

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

**Die Auswirkungen von Katalase auf das purinerge Signaling von  
humanen adipogenen Stromazellen (ASCs) während der osteogenen  
Differenzierung**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jann Mertens

2023

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

Gez.: Jann Mertens

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Tag der mündlichen Prüfung 12.10.2023

*“Sometimes I’ll start a sentence, and  
I don’t even know where it’s going. I  
just hope I find it along the way.”*

- Michael Scott

# **I. Deutsche Zusammenfassung**

Adipogene Stromazellen (ASCs) haben ein ausgeprägtes Regenerations- und Differenzierungspotential, welches sie von anderen Stromazellen unterscheidet. Aus diesem Grund stehen sie vermehrt im Fokus des *Bone Tissue Engineerings*. Sie könnten neue Ansätze für die Therapie kritischer Knochendefekte bieten.

In dieser Arbeit wurden ASCs kultiviert und mit einem osteogenen Differenzierungsmedium behandelt. Zunächst wurde die antioxidative Wirkung einer Behandlung mit Katalase auf die osteogene Differenzierung der ASCs untersucht. Des Weiteren wurde die intrazelluläre ATP-Konzentration als Zeichen eines veränderten Stoffwechsels gemessen. Es wurde untersucht, ob sich der Stoffwechsel durch die Zugabe von Katalase bzw. den dadurch verringerten Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies verändert. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Katalase auf die Expression purinerger Rezeptoren untersucht.

Es zeigte sich, dass die Katalasebehandlung die Osteogenese der ASCs verstärkt und dass die osteogene Differenzierung durch Zugabe reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) inhibiert wird. Bereits geringe Katalasekonzentrationen von 25 – 125 U/ml scheinen wirksam zu sein. Es konnte auch demonstriert werden, dass eine Behandlung mit Katalase zu einer Reduktion der intrazellulären ATP-Konzentration der ASCs führte. Die Auswirkung der Katalasebehandlung spiegelte sich auch in der Proteinexpression von purinergen Rezeptoren wider. Exemplarisch wurden dafür die für die Osteogenese bedeutsamen Rezeptorsubtypen P2X2/5/7 und P2Y2 analysiert. Es konnten Expressionsunterschiede der untersuchten Rezeptoren beobachtet werden, wenngleich diese Beobachtungen nicht statistisch verallgemeinerbar waren.

## II. Abstract

Adipogenic stromal cells (ASCs) have a pronounced regeneration and differentiation potential, which distinguishes them from other body cells. For this reason, they are increasingly the focus of *bone tissue engineering*. They could offer new approaches for the treatment of critical bone defects.

In this work, ASCs were cultivated and treated with an osteogenic differentiation medium. At first the antioxidant effect of treatment with catalase on osteogenic differentiation of ASCs was investigated. Furthermore, the intracellular ATP concentration was measured as a sign of the altered metabolism. It was investigated whether the metabolism change is induced by the addition of catalase or the resulting reduced content of reactive oxygen species. In the next step, the influence of the catalase treatment on the expression of purinergic receptors in the cell membrane was investigated.

Catalase treatment was shown to enhance osteogenesis of ASCs and inhibit osteogenic differentiation through increased ROS concentrations. Already low catalase concentrations from 25 – 125 U/ml appear to be effective. It could also be demonstrated that treatment with catalase led to a reduction in the intracellular ATP concentration of the cells (as a result of the altered energy metabolism). The effect of the catalase treatment was also reflected in the protein expression of purinergic receptors. As an example, receptor subtypes P2X<sub>2/5/7</sub> and P2Y<sub>2</sub>, which are important for osteogenesis, are analyzed. Expression differences of the investigated receptors could be shown, although no significant differences could be demonstrated.

### III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampère
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Aqua dest.	Aqua destillata; destilliertes Wasser
ASC	Adipogene Stromazellen
ATA	3-Amino-1,2,4-Triazol
ATP	Adenosintriphosphat
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
BMSC	Bone-marrow derived stromal cells
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CFU	Colony forming unit
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPC	Cetylpyridiniumchlorid-Lösung
DFC	Dental follicle cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure
DPSC	Dental pulp stromal cells
engl.	englisch
E-NTBDase	Ecto-Nucleosidtriphosphat-Phosphohydrolase
ERK1/2	Extracellular related kinase 1/2
FBS	Fetales Rinderserum
FOXO	Forkhead-Box O
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GPX .....	Glutathionperoxidase
h .....	Stunde (n)
H <sub>2</sub> O .....	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
HO• .....	Hydroxylradikal
l .....	Liter
LEF-1 .....	lymphoid enhancer factor 1
LOX .....	Lipoxygenase
MAPK .....	mitogen-activated protein kinase
Mg <sup>2+</sup> .....	Magnesium
min .....	Minute (n)
ml .....	Milliliter
mm .....	Millimeter
MSC .....	Mesenchymale Stromazellen
NaCl .....	Natriumchlorid
nm .....	nanometer
nM .....	nanomolar, nanomolar
NO• .....	Stickstoffmonoxid
NOX .....	NADPH-Oxidase
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	Superoxidanion
OD <sub>600</sub> .....	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OM .....	Osteogenes Differenzierungsmedium
PBS .....	Phosphate-buffered saline; Phosphatgepufferte Salzlösung
PMMA .....	Polymethylmethacrylat
RIPA .....	Radio-Immunoprecipitation Assay-Buffer
RT .....	Raumtemperatur
Runx2 .....	Runt-related transkription factor 2
SDS .....	sodium dodecyl sulfate; Natriumdodecylsulfat
sek .....	Sekunde (n)
SOD .....	Superoxiddismutase
sog. ....	sogenannt
SVF .....	Stromavaskuläre Fraktion
TBS .....	Tris Buffered Saline; Trisgepufferte Salzlösung

TBS-T ..... TBS mit 1 % Tween  
TCF ..... T-cell factor  
TEMED..... N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin  
U ..... Units; Einheit (en)  
UDP ..... Uridindiphosphat  
USC.....Umbilical cord stromal cells  
UTP.....Uridintriphosphat  
V ..... Volt  
Wnt..... Wingless und Int-1  
 $\mu$ l ..... Mikroliter  
 $\mu$ m ..... Mikrometer  
 $\mu$ M..... mikromolar

## IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Knochenaufbau im Detail .....	2
Abb. 2 Enchondrale und perichondrale Ossifikation.....	3
Abb. 3 Die Phasen des Knochenumbaus.....	4
Abb. 4 Prinzip des <i>Bone Tissue Engineering</i> .....	6
Abb. 5 Die Differenzierung von MCSs.....	8
Abb. 6 Luciferase-Reaktion .....	32
Abb. 7 Aufbau der Blotting-Apparatur für den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran.....	34
Abb. 8 Osteogene Differenzierung von ASCs visualisiert mit Alizarinrot-S.....	37
Abb. 9 Osteogene Differenzierung von ASCs nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38
Abb. 10 Lichtmikroskopische Aufnahme von kalzifizierter Matrix nach Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 10- fache Vergrößerung.....	39
Abb. 11 Ermittlung der optimalen Katalasekonzentration .....	40
Abb. 12 Kalzifizierte Matrix von ACSs nach Behandlung mit Katalase unter Anwesenheit von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	41
Abb. 13 Lichtmikroskopische Aufnahme von kalzifizierter Matrix nach Behandlung mit Katalase und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 10-fache Vergrößerung .....	41
Abb. 14 Osteogene Differenzierung von ASCs mit Katalase und ATA.....	42
Abb. 15 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes an den Tagen 0, 1, 2, 3, 7, 14 und 21.....	43
Abb. 16 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Behandlung mit osteogenem Diffenzierungsmedium.....	44
Abb. 17 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Behandlung mit 25 U/ml Katalase .....	45
Abb. 18 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Behandlung mit 125 U/ml Katalase .....	45
Abb. 19 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	46
Abb. 20 Vergleich der ATP-Konzentrationen aller Behandlungen untereinander zu einem bestimmten Messtag .....	47
Abb. 21 DNA-Gehalt während der osteogenen Differenzierung.....	48

<b>Abb. 22 P2X7-Expression</b> .....	49
<b>Abb. 23 P2X5-Expression</b> .....	50
<b>Abb. 24 P2X2-Expression</b> .....	51
<b>Abb. 25 P2Y2-Expression</b> .....	52

## **V. Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1</b>	<b>Verwendete Geräte .....</b>	<b>17</b>
<b>Tab. 2</b>	<b>Verwendetes Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>18</b>
<b>Tab. 3</b>	<b>Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....</b>	<b>20</b>
<b>Tab. 4</b>	<b>Verwendete Medien, Lösungen und Puffer .....</b>	<b>22</b>
<b>Tab. 5</b>	<b>Verwendete Kits .....</b>	<b>24</b>
<b>Tab. 6</b>	<b>Verwendete Primärantikörper .....</b>	<b>24</b>
<b>Tab. 7</b>	<b>Verwendete Sekundärantikörper.....</b>	<b>25</b>
<b>Tab. 8</b>	<b>Verwendete Software.....</b>	<b>25</b>
<b>Tab. 9</b>	<b>Verwendete Zusätze und Konzentrationen für die osteogene Differenzierung .....</b>	<b>29</b>
<b>Tab. 10</b>	<b>Behandlungsschema für Alizarin-Rot-S-Färbung.....</b>	<b>30</b>
<b>Tab. 11</b>	<b>Behandlungsschema für ATP-Assay.....</b>	<b>31</b>
<b>Tab. 12</b>	<b>Behandlungsschema für die Analyse der purinergen Rezeptoren .....</b>	<b>32</b>
<b>Tab. 13</b>	<b>Verdünnungen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper... </b>	<b>35</b>

## **VI. Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Bone Tissue Engineering.....	4
1.2	Adipogene Stromazellen.....	8
1.3	Die Osteogenese von ASCs und ihre Mechanismen .....	9
1.3.1	ROS und oxidativer Stress.....	10
1.3.2	Die Auswirkungen von ROS auf die Osteogenese von ASCs.....	12
1.3.3	Anti-oxidative Enzyme in der Osteogenese von ASCs .....	12
1.4	Purinerges Signaling .....	13
1.4.1	Adenosintriphosphat (ATP) im purinergen Signaling.....	14
1.4.2	Purinerge Rezeptoren in der osteogenen Differenzierung.....	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>17</b>
2.1	Geräte.....	17
2.2	Verbrauchsmaterial .....	18
2.3	Chemikalien und Reagenzien .....	20
2.4	Medien, Lösungen und Puffer .....	22
2.5	Assays und Kits .....	24
2.6	Antikörper.....	24
2.7	Software .....	25
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.1	Zellen und Zellkultur .....	26
3.1.1	Gewinnung von ASCs aus Fettgewebe.....	26
3.1.2	Gewinnung von ASCs aus Liposuktionsfett.....	26
3.1.3	Zellkultur .....	27
3.1.4	Passagieren der ASCs .....	27
3.1.5	Kryokonservierung der ASCs.....	28
3.1.6	Induktion der osteogenen Differenzierung der ASCs.....	28

3.1.7	Inkubation mit oxidativen und anti-oxidativen Zusätzen im Verlauf der osteogenen Differenzierung.....	29
3.2	Alizarin-Rot-S Färbung und Rücklösung .....	29
3.3	Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration .....	31
3.4	Western Blot Analysen der purinergen Rezeptoren .....	32
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	33
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	33
3.4.3	Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran.....	34
3.4.4	Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulose-Membran .....	34
3.4.5	Immunmarkierung und die Analyse der Proteinexpression.....	34
3.5	Statistische Auswertung.....	36
3.6	Ethikvotum.....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
4.1	Evaluation der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-S-Färbung	37
4.1.1	Der Einfluss von ROS auf die osteogene Differenzierung von ASCs.....	38
4.1.2	Der Einfluss von Katalase auf die osteogene Differenzierung von ASCs..	39
4.2	Der Einfluss von Katalase auf die intrazelluläre ATP-Konzentration im Verlauf der osteogenen Differenzierung.....	43
4.3	Der Einfluss von Katalase und ROS auf die Proliferation.....	48
4.4	Bestimmung der purinergen Rezeptorexpression im Verlauf der osteogenen Differenzierung .....	49
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1	Vergleich der osteogenen Differenzierung von ASCs unter Einfluss von Katalase und ROS durch Bestimmung der Matrixkalzifizierung .....	53
5.1.1	Evaluation der optimalen Katalasekonzentration für die Osteogenese von ASCs	54
5.2	Inhibition der enzymatischen Katalasereaktion mit ATA .....	55
5.3	Die intrazelluläre ATP-Konzentration im Verlauf der osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss von Katalase .....	56

5.4	Analyse der purinergen Rezeptor-Expression in der osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss von Katalase.....	58
5.4.1	Analyse der Proteinexpression von purinergen Rezeptoren unter den verschiedenen Behandlungen .....	59
5.5	Kritische Betrachtung der Ergebnisse.....	60
5.6	Schlussfolgerung.....	61
<b>6</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	

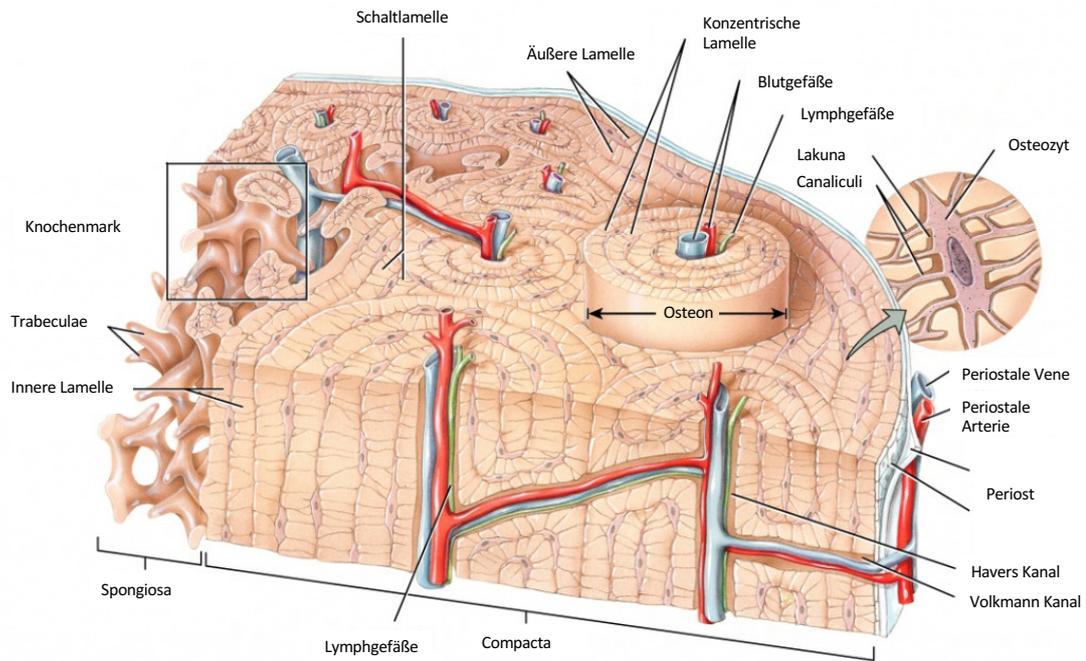
# **1 Einleitung**

Das Knochengewebe bildet zusammen mit Binde-, Knorpel- und Muskelgewebe eine muskuloskelettale Einheit, den Bewegungsapparat. Dabei unterliegt das Knochengestüt im Alltag wechselnden Druck- und Zugbelastungen, die ein hohes Maß an Stabilität, Flexibilität und darüber hinaus ein großes Anpassungsvermögen voraussetzen.

Neben den biomechanischen und formgebenden Eigenschaften hat der Knochen auch eine protektive Funktion. Er schützt innere Organe und ist zusätzlich ein zentrales Speicher- und Stoffwechselorgan für den Mineralstoffwechsel des Körpers und Ort der Blutbildung im Kindes- und Erwachsenenalter.

Der Knochen besteht aus einer harten, kompakten äußeren Schicht (Substantia compacta) und dem inneren Trabekelnetzwerk, einer schwammartigen aus Knochenbälkchen aufgebauten Struktur (Substantia spongiosa). Die Compacta besteht aus funktionellen Einheiten, den Osteonen, die longitudinal zum Knochen ausgerichtet sind. Die Osteone bestehen aus konzentrischen Lamellen, die um einen zentralen Nerven-Gefäß-Kanal (Havers-Kanal) angeordnet sind. Die Lamellen bestehen aus dem Osteoid, einer kollagenhaltigen Knochengrundsubstanz. Diese wird von Osteoblasten produziert, welche 4 – 6 % der Knochenzellen darstellen [1]. Während 50 – 70 % der Osteoblasten im Verlauf der Knochenbildung in Apoptose gehen, verbleibt ein Teil gewissermaßen im Osteoid eingemauert und differenziert zu ortsständigen Osteozyten [2, 3]. Ihre Fortsätze sind mit dem Havers-Kanal und anderen Osteozyten verbunden und ermöglichen so den Stoffaustausch und die Zellkommunikation untereinander. Die Havers-Kanäle sind miteinander durch quer verlaufende Volkmann-Kanäle verbunden. Sogenannte Schaltlamellen füllen den Raum zwischen den Osteonen in der Compacta aus.

Der Knochen ist ein aktives Organ und befindet sich in ständigem Auf- und Abbau. Der Knochenabbau erfolgt durch Osteoklasten. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen und sind hämatopoetischen Ursprungs [4]. Sie befinden sich in den Howship-Lakunen, den Resorptionsbereichen an der Oberfläche des Knochens.



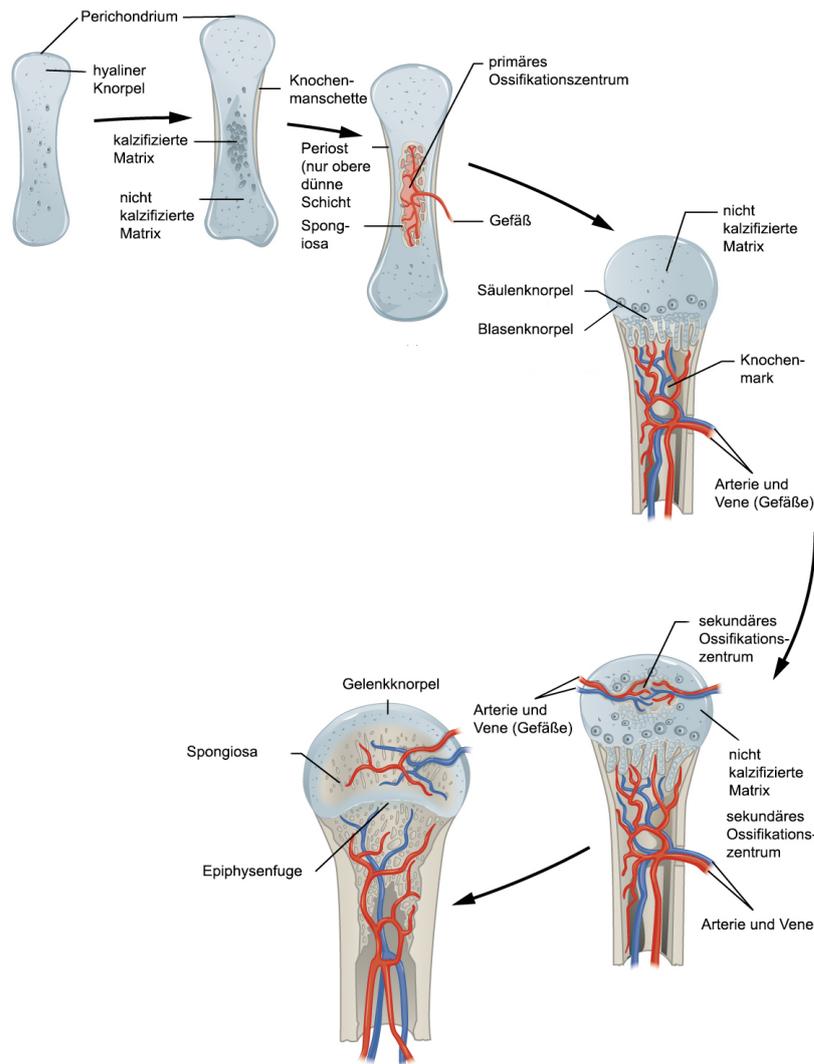
**Abb. 1 Knochenaufbau im Detail.** Hier sieht man einen Querschnitt durch einen Röhrenknochen und den Aufbau eines Osteons (modifiziert nach [5]).

Die Knochen trabekel der Spongiosa sind entlang der Belastungsvektoren (Trajektorien) ausgerichtet und sorgen so für maximale Stabilität des Knochens gegenüber Druck-, Zug-, und Torsionsbelastungen bei minimalem Materialaufwand.

Das Osteoid, die organische Knochenmatrix, macht ca. ein Drittel der Knochenmasse aus und besteht größtenteils aus Kollagen Typ I [6]. Weitere Proteine, die man in der Knochenmatrix detektieren kann, sind Proteoglycane wie Hyaluron und Glycoproteine wie die alkalische Phosphatase.

Etwa zwei Drittel der Knochenmasse bestehen aus Hydroxylapatit-Kristallen und kleineren Mengen Natrium, Kalium, Magnesium, Mangan und Fluoriden [6].

Die Knochenbildung (Ossifikation) umfasst zwei grundlegende Mechanismen. Die häufigste Form ist die sekundäre (oder enchondrale bzw. perichondrale) Ossifikation, bei der zunächst Chondrozyten eine kartilaginäre Matrix bilden, welche nach und nach durch Knochen substanz ersetzt wird. Seltener ist die Differenzierung mesenchymale Stammzellen zu Osteoblasten welche dann Knochenmatrix sezernieren (direkte oder desmale Ossifikation).

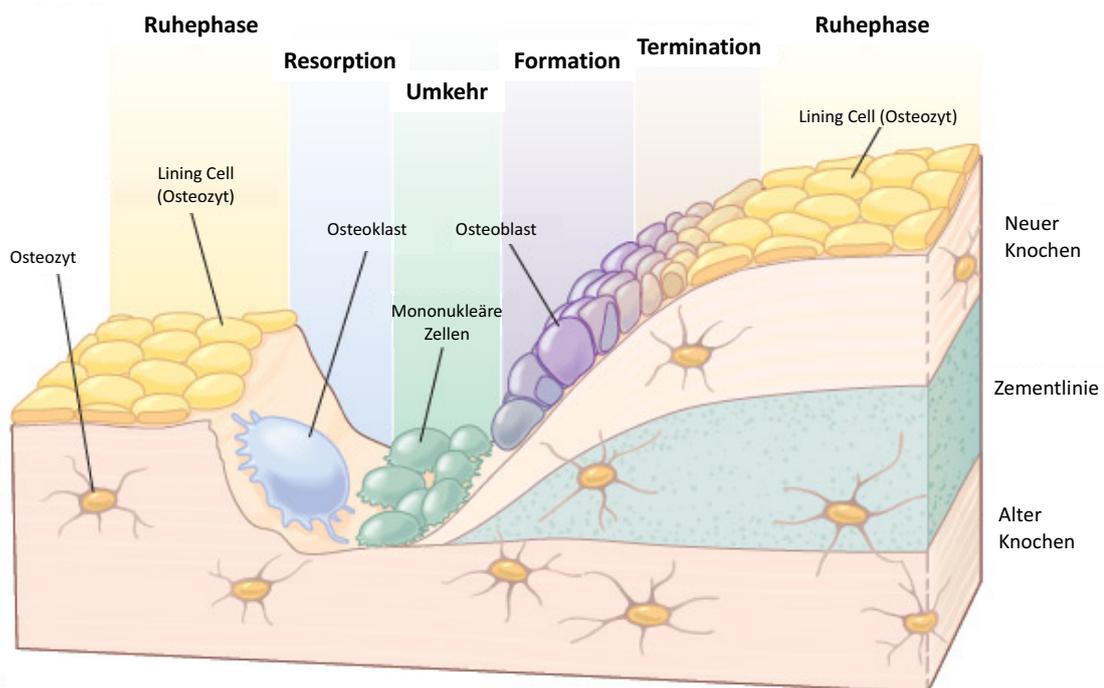


**Abb. 2 Enchondrale und perichondrale Ossifikation.** Darstellung der einzelnen Phasen der enchondralen bzw. perichondralen Ossifikation (modifiziert nach [7]).

