

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

**Modulation des osteogenen Differenzierungspotentials
mesenchymaler Stromazellen durch lichtinduzierte ($\lambda=453$ nm)
Veränderung des Redoxstatus intrazellulärer Flavine**

Dissertation

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

vorgelegt von Roman Frederic Herklotz

2020

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

gez.:

Dekan

Erstgutachter

Zweitgutachter

Zusammenfassung

Die Verwendung multipotenter mesenchymaler Stamm- sowie Stromazellen stellt seit mehr als zehn Jahren eine bedeutende Option in vielen Tissue-Engineering-basierten Anwendungen sowie zahlreichen medizinisch-regenerativen Therapieansätzen dar. Der Goldstandard in osteo-regenerativen Therapieoptionen basiert auf der Verwendung autologer Spongiosa mit den darin enthaltenen Knochenmark-Stamm- und Stromazellen (Bonemarrow-derived mesenchymal stromal cells, BMSC). Aufgrund des erhöhten Risikos unerwünschter Nebenwirkungen bei der BMSC-Gewinnung wurde bereits vor längerer Zeit damit begonnen, alternative Quellen zur Gewinnung multipotenter Zelltypen für die Nutzung in der regenerativen Medizin ausfindig zu machen. Vor diesem Hintergrund traten vor einigen Jahren aus Fettgewebe gewonnene mesenchymale adipogene Stromazellen (ASCs) als Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen in den Vordergrund. Insbesondere die Fähigkeit dieser Zellen, in verschiedene gewebespezifische Zelltypen wie Fett-, Knorpel- oder auch Knochenzellen differenzieren zu können, steht im Fokus zahlreicher Untersuchungen. In der osteogenen Differenzierung von ASCs stellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) essenzielle positive sowie negative Differenzierungsfaktoren dar. Während zumeist geringe ROS-Konzentrationen einen differenzierungssteigernden Einfluss auf die Osteogenese bewirken, stellen hohe intrazelluläre Produktionsraten von ROS einen entscheidenden Osteogenese-hemmenden Faktor dar. In der Zelle werden ROS physiologisch durch unterschiedliche redoxrelevante Enzymsysteme gebildet, die allesamt redoxaktive Flavinreste beinhalten. Dazu zählen u. a. Enzyme aus der Familie der NADPH-Oxidasen (NOX), die Xanthin/Hypoxanthin-Oxidase, aber auch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, wie die NADH-Dehydrogenase. Die Forschung deutet außerdem daraufhin, dass diese physiologischen Akteure unter dem Einfluss unterschiedlicher Umweltbedingungen (Ernährung, Medikamenteneinnahme, Umwelttoxinen, Alterungsprozesse) supraphysiologisch hohe ROS-Raten generieren können und so eine negative Auswirkung auf unterschiedliche biologische Prozesse initiieren können, so z. B. auch in der osteogenen Differenzierung von ASCs. Im Rahmen unterschiedlicher Forschungsprojekte der die aktuelle Promotionsarbeit betreuenden Einrichtung konnte erarbeitet werden, dass Bestrahlung von Zellen mit annähernd monochromatischem blauem Licht einer Wellenlänge von circa 450 nm über eine Interaktion mit in diesem Lichtspektrumbereich absorbierenden Flavinstrukturen zu einer stark erhöhten intrazellulären Generierung von ROS führte. Blaues Licht stellt somit ein interessantes Werkzeug in der

Untersuchung der Rolle Flavin-haltiger Enzyme sowie der durch sie generierten ROS in unterschiedlichen Prozessen der Zelle dar. Im Rahmen der hier vorgestellten Studie habe ich mir zum Ziel gesetzt, blaues Licht als Werkzeug erstmals auch an normalen sowie osteogen-induzierten humanen ASC-Primärkulturen einzusetzen und seine Wirkung auf die Vitalität, mitochondriale Aktivität, ATP-Synthese, Parameter der Glykolyse sowie Faktor-induzierte Osteogenese der ASC-Kulturen zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Versuche konnte ich feststellen, dass die von mir genutzte Strahlungsbelastung der Zellen durch blaues Licht keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte. Ich konnte aber zeigen, dass blaues Licht effektiv alle relevanten Parameter der Atmungskette (basale Aktivität, maximale Respiration, zusätzliche respiratorische Kapazität, ATP-Produktion) signifikant reduzieren konnte. Dieser Licht-induzierte Status der erwähnten mitochondrialen Parameter war temporär begrenzt (ca. 48 bis 72 Stunden) und völlig reversibel. Darüber hinaus führte die blaues-Licht-Flavin-Interaktion auch zur einer zeitlich begrenzten und reversiblen Reduktion von Aktivitätsparametern des lysosomalen Metabolismus. Parallel zu diesen Befunden konnte ich feststellen, dass blaues Licht signifikant die Faktor-induzierte Osteogenese humaner ASC-Kulturen hemmen konnte, was im Umkehrschluss auf eine pathophysiologische Rolle einer erhöhten Flavin-gesteuerten ROS Generierung hindeutet und die Annahme einer negativen Rolle oxidativen Stresses auf die Osteogenese weiter stärkt.

Abstract

The use of multipotent mesenchymal stem cells and stromal cells has been a significant option in many tissue engineering-based applications and numerous medical-regenerative therapy approaches for more than ten years now. The gold standard in osteo-regenerative therapy options is based on the use of autologous cancellous bone marrow stem and stroma cells (BMSC). Due to increased risk for the occurrence of undesired side effects in BMSC production, alternative sources for the production of multipotent cell types to be used in regenerative medicine were already identified. Against this backdrop, mesenchymal adipogenic stromal cells (ASCs) derived from adipose tissue came to the fore a few years ago, and these cells are the subject of many current research efforts. In particular, their ability to differentiate into different tissue-specific cell types such as fat, cartilage or bone cells is the focus of numerous research investigations. In the osteogenic differentiation of ASCs, reactive oxygen species (ROS) are essential positive and negative differentiation factors. While low ROS concentrations have an increasing influence on osteogenesis, high intracellular production rates of ROS are a decisive factor in inhibiting osteogenesis. In the cell, ROS are physiologically formed by different redox-relevant enzyme systems, which all contain redox-active flavin residues. These include enzymes from the family of NADPH oxidases (NOX), the xanthine/hypoxanthine oxidase, but also enzymes of the mitochondrial respiratory chain, such as NADH dehydrogenase. However, research suggests that these physiological players can generate supraphysiologically high ROS rates under the influence of different environmental conditions (nutrition, drugs, environmental noxae, aging processes) and thus initiate a negative effect on a wide range of biological processes, also in the osteogenic differentiation of ASCs. Several research projects based at the institution supervising the current PhD thesis, were able to show that the irradiation of cells with monochromatic blue light of a wavelength of about 450 nm led to a strongly increased intracellular generation of ROS via interaction with flavin structures absorbing in this light spectrum range. Blue light is therefore a promising tool for determine the role of flavin-containing enzymes and the ROS generated by them in different cellular processes. The study presented here is the first to use blue light as a tool in normal and osteogen-induced human ASC primary cultures so as to characterize its effect on vitality, mitochondrial activity, ATP synthesis and factor-induced osteogenesis of ASC cultures. My experiments showed that the blue light irradiation I used had no significant effect on the vitality of the cells. However, I was able to show that blue

light could significantly reduce all relevant parameters of the respiratory chain (basal activity, maximum respiration, additional respiratory capacity, ATP production). This light-induced status of the mentioned mitochondrial parameters was temporarily limited (it lasted for about 48 to 72 hours) and completely reversible. Interestingly, the blue-light-flavin interaction also led to a temporary and reversible reduction of activity parameters of the lysosomal metabolism. Along the lines of these findings, I found that blue light was able to significantly inhibit factor-induced osteogenesis in human ASC cultures, which in turn suggests a pathophysiological role of increased flavin-regulated ROS generation and further supports the assumption of a negative role of oxidative stress in osteogenesis.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
β-Gly	β-Glycerophosphat
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ASC	Adipogen-derived mesenchymal stromal cell (adipogen gewonnene mesenchymale Stromazelle)
ATP	Adenosintriphosphat
BMSC	Bonemarrow-derived mesenchymal stromal cell
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
cm	Centimeter
cm²	Quadratcentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DUOX	Dual Oxidase
ERK	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone

FCS	Fetal Calf Serum
Fe	Molekulares Eisen
FHL2	Four and a half LIM domains protein 2
FoxO	Forkhead-box-O
g	Erdbeschleunigung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HLA	Human leukocyte antigen
J	Joule
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCL	Kaliumchlorid
L	Links (Chiralität)
l	Liter
LED	Light-Emitting Diode
M	Molar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
miR-21	MicroRNA-21
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
MSC	Mesenchymale Stromazelle
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH Oxidase
OCR	Oxygen consumption rate

OD600	Optical Density 600 nm
p	Probilitas, Wahrscheinlichkeit (Statistik)
p38MAPK	P38 mitogen-activated protein kinase
PBS	Phosphate-buffered Saline
PDGFR-b	Platelet-derived growth factor receptor beta
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia Hydrogenii
PLA	Processed lipoaspirate Cells
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROI	Reactive oxygen intermediate
ROM	Reactive oxygen metabolite
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
Runx2	Runt-related transcription factor 2
S	Sinister, Links (Chiralität)
Tab.	Tabelle
TAZ	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
THz	Terahertz
UV	Ultraviolett
UVS	Ultraviolette Strahlung
W	Watt

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Abstract	iii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
1. Einleitung	1
1.1 Neue Therapien durch Stammzellen.....	1
1.1.1 Mesenchymale Stromazellen.....	1
1.1.2 MSC-Terminologie.....	3
1.1.3 Klinische Anwendung von MSCs	3
1.1.4 Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells (ASC).....	4
1.1.5 Klinische Anwendung von ASCs.....	4
1.1.6 Osteogene Differenzierung.....	5
1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	6
1.2.1 Zellschäden durch ROS und oxidativer Stress	7
1.2.2 ROS als Signalmolekül.....	8
1.2.3 ROS als Differenzierungsfaktor in MSCs	9
1.2.4 Entstehung von ROS	10
1.2.5 NADPH-Oxidasen als Quellen von ROS	10
1.2.6 NADH-dehydrogenase (Komplex I)	12
1.2.7 Cytochrom-C-Reduktase (Komplex III).....	13
1.2.8 DUOX1/2.....	13
1.3 Der Einfluss von Licht auf lebende Organismen.....	14
1.3.1 Blaues Licht.....	15
1.3.2 Reduktion Flavin-haltiger Proteine durch blaues Licht.....	18
1.4 Ziele dieser Arbeit	20
2. Material	21
2.1 Verbrauchsgegenstände	21
2.2 Geräte.....	22
2.3 Chemikalien.....	24
2.4 Medien und Lösungen	26
2.5 Software.....	27
3. Methodik	28

3.1	Isolierung von ASCs.....	28
3.2	Zellkulturpflege und Passagierung	29
3.3	Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer	30
3.4	Kryokonservierung von ASCs.....	30
3.5	Auftauen von ASCs	31
3.6	Versuchsvorbereitung der ASCs	31
3.7	Bestrahlung.....	32
3.8	Osteogene Differenzierung.....	33
3.9	Darstellung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und Rücklösung	33
3.10	Aufnahme mikroskopischer Bilder.....	34
3.11	Messung des intrazellulären Lipidgehalts mittels Nilrot-Färbung	34
3.12	Aktivitätsbestimmung der NADH-Dehydrogenase mittels CellTiter-Blue®- Messung.....	35
3.13	Messung des lysosomalen Metabolismus mittels Neutral-Rot-Färbung	36
3.14	Mikroskopische Apoptosedetektion mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodidfärbung.....	37
3.15	Messung der Apoptose mittels Propidiumiodid-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie.....	38
3.16	Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mittels Agilent Seahorse XF CellMito Stress Test Kit	39
3.17	Statistische Auswertung	41
4.	Ergebnisse	42
4.1	Hoechst 33342- und Propidiumiodidfärbung nach einmaliger Bestrahlung	42
4.2	Toxizitätsmessung mittels Durchflusszytometrie.....	45
4.3	Messung des Mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mittels Agilent Seahorse XF CellMito Stress Test	47
4.4	Aktivitätsbestimmung der NADH-Dehydrogenase mittels CellTiter-Blue®- Messung nach einmaliger Bestrahlung.....	50
4.5	Aktivitätsbestimmung der NADH-Dehydrogenase mittels CellTiter-Blue®- Messung bei konsekutiver Bestrahlung.....	53
4.6	Effekt der Bestrahlung auf die osteogene Differenzierung bei regelmäßiger Bestrahlung	57
4.7	Effekt der Bestrahlung auf den intrazellulären Lipidgehalt bei regelmäßiger Bestrahlung	63
5.	Diskussion	64
	Literaturverzeichnis	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mesenchymale Stromazellen - Ursprungsgewebe und Differenzierungspotential	2
Abbildung 2: Struktur der NADPH-Oxidase 4	11
Abbildung 3: Spektrum der elektromagnetischen Strahlung.....	14
Abbildung 4: Absorptionsspektren von unbestrahlten/bestrahlten.....	18
Abbildung 5: Entkopplung Flavin-haltiger Enzyme durch blaues Licht.....	19
Abbildung 6: Funktionsweise des Agilent Seahorse XF CellMito Stress Test.....	41
Abbildung 7: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – Kontrollgruppe nach 3 Stunden.....	43
Abbildung 8: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 10 J/cm ² Gruppe 3 Stunden nach einmaliger Bestrahlung	43
Abbildung 9: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 40 J/cm ² Gruppe 3 Stunden nach einmaliger Bestrahlung	43
Abbildung 10: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 80 J/cm ² Gruppe 3 Stunden nach einmaliger Bestrahlung	44
Abbildung 11: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid - Kontrollgruppe nach 8 Stunden.....	44
Abbildung 12: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 10 J/cm ² Gruppe 8 Stunden nach einmaliger Bestrahlung	44
Abbildung 13: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 40 J/cm ² Gruppe 8 Stunden nach einmaliger Bestrahlung	45
Abbildung 14: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 80 J/cm ² Gruppe 8 Stunden nach einmaliger Bestrahlung	45
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Apoptosemessung - Kontrolle und 10J/cm ²	46
Abbildung 16: Durchflusszytometrische Apoptosemessung - Kontrolle und 40 J/cm ²	46
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Apoptosemessung - Kontrolle und 80J/cm ² -.....	47
Abbildung 18: Agilent Seahorse: Maximale Respiration.....	48
Abbildung 19: Agilent Seahorse: Basale Respiration	48
Abbildung 20: Agilent Seahorse: ATP-Produktion.....	48
Abbildung 21: Agilent Seahorse: zusätzliche respiratorische Kapazität.....	48
Abbildung 22: Agilent Seahorse: Kopplungseffizienz.....	49
Abbildung 23: Agilent Seahorse: nicht mitochondrialer Sauerstoffverbrauch	49
Abbildung 24: Agilent Seahorse: Protonenleak	49
Abbildung 25: Agilent Seahorse: Übersichtsdarstellung.....	50
Abbildung 26: CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 10 J/cm ²	51

Abbildung 27: CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 40 J/cm ²	52
Abbildung 28: CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 80 J/cm ²	52
Abbildung 29: CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung - Übersichtsdarstellung	53
Abbildung 30: Celltiter-Blue®-Messung nach regelmäßiger Bestrahlung Tag 7	54
Abbildung 31: Celltiter-Blue®-Messung nach regelmäßiger Bestrahlung Tag 14	54
Abbildung 32: Celltiter-Blue®-Messung nach regelmäßiger Bestrahlung Tag 21	54
Abbildung 33: Neutralrot-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 10 J/cm ²	55
Abbildung 34: Neutralrot-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 40 J/cm ²	56
Abbildung 35: Neutralrot-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 80 J/cm ²	56
Abbildung 36: Neutralrot-Messung nach einmaliger Bestrahlung - Übersichtsdarstellung	56
Abbildung 37: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161025	57
Abbildung 38: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161019	57
Abbildung 39: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170215	58
Abbildung 40: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170309	58
Abbildung 41: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161202	58
Abbildung 42: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161208	58
Abbildung 43: OD600 Messung am Tag 21 Spender 150924	58
Abbildung 44: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161115	58
Abbildung 45: OD600 Messung am Tag 21 Spender 171115	59
Abbildung 46: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170303	59
Abbildung 47: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170117	59
Abbildung 48: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170110	59
Abbildung 49: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161108	59
Abbildung 50: OD600 am Tag 7 alle Responder	60
Abbildung 51: OD600 am Tag 14 alle Responder	60
Abbildung 52: OD600 am Tag 21 alle Responder	60
Abbildung 53: Alizarin-Rot-S-Färbung, makroskopische Aufnahme Kontrollgruppe am Tag 21	61
Abbildung 54: Alizarin-Rot-S-Färbung, makroskopische Aufnahme 10J/cm ² -Gruppe am Tag 21	61

Abbildung 55: Alizarin-Rot-S-Färbung, makroskopische Aufnahme 40J/cm ² -Gruppe am Tag 21	61
Abbildung 56: Alizarin-Rot-S-Färbung, mikroskopische Aufnahme Kontrollgruppe am Tag 21	62
Abbildung 57: Alizarin-Rot-S-Färbung, mikroskopische Aufnahme 10 J/cm ² -Gruppe am Tag 21	62
Abbildung 58: Alizarin-Rot-S-Färbung, mikroskopische Aufnahme 40 J/cm ² -Gruppe am Tag 21	62
Abbildung 59: Nilrot-Färbung Tag 21 Kontrolle, 10 J/cm ² 40 J/cm ²	63
Abbildung 60: Beeinflussung der osteogenen Differenzierung in ASCs durch Flavinhaltige Enzyme	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktive Sauerstoffspezies	7
Tabelle 2: Verbrauchsgegenstände	22
Tabelle 3: Geräte	24
Tabelle 4: Chemikalien.....	26
Tabelle 5: Medien und Lösungen	27
Tabelle 6: Software.....	27
Tabelle 7: Bestrahlungsdosen.....	32

1. Einleitung

1.1 Neue Therapien durch Stammzellen

Stammzellen stellen seit ihrer ersten Isolierung im Jahr 1981 einen der größten Hoffnungsträger für neue Therapieansätze in fast allen medizinischen Bereichen dar. Dies spiegelt sich nicht nur in Zehntausenden wissenschaftlichen Veröffentlichungen zum Thema, sondern auch in einem deutlichen öffentlichen Interesse. Längst ist der Begriff der Stammzelle auch für medizinische Laien zum Inbegriff neuartiger Behandlungsmethoden geworden. Ihr umfangreiches therapeutisches Potenzial resultiert aus ihren grundlegenden Eigenschaften: Die Fähigkeit zur Selbsterhaltung und das Potenzial, sich in eine Vielzahl von Zellreihen auszudifferenzieren (Morrison, Shah, & Anderson, 1997). Eine wichtige Unterscheidung stellt die Einteilung in embryonale Stammzellen und adulte Stammzellen dar. Erstere sind multipotent, sie können sich in jeglichen Zelltyp differenzieren. Letztere sind pluripotent, sie können sich ausschließlich in eine Auswahl festgelegter Gewebstypen differenzieren. Während multipotente, embryonale Stammzellen zwar ein sehr breites Anwendungspotenzial aufweisen, ist ihre Verfügbarkeit jedoch ausgesprochen gering. Eine Gewinnung von Zellen aus menschlichen Embryonen zur Heilung von Kranken geht mit schwierigen ethischen Abwägungen einher. Entsprechend hoch sind die Bemühungen, alternative Quellen für therapeutisch verwertbare Stammzellen zu entdecken.

1.1.1 Mesenchymale Stromazellen

Eine vielversprechende Gruppe von adulten Stammzellen stellen mesenchymale Stromazellen (MSC) dar. Diese lassen ebenfalls auf ein breites therapeutisches Potenzial hoffen und sind aufgrund ihrer Verfügbarkeit in verschiedenen adulten Geweben, wie beispielsweise Knochenmark, Nabelschnur und Fett, einfacher zu gewinnen (Ding, Shyu, & Lin, 2011). Entsprechend der Definitionskriterien für adulte Stammzellen sind sie pluripotent und können sich selbst erhalten. In vivo zeigen sie die Fähigkeit, sich in verschiedene mesenchymale Zellreihen wie Knochen, Knorpel, Sehnen, Fett und Knochenmarksstroma zu differenzieren. Es wird vermutet, dass MSCs durch ihre Fähigkeit, sich in die genannten Zellreihen zu differenzieren, einen entscheidenden Beitrag zur Regeneration von Geweben leisten. Details zu ihrer Wirkweise in dieser Funktion sind jedoch noch weitgehend ungeklärt (Phinney &

Prockop, 2007). Neben ihren Differenzierungseigenschaften bieten MSCs noch weiteres therapeutisches Potenzial. So konnten beispielsweise zahlreiche immunmodulatorische Effekte durch MSCs nachgewiesen werden (Bonewald et al., 2003; Strioga, Viswanathan, Darinkas, Slaby, & Michalek, 2012). Diese werden vornehmlich durch die parakrine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf umliegendes Gewebe reguliert und nehmen so beispielsweise Einfluss auf Entzündung, oxidativen Stress und Apoptose (Strioga et al., 2012). Durch diese vielseitigen Eigenschaften sind MSCs Teil umfangreicher Forschungsbemühungen, die sich neben verschiedenen Aspekten der Gewebsregeneration auch mit der Behandlung von Autoimmunerkrankungen auseinandersetzen (Bernardo & Fibbe, 2013; Di Nicola et al., 2002). Sowohl für Forschungs- als auch Therapiezwecke lassen sich MSCs nach ihrer Extraktion aus dem Gewebe in Zellkulturen ansiedeln. Dabei zeigen sie einen festen Phänotyp und wachsen als Monolayer auf Plastik. Durch eine Anpassung der Kulturbedingungen kann eine Differenzierung zu Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe ausgelöst werden (Pittenger et al., 1999). Regelmäßig weisen MSCs die Oberflächenmoleküle CD105, CD73 und CD90 auf, während die Oberflächenmoleküle CD45, CD34, CD14, Cd11b, CD79alpha, CD19 und HLA-DR nicht ausgeprägt sind (Dominici et al., 2006). Ein universeller Marker und eine damit verbundene einfache Identifizierungsmöglichkeit konnten bisher nicht gefunden werden.

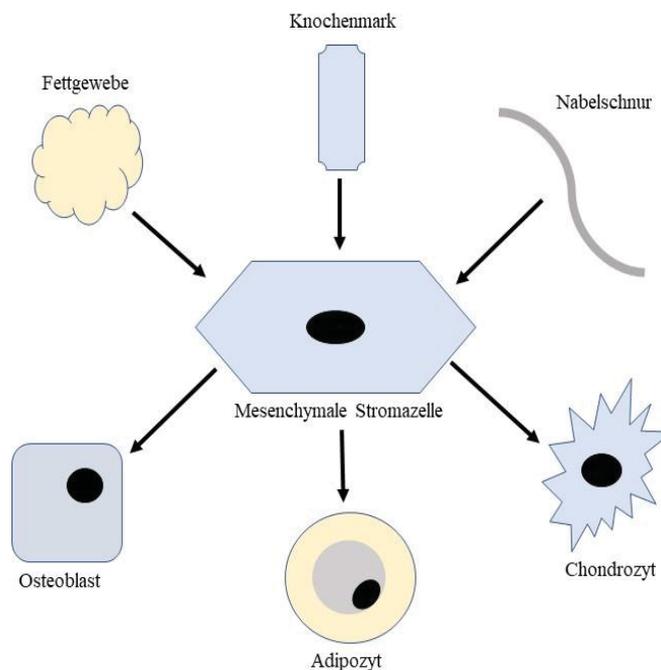


Abbildung 1: Mesenchymale Stromazellen - Ursprungsgewebe und Differenzierungspotential, eigene Darstellung

1.1.2 MSC-Terminologie

Aus Knochenmark oder anderen Geweben gewonnene plastikadhärente Zellen, welche keiner weiteren Fraktionierung unterlaufen sind, präsentieren sich teils heterogen und erfüllen nicht durchgehend die oben genannten Kriterien für Stammzellen. Die Bezeichnung einer nicht fraktionierten Zellkolonie als „mesenchymale Stammzellen“ würde folglich nicht ihren biologischen Eigenschaften entsprechen. Horwitz et al. etablierten zur Klärung dieses Mangels an Präzision den Begriff der „multipotenten mesenchymalen Stromazelle“. Diese kann ebenfalls mit MSC abgekürzt werden (Horwitz et al., 2005). In dieser Arbeit werde ich dieser präziseren Terminologie folgen und für die genutzten, aus Fettgewebe gewonnenen Zellen, den Namen „Adipogen-derived mesenchymal stromal cell“ (ASC) nutzen.

1.1.3 Klinische Anwendung von MSCs

Das weitreichende klinische Potenzial und die extensive wissenschaftliche Aufarbeitung von MSCs spiegelt sich in umfangreichen klinischen Anwendungsversuchen. Nach vielversprechenden Experimenten am Tiermodell (Galipeau & Sensebe, 2018) hat bereits eine Vielzahl an klinischen Verträglichkeits- und Machbarkeitsstudien stattgefunden. Diese nutzten vorwiegend allogene, also aus dem Körper des Patienten stammende MSCs, welche nach Entnahme und Aufarbeitung meist intravenös, intraartikulär oder intrathekal zugeführt wurden. Es erfolgten beispielsweise klinische Versuche bei Patienten mit Schlaganfall (Steinberg et al., 2016), rheumatoider Arthritis (Ghoryani et al., 2019), Arthrose (de Windt et al., 2017; Jo et al., 2014; Song et al., 2018), Herzinsuffizienz (Bartolucci et al., 2017), multipler Sklerose (Dahbour et al., 2017; Harris et al., 2018) und COPD (Weiss, Casaburi, Flannery, LeRoux-Williams, & Tashkin, 2013). Trotz teils vielversprechender Ansätze berichten Galipe et al., dass die Ergebnisse dieser Studien derzeit noch hinter den Erwartungen zurückbleiben. Weiterführende Forschung über die grundlegenden Mechanismen von Proliferation und Differenzierungsverhalten von MSCs erscheint essenziell, um deren therapeutisches Potenzial auszuschöpfen.

Ein weiterer limitierender Faktor für eine umfangreiche klinische Anwendung von MSCs liegt in der Methode ihrer Gewinnung. Diese erfolgte bisher vorwiegend aus Knochenmarksaspirat. So genannte „Bonemarrow-derived mesenchymal stromal cells“ (BMSCs) sind weitgehend etabliert und im Rahmen zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten erforscht. Die notwendige Knochenmarkspunktion geht jedoch teils mit Schmerzen, niedriger Ausbeute

und gesundheitlichen Komplikationen einher (Via, Frizziero, & Oliva, 2012). Dies mag gegenüber der Gewinnung von embryonalen Stammzellen zwar weiterhin die attraktivere Option sein, für großflächige Behandlungsansätze scheint jedoch weiterhin Bedarf an besser zugänglichem Ursprungsgewebe von MSCs zu bestehen.

1.1.4 Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells (ASC)

Im Jahr 2001 gelang Zuk et al. erstmals eine Isolation multipotenter Stammzellen aus Fettgewebe. Die aus Lipoaspirat gewonnenen Zellen, welche zunächst als processed lipoaspirate cells (PLA) bezeichnet wurden, zeigten in vitro die Fähigkeit, sich zu Knorpel-, Fett-, Knochen und Muskelgewebe zu differenzieren (Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001). Umfangreiche Untersuchungen legten nahe, dass PLAs deutliche Übereinstimmungen in Funktion, Phänotyp und Differenzierungspotenzial mit MSCs zeigen (Bodle, Hanson, & Lobo, 2011; De Ugarte et al., 2003; Gronthos et al., 2001). Entsprechend wurde der Begriff „Adipose tissue-derived MSCs“ (ASCs) etabliert. Für eine alternative Bedeutung der Abkürzung ASC siehe Kapitel 1.1.2. ASCs bieten deutliche Vorteile in der Verfügbarkeit gegenüber den aus dem Knochenmark gewonnenen BMSCs. Sie können einfacher, sicherer und in größeren Mengen aus gut zugänglichem Fettgewebe oder ungenutzten Liposuktionsabfällen gewonnen werden (Aust et al., 2004; Gimble & Guilak, 2003; Strioga et al., 2012). Trotz der großen Übereinstimmung ihrer biologischen Eigenschaften können bei ASCs und BMSCs gewisse Unterschiede gezeigt werden. Diese beinhalten das jeweilige Differenzierungspotenzial, die immunmodulatorische Wirkweise und den Phänotyp. Zu welchem Grad diese Unterschiede aus den genutzten Isolationsprotokollen und Zellpflegeverfahren resultieren, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Strioga et al., 2012). So wurde teilweise ein geringer ausgeprägtes Differenzierungspotenzial von ASCs gegenüber BMSCs in bestimmten Differenzierungslinien beobachtet (Mehlhorn et al., 2006). Die Mehrzahl der Autoren beschreibt das Differenzierungsverhalten jedoch als gleichwertig (Bodle et al., 2011).

1.1.5 Klinische Anwendung von ASCs

Ähnlich den BMSCs finden sich bei ASCs zahlreiche Ansätze für neue Therapieverfahren. Viele Versuche widmen sich dabei dem Bereich des *Tissue Engineering*. Dies bezeichnet das Einbringen von zellbesiedelten Polymeren, sogenannten *Scaffolds*, in einen lebenden

Organismus (Vacanti et al., 1988). Aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit und ihrer umfangreichen Differenzierungseigenschaften sind ASCs ein vielversprechender Zelltyp, um diese Rolle einzunehmen. Erwähnenswert sind hier beispielsweise Anwendungsversuche bei Knochendefekten (Bodde et al., 2011), Knorpelschäden (Gu, Li, Yin, & Yang, 2018), Endothelschäden (DiMuzio & Tulenko, 2007) und Herzmuskelgewebedefekten (Choi, Matsuda, Dusting, Morrison, & Dilley, 2010). Ähnlich den MSCs scheint das volle Potenzial jedoch noch unerreicht, da bisherige Ergebnisse die hohen Erwartungen noch nicht erfüllen können. Bajek et al. führen dies auf die unterschiedlichen ASC-Kulturen zurück, welche sich durch individuelle Isolationsmethoden und das Fehlen eines universellen Stammzellmarkers teils recht heterogen präsentieren (Bajek et al., 2016). Entsprechend scheint auch hier ein besseres Grundverständnis erforderlich, um das regenerative Potenzial von ASCs in größerem Maße zu nutzen.

1.1.6 Osteogene Differenzierung

Von besonderem therapeutischem Interesse ist die Differenzierung von ASCs zu Knochengewebe. Diese kann in vitro über einen von zwei grundsätzlichen Stimuli erfolgen. So kann zum einen mittels mechanischer Reize die physikalische Situation in lebendem Knochengewebe imitiert werden und damit ein Differenzierungsanreiz gesetzt werden. Alternativ kann dies mittels chemischer Stimulation erfolgen (Grottkau & Lin, 2013). Für eine solche Differenzierung mittels chemischer Stimulation konnte ein Nährmedium etabliert werden, welches durch Zusatz von Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure entsprechende Differenzierungsreize setzt (Langenbach & Handschel, 2013).

Die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen sind dabei von besonderem wissenschaftlichem Interesse. Hamidouche et al. beschreiben im Jahr 2008 erstmals eine grundlegende, durch Dexamethason ausgelöste, regulatorische Signalkaskade. Diese beruht auf einer Hochregulation des *Four and a half LIM domains protein 2* (FHL2), einem Mitglied der LIM Proteinfamilie. FHL2 stimuliert die Expression des Osteoblasten-Transkriptionsfaktors *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), wodurch eine osteogene Differenzierung eingeleitet wird (Hamidouche et al., 2008). Eine synergistische Wirkung auf diesen Signalweg wird dabei dem β -catenin ähnlichen Molekül *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* (TAZ) (Hong et al., 2009) sowie der *mitogen-activated protein kinase*

(MAPK) *phosphatase-1* (MKP-1) zugeschrieben (Phillips, Gersbach, Wojtowicz, & Garcia, 2006).

Ascorbinsäure ermöglicht als Cofaktor der Kollagensynthese die Entstehung einer kollagenreichen extrazellulären Matrix, welche für die osteogene Differenzierung ein essenzieller Bestandteil ist (Franceschi & Iyer, 1992; Xiao et al., 2002).

