mit dem Alter der Mäuse an, wie ein Vergleich von 31 Monate alten mit vier Monate alten Mäusen ergab [9, 53].

9 Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl ASCs als auch DFATs eine gute Materialquelle für die Osteogenese in vitro darstellen. Durch Zugabe von Katalase zum Differenzierungsmedium ließ sich die Osteogenese bei beiden Zellarten deutlich steigern. Die dargestellten in-vitro Ergebnisse zeigen zwar kein in allen Bereichen und Stoffwechsellagen signifikant besseres osteogenes Differenzierungspotenzial der DFATs gegenüber den ASCs, jedoch zeichnet sich ein deutlicher Trend ab. Dabei scheinen DFATs widerstandsfähiger gegenüber oxidativem Stress durch H_2O_2 zu sein. Ob sich diese Ergebnisse – auch aus den erwähnten Tierversuchen - auf den Menschen übertragen ließen, müsste durch weitere detaillierte Versuche mit Augenmerk auf das Alter der Spender und Spenderinnen untersucht werden. Wenn dem so wäre, wäre die Knochenregeneration bei alten Patientinnen und Patienten mit höherem endogenem oxidativem Stress, z.B. auch durch eine Osteoporoseerkrankung, besonders anfällig. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass DFATs oxidativen Stress in gewissem Umfang besser tolerieren können und somit für bestimmte Patientengruppen eine mindestens gleichwertige oder sogar bessere Alternative zu ASCs für zukünftige Tissue Engineered Bone Grafts darstellen.

10 Literaturverzeichnis

1. Tholpady, S.S., et al., *The cellular plasticity of human adipocytes*. Ann Plast Surg, 2005. **54**(6): p. 651-6.
2. Song, N., et al., *The perivascular phenotype and behaviors of dedifferentiated cells derived from human mature adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **457**(3): p. 479-84.
3. Gao, Q., et al., *Expression pattern of embryonic stem cell markers in DFAT cells and ADSCs*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(5): p. 5791-804.
4. Zhang, H.H., et al., *Ceiling culture of mature human adipocytes: use in studies of adipocyte functions*. J Endocrinol, 2000. **164**(2): p. 119-28.
5. Wei, S., et al., *Bovine dedifferentiated adipose tissue (DFAT) cells: DFAT cell isolation*. Adipocyte, 2013. **2**(3): p. 148-59.
6. Cadenas, E. and K.J. Davies, *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 222-30.
7. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
8. Shih, M.S., et al., *Relationship between bone formation rate and osteoblast surface on different subdivisions of the endosteal envelope in aging & osteoporosis*. Bone, 1993. **14**(3): p. 519-21.
9. 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.
10. Fraser, J.H., et al., *Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae*. Bone, 1996. **19**(3): p. 223-6.
11. Garrett, I.R., et al., *Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 632-9.
12. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
13. Nakazono, K., et al., *Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10045-8.
14. 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.
15. 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.
16. Kono, S., et al., *Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells*. Vet J, 2014. **199**(1): p. 88-96.

17. Rached, M.T., et al., *FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts*. Cell Metab, 2010. **11**(2): p. 147-60.
18. Teixeira, C.C., et al., *Foxo1, a novel regulator of osteoblast differentiation and skeletogenesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(40): p. 31055-65.
19. Goettsch, C., et al., *NADPH oxidase 4 limits bone mass by promoting osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 2013. **123**(11): p. 4731-8.
20. Mouche, S., et al., *Reduced expression of the NADPH oxidase NOX4 is a hallmark of adipocyte differentiation*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(7): p. 1015-27.
21. Warner, H.R., *Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease*. Free Radical Biology and Medicine, 1994. **17**(3): p. 249-258.
22. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1583-606.
23. Komori, T., *Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors*. J Cell Biochem, 2006. **99**(5): p. 1233-9.
24. Chawla, A. and M.A. Lazar, *Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1786-90.
25. Rahman, S., et al., *beta-catenin directly sequesters adipocytic and insulin sensitizing activities but not osteoblastic activity of PPARgamma2 in marrow mesenchymal stem cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51746.
26. 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.
27. Kishimoto, N., et al., *The osteoblastic differentiation ability of human dedifferentiated fat cells is higher than that of adipose stem cells from the buccal fat pad*. Clin Oral Investig, 2014. **18**(8): p. 1893-901.
28. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 726-36.
29. Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2739-49.
30. Douaisi, M., et al., *CD31, a Valuable Marker to Identify Early and Late Stages of T Cell Differentiation in the Human Thymus*. J Immunol, 2017. **198**(6): p. 2310-2319.
31. Elshal, M.F., et al., *CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2923-4.
32. Watson, J.E., et al., *Comparison of Markers and Functional Attributes of Human Adipose-Derived Stem Cells and Dedifferentiated Adipocyte Cells*

- from Subcutaneous Fat of an Obese Diabetic Donor*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2014. **3**(3): p. 219-228.
33. Matsumoto, T., et al., *Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential*. J Cell Physiol, 2008. **215**(1): p. 210-22.
 34. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
 35. Yoshimura, K., et al., *Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates*. J Cell Physiol, 2006. **208**(1): p. 64-76.
 36. Mody, N., et al., *Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(4): p. 509-19.
 37. 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.
 38. Wiese, A.G., R.E. Pacifici, and K.J. Davies, *Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells*. Arch Biochem Biophys, 1995. **318**(1): p. 231-40.
 39. Davies, K.J., *The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress*. IUBMB Life, 1999. **48**(1): p. 41-7.
 40. Kou, L., et al., *The phenotype and tissue-specific nature of multipotent cells derived from human mature adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **444**(4): p. 543-8.
 41. Nobusue, H., T. Endo, and K. Kano, *Establishment of a preadipocyte cell line derived from mature adipocytes of GFP transgenic mice and formation of adipose tissue*. Cell Tissue Res, 2008. **332**(3): p. 435-46.
 42. Nobusue, H. and K. Kano, *Establishment and characteristics of porcine preadipocyte cell lines derived from mature adipocytes*. J Cell Biochem, 2010. **109**(3): p. 542-52.
 43. Kasperk, C., et al., *Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(8): p. 2511-7.
 44. Sakamoto, F., et al., *The utility of human dedifferentiated fat cells in bone tissue engineering in vitro*. Cytotechnology, 2015. **67**(1): p. 75-84.
 45. Iyer, S., et al., *FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling*. J Clin Invest, 2013. **123**(8): p. 3409-19.
 46. van der Horst, A. and B.M. Burgering, *Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(6): p. 440-50.
 47. Salih, D.A. and A. Brunet, *FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(2): p. 126-36.
 48. Kops, G.J., et al., *Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress*. Nature, 2002. **419**(6904): p. 316-21.

49. Brunet, A., et al., *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. *Science*, 2004. **303**(5666): p. 2011-5.
50. Dowell, P., et al., *Convergence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Foxo1 signaling pathways*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(46): p. 45485-91.
51. 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.
52. Higuchi, M., et al., *Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes*. *Stem Cells Dev*, 2013. **22**(6): p. 878-88.
53. 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.