Während pro Jahr 2 – 3 % des kortikalen Knochens eines Erwachsenen von Osteoblasten und Osteoklasten komplett erneuert wird, haben trabekuläre Knochenanteile wie zum Beispiel in den Wirbelkörpern eine deutlich höhere Erneuerungsrate [3]. Dieser Prozess wird als *Bone Remodeling* bezeichnet und findet physiologisch das gesamte Leben statt, auch nach Knochenläsionen [8]. Dadurch bildet Knochen als eins der wenigen Organe des Körpers nach Verletzungen kein fibröses Narbengewebe am Ende der Frakturheilung aus [9].

Die fünf Phasen des *Bone Remodeling* bestehen aus Aktivierung, Resorption, Umkehrphase, Formation und Termination. Dabei spielen neben den genannten Zellen einige weitere Faktoren eine wichtige Rolle. Die Aktivierung erfolgt entweder hormonell (Parathormon, Östrogen) oder über Mechanosensorik. In der Resorptionsphase wird die

endostale Membran durch Kollagenasen verdaut und Osteoklasten werden aktiviert, welche Knochenmatrix mithilfe von Enzymen wie Cathepsin K und Metalloproteasen abbauen. Die Resorption dauert zwei bis vier Wochen und wird durch Apoptose der Osteoklasten beendet. Letztlich wandern Osteoblasten und Vorläuferzellen ein und bilden neues Osteoid. In der terminalen Phase kommt es zur Kalzifikation des Osteoids [3]. Man unterscheidet hochwertigen Lamellenknochen, bei dem die Kollagenfasern geordnet und parallel verlaufen, von primärem unreifen, minderwertigen und weniger stabilen Geflechtknochen, dessen Kollagenfasern einen ungeordneten Verlauf aufzeigen.



**Abb. 3 Die Phasen des Knochenbaus.** Hier sind die verschiedenen Phasen des Bone Remodeling dargestellt. Nach der terminalen Phase gehen die Zellen in eine Ruhephase über (modifiziert nach [10]).

## 1.1 Bone Tissue Engineering

Während zur Behandlung von kleinen und mittelgroßen Knochendefekten routinemäßig etablierte Verfahren wie die Auto- (Goldstandard) oder Allotransplantation von Spongiosa und Knochenfragmenten angewendet werden, stellen größere Defekte eine Herausforderung für die Defektheilung dar [11]. Abhängig von der Lokalisation, dem begleitenden Weichteilschaden und der lokalen Infektsituation sind operative Verfahren wie die Kallusdistraction, der Segmenttransport oder die PMMA-Spacer (Polymethylmethacrylat) assoziierte Membraninduktion (Masquelet-Technik)

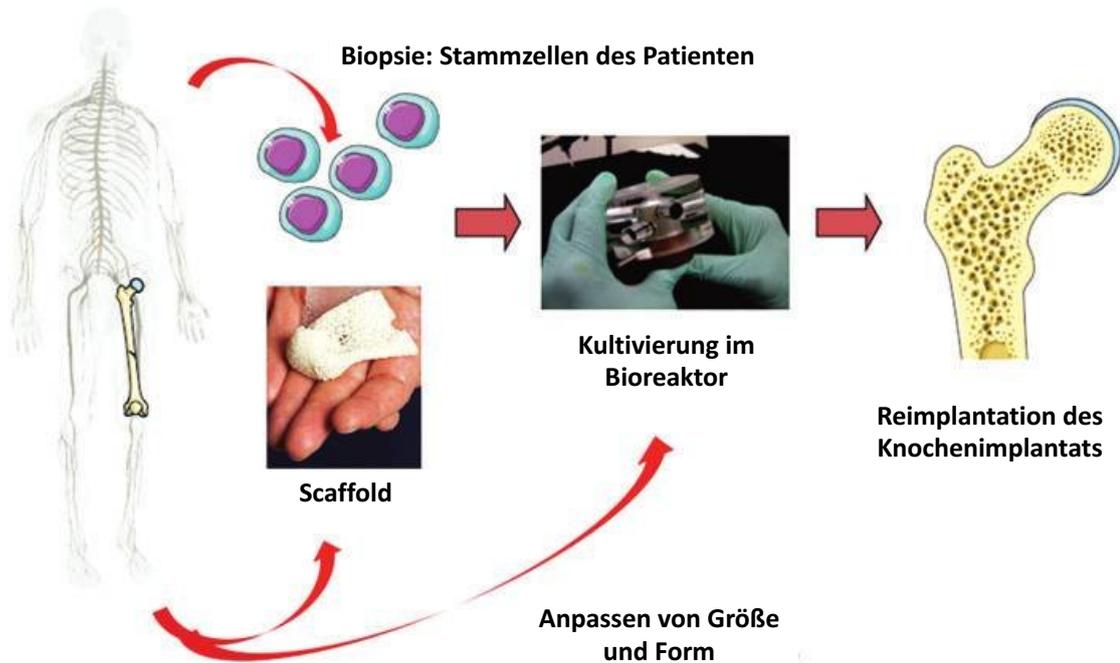
akzeptierte und weit verbreitete Techniken, um solche Defekte zu heilen. Dennoch sind sie mit mehrzeitigen Eingriffen und im Mittel mit langen Heilungsphasen verbunden [11-14]. Infektionen durch externe Fixateure, wie sie bei diesen Eingriffen teilweise verwendet werden, stellen vermeidbare Komplikationen dar und korrelieren mit der Anwendungsdauer [15, 16]. Außerdem limitieren Patientenmorbidity und geometrische Anforderungen eine effektive Therapie.

Weltweit sind Transplantationen von Knochen mit über 2 Millionen Eingriffen pro Jahr die zweithäufigste Gewebetransplantation nach Bluttransfusionen [17].

Seit über 50 Jahren beschäftigt sich die Wissenschaft mit der Erforschung von Knochenersatzmaterialien und deren Weiterentwicklung [17]. Die Vorstellung, Gewebe im Labor zu generieren, läutete vor etwas mehr als zwei Jahrzehnten das Zeitalter der Regenerativen Medizin und des Tissue Engineering ein. Seither werden besonders im Bereich des *Bone Tissue Engineering* enorme Fortschritte erzielt. Jedoch konnte durch die noch zu geringe Datenlage und die ökonomisch aufwendige Forschung bisher noch keine effizienten Therapiekonzepte vorgestellt werden [18].

Erste klinische Studien mit Mesenchymale Stromazellen (MSCs) zeigen heute vielversprechende Ergebnisse für die Behandlung von kritischen Knochendefekten.

Das *Bone Tissue Engineering* beschäftigt sich mit der Entwicklung von autologen und allogenen Gewebeersatz oder -erhalt zur Rekonstruktion im Rahmen von Knochendefekten *in vitro* und *in vivo*. Dabei könnte das Verfahren eine Alternative für die Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe anbieten, bei denen etablierte Therapien aufgrund von Defektgröße und Patientenmorbidity erfolglos bleiben. Das Prinzip des *Bone Tissue Engineering* besteht aus der Kultivierung, Expansion und Differenzierung von multipotenten Stromazellen *in vitro*. Diese können dann auf eine Trägerstruktur (sog. *Scaffold*, engl.) übertragen werden. Der *Scaffold* besteht aus einer drei-dimensionalen Struktur, die Botenstoffe und Wachstumsfaktoren enthält und osteoinduktive und -konduktive Eigenschaften hat, die die Bildung von Knochengewebe fördert. Die multipotenten Stromazellen sollen zur Proliferation, osteogenen Differenzierung und Bildung von extrazellulärer Matrix angeregt werden. Im Laufe des Prozesses sollte der *Scaffold* resorbiert werden. Ziel ist der vollständige Ersatz des *Scaffolds* durch körpereigene Knochensubstanz mit allen Eigenschaften eines nativen Knochens.



**Abb. 4 Prinzip des Bone Tissue Engineering.** In diesem Modell werden zunächst MSCs entnommen. Größe und Form des Scaffolds können individuell angepasst werden [19].

Ein *Scaffold* muss bestimmte Eigenschaften mitbringen. Roseti et al. hat einige davon zusammengefasst: Er sollte zunächst stabil gegenüber Druck- und Scherkräften sein und zugleich Flexibilität aufweisen. Durch eine optimale Verteilung von Poren bzw. Trabekeln sollte eine *native-like* Mikroarchitektur gemäß der Strukturhierarchie eines Knochens hergestellt werden. Das Material sollte nicht toxisch und resorbierbar sein und keine Allergien induzieren oder Abstoßungsreaktionen zulassen. Ein effizienter *Scaffold* sollte zudem in hoher Qualität schnell und kostengünstig produzierbar sein. Zusammengefasst sollte er als Leitstruktur die Eigenschaften eines Knochens in Bezug auf Struktur, Mechanik und Nährstofftransport nachahmen [20].

Die Materialforschung rund um *Scaffolds* und deren Weiterentwicklung ist aufwändig. Moderne *Scaffolds* bestehen aus synthetischen oder natürlichen Polymeren (Polycaprolacton, Alginate oder Kollagen), bioaktiven Keramiken (bioaktives Glas, Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit) oder Seide [21-23]. Dezellularisierte Knochenmatrix wird schon lange im klinischen Alltag verwendet und ist bekannt für seine osteogenen, osteoinduktiven und -konduktiven Eigenschaften [19]. Vorteilhaft Eigenschaften mehrerer Materialien versucht man zu Hybriden zu kombinieren [24]. Durch 3D-Druck im *Tissue Engineering* ist man heute in der Lage präzise Formen digital zu konstruieren, was die Herstellung individuell angepasster Implantate ermöglicht [25].

Erste klinische Studien am Tiermodell konnten zeigen, dass kritische Knochendefekte von 3 cm Größe mit einem *Scaffold* und Beimpfung mit allogenen *bone marrow derived stromal cells* (BMSCs) zu einer Defektregeneration führte. Dabei wurde der *Scaffold* direkt nach Defektentstehung eingebracht, während die BMSCs, auf Grund verbesserter Vaskularisierungsbedingungen zum Zeitpunkt der Beimpfung, vier Wochen später implantiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die BMSC-Implantate vergleichbare biomechanische Eigenschaften wie autologe Knochentransplantate haben [26].

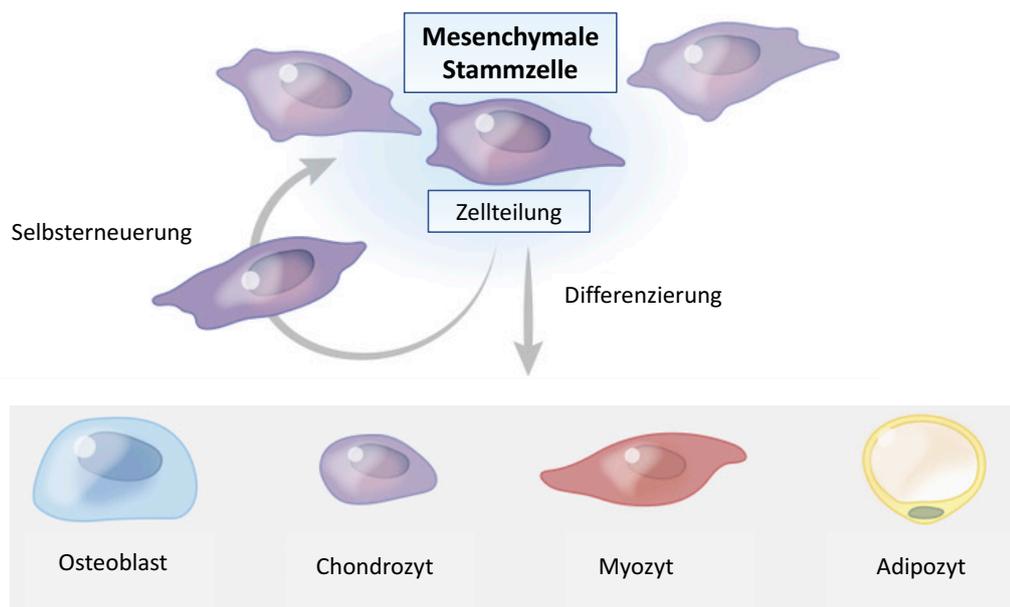
Eine Tiermodellstudie am Schwein aus der Arbeitsgruppe um Bhumiratana et al. berichtet über mit autologen *adipose tissue derived stromal cells* (ASCs) beimpfte *Scaffolds* aus dezellularisierter boviner Knochenmatrix für (gelenkübergreifende) Unterkieferdefekte. In den durchgeführten Experimenten wurde der *Scaffold* präklinisch in die anatomische Form gebracht, anschließend beimpft und für drei Wochen in einem Bioreaktor kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch diese Methode nach sechs Monaten deutlich mehr Knochen und deutlich mehr Gefäßinfiltration gebildet hat als bei den Kontrollgruppen ohne ASCs [27].

Die Gewebsregeneration ist wesentlich von den Kulturbedingungen *in vitro* abhängig. Nicht nur die einfache Inkubation mit Nährstoffen ist erforderlich, um Knochenzellen zur Formation von Knochengewebe anzuregen, sondern auch Stimuli aus der Umgebung der Zellen, die Vitalität und das Verhalten maßgeblich beeinflussen [28]. Deshalb wurden Bioreaktoren entwickelt, die die physiologischen Bedingungen des Körpers simulieren. Chen und Hu fassen einige Parameter wie pH-Wert, Temperatur, mechanische Stimuli, Diffusion und Perfusion zusammen, die individuell für die gewünschten Kulturbedingungen reguliert werden können [29]. Die Anforderungen an Bioreaktoren werden immer größer und die Geräte komplexer. Gerade die Ausbildung von Gefäßen im Rahmen der Neovaskularisation stellt aufgrund der limitierten Diffusionskapazität von Geweben eine große Herausforderung für die Entwicklung von *Scaffolds* dar [30].

Für *Bone Tissue Engineering* geeignete MSCs sind BMSCs aus dem Knochenmark, ASCs aus dem Fettgewebe, *dental pulp stromal cells* (DPSCs) aus der Zahnpulpa und *umbilical cord blood stromal cells* (USCs) der Wharton-Sulze [31, 32]. Die zu isolierende Zellpopulation sollte möglichst in großen Mengen verfügbar sein und die Entnahmebedingungen bei Spendern oder Patienten sollte eine geringe Morbidität aufweisen. Außerdem sollte eine hohe Proliferations- und Differenzierungskapazität möglich sein.

## 1.2 Adipogene Stromazellen

ASCs gehören zur Gruppe der mesenchymalen Stromazellen (MSCs). Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können durch ihr adipogenes, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential entsprechend in Fett-, Knochen und Knorpelzellen differenzieren, weshalb sie auch als „multipotent“ bezeichnet werden [33]. Häufig findet man auch den Begriff der „vaskulären Stromazellen“, zu denen sich ASCs und andere MSCs (z. B. BMSCs) aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften zuordnen lassen [34].



**Abb. 5 Die Differenzierung von MSCs.** Modifiziert nach [35].

ASCs können aus Fettgewebe und Liposuktionsfett isoliert werden, wo sie zusammen mit anderen Zellen vorkommen und gemeinsam die sogenannte Stromavaskuläre Fraktion (SVF) bilden. Neben MSCs finden sich dort etwa 50 – 70 % Adipozyten, 15 – 30 % Fibroblasten, 3 – 5 % Perizyten, 10 – 20 % Endothelzellen, 10 – 15 % Lymphozyten, 5 – 15 % Monozyten, 10 – 15 % Granulozyten und ein kleiner Teil hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen mit weniger als 0,1 % [36].

MSCs, Fibroblasten und Endothelzellen sind im Gegensatz zu anderen Zellen der SVF plastikadhärent, was ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal und Charakteristikum ist [37]. So ist es möglich die ASCs vom Rest der SVF in der Zellkultur zu separieren. Per Definition exprimieren ASCs zudem Oberflächenmerkmale, die sie immunphänotypisch von anderen Zellen unterscheiden. Dazu zählen CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 und

CD105 bei gleichzeitigem Fehlen der Oberflächenantigene CD14, CD31, CD34 und CD45 [34].

Gerade wegen der einfachen Gewinnung und der guten Zugänglichkeit von Fettgewebe, aus dem sie isoliert werden können, sind ASCs besonders attraktiv für das *Bone Tissue Engineering*. Fettgewebe und Liposuktionsfett werden im Rahmen bestimmter operativer Eingriffe gewonnen und sind je nach Patienten in großen Mengen verfügbar. In Liposuktionsfett sind 1 – 5 % ASCs enthalten [19]. Da für große Knochendefekte im Bereich des *Bone Tissue Engineering* eine große Anzahl von Zellen benötigt werden, ist es vorstellbar, dass diese Quelle durch die steigende Inzidenz von Adipositas weiterhin an Bedeutung gewinnt. Auch die Ausbeute von ASCs ist bei Weitem ergiebiger im Gegensatz zu BMSCs aus Knochenmarkaspirat und die Anzahl von koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU, engl.) ist höher (0,001 – 0,1 %) [38]. Zudem ist die Entnahmemorbidity einer Knochenmarkpunktion im Vergleich deutlich höher.

Anders als embryonale Stammzellen, deren klinische Anwendungen sowie Verwendung in der Forschung gegenwärtig Inhalt ethischer Debatten sind, ist der Gebrauch von ASCs ethisch unbedenklich [39].

Außerdem sollen ASC ein verbessertes osteogenes Differenzierungspotential haben [40].

### **1.3 Die Osteogenese von ASCs und ihre Mechanismen**

Wichtig für die osteogene *in vitro* Differenzierung von ASCs ist die Kultivierung mit Zusätzen wie Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat. Diese Substanzen und die eingesetzten Konzentrationen sind weitgehend etabliert [41].

Dexamethason induziert die Transkription von *LIM-domain protein with 4.5 domains* (FHL-2), welches an  $\beta$ -Catenin bindet. Dadurch wird  $\beta$ -Catenin vermehrt in den Nucleus transportiert um dort an *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF-1) zu binden. Durch diesen Schritt wird *Runx-related transcription factor 2* (Runx2) aktiviert und so die osteogene Differenzierung gefördert. Runx2 wird parallel dazu auch über weitere Faktoren wie den *Runx2 Coaktivator TAZ* und Teile des *mitogen-activated protein kinase signaling pathway* (MAPK-Signalkaskade) aktiviert [41].

Ascorbinsäure bewirkt die vermehrte Sekretion von Kollagen Typ I aus den Zellen in die Extrazelluläre Matrix, was über Bindung an Integrine und nachfolgender MAPK-Signalkaskade ebenfalls wieder zu einer Aktivierung von Runx2 führt [41].

Durch eine Behandlung mit  $\beta$ -Glycerophosphat werden Phosphatgruppen zur Verfügung gestellt, die für die Ausbildung von Hydroxylapatit in der extrazellulären Matrix notwendig sind. Das Phosphat vermittelt gleichzeitig intrazellulär weitere Schritte der Osteogenese über Phosphorylierung von *extracellular related kinase 1/2* (ERK1/2). Dies führt zu einer Steigerung der Expression von *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) [41]. Auch BMP-2 ist entscheidend für die Differenzierung zu Osteoblasten und fördert die Knochenheilung [42]. Diese Eigenschaften werden bereits kommerziell genutzt, indem rekombinante BMP-Produkte zur Behandlung von non-union Knochendefekten und spinalen Fusionen eingesetzt werden [43].

Mehrere Faktoren beeinflussen das Differenzierungspotential der ASCs unter kulturellen Bedingungen. Neben der Herkunft des Fettgewebes (viszeral oder subkutan), kann das osteogene Differenzierungspotential auch donorspezifisch stark variieren [44]. Die replikative und donorspezifische Seneszenz kann die Osteogenese *in vitro* beeinträchtigen, denn ROS häufen sich im Verlauf von Alterungsprozessen an und verstärken den Effekt des „cell aging“ [37].

### **1.3.1 ROS und oxidativer Stress**

ROS werden vielfach und ubiquitär in Stoffwechselreaktionen generiert. Gewebe besitzen viele Mechanismen, um ROS abzubauen. Allerdings übernehmen ROS auch wichtige Aufgaben in Prozessen wie Zelldifferenzierung, Immunabwehr und Apoptose. Daher können sie auch eine Mediatorfunktion in der Osteogenese von ASCs haben. Sie stellen eine Gruppe von freien Radikalen dar, die sehr reaktionsfreudig gegenüber anderen Molekülen sind. Radikale besitzen ein unpaares Elektron. Dieser Zustand macht sie als Molekül instabil mit dem Bestreben neue Bindungen einzugehen. Dazu zählen Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ ) und Hydroxylradikale ( $HO^{\bullet}$ ). Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) ist kein Radikal, gehört aber ebenfalls zu den ROS, besitzt aber ein im Vergleich niedrigeres Reaktionspotenzial [45]. ROS können auf unterschiedliche Weisen entstehen. Etwa 90 % entstehen physiologisch in der Atmungskette, im Inneren der Mitochondrien während der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP), aber auch exogene Faktoren wie radioaktive Strahlung oder ultraviolettes Licht sind Quellen von ROS. In der Atmungskette werden kontinuierlich Elektronen über Redoxreaktionen weitergegeben. Dabei fallen Protonen an, die über

einen elektro-chemischen Gradienten die ATP-Synthase antreiben. Gleichzeitig fallen im Komplex I (NADH-CoQ-Oxidoreduktase) und III (Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase) Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) an, die in die Mitochondrienmatrix gelangen und so Mitochondrien-DNA schädigen können. Sie werden als primäre ROS bezeichnet und sind hoch reaktiv. Über Komplex III gelangen sie zusätzlich in den intermembranösen Spalt der Mitochondrien, über den sie leicht ins Zytosol der Zellen gelangen [46]. Über das Enzym Superoxiddismutase (SOD) wird primäres  $O_2^{\bullet-}$  in  $H_2O_2$  umgewandelt. In der Mitochondrienmembran gibt es einige weitere Oxidoreduktasen, die  $H_2O_2$  produzieren. Es ist bisher unklar, welchen Beitrag sie zur mitochondrialen ROS-Produktion leisten [45]. In Peroxisomen werden durch zahlreiche Enzyme wie die Xanthin-Oxidase, Urat-Oxidase und D-Aspartat-Oxidase, hohe Mengen ROS produziert [47]. Aufgrund der hohen Anzahl an ROS-produzierenden Enzymen, besitzen Peroxisomen eine hohe Kapazität diese durch antioxidative Mechanismen abzuwehren [47]. Im glatten endoplasmatischen Retikulum werden durch den Fettsäuremetabolismus und die Flavin-Adenin-Dinukleotid-abhängige Proteinsynthese und -faltung ebenfalls ROS generiert [48]. Innerhalb von Lysosomen entstehen während der Protonenproduktion zur Aufrechterhaltung des sauren pH-Wertes für die Hydrolyse von körpereigenem- und Fremdmaterial vorwiegend Hydroxylradikale ( $HO\bullet$ ) [45, 49]. Weitere wichtige physiologische Quellen sind die NADPH-Oxidasen (NOX) die Bestandteil der Plasmamembranen sind [37]. Auch durch die Oxidation von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase (COX) und Lipooxygenase (LOX) zu Synthese von Eicosanoiden, Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen entstehen ROS [50].