Die Zugabe von β -Glycerophosphat stellt eine Quelle für nichtorganisches Phosphat dar. Dieses wird zur Bildung von Hydroxylapatit, einem essenziellen Teil der anorganischen Substanz des Knochens, benötigt. Zudem wirkt anorganisches Phosphat unter anderem regulatorisch auf das Osteopontin-Gen, welches an der osteogenen Differenzierung beteiligt ist (Fatherazi et al., 2009; Tada, Nemoto, Foster, Somerman, & Shimauchi, 2011).

Obwohl die Anwendung des oben genannten Differenzierungsmediums unter Forschungsbedingungen gute Ergebnisse erzielt, weist sie gewisse Einschränkungen für klinische Anwendungen auf. So müssen Zellen mehrere Wochen mit teils kostspieligen Wachstumsfaktoren behandelt werden, welche neben den gewünschten Effekten auch ungewollte Reaktionen in kultivierten Zellen hervorrufen können (Grottkau & Lin, 2013).

Zudem birgt die Anwendung von größeren Konzentrationen β -Glycerophosphat das Risiko, in Testverfahren, welche den Grad der osteogenen Differenzierung bewerten, falsch positive Ergebnisse zu erzeugen. Dies resultiert aus der Eigenschaft, nicht osteogen differenzierende Zellen zur Bildung von dystrophen, nicht-apatit Mineralisationen anzuregen (Bonewald et al., 2003). Zur Darstellung von Knochenmatrix werden die Alizarin-Rot-S-Färbung, welche an Calcium bindet, und die von-Kossa-Färbung, welche an Phosphat bindet, genutzt. Diese zeigen im Falle einer dystrophen, nicht-apatit Mineralisationen falsch positive Ergebnisse (Bonewald et al., 2003). Bessere Kenntnis über Differenzierungsmechanismen und deren Stimuli ist für eine therapeutische Anwendung wünschenswert.

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Als potenziell einflussreicher Differenzierungsfaktor von MSCs stehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) seit geraumer Zeit im Fokus wissenschaftlicher Arbeit. Die Abkürzung ROS resultiert dabei aus dem englischen Begriff *reactive oxygen species*. Zunächst möchte ich auf Arten, Entstehung und Funktion der ROS eingehen.

ROS, synonym auch als *reactive oxygen metabolites* (ROMs) oder *reactive oxygen intermediates* (ROIs) bezeichnet (Li, Jia, & Trush, 2016), sind eine Gruppe von kleinen Molekülen, welche von molekularem Sauerstoff abstammen und eine hohe chemische Reaktionsfreudigkeit mit einer Vielzahl von Zellstrukturen zeigen (Atashi et al., 2015). Wichtige nennenswerte Vertreter sind beispielsweise Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikale (OH^{\bullet}), Hydrogenperoxid (H_2O_2), Peroxylradikale (ROO^{\bullet}), singulärer Sauerstoff (1O_2) und organisches Hydroperoxid ($ROOH$) (Atashi et al., 2015) (Li et al., 2016).

Freie Radikale	Summenformel	Halbwertszeit
Superoxid-Anion (=Hyperoxid Anion)	$O_2^{\bullet-}$	10^{-6} s
Hydroxyl-Radikal	HO^{\bullet}	10^{-10} s
Hydroperoxylradikal	HOO^{\bullet}	17s
Alkoxyradikal	RO^{\bullet}	10^{-6} s
Peroxylradikal	ROO^{\bullet}	17s
Nicht-Radikale	Summenformel	Halbwertszeit
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	stabil
Singulett Sauerstoff	1O_2	10^{-6} s
Ozon	O_3	Sekunden
Hypochlorit-Anion	$HOCL$	stabil (Minuten)

Tabelle. 1: Reaktive Sauerstoffspezies modifiziert nach Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015

1.2.1 Zellschäden durch ROS und oxidativer Stress

Über Jahrzehnte war vornehmlich die schädliche Wirkung von ROS bekannt, da ihr hohes Interaktionspotenzial zu einer Schädigung von Zellkomponenten wie DNA, RNA, Proteinen und Fetten führen kann. Diese können zu Zellschäden, Mutationen und Apoptose führen (Li et al., 2016). Auch ihre entscheidende Rolle in Alterungsprozessen ist seit langem Inhalt

zahlreicher Untersuchungen (Beckman & Ames, 1998). Die Entdeckung von Enzymen, welche zum ROS-Abbau beitragen, wie die Superoxiddismutase, die Katalase sowie Radikalfänger wie die Vitamine C und E stärkten den Eindruck, dass ROS vornehmlich als schädliches Nebenprodukt in Organismen entstehen und durch den Organismus schnellstmöglich eliminiert werden müssen (Atashi et al., 2015).

Als wichtiger Begriff im Zusammenhang mit Zellschädigungen durch ROS ist dabei *oxidativer Stress* zu nennen. Dieser Zustand bezeichnet ein Ungleichgewicht aus Entstehung und Abbau von ROS, welches zu erhöhten ROS-Konzentrationen führt. Dadurch mehren sich Schäden an Zellkomponenten (Halliwell, 1994; Sies, 2015). Grundlegend kann hierfür sowohl ein vermehrtes Anfallen von ROS, als auch ein verminderter Abbau verantwortlich sein (Halliwell, 1994; Sies, 2015). Während moderate Level an oxidativem Stress zunächst verändertes zelluläres Verhalten und zelluläre Dysfunktion verursachen, führen höhere Dosen meist zum Zelltod (Li et al., 2016). Bei zahlreichen Krankheiten konnte oxidativer Stress als Teil des Pathomechanismus identifiziert werden. So finden sich beispielsweise erhöhte ROS-Level bei kardiovaskulären Erkrankungen (Senoner & Dichtl, 2019), Diabetes Mellitus (Ighodaro, 2018), Schädel-Hirn-Traumata (Khatri et al., 2018), Infertilität (Bisht, Faiq, Tolahunase, & Dada, 2017) und Morbus Alzheimer (Z. Chen & Zhong, 2014). Eine Bewertung, ob es sich um Folge oder Ursache der Erkrankung handelt, muss in diesem Zusammenhang jedoch stets einzeln getroffen werden.

1.2.2 ROS als Signalmolekül

Das Verständnis des Charakters der ROS wurde zunehmend in Frage gestellt, als erstmals Enzyme identifiziert wurden, deren Hauptfunktion in der ROS-Genese liegen (Bedard & Krause, 2007). Erste Vertreter dieser Gruppe waren Enzyme aus der Familie der NADPH Oxidasen (NOX). Diese generieren ROS, indem sie Elektronen von NADPH auf Sauerstoff übertragen, wodurch Superoxidradikale entstehen (Atashi et al., 2015). Neuere Überlegungen begreifen ROS nun als essenzielle Signalmoleküle, welche an zahlreichen zellulären Mechanismen beteiligt sind. Ihre Funktionen beinhalten unter anderem die Beeinflussung von zellulären Signalmechanismen, Regulation der Genexpression, zelluläre Abwehr und Einfluss auf die Zelldifferenzierung (Bedard & Krause, 2007). Die Hypothese von ROS als physiologische Signalmoleküle ist mittlerweile weitgehend anerkannt und steht im Fokus

zahlreicher Veröffentlichungen (Droge, 2002). Die Mischung aus pathologischen und physiologischen Effekten von ROS auf menschliche Zellen erscheint zunächst widersprüchlich. Um dies in Einklang zu bringen, gehen aktuelle Hypothesen von einer Balance aus, welche ein Grundlevel an ROS in Zellen benötigt, um normale Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose zu ermöglichen (Mittler, 2017). Erst eine Störung dieses Gleichgewichts und ein Zustand von oxidativem Stress führen zu zellulären Schädigungen durch ROS.

1.2.3 ROS als Differenzierungsfaktor in MSCs

Osteogene und adipogene Differenzierung in MSCs stehen in einem inversen Verhältnis, so dass die Differenzierung in eine Richtung stets eine Entwicklung der anderen Zelllinie unterdrückt (James, 2013). Zahlreiche Veröffentlichungen wiesen dabei in den letzten Jahren auf ROS als einflussreichen Differenzierungsfaktor in MSCs hin (Higuchi et al., 2013; Mateos et al., 2013; Shao et al., 2007). Dabei konnte beobachtet werden, dass osteogen differenzierte MSCs weniger intrazelluläre ROS aufweisen als adipogen differenzierte (Denu & Hematti, 2016). In folgenden Versuchen konnte durch eine künstlich herbeigeführte Steigerung der intrazellulären ROS Konzentration eine Inhibition der osteogenen Differenzierung verursacht werden (Krampera et al., 2005). Durch weitere Experimente konnte zudem eine Steigerung der adipogenen Eigenschaften beobachtet werden (Higuchi et al., 2013).

Auf molekularer Ebene zeigte sich, dass ROS Signalwege aktiviert, welche zur Gruppe der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) gehören. Dabei wurden insbesondere die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und *P38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) identifiziert (Rodrigues, Turner, Stolz, Griffith, & Wells, 2012). Zudem aktivieren sie die Expression von MicroRNA-21 (miR-21). Dies wird über *Platelet-derived growth factor receptor beta* (PDGFR-b), Akt- und MAPK-Signalwege vermittelt (Kim, Park, Song, Kim, & Sung, 2013). Es wurde festgestellt, dass insbesondere ROS, welche durch NOX gebildet wurden, eine entscheidende Rolle spielen. Diese verstärken PI3K-Signalwege und bewirken eine Hemmung von p38 MAPK (Almeida, Han, Martin-Millan, O'Brien, & Manolagas, 2007; C. T. Chen, Shih, Kuo, Lee, & Wei, 2008; Y. Wang et al., 2007). Auch der Inhibition des WNT-Signalwegs durch Forkhead-box-O (FoxO) Transkriptionsfaktoren wird eine bedeutende Rolle zugeschrieben (Almeida et al., 2007). Die Summe dieser Signale führt schließlich zu

einer Zunahme der Expression von Genen, welche eine adipogene Differenzierung bewirken.

1.2.4 Entstehung von ROS

Die Entstehungsmechanismen von ROS sind vielfältig. Neben exogenen Quellen wie beispielsweise Tabakrauch, Alkohol, bestimmten Medikamenten und Pestiziden finden sich auch viele endogene Quellen (Phaniendra et al., 2015). Ein seit langem bekannter Mechanismus ist dabei die Entstehung von ROS im Mitochondrium (Larosa & Remacle, 2018). Als wichtigste Ursprungsorte in diesem Zusammenhang sind die Komplexe I (NADH-Dehydrogenase) und III (Cytochrom-C-Reduktase) der Atmungskette zu nennen, in denen Superoxidanionen als Beiprodukte entstehen (Phaniendra et al., 2015). Inzwischen sind zudem über zehn weitere Entstehungsmechanismen von ROS im Mitochondrium bekannt (Starkov, 2008). Auch im endoplasmatischen Retikulum und in Peroxisomen fallen ROS an (Phaniendra et al., 2015). Eine weitere ROS-Quelle stellt die 5-Lipoxygenase dar, welche aus Arachidonsäure in mehreren Schritten Leukotrien A₄ synthetisiert. Im folgenden Abschnitt möchte ich auf einige relevante Quellen von ROS detaillierter eingehen.

1.2.5 NADPH-Oxidasen

Die bereits erwähnten NOX sind eine Gruppe von Transmembranproteinen, deren Hauptfunktion aus der Bildung von Superoxidanionen besteht. Ihre Subtypen lassen sich in zahlreichen Zell- und Gewebearten finden (Bedard & Krause, 2007). Bisher kategorisiert sind die Subtypen NOX 1 bis 5. Dabei zeigen alle NOX-Subtypen neben der Synthese von ROS auch gemeinsame Strukturelemente (Bedard & Krause, 2007; Lambeth, 2004). Funktionen, die durch Mitglieder der NOX erfüllt werden, stehen im Fokus vieler Untersuchungen. Bisher gibt es Anhalt für eine Beteiligung an antimikrobiellen Abwehrmechanismen (Bedard & Krause, 2007), Regulation von Zelltod und Alterung (Irani, 2000), Regulation von Zellwachstum (Burdon, 1995), Einfluss auf die Zelldifferenzierung (Atashi et al., 2015), Einfluss auf die Genexpression (Ha & Lee, 2005), Regulation von antiinflammatorischen Effekten (Bedard & Krause, 2007), sowie eine Beeinflussung zahlreicher Signalkaskaden.

Ein Subtyp der NOX-Familie mit einer wichtigen Rolle in der Osteogenese ist die NOX4, die erstmals in Zellen der Niere identifiziert und entsprechend als Renox bezeichnet wurde (Geiszt, Kopp, Varnai, & Leto, 2000; Shiose et al., 2001). Weitere Untersuchungen konnten

die NOX4 unter anderem auch in Osteoklasten, glatten Muskelzellen, hämatopoetischen Stammzellen, Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und Neuronen feststellen (Shiose et al., 2001). Während die Subtypen 1 bis 3 in ihrer Struktur starke Ähnlichkeiten aufweisen, zeigt die NOX4 deutlich weniger strukturelle Übereinstimmungen mit diesen (Bedard & Krause, 2007). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der NOX-Familie, die vornehmlich an der Zellmembran lokalisiert sind, findet sich die NOX4 auch am endoplasmatischen Retikulum, in Mitochondrien und im Zellkern (Block, Gorin, & Abboud, 2009). Der grundlegende Aufbau der NOX4 besteht, gleich den anderen Mitgliedern der NOX-Familie, aus sechs Transmembrandomänen (I bis VI). Diese enthalten zwei asymmetrisch eingefasste Häm-Strukturen, welche je ein zentrales Eisenmolekül (Fe) besitzen. Der auf der Seite des Zytoplasmas gelegene Teil umfasst eine NADPH- und eine Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) Bindungsstelle (siehe Abb. 2).

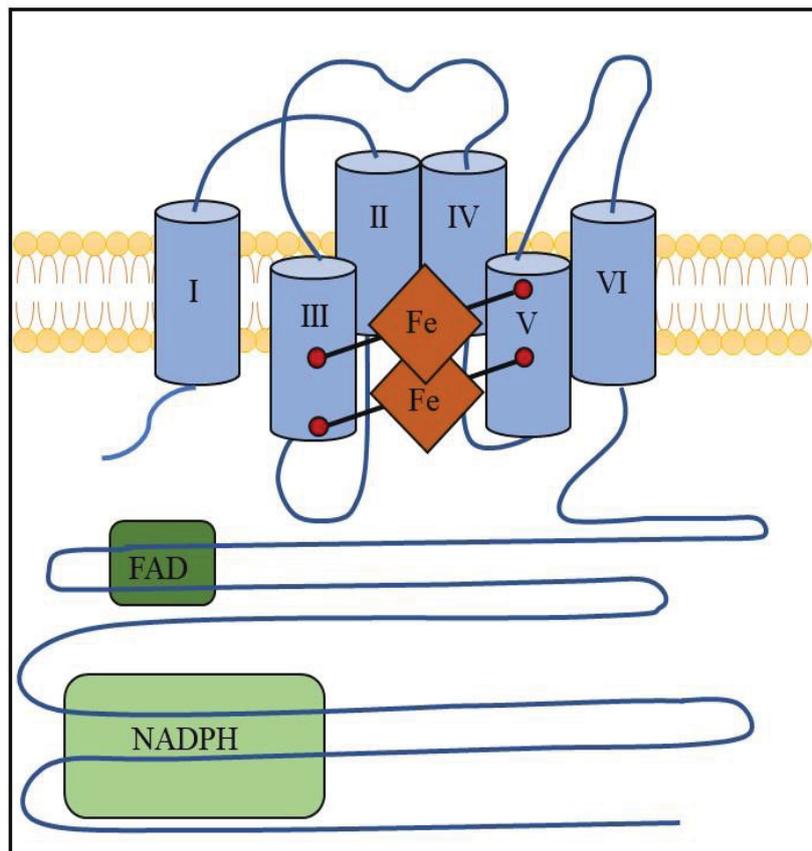


Abbildung 2: Struktur der NADPH-Oxidase 4, modifiziert nach Atashi, Modarressi, & Pepper, 2015

Details zur ROS-Synthese der NOX4 geben seit geraumer Zeit Anlass zur Diskussion. Lange wurde davon ausgegangen, dass die NOX4 gleich den NOX 1 bis 3 ebenfalls Superoxidationen synthetisiert, welche anschließend von der Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass Wasserstoffperoxid ein direktes Syntheseprodukt der NOX4 sein könnte (Nisimoto, Diebold, Cosentino-Gomes, & Lambeth, 2014). Das entstandene Wasserstoffperoxid nimmt anschließend Einfluss auf diverse Stoffwechselwege. Es wird davon ausgegangen, dass die NOX4 gebildete ROS nutzt, um unter anderem eine entscheidende regulatorische Rolle in der Zellproliferation (Mofarrahi et al., 2008) (Schroder, Wandzioch, Helmcke, & Brandes, 2009), Zellmigration (Meng, Lv, & Fang, 2008) und der Einleitung des Zelltods (Carmona-Cuenca et al., 2008; Kwon et al., 2006; Pedruzzi et al., 2004) zu spielen. Die zugrunde liegenden umfangreichen molekularbiologischen Mechanismen sind jeweils zellspezifisch (Guo & Chen, 2015).

Die Aktivität der NOX4-Aktivität wird über vielfältige Mechanismen kontrolliert. Es konnte beispielsweise ein Anstieg der mRNA-Expression der NOX4 während Phasen der Hypoxie, erhöhter Scherbelastung oder Schädigung des endoplasmatischen Retikulums gemessen werden (Bedard & Krause, 2007). Dies lässt vermuten, dass der Sauerstoffgehalt ein wichtiger Einflussfaktor auf die Aktivität der NOX4 sein könnte und ihr damit unter anderem eine Funktion als Sauerstoffsensor zuteilwerden könnte (Cross et al., 1990; Nisimoto et al., 2014).

1.2.6 NADH-dehydrogenase (Komplex I)

Dieser Enzymkomplex, welcher aufgrund seiner Stellung in der Kaskade der oxidativen Phosphorylierung auch als Komplex I bezeichnet wird, gehört zu den Oxidoreduktasen. Die Funktion der NADH-dehydrogenase besteht aus einer gekoppelten Reaktion: Zum einen die Oxidation von NADH, aus welcher letztlich eine Reduktion des Coenzym Q (Ubichinon) hervorgeht, zum anderen eine Translokation von Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum des Mitochondriums (von der Saal, 2020). Der gewonnene Protonengradient sowie die Änderung des Redoxstatus des Coenzym Q bereiten den Weg für die sich anschließenden Komplexe der Atmungskette und die resultierende Synthese von Adenosintriphosphat (ATP). Strukturell beachtenswert ist, im Kontext dieser Arbeit,

das enthaltene Flavinmononukleotid (FMN). Dieses fungiert als Akzeptor für die vom NADH ausgehenden Elektronen (von der Saal, 2020).

Im Mitochondrium stellt die NADPH-dehydrogenase eine der größten Quellen von ROS dar (Larosa & Remacle, 2018). Der genaue Entstehungsmechanismus sowie die Umstände unter denen die NADH-dehydrogenase beginnt ROS zu bilden sind bisher nicht abschließend geklärt, jedoch konnten in den letzten Jahren diverse Erkenntnisse gewonnen werden.

So scheint die NADH-dehydrogenase insbesondere dann ROS zu bilden, wenn ein „Stau“ von Elektronen in der Atmungskette entsteht und gleichzeitig NADH vorhanden ist. Dies kann beispielsweise durch Inhibitoren der Atmungskette geschehen (Larosa & Remacle, 2018). Auch eine „Rückwärtsübertragung“ der Elektronen vom Komplex II auf den Komplex I, wie sie beispielsweise bei einem sehr hohen Membranpotential vorkommt, resultiert in einer Produktion von ROS (Larosa & Remacle, 2018).

1.2.7 Cytochrom-C-Reduktase (Komplex III)

Ähnlich des oben erwähnten Komplex I findet im Komplex III zum einen ein Transport von Elektronen statt, zum anderen werden abermals Protonen in den Intermembranraum transportiert. Die Abfolge aus Redoxreaktionen wird als sogenannter Q-Zyklus bezeichnet und basiert auf Elektronenübertragungen zwischen dem im Komplex I reduzierten Ubichinol und Cytochrom c (von der Saal, 2020).

Auch an der Cytochrom-C-Reduktase lässt sich unter bestimmten Bedingungen eine Synthese von ROS nachweisen. Dabei scheint insbesondere die Lokalisation der Ubichinol-oxidierung an der ROS-Synthese beteiligt zu sein (Larosa & Remacle, 2018). Simultan zum Komplex I scheint dies vorwiegend während der Inhibierung der nachfolgenden Mechanismen, sowie unter Vorhandensein eines hohen Protonengradienten zu geschehen (Larosa & Remacle, 2018).

1.2.8 DUOX1/2

Als Dualoxidasen (DUOX) 1 und 2 bezeichnet man eine Gruppe von ROS synthetisierenden Enzymen, welche eng mit den NOX verwandt sind und erstmals in der Schilddrüse gefunden wurden (De Deken et al., 2000). Mittlerweile wurden DUOX unter anderem auch im Epithel der Atemwege (Forteza, Salathe, Miot, Forteza, & Conner, 2005), im Gastrointestinaltrakt

(El Hassani et al., 2005) und in der Prostata (D. Wang et al., 2005) nachgewiesen. Auch die Gruppe der DUOX scheint in sehr unterschiedlichen Zellmechanismen involviert zu sein. So sind beispielsweise DUOX im Epithel der Atemwege an antimikrobiellen Abwehrprozessen beteiligt (Fischer, 2009), in der Schilddrüse an der Synthese von Schilddrüsenhormonen (De Deken & Miot, 2019) sowie in der Haut an der Wundheilung.

1.3 Der Einfluss von Licht auf lebende Organismen

Unter dem Begriff Licht versteht man Energie transportierende, elektromagnetische Strahlung, welche sich in Wellenlängen bewegt, die dem menschlichen Auge sichtbar sind. Diese liegen grob zwischen 400 und 760 THz. Im erweiterten Sinne werden auch die an dieses Spektrum angrenzenden Frequenzen von Infrarot und Ultraviolett hinzugezählt, welche dem menschlichen Auge zwar nicht sichtbar sind, aber ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen (siehe Abb. 3) (Bahr et al., 2019; Paschotta, 2008).

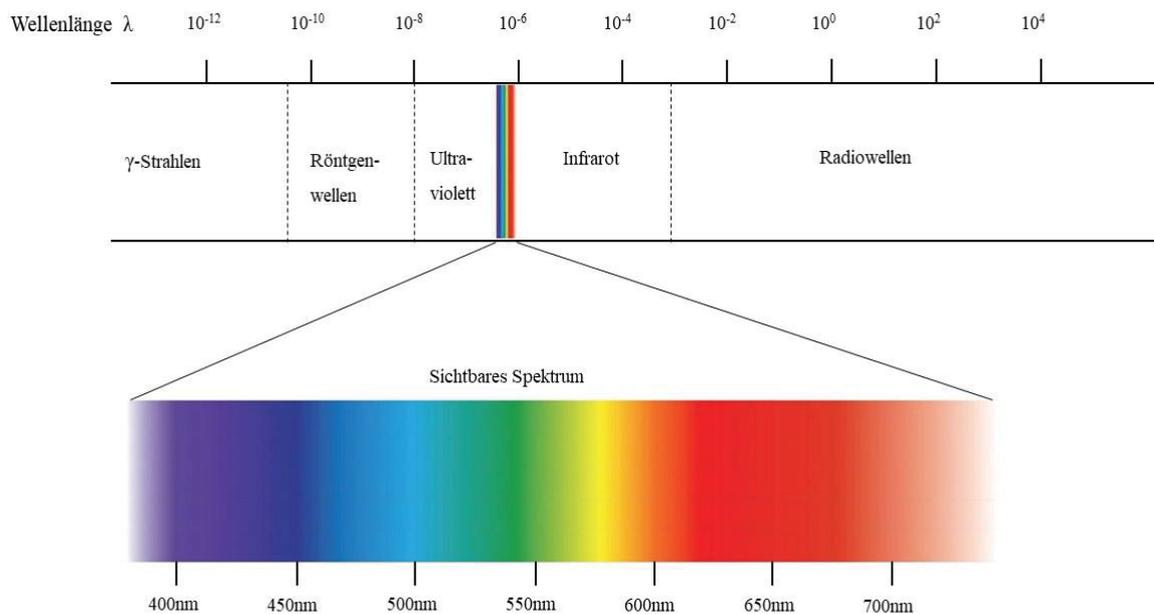


Abbildung 3: Spektrum der elektromagnetischen Strahlung modifiziert nach Bahr, Resag, & Riebe, 2019; Harten, 2017

Die Beeinflussung von lebenden Organismen durch Licht ist seit Beginn der modernen Wissenschaft von großem Interesse. In der medizinischen Forschung standen dabei lange insbesondere die Effekte von ultravioletter Strahlung (UVS) im Vordergrund. Diese beinhaltet Licht mit einer Wellenlänge zwischen 280 und 315 nm (UVB) und zwischen 315 und 380 nm (UVA). UV-Licht zeichnet sich durch seine besonders hohe Reaktionsfreudigkeit mit

lebenden Organismen aus. Nennenswerte Effekte von UV-Strahlung am Menschen sind dabei beispielsweise physiologische Prozesse wie die Synthese von Cholecalciferol (Vitamin D3). Aber auch zahlreiche pathologische Vorgänge wie die Entstehung diverser Hautkrebsarten, Beschleunigung der Zellalterung und Augenschäden (Bennett, 2008; Diffey, 1998) lassen sich beobachten. An Pathomechanismen wurden dabei unter anderem eine direkte Schädigung der DNA (Pfeifer & Besaratinia, 2012), ein Einfluss auf die Funktion von Transkriptionsfaktoren (Weatherhead, Farr, & Reynolds, 2013) und eine Steigerung von oxidativem Stress (Sage, Girard, & Francesconi, 2012) identifiziert. Auch Bestrahlung mit Wellen im Infrarotbereich zeigen Auswirkungen auf zelluläre Prozesse. So konnte eine Änderung des Redoxstatus der Cytochrom-C-Oxidase nach Bestrahlung mit infrarotem Licht beobachtet werden.

Wissenschaftliche Erkenntnisse über die Auswirkungen von Licht des sichtbaren Spektrums haben erst in jüngerer Zeit zugenommen. Von hohem Interesse sind neben potenziellen therapeutischen Anwendungen insbesondere die zu Grunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen. Entsprechend des ersten Energiegesetzes muss die Energie des Lichts von lichtempfindlichen Zielstrukturen in der Zelle, so genannten Photoakzeptoren, aufgenommen werden, um Effekte auf Zellen zeigen zu können (Losi, 2013). Dies können beispielsweise spezialisierte Photorezeptoren sein, in denen durch Licht ausgelöste Konformationsänderungen Signalkaskaden aktivieren und zelluläre Vorgänge beeinflussen (Losi, 2013). So können physiologische Vorgänge wie Phototropismus, Licht induziertes Wachstum oder circadiane Rhythmik vermittelt werden (Losi, 2013).

1.3.1 Blaues Licht

Als besonders einflussreich auf menschliche Zellen hat sich sichtbares Licht im blauen Spektrum mit einer Wellenlänge zwischen 400 nm und 500 nm erwiesen (Garza, Born, Hilbers, van Riel, & Liebmann, 2018). Während blaues Licht aufgrund seiner vielfältigen Effekte auf Zellen bereits länger in der Wissenschaft behandelt wird, steht es seit etwa einem Jahrzehnt zunehmend auch im Interesse der Öffentlichkeit. Grund hierfür sind vornehmlich die rapide steigende Verbreitung von Monitoren und Leuchtdioden, welche insbesondere die Retina einer stark erhöhten Konzentration von Licht des blauen Spektrums aussetzt (Renard & Leid, 2016). Schäden der Sehfunktion und Beeinflussung der circadianen Rhythmik durch blaues Licht werden aktuell vielseitig diskutiert (Tosini, Ferguson, & Tsubota, 2016).

Neben diesen potenziellen Risiken finden sich auch zahlreiche Hinweise für einen therapeutischen Nutzen von blauem Licht. Einige Ansätze für einen solchen Nutzen sind die antimikrobielle Wirkung im Einsatz gegen *Helicobacter-Pylori*-Besiedlungen, Wundinfektionen und Akne (Dai et al., 2012), sowie die lindernde Wirkung auf entzündliche Hauterkrankungen wie Ekzeme (Keemss et al., 2016) oder Psoriasis Vulgaris (Weinstabl, Hoff-Lesch, Merk, & von Felbert, 2011).

Die Wirkung von sichtbarem Licht auf Zellen der Retina und die daraus vermittelte Wahrnehmung von Licht ist bereits im 20. Jahrhundert ausgiebig untersucht worden. Als Photorezeptor konnte hier die Proteingruppe der Opsine identifiziert werden. Sie liegen in Zapfen- oder Stäbchenzellen vor und leiten Lichtreize über G-Protein-gekoppelte Signalwege an das zentrale Nervensystem weiter.

Erst neuere Untersuchungen hingegen geben Aufschluss auf Effekte von Licht des sichtbaren Spektrums auf nicht pigmentierte Zellen. Dabei konnten insbesondere drei Effekte beobachtet werden: eine Erhöhung der Konzentration von ROS, eine Erhöhung der Konzentration von Stickstoffmonoxid sowie eine Aktivierung G-Protein-vermittelter Signalwege (Garza et al., 2018).

Diverse wissenschaftliche Arbeiten stützen die Annahme, dass Bestrahlung mit blauem Licht eine Freisetzung von ROS bewirkt. Entstehung und Art dieser ROS werden in verschiedenen Publikationen jedoch unterschiedlich charakterisiert. Godley et al. beobachteten, dass isolierte Mitochondrien während der Bestrahlung mit blauem Licht drei Arten von ROS produzieren: Superoxidanionen, Hydroxylradikale und singulären Sauerstoff (Godley et al., 2005). Als potenzielle Quelle für diese lichtabhängige ROS-Entstehung mutmaßen die Autoren Enzyme der Atmungskette, insbesondere die Cytochrom-C-Oxidase (Godley et al., 2005). Nakashima et al. stellen ebenfalls eine erhöhte ROS-Synthese durch blaues Licht fest, sehen den Schwerpunkt aber in der Produktion von Superoxidanionen (Nakashima, Ohta, & Wolf, 2017). Aufgrund einer Reduktion der Autofluoreszenz der Haut von Mäusen nach Bestrahlung mit blauem Licht, schlussfolgern sie, dass eine Beteiligung von Flavinen in diesem Prozess vorliegt (Nakashima et al., 2017). Als Folge dieser Beobachtungen vermuten die Autoren einen bisher unterschätzten Einfluss von blauem Licht auf Alterungs- und Schädigungsprozesse der Haut.

Die Entstehungsmechanismen von Stickstoffmonoxid sind vielfältig und können in diversen menschlichen Zellen beobachtet werden. Auswirkungen von Stickstoffmonoxid auf den

menschlichen Körper sind zahlreich. Ein wichtiger Effekt, der durch Stickstoffmonoxid vermittelt wird, ist die Dilatation von Blutgefäßen und eine damit einhergehende Steigerung der Durchblutung. Eine Entstehung von freiem Stickstoffmonoxid durch blaues Licht konnte erstmals von Opländer et al. experimentell belegt werden (Opländer et al., 2013). Im Rahmen ihrer Forschungsarbeit konnten die Autoren zeigen, dass Bestrahlung mit blauem Licht einen lichtbedingten Zerfall von stickstoffhaltigen Molekülen bewirkt, welcher in einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid resultiert (Opländer et al., 2013). Bei der zunächst in vitro beobachteten Reaktion handelte es sich um eine enzymunabhängige Reaktion, welche ausschließlich in der Anwesenheit von Kupferionen stattfand (Opländer et al., 2013). Dies unterscheidet die beobachtete Reaktion grundlegend von einem UVA bedingten Zerfall von stickstoffhaltigen Verbindungen. Es kann folglich von einem neuen, bisher weniger gut verstandenen Mechanismus ausgegangen werden. Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass eine Bestrahlung von menschlicher Haut mit blauem Licht in einer deutlich gesteigerten Durchblutung resultiert (Opländer et al., 2013). Dieser Effekt ist laut den Autoren zum Teil durch den von ihnen beobachteten Zerfall von stickstoffhaltigen Verbindungen als auch durch eine Migration von Stickstoffmonoxid in tiefere Hautschichten vermittelt (Opländer et al., 2013). In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Abnahme des systolischen Blutdrucks, der arteriellen Steifheit und einer verbesserten Endothelfunktion führen (Stern et al., 2018). Auch diese Effekte waren mit einer erhöhten Konzentration von stickstoffhaltigen Verbindungen assoziiert (Stern et al., 2018). Albers et al. konnten diesen vermuteten Zusammenhang weiter manifestieren. Sie stellten fest, dass eine Bestrahlung von Probanden mit blauem Licht zu einer signifikanten Steigerung von Stickstoffmonoxid im Blutserum führte (Albers et al., 2019).