Kommt es zu einem Ungleichgewicht zu Gunsten der ROS, entsteht oxidativer Stress. Unter oxidativem Stress versteht man eine erhöhte Konzentration von ROS, die von Antioxidantien, welche als wichtige Puffersysteme im Körper fungieren, nicht in ausreichender Art und Weise verstoffwechselt werden können. Diese Imbalance resultiert aus einer deregulierten ROS-Produktion oder einem verminderten Abbau. Als Folge häufen sich zufällige Schädigungen der DNA und von Molekülen in der Zelle, wie der RNA oder anderen Proteinen.

Diese Schäden können als ein wichtiger Faktor für die Entstehung von Erkrankungen angesehen werden. So gibt es Erkenntnisse, dass erhöhte ROS-Konzentrationen ätiologisch relevant für das Entstehen oder Voranschreiten von Diabetes mellitus, chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie Arteriosklerose und anderen

kardiovaskulären Pathologien, Osteoporose, rheumatoider Arthritis, neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder multipler Sklerose und Tumorerkrankungen sind [51-57].

Genutzt wird diese schädigende Wirkung im Rahmen der Immunabwehr von Pathogenen durch aktivierte Phagozyten. Neben den beschriebenen Wirkungen übernehmen ROS jedoch auch wichtige regulatorische Aufgaben im Zellzyklus, indem sie Transkription und Translation modulieren. Zudem können ROS als Mediatoren innerhalb von Signalkaskaden dienen [58].

### **1.3.2 Die Auswirkungen von ROS auf die Osteogenese von ASCs**

Durch ihre regulatorischen Einflüsse auf den Zellzyklus, sind ROS auch an der Differenzierung von MSCs beteiligt und fungieren unter anderem als Weichensteller zwischen Adipogenese und Osteogenese [59]. Eine Studie von Chen et al. konnte zeigen, dass eine hohe Konzentration von ROS die Osteogenese von BMSCs hemmt. Die Inkubation von BMSCs *in vitro* mit Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einer Reduktion der osteogenen Differenzierung [60, 61].

Undifferenzierte MSCs beziehen den größten Teil ihrer Energie aus anaeroben Stoffwechselfvorgängen wie der Glykolyse und weisen eine höhere Konzentration von Laktat auf [61]. Osteoblasten gewinnen ihre Energie hingegen vermehrt aus der oxidativen Phosphorylierung [61]. Während der Osteogenese zeigt sich jedoch gleichzeitig auch ein Anstieg einiger antioxidativer Enzyme wie SOD und Katalase. Dies ist am ehesten als ein Mechanismus der Gegenregulation zu verstehen [61].

Wichtige Signalkaskaden der Osteogenese auf molekularer Ebene sind Wnt/ $\beta$ -catenin, NELL-1 und Hedgehog [59]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine hohe ROS-Konzentration die Adipogenese fördert [62]. Wichtige Signalkaskaden bzw. Bestandteile von Kaskaden der Adipogenese sind FOXO, PPAR $\gamma$  und CEBPs, während der BMP- und IGF-Signalweg an der Regulation der Adipogenese und Osteogenese beteiligt sind [59].

### **1.3.3 Anti-oxidative Enzyme in der Osteogenese von ASCs**

Humane Zellen sind in der Lage durch endogene anti-oxidative Enzyme hohe Konzentrationen von ROS abzubauen, um so die schädigende Wirkung von oxidativem Stress abzuwenden. Diese anti-oxidativen Systeme bestehen u. a. aus anti-oxidativen Enzymen wie SOD, Katalase und Glutathionperoxidase (GPX) und kommen in

verschiedenen Zellen im gesamten Körper vor [63]. Während die SOD in Mitochondrien die Reaktion von  $O_2^{\bullet-}$  zu  $H_2O_2$  katalysiert, ist die Katalase das am häufigsten in Peroxisomen vorkommende Antioxidans [47]. Katalase besitzt eine Dismutase-Aktivität ( $2 H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ ) sowie eine Peroxidase-Aktivität ( $H_2O_2 + RH_2 \rightarrow 2 H_2O + R$ ), mit der beispielsweise Ethanol in Geweben mit niedriger Alkoholdehydrogenase-Kapazität oxidiert werden kann [64]. Dabei werden entweder Eisen oder Mangan als Cofaktoren verwendet. Katalase, welche in Mitochondrien von Säugetieren nicht vorkommt, hat eine sehr hohe Wechselzahl und katalysiert innerhalb 1 Sekunde mehr als  $10^6$  Moleküle  $H_2O_2$  [65].

Zusammengefasst hemmt eine erhöhte ROS-Konzentrationen die Osteogenese und Katalase ist ein effizientes anti-oxidatives Enzym, welches große Mengen ROS abbauen kann [59-61].

#### **1.4 Purinerges Signaling**

Das purinerge *Signaling* ist ein hochkonserviertes, ubiquitär im Organismus vorkommende Signalsysteme. Nukleotide adressieren purinerge Rezeptoren, die an einer Vielzahl von wichtigen zellulären Prozessen wie Vasodilatation, endokrine Sekretion, Fertilität und der Immunantwort beteiligt sind. Sie übernehmen auch eine Rolle in der Proliferation, Migration und Differenzierung von MSCs [66]. MSCs sind mit einer Reihe von purinergen Rezeptoren und Enzymen ausgestattet, die mit Nukleotiden wie ATP interagieren, und so parakrine und autokrine Signalkaskaden induzieren [67]. Obwohl es bisher viele Studien über die Interaktion zwischen extrazellulären Nukleotiden und purinergen Rezeptoren gibt, ist dennoch nur sehr wenig über deren genaue Funktion in MSCs bekannt [68].

MSCs zeichnen sich durch ihr Selbsterneuerungs- und ihr adipogenes, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential aus [33]. Die dichotome Beziehung zwischen Adipogenese und Osteogenese wird maßgeblich über die Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$  (Adipogenese) und Runx2 (Osteogenese) reguliert [69]. Es konnte demonstriert werden, dass P2X6-Rezeptoren in ASCs während der Adipogenese vermehrt exprimiert werden während sie in der Osteogenese eine verminderte Expression aufzeigen [70]. Das zeigt, dass Liganden wie ATP und seine Derivate in der Lage sind über die Bindung an purinerge Rezeptoren die Differenzierung zu beeinflussen, wenngleich die genauen Mechanismen nicht abschließend geklärt sind [71, 72].

### **1.4.1 Adenosintriphosphat (ATP) im purinergen Signaling**

Nukleotide wie ATP und seine Derivate ADP, AMP, Adenosin und Adenin sind lebenswichtige und überall vorkommende Bestandteile der Zelle und Moleküle mit hohem energetischen Potential [66]. ATP kommt in millimolaren Konzentrationen in der Zelle vor und kann auch als Signalmolekül über Vesikel oder Transporter und Kanäle an verschiedenen purinergen Rezeptoren binden. Es trägt hauptsächlich zur Energieversorgung der Zellen bei.

Die Bindung von ATP und Adenosin an einen spezifischen Rezeptor kann ganz unterschiedliche Wirkungen haben (*Kap. 1.4.2*). Welcher Signalweg dominiert und welche Wirkung letztendlich in der Zielzelle daraus resultiert, wird maßgeblich von im Zytosol befindliche Ectonukleotidasen, welche Ectonukleotide spalten, beeinflusst. Wichtige Enzyme dieser Gruppe sind die Ecto-5'-Nukleotidase (CD73) und die Ecto-Nukleosidtriphosphat-Phosphohydrolase (E-NTBDase), die durch die Degradierung von ATP die Signaltransduktion der Adenosin-Rezeptoren aktivieren [73].

### **1.4.2 Purinerge Rezeptoren in der osteogenen Differenzierung**

Die Familie der purinergen Rezeptoren besteht aus sogenannten P1-Rezeptoren, welche bevorzugt von Adenosin aktiviert werden und P2-Rezeptoren. P2-Rezeptoren können weiter unterteilt werden in P2X- und P2Y-Rezeptoren. Dabei stellen P2X-Rezeptoren Liganden-gesteuerte Ionenkanäle dar (ionotrope Rezeptoren), die aus zwei Transmembrandomänen bestehen und lediglich ATP als Liganden haben. P2Y-Rezeptoren hingegen sind metabotrop und werden G-Protein gesteuert durch ATP, ADP, UTP, UDP und UDP-Glukose aktiviert. Beschrieben wird auch ein P0-Rezeptor Subtyp, der durch Adenin aktiviert wird [74].

P1-Rezeptoren werden weiterhin in A1, A2A, A2B und A3 unterteilt und bestehen aus jeweils sieben Transmembrandomänen. Ciciarello et al. berichten über A2B-Rezeptoren, die über Adenosin die osteogene Differenzierung regulieren können [72]. Auch konnte gezeigt werden, dass diese Rezeptorsubtypen eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung von BMSCs in Mäusen spielen könnten [75].

Die P2-Rezeptoren stellen die weitaus größere Gruppe dar. Einige der P2-Rezeptoren kommen in MSCs vor und scheinen eine Rolle in der Osteogenese und Adipogenese zu

übernehmen. So zeigten Ke et al., dass die Abwesenheit des P2X7-Rezeptors in Osteoblasten in Knockout-Mäusen zu einer reduzierten Knochenbildung führten [76].

Zippel et al. konnten demonstrieren, dass einige dieser Rezeptoren, während der osteogenen Differenzierung differentiell exprimiert werden. Während der osteogenen Differenzierung von ASCs zeigten die Rezeptoren P2X6, P2X7, P2Y1, -2 und -4 eine reduzierte Proteinexpression, während P2X5 im Vergleich zu undifferenzierten Zellen deutlich vermehrt exprimiert wurde. P2X6 zeigte in der adipogenen Differenzierung hingegen eine vermehrte Expression. Hieraus wurde geschlossen, dass die Osteogenese und das purinerge *Signaling* einen unterschiedlichen Einfluss in MSCs haben, da beispielsweise P2X5 in *dental follicle cells* (DFCs) deutlich vermindert war und eine Überexpression von P2X7 zu einer verstärkter kalzifizierten Matrix im Vergleich zu ASCs führte [70].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die osteogene Differenzierung von ASCs unter dem Einfluss von einem Antioxidans detailliert zu untersuchen.

Es soll evaluiert werden, ob es einen dosisabhängigen Effekt gibt und ob sich eine optimale Konzentration für die in-vitro Differenzierung identifizieren lässt.

Des Weiteren wird untersucht, welchen Einfluss die verbesserte Differenzierung auf den ATP-Haushalt hat und ob die purinergen Rezeptoren im Verlauf der Osteogenese differentiell exprimiert werden. Zusätzlich soll evaluiert werden, ob die Regulation bestimmter Rezeptoren mit einer verbesserten osteogenen Differenzierung assoziiert ist. Vor dem Hintergrund dieser Zielsetzung wird das purinerge *Signaling* betrachtet und exemplarisch die Rezeptoren P2X2, P2X5 und P2X7 sowie P2Y2 untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Etablierung einer Methodik des intrazellulären ATP-Nachweises, welche im Laufe der Versuchsaufbauten fortwährend optimiert wurde.

Folgende Studienendpunkte werden im Rahmen dieser Arbeit betrachtet:

1. Der Einfluss verschiedener Konzentrationen des Antioxidans Katalase auf die osteogene Differenzierung.

2. Der Einfluss der gesteigerten Osteogenese durch die Behandlung mit einem Antioxidans auf den intrazellulären ATP-Gehalt als Maß für den Energiestoffwechsel.
3. Die Expression und der Einfluss der Katalase auf P2-Rezeptoren während der osteogenen Differenzierung.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen Erkenntnisse über die Mechanismen der Osteogenese liefern und zum Verständnis beitragen, wie Katalase auf zellulärer und molekularer Ebene zu einer verstärkten osteogenen Differenzierung führen kann.

Das langfristige klinische Ziel ist die Verbesserung der Osteogenese im Rahmen der Stammzelltherapie.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Tab. 1 Verwendete Geräte.

Abzug	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland
Autoklav DX-90	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Blotting-Transfersystem Semi Dry Blotter Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Geldokumentationsanlage GelDoc	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Geltransferapparatur Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heizblock	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Kryo-Einfrierbehälter	Schmidt Laborgeräte GJM Handel und Service GmbH, Wien, Österreich
Kühlschrank	Nagle Nunc International, Rochester (NY), USA
Magnetrührer IKARET control/t, IKAMAG safety control	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40, Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskopkamera AxioCam MRC	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multiplattenlesegerät VICTOR3 Multilabel Counter Model 1420	Perkin Elmer, Waltham, USA

Pipetten Eppendorf Research fix 0,5 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipettboy Accujet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Spektrophotometer BioPhotometer plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Taumel-Rollenmischer	RM5K 30
	RM10W 30V
Ultraschallprozessor UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH, Berlin, Deutschland
Waagen Kern ABJ-N; 440-45	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Waage Ohaus Adventurer Pro	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Hybridisierungs-ofen Compact line OV3	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Vortex Nr. 444-1372	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugen: Megafuge 16 R; H Pico17 Microfuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 2 Verwendetes Verbrauchsmaterial.

Blotting-Filterpapier 2,5 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Einfrierrohrchen bio-one Cryos 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Einmalhandschuhe Micro-Touch; Nitra-Tex	Ansell GmbH, München, Deutschland
Falcons, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Falcons, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Filter (steril) 0,2 µm	Merck KGaA, Dramstadt, Deutschland
Glasflaschen 1000 ml, 500 ml, 250 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
Nitrozellulosemembran 0,2 µm	Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten aus Plastik 3 ml	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen (mit Filter) 10 – 1000 µl	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2 ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Stripetten (Costar 2, 5, 12, 25 ml Shorty Stripette Serological Pipettes)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflaschen (Cellstar Cell Culture Flask 25, 75, 175 cm <sup>2</sup> red filter cap)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten (Cellstar 6-, 12-, 24-, 96-Well Tissue Culture Plates)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber (blau, 40 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
3-Amino-1,2,4-Triazol (ATA) (500 nM)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
Acrylamid 30 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Alizarin-Rot-S	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest. (steril)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Adenosine 5'-triphosphate (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) (pH-Wert = 7)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
DMEM (4,5 g/l Glucose)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
Entwicklerlösung	BIO RAD, Clarity™ Western ECL, Substrate 200 ml, Cat. - Number: #170-5060
Ethanol (Emsure)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fetales Rinderserum Gold (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (Emplura)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Katalase (aus der Rinderleber)	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
Kollagenase Typ I	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Methanol (Emsure)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	VWR Chemicals, Radnor, USA
Paraformaldehyd 4 %	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
PBS-Lösung mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Ponceau-S	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure 37 % (Rotipuran)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	VWR Chemicals, Radnor, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	VWR Chemicals, Radnor, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Base	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland

## 2.4 Medien, Lösungen und Puffer

Tab. 4 Verwendete Medien, Lösungen und Puffer

Alizarin-Rot-Farblösung	0,5 % Alizarin Rot S
	ad H <sub>2</sub> O
Blotting-Puffer	40 ml 25x Transferpuffer
	50 ml Methanol
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (CPC) (10 %)	4 g CPC
	ad 40 ml H <sub>2</sub> O
Elektrophorese-Puffer (10x)	30,3 g Tris (pH-Wert = 8,3 – 8,8), 1x Puffer: 25 mM
	144,2 g Glycin, 1x Puffer: 192 mM
	10 g SDS, 1x Puffer: 0,1 %
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Kollagenase-Lösung	0,15 g BSA
	0,02 g Kollagenase Typ I
	ad 10 ml PBS
Laemmli-Puffer (4 x)	252 mM Tris-HCl (pH-Wert = 6,8)
	40 % Glycerol
	8 % SDS
	0,01 % Bromphenolblau
	20 % Mercaptoethanol
	ad 10 ml H <sub>2</sub> O
Osteogenes Differenzierungsmedium	DMEM (4,5 g/L Glucose in 500 ml)
	10 % FBS
	1 % Penicillin/ Streptomycin
	1 % L-Glutamin (falls nicht im DMEM enthalten)
	500 nM Dexamethason
	50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat
	10 mM β-Glycerophosphat

Ponceau-S-Farblösung	0,1 % Ponceau S
	3 % Trichloressigsäure
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O
Proliferationsmedium	DMEM (4,5 g/L Glucose in 500 ml)
	10 % FBS
	1 % Penicillin/ Streptomycin
	1 % L-Glutamin (falls nicht im DMEM enthalten)
RIPA-Puffer	50 mM Tris (pH-Wert = 8)
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	0,5 % Na-Deoxycholat
	0,1 % SDS
	Proteaseninhibitor (1 Tablette RIPA Complete auf 7 ml RIPA)
Sammelgel-Lösung (12 %, 2 Gele)	6 ml H <sub>2</sub> O
	1,3 ml 30 % Acrylamid
	2,5 ml 4 x Sammelpuffer
	20 µl TEMED
	50 µl 10 % APS
Sammelgel-Puffer (4 x)	0,5 M Tris (pH-Wert = 6,8)
	0,4 % SDS
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris (pH-Wert = 6,8)
	2 % SDS
	100 mM Mercaptoethanol
TBS (1x)	7,7 mM Tris (pH-Wert = 7,5)
	150 mM NaCl
TBS-T	TBS
	1 % Tween 20
Trenngel-Lösung (12 %, 2 Trenngele)	5,25 ml H <sub>2</sub> O
	6 ml 30 % Acrylamid
	3,75 ml 4 x Trenngelpuffer
	20 µl TEMED

	50 µl 10 % APS
Trenngel-Puffer (4 x)	1,5 M Tris (pH-Wert = 8,8)
	0,4 % SDS
Tris-Glycin-Transferpuffer (25 x)	18,2 g Tris-Base (1 x Puffer: 12 mM)
	90 g Glycin (1 x Puffer: 96 mM)
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O

## 2.5 Assays und Kits

Tab. 5 Verwendete Kits.

ATP Determination Kit Time Stable Assay	Biaffin GmbH & Co. KG, Kassel, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

## 2.6 Antikörper

Tab. 6 Verwendete Primärantikörper.

Primärantikörper	Hersteller
anti-P2RX5 (C-2), anti-Human, Monoclonal, Mouse	Santa Cruz, sc-373795
anti-P2RX7 (E1E8T), anti-Human, Monoclonal, Rabbit	Cell Signaling Technology, Nr. 13809
anti-P2XR2 (3D5), anti-Human, Monoclonal, Mouse	Santa Cruz, sc-293319
anti-P2RY2, anti-Human, Polyclonal, Rabbit	Novus Biologicals, NB110-39032
anti-GAPDH (13H12), anti-Human, Monoclonal, Mouse	Novus Biologicals, NBP2-27103

**Tab. 7** Verwendete Sekundärantikörper.

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Goat anti Mouse, Polyclonal, Immunoglobuline	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Goat anti Rabbit, Polyclonal, Immunoglobuline	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark

## **2.7 Software**

**Tab. 8** Verwendete Software.

Datenverarbeitung	Microsoft Excel 2016
Literaturverwaltungsprogramm	Endnote X8
Mikroskopsoftware	Axiovision Rel. 4.8
Grafische Darstellung	Graph Pad Prism 5.0c 2009
Statistische Auswertung	SPSS Version 29 von IBM
Textverarbeitung	Microsoft Word 2016
Westernblot Auswertung	BioRad Image Lab 6.0.1, 2017

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellen und Zellkultur**

#### **3.1.1 Gewinnung von ASCs aus Fettgewebe**

Das Fettgewebe wurde zunächst von Haut und Bindegewebe präpariert und in kleine Stücke geschnitten. Die Suspension wurde im Anschluss im Verhältnis 1:1 zu einer steril filtrierten Kollagenaselösung (0,2 µm Filter) gegeben und unter standardisierten Bedingungen für 1 h bei 37 °C im Inkubationsschrank unter ständiger Rotation inkubiert. Ziel ist die enzymatische Andauung des Binde- und Fettgewebes. Durch erneutes Filtrieren der Suspension sollten überschüssige Bindegewebsbestandteile entfernt werden. Anschließend wurde das Filtrat bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Das sich durch die Zentrifugation gebildete Zellpellet wurde mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) resuspendiert, gewaschen und nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun mit Proliferationsmedium resuspendiert und entsprechend der Zellzahl in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente ASCs zu entfernen. Es folgte die Zugabe von frischem Proliferationsmedium (DMEM mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin sowie 1 % Penicillin/Streptomycin) und die erneute Inkubation im Brutschrank wie oben beschrieben.

#### **3.1.2 Gewinnung von ASCs aus Liposuktionsfett**

Das Liposuktionsfett wurde zunächst in sterilen 50 ml Falconröhrchen portioniert und anschließend für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Das Fettgewebe wurde dann in Falconröhrchen transferiert und wie oben beschrieben im Verhältnis 1:1 mit der steril filtrierten Kollagenaselösung versetzt und für 1 h bei 37°C im Inkubationsschrank unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Filtrat bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Das sich durch die Zentrifugation gebildete Zellpellet wurde mit PBS resuspendiert, gewaschen und nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun mit Proliferationsmedium resuspendiert und entsprechend der Zellzahl in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Es folgte die Zugabe von frischem Proliferationsmedium (DMEM

mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin sowie 1 % Penicillin/Streptomycin) und die erneute Inkubation im Brutschrank wie oben beschrieben.

### **3.1.3 Zellkultur**

Die ASCs wurden in 175 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen oder in Zellkulturschalen kultiviert. Dabei erfolgte die Kultivierung unter Standardbedingungen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung. Die Zellen wurden in Medium (DMEM mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin sowie 1 % Penicillin/Streptomycin; Proliferationsmedium) kultiviert. Alle Experimente wurden in Zellkulturpassage 3 durchgeführt. In regelmäßigen Abständen fand je nach Zelldichte zwei bis dreimal die Woche ein Mediumwechsel statt, indem das alte Medium über den Zellen abgesaugt und durch neues auf Raumtemperatur gebrachtes Medium ersetzt wurde. Sobald die ASCs subkonfluent waren (70 – 80 %), erfolgte das Passagieren mit Trypsin-EDTA in 10 %-iger Verdünnung mit PBS. Das Zählen der geernteten Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurde ein befeuchtetes Deckgläschen über der Zählkammer platziert. Es wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt (1:1). Trypanblau ist eine zytotoxische Färbung, welche bereits tote Zellen blau anfärbt, vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf. Wiederum 10 µl dieser Suspension wurde dann mit einer feinen Pipette in den Raum zwischen Zählkammer und Deckgläschen gegeben. Die Zellzahl / ml ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Zellzahl} / 4 \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)}$$

### **3.1.4 Passagieren der ASCs**

Das Passagieren wurde bei Erreichen eines subkonfluenten Zellmonolayers (70 -80 %) durchgeführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die ASCs wurden mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml (175 cm<sup>2</sup>) bzw. 5 ml (75 cm<sup>2</sup>) Trypsin-EDTA-Lösung (10x Trypsin-EDTA und PBS im Verhältnis 1:10) für ca. 7 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung inkubiert. Dadurch wurden die Zellen schonend abgelöst. Zusätzlich konnte ein Zellschaber verwendet werden. Der Ablösevorgang wurde zwischendurch unter dem Mikroskop kontrolliert. Um eine enzymatische Verdauung durch das Trypsin zu verhindern, wurde direkt nach dem Ablösen der ASCs Proliferationsmedium hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 300 g für 5 min. Nach Resuspension mit Proliferationsmedium wurden die Zellen mit einer

Subkultivierungsratio von 1:2 bzw. 1:3 entsprechend der Zellzahl auf neue Zellkulturflaschen verteilt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung inkubiert.

Die ASCs wurden je nach Versuchsaufbau in Passage 3 in 12- bzw. 24-Well-Platten ausgesät und mit 1 ml bzw. 0,5 ml Proliferationsmedium/Well bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung inkubiert. Sobald mikroskopisch ein konfluentes Zellmonolayer erkennbar war, konnten die ASC für die Versuche verwendet.

### **3.1.5 Kryokonservierung der ASCs**

Zur Kryokonservierung wurden die ASCs wie oben bereits beschrieben trypsiniert und geerntet. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt (*Kap. 3.1.3*). Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend im eisgekühlten Einfriermedium (Dimethylsulfoxid, DMSO; im Verhältnis 1:10 in FBS) resuspendiert. Da DMSO oberhalb des Gefrierpunktes toxisch auf Zellen wirkt, wurden die Kryoröhrchen auf Eis gelagert. Die Menge des benötigten Einfriermediums wurde so berechnet, dass in jedem Kryoröhrchen  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingefroren werden konnten. Je 1 ml Zellsuspension mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden aliquotiert. Die Aliquots wurden in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80°C kryokonserviert. Isopropanol soll den Einfriervorgang auf -1°C/h verlangsamen, um zellschonendes Einfrieren zu gewährleisten.

Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, wurden die Vials in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Dann wurde zügig 1 ml Proliferationsmedium zugefügt und auf- und abpipettiert. Die Zellsuspension wurde nun in Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote und nicht adhärente Zellen zu entfernen.

### **3.1.6 Induktion der osteogenen Differenzierung der ASCs**

Die ASCs wurden für die Versuche in der 3. Passage in 12- bzw. 24-Well-Platten ausplattiert und so lange mit Proliferationsmedium inkubiert, bis sich ein konfluentes Monolayer gebildet hatte. Erst dann wurden die ASCs mit osteogenem Differenzierungsmedium OM, welches aus DMEM (4,5 g/l Glucose), 10 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin, 1 % L-Glutamin, 500 nM Dexamethason, 50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und 10 mM β-Glycerophosphat differenziert. Die Zellen

wurden maximal über eine Testdauer von 21 Tagen OM behandelt. Das osteogene Differenzierungsmedium wurde zweimal die Woche gewechselt.

### 3.1.7 Inkubation mit oxidativen und anti-oxidativen Zusätzen im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Nachdem sich ein konfluentes Monolayer gebildet hatte, wurden die ASCs additiv zur Behandlung mit OM mit Antioxidantien und als entsprechende Kontrolle mit einem relativ langlebigen reaktiven Sauerstoffspezies ( $H_2O_2$ ) bzw. ATA behandelt. Die verwendeten Zusätze und Konzentrationen sind in *Tab. 9* aufgelistet. Die Zellen wurden über eine Testdauer von 21 Tagen mit OM bzw. OM und den jeweiligen Zusätzen behandelt. Das Medium wurde zweimal die Woche gewechselt.

**Tab. 9** Verwendete Zusätze und Konzentrationen für die osteogene Differenzierung.

Zusatz	Konzentration
Katalase (aus Rinderleber)	25 U/ml, 125 U/ml, 250 U/ml
Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )	50 $\mu$ M
3-Amino-1,2,4-Triazol (ATA) in Kombination mit Katalase	500 nM ATA + 250 U/ml Katalase

## 3.2 Alizarin-Rot-S Färbung und Rücklösung

Die Quantifizierung der osteogenen Differenzierung erfolgte mittels Anfärbung der Kalzium Ionen in der extrazellulären Matrix mit der Alizarin-Rot-S-Lösung und Rücklösung des Farbstoffs mit Hilfe der Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (CPC-Lösung). Und anschließender Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600$  nm ( $OD_{600}$ ). Denn Osteoblasten sind in der Lage Kalzium in der extrazellulären Matrix zu deponieren. Für die Herstellung der Farbstofflösung wurden 0,5 % Alizarin-Rot-S in Aqua dest. gelöst. Pro 10 ml Aqua dest. wurden somit 50 mg Alizarin-Rot-S benötigt.

Für die Quantifizierung der osteogenen Differenzierung wurden ASCs über eine Testdauer von 21 Tagen mit OM allein oder mit den verschiedenen Zusätzen inkubiert (*Tab. 10*). An den Tagen 0 (Kontrolle mit Proliferationsmedium), 7, 14 und 21 wurde die

osteogene Differenzierung mit Hilfe der Alizarin-Rot-S Färbung evaluiert. Für den Versuch wurden die Zellen in 24-Well-Platten kultiviert.

**Tab. 10 Behandlungsschema für Alizarin-Rot-S-Färbung.**

<b>Behandlung</b>
Proliferationsmedium
OM
OM + Katalase (25, 125, 250 U/ml)
OM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (50 µM)
OM + ATA (500 nM) + Katalase (250 U/ml)
OM + Katalase (25, 125 U/ml) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (50 µM)

Für die Färbung der kalzifizierten Matrix mit Alizarin-Rot-S wurde das Medium abgesaugt und die ASC wurden mit je 1 ml/Well PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4 %-igem PFA für 15 min unter dem Abzug bei RT fixiert. Das PFA wurde abgesaugt und die Zellen mit je 1 ml/Well Aqua dest. gewaschen. Nun wurde die Alizarin-Rot-S Färbelösung zu je 0,5 ml/Well hinzugegeben. Dann erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen nochmals mit je 1 ml Aqua dest. gewaschen, bis der Überstand klar war. (Farbüberstand, der sich beispielsweise an der Well-Wand ablagert, würde das Ergebnis verfälschen). Um die Zellen vor der Austrocknung zu bewahren, wurden sie im Anschluss mit je 1 ml PBS überschichtet. Anschließend wurden die Zellen und die Kalziumdeposition, bzw. die erfolgreiche Färbung mikroskopisch und fotografisch evaluiert.

Die Rücklösung der Alizarin-Rot-S-Lösung erfolgte mit einer 10 %-igen CPC-Lösung (pH-Wert = 7). Zur Herstellung der 10 %-igen CPC-Lösung wurde CPC zu je 4 g pro 40 ml Aqua dest. unter dem Giftabzug abgewogen und in Aqua dest. gelöst. Das vollständige Lösen wurde erreicht, indem der Ansatz für 1 – 2 h auf dem Taumelrollenmischer inkubiert wurde.

Für die Rücklösung wurde das PBS über den Zellen zunächst abgesaugt. Dann wurde die 10 %-ige CPC-Lösung zu je 0,5 ml/Well auf die ASC gegeben. Es folgte eine 90 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) bis die Zellen vollständig entfärbt waren. Alle Schritte der Rücklösung wurden unter dem Abzug durchgeführt.

Für die quantitative Bestimmung wurde mit einem Photometer die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 600 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{600}$ ) des rückgelösten Farbstoffes im Überstand gemessen. Normiert wurde auf die Kontrolle und der Blank abgezogen.

### 3.3 Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration

Für die Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration wurden die Zellen über eine Testdauer von maximal 21 Tagen mit OM oder OM und den verschiedenen Zusätzen behandelt (*Tab. 11*). An den Tagen 0 (Kontrolle mit Proliferationsmedium), 1, 2, 3, 7, 14 und 21 wurde ein Luciferase-Assay (ATP Determination Kit, time stable assay, Biaffin) zur Bestimmung der intrazellulären ATP-Konzentration durchgeführt. Für den Versuch wurden die ASCs in 12-Well-Platten differenziert.

**Tab. 11** Behandlungsschema für ATP-Assay.

Behandlung
Proliferationsmedium
OM
OM + Katalase (25, 125 U/ml)
OM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (50 $\mu\text{M}$ )

Zunächst wurde das Medium über den Zellen abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 250  $\mu\text{l}$ /Well Trypsin/EDTA vom Wellboden abgelöst. Dafür wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen mit 250  $\mu\text{l}$ /Well Medium resuspendiert und mit einem Schaber vom Boden gelöst wurden, wurde die Zellsuspension in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei 13.300 rpm für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden je 300  $\mu\text{l}$  kochendes Aqua dest. auf das Zellpellet geben und die Zellen somit lysiert. Der Zellsuspension wurde mit einem Vortex-Gerät gemischt und anschließend ein weiteres Mal bei 13.300 rpm zentrifugiert. Dabei wurden zwei Vorgehensweisen miteinander verglichen. Neben der beschriebenen Zentrifugation wurde ein Teil der Zellen in Qia-shredder Tubes zentrifugiert. Danach wurde das Zell-Lysat sonifiziert. Der DNA-Gehalt der Proben wurde evaluiert (mit NanoDrop). Die Proben konnten danach bei -80°C eingefroren werden. Anschließend wurde der Assay nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Um eine Standardkurve zu erstellen, wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten ATP-Konzentrationen hergestellt. Folgende Verdünnungen wurden gewählt: 10.000 nM, 1.000 nM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM. Für die Standardreaktion wurden 50 µl des finalen Reagenzes vom Hersteller zusammen mit je 50 µl der ATP-Verdünnungsreihe als Doppelbestimmung in eine weiße 96-Well-Platte gegeben (Volumina im Verhältnis 1:1 vermischt). Mit allen Proben wurde gleich verfahren. Nach 15 min Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 560 \text{ nm}$  im Luminometer (VICTOR, Perkin Elmer) gemessen. Mit einer durch Luciferase katalysierten Biolumineszenz-Reaktion konnte das Substrat D-Luciferin abhängig von der ATP-Menge umgesetzt werden. Bei diesem Prozess entstand Licht, welches proportional zu der freigesetzten ATP-Menge war. Somit konnte mit Hilfe der Standardkurve die ATP-Menge bestimmt werden.



**Abb. 6 Luciferase-Reaktion**

### 3.4 Western Blot Analysen der purinergen Rezeptoren

Für die Extraktion von Proteinen aus ASCs wurden die Zellen über eine Testdauer von maximal 21 Tagen mit OM oder OM und den verschiedenen Zusätzen inkubiert (Tab. 12). An den Tagen null (Kontrolle mit Proliferationsmedium), 7, 14 und 21 erfolgte dann die Gewinnung von Proteinextrakten aus den Zellen.

**Tab. 12 Behandlungsschema für die Analyse der purinergen Rezeptoren.**

<b>Behandlung</b>
Proliferationsmedium
OM
OM + Katalase (125 U/ml)
OM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (50 µM)
OM + Katalase (125 U/ml) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (50 µM)

Dazu wurde das Medium über den ASC abgenommen und die Zellen mit jeweils 400  $\mu$ l PBS gewaschen. Anschließend wurde die Zellen mithilfe eines Schabers vom Wellboden gelöst und in 1,5 ml Zellkulturgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 13.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde mit 30  $\mu$ l RIPA-Puffer resuspendiert. Dabei wurden die Proben stets auf Eis gelagert, um die Aktivität von natürlichen Proteasen zu inhibieren. Zur Zell-Lyse wurden die Proben gevortext und im Anschluss für 30 s sonifiziert.

#### **3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

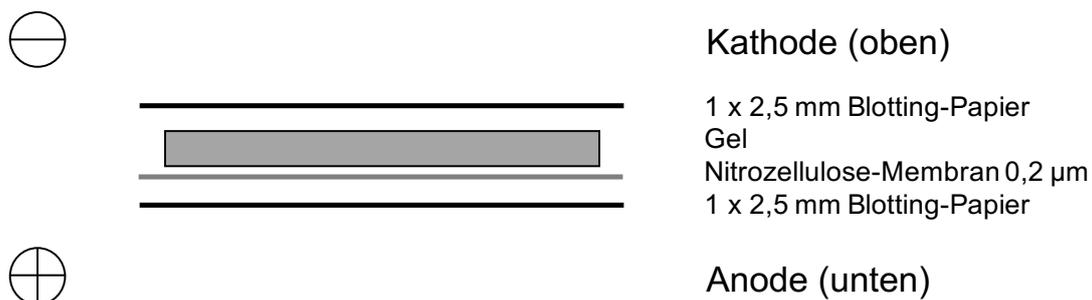
Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Pierce BCA-Proteinassay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo) genutzt und entsprechend der Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Messung der Proteinproben erfolgte im Multiplattenlesegerät (Perkin Elmer VICTOR3 V Multilabel Counter model 1420) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 562$  nm. Zusätzlich wurde eine BSA-Standardreihe mitgeführt.

#### **3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Für die Durchführung der SDS-Page wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell System (BioRad) verwendet. Dazu wurde zunächst ein 12 %-iges Trenngel hergestellt, welches mit einer Phase aus 70 %-igem Ethanol übergossen wurde. Nach Abschluss des Polymerisationsprozesses (20 min) wurde die Alkoholphase durch ein Sammelgel ersetzt. In die Sammelgel-Phase wurde ein Kamm eingebracht. Während der Polymerisationsprozesses wurden dann die Proben im Verhältnis 1:4 mit Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Im Anschluss wurde der Kamm aus den Sammelgelen entfernt und die Sammelgeltaschen wurden mit einem maximalen Volumen von 25  $\mu$ l (bei 0,75 mm Gelen und 35  $\mu$ l bei 1,0 mm Gelen) der vorbereiteten Proben und Laemmli-Puffer gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde mit einer Stromspannung von 60 V begonnen und sobald die Proteine durch das Sammelgel gewandert sind mit 110 – 130 V fortgesetzt. Nach dem Gellauf erfolgte das Blotting der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (0,2  $\mu$ m, BioRad). Um die Proteinexpression vergleichen zu können wurde in jede Sammelgeltasche, die gleiche Proteinmenge pipettiert (10  $\mu$ g).

### 3.4.3 Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran

Um die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine zu analysieren, erfolgte ein Transfer auf Nitrozellulose-Membranen (0,2  $\mu\text{m}$ , BioRad). Dazu wurden die Gele vorsichtig aus der SDS-Page-Kammer herausgelöst und der Sammelgelabschnitt abgetrennt und verworfen. Die Gele sollten nun für einen Moment in Blotting-Puffer äquilibrieren. Die Membranen und das Blotting-Papier wurden ebenfalls in Blotting-Puffer getaucht und befeuchtet. Anschließend erfolgte der Aufbau der Blotting-Apparatur wie in *Abb. 7* beschrieben. Luftblasen wurden entfernt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte durch Anlage eines elektrischen Feldes für 25 min bei einer Stromspannung von 25 V und einer Stromstärke von 2,5 A.



**Abb. 7** Aufbau der Blotting-Apparatur für den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran

### 3.4.4 Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulose-Membran

Um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran zu prüfen, erfolgte nach dem Transfervorgang die Färbung der Proteinbanden mit Ponceau-S-Farbstoff (Serva). Dafür wurden die Membranen für zwei bis drei Minuten in die Farbstofflösung gelegt und anschließend mit Aqua dest. entfärbt.

### 3.4.5 Immunmarkierung und die Analyse der Proteinexpression

Im Anschluss an den Proteintransfer und die Ponceau-S-Färbung wurden die Membranen in Falcon-Röhrchen gelagert und für 45 min bei RT auf dem Taumel-Rollenmischer mit 5 % BSA in TBS/T geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Dann folgte die Inkubation mit verschiedenen primären Antikörpern, indem die Antikörperlösung auf die Nitrozellulose-Membran gegeben wurde und für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht auf dem Taumelrollen-Mischer. Dabei wurden die Antikörper nicht zusammen, sondern nacheinander auf die Membranen gegeben. Die Antikörper und

die verwendeten Verdünnungen in 5 % BSA in TBS/T sind entsprechend den Herstellerangaben in *Tab. 13* dargestellt. Anschließend wurden die Membranen drei Mal für je 5 min mit TBS/T gewaschen, um dann mit den entsprechenden sekundären Antikörpern und 1 µl anti-Western-Marker für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert zu werden. Die Visualisierung der Proteinexpression erfolgte durch eine an den sekundären Antikörper gebundene Horseradish-Peroxidase, die durch die Oxidation von Luminol in der Entwicklerlösung ein Chemilumineszenz-Signal erzeugte. Nach einem weiteren Waschschrift wie oben beschrieben erfolgte die Detektion des Chemilumineszenz-Signals. Dazu wurden die Membranen in einer Schale gleichmäßig mit der Entwicklerlösung benetzt und zügig in den Entwickler überführt. Im Anschluss konnte die Proteinexpression anhand eines Vergleichs zum *House-keeping* Gen GAPDH analysiert werden. So kann die Proteinexpression der nachzuweisenden Proteine auf die Expression von GAPDH normiert werden. Die Detektion von GAPDH funktioniert mit Hilfe eines Rhodamin-gekoppelten Primärantikörpers, welcher fluoresziert und so ohne den Gebrauch eines zusätzlichen Sekundärantikörpers detektiert werden kann.

**Tab. 13 Verdünnungen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b> (jeweils in 5 % BSA in TBS/T)
anti-P2RX5, anti-Human, monoclonal, Mouse	1:500
anti-P2RX7, anti-Human, monoclonal, Rabbit	1:1000
anti-P2XR2, anti-Human, monoclonal, Mouse	1:500
anti-P2RY2, anti-Human, polyclonal, Rabbit	1:1000
anti-GAPDH, anti-Human, Monoclonal, Mouse	1:10.000
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b> (jeweils in TBS/T)
Goat anti Mouse, polyclonal, Immunoglobuline	1:1000
Goat anti Rabbit, polyclonal, Immunoglobuline	1:1000

### **3.5 Statistische Auswertung**

Für die Erstellung der Grafiken wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism 5.0c 2009 verwendet. Zur statistischen Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS Version 29 von IBM verwendet. Ein Unterschied wurde als signifikant angesehen, wenn die Wahrscheinlichkeit  $p$  des  $\alpha$ -Fehlers  $< 0,05$  ist. Die metrischen Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Bei metrischem Skalenniveau wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft, ob eine Normalverteilung vorliegt. Bei normalverteilten Daten wurden Mittelwerte mit dem Students t-Test für unabhängige Stichproben verglichen. Bei dem Vergleich von Mittelwerten zu zwei Zeitpunkten wurde der t-Test für abhängige Stichproben verwendet. Lagen nicht normalverteilte Werte vor, wurde mittels nicht-parametrischer Verfahren, dem Mann-Whitney-U-Test sowie dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, getestet. Das Signifikanzniveau wurde durch die asymptotische 2-seitige Signifikanz ermittelt.

### **3.6 Ethikvotum**

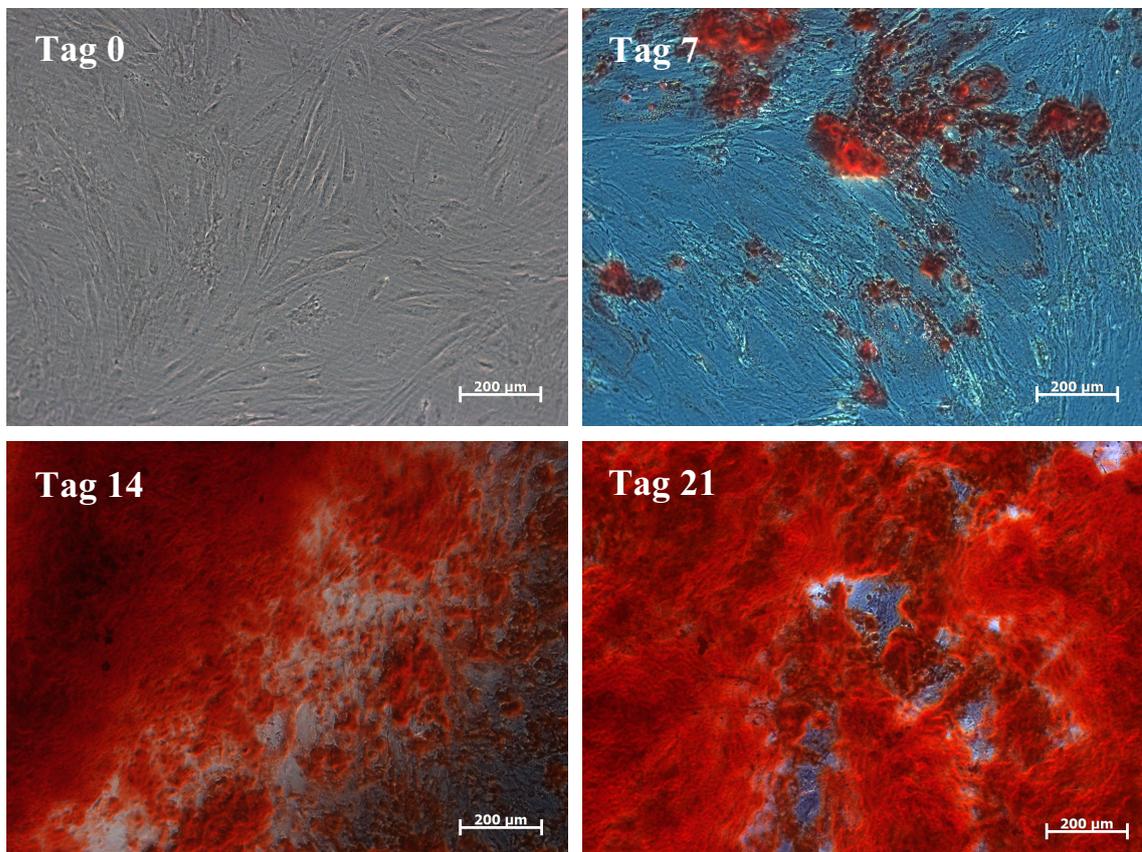
Dem Antrag mit dem Titel „Etablierung einer nicht personenbezogenen Sammlung von Körpergeweben und Blutproben zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für wissenschaftliche Zwecke“ mit dem Aktenzeichen 3634 wurde stattgegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Evaluation der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Rot-S-Färbung

Als Maß für die osteogenen Differenzierung wurde das Potential der ASCs untersucht Kalzium in der extrazellulären Matrix zu deponieren. Alizarinrot-S bindet an die Kalziumionen und lässt sich quali- und quantifizieren und lässt somit Rückschlüsse auf das osteogene Differenzierungspotential zu.