Die Zusammenschau dieser Beobachtungen könnten dazu beitragen, umfangreiche neue therapeutische Ansätze zu liefern. Bestrahlung mit blauem Licht könnte sowohl ein wirksames Mittel gegen lokale Minderdurchblutung als auch gegen arterielle Hypertonie darstellen. Eine Erhöhung der dermalen Durchblutung und Senkung des systolischen Blutdrucks durch Licht ist bereits umfassend an Licht des ultravioletten Spektrums beobachtet worden (Liu et al., 2014). Dieses ist jedoch aufgrund der schädigenden Wirkung von UV-Licht auf menschliche Zellen für therapeutischen Anwendbarkeit eingeschränkt (Bennett, 2008; Diffey, 1998).

1.3.2 Reduktion Flavin-haltiger Proteine durch blaues Licht

Die bereits mehrfach erwähnten Flavine sind eine Gruppe von Proteinen, denen ein Isoalloxazin-Ring zu Grunde liegt. Neben ihrem Vorkommen in Riboflavin, auch als Vitamin B2 bekannt, bilden sie in Form von Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN) das Redoxzentrum diverser Proteine wie den NADPH-Oxidase oder dem Komplex I der Atmungskette. Dabei stellt das Flavin einen molekularen Schalter dar, durch welchen Konformationsänderungen anderer Proteine und chemische Reaktionen reguliert werden können (Senda, Senda, Kimura, & Ishida, 2009). Dies geschieht über den Redoxstatus des Isoalloxazin-Rings. FAD und FMN können drei Redoxstatus einnehmen: oxidiert, einfach reduziert oder vollständig reduziert (Senda et al., 2009). Im oxidierten Stadium zeigt FAD ein Absorptionsmaximum bei etwa 450 nm (Garza et al., 2018). So kann Licht über eine Änderung des Redoxstatus und damit der Konformation Einfluss auf diverse chemische Reaktionen der Zelle nehmen. Einer davon ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Bouillaguet et al., 2008).

In vorangegangenen Versuchen beobachtete Julia Krassovka eine erhöhte Synthese von ROS nachdem sie Fibrozyten mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm bestrahlte. In weiterführenden Versuchen konnte sie nachweisen, dass in Wasser gelöstes FAD, welches mit 100 J/cm^2 blauen Lichts bestrahlt wurde sein Absorptionsmaximum bei 450 nm verliert. Diese Änderung der Absorptionseigenschaften ist beweisend für eine lichtbedingte Änderung des Redoxstatus.

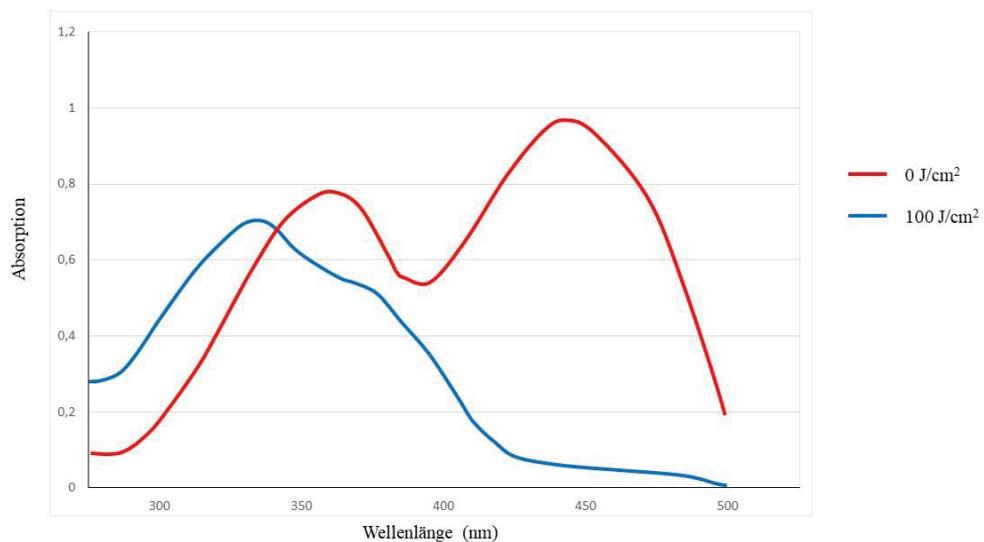


Abbildung 4: Absorptionsspektren von unbestrahlten/bestrahlten Flavinen, 100 J/cm^2 und Kontrollgruppe, modifiziert nach Krassovka, 2017

Anhand weiterer Versuche, welche auf einer Messung des NADPH⁺ Umsatzes und Proteinanalysen beruhten konnte sie folgende Hypothese aufstellen: Die Bestrahlung mit blauem Licht führt zu einer Photoreduktion Flavin-haltiger Proteine. In ROS-synthetisierenden Enzymen wie der NOX4 bewirkt diese Reduktion, dass die Enzyme in einen angeregten Zustand versetzt werden. Dies zeichnet sich dadurch aus, dass eine erhöhte Synthese des Produkts stattfindet, ohne dass das eigentlich benötigte Substrat verbraucht wird. Dieser Zustand wird als Entkopplung bezeichnet. Im Falle der NOX4 bedeutet dies, dass die Bestrahlung zu einer erhöhten Synthese von ROS führt, ohne dass NADPH oxidiert wird (Krassovka, 2017).

In der Fachliteratur finden sich ebenfalls Hinweise auf einen solchen Mechanismus. So ist beispielsweise bekannt, dass Cryptochrome durch einen ähnlichen Mechanismus funktionieren. Diese Flavin-haltigen Photorezeptoren, welche diverse Lichtabhängige Funktionen von Tieren und Pflanzen steuern, können durch Bestrahlung mit blauem Licht in einen erregten Status gelangen. In einer Redoxreaktion wird dabei ein Elektron auf ein Sauerstoffmolekül übertragen, wodurch ein Superoxidanion entsteht. Dieses wird anschließend zu Wasserstoffperoxid umgewandelt. Der Zyklus wiederholt sich, solange die nötige Energie durch Licht bereit gestellt wird (Garza et al., 2018).

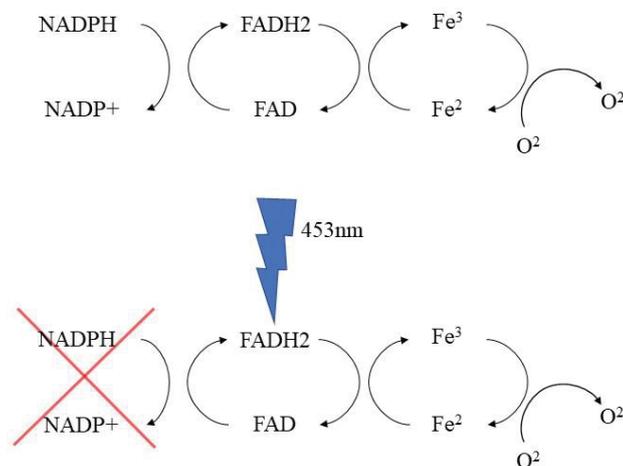


Abbildung 5: Entkopplung Flavin-haltiger Enzyme durch blaues Licht, modifiziert nach Krassovka, 2017

Dieser Mechanismus könnte zum einen das Verständnis von Licht des sichtbaren Spektrums auf menschliche Zellen verbessern. Zum andern kann er jedoch auch genutzt werden, um ein besseres Verständnis für Flavin-haltige, ROS-synthetisierende Enzyme wie die NOX4 zu entwickeln.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Stammzellbasierte Therapien bieten das Potenzial, zahlreiche Behandlungsverfahren zu revolutionieren. Insbesondere die sicher zugänglichen ASCs stellen sich als vielversprechende Kandidaten dar. Doch klinische Studien konnten die hohen Erwartungen bisweilen noch nicht vollständig erfüllen. Ein besseres Verständnis molekularer Mechanismen von Zelldifferenzierung und Proliferation könnte der Schlüssel zu einem effektiveren therapeutischen Einsatz von ASCs sein. Die osteogene Differenzierung von ASCs ist von besonderem Interesse, da dieser im Rahmen von Tissue-Engineering-basierten Anwendungen eine wichtige Rolle zukommt. Genauere Kenntnisse über molekulare Mechanismen, welche die Differenzierung beeinflussen, sind erstrebenswert. Anhand dieser könnten verbesserte Methoden entwickelt werden, um eine Differenzierung in die gewünschte Richtung zu initiieren.

Kernelement dieser Arbeit war die von Julia Krassovka beobachtete Photoreduktion von Flavin-haltigen Enzymen. Die von ihr aufgestellte Hypothese, dass Flavin-haltige Enzyme im Rahmen einer photoinduzierten Entkopplung eine erhöhte ROS-Synthese zeigen, wurde genutzt um durch Bestrahlung eine Aktivitätsänderung dieser Enzyme zu bewirken. Durch anschließende Untersuchungen konnte daraufhin eine Aussage über die Funktion und wirkweise der Enzyme und ihrer Produkte getroffen werden.

In der von mir durchgeführten Studie habe ich das blaue Licht als Werkzeug zur Substrat-unabhängigen Reduktion von Flavinresten in flavintragenden Enzymen an normalen sowie osteogen-induzierten humanen ASC-Primärkulturen eingesetzt und seine Auswirkung auf die Vitalität, mitochondriale Aktivität, ATP-Synthese sowie auf die Faktor-induzierte Osteogenese der ASC-Kulturen untersucht.

2. Material

2.1 Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstand	Hersteller
6-Well-Platte (6-well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
24-Well-Platte (6-well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
96-Well-Platte (6-well CELLSTAR® Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
CELLSTAR® 15 ml Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
CELLSTAR® 50 ml Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Einwegskalpell	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Japan
FACS-Falcon® 5 mL (Round Bottom Polystyrene Test Tube)	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
Filter, Millex-GP, 0,22 µm, Polyethersulfon	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Glasdeckplatte (1 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH; München; Deutschland
Kryoröhrchen (Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml™)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Medizinische Einmalhandschuhe (Micro-Touch® NitraTex®)	Ansell GmbH; München; Deutschland
Messzylinder 100 ml	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Messzylinder 500 ml	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Objektträger 6,6 cm x 7,6 cm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Pasteurpipetten, Glas (ISO 7712)	BRAND GmbH + CO KG; Wertheim; Deutschland

Pasteurpipetten, Plastik (Pipetten 3 ml Makro, Nr.2600111)	Ratiolab-GmbH, Pasteur-Plast
Petrischalen 100mm x 20mm	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Pipettenspitze mit Filter, 10/20 µl (Tip One)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH; Hamburg; Deutschland
Pipettenspitze mit Filter, 200 µl (Tip One)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH; Hamburg; Deutschland
Pipettenspitze mit Filter, 1000 µl (Tip One)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH; Hamburg; Deutschland
Reaktionsgefäß (SafeLock Tubes™ 0,5 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Reaktionsgefäß (SafeLock Tubes™ 1,5 ml)	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Stripetten (5 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripetten (10 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Stripetten (25 ml Corning® Costar® Shorty Stripette® Serological Pipets)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
T75 Zellkulturflasche, CELLSTAR® Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
T175 Zellkulturflasche, CELLSTAR® Cell Culture Flasks 175 cm ² red filter cap	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich
Vis Cuvette, semi micro, 3 ml	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Zellschaber, (28 cm, blau, steril, einzeln verpackt)	Greiner Bio-One GmbH; Kremsmünster; Österreich

Tabelle. 2: Verbrauchsgegenstände

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav DX-90	Systec GmbH; Linden, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland

Feinwaage (Kern 440; ABJ-N)	Kern & Sohn GmbH; Balingen; Deutschland
Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Kryo-Einfriergerät	Schmidt Laborgeräte GJM Handel und Service GmbH; Wien; Österreich
Kühlgerät Revco Ultima PLUS -86 °C	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Kühlschrank	Nalge Nunc International; Rochester (NY); Vereinigte Staaten
LED-Array Royal Blue (453 nm)	Philips GmbH Innovative Technologies; Aachen; Deutschland
Magnetrührer (IKA® RET control/t IKAMAG® safety control)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG; Staufen; Deutschland
Mikroskop (Zeiss Axiovert 40)	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Mikroskop (Zeiss Axiovert 200)	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Mikroskopkamera Axiocam MRC	Carl Zeiss AG; Oberkochen; Deutschland
Multiplattenlesegerät VICTOR™ V Multilabel Model 1420	Perkin Elmer; Waltham; Vereinigte Staaten
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik; Friedrichsdorf; Deutschland
Pipettboy Accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim; Deutschland
Pipette Eppendorf® Research® fix 0,5–10 µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Pipette Eppendorf® Research® fix 2–20µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Pipette Eppendorf® Research® fix 10–100µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Pipette Eppendorf® Research® fix 20-200µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Pipette Eppendorf® Research® fix 100-1000µl	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Photometer Biophotometer Plus	Eppendorf AG; Hamburg; Deutschland
Seahorse XFe96 Analyzer	Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten

Tischsaugpumpe	KNF Neuberger GmbH; Freiburg; Deutschland
Tischabzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG; Wangen; Deutschland
Taumelrollenmischer RM5-V 1750	Labortechnik Fröbel GmbH; Lindau; Deutschland
Vortex-Schüttler Model 444-1372	VWR®; Darmstadt; Deutschland
Warmwasserbad	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Werkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16 R	Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich; Deutschland

Tabelle. 3: Geräte

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Alizarin-Rot-S	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Antimycin A	Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
CellTiter-Blue®	Promega GmbH; Mannheim; Deutschland
Cetylpyridiniumchloride	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland

Dulbecco`s phosphate buffered Saline mit Calcium und Magnesium	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Dulbecco`s phosphate buffered Saline ohne Calcium und Magnesium	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Ethanol	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
FACS clean #340345	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FACS Puffer Flow™ #342003	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FACS Rinse #340346	BD Bioscience; Heidelberg; Deutschland
FCCP	Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten
Fetales Rinderserum	PAA Laboratories GmbH; Cölbe; Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Hoechst 33342	Pierce Biotechnology; Rockford; United States
Isopropanol	MERCK Millipore; Darmstadt; Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Kollagenase Typ1	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
L-Ascorbinsäure-2Phosphat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
NaCl	VWR® Chemicals; Radnor, USA
Neutral-Rot #553-24-2	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Oligomycin	Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten
Paraformaldehyd 4 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland

Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach; Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland
Rotenon	Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten
Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland
Spuellösung, 1000 ml	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland
Trypsin 0.5 %/EDTA 0.2 % in PBS	Biochrom GmbH; Berlin; Deutschland
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; München; Deutschland

Tabelle. 4: Chemikalien

2.4 Medien und Lösungen

Medium/Lösung	Inhaltsstoffe
Einfriermedium	Dimethylsulfoxide
	10 % Fetales Rinderserum
Kollagenase-Lösung	1,5 % Fetales Rinderserum
	0,2 % Kollagenase Typ I
	0,12 M NaCl
	0,1 M HEPES
	0,05 M KCL
	0,005 M Glucose
	0,001 M CaCl
Osteogenes Differenzierungsmedium	500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium
	10 % Fetales Rinderserum
	1 % Penicillin/Streptomycin

	1 % L-Glutamin
	0,02 % Dexamethason
	10 mM/l β -Glycerophosphat
	50 μ M/l L-Ascorbinsäure-2-Phosphat
XF Cell Mito Stress Test Kit	63 nmol Oligomycin
	72 nmol FCCP
	27 nmol Rotenon
	27 nmol Antimycin A
Zellkulturmedium	500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium
	10 % Fetales Rinderserum
	1 % Penicillin/Streptomycin
	1 % L-Glutamin

Tabelle. 5: Medien und Lösungen

2.5 Software

Verwendung	Software
FACS-Software	Cellquest Pro
Literaturverwaltung	Endnote X9
Mikroskopsoftware	Axiovision Rel. 4.8
Statistische Auswertung	GraphPad Prism 8
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel 2016
Textverarbeitung	Microsoft Word 2016

Tabelle. 6: Software

3. Methodik

3.1 Isolierung von ASCs

Die Gewinnung von ASCs erfolgte entweder aus en bloc Fettgewebe oder aus Liposuktionsresten. Diese wurden in Kooperation mit verschiedenen Kliniken direkt nach der operativen Entnahme abgeholt und gekühlt transportiert. Die Isolierung erfolgte innerhalb weniger Stunden nach der Entnahme und stets und sterilen Bedingungen. Dazu wurde zunächst die Kollagenaselösung vorbereitet (siehe Tabelle 5) und steril filtriert.

Im Falle des zusammenhängenden Fettgewebes wurde dieses zunächst freipräpariert. Es erfolgte die Entfernung von Haut und Blutgefäßen. Anschließend wurde das verbleibende Fettgewebe mit dem Skalpell in möglichst kleine Teile geschnitten. Diese wurden im Verhältnis 1:1 mit steril filtrierter Kollagenase-Lösung vermengt und in 50 ml Falcons überführt. Anschließend wurden diese für 60 Minuten in das vorgewärmte Schüttelbad gestellt. Alle zehn Minuten wurde eine zusätzliche Durchmischung von Hand durchgeführt. Nach Abschluss des Schüttelbads erfolgte eine Filtrierung durch ein autoklaviertes Nylongewebe mit 250 µm Porengröße und die Überführung in ein frisches 50 ml Falcon. Dieses wurde anschließend zehn Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Von den durch die Zentrifugation entstandenen Phasen wurden alle bis auf das Zellpellet verworfen. Die verbleibenden Zellen wurden anschließend mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate-buffered Saline, PBS) resuspendiert und abermals für zehn Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 25 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine sterile Zellkulturflasche überführt. Es erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ Luftanteil für 24 Stunden. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, um nicht adhärente Zellen und sonstige Gewebereste und Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden 30 ml frischen Zellkulturmediums beigegeben. Die Zellen wurden zur eindeutigen Identifikation mit dem Datum der Isolation und der Kennzeichnung *Passage 0* versehen und wieder in den Brutschrank gegeben.

Bei der Isolierung des Liposuktionsfettes wurde dieses zunächst für zehn Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstanden drei Phasen. Die sich in der Mitte befindende Fettschicht wurde in ein 50 ml Falcon überführt. Die anderen wurden verworfen.

Dem Fett im Falcon wurde im Verhältnis 1:1 sterile Kollagenase-Lösung hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 45-minütige Inkubation im vorgewärmten Schüttelbad. Die darauffolgenden Schritte glichen denen der Isolierung von zusammenhängendem Fettgewebe.

3.2 Zellkulturpflege und Passagierung

Die Zellkulturen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) verwendet, welches mit Fetalem-Rinder-Serum (FBS), Penicillin und L-Gluthamin angereichert war. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte dreimal wöchentlich mit vorgewärmtem Kulturmedium. Die Kulturflaschen wurden bei 37° C und 5 % CO₂ Gehalt der Luft verwahrt.

Es wurden regelmäßige mikroskopische Kontrollen durchgeführt, um die Zelldichte zu beurteilen und um eine Kontaminierung auszuschließen. Wenn die Zellschicht mehr als 90 % des Kulturbodens einnahm, erfolgte eine Passagierung. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt und einmalig mit 15 ml PBS gewaschen. Zur Lösung der adhärennten Zellen von der Kulturflaschenoberfläche wurden 10 ml einer Lösung aus Trypsin/EDTA und PBS im Verhältnis 1:10 beigegeben. Mit diesem wurden die Flaschen nun 5 bis 7 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Flaschen von der Seite beklopft, um einen physikalischen Reiz zu setzen (*shake-off* Methode), welcher die Zellen ablöst. Daraufhin wurden letzte adhärennte Zellen mit einem sterilem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst. Mithilfe von FBS-haltigem Zellkulturmedium, welches alpha-1-Antitrypsin enthält, wurde die durch Trypsin ausgelöste chemische Reaktion nach maximal zehn Minuten beendet, um Zellschäden zu verhindern. Die nun gelösten Zellen konnten in ein 50 ml Falcon überführt werden, welches anschließend für fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert wurde. Das Kulturmedium wurde daraufhin abgesaugt und das übrig gebliebene Zellpellet mit frischem Kulturmedium resuspendiert. Je nach Größe des Zellpellets wurde dieses nun auf zwei bis drei Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Kennzeichnung wurde auf die neuen Kulturflaschen übernommen und um die nächst höhere Passagiestufe ergänzt. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen wieder im Inkubator bebrütet. Am darauffolgenden Tag wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt.

3.3 Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Um eine Aussage bezüglich der Zellzahl in einer Kultur treffen zu können wurde das Zählverfahren mittels *Neubauer Zählkammer* durchgeführt. Dazu wurden die gewählten Zellen zunächst mit Hilfe von Trypsin gelöst (siehe 3.1) und in Zellkulturmedium resuspendiert. Aus diesem Medium konnte nun ein Aliquot von 50 µl entnommen und dessen Zellzahl bestimmt werden, um auf die Gesamtzellzahl Rückschluss zu erhalten. Dies geschah indem das entnommene Aliquot zunächst 1:1 mit *Trypanblau*, einem anionischen Farbstoff, angefärbt wurde. Dieser Schritt erleichterte die Zählung, da gesunde Zellen mit intakter Zellmembran nicht angefärbt werden und sich weiß vor blauem Hintergrund abheben. Beschädigte oder tote Zellen, die den Farbstoff nicht adäquat aus dem Zellinneren heraustransportieren können, werden blau angefärbt. Die *Neubauer Zählkammer* besitzt vier Zählkammern mit einem Volumen von jeweils 0,1 µl. Durch das darauf liegende angefeuchtete Deckgläschen entstehen Kapillarkräfte, welche die Zellsuspension gleichmäßig auf die Kammern verteilen. Nun konnte die Anzahl der Zellen in den vier Kammern gezählt werden und daraus der Mittelwert bestimmt werden. Dieser wurde zunächst mit dem Faktor Zwei multipliziert, um die Verdünnung durch den Farbstoff zu berücksichtigen und anschließend mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um Rückschluss auf die Zellkonzentration pro Milliliter zu erhalten. Anhand der Konzentration pro Milliliter konnte nun eine Aussage über die gesamte Zellmenge getroffen werden, indem man diese mit der Menge der Zellsuspension in Milliliter multiplizierte.

3.4 Kryokonservierung von ASCs

ASCs, welche nicht in unmittelbaren Versuchen benötigt wurden, konnten mittels Kryokonservierung für spätere Versuche verwahrt werden. Dazu wurde zunächst ein mit Dimethylsulfoxid (DMSO) angereichertes Einfriermedium angesetzt (siehe Tabelle 5). Dieses wurde aufgrund der temperaturabhängigen Toxizität von DMSO vor der Verwendung auf weniger als 0 °C gekühlt. Anschließend wurde das Nährmedium von den Zellkulturen entfernt und diese einmalig mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin gelöst (siehe 3.1). Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde eine Bestimmung der Zellzahl mittels *Neubauer Zählkammer* durchgeführt (siehe 3.2) und das Medium abgesaugt. Anhand der bestimmten Zellzahl wurde das Pellet so mit Einfriermedium resuspendiert, dass sich eine Konzentration von 10^6 Zellen pro Milliliter ergab. Anschließend wurde jeweils ein Milliliter

der Zelllösung in je ein Kryoröhrchen überführt. Diese wurde anschließend in einen Gefrierschrank mit einer Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ verwahrt. Um ein zu plötzliches Absinken der Temperatur zu vermeiden wurde diese kontrolliert in einem Kryoeinfriergerät um $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Stunde gesenkt. Anschließend erfolgte die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff.

3.5 Auftauen von ASCs

Um die Zellen in Kryokonservierung anschließend wieder nutzen zu können mussten diese aufgetaut werden. Aufgrund der zelltoxischen Eigenschaften von DMSO bei einer Temperatur von über $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ geschah dies nach einem Protokoll, welches ein unkontrolliertes Erwärmen verhindert. Dazu wurden die Kryoröhrchen zunächst in ein Wasserbad gelegt, bis etwa die Hälfte der gefrorenen Zellsuspension verflüssigt war. Der bereits flüssige Teil wurde direkt in einen mit Zellkulturmedium befüllten 50 ml Falcon überführt. Das verbleibende Eis wurde durch die Zugabe von Zellkulturmedium weiter geschmolzen und anschließend ebenfalls in das mit Zellkulturmedium gefüllte Falcon überführt. Nach Überführung der gesamten Zellsuspension wurde das Falcon für fünf Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Im nächsten Schritt folgte die Überführung in eine Zellkulturflasche. Diese wurde mit der jeweiligen Kennzeichnung der Zellen versehen und um die nächst höhere Passagestufe ergänzt. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein einmaliges Waschen mit PBS, um nicht adhärente oder tote Zellen zu entfernen.

3.6 Versuchsvorbereitung der ASCs

Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden für sämtliche Versuche ASCs in Passage drei auf 24- oder 6-Well-Platten angezüchtet. Dazu wurden ausreichend dicht bewachsene Zellkulturflaschen in Passage 2 trypsiniert (siehe 3.1) und mit Zellkulturmedium resuspendiert. Es erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl mittels *Neubauer Zählkammer* (siehe 3.2). Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Das Zellpellet, dessen Zellzahl nun bekannt war, wurde so verdünnt, dass pro Milliliter etwa 70000 Zellen enthalten waren. Für 24-Well-Platten erfolgte eine Überschichtung der einzelnen Wells mit je 0,5 ml Zellsuspension, so dass circa 35000 Zellen pro Well eingebracht wurden. Im Falle der 6-Well-Platte wurden je 1,5 ml beziehungsweise circa

105000 Zellen verwendet. Vor Versuchsbeginn wurde regelmäßig das Wachstum kontrolliert und dreimal wöchentlich das Zellkulturmedium gewechselt. Bei annähernd vollständig bewachsenem Boden waren die Zellkulturen versuchsbereit.

3.7 Bestrahlung

Die Bestrahlung mit blauem Licht erfolgte durch Leuchtioden (LED). Es wurde das Modell *Royal-Blue* der Firma Philipps genutzt. Dieses weist eine elektrische Leistung von 68.87 W auf und setzte die Zellen einer annähernd monochromatischen Strahlung von 453 nm aus. Der Abstand von LED zur Oberfläche der besiedelten Well-Platten war stets konstant bei 5 cm. So konnte mit Hilfe der Bestrahlungszeit die beabsichtigte Lichtdosis zugeführt werden. Es ergaben sich folgende Werte für Bestrahlungsdauer zu Lichtdosis.

Bestrahlungsdauer	Lichtdosis
8 Minuten	10 J/cm ²
32 Minuten	40 J/cm ²
64 Minuten	80 J/cm ²

Tabelle. 7: Bestrahlungsdosen

Vor Beginn der Bestrahlung wurden die entsprechenden Zellen zunächst vorbereitet, indem das Zellkulturmedium entfernt und durch DPBS (PBS mit Zusatz von Calcium und Magnesium) ersetzt. Dies sollte eine Interaktion der Bestrahlung mit dem Zellkulturmedium verhindern. Auch die entsprechende Kontrollgruppe wurde für dieselbe Dauer mit DPBS überschichtet, um eine Vergleichbarkeit zu gewähren. Dabei wurden die Proben und Kontrollen jeweils so lange in DPBS belassen wie die Zellgruppe mit der längsten Bestrahlungsdauer. Anschließend erfolgte die Entfernung von DPBS und eine Überschichtung mit frischem Zellkulturmedium.

Trotz der geringen Wärmebildung durch LED-Lampen mussten temperaturbedingte Reaktionen ausgeschlossen werden. Dazu wurden zunächst 24-Well Platten mit Thermometerfühlern versehen und mit 0.5 ml DPBS pro Well beschichtet. Auch im Rahmen einer einstündigen Bestrahlung stiegen die Temperaturen nicht über 37 °C, was der Temperatur des Brutschrankes entsprach. Entsprechend konnte eine temperaturbedingte Beeinflussung ausge-

geschlossen werden. In einem ersten Versuchsaufbau fand die Bestrahlung dreimal wöchentlich statt. Bei jeder Bestrahlung wurden je nach Gruppe entweder 10 J/cm² oder 40 J/cm² zugeführt.

3.8 Osteogene Differenzierung

Um eine osteogene Differenzierung einzuleiten wurden ausreichend bewachsene 24-Well-Platten genutzt. Als Differenzierungsmedium wurde Zellkulturmedium (siehe Tabelle 5) genutzt, dem zusätzlich Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure zugesetzt waren. Hintergründe zur Wirkweise sind in Kapitel 1.1.6 erläutert. Das Differenzierungsmedium wurde lichtgeschützt, steril und gekühlt verwahrt. Vor der Zugabe auf die Zellen erfolgte stets eine Erwärmung auf 37 °C im Wasserbad. Ein Wechsel des Mediums erfolgte drei Mal wöchentlich. Die Gesamtdauer der osteogenen Differenzierung betrug 21 Tage. Eine Bewertung über den Erfolg der osteogenen Differenzierung wurde indirekt getroffen, indem die Bildung einer Calciummatrix beobachtet wurde. Diese ließ sich im Laufe des Differenzierungsprozesses sowohl mikroskopisch darstellen als auch mit Hilfe der Alizarin-Rot-S-Färbung sichtbar machen und quantifizieren.

3.9 Darstellung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und Rücklösung

Die Beurteilung der osteogenen Differenzierung erfolgte mittels Alizarin-Rot-S-Färbung. Bei Alizarin-Rot-S handelt es sich um einen Farbstoff aus der Gruppe der Anthrachinone. Dieser färbt die Calciummatrix, welche sich um Osteozyten bildet, kräftig rot an. An den Tagen 7, 14 und 21 nach Beginn der Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums wurden Zellen mittels Alizarin-Rot-S-Färbung beurteilt. Diese Versuche wurden ausschließlich mit 24-Well-Platten durchgeführt. Für die Färbung wurde zunächst das Differenzierungsmedium entfernt. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen. Dies geschah mit Hilfe von Paraformaldehyd (PFA). Es wurde eine 4 % PFA Lösung auf Basis von destilliertem Wasser hergestellt und jedes Well mit je 0,5 ml überschichtet. Nach einer 15-minütigen Wartezeit bei Raumtemperatur wurde die PFA-Lösung entfernt und jedes Well drei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen, um PFA-Rückstände zu entfernen. Eine bereits vorbereitete Lösung von 0,5 % Alizarin-Rot-S-Farbstoff in destilliertem Wasser wurde zu je 0,5 ml je Well hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation im

Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Im darauffolgenden Schritt wurden die Zellen dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, um Farbstoffmoleküle, welche nicht an Calcium Matrix binden konnten, zu entfernen. An dieser Stelle wurden mikroskopische Bilder von repräsentativen Bereichen aufgenommen. Um eine Quantifizierung der unterschiedlichen Farbstoffbindung zwischen den verschiedenen behandelten Zellkulturen vorzunehmen erfolgte eine Rücklösung des Farbstoffs durch eine 10 % Cetylpyridiniumchlorid- (CPC) Lösung in destilliertem Wasser. Von dieser wurden je 0,5 ml auf jedes Well aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in für photometrische Messungen geeignete Küvetten übertragen. Die photometrische Dichtemessung erfolgte mit Hilfe des *Eppendorf Biophotometer plus*. Neben den Rücklösungen wurde eine ausschließlich mit CPC befüllte Küvette als Blank photometrisch gemessen und von sämtlichen Werten subtrahiert, so dass schlussendlich nur die optische Dichte des Farbstoffs berücksichtigt wurde. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und entsprechend als *Optical Density 600 nm* (OD₆₀₀) angegeben. Diese entsprach dem gebundenen Farbstoff und ist damit proportional zur Menge an gebildeter Calciummatrix. Aufgrund einer maximalen messbaren photometrischen Dichte seitens des Messgerätes musste bei sehr starker Farbstoffkonzentration zunächst eine Verdünnung erfolgen, welche anschließend mathematisch ausgeglichen wurde.

3.10 Aufnahme mikroskopischer Bilder

Fixierte und mit Alizarin-Rot-S angefärbte Zellkulturen konnten vor der Rücklösung fotografiert werden. Dies wurde zur Veranschaulichung des Grads der osteogenen Differenzierung genutzt. Dazu wurden das Zeiss Axiovert 40 und die Zeiss AxioCam genutzt. Die Bilder wurden in 400facher Vergrößerung aufgenommen und mit einem 200 µm Maßstab zur besseren Vergleichbarkeit versehen.

3.11 Messung des intrazellulären Lipidgehalts mittels Nilrot-Färbung

Um den Gehalt intrazellulärer Lipide beurteilen zu können, wurde der Farbstoff Nilrot genutzt. Dieser bindet selektiv an Lipidverbindungen und zeigt eine ausgeprägte Fluoreszenz. Entsprechend lässt sich anhand der gemessenen Fluoreszenz nach Anfärbung mittels Nilrot eine Aussage über den Lipidgehalt einer Zellkultur treffen.

Zellkulturen, welche für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert wurden und dreimal wöchentlich eine Bestrahlung mit je 10 J/cm^2 oder 40 J/cm^2 erfuhren, wurden am Tag 21 vor Durchführung der Alizarin-Rot-S-Färbung zunächst mittels Nilrot auf ihren Lipidgehalt geprüft und mit der nicht bestrahlten Kontrollgruppe verglichen. Dazu wurde zunächst eine Lösung aus PBS und Nilrot im Verhältnis 500:1 hergestellt und lichtgeschützt verwahrt. Anschließend wurde das Differenzierungsmedium von den Zellkulturen entfernt und diese einmalig mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine Beigabe von $300 \mu\text{l}$ Nilrotlösung pro Well und eine 20-minütige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Farbstoff entfernt und jedes Well zweimal mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenzbestimmung erfolgte im Multiplattenlesegerät.

3.12 Aktivitätsbestimmung der NADH-Dehydrogenase mittels CellTiter-Blue®-Messung

Seit Jahrzehnten nutzen Wissenschaftler den Farbstoff Resazurin um das Maß der Zellproliferation und das Auftreten von toxischen Effekten auf lebende Zellen feststellen zu können. Das hier gewählte Kit CellTiter-Blue® nutzt den Farbstoff Resazurin, welcher in lebende Zellen zu Resoflurin reduziert wird. Resoflurin weist eine hohe Fluoreszenz mit einem Absorptionsmaximum bei 573 nm auf und kann photometrisch quantifiziert werden. Dabei kann bereits makroskopisch ein Farbumschlag von dunkel Blau zu Pink beobachtet werden.

Die genaue Lokalisation dieser Reaktion war lange umstritten und es finden sich diesbezüglich bis heute teils widersprüchliche Angaben, welche Enzyme die Reduktion von Resazurin zu Resoflurin katalysieren können. Prinzipiell scheint die Reaktion durch mehrere Enzyme, in Anwesenheit von NADPH/NADH erfolgen zu können (Hall, Simeonov, & Davis, 2016). Neuere Untersuchungen legen nun nahe, dass der Umsatz des Farbstoffes stark proportional zur aeroben Energiegewinnung ist und vorwiegend durch die Atmungskette realisiert wird (de Fries & Mitsuhashi, 1995; González-Pinzón, Haggerty, & Myrold, 2012). Folglich wird das Celltiter-Blue Verfahren in dieser Arbeit als Maß der Aktivität der NADPH-Dehydrogenase interpretiert.

In einem ersten Versuchsaufbau wurden ASCs dreimal wöchentlich mit 10 J/cm^2 oder 40 J/cm^2 blauen Lichts bestrahlt. Die Messung mittels CellTiter-Blue® geschah an den Tagen

7, 14 und 21 nach Beginn der Differenzierung mittels Differenzierungsmedium. Die Messung fand dabei stets mit einem Abstand von 48 Stunden nach der letzten Bestrahlung statt.

In einem zweiten Versuchsaufbau wurden ASCs einmalig mit 10 J/cm², 40 J/cm² oder 80 J/cm² blauen Lichts bestrahlt und direkt im Anschluss an die Bestrahlung, sowie nach 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden mittels CellTiter-Blue®-Verfahren untersucht.

Für die Messung wurde zunächst eine Lösung aus CellTiter-Blue®-Farbstoff und Zellkulturmedium im Verhältnis 1:20 hergestellt. Dieses wurde bis zur Verwendung in lichtundurchlässigen Falcons verwahrt. Die zu messenden 24-Well-Platten wurden vom Zellkulturmedium befreit und mit je 0,5 ml der CellTiter-Blue®-Lösung überschichtet. Es folgte eine einstündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Um die stattgefundene Reaktion quantifizieren zu können wurden je 100 µl pro Well auf eine frische 96-Well Platte übertragen. Diese konnte nun mit Hilfe eines Plattenphotometers (*VICTOR3™ V Multilabel Counter Model 1420, Perkin Elmer*) gemessen werden. Um Messfehler gering zu halten wurde dieser Schritt doppelt ausgeführt, so dass letztlich pro Well je zwei Ergebnisse vorlagen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Zudem wurde ein mit frischem CellTiter-Blue®-Lösung befülltes Well als Blank gemessen. Dieses wurde anschließend von den anderen Werten subtrahiert, um lediglich die Fluoreszenz des reduzierten Resoflurins zu berücksichtigen.

Da das Verfahren keinen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung der Zellen zeigt, konnten die Zellen nach der Messung weiter genutzt werden. Deshalb wurden die 24-Well-Platten nach Entnahme des jeweiligen Aliquots einmalig mit PBS gewaschen und entweder wieder mit dem entsprechenden Medium in den Brutschrank überführt oder mit Hilfe der Alizarin-Rot-S-Färbung auf das Maß ihrer osteogenen Differenzierung getestet.

3.13 Messung des lysosomalen Metabolismus mittels Neutral-Rot-Färbung

Eine Untersuchung des lysosomalen Metabolismus erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs Neutralrot. Dieser ist ein schwach kationischer Farbstoff, welcher die Zellmembran durch passive Diffusion durchquert und in den Lysosomen akkumuliert. Dort bindet Neutral-Rot an anionischen Gruppen und Phosphatgruppen der lysosomalen Matrix (Repetto, del Peso, & Zurita, 2008). Aufgrund der Ladungsänderung, welche durch die Bindung erfolgt, kann der Farbstoff das Lysosom anschließend nicht mehr verlassen. Der pH-Gradienten des Lysosoms

muss aktiv aufrechterhalten werden. Dies geschieht durch *Vacuolar-type-proton-pumping ATPasen* (V-Typ ATPasen) (Futai, Sun-Wada, Wada, Matsumoto, & Nakanishi-Matsui, 2019). Diese nutzen ATP, um Protonen in das Innere des Lysosoms zu pumpen. Folglich sind der pH-Wert des Lysosoms und damit die gemessenen Werte im Neutralrot-Verfahren auch indirekt abhängig von der ATP-Konzentration und der Aktivität der Atmungskette.

Bei einem anschließenden Waschen der Zellen mit Alkohol wird nicht im Lysosom gebundener Farbstoff entfernt. So gibt die Menge an gebundenem Farbstoff in einer Zellkultur Auskunft über lysosomalen Metabolismus in einer Zellkultur.

Die auf 24-Well-Platten in Zellkulturmedium angezüchteten Zellen wurden zunächst entweder mit 10 J/cm^2 , 40 J/cm^2 oder 80 J/cm^2 bestrahlt oder als Kontrolle mitgeführt. Die Messungen wurden direkt im Anschluss an die Bestrahlung, sowie nach 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt.

Vor Beginn der Messung wurde zunächst der Farbstoff Neutralrot im Verhältnis 1:100 mit Zellkulturmedium gemischt. Zur Rücklösung des Farbstoffs wurde eine Mischung Isopropanol und 1-normaler Salzsäurelösung im Verhältnis 100:1 vorbereitet. Die Durchführung der Messung begann mit dem Absaugen des Zellkulturmediums. Anschließend wurden je 0,5 ml der Farbstofflösung pro Well beigegeben und für 90 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Zur Rücklösung des Farbstoffs wurden je 0,5 ml der vorbereiteten Salzsäurelösung beigegeben. Durch vorsichtiges Beklopfen der Platten wurde eine bessere Lösung und homogene Verteilung des Farbstoffs erzielt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mit Hilfe eines Plattenphotometers.

3.14 Mikroskopische Apoptosedetektion mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodidfärbung

Eine visuelle Darstellbarkeit von apoptotischen Zellen gelingt mittels der doppelten Anfärbung mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid. Hoechst 33342 kann sowohl in lebende als auch in tote Zellen eindringen. Es zeigt eine Fluoreszenz im blauen Spektrum. Diese verstärkt sich deutlich bei Bindung an DNA und zeigt ein Emissionsmaximum bei etwa 460 nm. Propidium-iodid besitzt nicht die Fähigkeit intakte Membranen zu durchqueren. Ledig-

lich im Falle einer geschädigten Zellmembran penetriert es die Zelle und bindet an Chromatinstrukturen. Auch die Fluoreszenz von Propidiumiodid steigt deutlich nach der Bindung und präsentiert sich dann im roten Spektrum mit einem Emissionsmaximum von 617 nm. Die Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht dann eine visuelle Unterteilung in vitale Zellen und tote, beziehungsweise beschädigte Zellen.

Das Verfahren wurde angewandt um Apoptose in ASCs aufzuzeigen, welche einmalig mit 10 J/cm², 40 J/cm² oder 80 J/cm² bestrahlt worden waren. Diese wurden mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die Färbung geschah jeweils 3 und 8 Stunden nach Ende der Bestrahlung.

Zunächst wurde die Farbstofflösung vorbereitet. Ein lichtgeschützter Falcon wurden mit einer definierten Menge PBS befüllt. Anschließend wurden die Farbstoffe Hoechst 33342 im Verhältnis 1:1000 sowie Propidiumiodid im Verhältnis 1:20 beigegeben. Im folgenden Schritt wurden die Zellen zunächst von Zellkulturmedium befreit und einmalig mit PBS gewaschen. Es wurden je 0,5 ml der Färbelösung pro Well beigegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit, welche lichtgeschützt und bei Raumtemperatur erfolgte, wurde die Farbstofflösung abgesaugt und durch 0,5 ml PBS ersetzt. Daraufhin konnten die Zellkulturen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Es wurden die Filter *FS15* zur Darstellung von Propidiumiodid, sowie *DAPI* zur Darstellung von Hoechst 33342 genutzt. Von repräsentativen Ausschnitten wurden Fotos aufgenommen.

3.15 Messung der Apoptose mittels Propidiumiodid-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie

Eine quantitative Messung der Apoptoserate wurde ebenfalls vorgenommen. Dazu wurden die Eigenschaften des Farbstoffs Propidiumiodids genutzt, welche in Kapitel 2.2.14 erläutert wurden. Anschließend wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt, um den prozentualen Anteil an apoptotischen Zellen zu bestimmen.

Die Durchflusszytometrie basiert darauf, dass in Flüssigkeit gelöste Zellen oder Zellkompartimente einzeln einen Laserstrahl passieren. Emissionen, welche entstehen, wenn der Laserstrahl auf die Zelle trifft, werden von Photodektoren gemessen. Die Qualität der Emissionen ändert sich entsprechend der Eigenschaften der zu messenden Zellen oder Zellkom-

partimente und der vorgenommenen Färbungen. Im Falle der durchgeführten Apoptosemessung mittels Propidiumiodidfärbung wird zelluläre DNA gemessen. Propidiumiodid bindet an DNA, wodurch die entstehenden Fluoreszenz-Emissionen proportional zu dieser sind (Riccardi & Nicoletti, 2006). Apoptotische Zellen spalten ihre DNA mit Hilfe von Caspasen und Desoxyribonukleasen, so dass die messbare DNA von apoptotischen Zellen aus deutlich kürzeren Abschnitten besteht als die von nicht apoptotischen (Riccardi & Nicoletti, 2006). Anhand des Verhältnisses von gespaltener zu intakter DNA kann eine Aussage über den Anteil apoptotischer Zellen in einer Kultur getroffen werden (Riccardi & Nicoletti, 2006).

Die mit diesem Verfahren gemessenen Zellen wurden zunächst simultan zu den vorangegangenen Versuchen einmalig mit 10 J/cm^2 , 40 J/cm^2 oder 80 J/cm^2 bestrahlt oder als unbehandelte Kontrollgruppe mitgeführt. Als Messzeitpunkte wurden das Ende der Bestrahlung sowie 4, 8, 24, und 48 Stunden nach diesem gewählt. Am jeweiligen Messzeitpunkt wurden die Zellen zunächst mit Hilfe von Trypsinlösung und einem Zellschaber geerntet (siehe Kapitel 3.1) und in Rundbodenröhrchen übertragen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, vier Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert und der entstandene Überstand abgesaugt. Nach einer Resuspension mit je $500 \mu\text{l}$ PBS wurden die Röhrchen zunächst auf Eis zwischengelagert. Anschließend erfolgte die Beigabe von je $4,5 \text{ ml}$ 70% Ethanol pro Röhrchen. Die Röhrchen wurden nun bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Messung verwahrt. Dies erfolgte für mindestens 30 Minuten. Um das Verfahren zu vereinfachen wurden die Proben jedoch bis zu 48 Stunden bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, um sämtliche Proben gleichzeitig auswerten zu können. Für die Auswertung wurden die Proben zunächst für vier Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das zurückbleibende Zellpellet mit je $500 \mu\text{l}$ einer Lösung aus Propidiumiodid und PBS im Verhältnis von je $10 \mu\text{g/ml}$ resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit, welche lichtgeschützt und bei Raumtemperatur erfolgte, konnte die Messung mit Hilfe des Durchflusszytometers durchgeführt werden.

3.16 Messung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mittels Agilent Seahorse XF CellMito Stress Test Kit

Eine Beeinflussung der Atmungskette durch Bestrahlung mit blauem Licht wurde mit Hilfe des *Agilent Seahorse XF CellMito Stress Test Kit* geprüft. Dieses basiert auf einer kontinuierlichen Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs mit Hilfe eines in Plastik eingefassten Fluorophores. Der gemessene Sauerstoffverbrauch wird als *oxygen consumption rate*

(OCR) bezeichnet. Die erste Messung der OCR spiegelt die basale Respiration. Anschließend wurden nacheinander drei chemische Modulatoren hinzugegeben und nach der Beigabe eines Jeden die OCR bestimmt. Der erste Modulator, Oligomycin, inhibiert die ATP-Synthase (Komplex V). Die resultierende Reduktion der OCR repräsentiert den Sauerstoffverbrauch, welcher im Rahmen der ATP-Synthese verbraucht wird und wird entsprechend als *ATP-linked respiration* bezeichnet wird. Im folgenden Schritt wurde die *Substanz Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone* (FCCP) zugeführt. FCCP bewirkt eine Entkopplung der Atmungskette, indem es einen gesteigerten Transport von Protonen durch die mitochondriale Membran erlaubt. Folglich wird der Protonengradient, welcher im Normalfall durch die Atmungskette aufgebaut wird, aufgehoben. Dies führt zu einer maximal gesteigerten Aktivität der Atmungskette. Die nun messbare OCR wurde als maximale Respiration bezeichnet. Wird die Basalrate von der maximalen Respiration abgezogen, so ergibt sich die Reservekapazität der Atmungskette. Im letzten Schritt erfolgte die Beigabe von Rotenon, einem Inhibitor des Komplex I sowie Antimycin A, einem Komplex III-Inhibitor. Die daraus erfolgende, vollständige Inhibition der Atmungskette bewirkt, dass die OCR massiv absinkt und lediglich nicht mitochondriale Atmungsaktivität repräsentiert.

Zur Durchführung der Messung wurden mehrere 96-Well Platten, welche ausreichend dicht mit ASCs besiedelt waren, genutzt. Diese wurden in regulärem Zellkulturmedium angezchtet. Am Tag vor der Messung wurde die Hydrierung der *Sensor-Cartridge in Seahorse XF Calibrant* begonnen, welche über Nacht in einem CO₂-freien Brutschrank bei 37 °C erfolgte. Am Tag der Messung wurde zunächst das Assay-Medium vorbereitet. Dieses wurde nach Empfehlung des Herstellers mit 10 mM Glucose sowie 2 mM Glutamin versetzt. Anschließend wurden die 96-Well-Platten von Zellkulturmedium befreit und mit DPBS überschichtet. Es erfolgte eine einmalige Bestrahlung mit 80 J/cm² blauen Lichts. Die mitgeführte Kontrollgruppe erfuhr keine weitere Behandlung. Im Anschluss wurden die Zellen einmalig mit dem vorbereiteten Assay-Medium gewaschen, ebenfalls mit Assay-Medium überschichtet und für eine Stunde bei 37 °C und ohne CO₂ inkubiert. Die Vorbereitung der Sensor-Cartridge erfolgte, indem die oben genannten Modulatoren zunächst in Assay-Medium gelöst und anschließend in die jeweiligen *Ports* pipettiert. Auch die Sensor-Cartridge wurde anschließend wieder bei 37 °C und ohne CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Sensor-Cartridge zunächst kalibriert. Dies geschah im Seahorse XFe96 Analyzer mit Hilfe der *Calibration-Plate*. Nach erfolgreichem Abschluss der Kalibrierung wurden die

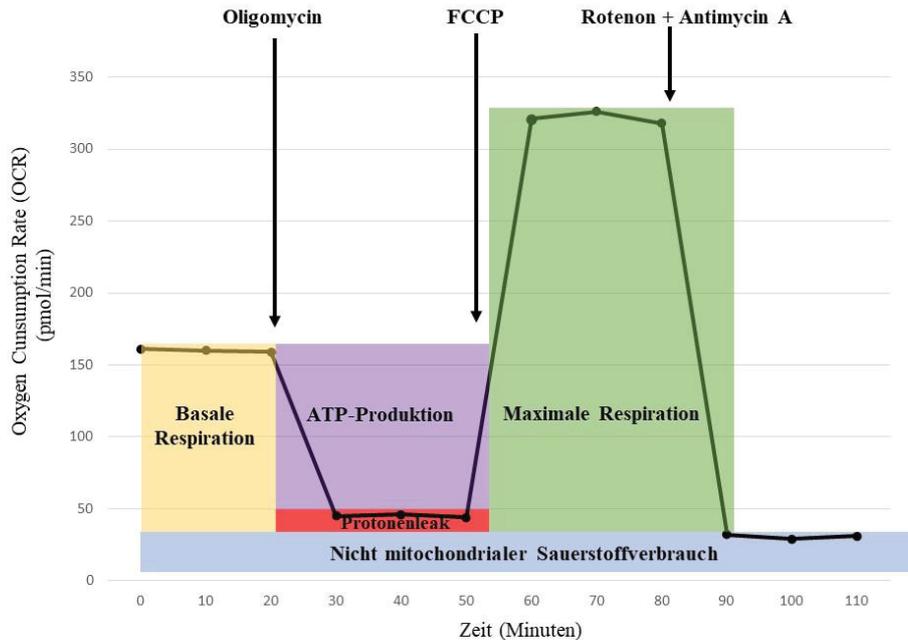


Abbildung 6: Funktionsweise des Agilent Seahorse XF CellMito Stress Test

Calibration-Plate durch die Zellkulturen ersetzt. Nach erfolgter Messung konnten die Daten mit Hilfe der *Wave-Software* ausgewertet werden.

3.17 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software *Graphpad Prism 8* durchgeführt. Dazu wurde im Falle einer Normalverteilung der Student's t-test oder ein ein- oder zweiseitiger Anova Test durchgeführt, um Daten auf Signifikanz zu prüfen. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikantes Ergebnis interpretiert. Diese wurden in den Abbildungen mit einem Stern markiert. Gruppierte Ergebnisse wurden mit einem zweiseitigen *Anova-Test* und zusätzlich mit einem Mehrfachvergleich ausgewertet. Dazu wurde der *Dunnett's multiple comparisons Test* genutzt.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten die Effekte von Flavin-haltigen ROS-synthetisierenden Enzymen wie der auf die Differenzierung sowie weitere Aspekte des Stoffwechsels von ASCs geprüft werden. Dazu wurden diese durch eine Bestrahlung mit blauem Licht in einen entkoppelten Zustand versetzt, welcher zu einer erhöhten ROS-Freisetzung führte. Ein hemmender Einfluss von ROS auf die osteogene Differenzierung von ASCs ist hinlänglich bekannt. Folglich sollte eine Inhibition der osteogenen Differenzierung aus der Bestrahlung resultieren. Es wurde zunächst mit Hilfe zweier Verfahren eine relevante Toxizität durch die Bestrahlung ausgeschlossen. Anschließend wurden die Effekte der Entkopplung auf die Atmungskette und den lysosomalen Stoffwechsel überprüft, sowie der Einfluss auf die osteogene Differenzierung untersucht.

4.1 Hoechst 33342- und Propidiumiodidfärbung nach einmaliger Bestrahlung

Um einen relevanten toxischen Effekt der Bestrahlung auf die genutzte Zellpopulation auszuschließen erfolgte eine Darstellung der Apoptose mittels Anfärbung durch die Farbstoffe Hoechst 33342 und Propidiumiodid. Zellen, die mit je 10 J/cm^2 , 40 J/cm^2 oder 80 J/cm^2 bestrahlt worden waren, wurden entweder 3 oder 8 Stunden nach Bestrahlung angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. (Abb. 7 bis 14). Apoptotische Zellen sind dabei als rote Stellen in der jeweils rechten Darstellung zu erkennen.

Da es sich bei diesem Verfahren eher um eine Visualisierung als um eine Messung handelt, können Beurteilungen nur subjektiv getroffen werden. Es scheint jedoch, dass höchstens die mit 80 J/cm^2 bestrahlten Zellen eine leicht erhöhte Apoptoserate gegenüber der Kontrollgruppe aufweist.

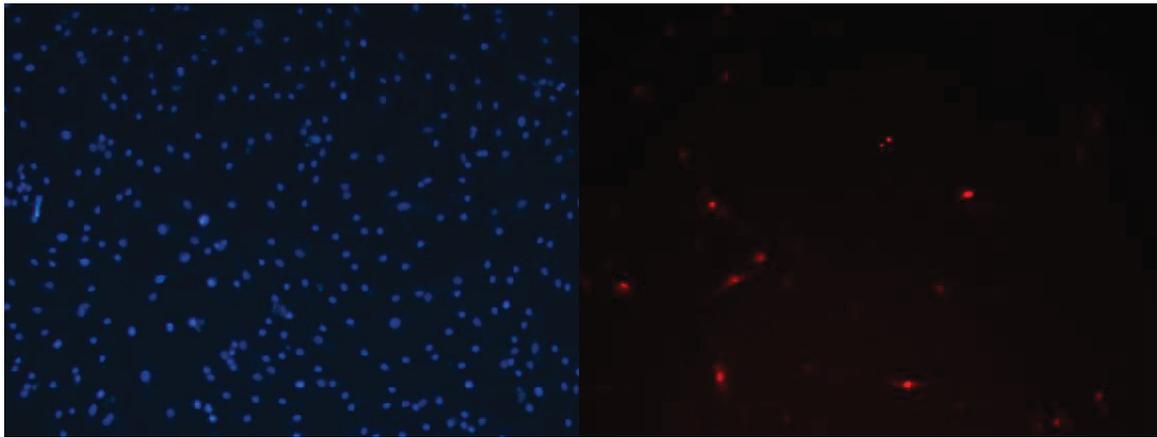


Abbildung 7: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – Kontrollgruppe nach 3 Stunden

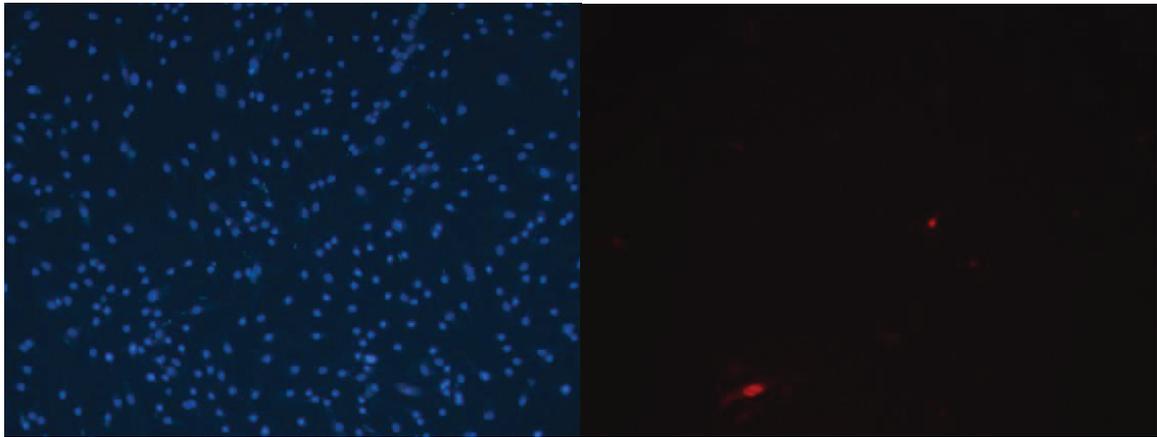


Abbildung 8: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 10 J/cm² Gruppe 3 Stunden nach einmaliger Bestrahlung

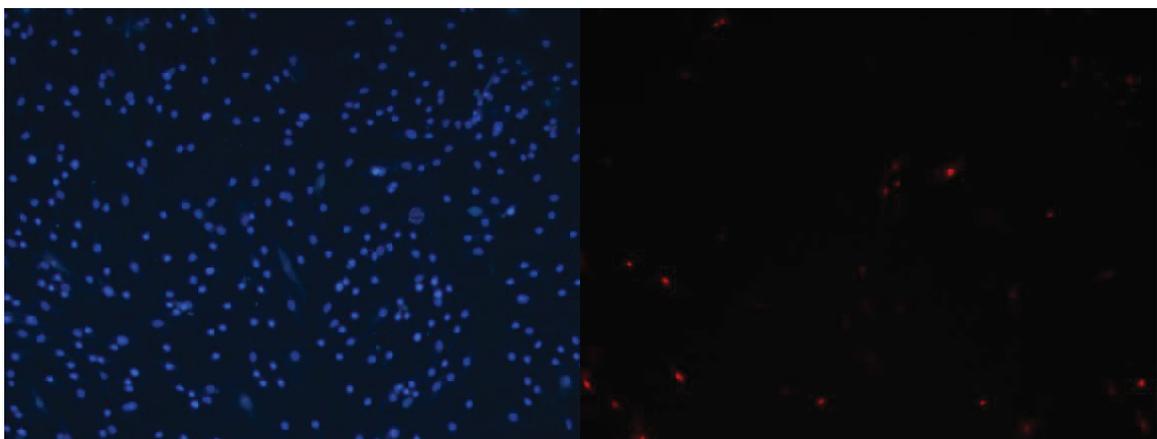


Abbildung 9: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 40 J/cm² Gruppe 3 Stunden nach einmaliger Bestrahlung

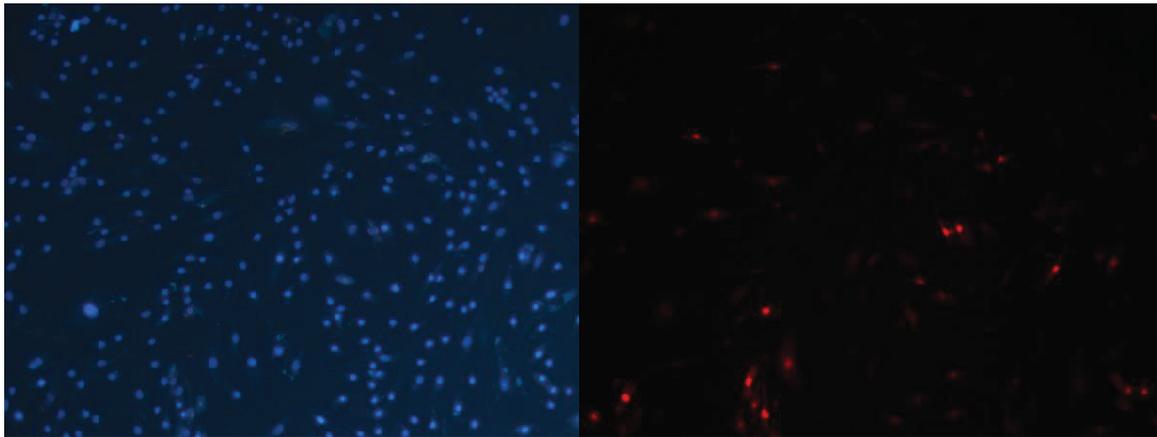


Abbildung 10: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 80 J/cm² Gruppe 3 Stunden nach einmaliger Bestrahlung

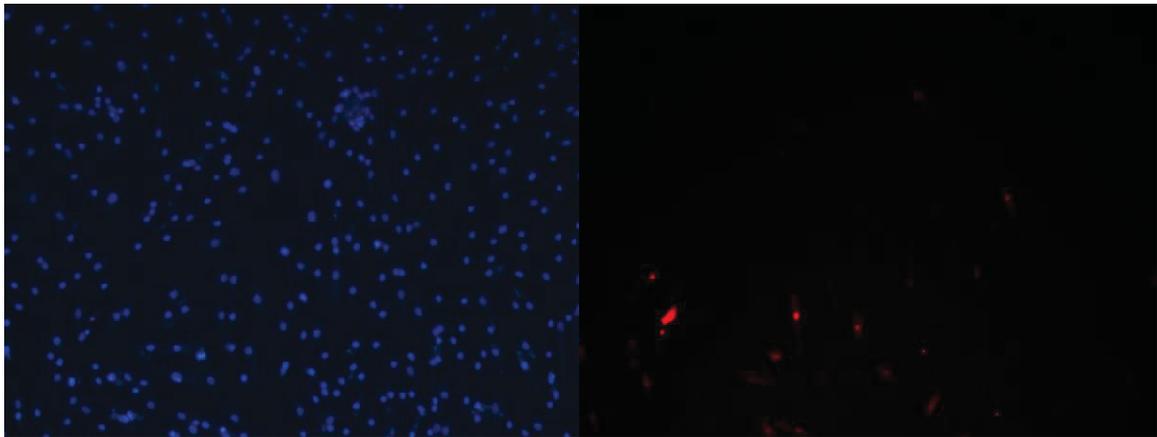


Abbildung 11: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid - Kontrollgruppe nach 8 Stunden

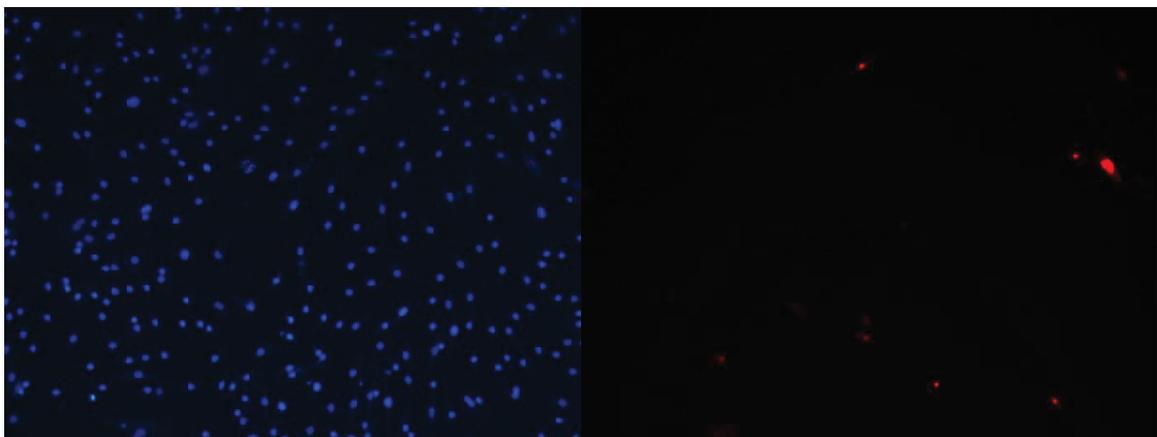


Abbildung 12: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 10 J/cm² Gruppe 8 Stunden nach einmaliger Bestrahlung

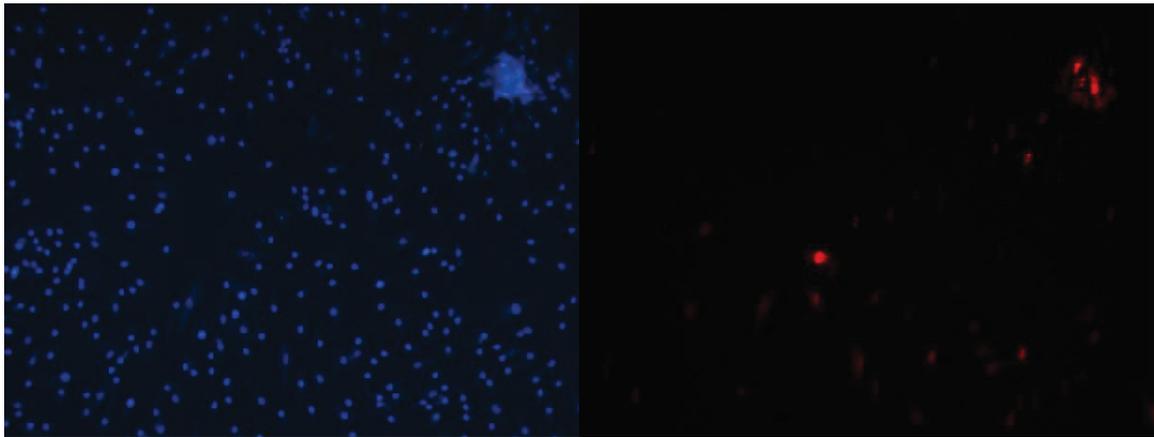


Abbildung 13: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 40 J/cm² Gruppe 8 Stunden nach einmaliger Bestrahlung

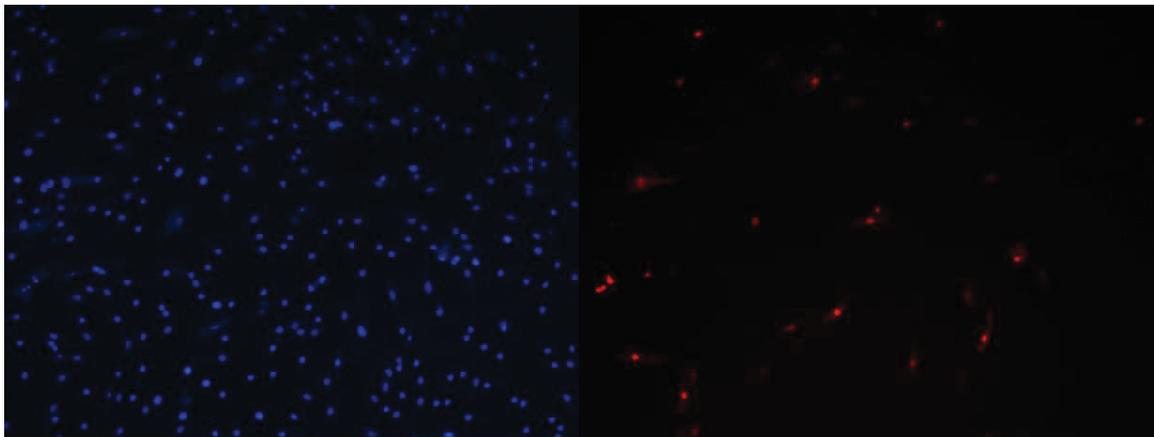


Abbildung 14: Apoptosedarstellung mittels Hoechst 33342 und Propidiumiodid – 80 J/cm² Gruppe 8 Stunden nach einmaliger Bestrahlung

4.2 Toxizitätsmessung mittels Durchflusszytometrie

Eine Quantifizierung der Apoptose erfolgte, indem ASCs zunächst mit dem Farbstoff Propidiumiodid angefärbt und anschließend mit einem Durchflusszytometer beurteilt wurden. Zellen, die mit entweder 10 J/cm², 40 J/cm² oder 80 J/cm² blauen Lichts bestrahlt worden waren, wurden auf diese Weise auf ihre Apoptoserate geprüft. Dies geschah direkt im Anschluss an die Bestrahlung sowie nach 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden. Hier fanden sich lediglich bei den mit 80 J/cm² bestrahlten Zellen höhere Mittelwerte in der Apoptoserate. Eine signifikante Differenz war aber zu keinem Zeitpunkt messbar. Auch im Two-way-Anova-Test konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Bestrahlung mit blauem Licht und Apoptoserate festgestellt werden ($p=0,0799$). Die teilweise hohen Standardabweichungen

sind Resultat der Arbeit mit Primärkulturen. Nichts destotrotz erscheint ein toxischer Effekt durch eine Bestrahlung mit 10 J/cm^2 sowie 40 J/cm^2 anhand dieser Ergebnisse unwahrscheinlich.