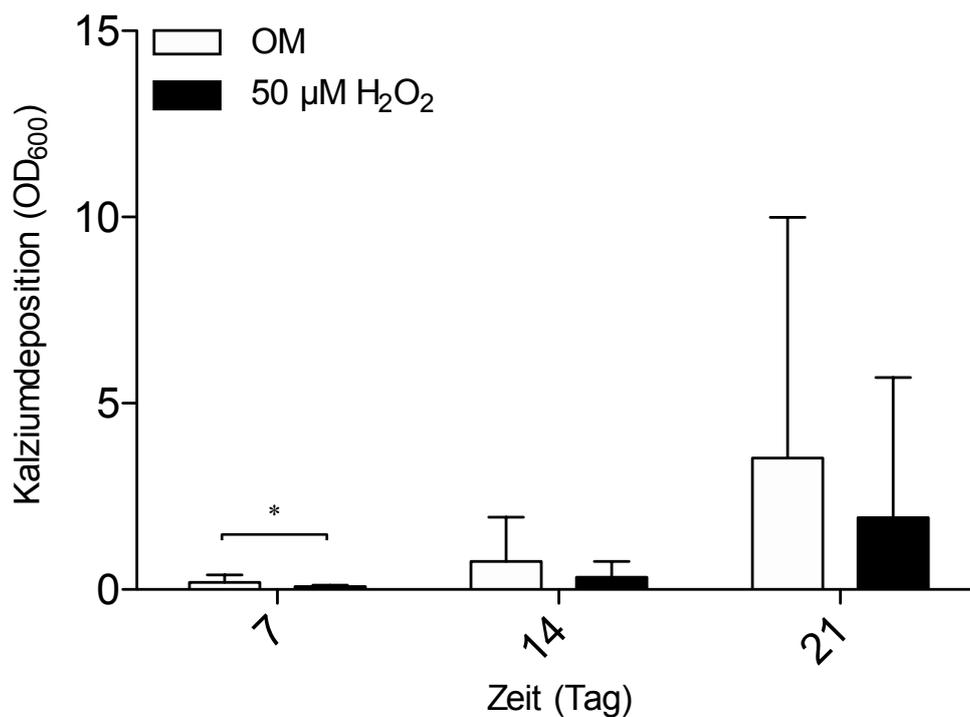
ASCs wurden für 21 Tage mit dem osteogenen Differenzierungsmedium behandelt. Die osteogene Differenzierung der ASCs wurden an den Tagen 0 (Kontrolle), 7, 14 und 21 analysiert. In *Abb. 8* sind mikroskopische Aufnahmen der ASCs im Verlauf der osteogenen Differenzierung visualisiert.



**Abb. 8** Osteogene Differenzierung von ASCs visualisiert mit Alizarinrot-S. Zu sehen sind ASCs im Verlauf osteogenen Differenzierung.

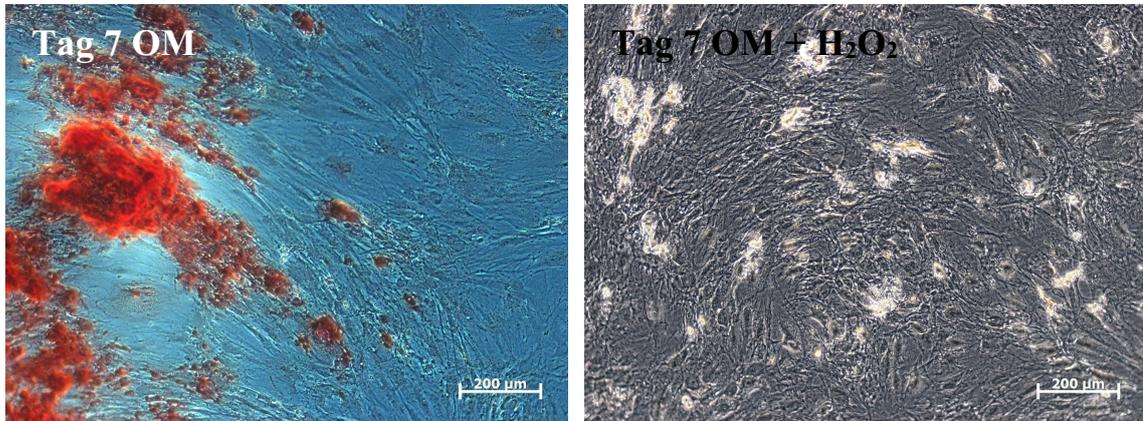
#### 4.1.1 Der Einfluss von ROS auf die osteogene Differenzierung von ASCs

Es wurde untersucht, welchen Einfluss  $H_2O_2$  als relativ langlebiges und stabiles ROS auf die osteogene Differenzierung der ASCs hat. Dafür wurden in diesem Versuch ASCs zusätzlich zum OM mit  $H_2O_2$  behandelt. Nach Behandlung mit  $H_2O_2$  zeigte sich an Tag 7 ein signifikanter Unterschied in der Kalziumdeposition in der OM-Gruppe und in der  $H_2O_2$ -Gruppe ( $0,0793 \pm 0,0377$  vs.  $0,1888 \pm 0,1974$ ;  $p = 0,027$ ). Zu den Zeitpunkten Tag 14 ( $0,7492 \pm 1,1952$  vs.  $0,3351 \pm 0,4163$ ;  $p = 0,277$ ) und 21 ( $3,530 \pm 6,640$  vs.  $1,935 \pm 3,761$ ;  $p = 0,115$ ) zeigte sich kein Unterschied (Abb. 9).



**Abb. 9 Osteogene Differenzierung von ASCs nach Behandlung mit  $H_2O_2$ .** ASCs wurden für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) mit Zusatz von  $H_2O_2$  kultiviert. Als Kontrolle wurden ASCs nur mit OM behandelt. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 wurden die Zellen analysiert. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar. Signifikanz bezogen auf OM des jeweiligen Messtages:  $*p \leq 0,05$  ( $n = 8$ ).

Abb. 10 zeigt lichtmikroskopischen Aufnahmen der ASCs nach Behandlung mit OM oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Im Vergleich ist bei den zusätzlich mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten ASCs eine verminderte Kalzifizierung zu erkennen.



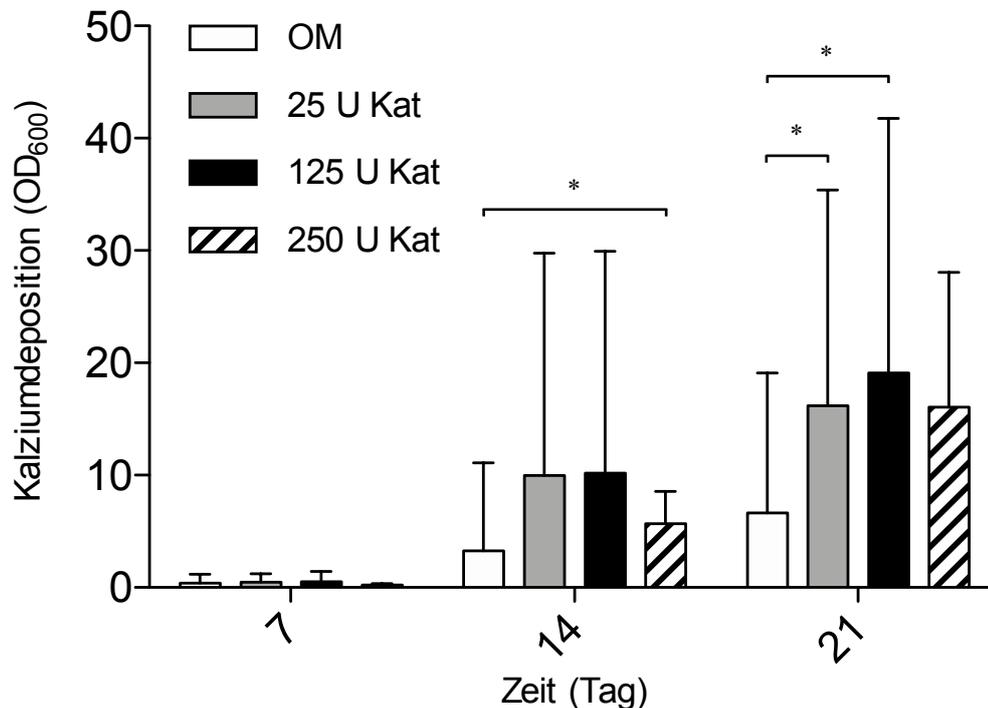
**Abb. 10 Lichtmikroskopische Aufnahme von kalzifizierter Matrix nach Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10-fache Vergrößerung.** Zu sehen sind mit Alizarin-Rot-S gefärbte ASCs an Tag 7 der osteogenen Differenzierung.

#### 4.1.2 Der Einfluss von Katalase auf die osteogene Differenzierung von ASCs

Im Folgenden wird die osteogene Differenzierung unter dem Einfluss von Katalase untersucht. Da antioxidative Enzyme wie Katalase in der Lage sind ROS abzubauen, wurde evaluiert, ob eine Behandlung mit Katalase die Osteogenese fördert. Die initial getestete Katalasekonzentration war 250 U/ml. Hierunter zeigte sich im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit OM an Tag 14 ein Unterschied ( $3,2689 \pm 7,8450$  vs.  $5,6575 \pm 2,8680$ ;  $p = 0,034$ ). Es zeigt sich kein Unterschied durch die Behandlung an den Tagen 7 ( $0,4163 \pm 0,7740$  vs.  $0,2075 \pm 0,1170$ ;  $p = 0,454$ ) bzw. 21 ( $6,6468 \pm 12,4460$  vs.  $16,0300 \pm 12,0031$ ;  $p = 0,076$ ) (Abb. 11).

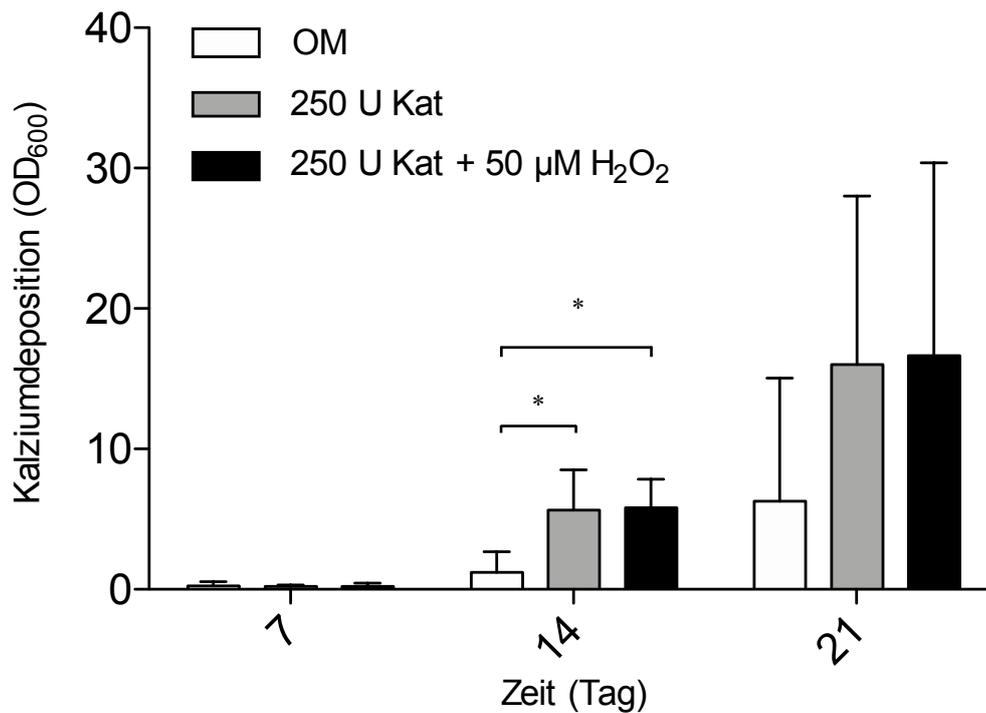
Um in einem zweiten Schritt die optimale Konzentration der Katalase zu evaluieren, wurde eine Titrationsreihe angesetzt. Entsprechend wurden die ASCs zusätzlich mit einer Konzentration von 25 und 125 U/ml Katalase behandelt. Durch Behandlung mit 25 bzw. 125 U/ml Katalase zeichnete sich an Tag 21 ebenfalls ein Unterschied zur alleinigen Behandlung mit OM ab ( $6,6468 \pm 12,4460$  vs.  $16,1900 \pm 19,2194$ ;  $p = 0,042$  bzw. vs.  $19,1200 \pm 22,6375$ ;  $p = 0,031$ ). An den Tagen 7 und 14 zeigte sich im Vergleich zur OM-Gruppe weder für 25 (Tag 7:  $0,4163 \pm 0,7740$  vs.  $0,4600 \pm 0,7711$ ;  $p = 0,958$ . Tag 14:  $3,2689 \pm 7,8450$  vs.  $9,9620 \pm 19,8222$ ;  $p = 0,112$ ) noch für 125 U/ml Katalase (Tag 7:

0,4163 ± 0,7740 vs. 0,5217 ± 0,9244; p = 0,875. Tag 14: 3,2689 ± 7,8450 vs. 10,2040 ± 19,7216; p = 0,112) ein Unterschied (Abb. 11).



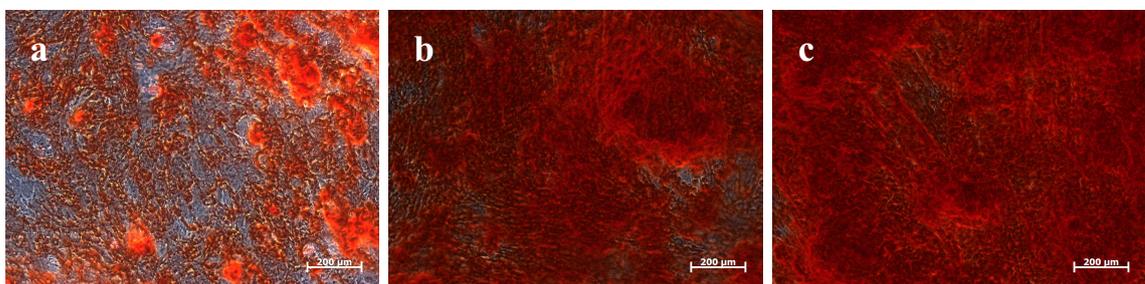
**Abb. 11 Ermittlung der optimalen Katalasekonzentration.** ASCs wurden für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und Katalase (Kat) kultiviert. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 wurden die Zellen analysiert. Die Balken stellen Mittelwerte ± SD dar. Signifikanz bezogen auf OM des jeweiligen Messtages: \*p ≤ 0,05 (n = 4 - 10).

Um den Wirkmechanismus der Katalase genauer zu untersuchen, wurden die ASCs zusätzlich zur Katalase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt (Abb. 12). Der Hypothese folgend, dass der pro-osteogene Effekt der Katalase Resultat des durch die Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstehenden Sauerstoffs ist, würde eine additive Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Osteogenese der ASC weiter steigern. Zum Zeitpunkt Tag 14 zeigt sich ein Unterschied zwischen den Gruppen OM und OM + 250 U/ml Katalase (1,2000 ± 1,4912 vs. 5,6575 ± 2,8680; p = 0,033) sowie zwischen den Gruppen OM und OM + 250 U/ml Katalase + 50µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5,8075 ± 2,0475; p = 0,011). Es zeigt sich hingegen kein Unterschied an Tag 7 zwischen den Gruppen OM und OM + 250 U/ml Katalase (0,2575 ± 0,2775 vs. 0,2075 ± 0,1170; p = 0,663) bzw. OM + 250 U/ml Katalase + 50µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2200 ± 0,2258; p = 0,733) und Tag 21 (6,2750 ± 8,7808 vs. 16,0300 ± 12,0031; p = 0,149) bzw. (16,6600 ± 13,7254; p = 0,149).



**Abb. 12 Kalzifizierte Matrix von ACSs nach Behandlung mit Katalase unter Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** ASCs wurden für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und Katalase (Kat) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kultiviert. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 wurden die Zellen analysiert. Die Balken stellen Mittelwerte ± SD dar. Signifikanz bezogen auf OM des jeweiligen Messtages: \*p ≤ 0,05 (n = 4).

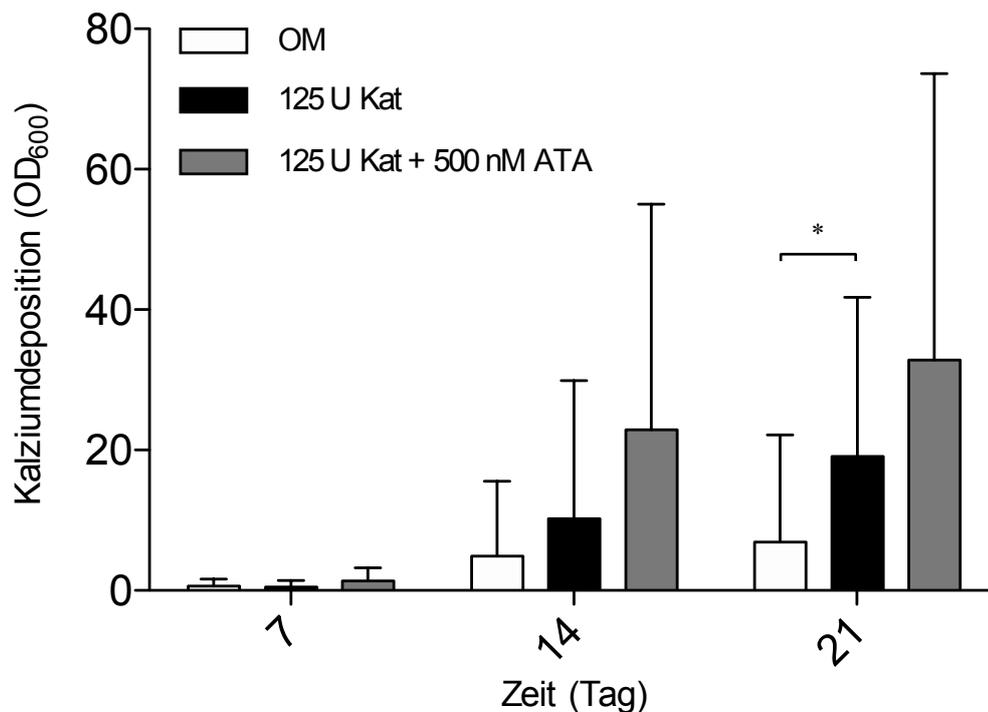
In *Abb. 13* ist vergleichbar zum oben gezeigten Ergebnis kein Unterschied zwischen den Katalasebehandlungen an Tag 14 zu erkennen.



**Abb. 13 Lichtmikroskopische Aufnahme von kalzifizierter Matrix nach Behandlung mit Katalase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10-fache Vergrößerung.** Zu sehen sind mit Alizarin-Rot-S gefärbte ASCs an Tag 14 der osteogenen Differenzierung. a.) ASCs, die mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelt wurden, b.) ASCs, die zusätzlich mit 250 U/ml Katalase behandelt wurden, c.) ASCs, die zusätzlich mit Katalase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden.

Um den Wirkungsmechanismus der Katalase weiter zu analysieren, sollte die Aktivität der Katalase im folgenden Versuch mit Hilfe eines Katalase-Inhibitors, 3-Amino-1,2,4-Triazol (ATA) inhibiert werden. *Abb. 14* zeigt, dass sowohl Katalase als auch das inaktivierte Enzym einen gleichsam positiven Effekt auf die osteogene Differenzierung hatten. Somit führte ATA entweder zu einer unvollständigen Inaktivierung der Katalase, oder die enzymatische Reaktion der Katalase ist nicht der Grund für verstärkte osteogene Differenzierung.

An Tag 21 zeigte ich ein Unterschied zwischen den Gruppen OM und OM + 125 U/ml Katalase ( $8,0122 \pm 16,7661$  vs.  $18,5114 \pm 25,2549$ ;  $p = 0,037$ ). Keinen Unterschied hingegen gibt es zwischen den Gruppen OM und OM +125 U/ml Katalase an den Tagen 7 ( $0,6005 \pm 1,0974$  vs.  $0,5634 \pm 1,0245$ ;  $p = 0,631$ ) und 14 ( $4,9324 \pm 10,6642$  vs.  $10,2052 \pm 19,7209$ ;  $p = 0,076$ ). Zwischen OM und mit Katalase und ATA behandelten ASCs zeigt sich an den Tagen 7 ( $0,6005 \pm 1,0974$  vs.  $1,2885 \pm 1,8222$ ;  $p = 0,317$ ), 14 ( $4,9324 \pm 10,6642$  vs.  $22,9018 \pm 32,1002$ ;  $p = 0,121$ ) und 21 ( $8,0122 \pm 16,7661$  vs.  $32,8650 \pm 40,7788$ ;  $p = 0,096$ ) kein Unterschied.

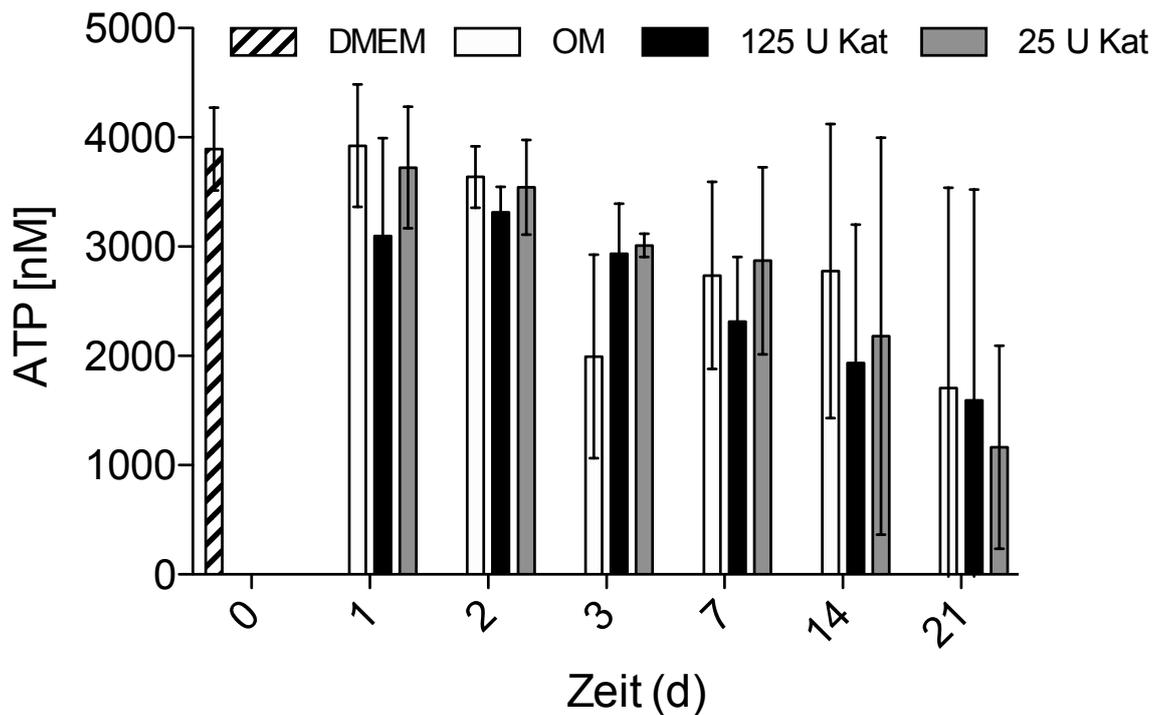


**Abb. 14 Osteogene Differenzierung von ASCs mit Katalase und ATA.** ASCs wurden für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium (OM), Katalase (Kat) und einem Zusatz von 3-Amino-1,2,4-Triazol (ATA) differenziert. An den Tagen 7, 14 und 21 wurden die Zellen analysiert. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar. Signifikanz bezogen auf OM des jeweiligen Messtages: \* $p \leq 0,05$  ( $n = 2 - 6$ ).