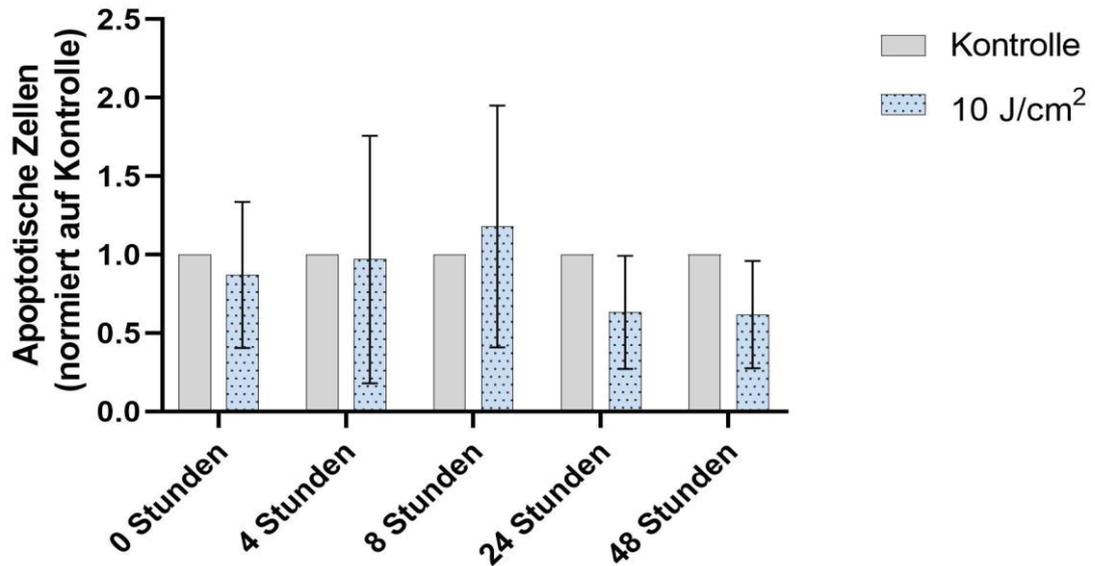


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Apoptosemessung - Kontrolle und 10 J/cm^2 -Gruppe

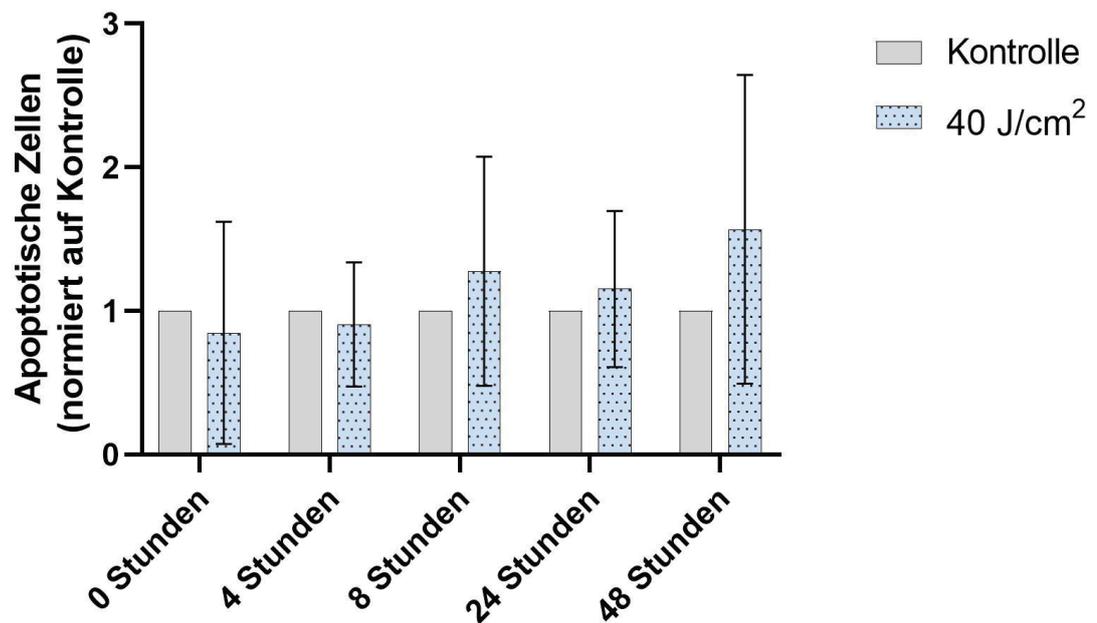


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Apoptosemessung - Kontrolle und 40 J/cm^2 -Gruppe

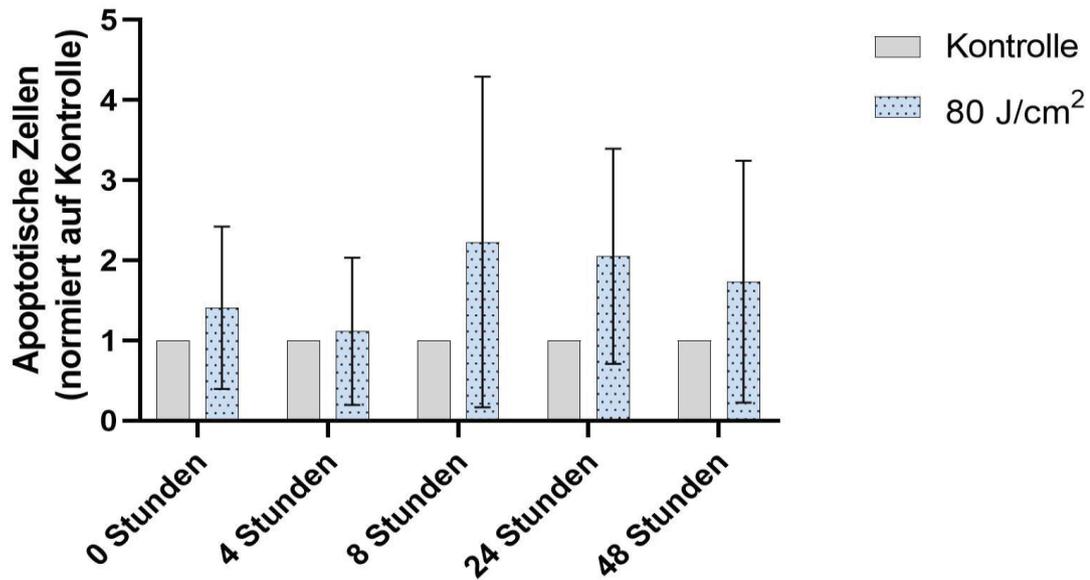


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Apoptosemessung - Kontrolle und 80J/cm²-Gruppe

4.3 Messung des Mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mittels Agilent Seahorse XF CellMito Stress Test

Um den Effekt von Bestrahlung mit Blauem Licht auf die mitochondriale Aktivität von ASCs zu prüfen wurde das Agilent Seahorse XF CellMito Stress Test Kit genutzt. Dieses erlaubt durch eine Messung des Sauerstoffverbrauchs Aussagen über die Aktivität der Atmungskette zu treffen. Über die konsekutive Beigabe von Chemikalien, welche modifizierend auf verschiedene Kompartimente der Atmungskette wirken (siehe 3.16), kann eine differenzierte Aussage über Grundverbrauch (Basal), Verbrauch im Rahmen der ATP-Synthese (ATP-Production), das Maß des Protonenleaks (Proton-Leak), die maximale Respiration (maximal Respiration), die Reservekapazität (Spare Respiratory Capacity) und den nicht mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (Non Mitochondrial Oxygen Consumption) getroffen werden. Der Test erfolgte an Zellen, welche einmalig mit 80 J/cm² blauen Lichts bestrahlt worden waren. Die Ergebnisse wurden mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Es zeigte sich eine deutliche Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität durch die Bestrahlung. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigten mit 80 J/cm² bestrahlte Zellen einen deutlich reduzierten Basalumsatz ($p < 0,0001$). Ebenso waren die maximale Respiration ($p < 0,0001$), die Reservekapazität ($p < 0,0001$), die ATP-Synthese ($p < 0,0001$) sowie die Kopplungseffizienz vermindert ($p < 0,0001$). Beim Protonen-Leak ($p < 0,0001$) und dem

nicht mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ($p=0,0039$) konnten erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden.

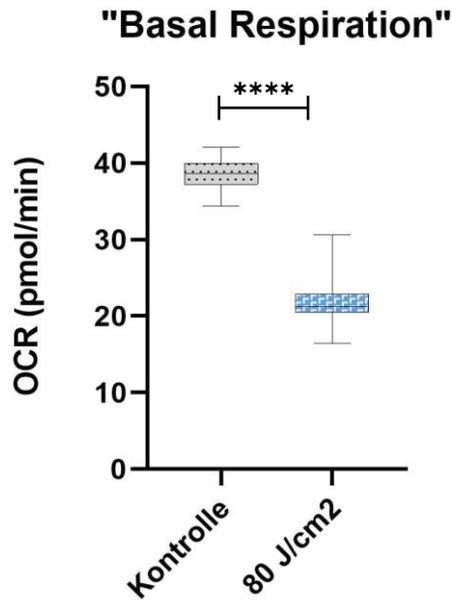


Abbildung 18: Agilent Seahorse: Basale Respiration Kontrollgruppe und 80 J/cm2 Gruppe, pmol/min, ****= $p < 0,0001$

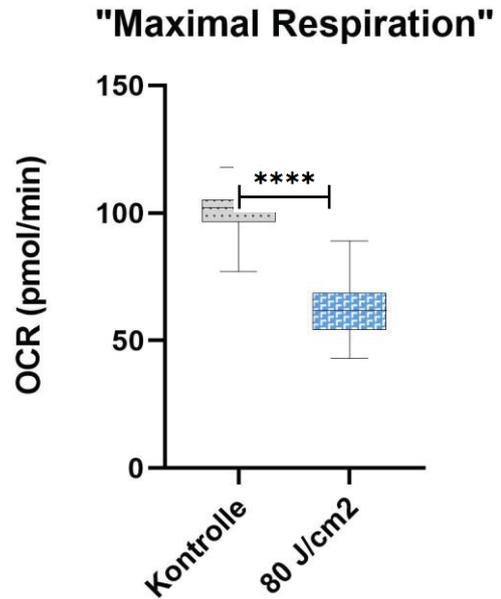


Abbildung 19: Agilent Seahorse: Maximale Respiration Kontrollgruppe und 80 J/cm2 Gruppe, pmol/min, ****= $p < 0,0001$

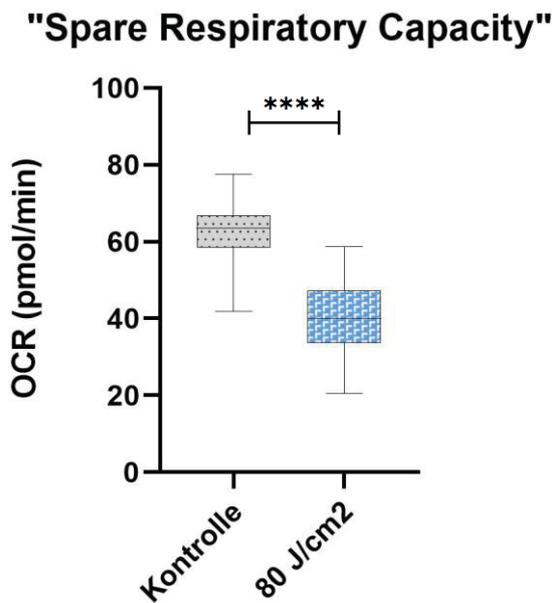


Abbildung 20: Agilent Seahorse: zusätzliche respiratorische Kapazität Kontrollgruppe und 80 J/cm2 Gruppe, pmol/min, ****= $p < 0,0001$

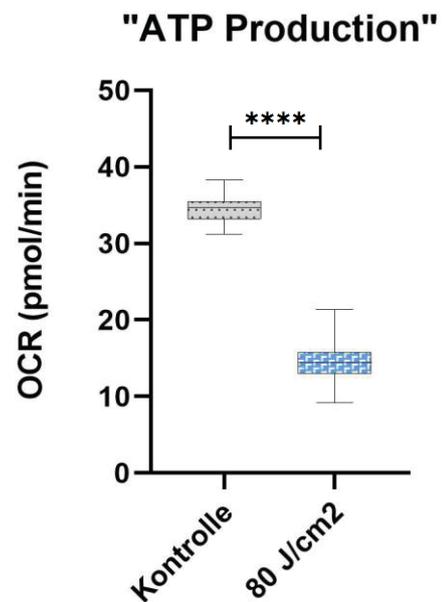


Abbildung 21: Agilent Seahorse: ATP-Produktion Kontrollgruppe und 80 J/cm2 Gruppe, pmol/min, ****= $p < 0,0001$

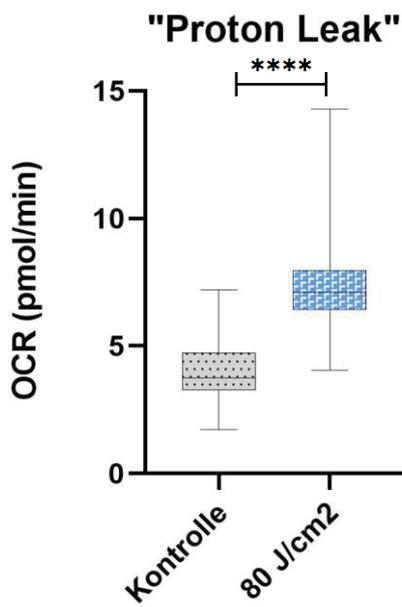


Abbildung 22: Agilent Seahorse: Protonen-leak Kontrollgruppe und 80 J/cm2 Gruppe, pmol/min, ****= $p < 0,0001$

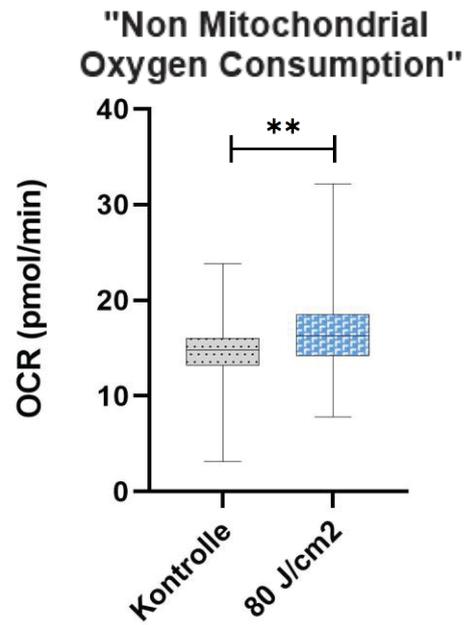


Abbildung 23: Agilent Seahorse: nicht mitochondri-aler Sauerstoffverbrauch Kontrollgruppe und 80 J/cm2 Gruppe, pmol/min, **= $p < 0,0039$

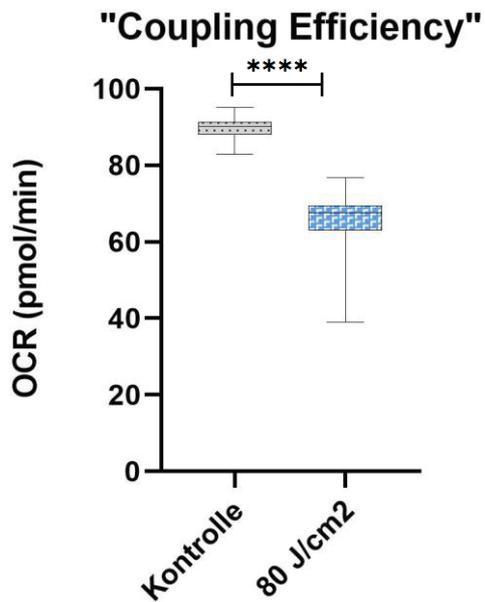


Abbildung 24: Agilent Seahorse: Kopplungseffizienz Kontrollgruppe und 80 J/cm2 Gruppe, pmol/min, ****= $p < 0,0001$

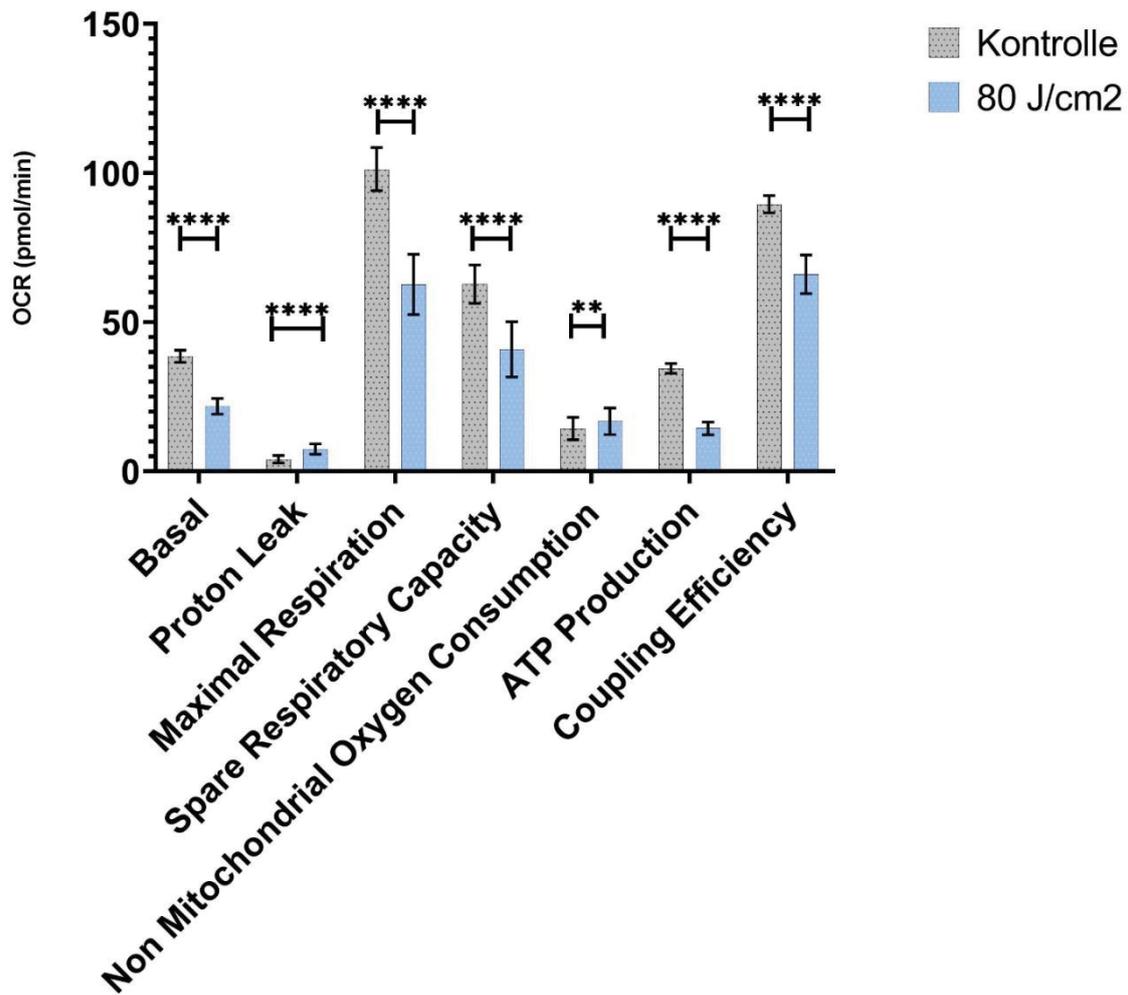


Abbildung 25: Agilent Seahorse: Übersichtsdarstellung Kontrollgruppe und 80 J/cm² Gruppe, pmol/min, ****= $p < 0,0001$, **= $p < 0,0039$

4.4 Aktivitätsbestimmung der NADH-Dehydrogenase mittels CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung

Um Informationen über die Aktivität der NADH-Dehydrogenase zu sammeln wurde das Celltiter-Blue®-Verfahren genutzt. Der Umsatz des Farbstoffs Resazurin repräsentiert hier die Aktivität der Atmungskette, insbesondere der NADH-Dehydrogenase.

Nach einmaliger Bestrahlung mit entweder 10 J/cm², 40 J/cm² oder 80 J/cm² blauen Lichts wurden mehrere CellTiter-Blue®-Messungen durchgeführt. Dies geschah direkt im Anschluss an die Bestrahlung sowie nach 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die mit 40 J/cm² oder 80 J/cm² bestrahlt worden waren, eine Verminderung in ihrem Farbstoffumsatz aufwiesen (siehe Abb.26 bis 28). Die Differenz im Farbstoffumsatz war am deutlichsten in der Messung nach 24 Stunden ausgeprägt und näherte sich in den darauffolgenden Messungen wieder denen der Kontrollgruppe an. Zellen, welche mit 40 J/cm² bestrahlt worden waren zeigten einmalig nach 24 Stunden eine signifikante Verminderung gegenüber der Kontrolle (p=0,0382). Die mit 80 J/cm² bestrahlte zeigte sowohl nach 24 Stunden (p=0,0118), als auch nach 48 Stunden (p=0,0334) eine signifikante Verminderung gegenüber der Kontrolle. Eine hoch signifikante Korrelation zwischen Bestrahlung und Proliferation konnte mittels two-way-Anova-Test mit einem p-Wert von <0,0001 belegt werden.

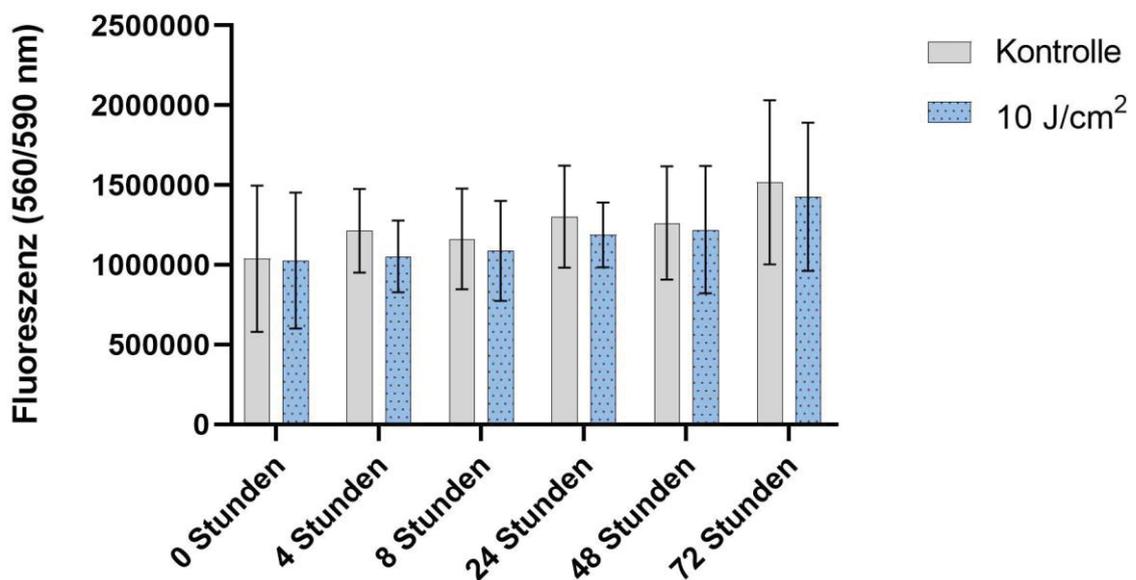


Abbildung 26: CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 10 J/cm²

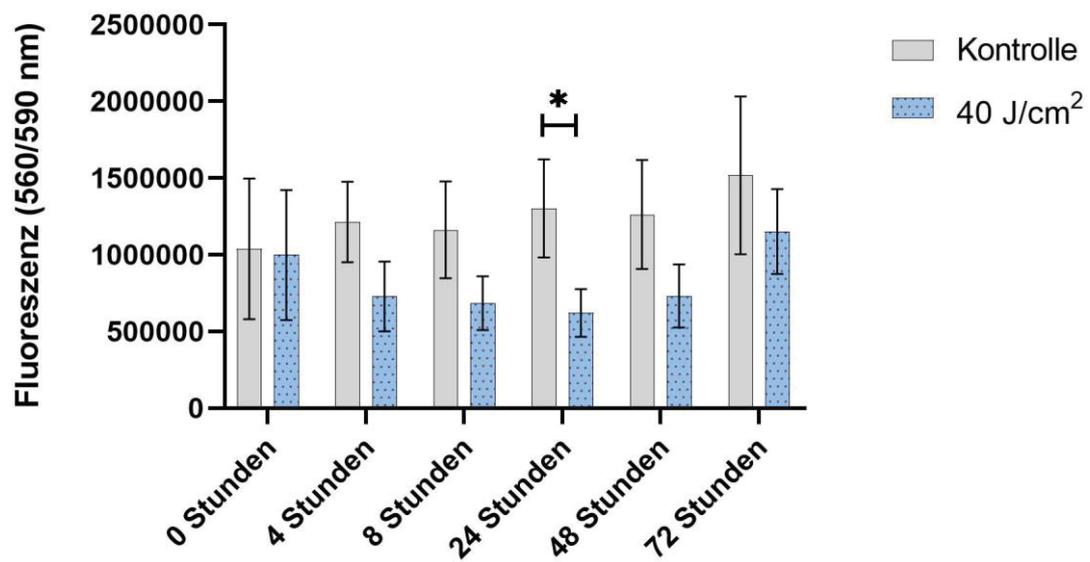


Abbildung 27: CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 40 J/cm², *=p<0,05

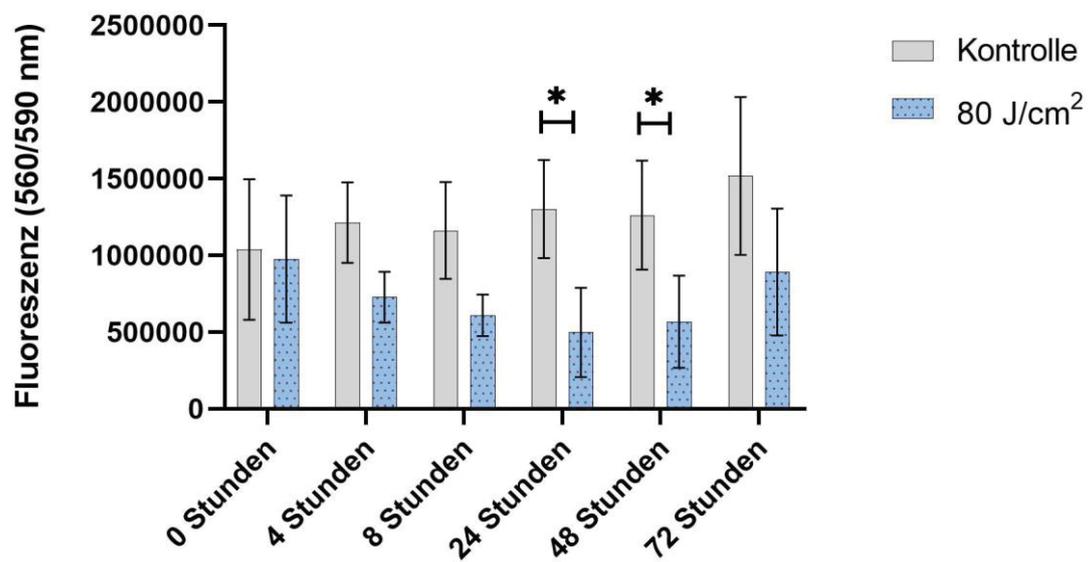


Abbildung 28: CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 80 J/cm², *=p<0,05

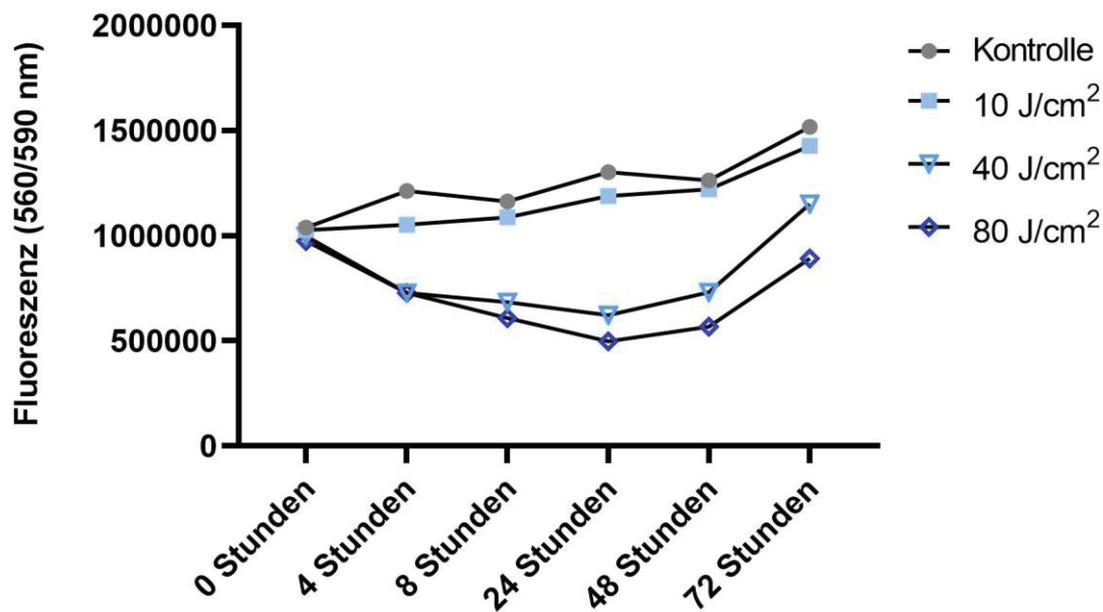


Abbildung 29: CellTiter-Blue®-Messung nach einmaliger Bestrahlung - Übersichtsdarstellung

4.5 Aktivitätsbestimmung der NADH-Dehydrogenase mittels CellTiter-Blue®-Messung bei konsekutiver Bestrahlung

Um eine Aussage über die langfristige Beeinflussung des Zellstoffwechsels, insbesondere der Atmungskette, durch die Bestrahlung treffen zu können wurde abermals das CellTiter-Blue®-Verfahren genutzt. Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium wurden dreimal wöchentlich mit 10 J/cm² oder 40 J/cm² bestrahlt und an den Tagen 7, 14 und 21, unmittelbar vor der Alizarin-Rot-S-Färbung mittels CellTiter-Blue®-Verfahren untersucht. Dabei lag zwischen der letzten Bestrahlung mit blauem Licht und der Messung mittels CellTiter-Blue® ein Abstand von 48 Stunden, um einheitliche Bedingungen zu gewähren.