## 4.2 Der Einfluss von Katalase auf die intrazelluläre ATP-Konzentration im Verlauf der osteogenen Differenzierung

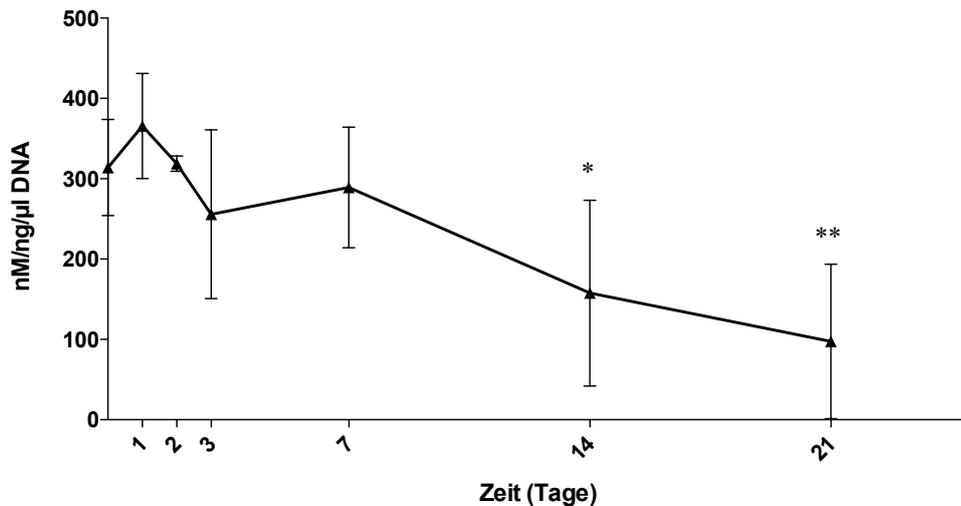
Um die intrazelluläre ATP-Konzentration zu analysieren, wurden die Zellen mit OM und den jeweiligen Zusätzen über insgesamt 21 Tage inkubiert und an definierten Tagen ein ATP-Assay durchgeführt.

In *Abb. 15* ist die intrazelluläre ATP-Konzentration an den jeweils gemessenen Tagen abgebildet. Zu erkennen ist, dass die ATP-Konzentration mit fortschreitender osteogener Differenzierung tendenziell sinkt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb der jeweiligen Messtage gibt es nicht.



**Abb. 15 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes an den Tagen 0, 1, 2, 3, 7, 14 und 21.** ASCs wurden nur mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) oder OM mit 25 und 125 U/ml Katalase (Kat) über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert. DMEM: Proliferationsmedium. Die Balken stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar (n = 3).

Anschließend wurde die intrazellulären ATP auf den DNA-Gehalt der Zellen normiert. *Abb. 16* zeigt die mittlere intrazelluläre ATP-Konzentration in ASCs welche mit OM behandelt wurden.

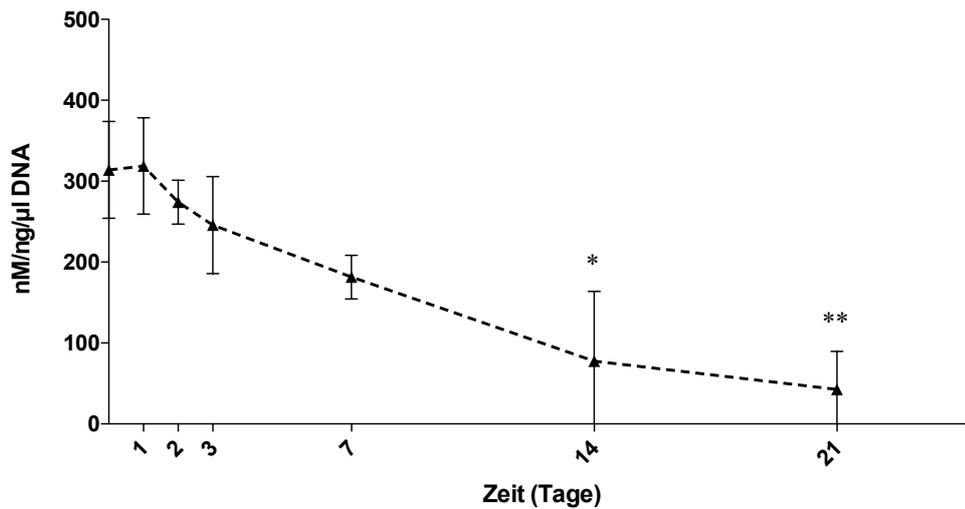


**Abb. 16 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Behandlung mit osteogenem Differenzierungsmedium.** ASCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert. Die Messwerte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar. Signifikanz bezogen auf Tag 0: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  ( $n = 3$ ).

Vergleicht man den Verlauf der intrazellulären ATP-Konzentration innerhalb der OM-Gruppe, zeigt sich an den Tagen 1 – 7 kein Unterschied zum Ausgangswert. Ab Tag 14 zeigt sich im Vergleich zum Ausgangswert eine reduzierte Konzentration ( $314,04 \pm 59,97$  vs.  $157,70 \pm 115,59$ ;  $p = 0,041$ ). An Tag 21 zeigte sich ein noch größerer Unterschied ( $314,04 \pm 59,97$  vs.  $97,51 \pm 96,16$ ;  $p = 0,009$ ).

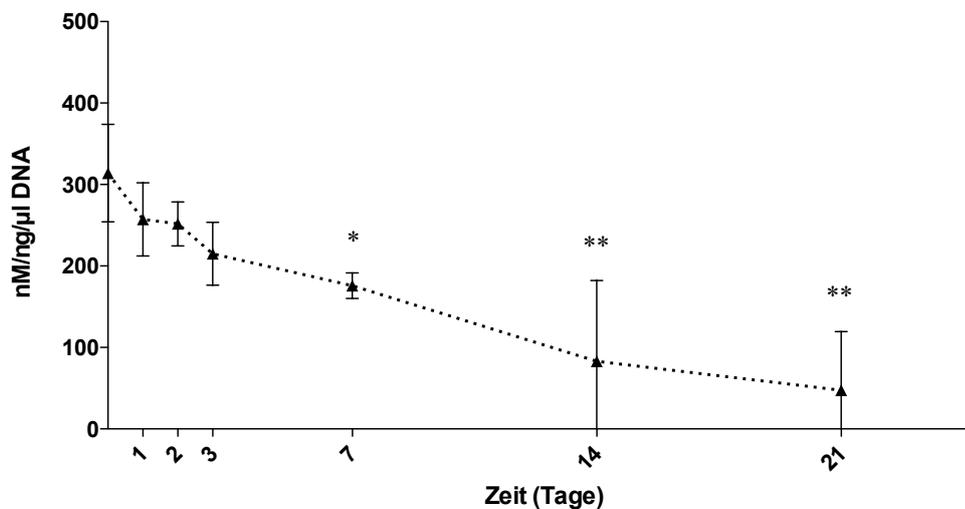
Vergleichbares zeigt sich in den ASCs, die zusätzlich zum OM mit Katalase behandelt wurden.

In der Gruppe mit 25 U/ml Katalase zeigt sich der Unterschied ab Tag 7 (314,04 ± 59,97 vs. 181,47 ± 27,03;  $p = 0,02$  bzw. Tag 14 mit 77,56 ± 86,17;  $p = 0,004$ ) (Abb. 17).



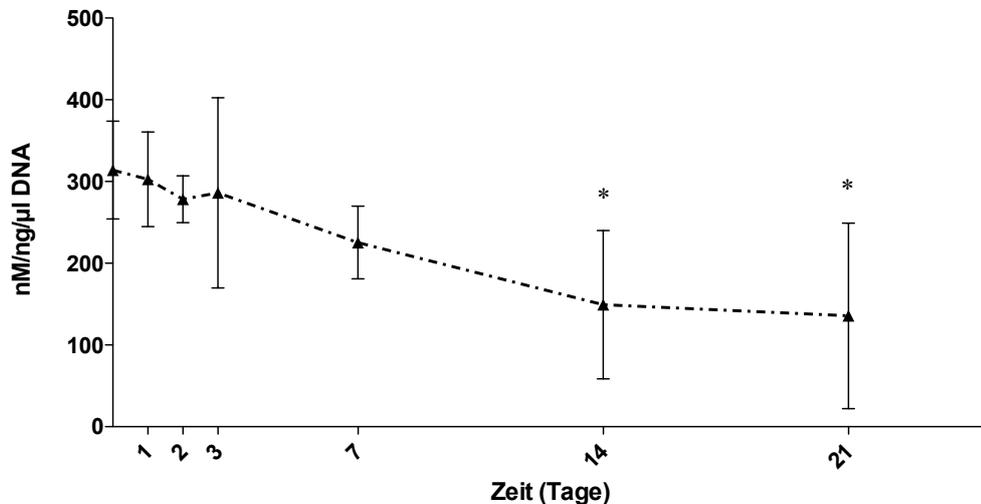
**Abb. 17 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Behandlung mit 25 U/ml Katalase.** ASCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und 25 U/ml Katalase über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert. Die Messwerte stellen Mittelwerte ± SD dar. Signifikanz bezogen auf Tag 0: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  ( $n = 3$ ).

In der Gruppe mit 125 U/ml Katalase kann eine geringere intrazelluläre ATP-Konzentration ebenfalls ab Tag 7 gezeigt werden (314,04 ± 59,97 vs. 175,97 ± 15,70;  $p = 0,033$ ) sowie an Tag 14 mit 82,92 ± 99,19 ( $p = 0,0$ ) und Tag 21 mit 47,51 ± 72,06 ( $p = 0,002$ ) im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 18).



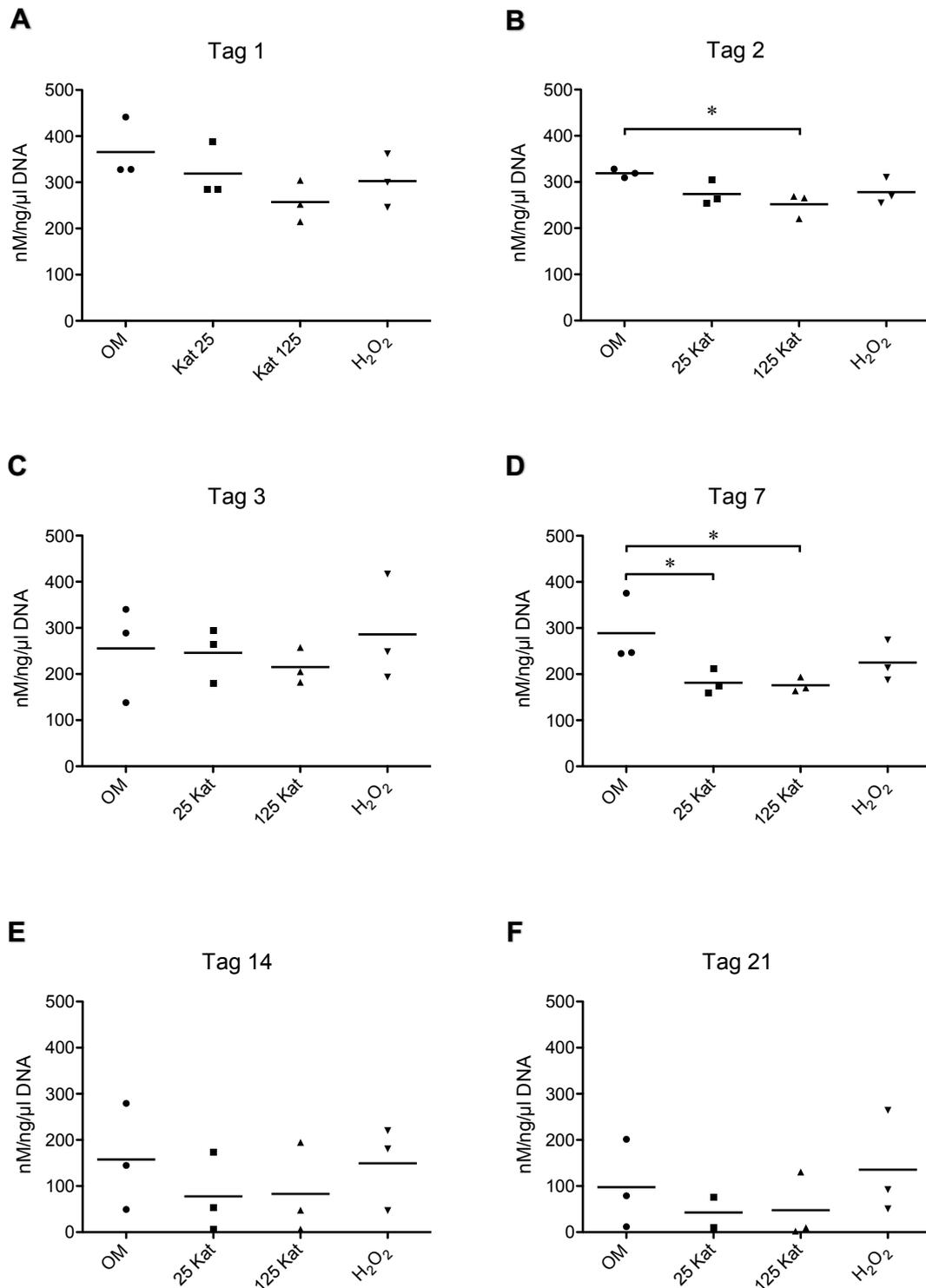
**Abb. 18 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Behandlung mit 125 U/ml Katalase.** ASCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und 125 U/ml Katalase über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert. Die Messwerte stellen Mittelwerte ± SD dar. Signifikanz bezogen auf Tag 0: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  ( $n = 3$ ).

In der Gruppe, welche zusätzlich zum OM mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurde, zeigte sich an den Tagen 1 – 7 kein Unterschied in der intrazellulären ATP-Konzentration durch die Behandlung (Abb. 19). Einen Unterschied kann an den Tagen 14 und 21 beobachtet werden (314,04 ± 59,97 vs. 149,25 ± 90,66 und 135,76 ± 113,47; p = 0,029).



**Abb. 19 Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** ASCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) und 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert. Die Messwerte stellen Mittelwerte ± SD dar. Signifikanz bezogen auf Tag 0: \*p ≤ 0,05 (n = 3).

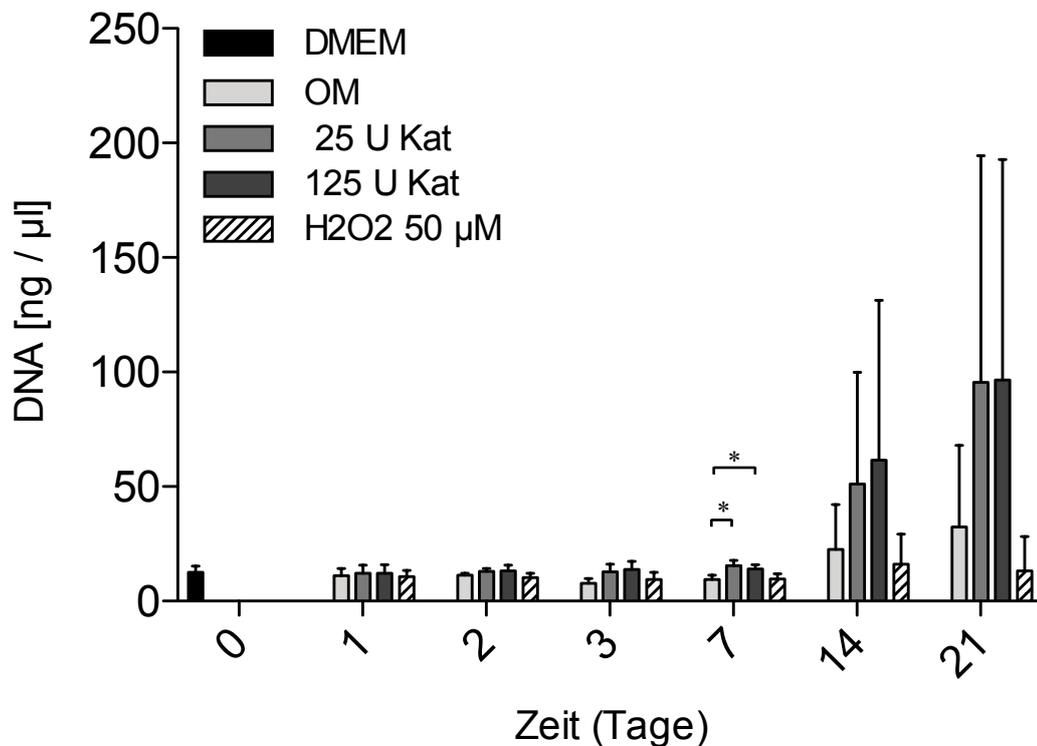
In Abb. 20 sind die ATP-Konzentrationen aller Gruppen untereinander im Vergleich an einem bestimmten Messtag zu sehen. Betrachtet man die OM-Gruppe an Tag 1 der Behandlung und vergleicht sie mit der 25 U/ml Katalase-Gruppe zeigt sich kein Unterschied in Hinblick auf die intrazelluläre ATP-Konzentration (A). Gleiches zeichnet sich in den Gruppen mit 125 U/ml Katalase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ab. An Tag 2 gibt es einen Unterschied der ATP-Konzentration zwischen der OM-Gruppe mit 318,86 (± 9,54) nM/ng/µl DNA und der 125 U/ml Katalase-Gruppe mit 251,68 (± 27,09) nM/ng/µl DNA (p = 0,015) (B). In der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe gab es keinen Unterschied. Ab Tag 3 konnte durch die Behandlung mit Ausnahme eines Trends an Tag 7 (289,13 ± 75,06 vs. 192,57 ± 26,89 bzw. 175,97 ± 15,70; p = 0,05) (D) in beiden Katalase-Gruppen kein Unterschied in der intrazellulären ATP-Konzentration zwischen den Gruppen und den Messtagen festgestellt werden.



**Abb. 20 Vergleich der ATP-Konzentrationen aller Behandlungen untereinander zu einem bestimmten Messtag.** ASCs wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM), zusätzlich mit 25 bzw. 125 U/ml Katalase (Kat) sowie zusätzlich mit 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert (A – F). Die Messwerte stellen Mittelwerte dar. Signifikanz bezogen auf OM des jeweiligen Messtages: \* $p \leq 0,05$  (n = 3).

### 4.3 Der Einfluss von Katalase und ROS auf die Proliferation

Um zu untersuchen, ob eine verbesserte osteogene Differenzierung durch die additive Behandlung mit der Katalase auf eine erhöhte Zellzahl zurückzuführen war, wurde vergleichend der DNA-Gehalt zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.



**Abb. 21 DNA-Gehalt während der osteogenen Differenzierung.** Die Abbildung zeigt den DNA-Gehalt der ASCs über einen Zeitraum von 21 Tagen. DMEM: Proliferationsmedium; OM: osteogenes Differenzierungsmedium; Kat: Katalase. Die Messwerte stellen Mittelwerte dar. Signifikanz bezogen auf OM des jeweiligen Messtages: \* $p \leq 0,05$  ( $n = 3$ ).

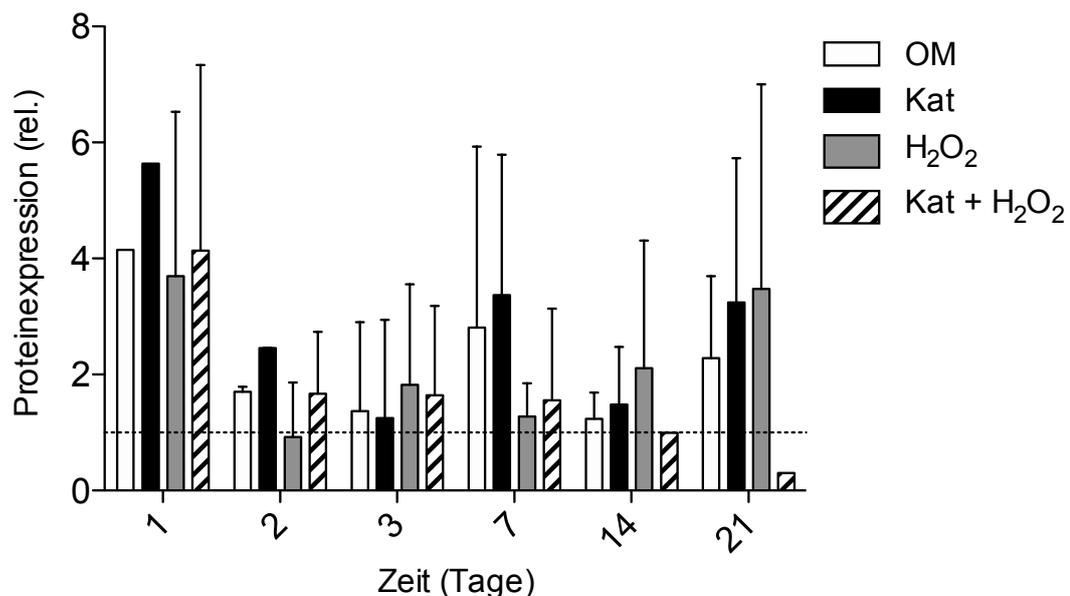
Wie in *Abb. 21* veranschaulicht, zeigen die ASCs unter einer Behandlung mit 25 U/ml Katalase bzw. 125 U/ml Katalase an Tag 7 im Vergleich mit OM einen höheren DNA-Gehalt auf ( $9,457 \pm 1,865$  vs.  $15,613 \pm 2,245$ ;  $p = 0,022$  bzw. vs.  $13,983 \pm 2,057$ ;  $p = 0,048$ ). Zwischen OM und der Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Tag 7 sowie an den anderen Beobachtungszeitpunkten kann kein verallgemeinerbarer Unterschied zwischen den Behandlungen identifiziert werden.

#### 4.4 Bestimmung der purinergen Rezeptorexpression im Verlauf der osteogenen Differenzierung

Im nächsten Schritt wurde die P2X2-/5-/7- und P2Y2-Rezeptors-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung untersucht. Die Erkenntnisse sollen Rückschlüsse zulassen, ob sich die Expression der Rezeptoren im Verlauf verändert und ob sich eine verbesserte osteogene Differenzierung durch die Behandlung mit der Katalase, in einer entsprechend modifizierten Rezeptorexpression widerspiegelt.

Dazu wurden ASCs mit OM, Katalase, einer Kombination aus Katalase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein über einen Zeitraum von 21 Tagen inkubiert und die Proteinexpression der oben genannten purinergen Rezeptoren an definierten Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung bestimmt. Da die Ergebnisse der ATP-Analyse (Kap. 4.2) bereits in der frühen Phase der osteogenen Differenzierung Unterschiede zwischen den Behandlungen zeigen (Tag 2), wurden hier ebenfalls die Tage 1 – 3 in die Messungen eingeschlossen.

In Abb. 22 ist das Verhältnis der P2X7-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung dargestellt. Die unbehandelte Kontrolle (Tag 0) wurde auf 1 normiert und durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

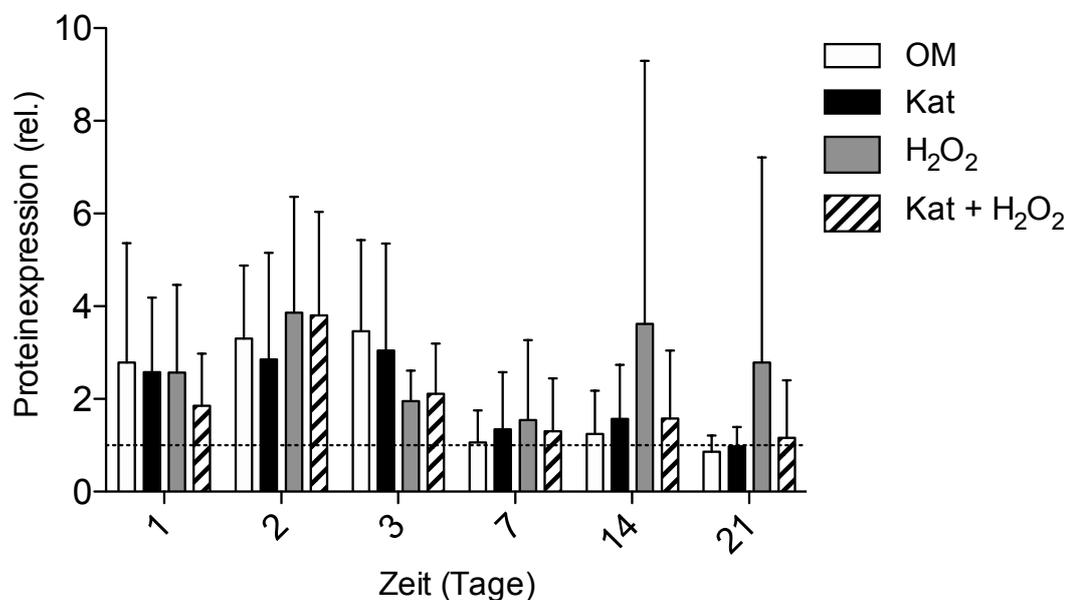


**Abb. 22 P2X7-Expression.** Die Abbildung zeigt die Protein-Expression von P2X7 über 21 Tage. OM: osteogenes Differenzierungsmedium; Kat: Katalase. Die Messwerte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar (n = 3 – 6).

Insgesamt zeigt sich die Tendenz zu einer erhöhten Expression des P2X7 Rezeptors während der osteogenen Differenzierung. Ein verallgemeinerbarer Unterschied zwischen der OM-Gruppe und den verschiedenen Zusätzen an den dargestellten Messtagen kann nicht gezeigt werden. Rein deskriptiv findet sich eine tendenziell erhöhte Expression der in der mit Katalase behandelten ACSs über den gesamten Beobachtungszeitraum von 21 Tagen. Auch die Rezeptorexpression in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gruppe unterscheidet sich von der OM-Gruppe.

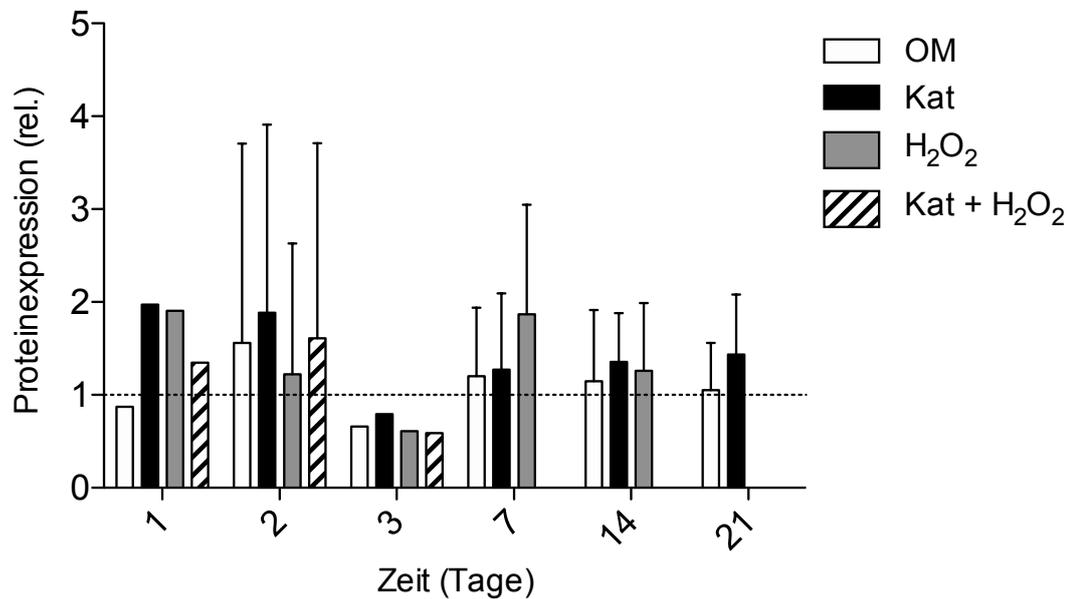
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass ASCs während der osteogenen Differenzierung unter OM vermehrt P2X7 exprimieren. Katalase führt tendenziell zu einer verstärkten Expression von P2X7.

In *Abb. 23* ist die Proteinexpression von P2X5 im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung dargestellt. Die Ergebnisse für P2X5 zeigen vor allem in den ersten drei Tagen eine insgesamt vermehrte Proteinexpression unter OM während der osteogenen Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten ASCs. Katalase hat im Vergleich mit OM keinen zusätzlichen Einfluss auf die Expression. Diese beobachteten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen am jeweiligen Messtag sind jedoch statistisch nicht verallgemeinerbar.



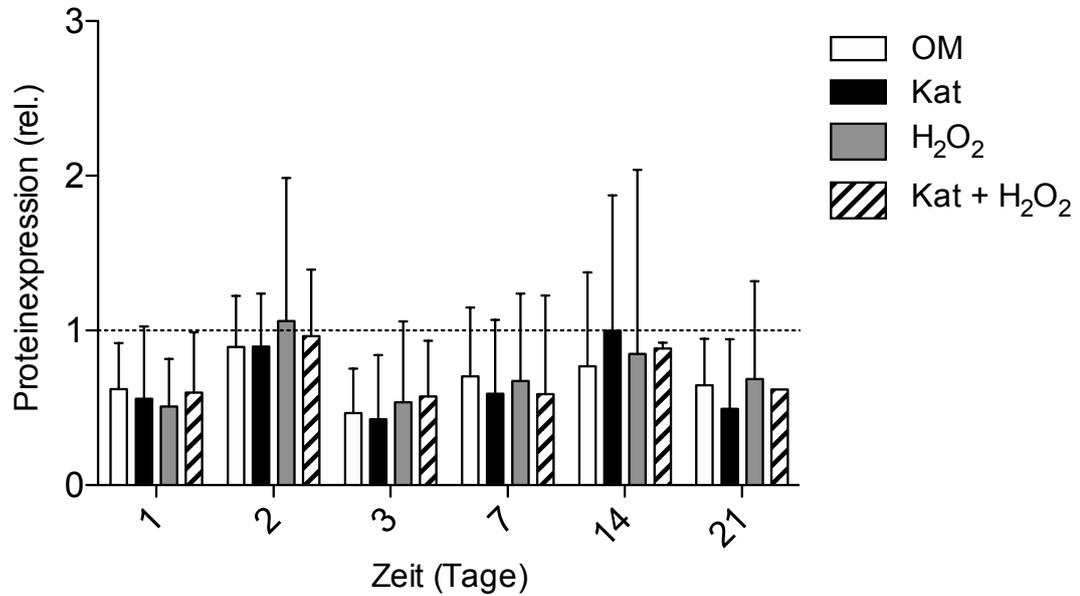
**Abb. 23 P2X5-Expression.** Die Abbildung zeigt die Protein-Expression von P2X5 über 21 Tage. OM: osteogenes Differenzierungsmedium; Kat: Katalase. Die Messwerte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar (n = 8 – 14).

In *Abb. 24* ist die Proteinexpression von P2X2 im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung dargestellt. Die P2X2-Expression steigt zum Beginn der Behandlung mit OM (Tag 1 und Tag 2) gering an, wird aber im Verlauf der osteogenen Differenzierung kaum modifiziert. Auch die Katalasebehandlung hat auf die Expression keinen wesentlichen Einfluss. Die beobachteten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen am jeweiligen Messtag sind ebenfalls statistisch nicht verallgemeinerbar.



**Abb. 24 P2X2-Expression.** Die Abbildung zeigt die Protein-Expression von P2X2 über 21 Tage. OM: osteogenes Differenzierungsmedium; Kat: Katalase. Die Messwerte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar (n = 2 – 9).

In *Abb. 25* ist die P2Y2-Proteinexpression im zeitlichen Verlauf der osteogenen Differenzierung dargestellt. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen am jeweiligen Messtag.



**Abb. 25 P2Y2-Expression.** Die Abbildung zeigt die Protein-Expression von P2Y2 über 21 Tage. OM: osteogenes Differenzierungsmedium; Kat: Katalase. Die Messwerte stellen Mittelwerte  $\pm$  SD dar. (n = 8 – 15).

## **5 Diskussion**

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die osteogene in-vitro Differenzierung von ASCs kann durch eine Behandlung mit Katalase verstärkt werden. Dies wird durch eine verstärkte Produktion kalzifizierter extrazellulärer Matrix deutlich.
2. Die osteogene in-vitro Differenzierung von ASCs kann durch eine additive Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibiert werden. Es wird nur geringe Mengen extrazelluläre Matrix produziert.
3. Während der Osteogenese kommt es zu einer Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration.
4. Es lassen sich Tendenzen in der Expression von purinergen Rezeptoren während der osteogenen Differenzierung erkennen. Klare Aussagen sind jedoch nicht möglich.

### **5.1 Vergleich der osteogenen Differenzierung von ASCs unter Einfluss von Katalase und ROS durch Bestimmung der Matrixkalzifizierung**

ASCs können dank ihres multipotenten Differenzierungspotentials in eine Vielzahl von Zellen differenzieren [33]. Auch durch die Fähigkeit osteogen zu differenzieren sind sie besonders interessant für das *Bone Tissue Engineering* und sind seit einiger Zeit vermehrt in den Fokus der regenerativen Medizin gerückt. Ihr *in vitro* Differenzierungsvermögen ist jedoch abhängig von unterschiedlichen Faktoren, unter anderem das Alter des Spenders und die Anzahl der Zellkultur-Passagen. Es wurde beobachtet, dass sich eine hohe Anzahl der Passagen, also die replikative Seneszenz der Zellen *in vitro* negativ auf das Differenzierungspotential auswirkt und so die Zellen ihre Fähigkeit zur Osteogenese inhibiert wird [77]. Man konnte zeigen, dass MSCs, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, weniger stark osteogen differenzieren [78], wohingegen eine geringe ROS-Konzentration sogar vorteilhaft für die Osteogenese ist [59]. Um zu zeigen, dass höhere ROS-Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf die osteogene Differenzierung von ASCs haben, wurden ASCs in dieser Arbeit mit einem Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt

und der Verlauf der osteogenen Differenzierung über insgesamt 21 Tage analysiert. Passend zu den davor genannten Beobachtungen, konnte somit gezeigt werden, dass eine Applikation erhöhter Konzentrationen von ROS zu einer verringerten Kalziumdeposition in die extrazelluläre Matrix, als Zeichen einer reduzierten osteogenen Differenzierung, führte. Die mikroskopischen Aufnahmen untermauern dieses Ergebnis (*Abb. 10*).

Daher könnten antioxidative Substanzen über eine Reduktion von ROS einen positiven Einfluss auf die Osteogenese haben. Eine Erkenntnis, die diese Annahme unterstützt ist, dass antioxidative Enzyme wie MnSOD und Katalase im Laufe der Osteogenese eine verstärkte Expression zeigen, vermutlich als Gegenregulation zu ansteigenden ROS [61]. Umgekehrt konnte nachgewiesen werden, dass eine durch Zigarettenrauch verursachte, reduzierte Katalase-Expression zu einer reduzierten osteogenen Differenzierung von MSCs führte [79]. Bisherige Studien beschäftigten sich daher eher mit intrinsischen Abläufen, etwa wie sich ROS und antioxidative Substanzen in der Differenzierung von MSCs zueinander verhalten.

Eine Behandlung der Zellen mit Katalase, die in der Lage ist, große Mengen an ROS umzusetzen, könnte daher eine Möglichkeit sein die Osteogenese von ASCs zu verbessern. Durch die hier vorliegenden Versuche konnte gezeigt werden, dass die osteogene Differenzierung ASCs durch eine Behandlung mit exogen zugeführter Katalase deutlich gesteigert wird. Allerdings gibt es gegenwärtig wenige Forschungsarbeiten, die sich mit der exogenen Zufuhr von Katalase in der Zellkultur und ihre Auswirkung auf die osteogene Differenzierung von MSCs beschäftigen. Der pro-osteogene Effekt der Katalase, vor allem der einer von additiv zugegebenen Katalase, sollte auf mehreren Ebenen näher evaluiert werden.

### **5.1.1 Evaluation der optimalen Katalasekonzentration für die Osteogenese von ASCs**

Um herauszufinden, ob die additive Zugabe der Katalase dosisabhängig zu einer verstärkten osteogenen Differenzierung führt, wurden ASCs zunächst mit einer Titrationsreihe von 25 – 250 U/ml Katalase inkubiert und über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet. Die Ergebnisse zeigen bereits eine erheblich gesteigerte osteogene Differenzierung bei 25 U/ml Katalase. Allerdings zeigten die ASCs die beste osteogene Differenzierung bei einer Katalase-Konzentration von 25 – 125 U/ml und dieser Effekt konnte mit einer weiteren Erhöhung der Konzentration (250 U/ml Katalase) nicht weiter

gesteigert werden (*Abb. 11*). Da auch schon eine Katalase-Konzentration von 25 U/ml zu einer Verbesserung der Osteogenese führte, kann man innerhalb gewisser Grenzen von einer Dosisabhängigkeit ausgehen, die bei höheren Konzentrationen ein Sättigungsverhalten zeigt.

## **5.2 Inhibition der enzymatischen Katalasereaktion mit ATA**

Um weiter Klarheit über den Wirkmechanismus der Katalase zu gewinnen, wurde in einem nächsten Schritt genauer untersucht, ob die antioxidative Funktion, sprich die enzymatische Reaktion der Katalase,  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu reduzieren, für die verstärkte osteogene Differenzierung der ASCs verantwortlich ist. Oder ob letztendlich der in dieser Reaktion anfallende Sauerstoff für den Effekt verantwortlich ist. Katalase führt über eine Dismutase-Reaktion zur Umsetzung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und Sauerstoff [47]. So wäre es vorstellbar, dass die entstehenden Mengen an Sauerstoff aus dieser Reaktion den beobachteten Effekt der verstärkten osteogenen Differenzierung bewirken würde [80]. Folglich müsste mit steigender Katalasekonzentration mehr Sauerstoff entstehen, der dann die Osteogenese verbessert. Wie bereits gezeigt werden konnte, hat Sauerstoff eine positive Auswirkung auf Gewebe und wird vielversprechend zur Therapie von z. B. Knochendefekten angewendet [81]. Dieser Annahme folgend, wurde der Katalase zusätzlich  $\text{H}_2\text{O}_2$  hinzugesetzt. Die Ergebnisse in *Abb. 12* demonstrieren, dass eine Koinkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die osteogene Differenzierung der ASC nicht weiter steigern kann.

Daher galt es nun zu differenzieren, ob die Struktur der Katalase selbst für eine verbesserte Differenzierung verantwortlich ist. Dazu wurde die Auswirkung einer enzymatisch inaktiven Katalase auf die osteogene Differenzierung untersucht, indem ASCs zusätzlich zur Katalase mit dem Katalase-Inhibitor ATA behandelt wurden. ATA führt über eine irreversible Inhibition zu Aufhebung der enzymatischen Funktion der Katalase [82]. Dies wurde in der beschriebenen Studie ebenfalls an ASCs gezeigt, allerdings wurden wesentlich höhere Konzentrationen ATA verwendet (bis 10 nM). Eine zusätzliche Behandlung mit ATA zeigte keine Reduktion der kalzifizierten Matrix und damit der osteogenen Differenzierung (*Abb. 14*). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass ATA die Katalase nur unvollständig inhibierte (aufgrund der niedrigen Konzentration von ATA) und die restlichen aktiven Anteile der Katalase ausreichend waren, um den

Effekt zu zeigen. Auch wurden keine höheren Konzentrationen von ATA ausprobiert und analysiert, ob steigende Konzentrationen die Katalase inhibieren können. Zu vermuten ist so, dass die Konzentration ATA nicht ausreichte, um die Katalase zu inhibieren.

### **5.3 Die intrazelluläre ATP-Konzentration im Verlauf der osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss von Katalase**

In der hier vorliegenden Arbeit sollte ein Bestandteil des Energiemetabolismus der ASCs während der osteogenen Differenzierung untersucht werden. Dafür wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass es während der osteogenen Differenzierung zu einer Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration in ASCs kommt. Eine Behandlung mit Katalase führte zu weiter einer verstärkten Reduktion des intrazellulären ATP-Konzentration.

ROS können in erhöhten Konzentrationen zu einer Schädigung der Zellen führen [37, 83]. Sie zerstören unter anderem DNA, Proteine und Zellmembranen. Unter physiologischen Umständen schützen antioxidative Enzyme wie Katalase die Zelle vor ROS. Des Weiteren weiß man, dass erhöhte ROS-Konzentrationen ebenfalls zu einer reduzierten ATP-Synthese führen können, da sie die ATP-Synthase in der Atmungskette hemmen [84]. Aus Beobachtungen von MSCs während der osteogenen Differenzierung weiß man, dass eine erhöhte ROS-Konzentration zu einer Inhibition der Osteogenese führt und die Adipogenese im Gegensatz dazu gefördert wird [59]. Da Katalase eines der effizientesten Enzyme in Bezug auf den Abbau hoher Mengen ROS ( $10^{-7}$  M/s) ist [85], wäre es auch vorstellbar, dass es dadurch auch zu einer vermehrten ATP-Produktion in den Zellen während der Osteogenese kommt und die ASCs so mehr Energie in Form von ATP zur Verfügung haben um verstärkt osteogen zu differenzieren.

Um dies genauer zu untersuchen wurde die intrazelluläre ATP-Konzentration der ASCs während der osteogenen Differenzierung quantifiziert. In dieser Arbeit wurde nicht unterschieden, ob der gemessene ATP-Gehalt der Glykolyse oder der oxidativen Phosphorylierung als energieliefernder Prozess zuzuschreiben war. Es wurde lediglich der Gesamtgehalt des intrazellulären ATP bestimmt. Denn im Verlauf der Differenzierung von MSCs verändert sich auch der Energiestoffwechsel. Die Glykolyse bleibt zwar erhalten, jedoch wird ATP vermehrt auch aus oxidativer Phosphorylierung gewonnen [86]. Da die oxidative Phosphorylierung der weitaus effektivere Weg ist

Energie zu produzieren lässt sich vermuten, dass dadurch die ASCs so dem erhöhten Energiebedarf gerecht werden können, der für die Differenzierung benötigt wird. Diese Annahme wird unterstützt von den Beobachtungen von Chen et al., die gezeigt haben, dass der intrazelluläre ATP-Gehalt von hBMSCs während der osteogenen Differenzierung ansteigt [61]. Sie haben den Anstieg des aeroben Energiemetabolismus mit einem erhöhten mitochondrialen DNA-Gehalt (mtDNA), einer erhöhten Expression respiratorischer Enzyme und einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs in Verbindung gebracht. Gleichzeitig demonstrierten sie einen Abfall der ROS-Konzentration bei verstärkter Expression anti-oxidativer Enzyme wie der Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) und der Katalase. Es wird diskutiert, dass MnSOD und Katalase vermutlich als Reaktion auf die anfangs ansteigenden ROS hochreguliert, um die Zelle vor einer Schädigung zu schützen [61].

Die Beobachtungen dieser Arbeit decken sich zumindest zum Teil mit denen von Chen et al. Auch hier konnte ein initialer ATP-Abfall gezeigt werden (*Abb. 16*). Allerdings sank das ATP im Verlauf weiter und erreichte an Tag 21 der osteogenen Differenzierung den niedrigsten Wert, mit einem Drittel der Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert der undifferenzierten Kontrolle. Nach Behandlung der Zellen mit Katalase, welche zu einer verstärkten Osteogenese führte, lag die ATP-Konzentration noch unterhalb der nur mit osteogenem Differenzierungsmedium behandelten Zellen. Somit führte die Behandlung mit OM zu einer reduzierten ATP-Konzentration. Die Katalase-Behandlung führte zu einer noch stärker reduzierten ATP-Konzentration.

In mehreren Arbeiten konnte jedoch ein Anstieg der ATP-Konzentration während der Osteogenese von MSCs gezeigt werden [61, 86]. Eine Erklärung für den ATP-Abfall bei gleichzeitig verstärkter Osteogenese könnte sein, dass die von uns gemessene ATP-Konzentration den ATP-Verbrauch der ASCs widerspiegelt. Würden die Zellen aufgrund des hohen Energieaufwandes vermehrt ATP verbrauchen, um z. B. kalzifizierte Matrix zu produzieren, erscheint ein erhöhter ATP-Verbrauch durchaus sinnvoll. In der Folge würde weniger ATP messbar sein. Dies setzt aber voraus, dass das ATP umgehend verstoffwechselt bzw. direkt aus der Zelle ausgeschleust würde, um beispielsweise als Phosphatspender zum Aufbau kalzifizierter Matrix genutzt zu werden [87]. Dies könnte auch ein Erklärungsansatz für den ATP-Abfall durch Katalase sein. Da Katalase die Reaktion von  $H_2O_2$  zu Wasser und Sauerstoff katalysiert und Sauerstoff in der Atmungskette für die Produktion von ATP benötigt wird, könnte eine exogene Zufuhr

der Katalase über eine Erhöhung von Sauerstoff zu einer erhöhten ATP-Synthese führen. Hierfür spricht, dass, wie in *Abb. 12* zu sehen, ASCs unter einer Behandlung mit einer Kombination aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Katalase ebenfalls eine Verstärkung der Osteogenese zeigen im Vergleich zu Zellen, die nur mit Katalase behandelt wurden.

Katalase und die aerobe ATP-Produktion befinden sich in unterschiedlichen Zellkompartimenten [83], dadurch wäre ein direkter Einfluss der Katalase auf Prozesse in der Atmungskette (ATP-Synthase) weniger wahrscheinlich als ein Einfluss der Katalase auf ATP, welches sich im Zytosol oder Interstitium befindet.

#### **5.4 Analyse der purinergen Rezeptor-Expression in der osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss von Katalase**

Um Zusammenhänge und eine potenzielle Wirkung von Katalase und osteogener Differenzierung auf Rezeptorebene weiter aufzuschlüsseln, wurde die Proteinexpression purinerner Rezeptoren untersucht. Dazu wurden ASCs wie zuvor beschrieben mit OM inkubiert und so osteogen differenziert.

Insgesamt erfolgte die osteogene Differenzierung und die jeweilige Behandlung über 21 Tage. An definierten Messtagen wurde dann die Expression der purinergen Rezeptoren bestimmt. P<sub>2</sub>-Rezeptoren sind ubiquitär auf Plasmamembranen vorkommende Rezeptoren, die in vielen Zellen an verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt sind [88]. Ihre Funktion wird zum einen durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen der Konzentration und Kombination verschiedener Subtypen und zum anderen durch die Anwesenheit und Modifikation von Zellmetaboliten beeinflusst. So kommen sie beispielsweise auch in Osteoblasten und Osteoklasten vor, wo sie in grundlegend gegensätzlichen Funktionen am Knochenstoffwechsel beteiligt sind [89]. Bisher ist trotz intensiver Forschung nicht abschließend geklärt, welche purinergen Rezeptoren genau an diesen und weiteren Prozessen beteiligt sind und wie sich die Aktivierung im Zusammenspiel auf das Verhalten von MSCs auswirkt. Wenngleich diese Signalwege für die osteogene Differenzierung wichtig zu sein scheinen, gibt es bezüglich der Bedeutung einzelner Rezeptoren aktuell zahlreiche Kontroversen [90]. Die Hypothese dieser Arbeit

war, dass eine gesteigerte osteogene Differenzierung mit einer veränderten Proteinexpression der untersuchten P2-Rezeptoren einhergeht und diese durch die zusätzliche Behandlung mit Katalase und ROS reguliert werden. Über diesen Mechanismus könnte man vielleicht den im ersten Teil der Arbeit gezeigten proosteogenen Effekt der Katalase auf die ASCs mechanistisch erklären.