Zu beobachten war eine Verminderung des Mittelwerts der mit 40 J/cm² bestrahlten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe an den Tagen 7 und 14. Am Tag 21 ließ sich dies nicht mehr beobachten, und der Mittelwert der bestrahlten Zellen überstieg den der Kontrollgruppe (siehe Abb. 30 bis 32). Ein signifikanter Einfluss von blauem Licht auf die Aktivität der Atmungskette war in diesem Versuchsaufbau zu keinem Messzeitpunkt nachweisbar.

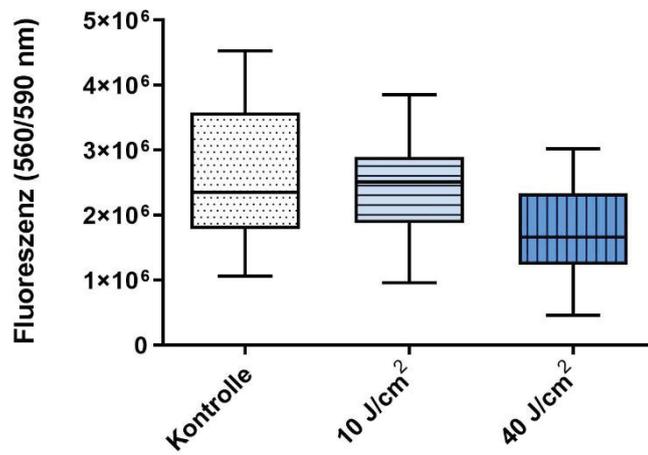


Abbildung 30: Celltiter-Blue®-Messung nach regelmäßiger Bestrahlung Tag 7

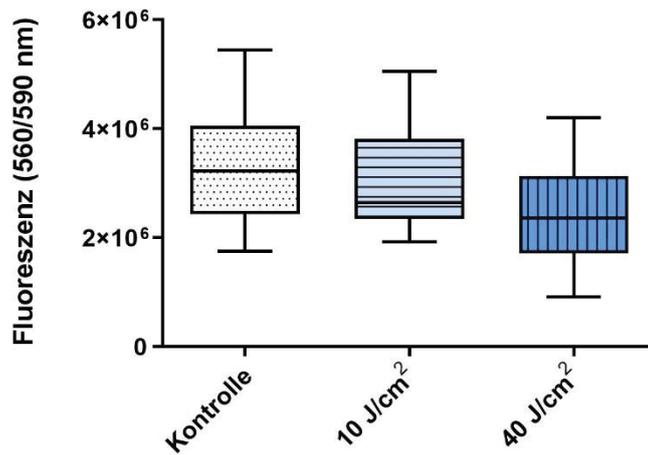


Abbildung 31: Celltiter-Blue®-Messung nach regelmäßiger Bestrahlung Tag 14

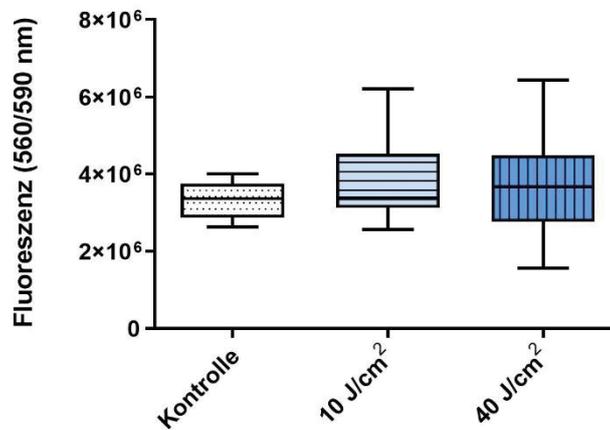


Abbildung 32: Celltiter-Blue®-Messung nach regelmäßiger Bestrahlung Tag 21

4.6 Messung des lysosomalen Metabolismus mittels Neutral-Rot-Färbung

Für eine Beurteilung des lysosomalen Stoffwechsels wurde das Neutralrot-Verfahren herangezogen. Abermals wurden Zellen mit entweder 10 J/cm^2 , 40 J/cm^2 oder 80 J/cm^2 blauen Lichts bestrahlt und direkt im Anschluss an die Bestrahlung sowie nach 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Während die mit 10 J/cm^2 bestrahlten Zellen stets ähnliche Werte wie die Kontrollgruppe zeigten (siehe Abb. 33) zeigte die mit 40 J/cm^2 bestrahlte Zellgruppe bereits direkt nach Ende der Bestrahlung eine deutliche Aktivitätsminderung (Abb. 34). Nach 4 ($p= 0,0223$) und 8 Stunden ($p= 0,0240$) war diese statistisch signifikant. Nach 48 Stunden glich der Wert wieder dem der Kontrollgruppe. Ähnlich verhielten sich die mit 80 J/cm^2 bestrahlten Zellen (Abb. 35). Diese zeigten bereits direkt im Anschluss an die Bestrahlung ($p= 0,0479$) sowie nach 4 ($p= 0,0115$) und 24 Stunden ($p= 0,0154$) eine signifikante Aktivitätsminderung. In der nach 8 Stunden durchgeführten Messung handelte es sich um eine hochsignifikante Veränderung ($p= 0,0075$). In der nach 72 Stunden durchgeführten Messung glich der Wert wieder dem der Kontrollgruppe.

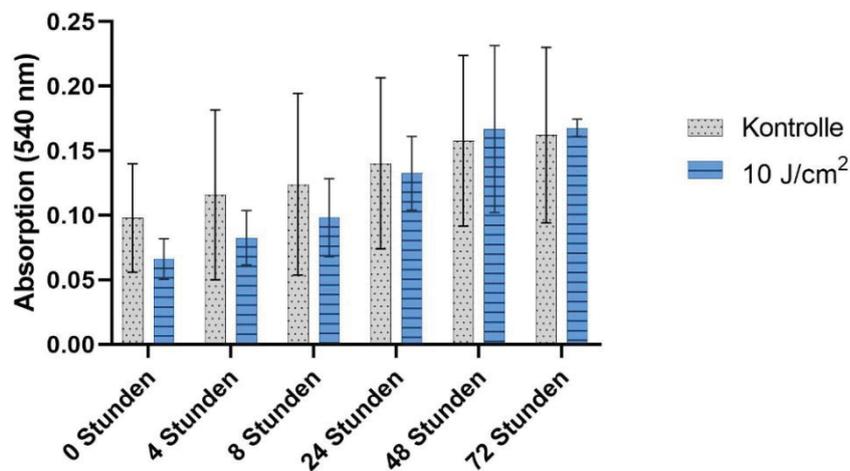


Abbildung 33: Neutralrot-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 10 J/cm^2

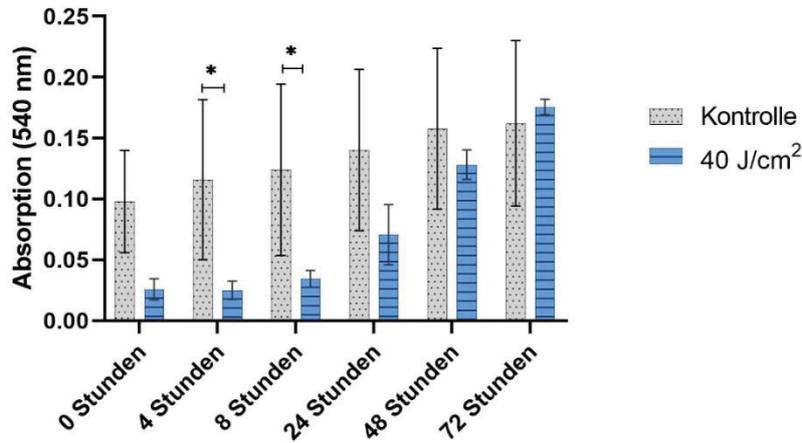


Abbildung 34: Neutralrot-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 40 J/cm²,
 *= p < 0,05

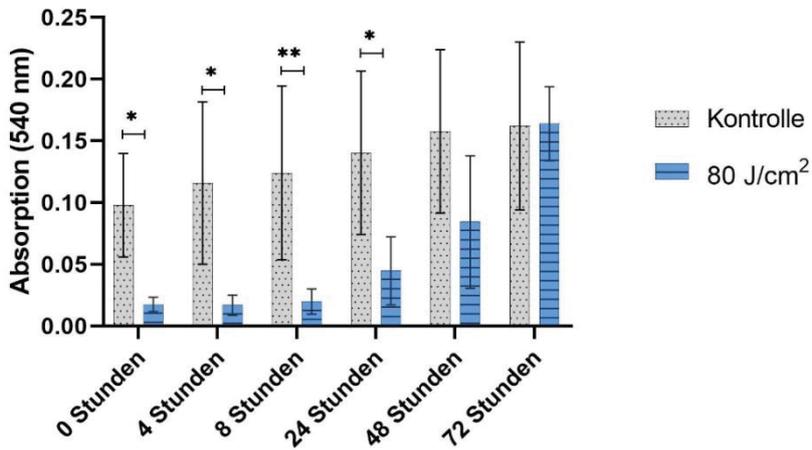


Abbildung 35: Neutralrot-Messung nach einmaliger Bestrahlung – Kontrolle und 80 J/cm²,
 *= p < 0,05 **= p < 0,01

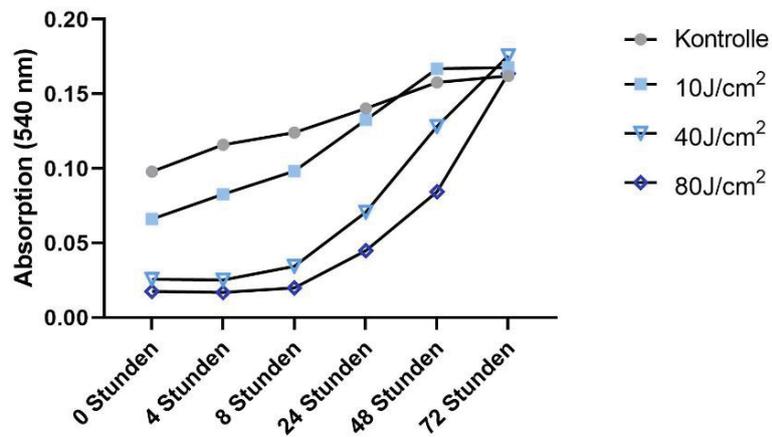


Abbildung 36: Neutralrot-Messung nach einmaliger Bestrahlung - Übersichtsdarstellung

4.7 Effekt der Bestrahlung auf die osteogene Differenzierung bei regelmäßiger Bestrahlung

Es wurden ASCs für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Eine Versuchsgruppe wurde dabei dreimal wöchentlich mit 10 J/cm^2 blauen Lichts von 453 nm Wellenlänge bestrahlt, eine weitere Gruppe mit 40 J/cm^2 . Eine mitgeführte Kontrollgruppe erfuhr keiner spezielle Behandlung. Es wurden Messungen der osteogenen Differenzierung an den Tagen 7, 14 und 21 mittels Alizarin-Rot-S-Färbung und anschließender Rücklösung durchgeführt (siehe Abb. 50 bis 52). Es zeigte sich eine Inhibition der osteogenen Differenzierung durch Bestrahlung mit blauem Licht, welche im Two-way-Anova-Test statistische Signifikanz aufwies ($p=0,0124$). In der mit 40 J/cm^2 bestrahlten Gruppe zeigte sich am Tag 21 eine signifikante Inhibition der osteogenen Differenzierung gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,0284$). Auch bei makroskopischer und mikroskopischer Betrachtung ließ sich am Tag 21 eine deutlich geringere Anfärbbarkeit der mit 40 J/cm^2 bestrahlten Zellkulturen erkennen. ASCs von Spendern, welche auch nach 21 Tagen im Differenzierungsmedium keine OD600 von >1 zeigten, wurde als *non-responder* vermerkt und nicht für die zusammenfassende Grafik berücksichtigt. Aufgrund der teils hohen Divergenz in der Ausprägung der Osteogenen Differenzierung sind zunächst alle Messergebnisse vom Tag 21 aufgeführt (Abbildungen 37-49).

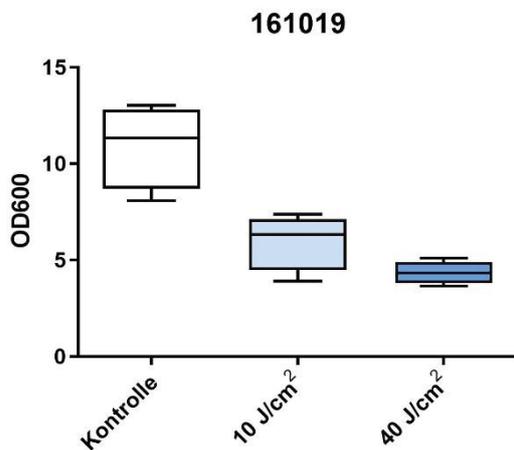


Abbildung 37: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161019 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

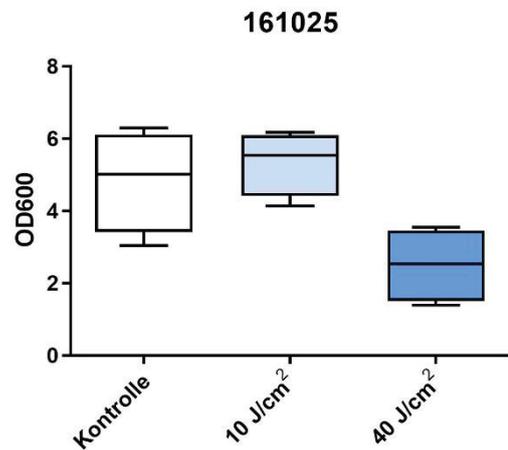


Abbildung 38: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161025 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

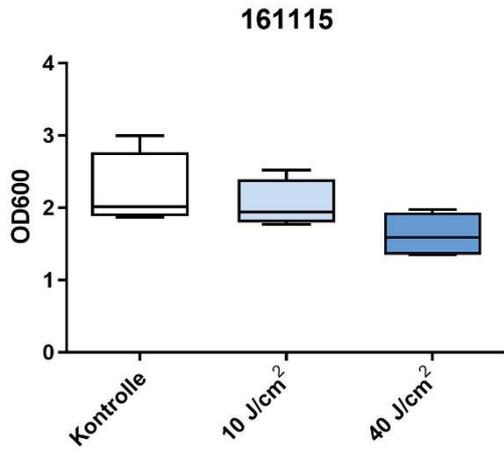


Abbildung 39: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161115 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

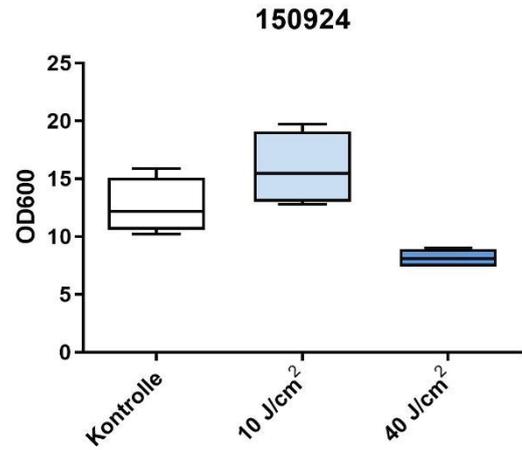


Abbildung 40: OD600 Messung am Tag 21 Spender 150924 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

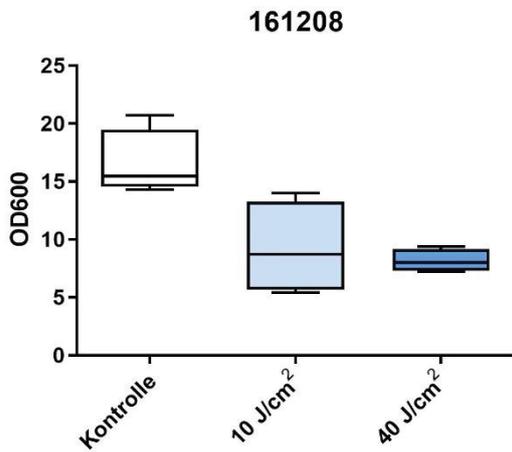


Abbildung 41: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161208 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

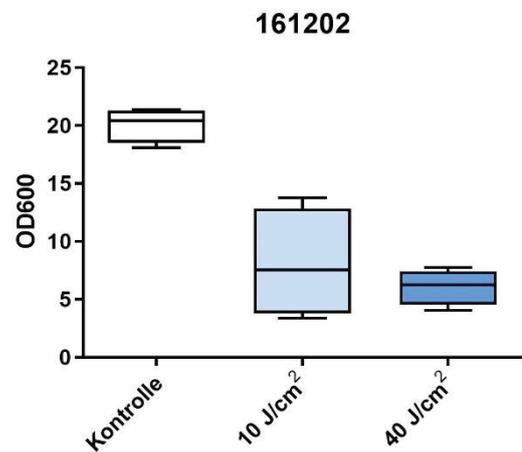


Abbildung 42: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161202 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

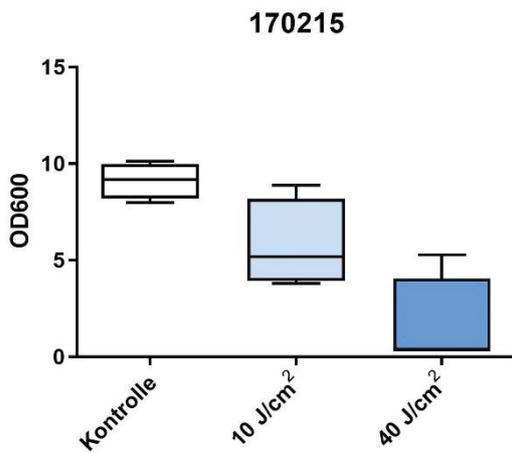


Abbildung 43: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170215 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

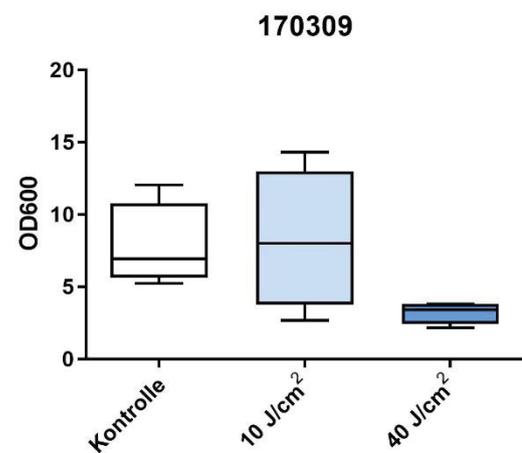


Abbildung 44: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170309 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

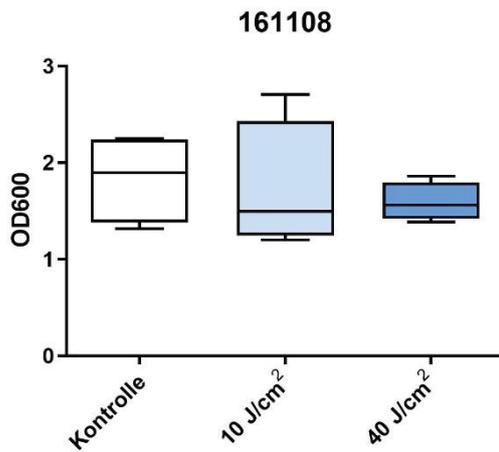


Abbildung 45: OD600 Messung am Tag 21 Spender 161108 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

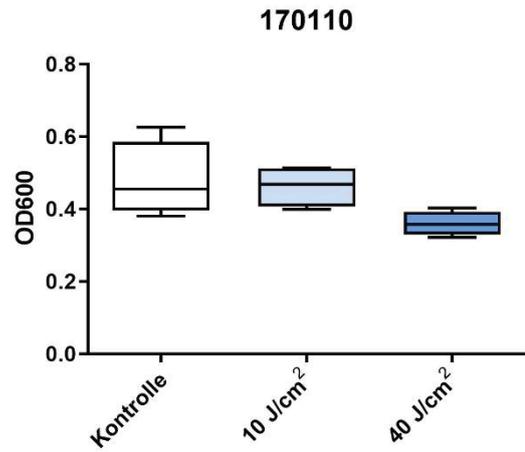


Abbildung 46: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170110 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm² non-responder

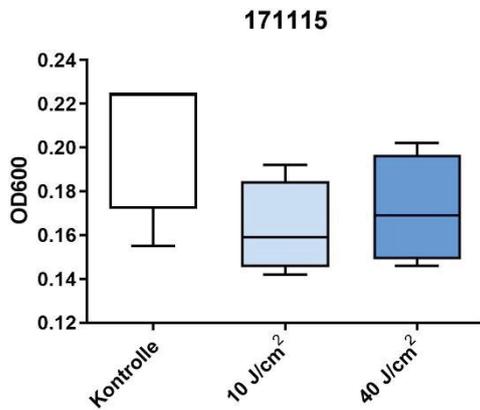


Abbildung 47: OD600 Messung am Tag 21 Spender 171115 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm² non-responder

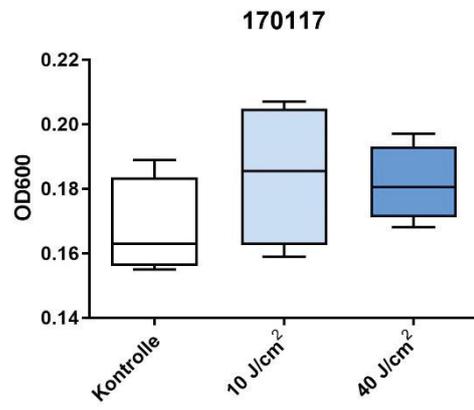


Abbildung 48: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170117 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm² non-responder

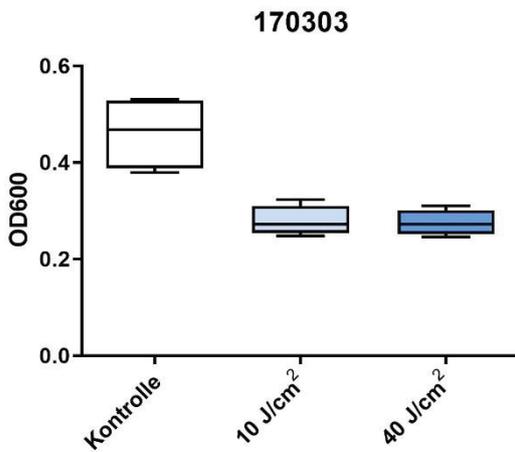


Abbildung 49: OD600 Messung am Tag 21 Spender 170303 Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm² non-responder

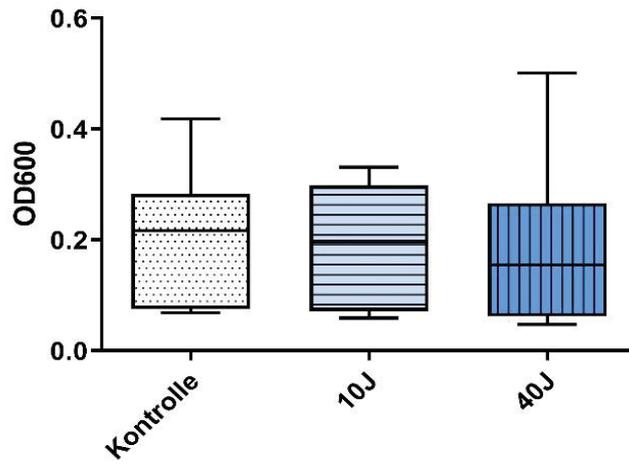


Abbildung 50: OD600 am Tag 7 alle Responder, Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

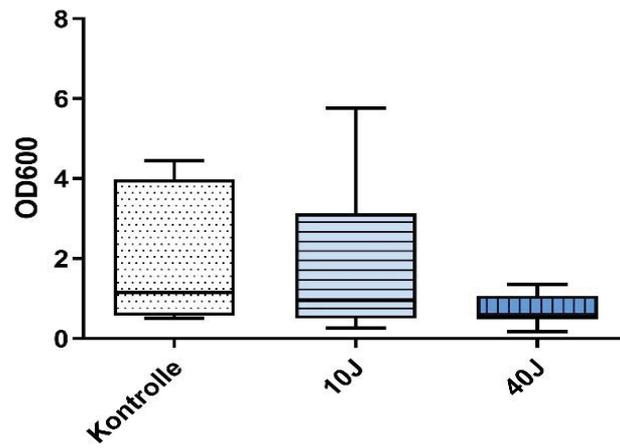


Abbildung 51: OD600 am Tag 14 alle Responder, Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²

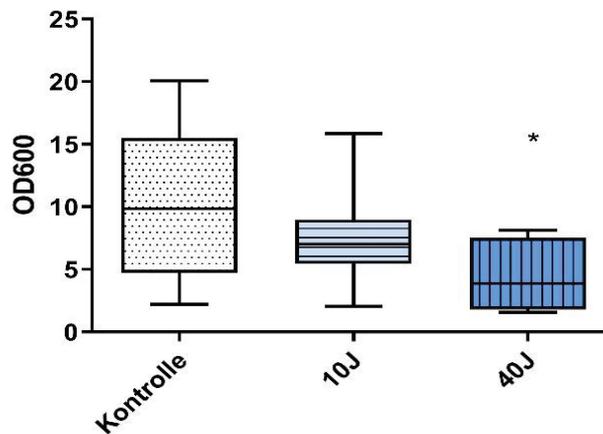


Abbildung 52: OD600 am Tag 21 alle Responder Kontrolle, 10 J/cm² 40 J/cm²
 *= $p < 0,05$

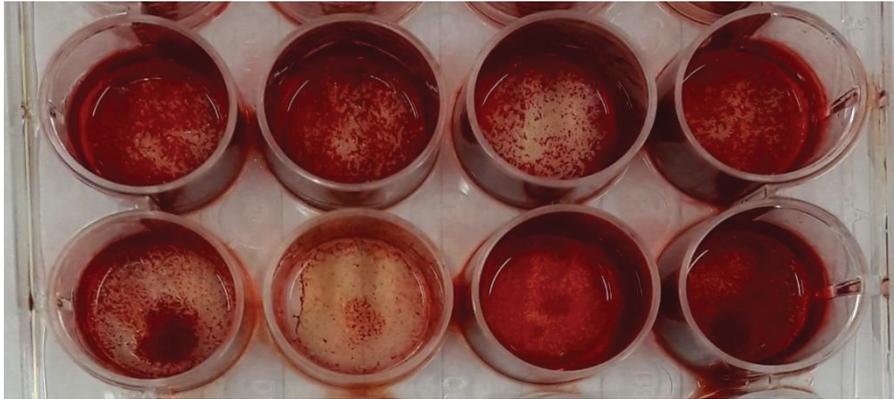


Abbildung 53: Alizarin-Rot-S-Färbung, makroskopische Aufnahme Kontrollgruppe am Tag 21

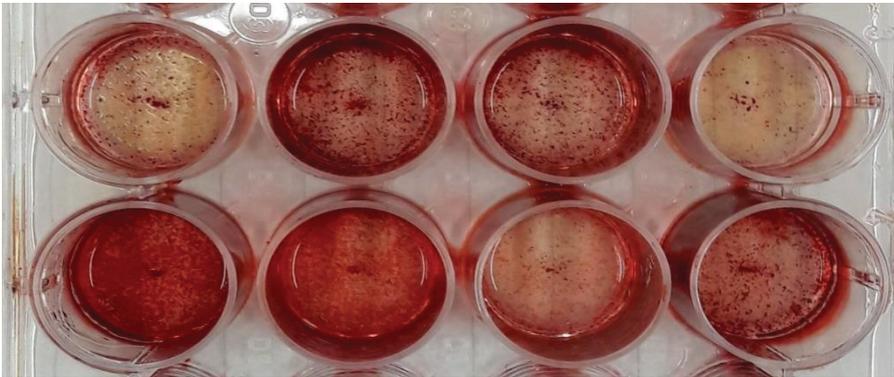


Abbildung 54: Alizarin-Rot-S-Färbung, makroskopische Aufnahme 10J/cm2-Gruppe am Tag 21

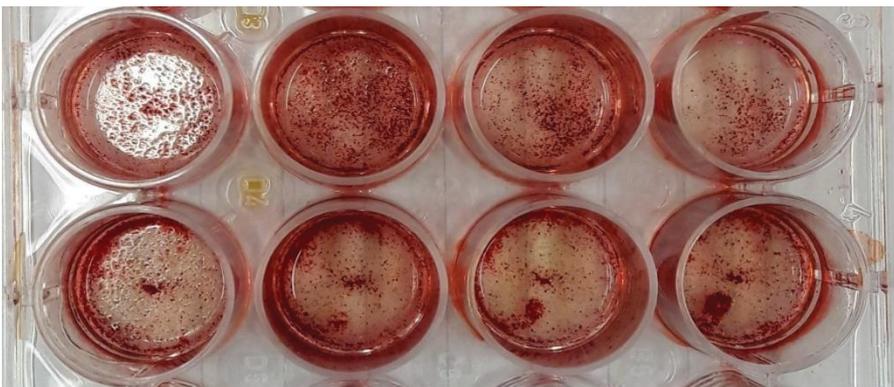
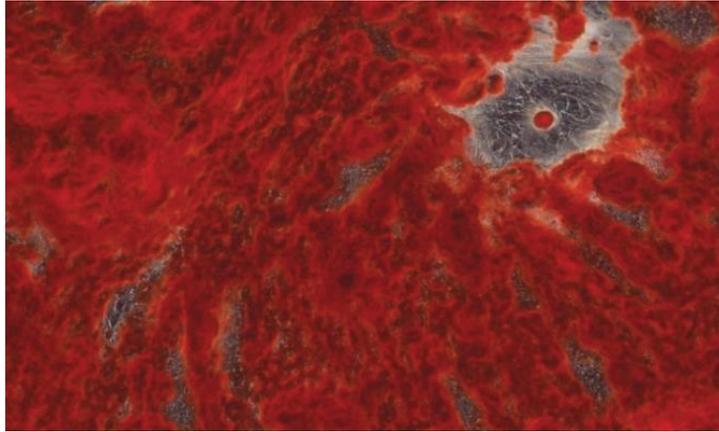
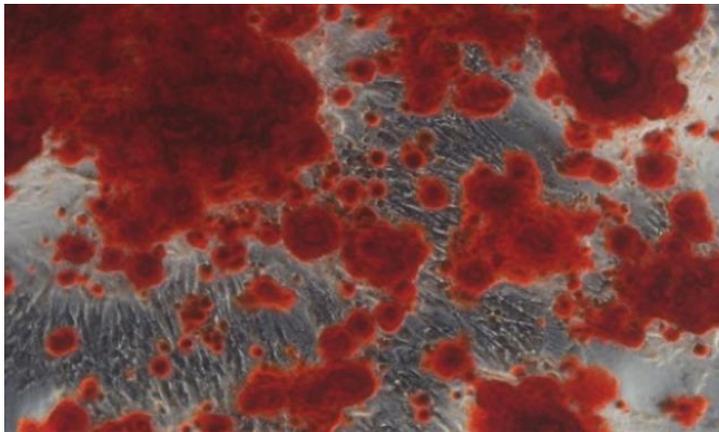


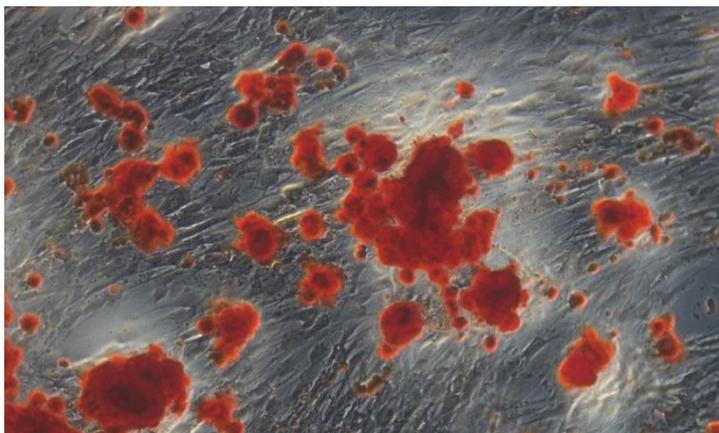
Abbildung 55: Alizarin-Rot-S-Färbung, makroskopische Aufnahme 40J/cm2-Gruppe am Tag 21



*Abbildung 56: Alizarin-Rot-S-Färbung, mikroskopische Aufnahme
Kontrollgruppe am Tag 21*



*Abbildung 57: Alizarin-Rot-S-Färbung, mikroskopische Aufnahme
10 J/cm²-Gruppe am Tag 21*



*Abbildung 58: Alizarin-Rot-S-Färbung, mikroskopische Aufnahme
40 J/cm²-Gruppe am Tag 21*

4.8 Effekt der Bestrahlung auf den intrazellulären Lipidgehalt bei regelmäßiger Bestrahlung

Mittels Nilrot-Färbung und anschließender Fluoreszenzmessung wurde der intrazelluläre Lipidgehalt bestimmt. Dies geschah nach 21 Tagen Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium und dreimal wöchentlicher Bestrahlung mit entweder 10 J/cm^2 oder 40 J/cm^2 blauen Lichts. Der Vergleich erfolgt gegenüber einer Kontrollgruppe, welche sich in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert, aber nicht bestrahlt wurde. Ein Einfluss von blauem Licht auf den intrazellulären Lipidgehalt war am Tag 21 nicht zu beobachten (siehe Abb. 59).