#### **5.4.1 Analyse der Proteinexpression von purinergen Rezeptoren unter den verschiedenen Behandlungen**

Die osteogene Differenzierung beeinflusste tendenziell die Proteinexpression von P2X5, P2X7 und P2Y2, jedoch nicht die von P2X2. Betrachtet man die Ergebnisse von P2X7 fällt auf, dass eine Behandlung mit OM zu einer insgesamt gesteigerten Expression führte (*Abb. 22*). Interessant sind diese Ergebnisse in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Kalziumdeposition. Diese zeigte eine kontinuierliche Steigerung mit Anzahl der Behandlungstage und das höchste Ausmaß schließlich an Tag 21. In diesem Zusammenhang erscheint es daher möglich, dass für die Mineralisation von extrazellulärer Matrix, während der osteogenen Differenzierung eine Expression von P2X7 notwendig ist, oder diese sogar darüber reguliert wird. So gibt es in der Literatur Evidenz, dass nach gezielter Blockade von P2X7 durch spezifische Antagonisten die Voraussetzung für eine Mineralisation der extrazellulären Matrix deutlich eingeschränkt bzw. vollständig aufgehoben ist [91]. In Untersuchungen an MSCs postmenopausaler Frauen führte im Umkehrschluss eine Aktivierung von P2X7 zu vermehrter osteogener Differenzierung und Matrixkalzifizierung [92]. Andere beschreiben in Kontrast dazu eine Reduktion der Expression von P2X7 unter Einfluss von einer prolongierten Exposition von ATP als aktivierender Ligand sowie eine Reduktion von, mit osteogener Differenzierung assoziierten, Transkriptionsfaktoren. [93]. Eine direkte Korrelation zwischen Kalziumdeposition an einem bestimmten Tag der osteogenen Differenzierung und zur relativen Expression von P2X7 zu diesem Zeitpunkt ist anhand der hier aufgeführten Ergebnisse nicht zu erkennen. Daher wurde versucht einen Zusammenhang mit der Konzentration des ATP herzustellen. Dem Verständnis folgend, dass ATP in einer auto-/parakrinen Weise wirkt, und dass je nach Konzentration und Applikationsdauer eine tendenziell fördernde oder inhibierende Wirkung auf die osteogene Differenzierung durch P2X7 hervorgerufen wird, könnten niedrige intrazelluläre Konzentrationen zu einer erhöhten extrazellulären Aktivierung von P2X7 und zu einer vermehrten Kalziumdeposition führen. Höhere Konzentrationen hingegen würden P2X7 inhibieren

und zu weniger kalzifizierter Matrix führen. Allerdings ist hier außeracht gelassen, dass Nukleotidasen maßgeblich an der Verstoffwechslung von ATP und folglich auch an der Aktivierung/Inhibierung von P2X7 beteiligt sind. Unter antioxidativen Bedingungen zeigte sich in dieser Arbeit an fast allen Tagen eine nur leichte und nicht statistisch verallgemeinerbar erhöhte Expression des Rezeptors. Dies könnte ein Hinweis auf einen Einfluss von Katalase auf den Rezeptor sein, welcher in folgenden Versuchsreihen genauer untersucht werden könnte.

P2X5 wurde unter OM besonders in den ersten Tagen der osteogenen Differenzierung vermehrt exprimiert (*Abb. 23*). Aber auch hier konnte Katalase keinen über diese Arbeit hinaus verallgemeinerbaren Unterschied in der Proteinexpression induzieren. Der Hinweis auf eine vermehrte Expression in den ersten 3 Tagen könnte aber auf eine Rolle dieses Rezeptors in der frühen Phase der Osteogenese hindeuten.

Deskriptiv zeigt P2Y2 im Gegensatz zu P2X5 und P2X7 eine verringerte Expression. Du et al. konnten zeigen, dass eine Inhibition des Rezeptors die osteogene Differenzierung von MSCs bei Mäusen vorantreiben konnte [94]. So scheint es auch hier schlüssig, dass der Rezeptor in der osteogenen Differenzierung herunterreguliert werden muss, um diese zu fördern. Bei menschlichen BMSCs wurde dieser, auf die Osteogenese inhibitorische Effekt ebenfalls gezeigt [95].

Obwohl P2X2 keine Rolle in der osteogenen Differenzierung von ASCs in Richtung Osteoblasten zu spielen scheint, konnte hier eine Proteinexpression in undifferenzierten und osteogen differenzierten ASCs nachgewiesen werden (*Abb. 24*) [70, 90].

## **5.5 Kritische Betrachtung der Ergebnisse**

Grundsätzlich ergeben sich bei der Verwendung von Kulturen aus primären Zelllinien sowohl Vor- als auch Nachteile. Durch etablierte Kultivierungsmethoden lassen sie sich in praktisch unerschöpflicher Menge für eine Vielzahl von Fragestellungen verwenden. Ein Versuchsaufbau kann geplant und durch viele Parameter kontrolliert werden. Die Omnipotenz primärer Zelllinien ermöglicht eine präzise Darstellung und Erforschung von Stoffwechselwegen des menschlichen Organismus. Dennoch kommen die Ergebnisse von Versuchen mit Zellkulturen an ihre Grenzen. Die Gegebenheiten des menschlichen Organismus sind zu komplex, als dass man sie vollständig im Experiment nachbilden kann. Dementsprechend liefern diese Ergebnisse ein Erklärungsmodell, eine direkte

Übertragung der Aussagen ist schwierig. Eine statistische Verallgemeinerung ist hier aufgrund einer geringen Stichprobengröße nicht möglich.

Um die Bedeutung der ATP-Reduktion für die Osteogenese detaillierter aufzuklären könnte man eine größere Stichprobe untersuchen. Zum anderen könnte man zur besseren Vergleichbarkeit die exakte Zellzahl bestimmen und auf diese normieren. Hier wurde auf die DNA-Menge normiert. Die Bestimmung der Zellzahl war in diesem Versuch nicht praktikabel, da durch das Ablösen mittels Abschabens der Zellen am Wellboden eine erhebliche Menge an Zellen zerstört wurde. Eine sichere Normierung des gemessenen ATP pro Zelle hätte zu falsch erhöhten Messwerten führen können. Letztendlich konnten somit größere Probenmengen verarbeitet werden.

Das Problem in der Verwendung der Qia-shredder Tubes bestand darin, dass unkontrollierte Mengen DNA verloren gingen und die Ergebnisse daher nicht verwendet werden konnten. Durch das Ausprobieren verschiedener Methoden konnte das hier beschriebene ATP-Assay als bestmögliche Methode etabliert werden.

Anschließende Versuche sollten den gemessenen intrazellulären ATP-Verlauf in Bezug zu extrazellulären ATP-Werten betrachten. Um die Stoffwechselaktivität während der osteogenen Differenzierung von ASCs genauer abzubilden, bedarf es zukünftig weiteren Untersuchungen. Betrachtet werden könnte an dieser Stelle etwa die Glykolyse oder Veränderungen in den Mitochondrien unter dem Einfluss der Katalase.

Es konnte keine klare Aussage über das Verhalten der beobachteten purinergen Rezeptoren getätigt werden. Durch einen komplexen Versuchsaufbau und die Verwendung von fehleranfälligen Western-Blot Analysen ist die Aussagekraft der Ergebnisse begrenzt.

## **5.6 Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Arbeit konnte zuverlässig gezeigt werden, dass eine Behandlung mit exogen zugeführter Katalase zu einer Steigerung der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix der ASCs *in vitro* führt.

Analog konnte demonstriert werden, dass eine Behandlung mit  $H_2O_2$  zu einer deutlich reduzierten Kalzifizierung der extrazellulären Matrix führt. Rückschlüsse auf einen

molekularen Mechanismus der Katalase können anhand der Versuche nicht zugelassen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre ATP-Konzentration im Verlauf der Osteogenese sinkt.

Deutliche molekulare Effekte einer Katalasebehandlung konnten auch hier nicht aufgezeigt werden. Hier bedarf es weiteren Untersuchungen auf molekularer Ebene anhand eines in-vitro Modells.

Diese Arbeit konnte keine eindeutigen Veränderungen der Rezeptorexpression der dargestellten purinergen Rezeptoren aufzeigen.

Bis die Erkenntnisse auf ein in-vivo Modell übertragen werden können, sind zunächst weitere grundlegende Untersuchungen an in-vitro Modell notwendig, insbesondere um molekulare Mechanismen aufzuschlüsseln.

Generell zeichnen sich bereits jetzt eher lokale als systemische klinische Anwendungsmöglichkeiten im Bereich des *Bone Tissue Engineerings* ab. Diese könnten vor allem intraoperative lokale Applikationen von Antioxidantien auf Knochengewebe bzw. Knochenersatzmaterialien umfassen.

## **6 Literatur- und Quellenverzeichnis**

1. Capulli, M., R. Paone, and N. Rucci, *Osteoblast and osteocyte: games without frontiers*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 3-12.
2. Roeder, E., B.G. Matthews, and I. Kalajzic, *Visual reporters for study of the osteoblast lineage*. Bone, 2016. **92**: p. 189-195.
3. Katsimbri, P., *The biology of normal bone remodelling*. Eur J Cancer Care (Engl), 2017. **26**(6).
4. Cappariello, A., et al., *The Great Beauty of the osteoclast*. Arch Biochem Biophys, 2014. **558**: p. 70-8.
5. Tortora, G.J. and B. Derrickson, *Figure 6.3 Histology of compact and spongy bone*, in *Principles of Anatomy and Physiology*. 2009, John Wiley & Sons, Inc. p. 180.
6. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., et al., *Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2006. **11**(1): p. E47-51.
7. J. Gordon Betts, K.A.Y., James A. Wise, Eddie Johnson, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Oksana Korol, Jody E. Johnson, Mark Womble, Peter DeSaix, in *Anatomy and Physiology*. Apr 25, 2013, OpenStax, <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/6-4-bone-formation-and-development>.
8. Paiva, K.B. and J.M. Granjeiro, *Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 74-87.
9. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. **42**(6): p. 551-5.
10. *Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "bone remodeling". Encyclopedia Britannica, 16 Feb. 2010, <https://www.britannica.com/science/bone-remodeling>. Accessed 3 May 2023.*
11. Locker, P.H., et al., *Management of Bone Defects in Orthopedic Trauma*. Bull Hosp Jt Dis (2013), 2018. **76**(1): p. 278-284.
12. Masquelet, A.C., *Induced Membrane Technique: Pearls and Pitfalls*. J Orthop Trauma, 2017. **31 Suppl 5**: p. S36-s38.
13. Taylor, B.C., et al., *Treatment of Bone Loss With the Induced Membrane Technique: Techniques and Outcomes*. J Orthop Trauma, 2015. **29**(12): p. 554-7.

14. Mekhail, A.O., et al., *Bone transport in the management of posttraumatic bone defects in the lower extremity*. J Trauma, 2004. **56**(2): p. 368-78.
15. Kocaoglu, M., et al., *Fixator-assisted acute femoral deformity correction and consecutive lengthening over an intramedullary nail*. J Bone Joint Surg Am, 2009. **91**(1): p. 152-9.
16. Ferchaud, F., et al., *Reconstruction of large diaphyseal bone defect by simplified bone transport over nail technique: A 7-case series*. Orthop Traumatol Surg Res, 2017. **103**(7): p. 1131-1136.
17. Campana, V., et al., *Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice*. J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(10): p. 2445-61.
18. Henkel, J., et al., *Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective*. Bone Res, 2013. **1**(3): p. 216-48.
19. Ng, J., et al., *Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2017. **23**(5): p. 480-493.
20. Roseti, L., et al., *Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **78**: p. 1246-1262.
21. Asghari, F., et al., *Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017. **45**(2): p. 185-192.
22. El-Rashidy, A.A., et al., *Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models*. Acta Biomater, 2017. **62**: p. 1-28.
23. Bhattacharjee, P., et al., *Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview*. Acta Biomater, 2017. **63**: p. 1-17.
24. Kang, Z., et al., *Preparation of polymer/calcium phosphate porous composite as bone tissue scaffolds*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **70**(Pt 2): p. 1125-1131.
25. Ma, H., et al., *3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy*. Acta Biomater, 2018. **79**: p. 37-59.
26. Berner, A., et al., *Delayed minimally invasive injection of allogenic bone marrow stromal cell sheets regenerates large bone defects in an ovine preclinical animal model*. Stem Cells Transl Med, 2015. **4**(5): p. 503-12.
27. Bhumiratana, S., et al., *Tissue-engineered autologous grafts for facial bone reconstruction*. Sci Transl Med, 2016. **8**(343): p. 343ra83.
28. Ehrlich, P.J. and L.E. Lanyon, *Mechanical strain and bone cell function: a review*. Osteoporos Int, 2002. **13**(9): p. 688-700.

29. Chen, H.C. and Y.C. Hu, *Bioreactors for tissue engineering*. Biotechnol Lett, 2006. **28**(18): p. 1415-23.
30. Mercado-Pagan, A.E., et al., *Vascularization in bone tissue engineering constructs*. Ann Biomed Eng, 2015. **43**(3): p. 718-29.
31. Zajdel, A., et al., *Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord*. Acta Biochim Pol, 2017. **64**(2): p. 365-369.
32. Graziano, A., et al., *Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration*. Stem Cell Rev, 2008. **4**(1): p. 21-6.
33. De Francesco, F., et al., *Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside*. Tissue Eng Part B Rev, 2015. **21**(6): p. 572-84.
34. Zhan, W., S.S. Tan, and F. Lu, *Adipose-Derived Stem Cell Delivery for Adipose Tissue Engineering: Current Status and Potential Applications in a Tissue Engineering Chamber Model*. Stem Cell Rev Rep, 2016. **12**(4): p. 484-91.
35. *Stem cell fate*. NEJM Illustrated Glossary, Copyright Massachusetts Medical Society, [https://illustrated-glossary.nejm.org/term/mesenchymal\\_stem\\_cell?term=mesenchymal\\_stem\\_cell](https://illustrated-glossary.nejm.org/term/mesenchymal_stem_cell?term=mesenchymal_stem_cell), Access Date 02.09.2019.
36. Bourin, P., et al., *Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. Cytotherapy, 2013. **15**(6): p. 641-8.
37. Li, Y., et al., *Senescence of mesenchymal stem cells (Review)*. Int J Mol Med, 2017. **39**(4): p. 775-782.
38. Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, *Bone tissue engineering: recent advances and challenges*. Crit Rev Biomed Eng, 2012. **40**(5): p. 363-408.
39. Hyun, I., *The bioethics of stem cell research and therapy*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 71-5.
40. Dufrane, D., *Impact of Age on Human Adipose Stem Cells for Bone Tissue Engineering*. Cell Transplant, 2017. **26**(9): p. 1496-1504.
41. Langenbach, F. and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(5): p. 117.

42. Rosen, V., *BMP2 signaling in bone development and repair*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(5-6): p. 475-80.
43. Balmayor, E.R., *Targeted delivery as key for the success of small osteoinductive molecules*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **94**: p. 13-27.
44. Cawthorn, W.P., E.L. Scheller, and O.A. MacDougald, *Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future*. J Lipid Res, 2012. **53**(2): p. 227-46.
45. Di Meo, S., et al., *Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1245049.
46. Brand, M.D., *The sites and topology of mitochondrial superoxide production*. Exp Gerontol, 2010. **45**(7-8): p. 466-72.
47. Antonenkov, V.D., et al., *Peroxisomes are oxidative organelles*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(4): p. 525-37.
48. Tu, B.P. and J.S. Weissman, *The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 983-94.
49. Sun-Wada, G.H., Y. Wada, and M. Futai, *Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase*. Cell Struct Funct, 2003. **28**(5): p. 455-63.
50. Cho, K.J., J.M. Seo, and J.H. Kim, *Bioactive lipoxigenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species*. Mol Cells, 2011. **32**(1): p. 1-5.
51. Newsholme, P., et al., *Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes*. Biochem J, 2016. **473**(24): p. 4527-4550.
52. Kattoor, A.J., et al., *Oxidative Stress in Atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2017. **19**(11): p. 42.
53. Bonaccorsi, G., et al., *Oxidative stress as a possible pathogenic cofactor of postmenopausal osteoporosis: Existing evidence in support of the axis oestrogen deficiency-redox imbalance-bone loss*. Indian J Med Res, 2018. **147**(4): p. 341-351.
54. Quinonez-Flores, C.M., et al., *Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 6097417.
55. Tonnie, E. and E. Trushina, *Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2017. **57**(4): p. 1105-1121.

56. Ohl, K., K. Tenbrock, and M. Kipp, *Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action*. *Exp Neurol*, 2016. **277**: p. 58-67.
57. Sosa, V., et al., *Oxidative stress and cancer: an overview*. *Ageing Res Rev*, 2013. **12**(1): p. 376-90.
58. Alfadda, A.A. and R.M. Sallam, *Reactive oxygen species in health and disease*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 936486.
59. Atashi, F., A. Modarressi, and M.S. Pepper, *The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review*. *Stem Cells Dev*, 2015. **24**(10): p. 1150-63.
60. Mody, N., et al., *Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells*. *Free Radic Biol Med*, 2001. **31**(4): p. 509-19.
61. Chen, C.T., et al., *Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Stem Cells*, 2008. **26**(4): p. 960-8.
62. Liu, G.S., et al., *Redox mechanisms in regulation of adipocyte differentiation: beyond a general stress response*. *Cells*, 2012. **1**(4): p. 976-93.
63. He, L., et al., *Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **44**(2): p. 532-553.
64. Zhang, X., et al., *Cardiac-specific overexpression of catalase rescues ventricular myocytes from ethanol-induced cardiac contractile defect*. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. **35**(6): p. 645-52.
65. Ighodaro, O.M. and O.A. Akinloye, *First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid*. *Alexandria Journal of Medicine*, 2018. **54**(4): p. 287-293.
66. Cavaliere, F., C. Donno, and N. D'Ambrosi, *Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation*. *Front Cell Neurosci*, 2015. **9**: p. 211.
67. Glaser, T., et al., *Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration*. *Purinergic Signal*, 2012. **8**(3): p. 523-37.
68. Kaebisch, C., et al., *The role of purinergic receptors in stem cell differentiation*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2015. **13**: p. 75-84.
69. James, A.W., *Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation*. *Scientifica (Cairo)*, 2013. **2013**: p. 684736.

70. Zippel, N., et al., *Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2012. **21**(6): p. 884-900.
71. Scarfi, S., *Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions*. *World J Stem Cells*, 2014. **6**(2): p. 153-62.
72. Ciciarello, M., et al., *Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages*. *Stem Cells Dev*, 2013. **22**(7): p. 1097-111.
73. Iser, I.C., et al., *Mesenchymal stem cells from different murine tissues have differential capacity to metabolize extracellular nucleotides*. *J Cell Biochem*, 2014. **115**(10): p. 1673-82.
74. Gorzalka, S., et al., *Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues*. *Mol Pharmacol*, 2005. **67**(3): p. 955-64.
75. Katebi, M., M. Soleimani, and B.N. Cronstein, *Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development*. *J Leukoc Biol*, 2009. **85**(3): p. 438-44.
76. Ke, H.Z., et al., *Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(7): p. 1356-67.
77. Elkhenany, H., et al., *Impact of the source and serial passaging of goat mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation potential: implications for bone tissue engineering*. *J Anim Sci Biotechnol*, 2016. **7**: p. 16.
78. Tan, J., et al., *Decreased osteogenesis of adult mesenchymal stem cells by reactive oxygen species under cyclic stretch: a possible mechanism of age related osteoporosis*. *Bone Res*, 2015. **3**: p. 15003.
79. Aspera-Werz, R.H., et al., *Nicotine and Cotinine Inhibit Catalase and Glutathione Reductase Activity Contributing to the Impaired Osteogenesis of SCP-1 Cells Exposed to Cigarette Smoke*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 3172480.
80. Sahlender, B., *Einfluss von oxidativem Stress auf das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen*. 2018.
81. Gardin, C., et al., *Hyperbaric Oxygen Therapy Improves the Osteogenic and Vasculogenic Properties of Mesenchymal Stem Cells in the Presence of Inflammation In Vitro*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(4).

82. Ruiz-Ojeda, F.J., et al., *Impact of 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT)-Derived Increase in Hydrogen Peroxide Levels on Inflammation and Metabolism in Human Differentiated Adipocytes*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0152550.
83. Bai, J. and A.I. Cederbaum, *Mitochondrial catalase and oxidative injury*. Biol Signals Recept, 2001. **10**(3-4): p. 189-99.
84. Tatsumi, T. and K.J. Kako, *Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial enzyme function studied in situ in rat heart myocytes*. Basic Res Cardiol, 1993. **88**(3): p. 199-211.
85. Goyal, M.M. and A. Basak, *Human catalase: looking for complete identity*. Protein Cell, 2010. **1**(10): p. 888-97.
86. Shum, L.C., et al., *Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation*. Stem Cells Dev, 2016. **25**(2): p. 114-22.
87. Nakano, Y., W.N. Addison, and M.T. Kaartinen, *ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures*. Bone, 2007. **41**(4): p. 549-61.
88. Burnstock, G. and G.E. Knight, *Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems*. Int Rev Cytol, 2004. **240**: p. 31-304.
89. Hoebertz, A., et al., *Expression of P2 receptors in bone and cultured bone cells*. Bone, 2000. **27**(4): p. 503-10.
90. Carluccio, M., et al., *Adult mesenchymal stem cells: is there a role for purine receptors in their osteogenic differentiation?* Purinergic Signal, 2020. **16**(3): p. 263-287.
91. Sun, D., et al., *Shockwaves induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through ATP release and activation of P2X7 receptors*. Stem Cells, 2013. **31**(6): p. 1170-80.
92. Noronha-Matos, J.B., et al., *P2X7-induced zeiosis promotes osteogenic differentiation and mineralization of postmenopausal bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. FASEB J, 2014. **28**(12): p. 5208-22.
93. Rodrigues-Ribeiro, R., et al., *Dual role of P2 receptors during osteoblast differentiation*. Cell Biochem Biophys, 2015. **71**(2): p. 1225-33.
94. Du, D., et al., *TNF-alpha suppresses osteogenic differentiation of MSCs by accelerating P2Y2 receptor in estrogen-deficiency induced osteoporosis*. Bone, 2018. **117**: p. 161-170.

95. Noronha-Matos, J.B., et al., *Role of ecto-NTPDases on UDP-sensitive P2Y(6) receptor activation during osteogenic differentiation of primary bone marrow stromal cells from postmenopausal women.* J Cell Physiol, 2012. **227**(6): p. 2694-709.

## **7 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek für die Möglichkeit meine Dissertation im Forschungslabor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie anfertigen zu können.

Zudem danke ich Frau PD Dr. rer. nat. Vera Grotheer für die Betreuung und das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Team des Forschungslabores für die unermüdliche Betreuung und wertvolle Hilfe, allen voran den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Samira Seghrouchni, Frau Jutta Schneider und Frau Christa Wilkens.

Ich danke meiner Familie für das Privileg und die Unterstützung.

Ich bin glücklich so großartige Freunde zu haben – ihnen danke ich besonders für die nötige Motivation.

Der größte Dank gilt meiner Freundin Lisa für das Aushalten meiner Launen.