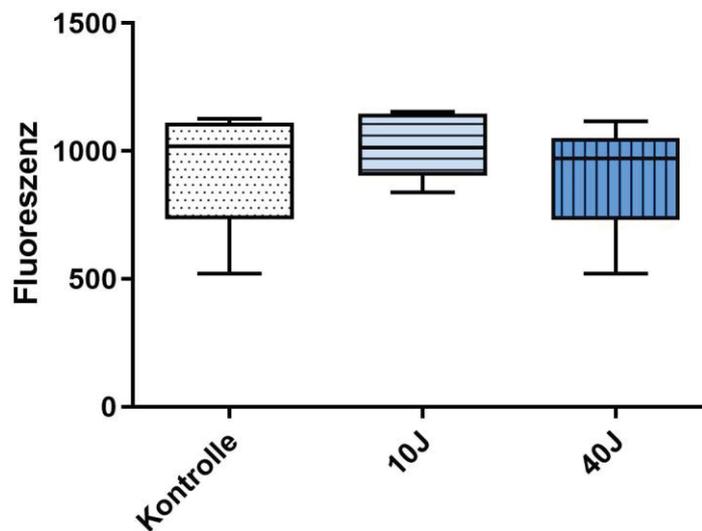


Abbildung 59: Nilrot-Färbung Tag 21 Kontrolle, 10 J/cm^2 40 J/cm^2

5. Diskussion

In der Entwicklung neuer Therapieverfahren für Krankheiten beinahe aller medizinischer Fachrichtungen stellen stammzellbasierte Ansätze eine vielversprechende Option dar. Das Ersetzen kranker Gewebe mit künstlich angezuchteten Geweben, das sogenannte *Tissue Engineering*, beschäftigt weltweit zahlreiche Wissenschaftler. Tissue Engineering nutzt die multipotenten Eigenschaften der Stammzellen, um diese in die zu ersetzenden Zellen differenzieren zu lassen. Insbesondere die Behandlung degenerativer Knochenerkrankungen mit autolog gewonnenen Stammzellen stellt einen Schwerpunkt des Tissue Engineering dar.

Entscheidend für stammzellbasierte Therapieansätze ist die Gewinnung geeigneter Stammzellen. Embryonale Stammzellen bieten zwar hervorragende Differenzierungseigenschaften; aufgrund ihrer Gewinnung aus Embryonen sind diese Zellen jedoch nur eingeschränkt verfügbar und das Verfahren ihrer Gewinnung ist ethisch umstritten (Vazin & Freed, 2010). Eine Alternative stellen aus adultem Gewebe gewonnene, mesenchymale Stromazellen (MSCs) dar. MSCs sind eine heterogene Gruppe adulter Stammzellen, die aus diversen adulten Gewebetypen gewonnen werden können (Uccelli, Moretta, & Pistoia, 2008). Neben ihren Differenzierungseigenschaften stehen MSCs auch aufgrund ihrer zahlreichen immunmodulatorischen Eigenschaften im Fokus der Forschung (Murphy, Moncivais, & Caplan, 2013). Insbesondere die aus dem Knochenmark gewonnenen „Bonemarrow-derived mesenchymal stromal cells“ (BMSCs) haben sich aufgrund ihrer guten Eigenschaften zum Standard in der Erforschung und Anwendung, insbesondere in Knochenersatzverfahren, entwickelt (Tan, Lui, Rui, & Wong, 2012; Uccelli et al., 2008). Die Gewinnung von BMSCs geht jedoch in der Regel mit einer Knochenmarkspunktion einher. Diese kann neben Unannehmlichkeiten wie Schmerzen auch zu seltenen aber ernststen Komplikationen wie Blutungen oder Infektionen führen (Draganski, Deason, & Craig, 2019). Folglich sind einfacher zugängliche Alternativen erforderlich.

Eine solche Alternative stellen adipogene Stromazellen (ASCs) dar. ASCs können aus adultem Fettgewebe gewonnen werden, was ihre Gewinnung gegenüber anderen Stammzellarten unkompliziert, ergiebig und weniger komplikationsbehaftet macht. Bisherige klinische Versuche, dieses Potenzial für osteo-regenerative Therapieoptionen zu nutzen, blieben jedoch größtenteils hinter den hohen Erwartungen zurück. In vivo scheinen dabei insbesondere ihr

Proliferationsverhalten und eine insuffiziente Beeinflussbarkeit der (osteogenen) Differenzierung als limitierende Faktoren in Frage zu kommen. Besseres Wissen über Einflussfaktoren auf Differenzierungsverhalten, Proliferation und Zellstoffwechsel könnten entscheidende Erkenntnisse liefern, um dieses therapeutische Potenzial nutzbar zu machen.

Als besonders einflussreicher Faktor auf die osteogene Differenzierung von ASCs konnten reaktive Sauerstoffspezies (ROS) identifiziert werden. Forschungen ergaben, dass ROS eine osteogene Differenzierung in MSCs inhibieren (Denu & Hematti, 2016) und eine adipogene Differenzierung fördern (Higuchi et al., 2013). Dabei lässt sich sowohl eine intrinsische Veränderung der ROS-Konzentration während des Differenzierungsprozesses beobachten, als auch eine Beeinflussung des Differenzierungsverhaltens bei einer künstlichen Beigabe von ROS erzeugen (de Villiers et al., 2018).

Diverse Untersuchungen zeigen, dass das Alter des Spenders maßgeblichen Einfluss auf das osteogene Differenzierungspotenzial von ASCs hat (Choudhery, Badowski, Muise, Pierce, & Harris, 2014). Ein hohes Alter und die damit verbundene Zellseneszenz korrelieren mit einer Erhöhung von ROS (Davalli, Mitic, Caporali, Lauriola, & D'Arca, 2016). Folglich könnte die ROS-Zunahme auch die verminderte osteogene Differenzierung in ASCs von alten Spendern erklären.

ROS, welche eine Vielzahl von biologischen Prozessen und Veränderungen anstoßen können, sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass ROS sowohl Bestandteil zahlreicher Krankheits- und Alterungsprozesse sind, als auch wichtige physiologische Funktionen erfüllen (Li et al., 2016). Die intrazelluläre Genese von ROS geschieht durch verschiedene redoxrelevante Enzymsysteme, welche sich allesamt durch einen redoxaktiven Flavinrest auszeichnen (Phaniendra et al., 2015). Zu diesen Enzymsystemen gehören die Familie der NADPH-Oxidasen, die Xanthin/Hypoxanthin-Oxidase, sowie verschiedene Enzyme der Atmungskette (Lindsay, McCourt, Karachunski, Lowe, & Ervasti, 2018; Phaniendra et al., 2015).

Diverse Forschungsprojekte des Labors für Unfallchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf haben nachgewiesen, dass eine Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm zu einer deutlich erhöhten ROS-Synthese durch die genannten Flavin-haltigen Enzyme führt. So konnte Julia Krassovka zeigen, dass die Bestrahlung durch eine photoinduzierte

Änderung des Redoxstatus der Flavinanteile Einfluss auf die Aktivität der genannten Enzyme nimmt (Krassovka, 2017). Sie konnte zudem nachweisen, dass eine Bestrahlung Flavin-haltiger Enzyme nicht nur eine erhöhte Konzentration an ROS, sondern auch eine Verminderung des NADP⁺ Umsatzes bewirkt. Dementsprechend befinden sich die bestrahlten Enzyme in einem Zustand, welcher sich durch eine erhöhte Synthese des Produkts auszeichnet, ohne dass das eigentlich benötigte Substrat verbraucht wird. Dies wird als Entkopplung bezeichnet.

Die Bestrahlung mit blauem Licht kann also als ein neuartiges Werkzeug angesehen werden, um Flavin-haltige ROS-synthetisierende Enzyme und die durch sie entstehenden ROS bezüglich ihrer biologischen Funktion und Wirkweise zu untersuchen. Dieses Verfahren wird in den von mir durchgeführten Versuchen erstmals genutzt, um die Wirkung der genannten Enzyme auf normale sowie osteogen induzierte ASC-Kulturen zu prüfen. In den Versuchen wurden Auswirkungen auf die Vitalität, mitochondriale Aktivität, ATP-Synthese, lysosomale Aktivität und die induzierte Osteogenese untersucht. Eine genauere Kenntnis der genannten Enzyme und ihres Einflusses könnte sowohl ein Schlüsselement für eine klinische Anwendbarkeit von ASCs sein als auch wichtige Informationen über Seneszenz-bedingte Zellveränderungen liefern. Eine nachweisbare Beeinflussung der osteogenen Differenzierung durch die Aktivierung Flavin-haltiger Enzyme könnte Hinweise dafür liefern, dass diese durch ihre ROS-Synthese maßgeblich an der Regulation der osteogenen Differenzierung in ASCs beteiligt sind. Folglich wäre beispielsweise eine medikamentöse Regulation dieser Enzyme und damit der ROS-Synthese denkbar, um Einfluss auf die osteogene Differenzierung zu nehmen.

In den von mir durchgeführten Versuchen wurde zunächst ausgeschlossen, dass die verwendeten Lichtdosen einen toxischen Effekt auf ASCs zeigen. Dazu wurden Zellkulturen einmalig mit je 10 J/cm², 40 J/cm² oder 80 J/cm² bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ende der Bestrahlung hinsichtlich ihrer Apoptoserate untersucht. Eine Visualisierung der Apoptoserate wurde mit den Farbstoffen Hoechst 33342 und Propidiumiodid durchgeführt. Da es sich nicht um ein quantitatives Verfahren handelt und nur repräsentative Ausschnitte gezeigt wurden, sollten Interpretationen zurückhaltend formuliert werden. Allerdings zeigte sich, dass die mit 80 J/cm² bestrahlten Zellen leicht mehr apoptotische Zellen als die Kontrollgruppe enthielten, während die mit 10 J/cm² und 40 J/cm² bestrahlten Zellen etwa denen der Kontrollgruppe glichen.

Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurde die Durchflusszytometrie nach Anfärbung mit Propidiumiodid genutzt. Als Messzeitpunkte wurden 4, 8, 24 sowie 48 Stunden nach Ende der Bestrahlung gewählt. In der Auswertung zeigte sich bei keiner der Gruppen eine signifikante Erhöhung der Apoptose. Die teils erhöhten Mittelwerte der mit 80 J/cm^2 bestrahlten Gruppe könnten jedoch ein Hinweis darauf sein, dass diese Intensität einen Grenzbereich zur Toxizität darstellt. Die teils erhöhten Standardabweichungen sind Resultat der Arbeit mit Primärkulturen. Letztlich lässt sich anhand der Ergebnisse argumentieren, dass insbesondere Zellen, die mit 10 J/cm^2 sowie 40 J/cm^2 bestrahlt wurden, keiner relevanten Toxizität ausgesetzt sind.

Die Untersuchung der Funktionsparameter der Atmungskette, welche mit Hilfe des Seahorse XF Cell Mito Stress Test untersucht wurden, zeigten eine ausgeprägte Beeinflussung durch die Bestrahlung und die dadurch resultierenden erhöhten ROS-Level. Es fanden sich hochsignifikante Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. Die basale Aktivität, die maximale Respiration, die zusätzliche respiratorische Kapazität und die ATP-Produktion waren im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich reduziert, während der Protonenleak sowie der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch erhöht waren.

Zusammenfassend lässt sich also schlussfolgern, dass die Arbeitsleistung der Atmungskette deutlich inhibiert wird, während andere zelluläre sauerstoffabhängige Stoffwechselfvorgänge gesteigert werden. Dies könnte auf die erhöhten ROS-level zurückzuführen sein. Auch die NADH-Dehydrogenase ist durch ihre Flavingruppe ein Photoakzeptor und ist damit selbst von der Bestrahlung betroffen. Auch wenn eine direkte Inhibition der NADH-Dehydrogenase durch die Bestrahlung nicht sicher auszuschließen ist, deuten die Voruntersuchungen doch darauf hin, dass die NADH-Dehydrogenase durch eine Bestrahlung mit blauem Licht allenfalls eine Aktivitätssteigerung erfahren sollte. Auch Godley et al. testeten die Effekte von Bestrahlung mit blauem Licht auf isolierte Mitochondrien, um genauere Aussagen über Interaktionen mit mitochondrialen Strukturen treffen zu können. Dabei konnten sie neben einem Verlust von Aktivität der Atmungskette stets auch eine gesteigerte Synthese von ROS beobachten (Godley et al., 2005). Während eine ROS-unabhängige Inhibition der Atmungskette durch Bestrahlung bisher nicht nachgewiesen werden konnte, ist die Inhibition der Atmungskette durch ROS durchaus erklärbar. Einen möglichen Erklärungsansatz für eine ROS-abhängige Inhibition der Atmungskette stellen Entkopplungsproteine (*uncoupling proteins*, UCPs), dar. Diese sind Transportproteine der inneren Mitochondrienmembran, welche

unter anderem einen Protonenfluss zurück in das Mitochondrium ermöglichen (Cheng et al., 2017). Trotz der teilweise ungeklärten Funktionsweise dieser UCPs gibt es Hinweise darauf, dass UCPs insbesondere bei einem vermehrten Auftreten von ROS einen vermehrten Protonenleak verursachen (Brookes, 2005). Brookes et al. vermuten eine inverse Beziehung, in der das Auftreten von Protonenleaks eine verminderte Synthese von ROS bewirkt, während eine erhöhte ROS-Konzentration zu einem verstärkten Protonenleak führt. Insbesondere Superoxid konnte als UCP-Aktivator identifiziert werden (Echtay et al., 2002). Folglich könnte insbesondere die beobachtete Erhöhung des Protonenleaks durch die erhöhte ROS-Konzentration zu erklären sein.

Ein zeitlicher Verlauf der Beeinflussung der Atmungskette, insbesondere der Aktivität der NADH-Dehydrogenase, wurde mit Hilfe des CellTiter-Blue®-Verfahrens dargestellt (Abu-Amero & Bosley, 2005). Dazu wurden ASCs in regulärem Proliferationsmedium einmalig bestrahlt. Es wurden Dosen von 10 J/cm^2 , 40 J/cm^2 oder 80 J/cm^2 genutzt und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Als Messzeitpunkte wurden das Ende der Bestrahlung, sowie 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden danach gewählt. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition der respiratorischen Aktivität. Bei der mit 40 J/cm^2 bestrahlten Gruppe war die Inhibition gegenüber der Kontrollgruppe bei der Messung nach 24 Stunden statistisch signifikant ($p=0,0382$). Bei der mit 80 J/cm^2 bestrahlten Gruppe konnte eine statistische Signifikanz bei den Messungen nach 24 Stunden ($p=0,0118$) und 48 Stunden ($p=0,0334$) festgestellt werden. Im zeitlichen Verlauf glichen sich die Werte jedoch wieder denen der Kontrollgruppe an, so dass nach 72 Stunden keine statistische Signifikanz mehr feststellbar war. Für diese Entwicklung ist derselbe Mechanismus verantwortlich wie im Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Der zeitliche Verlauf und die annähernd vollständige Erholung weisen jedoch deutlich auf die Reversibilität sowie die temporäre Begrenztheit des beobachteten Effekts hin.

In einem simultanen Versuchsaufbau wurde der Einfluss Flavin-haltiger Enzyme auf den lysosomalen Stoffwechsel untersucht. Dies geschah unter Verwendung der Neutralrot-Färbung. Auch hier zeigte sich ein ausgeprägter Einfluss auf die Zellen, welche mit 40 J/cm^2 oder 80 J/cm^2 bestrahlt wurden. Im Gegensatz zur CellTiterBlue®-Messung zeigte sich der tiefste gemessene Wert direkt im Anschluss an die Bestrahlung. Eine statistisch signifikante Inhibition zeigte sich bei der mit 40 J/cm^2 bestrahlten Gruppe nach 4 Stunden ($p=0,0223$)

und nach 8 Stunden ($p=0,0240$). Bei der mit 80 J/cm^2 bestrahlten Gruppe fanden sich statistisch signifikante Ergebnisse direkt im Anschluss an die Bestrahlung ($p=0,0479$), nach 4 Stunden ($p=0,0115$) sowie nach 24 Stunden ($p=0,0154$). Nach 8 Stunden konnte bei der mit 80 J/cm^2 bestrahlten Gruppe eine hochsignifikante Inhibition gemessen werden ($p=0,0075$). Anschließend erfolgte bei allen Gruppen eine vollständige Erholung und Angleichung an die Kontrollgruppe innerhalb von 72 Stunden.

Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen, dass simultan zur Beeinflussung der Atmungskette eine massive, jedoch zeitlich begrenzte und vollständig reversible Beeinflussung des lysosomalen Stoffwechsels stattfindet. Abermals lassen sich verschiedene Hypothesen aufstellen, worauf die beobachtete Beeinträchtigung beruht. Eine Erhöhung der zellulären ROS-Konzentration führt unter physiologischen Umständen zu einer Aktivierung von Autophagie durch Lysosomen (Zhang et al., 2016). Autophagie bezeichnet physiologische Prozesse des Abbaus und der Wiederverwertung von zelleigenen Bestandteilen. Diese Prozesse gehen jedoch mit einer temporären Erhöhung der Neutralrot-Aufnahme einher (Martins, Severino, Souza, Stolf, & Baptista, 2013). Auch die Ergebnisse der Toxizitätsmessung lassen eine ROS-bedingte Autophagie unplausibel erscheinen. Eine bessere Erklärung findet sich bei Betrachtung der lysosomalen Funktionsweise. Lysosomen, deren Inhalt im Vergleich zum Zellplasma deutlich saurer ist, müssen aktiv einen pH-Gradienten aufrechterhalten. Dies geschieht durch *Vacuolar-type-proton-pumping ATPasen* (Futai et al., 2019). Diese Protonenpumpen nutzen ATP als Energiequelle, um Protonen in das Innere des Lysosoms zu befördern. Folglich sind der pH-Wert des Lysosoms und damit die gemessenen Werte im Neutralrot-Verfahren abhängig von der ATP-Konzentration und damit auch von der Aktivität der Atmungskette.

Die Beeinflussung des lysosomalen Stoffwechsels könnte folglich ein Resultat aus der Inhibition der ATP-Synthese sein, die durch das Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Verfahren gezeigt werden konnte. Aktuelle Untersuchungsergebnisse verschiedener Forschungsgruppen untermauern diese Überlegung. Insbesondere der hochgradig energieabhängige Vorgang der Autophagie scheint bereits unter leicht verminderten ATP-Konzentrationen deutlich eingeschränkt zu sein (Plomp, Gordon, Meijer, Høyvik, & Seglen, 1989; Schütt, Aretz, Auffarth, & Kopitz, 2012). Autophagie gilt als ein lebenswichtiger zytoprotektiver Prozess, der die Anhäufung von geschädigten zellulären Biomolekülen und Strukturen verhindert (Rajawat, Hilioti, & Bossis, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Autophagie degenerative Veränderungen im Gewebe befördert, die denen

ähneln, die mit dem Alterungsprozess einhergehen. Zudem ist sowohl physiologisches als auch pathologisches Altern oft mit einem verminderten autophagischen Potenzial assoziiert (Rubinsztein, Mariño, & Kroemer, 2011). Diese Zusammenhänge verdeutlichen, wie weitreichend die Wirkung der untersuchten ROS-synthetisierenden Enzyme ist.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss Flavin-haltiger Enzyme auf die induzierte Osteogenese von ASCs geprüft. Dazu wurden ASCs drei Wochen lang in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert und dreimal wöchentlich mit jeweils 10 J/cm² oder 40 J/cm² blauen Lichts mit einer Wellenlänge von 453 nm bestrahlt. Eine Kontrollgruppe, welche ebenfalls in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert wurde, wurde nicht bestrahlt. An den Tagen 7, 14 und 21 wurde der Grad der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-S-Färbung bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutliche Inhibition der osteogenen Differenzierung bei der behandelten Gruppe. Im Fall der Zellgruppe, welche mit 40 J/cm² bestrahlt worden war, konnte dieser Effekt gegenüber der Kontrollgruppe am Tag 21 mit statistischer Signifikanz ($p=0,0284$) belegt werden. Auch ein allgemeiner Einfluss der Bestrahlung auf das Maß der Differenzierung präsentierte sich, alle Versuchszeitpunkte zusammengenommen, als statistisch signifikant ($p=0,0452$). Die Beeinflussung der osteogenen Differenzierung konnte an den Tagen 7 und 14 bereits als Tendenz erkannt werden, erreichte aber kein statistisch signifikantes Ausmaß. Dies ist dadurch zu erklären, dass eine Inkubation mittels Differenzierungsmedium erst nach zwei bis drei Wochen zur Bildung einer adäquaten Calciummatrix führt. Dies lässt sich gut an der mitgeführten Kontrolle erkennen, welche am Tag 21 einen um den Faktor 50 höheren Mittelwert gegenüber dem Tag 7 in der OD600 zeigte.

In der Betrachtung der einzelnen Spender (Abb. 37 bis 49) konnte eine breite Varianz im Grad der osteogenen Differenzierung festgestellt werden. Dies begründet sich zum einen in der Arbeit mit Primärkulturen, zum anderen im unterschiedlichen Differenzierungspotenzial einzelner Spender. Letzteres kann aufgrund verschiedener Faktoren wie beispielsweise des Alters stark variieren (Choudhery et al., 2014). Von den insgesamt 13 verschiedenen Zellspendern zeigten vier kein suffizientes Ansprechen auf die Induktion der osteogenen Differenzierung, da sie nach 21 Tagen keine ODT-Werte >1 erreichten. Diese wurden als non-responder markiert. Die einzelnen Ergebnisse finden sich in den Abbildungen (Abb. 46 bis 59), sie wurden jedoch für die statistische Auswertung nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eindrucksvoll, dass die ROS-Synthese durch Flavin-haltige Enzyme einen inhibierenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung von ASCs nimmt. ASCs sind in ihrem Differenzierungsverhalten invers, was bedeutet, dass die Differenzierung in osteogene Zelltypen eine adipogene Differenzierung verhindert und vice versa (James, 2013). Eine adipogene Differenzierung ist mit einer erhöhten ROS-Konzentration assoziiert und kann auch gezielt durch eine Beigabe von ROS stimuliert werden (de Villiers et al., 2018). Auch eine Inhibition der adipogenen Differenzierung durch Antioxidantien konnte beobachtet werden (de Villiers et al., 2018). Aus diesen Überlegungen heraus stellte sich die Frage, ob es im Umkehrschluss zu einer Steigerung adipogener Differenzierungstendenzen kam. Dies wurde unter Zuhilfenahme der Nilrot-Färbung untersucht, welche intrazelluläre Lipidanteile aufzeigt.

Die Untersuchung erfolgte an ASCs, welche 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert worden waren und dreimal wöchentlich mit entweder 10 J/cm² oder 40 J/cm² blauen Lichts bestrahlt worden waren. In der Fluoreszenzmessung konnten keine Unterschiede zwischen den bestrahlten Zellen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Entsprechend war der intrazelluläre Lipidanteil gegenüber der Kontrollgruppe etwa identisch, was eine verstärkte adipogene Differenzierung unwahrscheinlich macht. Aufgrund der Tatsache, dass auch die bestrahlten Zellen eine leichte Knochenmatrix gebildet haben, ist dies jedoch wenig überraschend. Das oben beschriebene inverse Differenzierungsverhalten lässt nur eine Differenzierungsrichtung zu. So hat durch die Erhöhung der ROS-Konzentration zwar eine Minderung der osteogenen Differenzierung stattgefunden, jedoch keine Einleitung einer adipogenen Differenzierung. Ob Zellen, die in regulärem Proliferationsmedium inkubiert werden, durch die Aktivierung Flavin-haltiger Enzyme mit blauem Licht adipogene Differenzierung zeigen, sollte in zukünftigen Versuchen geprüft werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen legen deutlich dar, wie vielfältig die Wirkungen Flavin-haltiger, ROS-synthetisierender Enzyme auf verschiedene Aspekte von Stoffwechsel und Differenzierungsverhalten von ASCs wirken. Besonders der inhibierende Einfluss der untersuchten Enzyme auf die osteogene Differenzierung ist von klinischem Interesse. Wie genau diese Inhibition stattfindet, lässt sich aus verschiedenen Teilaspekten erklären.

Einen inhibierenden Einfluss von ROS auf die osteogene Differenzierung von ASCs wurde bereits mehrfach nachgewiesen. Es konnten zudem unterschiedliche molekularbiologische

Signalwege identifiziert werden, welche diesen Effekt vermitteln könnten. Almeida et al. zeigten, dass ROS sich negativ auf eine osteogene Differenzierung von ASCs auswirken können, indem sie eine Aktivierung des Forkhead-box-O (FoxO) Transkriptionsfaktors bewirken (Almeida et al., 2007). Dadurch kommt es zu einer Antagonisierung des WNT-Signalwegs, der eine entscheidende Rolle in der Bildung von Osteoblasten darstellt (Almeida et al., 2007). Weitere Signalmoleküle, die in diesem Kontext identifiziert wurden, sind die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) und die *P38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAPK) (Rodrigues et al., 2012). Über den Ursprung der ROS und unter welchen Umständen eine Freisetzung erfolgt ist jedoch weniger bekannt. Entsprechend ist eine Einordnung der hier untersuchten Enzyme für ein besseres Verständnis der genannten Mechanismen von großem Interesse.

Auch die im Rahmen dieser Studie beobachteten Effekte auf die Atmungskette und ATP-Synthese können einen relevanten Einfluss auf die osteogene Differenzierung von ASCs zeigen. Roszek und Wujak formulieren die Vermutung, dass MSCs ATP in deutlich höherem Maße als andere Zellen zur Signalübermittlung nutzen (Roszek & Wujak, 2018). Die Autoren beschreiben, dass ATP auf MSCs beispielsweise als Anreiz zur Mobilisierung wirken kann, die Proliferations- und Migrationsraten moduliert, sowie das Differenzierungsverhalten beeinflusst.

Dabei scheinen sowohl die intra- als auch extrazelluläre ATP-Konzentration sowie das Verhältnis von ATP zu ADP regulatorische Rollen einzunehmen und sich stark auf das Schicksal der Zelle auszuwirken. Sun et al. zeigten, dass eine erhöhte ATP-Menge zu einer erhöhten Aktivität der alkalischen Phosphatase, einer stärkeren Osteocalcin-Proteinexpression sowie Matrixmineralisation führt und so förderlich auf eine osteogene Differenzierung in MSCs wirkt (Sun et al., 2013). In seiner Funktion als Signalmolekül fungiert ATP vorwiegend durch eine Modulation der intrazellulären Calciumkonzentration und eine Beeinflussung G-Protein-gekoppelter Signalwege. Wang et al. zeigten, dass ATP, welches an A2b-Adenosinrezeptoren bindet, mittels einer Aktivierung von cAMP/PKA Signalwegen zu einer ausgeprägten Expression von Osteogenese induzierenden Genen wie Runx2, BMP-2, und OCN führt (C. Wang et al., 2016).

Simultan zu den ROS scheint auch hier ein inverses Verhältnis zwischen osteogener und adipogener Differenzierung vorzuliegen, da höhere ROS-Level die Adipogenese sowie die

Formation von Lipidtröpfchen verhindert (Zippel et al., 2012). Für diese Inhibition der adipogenen Differenzierung konnten insbesondere eine ATP-abhängige Aktivierung des P2Y2-Rezeptors und eine Antagonisierung des P2Y4-Rezeptors identifiziert werden (Zippel et al., 2012).

Eine negative Beeinflussung des osteogenen Differenzierungspotenzials durch ATP ist zudem noch über einen weiteren Mechanismus zu erklären. Wie oben beschrieben, konnte gezeigt werden, dass die verminderte ATP-Synthese einen deutlichen negativen Einfluss auf den lysosomalen Stoffwechsel hat. Neuere Untersuchungen zu Lysosomen zeigen, dass diese über mehr und komplexere Funktionen verfügen als lange angenommen. Iwayama et al. beobachteten lebende Osteoblasten unter Mineralisierungsbedingungen mit Superauflösungsmikroskopie im Nanobereich (Iwayama et al., 2019). Dabei konnten sie beobachten, dass Lysosomen kalzium- und phosphatreiche Matrixvesikel transportieren und diese durch Exozytose sezernieren. Die Autoren schließen daraus, dass Lysosomen eine essenzielle Rolle in der Osteogenese aufweisen (Iwayama et al., 2019). Die hier beobachtete ATP-abhängige negative Beeinflussung des lysosomalen Stoffwechsels hat also ebenfalls das Potenzial, sich maßgeblich negativ auf das osteogene Differenzierungspotenzial von ASCs auszuwirken.

In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigt sich, dass Flavin-haltige ROS-synthetisierende Enzyme eine Kaskade von unterschiedlichen zellulären Signalwegen und Stoffwechselländerungen beeinflussen, welche allesamt einen ausgeprägten negativen Einfluss auf die Osteogenese haben. Zudem führt die (Über-)Aktivierung der untersuchten Enzyme zu einem gestörten lysosomalen Stoffwechsel, welcher mit einer Störung der Autophagie assoziiert wird. Hieraus können durch eine induzierte zelluläre Alterung weitere Einschränkungen auf das Differenzierungspotenzial hervorgehen.

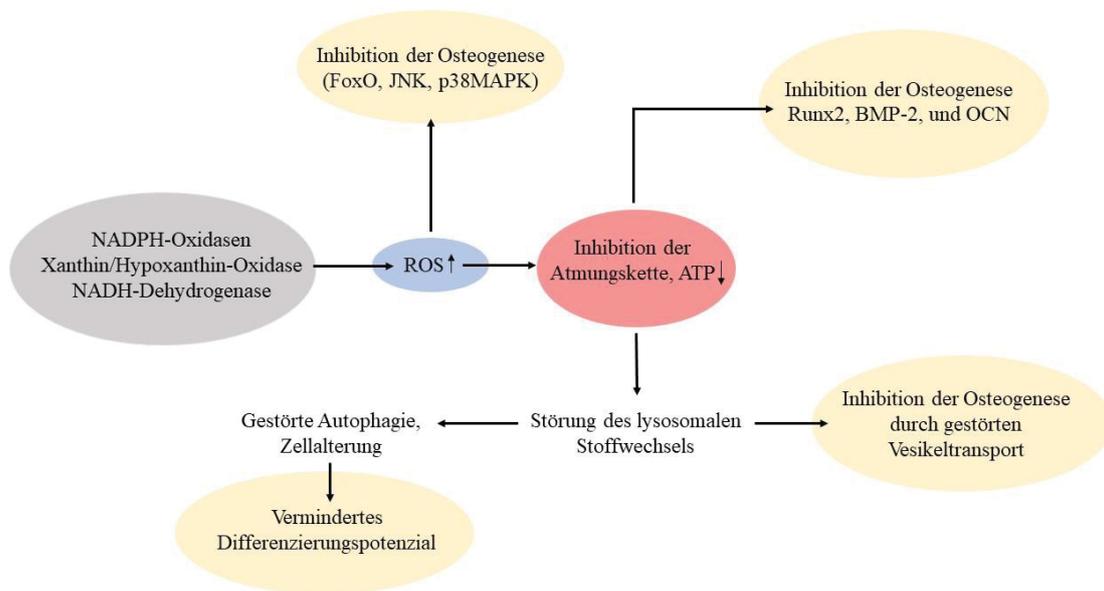


Abbildung 60: Beeinflussung der osteogenen Differenzierung in ASCs durch Flavin-haltige Enzyme, eigene Darstellung

Diese umfangreichen und komplexen Erkenntnisse könnten helfen, die untersuchten Enzyme klinisch nutzbar zu machen. Eine medikamentöse Inhibition von NOX-Enzymen könnte beispielsweise genutzt werden, um eine bessere Regulation des biologischen Potenzials von ASCs in vitro und in vivo zu erreichen und letztlich eine bessere osteogene Differenzierung von ASCs zu erzeugen. Dies könnte einen wichtigen Schritt zur Verbesserung der klinischen Anwendbarkeit von Tissue Engineering darstellen.

Eine Förderung der Osteogenese könnte jedoch auch bei all jenen Krankheiten eingesetzt werden, bei denen die Knochenzerstörungsrate die Knochenbildungsrate übersteigt, wie zum Beispiel Osteoporose, Frakturfehlbildungen und rheumatoide Arthritis (Noronha- Matos & Correia-de-Sá, 2016). Ob diese Krankheiten möglicherweise auch mit einer Überaktivierung der hier untersuchten Enzyme einhergehen, sollte ebenfalls geprüft werden.

Doch auch eine Aktivitätssteigerung der ROS-synthetisierenden Enzyme könnte unter bestimmten Umständen einen klinischen Nutzen bringen. Patienten mit Erkrankungen, die mit einer erhöhten Knochenbildung einhergehen, wie es beispielsweise in der komplexen Gruppe der heterotopen Ossifikationen sowie den benignen und malignen Knochentumoren der Fall ist, könnten von einer medikamentösen Inhibition der Osteogenese profitieren.

Die Erkenntnisse und Überlegungen dieser Arbeit stellen somit einen Anlass für weiterführende Untersuchungen Flavin-haltiger, ROS-synthetisierender Enzyme und ihrer klinischen Nutzbarkeit dar.

Literaturverzeichnis

- Abu-Amero, K. K., & Bosley, T. M. (2005). Detection of mitochondrial respiratory dysfunction in circulating lymphocytes using resazurin. *Arch Pathol Lab Med*, *129*(10), 1295-1298. doi:10.1043/1543-2165(2005)129[1295:Domrdi]2.0.Co;2
- Albers, I., Zernickel, E., Stern, M., Broja, M., Busch, H. L., Heiss, C., . . . Suschek, C. V. (2019). Blue light ($\lambda=453\text{nm}$) nitric oxide dependently induces beta-endorphin production of human skin keratinocytes in-vitro and increases systemic beta-endorphin levels in humans in-vivo. *Free Radic Biol Med*, *145*, 78-86. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.022
- Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., O'Brien, C. A., & Manolagas, S. C. (2007). 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*, *282*(37), 27298-27305. doi:10.1074/jbc.M702811200
- Atashi, F., Modarressi, A., & Pepper, M. S. (2015). The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*, *24*(10), 1150-1163. doi:10.1089/scd.2014.0484
- Aust, L., Devlin, B., Foster, S. J., Halvorsen, Y. D., Hicok, K., du Laney, T., . . . Gimble, J. M. (2004). Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, *6*(1), 7-14. doi:10.1080/14653240310004539
- Bahr, B., Resag, J., & Riebe, K. (2019). *Faszinierende Physik* (3. ed.). Berlin, Deutschland: Springer Verlag.
- Bajek, A., Gurtowska, N., Olkowska, J., Kazmierski, L., Maj, M., & Drewa, T. (2016). Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *64*(6), 443-454. doi:10.1007/s00005-016-0394-x
- Bartolucci, J., Verdugo, F. J., Gonzalez, P. L., Larrea, R. E., Abarzua, E., Goset, C., . . . Khoury, M. (2017). Safety and efficacy of the intravenous infusion of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with heart failure: A phase 1/2 randomized controlled trial (RIMECARD trial [randomized clinical trial of intravenous infusion umbilical cord mesenchymal stem cells on cardiopathy]). *Circ Res*, *121*(10), 1192-1204. doi:10.1161/circresaha.117.310712
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, *78*(2), 547-581. doi:10.1152/physrev.1998.78.2.547
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, *87*(1), 245-313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Bennett, D. C. (2008). Ultraviolet wavebands and melanoma initiation. *Pigment Cell Melanoma Res*, *21*(5), 520-524. doi:10.1111/j.1755-148X.2008.00500.x
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, *13*(4), 392-402. doi:10.1016/j.stem.2013.09.006
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol*, *14*(8), 470-485. doi:10.1038/nrur.2017.69

- Block, K., Gorin, Y., & Abboud, H. E. (2009). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(34), 14385-14390. doi:10.1073/pnas.0906805106
- Bodle, J. C., Hanson, A. D., & Lobo, E. G. (2011). Adipose-derived stem cells in functional bone tissue engineering: lessons from bone mechanobiology. *Tissue Eng Part B Rev*, *17*(3), 195-211. doi:10.1089/ten.TEB.2010.0738
- Bonewald, L. F., Harris, S. E., Rosser, J., Dallas, M. R., Dallas, S. L., Camacho, N. P., . . . Boskey, A. (2003). von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int*, *72*(5), 537-547. doi:10.1007/s00223-002-1057-y
- Bouillaguet, S., Owen, B., Wataha, J. C., Campo, M. A., Lange, N., & Schrenzel, J. (2008). Intracellular reactive oxygen species in monocytes generated by photosensitive chromophores activated with blue light. *Dent Mater*, *24*(8), 1070-1076. doi:10.1016/j.dental.2007.12.004
- Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med*, *38*(1), 12-23. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.016
- Burdon, R. H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, *18*(4), 775-794. doi:10.1016/0891-5849(94)00198-s
- Carmona-Cuenca, I., Roncero, C., Sancho, P., Caja, L., Fausto, N., Fernandez, M., & Fabregat, I. (2008). Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J Hepatol*, *49*(6), 965-976. doi:10.1016/j.jhep.2008.07.021
- Chen, C. T., Shih, Y. R., Kuo, T. K., Lee, O. K., & Wei, Y. H. (2008). Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, *26*(4), 960-968. doi:10.1634/stemcells.2007-0509
- Chen, Z., & Zhong, C. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, *30*(2), 271-281. doi:10.1007/s12264-013-1423-y
- Cheng, J., Nanayakkara, G., Shao, Y., Cueto, R., Wang, L., Yang, W. Y., . . . Yang, X. (2017). Mitochondrial Proton Leak Plays a Critical Role in Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. In G. Santulli (Ed.), *Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine* (pp. 359-370). Cham: Springer International Publishing.
- Choi, Y. S., Matsuda, K., Dusing, G. J., Morrison, W. A., & Dilley, R. J. (2010). Engineering cardiac tissue in vivo from human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, *31*(8), 2236-2242. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.097
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., & Harris, D. T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*, *12*, 8. doi:10.1186/1479-5876-12-8
- Cross, A. R., Henderson, L., Jones, O. T., Delpiano, M. A., Hentschel, J., & Acker, H. (1990). Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO₂ sensor protein in the rat carotid body. *Biochem J*, *272*(3), 743-747. doi:10.1042/bj2720743
- Dahbour, S., Jamali, F., Alhattab, D., Al-Radaideh, A., Ababneh, O., Al-Ryalat, N., . . . Awidi, A. (2017). Mesenchymal stem cells and conditioned media in the treatment

- of multiple sclerosis patients: Clinical, ophthalmological and radiological assessments of safety and efficacy. *CNS Neurosci Ther*, 23(11), 866-874. doi:10.1111/cns.12759
- Dai, T., Gupta, A., Murray, C. K., Vrahas, M. S., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2012). Blue light for infectious diseases: Propionibacterium acnes, Helicobacter pylori, and beyond? *Drug Resist Updat*, 15(4), 223-236. doi:10.1016/j.drup.2012.07.001
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3565127. doi:10.1155/2016/3565127
- De Deken, X., & Miot, F. (2019). DUOX Defects and Their Roles in Congenital Hypothyroidism. *Methods Mol Biol*, 1982, 667-693. doi:10.1007/978-1-4939-9424-3_37
- De Deken, X., Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., . . . Miot, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*, 275(30), 23227-23233. doi:10.1074/jbc.M000916200
- de Fries, R., & Mitsushashi, M. (1995). Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal*, 9(2), 89-95. doi:10.1002/jcla.1860090203
- De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., . . . Hedrick, M. H. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174(3), 101-109. doi:10.1159/000071150
- de Villiers, D., Potgieter, M., Ambele, M. A., Adam, L., Durandt, C., & Pepper, M. S. (2018). The role of reactive oxygen species in adipogenic differentiation. *Adv Exp Med Biol*, 1083, 125-144. doi:10.1007/5584_2017_119
- de Windt, T. S., Vonk, L. A., Slaper-Cortenbach, I. C., van den Broek, M. P., Nizak, R., van Rijen, M. H., . . . Saris, D. B. (2017). Allogeneic mesenchymal stem cells stimulate cartilage regeneration and are safe for single-stage cartilage repair in humans upon mixture with recycled autologous chondrons. *Stem Cells*, 35(1), 256-264. doi:10.1002/stem.2475
- Denu, R. A., & Hematti, P. (2016). Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2989076. doi:10.1155/2016/2989076
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., . . . Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838-3843. doi:10.1182/blood.v99.10.3838
- Diffey, B. L. (1998). Ultraviolet radiation and human health. *Clin Dermatol*, 16(1), 83-89. doi:10.1016/s0738-081x(97)00172-7
- DiMuzio, P., & Tulenko, T. (2007). Tissue engineering applications to vascular bypass graft development: the use of adipose-derived stem cells. *J Vasc Surg*, 45 Suppl A, A99-103. doi:10.1016/j.jvs.2007.02.046
- Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 20(1), 5-14. doi:10.3727/096368910x

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Draganski, E., Deason, T., & Craig, F. E. (2019). Bone Marrow Aspiration and Biopsy Performed by RNs: A Review of Clinical Practice. *Am J Nurs*, 119(9), 47-53. doi:10.1097/01.NAJ.0000580260.18537.ca
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., . . . Brand, M. D. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 415(6867), 96-99. doi:10.1038/415096a
- El Hassani, R. A., Benfares, N., Caillou, B., Talbot, M., Sabourin, J. C., Belotte, V., . . . Dupuy, C. (2005). Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288(5), G933-942. doi:10.1152/ajpgi.00198.2004
- Fatherazi, S., Matsa-Dunn, D., Foster, B. L., Rutherford, R. B., Somerman, M. J., & Presland, R. B. (2009). Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res*, 88(1), 39-44. doi:10.1177/0022034508328072
- Fischer, H. (2009). Mechanisms and function of DUOX in epithelia of the lung. *Antioxid Redox Signal*, 11(10), 2453-2465. doi:10.1089/ars.2009.2558
- Forteza, R., Salathe, M., Miot, F., Forteza, R., & Conner, G. E. (2005). Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32(5), 462-469. doi:10.1165/rcmb.2004-0302OC
- Franceschi, R. T., & Iyer, B. S. (1992). Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 7(2), 235-246. doi:10.1002/jbmr.5650070216
- Futai, M., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Matsumoto, N., & Nakanishi-Matsui, M. (2019). Vacuolar-type ATPase: A proton pump to lysosomal trafficking. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 95(6), 261-277. doi:10.2183/pjab.95.018
- Galipeau, J., & Sensebe, L. (2018). Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*, 22(6), 824-833. doi:10.1016/j.stem.2018.05.004
- Garza, Z. C. F., Born, M., Hilbers, P. A. J., van Riel, N. A. W., & Liebmann, J. (2018). Visible blue light therapy: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Curr Med Chem*, 25(40), 5564-5577. doi:10.2174/0929867324666170727112206
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P., & Leto, T. L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(14), 8010-8014. doi:10.1073/pnas.130135897
- Ghoryani, M., Shariati-Sarabi, Z., Tavakkol-Afshari, J., Ghasemi, A., Poursamimi, J., & Mohammadi, M. (2019). Amelioration of clinical symptoms of patients with refractory rheumatoid arthritis following treatment with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells: A successful clinical trial in Iran. *Biomed Pharmacother*, 109, 1834-1840. doi:10.1016/j.biopha.2018.11.056

- Gimble, J., & Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5(5), 362-369. doi:10.1080/14653240310003026
- Godley, B. F., Shamsi, F. A., Liang, F. Q., Jarrett, S. G., Davies, S., & Boulton, M. (2005). Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem*, 280(22), 21061-21066. doi:10.1074/jbc.M502194200
- González-Pinzón, R., Haggerty, R., & Myrold, D. D. (2012). Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 117(G3). doi:10.1029/2012jg001965
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., & Gimble, J. M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), 54-63. doi:10.1002/jcp.1138
- Grottkau, B. E., & Lin, Y. (2013). Osteogenesis of adipose-derived stem cells. *Bone Res*, 1(2), 133-145. doi:10.4248/br201302003
- Gu, X., Li, C., Yin, F., & Yang, G. (2018). Adipose-derived stem cells in articular cartilage regeneration: current concepts and optimization strategies. *Histol Histopathol*, 33(7), 639-653. doi:10.14670/hh-11-955
- Guo, S., & Chen, X. (2015). The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance. *J Drug Target*, 23(10), 888-896. doi:10.3109/1061186x.2015.1036276
- Ha, H., & Lee, H. B. (2005). Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney. *Nephrology (Carlton)*, 10 Suppl, S7-10. doi:10.1111/j.1440-1797.2005.00448.x
- Hall, M. D., Simeonov, A., & Davis, M. I. (2016). Avoiding Fluorescence Assay Interference-The Case for Diaphorase. *Assay Drug Dev Technol*, 14(3), 175-179. doi:10.1089/adt.2016.707
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 52(8 Pt 1), 253-265. doi:10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x
- Hamidouche, Z., Hay, E., Vaudin, P., Charbord, P., Schule, R., Marie, P. J., & Fromiguet, O. (2008). FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *Faseb j*, 22(11), 3813-3822. doi:10.1096/fj.08-106302
- Harris, V. K., Stark, J., Vyshkina, T., Blackshear, L., Joo, G., Stefanova, V., . . . Sadiq, S. A. (2018). Phase I trial of intrathecal mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in progressive multiple sclerosis. *EBioMedicine*, 29, 23-30. doi:10.1016/j.ebiom.2018.02.002
- Harten, U. (2017). *Physik [7. Auflage]Eine Einführung für Ingenieure und Naturwissenschaftler*.
- Higuchi, M., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S. T., Chan, E. C., & Liu, G. S. (2013). 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*, 22(6), 878-888. doi:10.1089/scd.2012.0306

- Hong, D., Chen, H. X., Xue, Y., Li, D. M., Wan, X. C., Ge, R., & Li, J. C. (2009). Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *116*(1-2), 86-92. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.05.007
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., . . . Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *7*(5), 393-395. doi:10.1080/14653240500319234
- Ighodaro, O. M. (2018). Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*, *108*, 656-662. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.058
- Irani, K. (2000). Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*, *87*(3), 179-183. doi:10.1161/01.res.87.3.179
- Iwayama, T., Okada, T., Ueda, T., Tomita, K., Matsumoto, S., Takedachi, M., . . . Murakami, S. (2019). Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization. *Sci Adv*, *5*(7), eaax0672. doi:10.1126/sciadv.aax0672
- James, A. W. (2013). Review of signaling pathways governing msc osteogenic and adipogenic differentiation. *Scientifica (Cairo)*, *2013*, 684736. doi:10.1155/2013/684736
- Jo, C. H., Lee, Y. G., Shin, W. H., Kim, H., Chai, J. W., Jeong, E. C., . . . Yoon, K. S. (2014). Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*, *32*(5), 1254-1266. doi:10.1002/stem.1634
- Keemss, K., Pfaff, S. C., Born, M., Liebmann, J., Merk, H. F., & von Felbert, V. (2016). Prospective, randomized study on the efficacy and safety of local UV-free blue light treatment of eczema. *Dermatology*, *232*(4), 496-502. doi:10.1159/000448000
- Khatri, N., Thakur, M., Pareek, V., Kumar, S., Sharma, S., & Datusalia, A. K. (2018). Oxidative stress: Major threat in traumatic brain injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *17*(9), 689-695. doi:10.2174/1871527317666180627120501
- Kim, J. H., Park, S. G., Song, S. Y., Kim, J. K., & Sung, J. H. (2013). Reactive oxygen species-responsive miR-210 regulates proliferation and migration of adipose-derived stem cells via PTPN2. *Cell Death Dis*, *4*, e588. doi:10.1038/cddis.2013.117
- Krampera, M., Pasini, A., Rigo, A., Scupoli, M. T., Tecchio, C., Malpeli, G., . . . Vinante, F. (2005). HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood*, *106*(1), 59-66. doi:10.1182/blood-2004-09-3645
- Krassovka, J. M. (2017). *Molekulare Grundlagen der durch blaues Licht induzierten Differenzierungshemmung humaner Fibroblasten zu Myofibroblaste*. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kwon, D. S., Kwon, C. H., Kim, J. H., Woo, J. S., Jung, J. S., & Kim, Y. K. (2006). Signal transduction of MEK/ERK and PI3K/Akt activation by hypoxia/reoxygenation in renal epithelial cells. *Eur J Cell Biol*, *85*(11), 1189-1199. doi:10.1016/j.ejcb.2006.06.001

- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 4(3), 181-189. doi:10.1038/nri1312
- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 4(5), 117. doi:10.1186/scrt328
- Larosa, V., & Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep*, 38(5). doi:10.1042/bsr20171492
- Li, R., Jia, Z., & Trush, M. A. (2016). Defining ROS in biology and medicine. *React Oxyg Species (Apex)*, 1(1), 9-21. doi:10.20455/ros.2016.803
- Lindsay, A., McCourt, P. M., Karachunski, P., Lowe, D. A., & Ervasti, J. M. (2018). Xanthine oxidase is hyper-active in Duchenne muscular dystrophy. *Free radical biology & medicine*, 129, 364-371. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.404
- Liu, D., Fernandez, B. O., Hamilton, A., Lang, N. N., Gallagher, J. M. C., Newby, D. E., . . . Weller, R. B. (2014). UVA irradiation of human skin vasodilates arterial vasculature and lowers blood pressure independently of nitric oxide synthase. *J Invest Dermatol*, 134(7), 1839-1846. doi:10.1038/jid.2014.27
- Losi, A. (2013). Blue-light photoreceptors: from activation to advanced applications. *Photochem Photobiol Sci*, 12(7), 1124. doi:10.1039/c3pp90017g
- Martins, W. K., Severino, D., Souza, C., Stolf, B. S., & Baptista, M. S. (2013). Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. *Biotechnol J*, 8(6), 730-737. doi:10.1002/biot.201200306
- Mateos, J., De la Fuente, A., Lesende-Rodriguez, I., Fernandez-Pernas, P., Arufe, M. C., & Blanco, F. J. (2013). Lamin A deregulation in human mesenchymal stem cells promotes an impairment in their chondrogenic potential and imbalance in their response to oxidative stress. *Stem Cell Res*, 11(3), 1137-1148. doi:10.1016/j.scr.2013.07.004
- Mehlhorn, A. T., Niemeyer, P., Kaiser, S., Finkenzeller, G., Stark, G. B., Sudkamp, N. P., & Schmal, H. (2006). Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng*, 12(10), 2853-2862. doi:10.1089/ten.2006.12.2853
- Meng, D., Lv, D. D., & Fang, J. (2008). Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 80(2), 299-308. doi:10.1093/cvr/cvn173
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends Plant Sci*, 22(1), 11-19. doi:10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Mofarrahi, M., Brandes, R. P., Gorlach, A., Hanze, J., Terada, L. S., Quinn, M. T., . . . Hussain, S. N. (2008). Regulation of proliferation of skeletal muscle precursor cells by NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*, 10(3), 559-574. doi:10.1089/ars.2007.1792
- Morrison, S. J., Shah, N. M., & Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88(3), 287-298. doi:10.1016/s0092-8674(00)81867-x

- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*, 45(11), e54. doi:10.1038/emm.2013.94
- Nakashima, Y., Ohta, S., & Wolf, A. M. (2017). Blue light-induced oxidative stress in live skin. *Free Radic Biol Med*, 108, 300-310. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.010
- Nisimoto, Y., Diebold, B. A., Cosentino-Gomes, D., & Lambeth, J. D. (2014). Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. *Biochemistry*, 53(31), 5111-5120. doi:10.1021/bi500331y
- Opländer, C., Deck, A., Volkmar, C. M., Kirsch, M., Liebmann, J., Born, M., . . . Suschek, C. V. (2013). Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivatives in human skin in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 65, 1363-1377. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.022
- Paschotta, R. (2008). light. In *Encyclopedia of Laser Physics and Technology* (1. Edition ed.): Wiley-VCH.
- Pedruzzi, E., Guichard, C., Ollivier, V., Driss, F., Fay, M., Prunet, C., . . . Ogier-Denis, E. (2004). NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol*, 24(24), 10703-10717. doi:10.1128/mcb.24.24.10703-10717.2004
- Pfeifer, G. P., & Besaratinia, A. (2012). UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci*, 11(1), 90-97. doi:10.1039/c1pp05144j
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*, 30(1), 11-26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0
- Phillips, J. E., Gersbach, C. A., Wojtowicz, A. M., & Garcia, A. J. (2006). Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci*, 119(Pt 3), 581-591. doi:10.1242/jcs.02758
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, 25(11), 2896-2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
- Plomp, P. J., Gordon, P. B., Meijer, A. J., Høyvik, H., & Seglen, P. O. (1989). Energy dependence of different steps in the autophagic-lysosomal pathway. *J Biol Chem*, 264(12), 6699-6704.
- Rajawat, Y. S., Hilioti, Z., & Bossis, I. (2009). Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res Rev*, 8(3), 199-213. doi:10.1016/j.arr.2009.05.001
- Renard, G., & Leid, J. (2016). The dangers of blue light: True story! *J Fr Ophtalmol*, 39(5), 483-488. doi:10.1016/j.jfo.2016.02.003

- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, *3*(7), 1125-1131. doi:10.1038/nprot.2008.75
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, *1*(3), 1458-1461. doi:10.1038/nprot.2006.238
- Rodrigues, M., Turner, O., Stolz, D., Griffith, L. G., & Wells, A. (2012). Production of reactive oxygen species by multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells upon exposure to fas ligand. *Cell Transplant*, *21*(10), 2171-2187. doi:10.3727/096368912x639035
- Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, *146*(5), 682-695. doi:10.1016/j.cell.2011.07.030
- Sage, E., Girard, P. M., & Francesconi, S. (2012). Unravelling UVA-induced mutagenesis. *Photochem Photobiol Sci*, *11*(1), 74-80. doi:10.1039/c1pp05219e
- Die Erkenntnisse und Überlegungen dieser Arbeit stellen somit einen Anlass für weiterführende Untersuchungen Flavin-haltiger, ROS-synthetisierender Enzyme und ihrer klinischen Nutzbarkeit dar.
- Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(2), 239-245. doi:10.1161/atvbaha.108.174219
- Schütt, F., Aretz, S., Auffarth, G. U., & Kopitz, J. (2012). Moderately reduced ATP levels promote oxidative stress and debilitate autophagic and phagocytic capacities in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *53*(9), 5354-5361. doi:10.1167/iovs.12-9845
- Senda, T., Senda, M., Kimura, S., & Ishida, T. (2009). Redox control of protein conformation in flavoproteins. *Antioxid Redox Signal*, *11*(7), 1741-1766. doi:10.1089/ars.2008.2348
- Senoner, T., & Dichtl, W. (2019). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients*, *11*(9). doi:10.3390/nu11092090
- Shao, J. S., Aly, Z. A., Lai, C. F., Cheng, S. L., Cai, J., Huang, E., . . . Towler, D. A. (2007). Vascular Bmp Msx2 Wnt signaling and oxidative stress in arterial calcification. *Ann N Y Acad Sci*, *1117*, 40-50. doi:10.1196/annals.1402.075
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., . . . Sumimoto, H. (2001). A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem*, *276*(2), 1417-1423. doi:10.1074/jbc.M007597200
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, *4*, 180-183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
- Song, Y., Du, H., Dai, C., Zhang, L., Li, S., Hunter, D. J., . . . Bao, C. (2018). Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regen Med*, *13*(3), 295-307. doi:10.2217/rme-2017-0152
- Starkov, A. A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, *1147*, 37-52. doi:10.1196/annals.1427.015
- Steinberg, G. K., Kondziolka, D., Wechsler, L. R., Lunsford, L. D., Coburn, M. L., Billigen, J. B., . . . Schwartz, N. E. (2016). Clinical outcomes of transplanted

- modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells in stroke: A phase 1/2a study. *Stroke*, 47(7), 1817-1824. doi:10.1161/strokeaha.116.012995
- Stern, M., Broja, M., Sansone, R., Grone, M., Skene, S. S., Liebmann, J., . . . Heiss, C. (2018). Blue light exposure decreases systolic blood pressure, arterial stiffness, and improves endothelial function in humans. *Eur J Prev Cardiol*, 25(17), 1875-1883. doi:10.1177/2047487318800072
- Strioga, M., Viswanathan, S., Darinkas, A., Slaby, O., & Michalek, J. (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*, 21(14), 2724-2752. doi:10.1089/scd.2011.0722
- Sun, D., Junger, W. G., Yuan, C., Zhang, W., Bao, Y., Qin, D., . . . Yu, T. (2013). Shockwaves induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through ATP release and activation of P2X7 receptors. *Stem Cells*, 31(6), 1170-1180. doi:10.1002/stem.1356
- Tada, H., Nemoto, E., Foster, B. L., Somerman, M. J., & Shimauchi, H. (2011). Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone*, 48(6), 1409-1416. doi:10.1016/j.bone.2011.03.675
- Tan, Q., Lui, P. P., Rui, Y. F., & Wong, Y. M. (2012). Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 18(7-8), 840-851. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0362
- Tosini, G., Ferguson, I., & Tsubota, K. (2016). Effects of blue light on the circadian system and eye physiology. *Mol Vis*, 22, 61-72.
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8(9), 726-736. doi:10.1038/nri2395
- Vacanti, J. P., Morse, M. A., Saltzman, W. M., Domb, A. J., Perez-Atayde, A., & Langer, R. (1988). Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*, 23(1 Pt 2), 3-9. doi:10.1016/s0022-3468(88)80529-3
- Vazin, T., & Freed, W. J. (2010). Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci*, 28(4), 589-603. doi:10.3233/rnn-2010-0543
- Via, A. G., Frizziero, A., & Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2(3), 154-162.
- von der Saal, K. (2020). *Biochemie* (1st ed. 2020 ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Wang, C., Liu, D., Zhang, C., Sun, J., Feng, W., Liang, X. J., . . . Zhang, J. (2016). Defect-Related Luminescent Hydroxyapatite-Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells Via an ATP-Induced cAMP/PKA Pathway. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8(18), 11262-11271. doi:10.1021/acsami.6b01103
- Wang, D., De Deken, X., Milenkovic, M., Song, Y., Pirson, I., Dumont, J. E., & Miot, F. (2005). Identification of a novel partner of duox: EFPI, a thioredoxin-related protein. *J Biol Chem*, 280(4), 3096-3103. doi:10.1074/jbc.M407709200

- Wang, Y., Zeigler, M. M., Lam, G. K., Hunter, M. G., Eubank, T. D., Khramtsov, V. V., . . . Marsh, C. B. (2007). The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *36*(1), 68-77. doi:10.1165/rcmb.2006-0165OC
- Weatherhead, S. C., Farr, P. M., & Reynolds, N. J. (2013). Spectral effects of UV on psoriasis. *Photochem Photobiol Sci*, *12*(1), 47-53. doi:10.1039/c2pp25116g
- Weinstabl, A., Hoff-Lesch, S., Merk, H. F., & von Felbert, V. (2011). Prospective randomized study on the efficacy of blue light in the treatment of psoriasis vulgaris. *Dermatology*, *223*(3), 251-259. doi:10.1159/000333364
- Weiss, D. J., Casaburi, R., Flannery, R., LeRoux-Williams, M., & Tashkin, D. P. (2013). A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest*, *143*(6), 1590-1598. doi:10.1378/chest.12-2094
- Xiao, G., Gopalakrishnan, R., Jiang, D., Reith, E., Benson, M. D., & Franceschi, R. T. (2002). Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, *17*(1), 101-110. doi:10.1359/jbmr.2002.17.1.101
- Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., Yang, J., Calvo, R., Patnaik, S., . . . Xu, H. (2016). MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nature communications*, *7*, 12109-12109. doi:10.1038/ncomms12109
- Zippel, N., Limbach, C. A., Ratajski, N., Urban, C., Luparello, C., Pansky, A., . . . Tobiasch, E. (2012). Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, *21*(6), 884-900. doi:10.1089/scd.2010.0576
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., . . . Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, *13*(12), 4279-4295. doi:10.1091/mbc.e02-02-0105
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., . . . Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, *7*(2), 211-228. doi:10.1089/107632701300062859

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich für die umfangreiche Unterstützung durch alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Forschungslabors der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek für die gute Betreuung der Dissertation. Auch bei Dr. rer. nat. Vera Grotheer, Jutta Schneider, Christa Wilkens und Samira Seghrouchni möchte ich mich für die tatkräftige Hilfe bedanken. Es war eine schöne und lehrreiche Zeit.